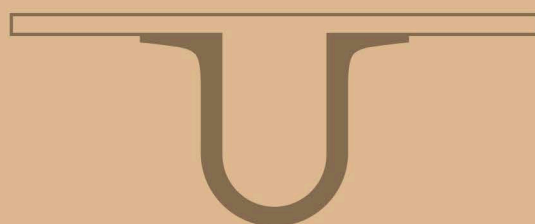




UNIVERSIDADE D
COIMBRA



Patrícia dos Santos

SÍNTESE E ESTUDOS DA ATIVIDADE ANTITUMORAL
DE COMPLEXOS DE RUTÉNIO-SALEN

Dissertação de Mestrado na área científica de Química Medicinal,
orientada pela Professora Doutora Elisa Serra e pela Professora Doutora Ana Salomé Pires
e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra.

Fevereiro de 2019

Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade de Coimbra

SÍNTESE E ESTUDOS DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE COMPLEXOS DE RUTÉNIO-SALEN

Patrícia dos Santos

Dissertação de Mestrado na área científica de Química Medicinal orientada pela Professora Doutora Elisa Serra e pela Professora Doutora Ana Salomé Pires e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

Fevereiro de 2019

*"I'm a great believer in luck.
The harder I work, the more luck I have"*

Coleman Cox

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a uma série de pessoas que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Uma parte do trabalho foi realizada no grupo de Química Orgânica, no Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e outra parte no Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

Gostaria de começar por agradecer à Doutora Maria Elisa Serra, orientadora desta dissertação, por me ter aceite para a realização deste trabalho, por toda a disponibilidade ao longo do tempo, bem como pelos ensinamentos e ajuda prestada nas técnicas laboratoriais. Agradecer pelo apoio e auxílio prestados em todas as fases do desenvolvimento do trabalho, bem como pela ajuda prestada na escrita desta dissertação.

À Doutora Dina Murtinho, agradeço a simpatia e boa disposição a qualquer hora do dia, imprescindíveis para o bom ambiente no laboratório, bem como os conselhos e ensinamentos diários.

À coorientadora deste trabalho, Doutora Salomé Pires, quero desde já agradecer a oportunidade que me ofereceu para realizar parte do trabalho no Instituto de Biofísica, agradecer todos os ensinamentos prestados na área dos testes *in vitro*, nomeadamente de cultura de células. Pela total disponibilidade, pela clarificação de todas as dúvidas e pelo rigor na execução do trabalho experimental. Pelos conselhos, pela paciência e pela amizade. Agradeço também a correção minuciosa desta dissertação, bem como a execução da análise estatística do trabalho prático.

À Doutora Maria Filomena Botelho, agradecer a correção do trabalho bem como a oportunidade de desenvolver a segunda parte do trabalho no Instituto de Biofísica.

À Doutora Margarida Abrantes, agradecer a boa disposição diária e a ajuda na realização dos testes de hemocompatibilidade.

Ao Mestre Paulo Teixeira pelos estudos de morfologia, realizados no Serviço de Anatomia Patológica do Centro Hospitalar Universitário de Coimbra e à Doutora Ana

Cristina Gonçalves, pela realização da técnica de citometria de fluxo, imprescindível neste trabalho.

Ao Mestre Pedro Cruz pelos estudos de ressonância magnética nuclear e ao Mestre Sílvia Gramacho, pela boa disposição e a disponibilidade ao longo do trabalho para a realização da espectroscopia de infravermelho.

Ao grupo de Química Orgânica da Universidade de Coimbra, pela integração no grupo, pela partilha de conhecimentos, pela ajuda e pelo bom ambiente no laboratório. Aos meus amigos de longa data, Juliana Araújo, João Simões e Cláudia Alves que entraram comigo nisto à seis anos, pelo apoio e amizade. Ao Francisco e à Vanessa, por todo o apoio físico e emocional na execução das experiências, pela prontidão e pela simpatia e boa disposição diárias.

Aos colegas do Instituto de Biofísica, mestre Ricardo Teixeira, mestre Rita Neves, mestre Beatriz Serambeque, mestre Beatriz Lopes, Beatriz Ferreira e Rosana Martins agradeço todo o auxílio prestado em laboratório, a transmissão de conhecimento bem como a boa disposição.

Às minhas amigas, àquelas que nunca me falham, Cristiana Costa, Jéssica Pereira e Raquel Sampaio, agradeço todo o apoio e preocupação.

Ao Victor, para o qual as palavras nunca vão chegar. Agradeço pela motivação e apoio em todos momentos. Por fazer com que a distância pareça não existir. Por nunca me deixar desistir. Obrigada por permaneceres.

Por fim, um agradecimento às pessoas mais importantes da minha vida, pai, mãe e irmã, porque sem eles nada disto seria possível. Agradeço o apoio incondicional e a paciência para me aturar nos piores momentos. Por todos os sacrifícios e preocupações. Pela motivação, pela força e também pela compreensão das minhas ausências. Aos meus avós, agradeço o apoio, a motivação e a força que me deram para nunca desistir. Avó, pela tua garra e persistência, por seres a estrela mais brilhante.

Índice

Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
Índice de Esquemas	xv
Abreviaturas	xvii
Resumo	xxi
Abstract	xxv
Introdução	1
1.1 Cancro: definição, causas e conceitos	3
1.1.1 Epidemiologia	5
1.1.2 Cancro da mama	6
1.1.3 Cancro colorretal.....	9
1.2 Quimioterapia	12
1.2.1 Quimioterapia do cancro da mama	13
1.2.2 Quimioterapia do cancro colorretal.....	13
1.2.3 Ciclo celular e fármacos usados em quimioterapia	15
1.3 Complexos metálicos usados em quimioterapia	26
1.3.1 Novos complexos de platina.....	26
1.3.2 Complexos de ruténio	29
1.3.3 Outros complexos metálicos	36
1.4. Complexos metálicos com ligandos salen e salan.....	39
Síntese de Complexos de Ru(II) e Ru(III)	47
2.1 Síntese de ligandos derivados do ácido (+)-canfórico	50
2.1.1 Síntese da diamina derivada do ácido canfórico	51

2.1.2 Síntese do 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído	52
2.1.3 Síntese de salens derivados do ácido (+)-canfórico.....	54
2.1.4 Síntese de salans derivados do ácido (+)-canfórico.....	54
2.2 Síntese de ligandos derivados do ácido <i>L</i> -tartárico.....	55
2.2.1 Síntese da diamina derivada do ácido <i>L</i> -tartárico	56
2.2.2 Síntese do salen derivados do ácido <i>L</i> -tartárico.....	57
2.3 Síntese de complexos metálicos	58
2.3.1 Síntese de complexos de Ru(II) e Ru(III).....	58
2.3.2. Síntese de um complexo de Cu(II)	60
2.4 Conclusão	61
Estudos <i>in vitro</i>	63
3.1 Proliferação celular.....	65
3.2 Viabilidade e morte celular	73
3.3 Avaliação do ciclo celular	78
3.4 Stresse oxidativo.....	80
3.5 Hemocompatibilidade	83
Conclusão	99
Experimental.....	105
5.1 Técnicas de identificação e caracterização	107
5.2 Purificação e secagem dos solventes e reagentes	108
5.3 Métodos sintéticos	109
5.3.1 Síntese de (1 <i>R</i> , 3 <i>S</i>)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano	109
5.3.2 Síntese de (<i>S</i> , <i>S</i>)-2,3- <i>O</i> -isopropilideno-1,4-diaminobutano	110
5.3.3 Síntese de 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído.....	112
5.3.4. Síntese dos salens	113
5.3.5. Síntese dos salans	115
5.3.6 Síntese dos complexos de ruténio	117

5.3.7 Síntese do complexo de Cu(II)	121
5.4 Estudos <i>in vitro</i>	122
5.4.1 Culturas celulares	123
5.4.2 Tratamento com os complexos em estudo	125
5.4.3 Determinação da proliferação celular.....	127
5.4.4 Citometria de fluxo.....	129
5.4.5 Análise da morfologia.....	133
5.4.6 Avaliação do stresse oxidativo por fluorimetria	134
5.4.7 Avaliação da hemocompatibilidade	137
5.4.8 Análise estatística.....	138
Referências	141

Índice de Figuras

Figura 1.1 Resposta de células saudáveis e de células malignas após lesão celular.....	5
Figura 1.2 Representação de tumor a iniciar nos ductos e nas glândulas mamárias..	7
Figura 1.3 Estadiamento do cancro colorretal	10
Figura 1.4 Representação esquemática das diferentes fases do ciclo celular	16
Figura 1.5 Diferentes classes dos fármacos de quimioterapia	17
Figura 1.6 Interações que podem ocorrer entre um agente alquilante e o ADN.	18
Figura 1.7 Ilustração de ligações intracadeia entre a cisplatina e as bases de ADN.....	20
Figura 1.8 Mecanismo de ação do 5-FU.	22
Figura 1.9 Representação esquemática de uma possível via metabólica do CPT-11.	23
Figura 1.10 Estruturas químicas de antraciclinas.....	24
Figura 1.11 Mecanismo de ação dos alcaloides de vinca e dos taxanos.....	25
Figura 1.12 Representação esquemática da expressão do recetor da transferrina em células que sobre-expressam o recetor da transferrina e em células saudáveis.....	31
Figura 1.13 Esquema geral de potenciais mecanismos de ação e transporte dos complexos de ruténio.	33
Figura 1.14 Esquema do possível mecanismo de ação do KP1019.....	35
Figura 1.15 Representação estrutural do RAPTA-C.....	35
Figura 3.1 Curvas de dose-resposta da atividade metabólica nas linhas celulares tumorais dos complexos salen.....	67
Figura 3.2 Curvas de dose-resposta da atividade metabólica nas linhas celulares tumorais dos complexos salen.	69
Figura 3.3 Efeito da atividade metabólica do ligando 2.6 e complexo 2.18	72
Figura 3.4 Viabilidade das linhas celulares tumorais	73
Figura 3.5 Análise morfológica das linhas celulares tumorais.....	76
Figura 3.6 Viabilidade das linhas de tecido saudável	77

Figura 3.7 Ciclo celular das linhas tumorais.....	78
Figura 3.8 Avaliação da produção intracelular de peróxidos	80
Figura 3.9 Avaliação da produção intracelular de radical superóxido	81
Figura 3.10 Avaliação da produção intracelular de GSH	82
Figura 3.11 Quantificação da libertação de hemoglobina.....	83
Figura 5.1 Estrutura química do MTT e dos cristais de formazano resultantes das células metabolicamente ativas.	127
Figura 5.2 Ensaio da anexina.	131

Índice de Tabelas

Tabela 3.1 Valores de IC ₅₀ dos complexos de ruténio salen testados nas linhas celulares tumorais.	68
Tabela 3.2 Valores de IC ₅₀ dos complexos de ruténio salan testados nas linhas celulares tumorais.	70
Tabela 3.3 Valores de IC ₅₀ do complexo 2.18 e dos fármacos usados em quimioterapia convencional.....	71
Tabela 5.1 Valores de IC ₅₀ do complexo 2.18 para as linhas celulares tumorais.	126
Tabela 5.2 Populações celulares possíveis de identificar com recurso à dupla marcação com AnV e IP.....	132

Índice de Esquemas

Esquema 1.1 Síntese de bases de <i>Schiff</i>	39
Esquema 1.2 Bis(salicilideno)etilenodiamina (salen).	40
Esquema 2.1 Síntese do ácido canfórico a partir da cânfora	50
Esquema 2.2 Síntese de (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano	51
Esquema 2.3 Representação mecanística da reação de Schmidt.	52
Esquema 2.4 Síntese de 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído.	53
Esquema 2.5 Representação mecanística da reação de Duff.	53
Esquema 2.6 Síntese dos ligandos salens.	54
Esquema 2.7 Síntese dos ligandos salans.	55
Esquema 2.8 Sequência de reações de síntese de (<i>S,S</i>)-2,3- <i>O</i> -isopropilideno-1,4-diaminobutano.	56
Esquema 2.9 Síntese de (2 <i>S</i> , 3 <i>S</i>)- <i>N,N'</i> -bis[salicilideno]-2,3- <i>O</i> -isopropilideno -1,4-diaminobutano	57
Esquema 2.10 Esquema da síntese dos complexos salen clorados de ruténio	59
Esquema 2.11 Esquema da síntese dos complexos salan clorados de ruténio)	60
Esquema 2.12 Síntese do complexo de Cu(II) a partir do ligando salen	61
Esquema 5.1 Oxidação da sonda DHE pelo radical superóxido	135
Esquema 5.2 Clivada intracelularmente da sonda DCFH ₂ -DA por esterases.....	136

Abreviaturas

5-FU	<i>5-Fluorouracil</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AF	Ácido folínico
AnV	<i>Anexina V</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ARN	Ácido Ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog</i>
BRCA1	<i>Breast cancer gene 1</i>
BRCA2	<i>Breast cancer gene 2</i>
CDH1	<i>Human E-catherin</i>
CHEK2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
DCF	<i>2',7'-dicholorofluorescein</i>
DCH ₂ -DA	<i>2',7'-dicholorohydrofluorescein</i>
DCIS	<i>Ductal carcinoma in situ</i>
DHE	<i>Dihydroethidium</i>
DMF	<i>Dimethylformamide</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ER	<i>Estrogen receptor</i>
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i>
FdUMP	<i>Fluorodeoxyuridine monophosphate</i>
FdUTP	<i>Fluorodeoxyuridine triphosphate</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>

FSC	<i>Forward scatter</i>
FUMP	<i>Fluoruridine monophosphate</i>
FUDP	<i>Fluoruridine diphosphate</i>
FUTP	<i>Fluoruridine triphosphate</i>
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>
HER-2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
HNPCC	<i>Hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>
IC ₅₀	<i>Half maximal inhibitory concentration</i>
IDC	<i>Invasive ductal carcinoma</i>
IGF	<i>Insulin growth factor</i>
ILC	<i>Invasive lobular carcinoma</i>
IP	<i>Iodeto de Propídeo</i>
IV	<i>Infra-vermelho</i>
K-Ras	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LCIS	<i>Lobular carcinoma in situ</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
MSH2	<i>MutS homolog 2</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NOS	<i>Nitrogen oxide species</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PI3KCA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alfa</i>
PR	<i>Progesterone Receptor</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
RAS	<i>Rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RMN ¹ H	<i>Ressonância magnética nuclear protónica</i>
RMN ¹³ C	<i>Ressonância magnética nuclear de carbono 13</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SCC	<i>Side scatter</i>
SOD	<i>Superoxide dismutase</i>

TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
THF	<i>Tetrahydrofuran</i>
TLC	<i>Thin layer chromatography</i>
TMS	<i>Tetramethylsilane</i>
TNM	<i>Tumor node metastasis</i>
TP53	<i>Cellular tumor antigen p53</i>
UGT1A1	<i>Uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

Utilizaram-se as seguintes abreviaturas na espectroscopia de ressonância magnética nuclear protónica:

d – Dupleteo

m – Multipleteo

s – Singuleto

t - Tripleto

Resumo

O cancro da mama e o cancro colorretal são, respetivamente, o segundo e terceiro tipos de cancro com maior incidência e, por isso, estão associados a elevadas taxas de mortalidade em todo o mundo. Embora exista uma série de fármacos quimioterapêuticos usados para o tratamento destas doenças, que incluem os complexos metálicos de platina, as fluoropirimidinas, os taxanos, as antraciclinas, entre outros, de uma forma geral eles apresentam algumas desvantagens. Entre elas, destacam-se os efeitos adversos severos, bem como o desenvolvimento de resistência aos fármacos por parte das células tumorais ao longo da terapêutica. Assim, é fundamental o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais que ultrapassem estes problemas.

Estudos anteriores, realizados na Unidade de Biofísica da Universidade de Coimbra em parceria com o grupo de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade de Coimbra, demonstraram que complexos metálicos salen derivados do ácido (+)-canfórico exibem atividade antitumoral, especialmente complexos metálicos com ligandos di e tetraclorados. Segundo a literatura, complexos de ruténio têm apresentado elevada atividade citotóxica, demonstrando maior seletividade para as células tumorais. A sua menor toxicidade relativamente, por exemplo, aos complexos de platina, torna-os uma alternativa credível e promissora aos fármacos atualmente utilizados em quimioterapia. Neste enquadramento, o objetivo do trabalho descrito nesta dissertação foi sintetizar novos complexos de Ru(III) e Ru(II), com ligandos salen e salen, di e tetraclorados derivados do ácido (+)-canfórico e, recorrendo a estudos *in vitro*, testar a sua atividade antitumoral em linhas celulares de cancro da mama, MCF-7 e HCC1806, e colorretal, LS1034 e WiDr. A finalidade deste estudo passa por perceber se o número de átomos de cloro, o número de oxidação do metal e/ou as alterações

no esqueleto do ligando (ligando salen ou salan) influenciam a atividade citotóxica do complexo.

Na primeira parte do trabalho foi efetuada a síntese dos complexos de ruténio derivados do ácido (+)-canfórico. Esta síntese envolveu inicialmente a preparação da diamina derivada do ácido (+)-canfórico pela reação de *Schmidt*. Depois, a reação da diamina com derivados de salicilaldeído sob irradiação por ultrassons, originou os ligandos salen. Uma vez obtidos os ligandos salen, os mesmos foram reduzidos para obter os correspondentes ligados salan. Para finalizar, os ligandos salen e salan foram complexados com Ru(III) e Ru(II), dando origem aos respetivos complexos de ruténio.

A segunda parte do trabalho envolveu a análise da atividade antitumoral dos complexos de ruténio sintetizados, nas linhas celulares de cancro da mama, MCF-7 e HCC1806, e colorretal, LS1034 e WiDr, através de estudos *in vitro*. Primeiro avaliou-se a atividade antiproliferativa de todos os complexos, e observou-se que todos apresentavam atividade antiproliferativa dependente da concentração de compostos, nas linhas celulares em estudo. No entanto, o complexo mais promissor foi o complexo de Ru(III) do ligando salen tetraclorado, com valores de IC₅₀ que compreendem 2,1-3,7 µM. É muito importante evidenciar que estes valores são inferiores a muitos dos obtidos com fármacos usados atualmente no tratamento quimioterapêutico dos cancros da mama e colorretal. A atividade antiproliferativa promissora deste composto pode ser devida à presença, em simultâneo, de duas características relevantes, a presença dos quatro átomos de cloro, responsáveis por aumentar a lipofilicidade do complexo e, conseqüentemente, a sua captação pela célula tumoral, e o número de oxidação +3, que permite que estes complexos atuem como profármacos.

Com este complexo mais promissor, prosseguiram os estudos de viabilidade e ciclo celular, nos quais se observou uma diminuição da viabilidade celular para todas as linhas celulares, sendo esta mais marcada nas linhas HCC1806 e LS1034, acompanhada de notória morte celular por necrose para a concentração mais elevada e de morte celular por apoptose para a concentração intermédia. Avaliou-se também o stresse oxidativo induzido nas células pelo complexo, através da avaliação da produção de ROS

e da defesa antioxidante GSH. Os resultados indicam que houve alterações a nível de stresse oxidativo, nomeadamente na produção intracelular de peróxidos e superóxidos, e que esta alteração está muito provavelmente relacionada com o tipo de morte celular induzida pelo complexo.

Realizaram-se ainda estudos de seletividade com recurso a duas linhas celulares de tecido saudável: HFF1 e CCD841 CoN. Observou-se que o complexo mais promissor apresentou elevada seletividade para linhas celulares tumorais, visto que não diminuiu de forma considerável a viabilidade das células não tumorais. Para concluir os estudos, avaliou-se a hemocompatibilidade do complexo, por quantificação da hemoglobina libertada. Os resultados revelaram que o complexo não afeta a integridade da membrana dos eritrócitos, facto suportado pela reduzida libertação da hemoglobina para o soro.

Com base nos resultados obtidos, o complexo de Ru(III) tetracolorado salen demonstrou possuir características que o poderão tornar uma alternativa eficaz e segura para o tratamento do cancro da mama e colorretal.

Abstract

Breast cancer and colorectal cancer are, respectively, the second and third most prevalent cancers, and are therefore associated with high mortality rates worldwide. Although there are a number of chemotherapeutic drugs used for the treatment of these diseases, which include platinum metal complexes, fluoropyrimidines, taxanes, anthracyclines, among others, they generally have some disadvantages. These include severe adverse effects as well as the development of resistance to the drugs by the tumor cells throughout the therapy. Thus, the development of new antitumor drugs that will overcome these problems is fundamental.

Previous studies carried out at the Biophysics Unit of the University of Coimbra in partnership with the group of Organic Chemistry of the Department of Chemistry of the University of Coimbra showed that metal complexes derived from (+)-camphoric acid exhibit antitumor activity, especially metal complexes with di- and tetrachlorinated ligands. According to the literature, ruthenium complexes have shown high cytotoxic activity, demonstrating greater selectivity for tumor cells. Their lower toxicity relative to, for example, platinum complexes makes them a credible and promising alternative to currently used chemotherapy drugs. In this context, the objective of the work described in this dissertation was to synthesize new Ru(III) and Ru(II) complexes with di- and tetrachlorinated salen and salan ligands and, using *in vitro* studies, test their anti-tumor activity in breast cancer MCF-7 and HCC1806 cell lines, and in colorectal cancer LS1034 and WiDr cell lines. The purpose of this study is to determine whether the number of chlorine atoms, the oxidation number of the metal and / or changes in the backbone of the ligand (salen or salan ligand) influence the cytotoxic activity of the complex.

In the first part of the work the synthesis of ruthenium complexes derived from camphoric acid was carried out. This synthesis initially involved the preparation of the diamine derived from (+)-camphoric acid through the Schmidt reaction. The subsequent reaction of the diamine with salicylaldehyde derivatives under ultrasound irradiation gave the salen ligands. These ligands were reduced to give the corresponding salan ligands. Finally, the salen and salan ligands were complexed with Ru(III) and Ru(II), giving rise to the corresponding ruthenium complexes.

The second part of the work involved the analysis of the antitumor activity of the ruthenium complexes that were synthesized, in the breast cancer cell lines, MCF-7 and HCC1806, and colorectal cancer cell lines LS1034 and WiDr, by *in vitro* studies. The antiproliferative activity of all the complexes was first evaluated and all of them showed antiproliferative activity in the cell lines under study, dependent on the concentration of compounds. However, the most promising complex was the Ru(III) complex of the tetrachlorinated salen ligand, with IC_{50} values of 2.1-3.7 μ M. It is very important to note that these values are lower than many of those obtained with drugs currently used in the chemotherapeutic treatment of breast and colorectal cancers. The promising antiproliferative activity of this compound can be due to the simultaneous presence of two relevant characteristics, the presence of the four chlorine atoms, responsible for increasing the lipophilicity of the complex and, consequently, its uptake by the tumor cell, and the oxidation number +3, which allows these complexes to act as prodrugs.

With this most promising complex, viability and cell cycle studies were undertaken, in which a decrease in cell viability was observed for all cell lines, which was more marked in the HCC1806 and LS1034 cell lines, accompanied by cell death by necrosis for the highest concentration and cell death by apoptosis for the intermediate concentration. The oxidative stress induced in the cells by the complex, was also determined through the evaluation of ROS production and GSH antioxidant defense. The results indicate that there were alterations in oxidative stress, namely in the intracellular production of peroxides and superoxides, and that this alteration is most probably related to the type of cell death induced by the complex.

Selective studies were also performed using two healthy tissue cell lines: HFF1 and CCD841 CoN. It was observed that the most promising complex showed high selectivity for tumor cell lines, since it did not significantly decrease the viability of non-tumor cells. To conclude the studies, the hemocompatibility of the complex was assessed by quantifying the released hemoglobin. The results revealed that the complex does not affect the erythrocyte membrane integrity, supported by the reduced release of hemoglobin to the serum.

Based on the results obtained, the tetrachlorinated salen Ru(III) complex has been shown to have characteristics that may make it an effective and safe alternative for the treatment of breast and colorectal cancer.

CAPÍTULO I

Introdução

1. Introdução

1.1 Cancro: definição, causas e conceitos

O nosso organismo é constituído por vários tipos de células que possuem mecanismos moleculares dependentes de genes responsáveis por regular o crescimento, a diferenciação e a morte celular.[1] Cada organismo é o resultado de um equilíbrio entre a proliferação celular e a morte celular, em que esta última ocorre quando as células apresentam anomalias ou deixam de ser necessárias ao organismo.[2] As neoplasias surgem quando este equilíbrio se desregula, isto é, quando surgem alterações no material genético da célula (mutações) que não se conseguem corrigir.[1] Tais mutações podem estar relacionadas com um aumento da estimulação da divisão celular, a nível dos proto-oncogenes, ou relacionadas com a diminuição dos mecanismos que impedem a divisão celular, a nível dos genes supressores tumorais.[1–3]

Os proto-oncogenes são genes que estão envolvidos no estímulo da divisão celular e que estão normalmente inativos nas células que não precisam de se dividir.[4] Por outro lado, os genes supressores tumorais são genes que, apesar de estarem envolvidos no desenvolvimento das células, têm um efeito contrário aos proto-oncogenes pois inibem a divisão celular e estão normalmente ativos. Ao serem sujeitos a um agente mutagénico, os proto-oncogenes podem alterar-se tornando-se ativos (oncogenes), estimulando a permanente divisão celular, enquanto os genes supressores tumorais podem tornar-se inativos, deixando de inibir a proliferação celular.[1,2]

A grande maioria dos cancros ocorre devido a fatores ambientais (90-95%), e apenas uma minoria (5-10%) se deve a fatores hereditários.[5] É esperado que a ocorrência de cancro aumente com o envelhecimento da população e com a prevalência de

fatores de risco, como por exemplo o tabagismo, os maus hábitos alimentares, a obesidade, as infecções por alguns vírus e bactérias e a exposição a radiações.[6] No entanto, as mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio Homem, como os hábitos e os estilos de vida, determinam os diferentes tipos de cancro.[4] Por exemplo, o cancro do pulmão é o tipo de cancro mais incidente e com maior taxa de mortalidade em homens e em mulheres sobretudo devido à dinâmica da epidemia tabágica.[7]

Em organismos saudáveis, as células possuem vários mecanismos para se protegerem de diversas lesões e impedirem que as células proliferem de forma inadequada. Um exemplo são os *checkpoints* do ciclo celular, através dos quais as células não progridem caso existam erros no ADN.[1,2] No entanto, algumas células conseguem evitar esses controlos celulares. Tal facto leva a uma acumulação excessiva de mutações nas células que pode resultar na sua transformação maligna (Figura 1.1).[1] As células malignas, possuidoras de um comportamento anormal, multiplicam-se de forma descontrolada formando uma massa de células. A manutenção e a acumulação dessa massa celular formam o tumor maligno que, ao proliferar, pode adquirir a capacidade de invadir inicialmente os tecidos circundantes e, numa fase mais avançada da doença, invadir os vasos sanguíneos ou linfáticos. Simultaneamente, as células tumorais são capazes de produzir fatores de crescimento angiogénico, de tal modo que se forma uma rede de neovasos. Outra particularidade das células malignas, é a sua capacidade de se desprenderem da massa original e de migrar para longe. Os neovasos e a invasão vascular pelas células tumorais pode promover a disseminação do tumor permitindo que as células tumorais alcancem órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando metástases.[4,8,9] Conforme as células tumorais vão substituindo as normais, os tecidos invadidos vão perdendo as suas funções, podendo levar a uma falência do órgão ou, em casos mais graves, levar à morte do doente.[4]

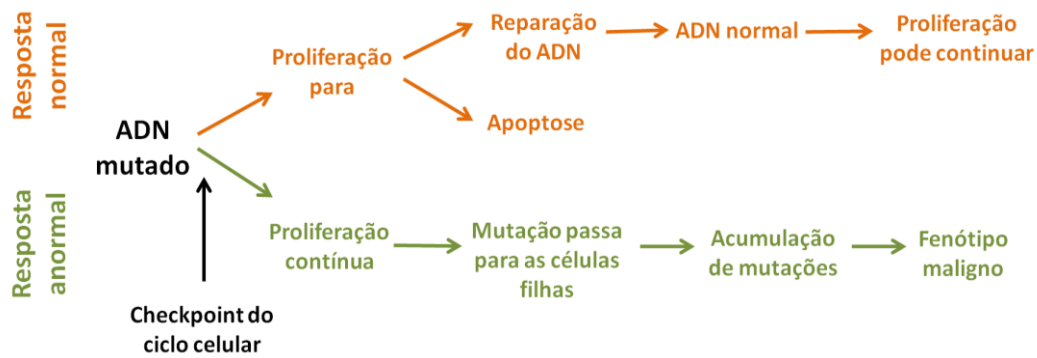


Figura 1.1 Resposta de células saudáveis (em cima) e de células malignas (em baixo) após lesão celular.[1] Quando o ADN é mutado, as células normais possuem mecanismos de defesa que permitem a paragem da proliferação celular e a reparação das lesões e, caso não seja possível a sua reparação, é induzida apoptose da célula mutada. Por outro lado, as células malignas em situações de mutação apresentam um comportamento anormal, não conseguem parar o ciclo celular para reparar a lesão, há passagem das mutações para as células filhas obtendo-se, com o passar do tempo, uma acumulação de mutações e um fenótipo maligno.

1.1.1 Epidemiologia

O cancro é a segunda maior causa de morte em todo o mundo.[10] Mesmo nos países em desenvolvimento o cancro é considerado uma causa fundamental de morbilidade e de mortalidade, pelo que é abordado como uma das maiores problemáticas da sociedade.[11]

Segundo a Organização Mundial de Saúde cerca de 14 milhões de novos casos de cancro ocorrem anualmente. No presente ano, a doença será responsável por causar cerca de 9,6 milhões de mortes globalmente, sendo os tipos de cancro que causaram mais mortes os cancros do pulmão (1,8 milhares de mortes), colorretal (862 mil mortes), do estômago (783 mil mortes), do fígado (782 mil mortes) e da mama (627 mil mortes). Estes correspondem também aos tipos de cancro mais incidentes, acrescentando o cancro da pele e da próstata e excluindo o cancro do fígado. Globalmente, aproximadamente 1 em cada 6 mortes é causada por cancro.[12] Em relação às diferenças de género, das quase 9 milhões de mortes por cancro, aproximadamente 5 milhões correspondem a homens e 3,8 milhões a mulheres, sendo o cancro do pulmão o mais mortal em homens e o cancro da mama em mulheres.[10]

Em Portugal, em 2014, cerca de 26 mil pessoas foram vítimas da doença. O número de mortes foi mais elevado no género masculino e em idades iguais ou superiores a 65 anos.[13] Prevê-se que em 2035 a incidência de cancro seja perto de 60 mil, devido ao envelhecimento e às modificações do estilo de vida da população.[14] O cancro do pulmão é o mais letal em Portugal, e foi responsável por 3927 óbitos em 2014.[15] Para o género masculino os tipos de cancro mais frequentes em Portugal são o cancro da próstata, seguido do colorretal e do pulmão. Para o género feminino o cancro da mama é o mais incidente, seguido do colorretal e do cancro do colo do útero.[16] Relativamente à mortalidade, em 2014 no género masculino o cancro do pulmão foi o tipo mais mortal, seguido da próstata e do colorretal. Na mulher, o cancro da mama seguido do colorretal e do estômago foram os mais letais.[15]

Esta dissertação resultou da continuidade de trabalhos anteriores, em que foram usadas linhas celulares do cancro da mama e do cancro colorretal para estudos *in vitro*. O racional da escolha destas linhas celulares foi a elevada necessidade da descoberta de novos compostos quimioterapêuticos para estes dois tipos de cancro, devido às suas elevadas incidências. Para completar esses resultados, no trabalho descrito nesta dissertação usaram-se as mesmas linhas celulares.

Em seguida são abordados alguns conceitos sobre os cancros da mama e colorretal, nomeadamente fatores de risco, causas e fármacos quimioterapêuticos usados em cada uma das patologias.

1.1.2 Cancro da mama

O cancro da mama é um dos tipos de cancro mais comuns e é uma das principais razões da elevada taxa anual de mortalidade entre as mulheres. Esta doença ocorre maioritariamente nas mulheres mas também pode ocorrer no homem, embora representando apenas 1% de todos os cancros da mama.[17,18] Devido à elevada prevalência e à severidade da doença, o cancro da mama é um problema de grande importância para a sociedade atual.

Muitos fatores que aumentam o risco de cancro de mama não são modificáveis, como a idade, a história familiar, a menarca precoce e a menopausa tardia. Por outro lado, a obesidade pós-menopausa, o uso de hormonas combinadas de estrogénio e progesterona após a menopausa, o consumo de álcool e a ausência de amamentação após parto constituem alguns dos fatores de risco modificáveis do cancro da mama.[19]

A maioria dos cancros da mama desenvolve-se nas glândulas produtoras de leite do tecido mamário denominados lóbulos, ou nos ductos, que são canais que ligam os lóbulos ao mamilo (Figura 1.2) devido a uma permanente estimulação de fatores carcinogénicos.[20]

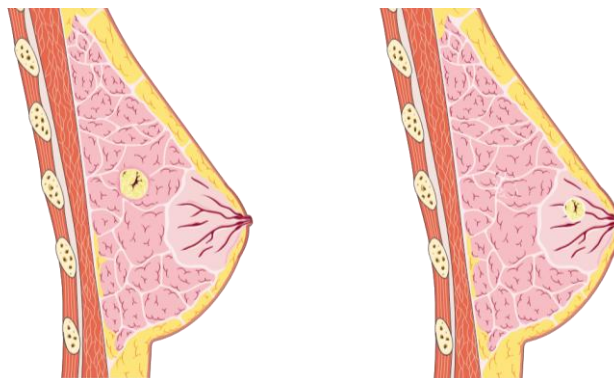


Figura 1.2 À esquerda representação de tumor (em redondo, a amarelo) a iniciar nos ductos e à direita representação do tumor (a amarelo) a iniciar nas glândulas mamárias. Elaborado com recurso a Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Embora o cancro da mama seja geralmente referido como uma doença singular, atualmente comporta um grupo diverso de lesões que diferem no grau histológico do tumor. Os carcinomas da mama podem ser divididos em dois grupos principais. O primeiro corresponde aos cancros não invasivos e divide-se em carcinoma ductal *in situ* (DCIS, do inglês *ductal carcinoma in situ*) e carcinoma lobular *in situ* (LCIS, do inglês *lobular carcinoma in situ*), nos quais as células do tumor se mantêm confinadas aos ductos ou lóbulos, respetivamente, e não invadem o estroma circundante. O segundo corresponde aos cancros invasivos e constitui cerca de 70% dos cancros da mama.

Neste último grupo de tumores, as células têm capacidade de atravessar as paredes dos gânglios ou ductos onde se desenvolveram e, crescerem no tecido mamário circundante. O carcinoma ductal invasivo (IDC, do inglês *invasive ductal carcinoma*) tem início nos canais de leite, enquanto o carcinoma lobular invasivo (ILC, do inglês *invasive lobular carcinoma*) tem início nas glândulas de produção de leite. Ambos têm potencial para se propagar a qualquer parte do corpo.[21,22]

Mutações em proto-oncogenes ou genes supressores tumorais têm um papel relevante na indução e na progressão do cancro.[1] No caso do cancro da mama, o proto-oncogene afetado mais conhecido é o *HER-2* (do inglês *human epidermal growth factor receptor-type 2*), o qual regula o crescimento e a proliferação das células. Caso este proto-oncogene sofra uma mutação (causa esporádica), transforma-se no oncogene *HER-2* que promove o crescimento e a divisão celular de forma descontrolada. A sobre-expressão da proteína HER-2 ocorre em cerca de 20% dos casos de cancro da mama.[23] Relativamente aos genes supressores tumorais, mutações no gene *TP53* ocorrem em cerca de 30% dos casos de cancro da mama.[24] Este gene é responsável por, em células normais com ADN danificado, parar a proliferação e corrigir a lesão e, se a célula não consegue reparar a lesão, o gene aciona os sinais de indução de apoptose. Caso o gene *TP53* mutado seja herdado, causa uma síndrome chamada *Lifraumeni*, que predispõe ao cancro em idade precoce.[23] Para além destes, existem muitos outros genes envolvidos em mutações causadores de cancro da mama de forma esporádica, como por exemplo *PI3KCA*, *GATA3*, *IGF* e *VEGF*. [23,25]

O cancro da mama de causa hereditária inclui apenas 5-10% dos casos da doença. Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* ocorrem em grande parte dos casos hereditários.[26] Estes genes são genes supressores tumorais e as proteínas codificadas por estes genes participam na sinalização do ADN danificado. Quando ocorrem mutações nestes genes, existe perda de controlo do ciclo celular responsável por promover o desenvolvimento neoplásico. Alterações noutros genes, por exemplo, *TP53*, *PTEN*, *CHEK2*, *ATM*, e *CDH1* também são associados à doença hereditária, porém são menos comuns.[22,26]

Uma característica importante de algumas células tumorais de cancro da mama é a presença de recetores de estrogénio (ER-positivo) e de progesterona (PR-positivo), responsáveis por mediar o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência destas células.[22] Os estrogénios têm um papel importante no desenvolvimento e na progressão da doença que é refletido em três fatores de risco que incluem a idade da primeira menstruação (menarca), a idade da menopausa e existência de obesidade após menopausa. A exposição a estrogénios determina o risco de cancro da mama porque estes aumentam as taxas de proliferação celular. Por esta razão, a menarca precoce, a menopausa tardia e, especialmente, a obesidade após a menopausa (tecido adiposo é fonte de estrogénio endógeno) são fatores de risco para o cancro de mama.[23] Tais fatores estão fortemente associados ao risco de cancro da mama ER-positivo, (cerca de 60% dos casos), enquanto os fatores de risco para o cancro da mama ER-negativo estão mais associados a mecanismos não-hormonais.[21]

1.1.3 Cancro colorretal

O cancro colorretal é uma das principais causas de morte, especialmente em países desenvolvidos e industrializados.[3,27] Este tipo de cancro desenvolve-se no cólon ou no reto, dois segmentos pertencentes ao intestino grosso. A maioria dos casos de cancro colorretal são provenientes de pólipos adenomatosos benignos pré-existentes que progridem para cancros invasivos.[3]

O cancro colorretal é predominantemente uma doença de indivíduos mais velhos, na medida em que cerca de 90% dos casos são diagnosticados com idade superior a 50 anos.[8] Para além disso, vários fatores ambientais, principalmente relacionados com a dieta e com o estilo de vida, parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de cancro colorretal.[3] Indivíduos que sigam uma dieta rica em fibras, frutas, vegetais e baixa gordura animal têm em média menor risco de desencadear a doença.[8]

O cancro colorretal é classificado em diferentes estádios. Segundo a classificação TNM (do inglês *tumor node metastasis*), tumores que estão confinados à parede do cólon (estádio I e II) são tratáveis, mas, caso não sejam tratados podem estender-se para os gânglios linfáticos regionais (estádio III) e, numa fase mais avançada, podem disseminar-se para outros órgãos através do processo de metastização (estádio IV), sendo estes últimos normalmente incuráveis (Figura 1.3).[28]

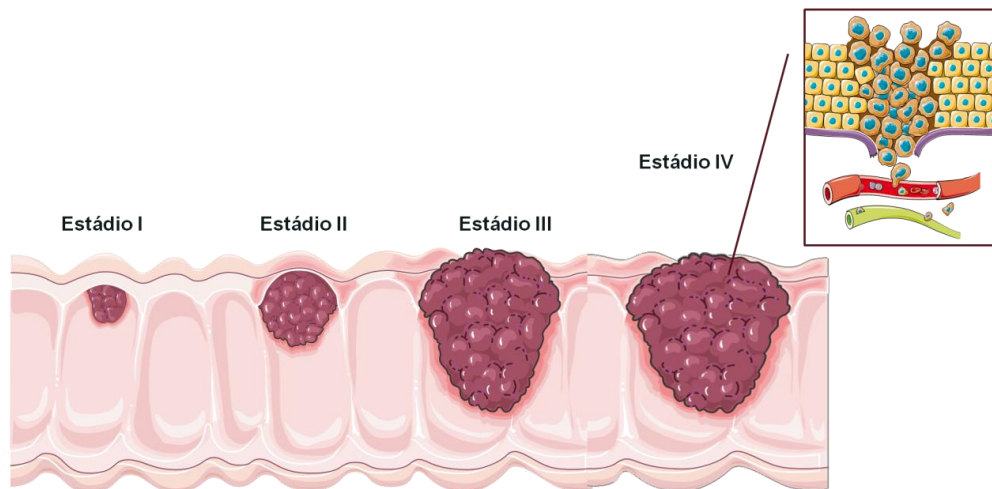


Figura 1.3 Estadiamento do cancro colorretal. Nos estádios I e II o tumor encontra-se confinado à parede do cólon; no estágio III o tumor propaga-se para os gânglios linfáticos regionais; e no estágio IV o tumor apresenta metástases para outros órgãos. Elaborado com recurso a Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

Como explicado anteriormente, o cancro resulta de uma série de alterações genéticas que induzem perda progressiva do controlo normal do crescimento e da diferenciação celular.[3,8] A ativação de vias oncogénicas, a inativação de genes supressores tumorais e a sobre-expressão de fatores de crescimento são algumas causas que despoletam o processo de carcinogénese do cancro colorretal.[29]

Vários oncogenes desempenham papéis fundamentais na promoção do cancro colorretal. O principal é o oncogene *K-RAS* (do inglês *kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) que se encontra mutado em aproximadamente metade de todos os cancros colorretais.[27] Este gene está envolvido na transdução de sinais de crescimento celular e, caso esteja mutado, induz sinais de crescimento celular sucessivo. Outros oncogenes frequentemente identificados nesta doença incluem o *BRAF* (do inglês *v-raf*

murine sarcoma viral oncogene homolog B1) e o *PI3KCA* (do inglês *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alfa*).[27,30][29] Mutações no BRAF e no K-RAS induzem a via de sinalização MAPK (do inglês *Mitogen-activated protein kinase*) enquanto mutações no PI3KCA induzem perda da proteína PTEN (do inglês *phosphatase and tensin homolog*), que é um inibidor da via de sinalização PI3K (do inglês *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*).[29]

Relativamente aos genes supressores tumorais, há uma série deles que desempenham um papel importante no cancro colorretal.[8] Mutações no gene *APC* (do inglês *adenomatous polyposis coli gene*) foram encontradas em 75% dos casos esporádicos de cancro colorretal. Esta mutação inativa o gene que codifica a proteína APC (do inglês *adenomatous polyposis coli*).[31] Esta proteína é responsável por regular a via de sinalização Wnt, importante na regulação e no desenvolvimento celular, através da modulação da β -catenina. Normalmente, o produto proteico do gene *APC* interage com a β -catenina formando o complexo β -catenina-Wnt, responsável por inibir a função da β -catenina. Mutações neste gene induzem a sobre-expressão de β -catenina e, consequentemente, o crescimento e a proliferação celular descontrolados. Desta forma, há uma acumulação de células que podem impulsionar a iniciação de cancro colorretal.[8,30,31] Por outro lado, as mutações *APC* podem ser germinativas dando origem à polipose adenomatosa familiar (FAP, do inglês *familial adenomatous polyposis*) que é uma síndrome hereditária que induz o desenvolvimento de múltiplos pólipos adenomatosos. Pessoas portadoras do gene *APC* mutado apresentam risco de quase 100% de desenvolver pólipos até aos 40 anos.[30] Um outro gene supressor tumoral é o gene *TP53* (do inglês *celular tumor antigen p53*). O *TP53* é um gene que facilita a reparação do ADN e, quando a mesma não é viável, induz apoptose. A inativação de *TP53* é encontrada em até 75% de tumores colorretais esporádicos.[8,30,31]

Embora a maioria dos cancros colorretais sejam esporádicos, existe uma proporção significativa (5-6%) que tem um histórico genético claro, como é o caso do cancro colorretal hereditário sem polipose (HNPCC, do inglês *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*), também conhecido como síndrome de Lynch,[27] que afeta entre 2-

4% dos casos de cancro colorretal. Esta patologia não se origina a partir de pólipos, como é comum noutros casos de cancro colorretal. Doentes com HNPCC possuem uma mutação nos genes de reparação do ADN (principalmente *MLH1* e *MSH2*) e possuem em média cerca de 80% de risco de desenvolver cancro colorretal até aos 45 anos.[27,30]

Por último, os fatores de crescimento também têm um papel importante no desenvolvimento de cancro colorretal. A proteína EGF (do inglês *epidermal growth factor*) e o seu recetor EGFR (do inglês *epidermal growth factor receptor*), são encontrados em vários subgrupos deste tipo de cancro, em que o recetor medeia a sinalização através da ativação das cascatas de sinalização MAPK e PI3K. O VEGF (do inglês *vascular endothelial growth factor*) é outro fator de crescimento associado à angiogénese que também está associado ao cancro colorretal.[29]

1.2 Quimioterapia

Existem três tipos principais de tratamento para o cancro: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A cirurgia e a radioterapia são essencialmente tratamentos locais direcionados ao tumor primário, enquanto a quimioterapia é um tratamento sistémico capaz de atuar no tumor primário, e para além disso, tratar metástases.[32] Para além de ser uma das principais metodologias antineoplásicas, pode ser usada como tratamento curativo, embora resulte apenas numa minoria de cancros, ou como tratamento paliativo para ajudar a controlar a doença e os sintomas o maior tempo possível.[33] Para além disso, isoladamente, a quimioterapia pode ser usada como tratamento neoadjuvante para diminuir o tamanho do tumor, ou como tratamento adjuvante para erradicar a doença e para prevenir a recorrência e a capacidade de formação de metástases.[4,34,35]

1.2.1 Quimioterapia do cancro da mama

No que diz respeito ao cancro da mama, a quimioterapia neoadjuvante habitualmente reduz o tamanho do tumor em 80-90% das doentes e induz reposta patológica em 20% dos doentes, quando é feita recorrendo ao tratamento combinado de taxanos (paclitaxel e docetaxel) e antraciclina (epirrubina e doxorubicina). Tal terapia pode ser usada tanto em estádios iniciais como avançados do tumor. A quimioterapia adjuvante, que tem a finalidade de prevenir a recorrência por micrometástases, dispõe de um espetro mais avançado de fármacos, como antraciclina, taxanos, mostardas nitrogenadas (ciclofosfamida), antimetabolitos (metotrexato e 5-fluorouracilo (5-FU)) que podem ser administrados individualmente ou combinados entre si. Relativamente à quimioterapia paliativa, o tratamento para o cancro da mama metastático mais utilizado é também à base de antraciclina e de taxanos em monoterapia ou combinados com outros fármacos. Em doentes com recorrência tumoral precoce após a quimioterapia adjuvante com antraciclina e taxanos usam-se outros fármacos como capecitabina (fluoropirimidina), gemcitabina (antimetabolito), vinorelbina (alcaloide de vinca), derivados de platina e mitomicina C (antibiótico), entre outros.[36]

Outra abordagem é o tratamento dirigido a alvos moleculares através, por exemplo, de anticorpos monoclonais, como o trastuzumab, um anticorpo monoclonal dirigido ao HER-2. A sobre-expressão de HER-2 em doentes de cancro da mama tem valor prognóstico e preditivo e o resultado positivo, que ocorre em cerca de 15-20% dos cancros da mama, seleciona as doentes para tratamento com trastuzumab. O tratamento consiste na inibição da proliferação das células do cancro da mama que sobre-expressam HER-2.[36]

1.2.2 Quimioterapia do cancro colorretal

É importante distinguir os diferentes estádios do cancro colorretal para facilitar a determinação de uma melhor terapêutica a usar e, consequentemente, melhor prognóstico.[37] Quando o cancro colorretal é diagnosticado numa fase precoce (estádio I),

as probabilidades de cura completa são grandes. No entanto, aproximadamente metade dos doentes desenvolvem metástases (estádio IV) e a maioria desses doentes apresenta um tempo de sobrevida geralmente baixo (cerca de 1 ano). Nestes casos, a quimioterapia é a base do tratamento na melhoria da qualidade de vida e no aumento do tempo de sobrevida.[37–39] Para além disso, a quimioterapia do cancro colorretal também é, frequentemente, utilizada no tratamento neoadjuvante e adjuvante da doença.[34]

O tratamento adjuvante do cancro colorretal tem sido, até recentemente, amplamente dependente da quimioterapia à base de fluoropirimidinas (como o 5-FU), administradas oral ou intravenosamente.[35,38,39] O fármaco de biomodulação mais extensamente utilizado em combinação com 5-FU é a leucovorina, também conhecido como ácido folínico (AF). Tal combinação melhora significativamente as taxas de resposta em doentes com cancro colorretal.[39] Fármacos citotóxicos descobertos mais recentemente, como o irinotecano e a oxaliplatina, são também amplamente utilizados. Tais compostos são usados como tratamento de segunda linha em doentes que apresentam resistência ao 5-FU em estádios iniciais da doença, mas também em combinação com o 5-FU e com a leucovorina como terapia inicial para cancro colorretal metastático.[35,38] Como agente único, a oxaliplatina tem apenas uma atividade modesta no cancro colorretal avançado, com uma taxa de resposta global de cerca de 10% em doentes resistentes às fluoropirimidinas. Quando usada em combinação com 5-FU, a taxa de resposta global é bastante superior, entre os 46 e os 58%.[39] O irinotecano, quando avaliado como terapia combinada de primeira linha para a doença em estágio avançado, apresenta uma taxa de resposta superior (cerca de 50%) em relação à monoterapia baseada em 5-FU (resposta de aproximadamente 28%).[35,39] A combinação de dois fármacos citotóxicos é mais ativa, como abordagem de primeira linha de cancro colorretal metastático, do que o tratamento à base de 5-FU/ leucovorina isoladamente. A combinação do 5-FU, leucovorina e oxaliplatina (FOLFOX) é a escolha mais comum para uma primeira linha de tratamento que, no caso de insucesso é substituída pela combinação 5-FU, leucovorina e irinotecano (FOLFIRI), como segunda linha de tratamento. As combinações FOLFOX e FOLFIRI, embora disponham de uma atividade semelhante, apresentam um perfil de segurança diferente.[38,40] A administra-

ção dos três fármacos citotóxicos disponíveis 5-FU/leucovorina, irinotecano e oxaliplatina (FOLFOXIRI) na doença metastática também é possível e aumenta a sobrevivência global.[38]

Anticorpos monoclonais como o bevacizumab (inibidor do recetor do fator de crescimento epidérmico: anti-EGFR) e o cetuximab (inibidor do fator de crescimento endotelial vascular: anti-VEGF) também têm sido administrados em casos avançados de cancro colorretal (estádio IV).[34,38,40]

1.2.3 Ciclo celular e fármacos usados em quimioterapia

Como abordado anteriormente, existem diversos mecanismos que estão envolvidos na transformação de uma célula normal em uma célula potencialmente maligna. A maior parte deles interferem na divisão celular e, portanto, o conhecimento do ciclo celular e dos seus mecanismos é importante para compreender a etiologia do cancro.[4] A divisão celular envolve quatro fases, G_1 , S, G_2 e M (Figura 1.4). A fase G_1 é a primeira fase de crescimento e síntese de proteínas. Nesta fase, as células preparam-se para a replicação do ADN que ocorre na fase seguinte, denominada fase S. A fase G_2 ocorre entre o fim da replicação de ADN e o começo da mitose e corresponde à continuação da síntese de proteínas e ARN iniciada em G_1 . A mitose ou a divisão celular ocorre durante a fase M, em que a célula se divide em duas células-filhas, iguais entre si e cada uma com a mesma quantidade de material genético que a célula-mãe. No final da fase M as células ou voltam a entrar no ciclo celular em G_1 para sofrer mais maturação e replicação, ou aguardam ativação repousando na fase G_0 . Na fase G_0 as células são consideradas estar fora do ciclo celular porque não estão a passar pelo processo de divisão celular.[4,41] As células podem permanecer na fase G_0 por diferentes períodos de tempo e, dependendo das necessidades do organismo, ou são recrutadas de volta para a fase G_1 ou, eventualmente, sofrem morte celular programada (apoptose).[42]

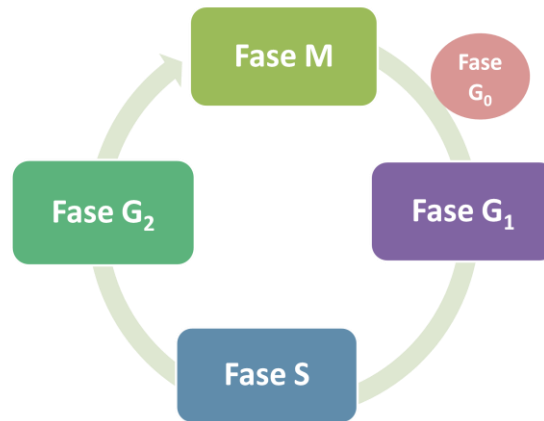


Figura 1.4 Representação esquemática das diferentes fases do ciclo celular. Este ciclo tem início na fase G₁, onde ocorre crescimento e síntese de proteínas seguido da fase S responsável pela síntese do ADN. Segue-se a fase G₂ onde se dá a continuação da síntese de proteínas e ARN e, por fim, a fase M correspondente à mitose na qual se verifica a divisão do material genético. A fase G₀ é a fase onde as células repousam e esperam ativação para a fase G₁. [4]

A função dos fármacos de quimioterapia é interromper o ciclo celular e causar morte das células. Esta interação com o ciclo celular ocorre tanto em células tumorais como em células saudáveis, no entanto, elas diferem entre si porque, as últimas possuem maior capacidade de reparação de danos do que as primeiras, o que resulta numa maior acumulação de lesões nas células tumorais. [34]

Os fármacos quimioterapêuticos podem ser classificados de duas maneiras, ou pelas suas propriedades bioquímicas ou pela sua especificidade para o ciclo celular. Relativamente à especificidade para o ciclo celular, os antineoplásicos podem ser específicos para o ciclo celular, quando têm o seu efeito numa fase particular do mesmo (fig. 1.4), ou podem não ser específicos, quando afetam as células em qualquer fase, incluindo a fase de repouso (G₀). [34,42] As células tumorais são caracterizadas por divisão celular rápida e descontrolada. Para fármacos específicos do ciclo celular, as células que proliferam mais ativamente (normalmente as tumorais) são as mais vulneráveis à quimioterapia. Por outro lado, o impacto da quimioterapia é também observado em células normais que possuem alta taxa mitótica, como é o caso dos folículos capilares, das células de revestimento da mucosa do trato gastrointestinal e das células da medula óssea. [33,43] Daí resulta a indução de uma grande variedade de efeitos secundários por parte dos fármacos quimioterapêuticos que podem incluir

náuseas, vômitos, distúrbios gastrointestinais, queda de cabelo, anemia entre outros.[34,41,43]

Quanto às propriedades bioquímicas os fármacos quimioterapêuticos são divididos em diferentes classes conforme o seu mecanismo de ação.[34] As principais classes são os agentes alquilantes, os antimetabolitos, os inibidores da topoisomerase I e II, os antibióticos antitumorais e os fármacos citotóxicos que interferem com a tubulina (Figura 1.5).[34] Seguidamente são descritas as classes de citotóxicos que são atualmente mais utilizados na terapêutica do cancro da mama e do cancro colorretal, sendo descrito o seu mecanismo de ação e respetivos efeitos farmacológicos.

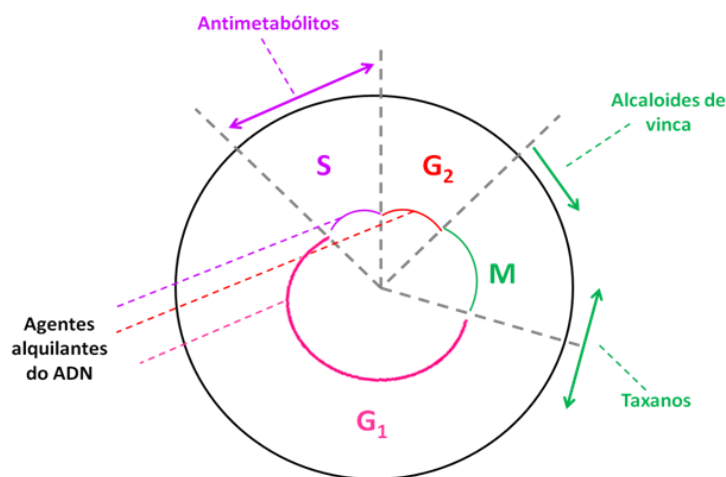


Figura 1.5 Diferentes classes dos fármacos de quimioterapia relacionados com as diferentes fases do ciclo celular.[43]

1.2.3.1 Agentes alquilantes

Os agentes alquilantes são uma classe de fármacos eletrofílicos que reagem com o ADN através da formação de ligações covalentes.[41,43] São compostos altamente reativos com capacidade de introduzir grupos alquilo em locais nucleofílicos do ADN e consequentemente formar ruturas numa ou nas duas cadeiras do ADN, pela formação de ligações intra ou intercadeia, respetivamente (Figura 1.6).[44] Para além destas, ainda existem as ligações interhélicas, responsáveis pela existência de alquila-

ção de dois filamentos de hélices de ADN diferentes. Estas ligações produzem lesões no ADN que muitas vezes conduzem à morte celular.[4]

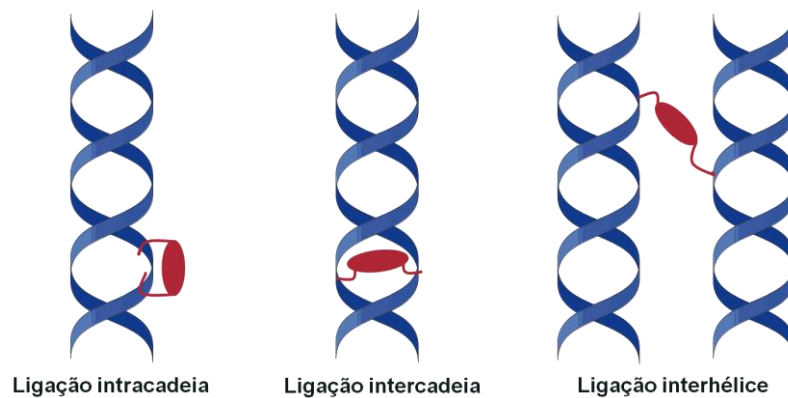


Figura 1.6 Interações que podem ocorrer entre um agente alquilante e o ADN.[4] À esquerda está representada uma ligação intracadeia, em que há alquilação apenas de um único filamento do ADN. No meio, a ligação intercadeia, responsável pela alquilação de dois filamentos do ADN. E à direita está representada a ligação interhélices, em que há alquilação de dois filamentos de hélices diferentes do ADN. Elaborado com recurso a Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

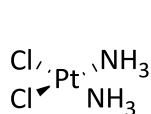
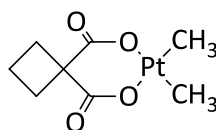
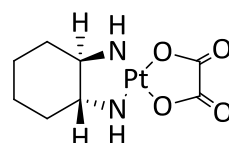
Apesar de se admitir que estes agentes não são ciclo-celular específicos, observou-se que as células são mais sensíveis à alquilação na fase S do ciclo celular, apresentando bloqueio em G₂. [4]

Os agentes alquilantes compreendem ainda cinco grupos: as mostardas nitrogenadas, as nitrosureias, as metilhidrazinas, derivados de platina e as triazinas. As subclasses de agentes alquilantes e os principais compostos que lhes pertencem estão listadas abaixo (Tabela 1.1). No entanto, apenas iremos abordar mais aprofundadamente os derivados de platina, que constituem o tipo de agentes alquilantes mais usados na quimioterapia do cancro colorretal e, para além disso, constituem a única classe de fármacos derivados de metais.

Grupos de agentes alquilantes	Compostos
Mostardas Nitrogenadas	Mecloretamina Clorambucilo Ciclofosfamida Melfalano Ifosfamida
Nitrosureias	Carmustina Lomustina Estreptozocina
Metilhidrazinas	Procarbazina
Derivados de Platina	Cisplatina Carboplatina Oxaliplatina
Triazinas	Bussulfano

Tabela 1.1 Principais subclasses de agentes alquilantes e respectivos compostos pertencentes a cada subclasse.

O interesse dos fármacos derivados de platina como citotóxicos começou em 1960, quando *Barnet Rosenberg* descobriu um composto altamente citotóxico denominado cisplatina (**1.1**).[45] Após tal descoberta, uma infinidade de compostos de platina foi preparada e foi analisado o seu potencial quimioterapêutico, embora apenas a cisplatina (**1.1**), a carboplatina (**1.2**) e a oxaliplatina (**1.3**) tenham passado nos ensaios clínicos e sejam os únicos metalofármacos atualmente usados no tratamento do cancro.

**1.1****1.2****1.3**

A cisplatina é um composto muito eficaz, com grande sucesso na quimioterapia que é usado num número significativo de cancros com alta incidência como, por exemplo, o cancro do ovário, o cancro do testículo, o cancro da cabeça e pescoço, o cancro do pulmão, o cancro do esófago, o cancro da vesícula biliar, o cancro da mama, o cancro do estômago.[46] No entanto, a existência de múltiplos efeitos adversos e da

eficácia limitada devido ao desenvolvimento de resistência ao fármaco por parte das células tumorais, desencadeou o desenvolvimento de análogos, carboplatina e a oxaliplatina, menos tóxicos e com menor indução de quimioresistência.[9,32,41] Embora a carboplatina e a oxaliplatina apresentem menos efeitos adversos, eles continuam a existir e podem ser bastante severos. Os complexos de platina em geral apresentam efeitos secundários como náuseas, vômitos, mielossupressão, imunossupressão, nefrotoxicidade, neurotoxicidade e perda de cabelo entre outros[47].

O mecanismo de ação da cisplatina e da oxaliplatina são semelhantes. Estes compostos estabelecem principalmente ligações 1,2-intracadeia (Figura 1.7) com o ADN, em que o composto se liga covalentemente e preferencialmente ao átomo de azoto na posição 7 das purinas (adenina e guanina).[46] A ligação destes fármacos ao ADN interfere com a transcrição ou na replicação do ADN que, por sua vez, desencadeia morte celular por apoptose.[38,47] Relativamente ao mecanismo de ação da carboplatina, está relacionado com a sua interação com o ADN, tubulina e outras proteínas.[48] Assim, os compostos de platina não são específicos de uma fase do ciclo celular, causando danos no ADN em qualquer fase do ciclo celular, pelo que não é necessária a exposição prolongada a estes fármacos.[43]

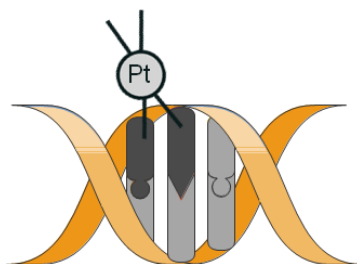


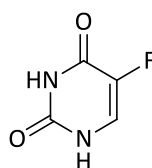
Figura 1.7 Ilustração de ligações intracadeia entre a cisplatina e as bases de ADN.[46] Elaborado com recurso a Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

1.2.3.2 Antimetabolitos

Os antimetabolitos são fármacos citotóxicos que se assemelham estruturalmente a metabolitos naturais (purinas e pirimidinas) que existem no organismo, necessários para o natural funcionamento do mesmo. Assim, o agente citotóxico compete com o metabolito natural, e como a célula não os consegue diferenciar resulta no impedimento de algumas das funções normais das células.[42]

Existem dois mecanismos de ação característicos destes compostos, o primeiro consiste na inibição de enzimas chave envolvidas na síntese de ADN, e o segundo consiste na incorporação dos metabolitos nas cadeias de ADN e ARN, que leva à formação de ruturas nas cadeias ou à terminação prematura da síntese do ADN.[32] Ao bloquearem a síntese do ADN, os antimetabolitos têm especificidade para o ciclo celular na fase S e, conseqüentemente, são mais eficazes em tumores com elevadas taxas de crescimento.[4,42]

Esta classe de compostos pode dividir-se em três subclasses os antagonistas dos folatos, os análogos das purinas e os análogos das pirimidinas. Um dos fármacos pertencentes a esta classe, e que é amplamente usado no tratamento nos cancros colorretal e da mama, é o 5-FU (**1.4**), que é um análogo do uracilo (pirimidina) com um átomo de fluor na posição C-5.[41]



1.4

O 5-FU é metabolizado intracelularmente e convertido a difosfato de fluorouridina (FUMP) que, posteriormente, é transformado em dois metabolitos ativos, o trifosfato de fluorouridina (FUTP) e o monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP). O FUTP incorpora-se no ARN e o FdUMP liga-se covalentemente à timidilato sintase, enzima

envolvida na síntese de nucleótidos de pirimidina, resultando na sua inibição (Figura 1.8). Tais metabolitos inibem ou alteram a síntese de ADN e de ARN.[32,34,43]

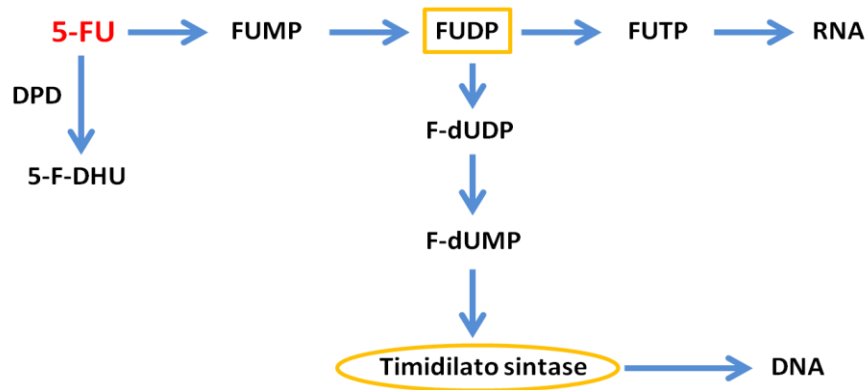


Figura 1.8 Mecanismo de ação do 5-FU. O 5-FU é inicialmente convertido a difosfato de fluorouridina (FUMP), que posteriormente é transformado em trifosfato de fluorouridina (FUTP) e monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP). O FUTP incorpora-se do RNA e o FUMP liga-se covalentemente à enzima timidilato sintase, inibindo-a. [32]

O 5-FU é muitas vezes combinado clinicamente com leucovorina, o qual otimiza a ligação entre o metabolito FdUMP e a enzima timidilato sintase e aumenta a eficácia antitumoral do 5-FU.[32] No entanto, o 5-FU apresenta diversos efeitos adversos que incluem neutropenia, estomatite, diarreia, vermelhidão, inchaço e dor nos pés e mãos e erupções cutâneas.[49]

1.2.3.3 Inibidores da topoisomerase I e II

As topoisomerasas são enzimas responsáveis por alterar o superenrolamento existente nas hélices do ADN após a transcrição. Através da quebra transitória das ligações existentes no ADN, há libertação de tensão de torção, para que o ADN seja replicado e, no final, volte a ser ligado. A topoisomerase I provoca rutura de uma única cadeia de ADN e a topoisomerase II quebra as duas cadeias.[32] Dessa forma, os inibidores das topoisomerasas provocam acumulação de tensões e falhas no enrolamento das cadeias de ADN que podem culminar em morte celular.[50]

Inibidores da topoisomerase I são, por exemplo, o topotecano e o irinotecano que são específicos para a fase S do ciclo celular.[32] Os inibidores da topoisomerase II são específicos para a fase G₂ do ciclo celular e incluem o etoposido e o teniposido, por exemplo.[51]

O irinotecano (CPT-11) é um derivado semi-sintético da camptotecina, usado na terapêutica do cancro colorretal, pertencente à família dos inibidores da topoisomerase I.[49][52] É um profármaco hidrossolúvel que após metabolização, fundamentalmente hepática, se converte no metabolito ativo SN-38 por ação de enzimas carboxilesterases (CE, do inglês carboxylesterase enzymes). Este metabolito ativo, por sua vez, pode ser inativado a SN-38G no fígado por glucuronidação pela enzima UGT1A1 (do inglês, *uridine diphosphate glucuronosyltransferase 1A1*) (Figura 1.9).[53] O SN-38 inibe a topoisomerase I com uma atividade 1000 vezes superior ao CPT-11. O irinotecano e o seu metabolito ativo SN-38 ligam-se ao complexo DNA-topoisomerase I e impedem a re-ligação da cadeia simples de ADN. Desta forma, ocasionam lesões irreversíveis no ADN e no ARN, além de apoptose.[50,53] Os efeitos secundários comuns incluem diarreia, vômitos, perda de cabelo e febre.[53,54]

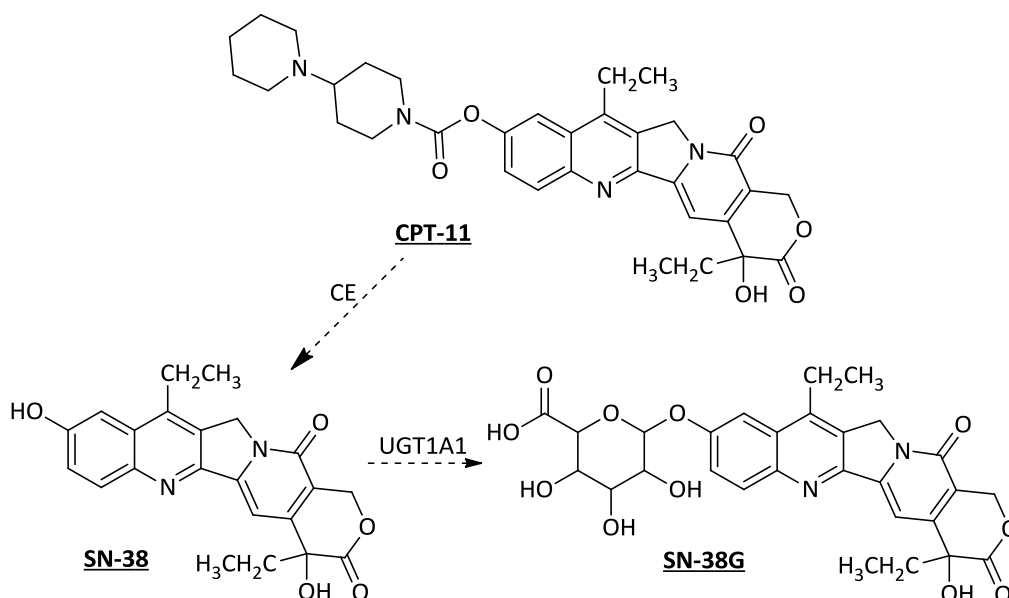


Figura 1.9 Representação esquemática de uma possível via metabólica do CPT-11. O CPT-11 é convertido no metabolito ativo SN-38 mediado por carboxilesterases (CE) e este, por sua vez, pode ser inativado a SN-38G por glucuronidação pela enzima UGT1A1. [53]

1.2.3.4 Antibióticos antitumorais

Esta classe de antineoplásicos engloba antibióticos que interferem na proliferação celular através de diversos mecanismos.[42] As antraciclina são o tipo de compostos pertencente a esta classe de fármacos que mais são usados no tratamento do cancro da mama. Existem antraciclina isoladas diretamente das bactérias, como a doxorubicina e a daunorrubicina, enquanto outras são análogos sintéticos destas, tais como a epirrubicina e a idarrubicina (Figura 1.10).[55]

Entre os citotóxicos desta classe, as antraciclina possuem um dos mais amplos espectros de atividade dado que inibem a síntese do ADN através de uma série complexa de ações.[43] Desta forma, não são específicas para o ciclo celular. As antraciclina podem causar morte celular pela formação de ligações com os fosfolípidos da membrana celular; pela formação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*), responsáveis por provocar lesões oxidativas; pela formação de ligações intercadeia com o ADN, resultando no bloqueio da síntese do ADN e do ARN; e pela diminuição da atividade da topoisomerase II, promovendo a rutura dos filamentos do ADN.[4,42]

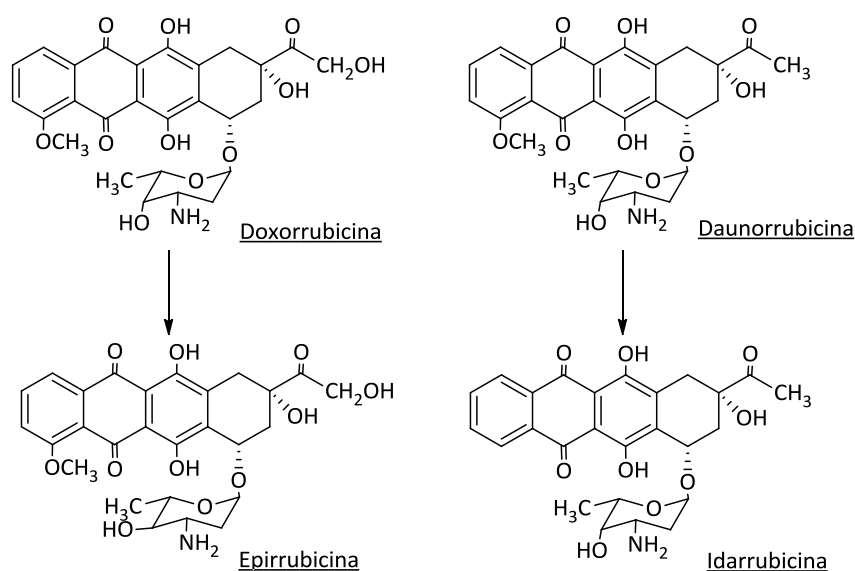


Figura 1.10 Estruturas químicas das principais antraciclina aprovadas para uso clínicos: doxorubicina, epirrubicina, daunorrubicina e idarrubicina. A epirrubicina é um derivado semi-sintético obtido pela epimerização axial-equatorial do grupo hidroxilo no anel daunosamina da doxorubicina. A idarrubicina é um análogo da daunorrubicina obtido pela remoção do grupo metoxi.[56]

Cardiotoxicidade, cardiomiopatia crônica e insuficiência cardíaca congestiva são alguns dos efeitos adversos na dependência das antraciclinas.[55]

1.2.3.5 Citotóxicos que interferem com a tubulina

A tubulina (alfa e beta), subunidade básica dos microtúbulos, desempenha um papel importante na função celular, nomeadamente na manutenção da forma celular, na mitose, na meiose e no transporte intracelular.[32]

Existem duas classes de fármacos antitumorais conhecidos por interferir com a função da tubulina. Uma das classes corresponde aos alcalóides de vinca, que se ligam à tubulina de forma a impedir a formação dos microtúbulos, bloqueando a divisão celular na metafase. A outra classe são os taxanos, fármacos comumente utilizados no tratamento do cancro da mama. Os taxanos são terpenos extraídos da árvore do *Taxus brevifolia*. [41] Estes têm a capacidade de se ligar aos microtúbulos, impedindo a sua separação (Figura 1.11). Assim, fica impossibilitada a formação do fuso mitótico bem como a separação e migração dos cromossomas, o que impede a continuação da divisão celular.[57] Por essa razão, os taxanos são compostos específicos para a fase M do ciclo celular.[41]

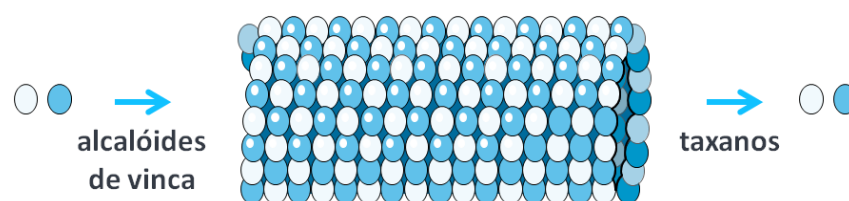
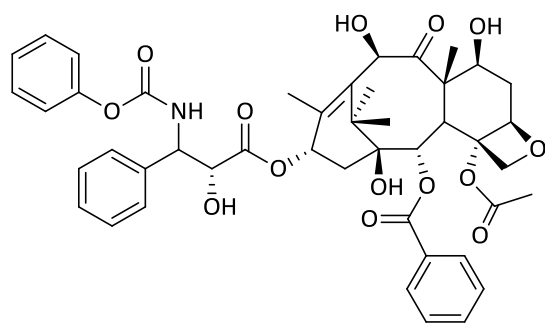
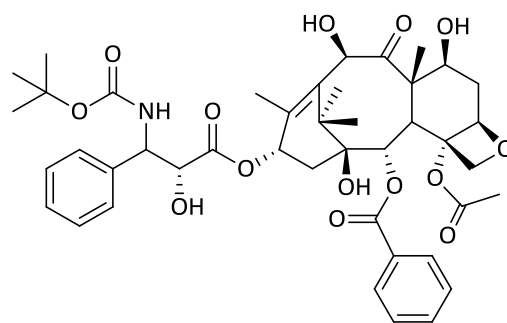


Figura 1.11 Mecanismo de ação dos alcalóides de vinca e dos taxanos. Elaborado com recurso a Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

Exemplos de taxanos são o paclitaxel (**1.5**), isolado diretamente da planta e o docetaxel (**1.6**), taxano semi-sintético obtido do *Taxus baccata*. Efeitos adversos possíveis incluem perda de cabelo, mielossupressão, sintomas gastrointestinais, neutropenia, edema e retenção de fluidos.[57]



1.5



1.6

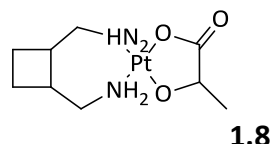
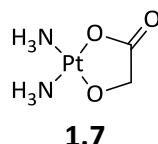
1.3 Complexos metálicos usados em quimioterapia

Um dos maiores desafios da investigação em química medicinal para a terapêutica do cancro é a descoberta de compostos capazes de inibir seletivamente a proliferação de células tumorais sem afetarem o crescimento das células normais. Desta forma, os complexos de metais de transição, pertencentes aos grupos 3-12 da tabela periódica (elementos do bloco d), têm mostrado ser um conjunto de potenciais fármacos para o tratamento de várias doenças e em particular do cancro.

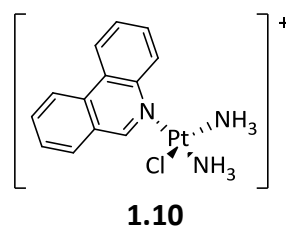
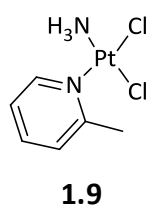
1.3.1 Novos complexos de platina

Como abordado anteriormente, desde a sua descoberta a cisplatina tem sido um fármaco antineoplásico usado na prática clínica no tratamento de várias neoplasias. Apesar do seu sucesso no tratamento do cancro, a eficácia clínica dos complexos de platina usados atualmente tem sido consideravelmente limitada devido à quimiorresistência, que conduz a recidivas do tumor, e aos significativos efeitos adversos destes fármacos. Tais limitações têm desencadeado o desenvolvimento de um largo número de novos complexos de platina como potenciais fármacos antitumorais, que possam ser mais eficazes e menos tóxicos.[58] Com o objetivo de desenvolver fármacos que superem as vantagens associadas à terapêutica com compostos derivados da platina, isto é, a obtenção de compostos mais eficazes, menos tóxicos, com maior solubilidade em solução aquosa e maior espectro de atividade, alguns milhares de com-

plexos derivados da platina foram sintetizados e submetidos a ensaios de atividade antitumoral. Porém, somente alguns mostraram atividade comparável à cisplatina. Exemplos são a nedaplatina (**1.7**), que recebeu aprovação para uso clínico no Japão e apresenta menor nefrotoxicidade e toxicidade gastrointestinal do que a cisplatina[59] e a lobaplatina (**1.8**) que foi aprovada em testes clínicos na China e supera a resistência à cisplatina por parte das células em alguns modelos tumorais pré-clínicos.[46,60]



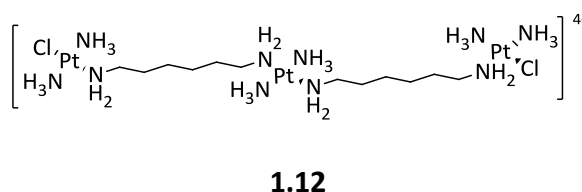
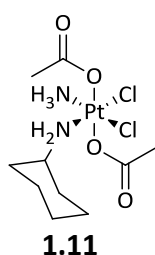
Para resolução de algumas das limitações que os fármacos derivados de platina usados atualmente apresentam, complexaram-se diferentes tipos de ligandos a este metal, originando, por exemplo, a picoplatina (**1.9**). A picoplatina é um complexo de Pt(II) estereamente impedido, com eficácia na quimioterapia contra tumores sólidos e que apresenta um perfil de interações com biomoléculas diferente da cisplatina. A picoplatina parece ter grande potencialidade clínica e, em ensaios clínicos de fase II, mostrou ter menor toxicidade que outros fármacos à base de platina existentes na clínica.[60] Outro exemplo é a fenantriplatina (**1.10**), que é um complexo de Pt(II) que tem a capacidade de se ligar ao ADN apenas através de um sítio de coordenação. Este composto exibiu um efeito citotóxico mais elevado do que a cisplatina.[61]



Todos os fármacos antitumorais de platina, aprovados atualmente para uso clínico, são complexos que, na sua maioria, formam ductos com o ADN para induzir a morte celular. Pensa-se que devido à semelhança estrutural existente entre eles, apresentem atividades e efeitos colaterais semelhantes. Uma alternativa possível aos complexos de Pt(II) de geometria planar quadrada atualmente usados, são os complexos

de Pt(IV) de geometria octaédrica.[61] Comparando com os complexos de Pt(II), os complexos de Pt(IV) apresentam normalmente maior atividade antitumoral e são mais estáveis em meio ácido, podendo assim resistir às condições acídicas do estômago quando administrados por via oral. Adicionalmente, os complexos de Pt(IV) agem como profármacos, porque a sua atividade antitumoral se manifesta mais fortemente após a sua redução *in vivo* a Pt(II) por agentes biológicos redutores (ex. glutatona).[46] Um exemplo desse tipo de compostos, que chegou a ensaios clínicos, é o JM-216 (também denominado satraplatina **1.11**) para o tratamento de cancro avançado da próstata. Este composto gerou grande expectativa por ter potencial para ser administrado oralmente.[60,62] Contudo, como consequência da sua reduzida absorção celular e devido a efeitos secundários indesejáveis, o composto foi descartado na fase II de ensaios clínicos.[46,62]

Outra alternativa aos complexos de Pt(II) foi o desenvolvimento de compostos de platina estruturalmente dissimilares à cisplatina, com a finalidade de participarem em diferentes tipos de interações com o ADN e, conseqüentemente, apresentarem uma atividade diferente da cisplatina. Um exemplo são os complexos de Pt(II) polinucleares, como o caso do complexo de Pt(II) trinuclear, o BBR3464, (**1.12**). Este complexo, com uma estrutura totalmente diferente da cisplatina, foi o primeiro fármaco polinuclear a entrar em ensaios clínicos tendo apresentado atividade citotóxica elevada.[46,60,62] O mecanismo de ação do BBR3464 contrasta vivamente com o dos complexos de platina mononucleares porque as interações com o ADN são predominantemente ligações cruzadas inter e intracadeia de longo alcance, onde os locais de platinação podem ser separados por até quatro pares de bases. Desta forma, as mudanças conformacionais no ADN também são distintas.[62] A eficácia antitumoral dos complexos de platina polinucleares foi já demonstrada em tumores resistentes à cisplatina.[28,62]



1.3.2 Complexos de ruténio

Embora os compostos de platina apresentem atividades anti-proliferativas bastante promissoras, compostos com outros centros metálicos também têm sido bastante auspiciosos, como é o caso dos complexos de ruténio.

O estudo dos complexos de ruténio tem aumentado significativamente nos últimos anos devido à elevada atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo* que os mesmos têm apresentado.[9,45,63,64] Tal facto deve-se, maioritariamente, ao átomo de ruténio admitir múltiplos estados de oxidação (de +2 a +8) química e biologicamente acessíveis[9], o que permite a obtenção de múltiplos complexos estruturalmente diversificados. Esta variedade de possíveis estados de oxidação permite a sua utilização numa grande variedade de aplicações, incluindo na química, na biologia, na medicina, na nanociência e na fotoquímica. [64-67]

Todavia, especialmente em química medicinal, os estados de oxidação mais comuns e estáveis dos complexos de ruténio são +2 e +3 em condições fisiológicas, o que tem particular importância devido à sua estabilidade abaixo do pH fisiológico no ambiente tumoral. Para além disso, o equilíbrio existente entre essas espécies torna-as adequadas para potenciais usos farmacológicos.[9,65]

Frequentemente, os complexos de ruténio com estados de oxidação +2 e +3 acomodam uma geometria octaédrica. Dado os ligandos influenciarem as propriedades estéricas e eletrónicas dos complexos, a sua escolha é crucial para a formação de um complexo farmacologicamente ativo, que deve alcançar os seus alvos biológicos sem ser quimicamente modificado.[9,66] A coordenação de um ligando excessivamente forte pode tornar o fármaco inativo por impedir a coordenação do centro metálico com o alvo biológico, enquanto um ligando muito lábil pode ser substituído demasiado depressa.[67,68] Para além disso, a escolha do ligando também é fundamental nos efeitos biológicos dos compostos organometálicos, pois pode influenciar as suas características tais como a sua solubilidade intracelular e a sua biodisponibilidade, uma vez

que o ligando é maioritariamente responsável pelo transporte e afinidade da molécula para o alvo.[68]

Os complexos de ruténio oferecem várias vantagens relativamente aos complexos de Pt(II) antitumorais convencionalmente usados na clínica. Apresentam um processo de síntese mais acessível e económico [45,66,70] e possuem uma toxicidade mais baixa do que os seus equivalentes de platina. Deve referir-se ainda a seletividade. Tem-se observado que os compostos de ruténio interagem melhor com células tumorais do que com células de tecidos normais. Pensa-se que tal interação poderá resultar de características do metal, especialmente diferentes estados de oxidação, que resultam numa seletividade maior destes complexos do que os de platina atualmente disponíveis para o tratamento do cancro.[69]

1.3.2.1 Propriedades bioquímicas dos complexos de ruténio

O mecanismo de ação dos complexos de ruténio é difícil de esclarecer devido à existência de uma grande variedade deste tipo de complexos com diferentes estados de oxidação e ligandos de estrutura diversificada. No entanto, durante as últimas décadas os complexos de ruténio foram considerados candidatos atraentes devido a algumas propriedades únicas. De entre essas propriedades podemos referir a ativação por redução, o transporte por proteínas, a fraca ligação ao ADN e a cinética favorável da substituição dos ligandos.

1) Ativação por redução. Os complexos de Ru(III) são considerados profármacos porque até alcançarem o local do tumor permanecem no seu estado de oxidação inativo +3 e, uma vez em ambiente tumoral (que é mais redutor do que o existente em tecidos saudáveis) sofrem uma redução para o estado de oxidação mais reativo +2. Desta forma espera-se que os complexos de Ru(III) tenham ação mais eficaz nas células tumorais do que nas células saudáveis, o que de algum modo indica seletividade.[70] Para além disso, no organismo existem moléculas redutoras biologicamente ativas bastante relevantes, como o ácido ascórbico e a glutatona, que são capazes de reduzir

espécies de Ru(III) sob condições fisiológicas. Assim, espera-se que quanto maior a facilidade de redução dos complexos de Ru(III), maior seja o seu potencial citotóxico.[9,65,69,71]

2) Transporte por proteínas. Os estados de oxidação +2 e +3 dos complexos de ruténio, em condições fisiológicas, propiciam diferentes potenciais redox e consequente ligação a biomoléculas. Os complexos de ruténio têm demonstrado elevada afinidade para o sítio de ligação do ferro na transferrina (glicoproteína que transporta o ferro no plasma humano[72]). As células tumorais apresentam um metabolismo diferente das células saudáveis, na medida em que apresentam elevada necessidade de iões Fe(III). Tal facto conduz a uma sobre-expressão de recetores de transferrina na superfície das células tumorais (Figura 1.12). Assim, o complexo de Ru-transferrina aumenta a possibilidade de se atingirem as células tumorais, aumentando a seletividade e, por conseguinte, contribuindo para uma diminuição da toxicidade dos complexos de ruténio (Figura 1.12).[9,58,65,66,67] Para além disso, os complexos de ruténio também se ligam à albumina, principal proteína existente no plasma sanguíneo, até serem transportados por endocitose para a célula tumoral. Esta propriedade tem ainda outras influências no organismo, na medida em que os complexos de Ru(III) ao substituírem o Fe(III), induzem um aumento de iões Fe(III) livres e disponíveis para participar na reação de *Fenton*, responsável por produzir espécies redox do tipo Fenton e radicais livres intracelulares que resultam em lesões celulares que induzem a apoptose.[73]

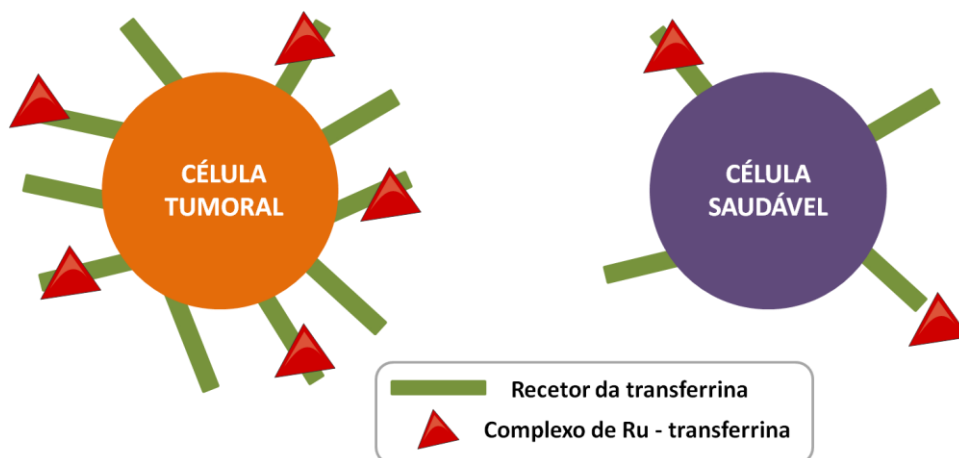


Figura 1.12 Representação esquemática da expressão do recetor da transferrina em células que sobre-expressam o recetor da transferrina (à esquerda) e em células saudáveis (à direita).[9]

3) Fraca ligação ao ADN. Como é conhecido, o ADN é um alvo relevante para fármacos antitumorais contendo metais, nomeadamente platina. Devido às diferenças estruturais entre os complexos de ruténio e de platina, os primeiros interagem com o ADN de forma diferente, devido à sua menor afinidade para ligação ao ADN. Assim, as modificações estruturais e conformacionais produzidas na dupla hélice do ADN são significativamente menores.[69] Os complexos de platina continuam a estar entre os medicamentos antitumorais mais eficazes utilizados até agora. No entanto, os análogos estruturais diretos da cisplatina não mostraram eficácia clínica amplamente melhorada em comparação com o fármaco original. Uma possível explicação para isso é que todos os fármacos de platina usados clinicamente mostraram semelhantes modos de ligação ao ADN, resultando em consequências biológicas similares.[69] Desta maneira, o facto dos complexos de ruténio terem baixa afinidade para o ADN poderá ser uma vantagem pois pode conduzir a um mecanismo de ação diferente dos complexos de platina existentes e, para além disso podem apresentar ação em tumores resistentes à cisplatina, como já aconteceu em culturas celulares *in vitro*. [74,75]

4) Cinética favorável da substituição dos ligandos. A cinética de troca dos ligandos nos complexos é um fator importante, porque, a maioria dos fármacos metálicos administrados sofre modificações espontâneas antes de atingir o alvo. Similarmente aos complexos de platina usados na clínica, os complexos de ruténio apresentam uma cinética de troca dos ligandos relativamente lenta (na faixa de minutos a dias, em vez de microssegundos a segundos) contribuindo para a sua inércia geral e evitando reações rápidas de equilíbrio.[70] Isto pode ser em parte devido à capacidade dos complexos de ruténio mimetizarem a ligação do ferro a moléculas de grande importância biológica, como a transferrina.

Desta forma, conseguiu-se prever, no geral, o mecanismo de ação dos complexos de ruténio: uma vez na corrente sanguínea sofrem transporte por proteínas como a transferrina e a albumina até alcançarem as células tumorais, que, normalmente sobreexpressam o recetor da transferrina e se encontram num ambiente de hipoxia e redutor. Ao sofrerem endocitose para as células tumorais, os complexos sofrem ativação por redução e, na sua forma ativa de Ru(II), induzem morte celular por diferentes

mecanismos já descritos como a disfunção mitocondrial, a produção de espécies redox do tipo Fenton e a indução de apoptose (Figura 1.13).[9,73,76]

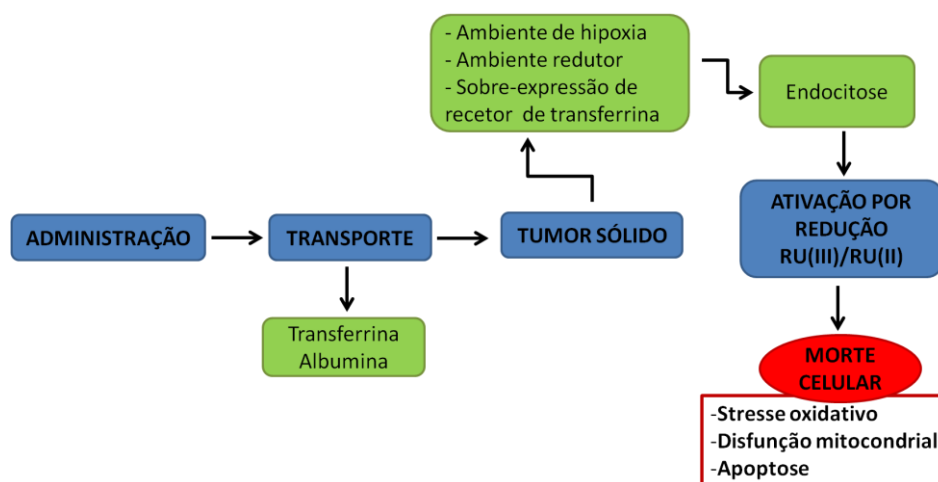
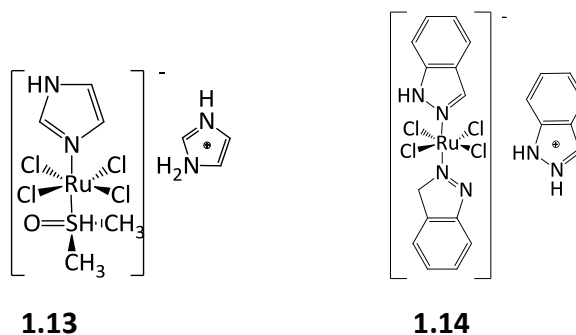


Figura 1.13 Esquema geral dos potenciais mecanismos de ação e transporte dos complexos de rutênio.

1.3.2.2 Exemplos de complexos de rutênio

Apesar de, até agora, nenhum complexo de rutênio ter sido aprovado para uso clínico, o sucesso em ensaios clínicos de fase I e de fase II de alguns complexos de Ru(III), como, o NAMI-A {imidazole *trans*-[tetracloro-(DMSO)(1H-imidazole)rutênio(III)]} (1.13) e o KP1019 {indazone *trans*-[tetraclorobis-(1H-indazole)rutênio(III)]} (1.14), em conjunto com diversos estudos de atividade *in vitro* e *in vivo* favoráveis de outros complexos de rutênio, têm motivado a prossecução do estudo destes complexos para utilização como possíveis fármacos antitumorais.[76]



Os compostos NAMI-A e KP1019 apresentam uma geometria de coordenação octaédrica. Apesar das suas similaridades estruturais e químicas, estes complexos exibem atividades biológicas diferentes.[58] O NAMI-A foi o primeiro complexo de Ru(III) a entrar em ensaios clínicos. Estudos demonstraram que apresenta elevada seletividade em metástases do cancro do pulmão, prevenindo a sua formação e inibindo o seu crescimento.[67] Para além disso, apresenta uma atividade citotóxica mais elevada do que a da cisplatina.[70,78] As metástases são um fator importante relativamente aos tumores malignos, pois não existem fármacos no mercado capazes de controlar o seu crescimento. Por esse motivo, podem ser um alvo relevante para a quimioterapia inovadora. Por outro lado, o KP1019 é um complexo de Ru(III) caracterizado pela citotoxicidade elevada para os tumores colorretais e para os tumores sólidos primários resistentes à cisplatina. [67,68,78]

Estudos relataram que o NAMI-A interfere na metastização e invasão celular por ativação dos mecanismos de morte celular e por interação com moléculas responsáveis pela sobrevivência celular, enquanto o KP1019 promove a apoptose das células principalmente através da via mitocondrial. Para além disso, estes compostos atuam como profármacos porque sofrem ativação por redução em ambiente tumoral *in vivo* para exercerem as suas atividades farmacológicas.[78]

A partir de estudos químicos e biológicos do KP1019 relativamente à sua atividade biológica *in vitro* e *in vivo*, pôde-se presumir o seu mecanismo de ação. O KP1019, uma vez administrado por via intravenosa, interage com proteínas (transferri- na e albumina) na corrente sanguínea formando adutos. Essas proteínas direcionam o composto para as células tumorais que, por endocitose, entra na célula onde sofre redução, ficando na forma ativa (Ru(II)), maioritariamente responsável pela sua citotoxicidade. Uma vez na célula tumoral, o composto induz apoptose principalmente por via mitocondrial (fig. 1.14). Este mecanismo de ação, diferente da cisplatina, pode justificar o facto de o KP1019 apresentar atividade contra tumores resistentes à cisplatina, assim como a sua baixa toxicidade quando comparado com compostos de platina, dois fatores deveras relevantes que o tornam um atraente para uso clínico.[9,78]

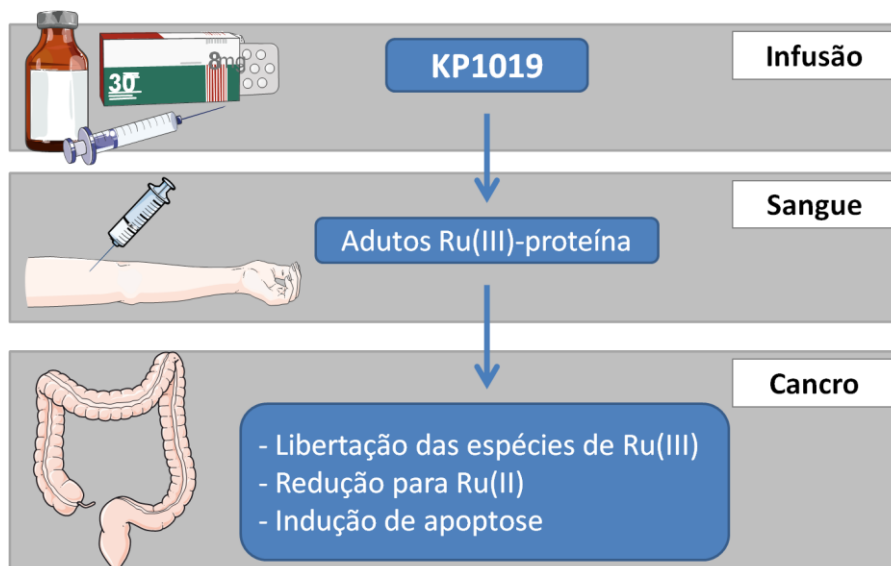


Figura 1.14 Esquema do possível mecanismo de ação do KP1019. O composto KP1019 administrado por via intravenosa, liga-se a proteínas presentes na corrente sanguínea, formando adutos. Estas proteínas direcionam o KP1019 para as células tumorais e, uma vez no tumor, o complexo é libertado, sofre redução a Ru(II) e interage com o ADN e/ou outras biomoléculas, conduzindo a célula a apoptose.[78] Elaborado com recurso a Servier.com (This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Outro composto bastante estudado é o RAPTA-C (Figura 1.15), um composto anfifílico. O ruténio possui quatro pontos de coordenação, estando coordenado ao ligando areno, ao PTA (fosfina) que lhe dá o carácter hidrofóbico, e a dois ligandos lábeis (cloretos). Os derivados de RAPTA-C são estáveis em soluções aquosas e a sua solubilidade em água é biologicamente favorável, ao contrário da insolubilidade de muitas classes de organometálicos investigados como fármacos antitumorais.[58,79] Embora o RAPTA-C não apresente um efeito citotóxico *in vitro* muito elevado, sabe-se que inibe o processo de metastização, de forma idêntica ao NAMI-A.[80]

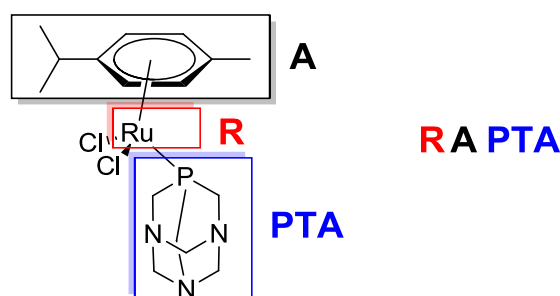
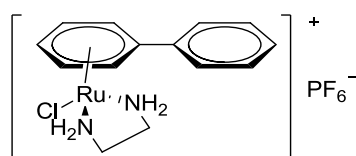


Figura 1.15 Representação estrutural do RAPTA-C.

Apesar do RAPTA-C ser menos citotóxico do que a cisplatina em células tumorais, apresenta maior citotoxicidade nestas do que em células saudáveis. Esta seletividade pode ser explicada pelo facto deste composto sofrer protonação do ligando PTA a valores de pH ácidos, característicos de células tumorais. Assim, a protonação do ligando PTA corresponde à forma mais ativa do RAPTA-C. Este possui características biológicas que favorecem a ativação seletiva desses complexos em ambientes ácidos e hipóxicos, como nos tumores sólidos, responsáveis por danificar maioritariamente células tumorais. O RAPTA-C, com elevada seletividade e geralmente baixa toxicidade, é considerado um potencial agente terapêutico.[9,77]

Também o RM175 (**1.15**) alcançou fases avançadas em testes pré-clínicos e, como o RAPTA-C, pertence à família de complexos de Ru(II)-areno. Este composto tem como alvo o ADN, por ligação covalente ou por intercalação do grupo areno[81]. *In vitro*, o RM175 revelou eficácia comparável aos complexos de platina em tumores do pulmão, do ovário, do esófago, do pâncreas, colorretal e também em melanoma, pela indução de morte celular por apoptose. *In vivo* foi registado um abrandamento do crescimento dos mesmos tipos de cancros. [81,82]



1.15

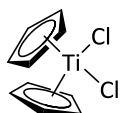
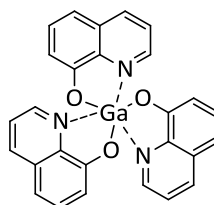
1.3.3 Outros complexos metálicos

Dos complexos metálicos estudados, apenas os de platina têm sido utilizados na clínica até ao momento. Todavia, compostos com outros centros metálicos têm apresentado resultados esperançosos relativamente ao seu potencial antitumoral. A grande quantidade de resultados promissores obtidos em estudos de citotoxicidade de complexos com diversos centros metálicos em ensaios *in vitro* tem motivado a pesquisa e aumentado a esperança de alguns se poderem vir a utilizar na indústria farmacêu-

tica e na clínica. Exemplos bastante promissores que alcançaram os ensaios clínicos de fase I e de fase II foram alguns complexos de titânio, de gálio e de rutênio.[14,25,57,82,83]

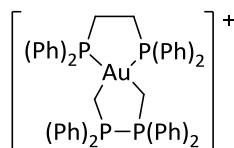
Complexos de Ti(IV), como por exemplo o titanoceno **1.16**, têm apresentado atividade antitumoral devido à elevada capacidade de ligação destes compostos ao ADN. Para além disso, estes complexos também inibem a enzima topoisomerase II e sofrem captação celular mediada pela transferrina.[71,76] O complexo **1.16** foi testado em ensaios clínicos de fase I e de fase II, revelando elevada atividade anticancerígena.[82]

Complexos de Ga(III) têm também mostrado atividade citotóxica. Estes complexos interferem na síntese do ADN, através da inibição de enzimas como ATPases ou ADN polimerases. Para além disso, têm revelado alterações na função mitocondrial.[71,83,84] O complexo de Ga(III) KP46 [FFC11, (**1.17**)], quando usado em ensaios clínicos de fase I e de fase II, demonstrou atividade anticancerígena significativa.[83]

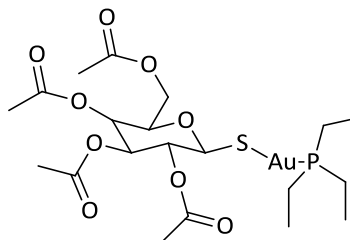
**1.16****1.17**

Complexos de ouro têm também demonstrado atividade citotóxica, especialmente em linhas celulares resistentes à cisplatina. Um exemplo é a auranofina (**1.17**), complexo difosfínico de Au(I), usado para tratar a artrite reumatoide. Embora não apresente interações diretas com o ADN, este apresenta atividade antitumoral através da inibição da replicação do ADN, da transcrição e da síntese proteica.[71] Tem-se verificado também que compostos de Au(III) (como o **1.18**) apresentam elevada seletividade para enzimas que contêm o grupo tiol, como a tiorredoxina redutase (TrxR). Esta última está envolvida em diversas funções fisiológicas anormais, incluindo o cresci-

mento anormal de células tumorais. Por isso, é um composto atrativo no desenvolvimento de novos compostos que podem, seletivamente, ligar-se ao sítio ativo da enzima, inibindo-a.[61]

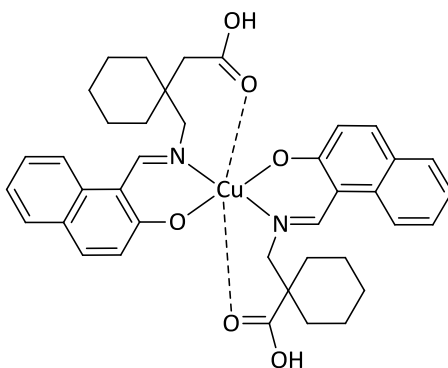


1.18



1.19

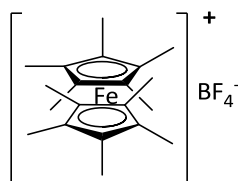
Também complexos de cobre têm sido alvo de vários estudos. O cobre é um metal existente no organismo humano, necessário para muitas vias biológicas e para processos catalíticos enzimáticos. Por se considerar que os complexos de metais endógenos são menos tóxicos para as células normais, complexos de cobre têm sido altamente investigados. Alguns complexos de cobre possuem a capacidade de atuar como inibidores das topoisomerases I e II, responsáveis pela regulação do enrolamento do ADN.[85] Para além disso, interagem com o ADN através de ligações não covalentes – intercalares e electrostáticas.[85] Um exemplo de um complexo de Cu(II) é o composto **1.20**, derivado de uma base de *Schiff*, que apresenta elevada citotoxicidade e seletividade para células tumorais.[86]



1.20

Complexos de ferro do tipo ferroceno, como por exemplo o DEMFc⁺ (**1.21**), também apresentam atividade antitumoral. Pensa-se que essa atividade esteja asso-

ciada ao facto deste tipo de compostos gerarem radicais livres que oxidam o ADN, danificando-o.[71] A membrana celular e a enzima topoisomerase II são outros alvos possíveis deste tipo de compostos.[87]

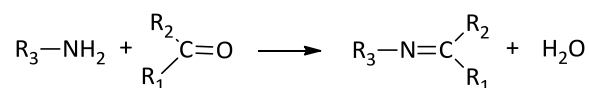


1.21

As propriedades citotóxicas dos complexos de prata atraíram também um grande interesse, pois a maioria destes apresentam maior atividade citotóxica do que a cisplatina, com relativamente baixa toxicidade e maior seletividade para as células tumorais.[71,88] Por exemplo, complexos de Ag(I) derivados de ligandos piridínicos dissustituídos foram avaliados *in vitro* em linhas celulares de diferentes tipos de cancro exibindo uma elevada atividade citotóxica.[89]

1.4. Complexos metálicos com ligandos salen e salan

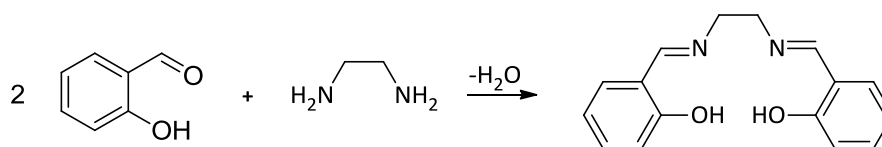
As bases de *Schiff* também designadas por azometinos foram descobertas em 1864 por *Hugo Schiff*. Possuem um grupo funcional que é uma dupla ligação carbono-azoto e são sintetizados pela condensação de uma amina primária com um composto carbonílico (aldeído ou cetona) (Esquema 1.1). [90,91]



Esquema 1.1 Síntese de bases de *Schiff*.

Em química medicinal, a ligação C=N dos azometinos tem mostrado ser essencial para diferentes atividades farmacológicas, tais como atividade antibacteriana, anti-fúngica, antiviral e também atividade antitumoral.[90-94]

Os compostos salen são um tipo de bases de *Schiff* tetradentados, derivadas de *N,N'*-bis(salicilideno)etilenodiamina, que resultam da condensação de uma diamina com salicilaldeídos ou hidroxicetonas (Esquema 1.2).[91] Obtidos por um procedimento sintético simples, estes compostos existem numa grande variedade estrutural devido às inúmeras combinações de diaminas/aldeídos ou cetonas possíveis. Os salens têm desempenhado um papel central no desenvolvimento da química de coordenação na medida em que reagem facilmente com um leque alargado de metais de transição com diferentes estados de oxidação originando os correspondentes metalosalens.[96,97] A coordenação do salen com iões metálicos é tetradentada, envolvendo os dois azotos dos grupos azometino e os dois oxigénios dos grupos hidroxilo.[95]



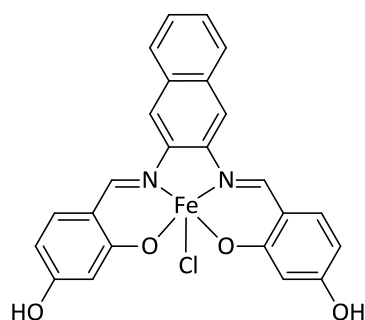
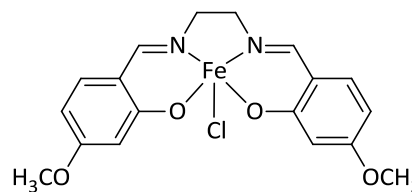
Esquema 1.2 Bis(salicilideno)etilenodiamina (salen).

Da redução dos grupos imina dos compostos salen resultam os compostos salan, que apresentam também coordenação tetradentada com iões metálicos. São estruturalmente mais flexíveis do que os salen devido às ligações simples. Complexos derivados de salans têm apresentado maior estabilidade hidrolítica, elevada atividade anticancerígena *in vivo* e *in vitro* em vários tipos de cancro, bem como em diferentes linhas celulares incluindo as resistentes à cisplatina. Adicionalmente, estes compostos apresentam baixa toxicidade.[96–98]

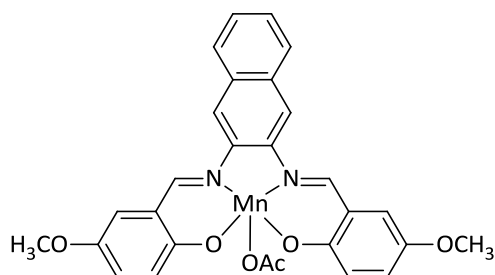
O interesse nos complexos metálicos de salens deve-se às inúmeras funções que têm desempenhado em síntese orgânica, em particular, em processos catalíticos tais como reações de epoxidação de alcenos, hidroxilações, hétero *Diels-Alder* e oxidações, entre outras.^{26–28} Biologicamente, estes complexos podem apresentar atividade antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e anti-inseticida.[91]·[92] Para além disso, este tipo de complexos tem atividade citotóxi-

ca,[63][101] podendo ser uma possível alternativa aos complexos metálicos de platina, atualmente usados na clínica. Correntemente é estudada a atividade antitumoral de complexos de ferro, de manganésio, de cobre, de cobalto, de vanádio, e de níquel de salens, com maior foco nos complexos de ferro e de manganésio.[101–104]

Complexos de Fe(III) demonstraram elevada atividade citotóxica em células MCF-7 com indução de morte celular por apoptose. O complexo **1.22**, após um período de incubação de 96 horas, mostrou elevada atividade antiproliferativa com uma IC_{50} de 0,2 μ M.[104] Mais tarde, foram realizados estudos em células normais da mama (MCF-10) de outro conjunto de complexos de Fe(III) para analisar a seletividade dos compostos para as células tumorais. Os autores concluíram que o complexo **1.23** apresentou seletividade para as células tumorais, sendo três vezes mais citotóxico nestas do que nas células saudáveis.[105]

**1.22****1.23**

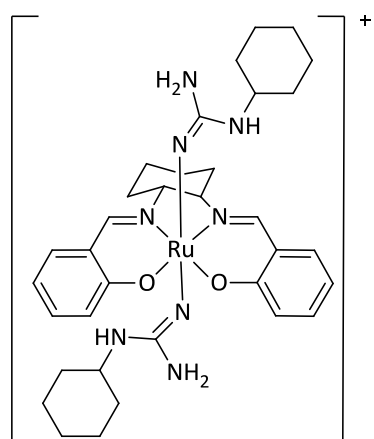
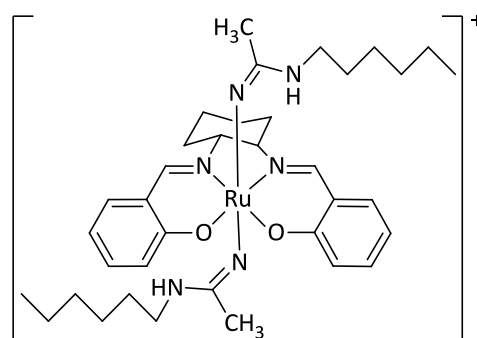
Para além dos complexos de Fe(III), os complexos de Mn(III) também têm demonstrado atividade antiproliferativa em células MCF-7, com tempo de incubação de 96 horas. Por exemplo, o complexo **1.24** apresentou atividade citotóxica semelhante à da cisplatina ($IC_{50}=18 \mu$ M) em células tumorais MCF-7 com valor de IC_{50} de 19 μ M e mostrou ser ligeiramente mais seletivo para células tumorais, embora que ligeiramente (IC_{50} de 101 μ M para o **1.24** em comparação com a IC_{50} de 91 μ M da cisplatina em células MCF-10), sendo o tipo de morte celular predominante a apoptose.[102]



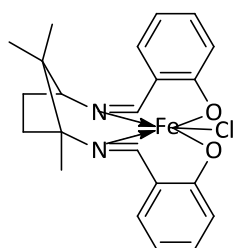
1.24

Como anteriormente referido, têm sido desenvolvidos complexos de rutênio de sistemas de bases de *Schiff*, devido às características vantajosas que estes ligandos proporcionam aos complexos metálicos. No entanto, a investigação em torno da sua aplicabilidade antitumoral é ainda reduzida.

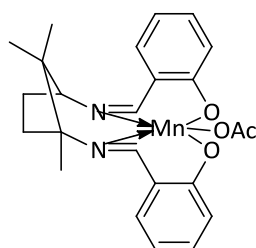
O complexo de Ru(III) **1.25** apresentou atividade antitumoral com valor de IC_{50} de 3,3 μ M em células MCF-7 com tempo de incubação de 72 horas. Este composto é rico em guanidina, o que lhe confere uma elevada capacidade de penetração celular. Pensa-se que **1.25** induz lesões no ADN e ativa vias típicas de apoptose em células MCF-7. O composto **1.26**, também do tipo salen, foi o mais ativo e mostrou um potencial citotóxico bastante melhorado comparado com a cisplatina (possui uma IC_{50} de 0,5 μ M nas mesmas condições que o anterior). Possui uma estrutura diferente do complexo **1.25**, em que em vez de um grupo guanidina possui um grupo amidina. Dessa forma, o seu mecanismo de ação também é diferente, pois o composto **1.26** induz morte celular por paraptose, caracterizada pela vacuolização citoplasmática e indução de lesões mitocondriais.[106]

**1.25****1.26**

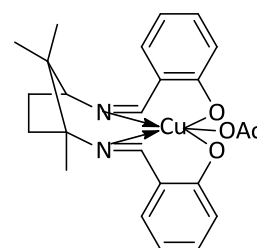
O grupo de Química Orgânica do Centro de Química de Coimbra em associação com o Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra estudou a atividade citotóxica de complexos salen com diferentes centros metálicos (ferro, manganésio e cobre) utilizando o mesmo ligando, em linhas celulares de cancro colorretal (WiDr, C2BBE1), de cancro da mama (MCF-7) e de melanoma (A375). Usando um ligando derivado do ácido canfórico, complexos de Fe(III), de Mn(III) e de Cu(II) (**1.27-1.29**) foram sintetizados, tendo sido analisada a atividade antiproliferativa de cada um deles após um tempo de exposição de 48 horas. De todos, o complexo de Cu(II) **1.29** demonstrou ser o mais promissor em todas as linhas celulares, apresentando valores de IC_{50} a variar de 3,32 μ M a 6,71 μ M. Os complexos de Fe(III) (**1.27**) e de Mn(III) (**1.28**) apresentaram valores de IC_{50} com uma ordem de grandeza superior aos do complexo de Cu(II), sendo o complexo de Fe(III) mais eficaz nas linhas celulares WiDr e MCF-7 e o de Mn(III) mais eficaz nas restantes. Quando comparados os valores de IC_{50} destes compostos com os obtidos na quimioterapia convencional, nas mesmas linhas celulares (por exemplo, utilizando 5-FU e epirrubicina), o complexo de Cu(II) mostrou ser 15 vezes mais eficaz na inibição da proliferação celular.[101]



1.27

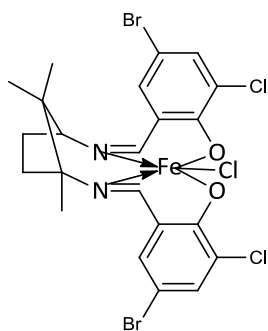


1.28

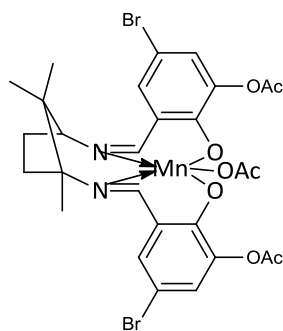


1.29

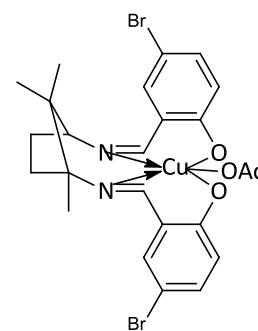
Como a presença de átomos de halogénio, em alguns compostos farmacêuticos, melhora significativamente a sua atividade biológica, principalmente os efeitos citotóxicos,[107,108] Silva Serra *et al.* decidiram continuar com os estudos e sintetizar complexos estruturalmente semelhantes mas contendo ligandos dibromados (**1.30-1.32**). O objetivo foi avaliar se a presença dos átomos de bromo nos ligandos afetava a atividade antitumoral dos complexos. O estudo da atividade antiproliferativa foi realizado nas mesmas linhas celulares de cancro da mama e de cancro colorretal do estudo anterior e nas mesmas condições. Os resultados mostraram que o complexo de cobre (**1.32**) foi, mais uma vez, o que apresentou maior atividade citotóxica em todas as linhas celulares estudadas, com valores de IC₅₀ a variar de 0,95 µM a 2,32 µM enquanto os complexos dibromados de Fe(III) e de Mn(III) (**1.30** e **1.31**) apresentaram uma atividade antitumoral inferior, com valores de IC₅₀ entre 8,54 µM e 22,56 µM e entre 8,68 µM e 18,53 µM, respetivamente.[109] A diferença da atividade antitumoral dos vários complexos poderá ser mediada pela geometria quadrada planar do complexo de Cu(II), que pode ser importante na sua capacidade de ligação a alvos biológicos apropriados, como os ácidos nucleicos ou grupos fosfato.[102,110]



1.30

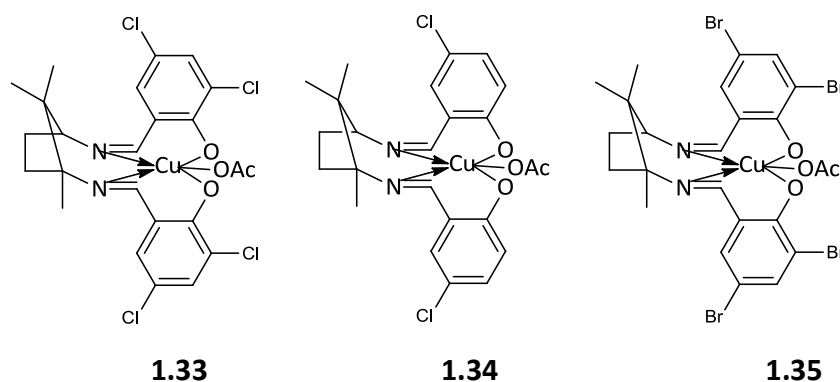


1.31



1.32

Os complexos de Cu(II) não halogenado (**1.29**) e o dibromado (**1.32**) apresentaram resultados de citotoxicidade interessantes, relativamente aos complexos com outros centros metálicos. Assim, como o complexo **1.32** mostrou ser 3 a 5 vezes mais efetivo na inibição da proliferação de células tumorais do que **1.29**, devido à presença de dois átomos de bromo na sua estrutura, deu-se continuidade aos estudos no sentido de avaliar, a influência do tipo e da quantidade de átomos de halogénio, na atividade citotóxica destes compostos. Desta forma sintetizaram-se complexos salen de Cu(II) tetrabromados (**1.35**) e di- e tetraclorados (**1.33** e **1.34**) e testou-se a sua atividade antitumoral nas mesmas linhas celulares e nas mesmas condições que o estudo anterior. Os complexos di- e tetraclorados (**1.33** e **1.34**) deram origem aos melhores resultados de atividade antitumoral, apresentando valores de IC_{50} de 0,82-1,64 μ M e de 0,63-1,09 μ M, respetivamente. O composto tetrabromado apresentou atividade citotóxica inferior, com valores de IC_{50} na ordem de 1,07-1,52 μ M. De todos, o complexo salen tetraclorado de Cu(II) (**1.34**) foi que apresentou uma atividade antiproliferativa mais acentuada nas quatro linhas celulares. Apresentou capacidade de induzir morte celular por apoptose, mas cujo mecanismo não passa pelo bloqueio do ciclo celular.[110]



CAPÍTULO II

Síntese de complexos metálicos

2. Síntese de complexos

Um dos objetivos do trabalho que deu origem a esta dissertação foi a síntese de novos complexos de Ru(III) e Ru(II), de ligandos do tipo salen e salan derivados do ácido canfórico, no sentido de dar continuidade a trabalhos realizados anteriormente pelo grupo de Química Orgânica.

No capítulo anterior, destacou-se a atividade antitumoral que vários complexos de rutênio têm apresentado. Do mesmo modo, complexos metálicos contendo ligandos salen também têm demonstrado um efeito potenciador na atividade citotóxica contra várias linhas celulares tumorais. Estudos realizados pelo grupo de química orgânica da Universidade de Coimbra usando complexos de cobre, manganésio e ferro, com ligandos halogenados e não halogenados (**1.26** - **1.34**) demonstraram resultados de citotoxicidade interessantes.[101,109,110] Dos complexos sintetizados, os que apresentaram melhor atividade citotóxica foram os complexos de Cu(II) que possuíam ligandos clorados. Em consequência da elevada atividade citotóxica demonstrada por estes complexos e também por complexos de rutênio em geral, para este trabalho foi proposta a síntese de complexos de rutênio com ligandos salen di- e tetraclorados. De forma a estudar um possível efeito do estado de oxidação do metal na atividade citotóxica, sintetizaram-se complexos de rutênio com dois estados de oxidação, Ru(II) e Ru(III). Para além disso, sintetizaram-se ligandos salan di- e tetraclorados e os seus respetivos complexos de Ru(II) e Ru(III). Com estes últimos pretendia-se estudar o efeito da redução do grupo imina (-CH=N-) do ligando a amina (-CH₂-NH-) na atividade antitumoral dos complexos. Com a finalidade de completar trabalho já desenvolvido, sintetizou-se também o ligando salen tetraclorado derivado do *L*-ácido tartárico e o seu respetivo complexo de cobre para averiguar o efeito da estrutura base do ligando na atividade citotóxica do complexo metálico. Obtidos os complexos de rutênio, estes

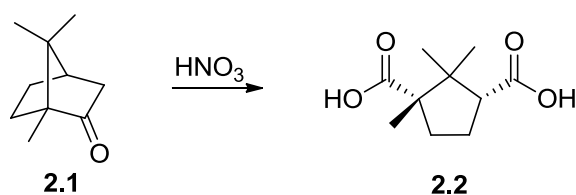
foram sujeitos a estudos *in vitro* de atividade antitumoral em linhas celulares do cancro da mama (MCF-7 e HCC1806) e do cancro colorretal (LS1034 e WiDr).

Neste capítulo é apresentada a síntese dos ligandos salen e salan derivados do ácido (+)-canfórico, e a subsequente preparação dos complexos correspondentes de Ru(II) e Ru(III). Será também descrita a preparação de um salen derivado do ácido tartárico e o seu complexo de cobre.

2.1 Síntese de ligandos derivados do ácido (+)-canfórico

O ácido(+)-canfórico (**2.2**) foi isolado e estudado pela primeira vez pelo farmacêutico francês Nicolas Vauquelin no início do século XIX. É um composto quiral que pode ser obtido pela oxidação da cânfora (**2.1**) por ácido nítrico (Esquema 2.1). A cânfora, por sua vez, é um composto natural pertencente à família dos terpenos e é bastante abundante na madeira da canforeira da espécie *Cinnamomum camphora*. [111]

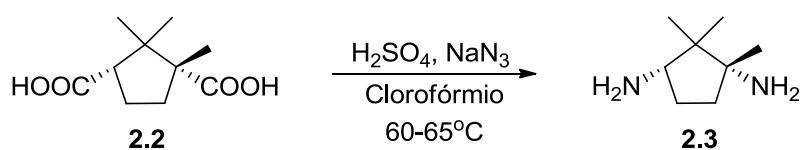
O ácido canfórico possui diversas aplicações farmacêuticas, sendo usado principalmente como antisséptico local para a garganta, nariz e bexiga. Apresenta baixa toxicidade, sendo dessa forma usado como um substituinte da cânfora nesse tipo de aplicações. [112]



Esquema 2.1 Síntese do ácido canfórico (**2.2**) a partir da cânfora (**2.1**).

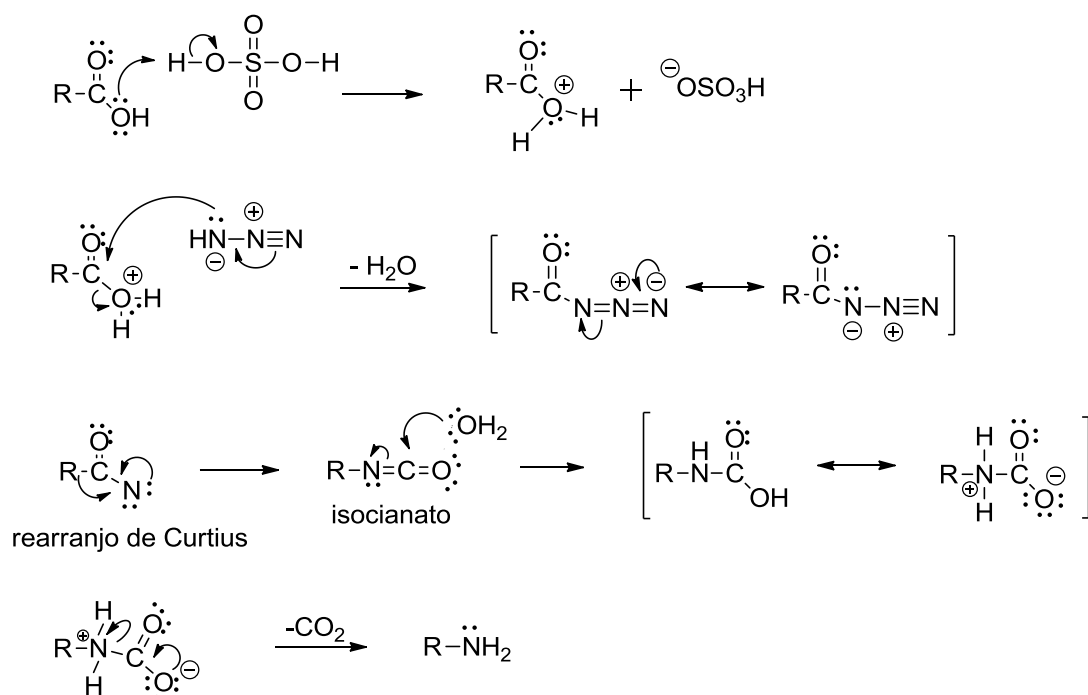
2.1.1 Síntese da diamina derivada do ácido canfórico

De modo a sintetizar os ligandos salen e salan derivados do ácido canfórico **2.2**, foi necessário preparar em primeiro lugar a diamina correspondente **2.3**. Esta diamina foi obtida por reação do ácido canfórico (**2.2**) com azida de sódio e ácido sulfúrico em clorofórmio, a 60-65°C durante uma noite. Nestas condições é gerado *in situ* o ácido hidrazóico (HN₃). Como produto final, obteve-se um óleo amarelo claro, confirmado por RMN¹H, com um rendimento de 94% (Esquema 2.2).



Esquema 2.2 Síntese de (1*R*,3*S*)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano (**2.3**) a partir do ácido (+)-canfórico (**2.2**).

A adição de ácido hidrazóico a ácidos carboxílicos, aldeídos ou cetonas denomina-se reação de Schmidt, em homenagem a Karl Friedrich Schmidt, químico responsável pela conversão de benzofenona e ácido hidrazóico em benzanilida pela primeira vez, em 1923. Nesta reação, os ácidos carboxílicos formam aminas através do rearranjo de Curtius, cujo intermediário é um isocianato. Primeiramente o ácido carboxílico forma o ião acilo, depois há adição nucleofílica do ião da azida ao carbono do ião acilo, com libertação de água. De seguida, ocorre o rearranjo de Curtius, migração de um grupo alquilo do carbono para o azoto, formando o intermediário isocianato. Após libertação de azoto molecular. Por fim, este intermediário sofre hidrólise, formando a amina, com libertação de dióxido de carbono. O rearranjo ocorre com retenção de configuração pelo que a amina obtida (**2.3**) é óticamente pura, possuindo a mesma configuração que o ácido de partida (Esquema 2.3).[113]



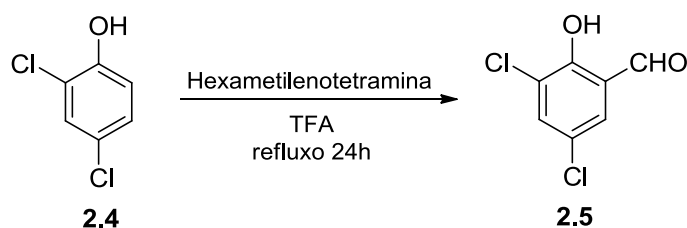
Esquema 2.3 Representação mecanística da reação de Schmidt.

2.1.2 Síntese do 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído

Obtida a diamina **2.3**, procedemos à sua condensação com dois aldeídos clorados, 5-cloro-2hidroxibenzaldeído e 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído, para originar os salens pretendidos. Devido à indisponibilidade comercial, na altura, do 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído, foi necessário em primeiro lugar proceder à sua síntese.

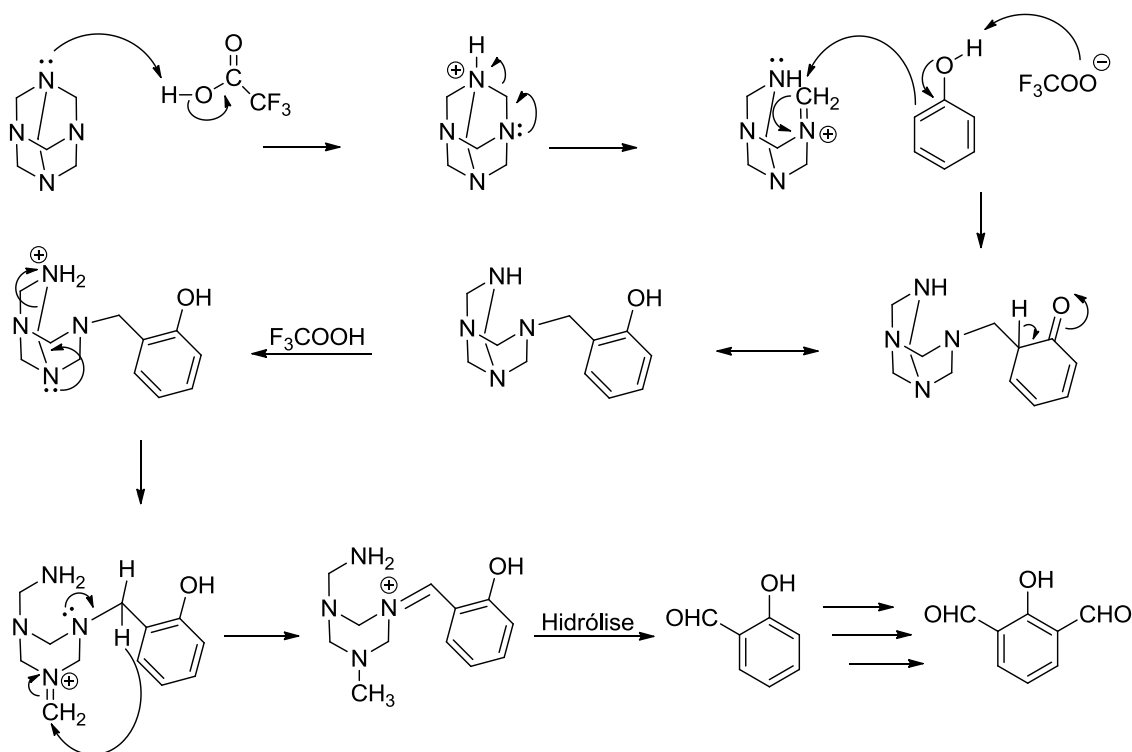
Por reação do 3,5-diclorofenol (**2.4**) e 1 equivalente de hexametenotetramina em TFA, em refluxo em atmosfera inerte, durante 24h, formou-se o 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído (**2.5**). O produto, confirmado por TLC e RMN¹H, obteve-se como um sólido amarelo com rendimento de 58% (Esquema 2.4).

Esta síntese envolve a formilação do 3,5-diclorofenol pela reação de Duff, que permite a formação de aldeídos aromáticos quase exclusivamente na posição orto em relação ao grupo hidroxilo presente no anel.[114]



Esquema 2.4 Síntese de 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído (2.5) a partir de 3,5-diclorofenol (2.4).

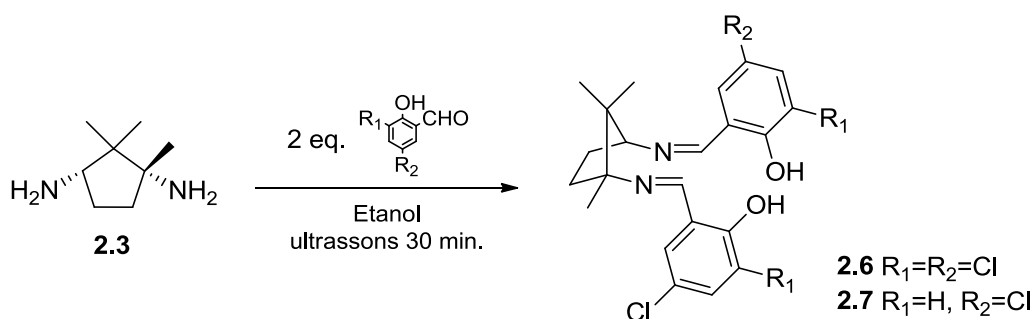
O mecanismo da reação do esquema 2.4 envolve uma substituição eletrofílica aromática, em que a espécie eletrofílica é o íão imínio CH_2NR_2^+ formado a partir da hexametilenotetramina. Esta adição resulta na formação intermediária de uma benzilamina, seguida de um íão imínio que na etapa final sofre hidrólise ácida, para dar origem ao benzaldeído correspondente.[115] Importa referir que a reação requer substituintes fortemente doadores de elétrons no anel aromático, tal como no fenol o grupo hidroxilo, responsável por ativar o anel aromático, condição necessária para que a formilação ocorra. A formilação ocorre preferencialmente na posição *orto* relativamente ao substituinte dador de elétrons (Esquema 2.5).[116]



2.1.3 Síntese de salens derivados do ácido (+)-canfórico

Os salens necessários para os estudos de citotoxicidade foram sintetizados através da reação da condensação da diamina com dois equivalentes aldeído. Nesta síntese recorreu-se à irradiação com ultrassons, na presença de sílica como catalisador, devido às vantagens e à conveniência que o método apresenta. Para além de tempos de reação mais curtos, cerca de 30 minutos, apresenta um menor consumo de energia e maior facilidade no isolamento dos produtos. Também apresenta rendimentos superiores aos rendimentos das reações promovidas pelo procedimento tradicional,[100] que podem levar desde 2 até 24 horas, dependendo dos reagentes.[100]

Utilizando condições de reação anteriormente otimizadas[100] e 5-cloro-2-hidroxibenzaldeído e 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído, obtiveram-se os salens **2.6** e **2.7** como sólidos amarelos, característica deste tipo de compostos (Esquema 2.6). Os salens obtidos com rendimentos de 71% e 65%, respetivamente, foram posteriormente confirmados por RMN.

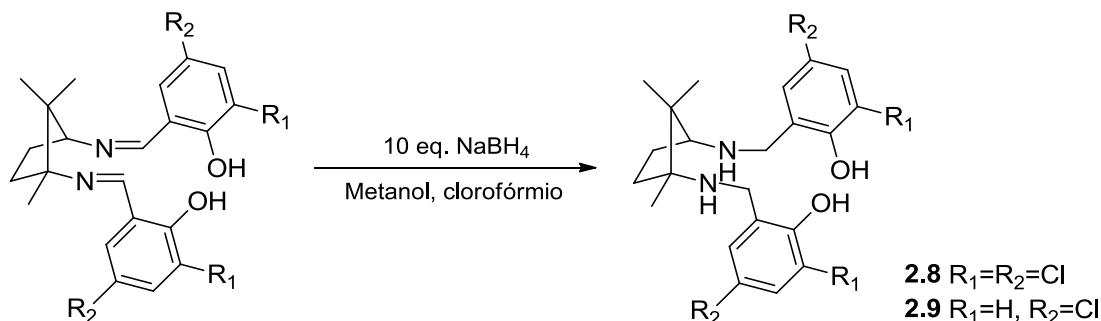


Esquema 2.6 Síntese dos salens **2.6** e **2.7**.

2.1.4 Síntese de salans derivados do ácido (+)-canfórico

Após a obtenção dos salens, procedeu-se à redução dos seus grupos imina para obter os correspondentes salans, outro conjunto de ligandos para estudos de citotoxicidade. A redução foi efetuada em MeOH/CHCl₃ (1:1) à temperatura ambiente durante cerca de 1 hora, usando como agente redutor o boro-hidreto de sódio. Obtiveram-se assim os salans **2.8** e **2.9** a partir dos salens **2.6** e **2.7**, respetivamente. As reações

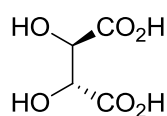
foram controladas por TLC e os produtos obtidos foram confirmados por RMN¹H. Obtiveram-se sólidos de cor branca com rendimentos de 84 e 86%, respetivamente (Esquema 2.7).



Esquema 2.7 Síntese dos salans **2.8** e **2.9**.

2.2 Síntese de ligandos derivados do ácido *L*-tartárico

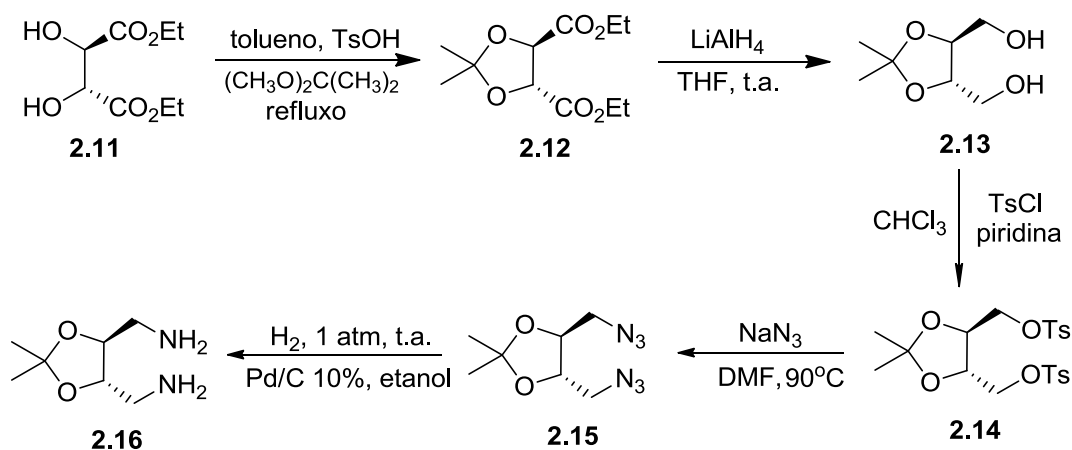
O ácido *L*-tartárico, também denominado ácido 2,3-di-hidroxitbutanodioico, **2.10**, é um composto natural encontrado num número pequeno de espécies vegetais, sendo a videira (*Vitis vinifera*) uma das poucas plantas onde ele está presente em quantidade elevada.[117] Este composto foi isolado pela primeira vez em 1769, pelo químico sueco Carl Wilhelm Scheele e tem um papel importante na produção de vinho pois baixa o pH do mosto a valores que impossibilitam o crescimento bacteriano. Para além disso, o ácido *L*-tartárico é usado na formulação de produtos efervescentes na área farmacêutica, e na indústria alimentícia serve como acidulante natural. Em vegetais atua como conservante pois inibe a ação de enzimas que causam a variação de cor e sabor no alimento.[118] Para além das aplicações referidas, o ácido *L*-tartárico, composto quiral de fácil acessibilidade, é largamente utilizado como precursor de ligandos quirais e como agente de resolução uma vez que forma, com racematos, sais diastereoisoméricos facilmente separáveis.[113]



2.10

2.2.1 Síntese da diamina derivada do ácido *L*-tartárico

Para sintetizar salens derivados do ácido tartárico, foi em primeiro lugar sintetizada a diamina correspondente. Recorreu-se à sequência sintética apresentada no Esquema 2.8, em que o precursor foi o tartarato de etilo (**2.11**). Todas estas reações já foram realizadas e otimizadas no grupo de Química Orgânica.[113][119]



Esquema 2.8 Sequência de reações de síntese de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diaminobutano.

Partindo do *L*-(+)-tartarato de etilo (**2.11**) para obter o 2,3-*O*-Isopropilideno-tartarato de etilo (**2.12**), protegeram-se os grupos hidroxilo do ácido *L*-tartárico por reação com 2,2-dimetoxipropano. Usou-se tolueno como solvente e ácido *p*-toluenossulfônico como catalisador da reação. A reação ocorreu em refluxo durante 3 horas. Após isolamento, obteve-se um óleo acastanhado com rendimento 78% (Esquema 2.8).

Após a obtenção de **2.12**, por redução com hidreto de alumínio e lítio em THF seco, à temperatura ambiente, durante uma noite, obteve-se o diol **2.13**, um óleo incolor, com rendimento de 96% (Esquema 2.8).

Procedeu-se seguidamente à tosilação do diol **2.13**. A este, em clorofórmio seco, foi adicionado piridina e, seguidamente, cloreto de tosilo lentamente (recentemente recristalizado para maximizar o rendimento da reação), num banho de gelo de

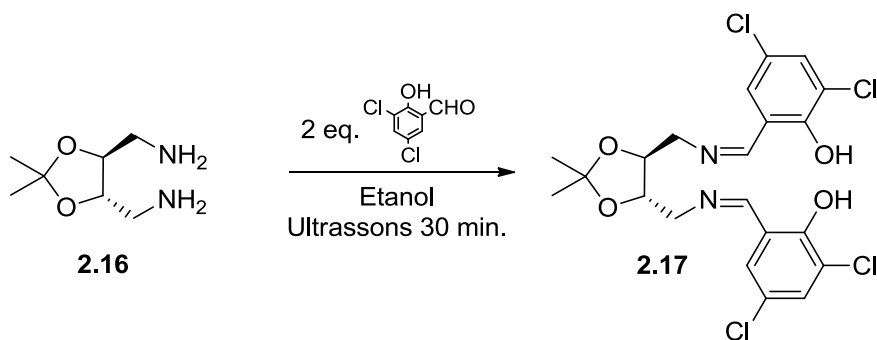
forma a evitar que a temperatura ultrapassasse os 5°C. O isolamento após 3H horas deu origem a um óleo, que após cristalização em etanol originou **2.14**, um sólido branco cristalino com rendimento de 68% (Esquema 2.8).

O composto ditosilado **2.14**, foi dissolvido em DMF seca e tratado com azida de sódio, a 90°C, durante aproximadamente 18 horas, em atmosfera inerte. Obteve-se um óleo castanho claro **2.15** com um rendimento de 82%. O produto foi caracterizado por espectroscopia de infravermelho, tendo-se observado a existência de uma banda a 2160-2120 cm⁻¹, que evidenciou a presença do grupo azida (Esquema 2.8).

Por fim, obtida a diazida **3.15** procedeu-se à sua hidrogenólise para obter a diamina **2.16**. Esta reação ocorreu a 1 atm de H₂, com Pd/C 10% e etanol como solvente, durante uma noite. Por espectroscopia de infravermelho observou-se a ausência da azida a 2160-2120 cm⁻¹, que confirmou que toda a azida tinha sido consumida. Obteve-se assim a diamina **2.16**, um óleo amarelo claro com um rendimento quantitativo (Esquema 2.8).

2.2.2 Síntese do salen derivado do ácido L-tartárico

Utilizando a diamina **2.16**, sintetizou-se o ligando salen **2.17** através do procedimento sintético descrito na secção 2.1.3. Fez-se reagir a diamina com dois equivalentes do 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído (**2.4**) durante 30 minutos sob ultrassons, para dar origem ao ligando salen **2.17**, com um rendimento de 44% (Esquema 2.9).



Esquema 2.9 Síntese de (2S, 3S)-N,N'-bis[salicilideno]-2,3-O-isopropilideno-1,4-diaminobutano (**3.8**).

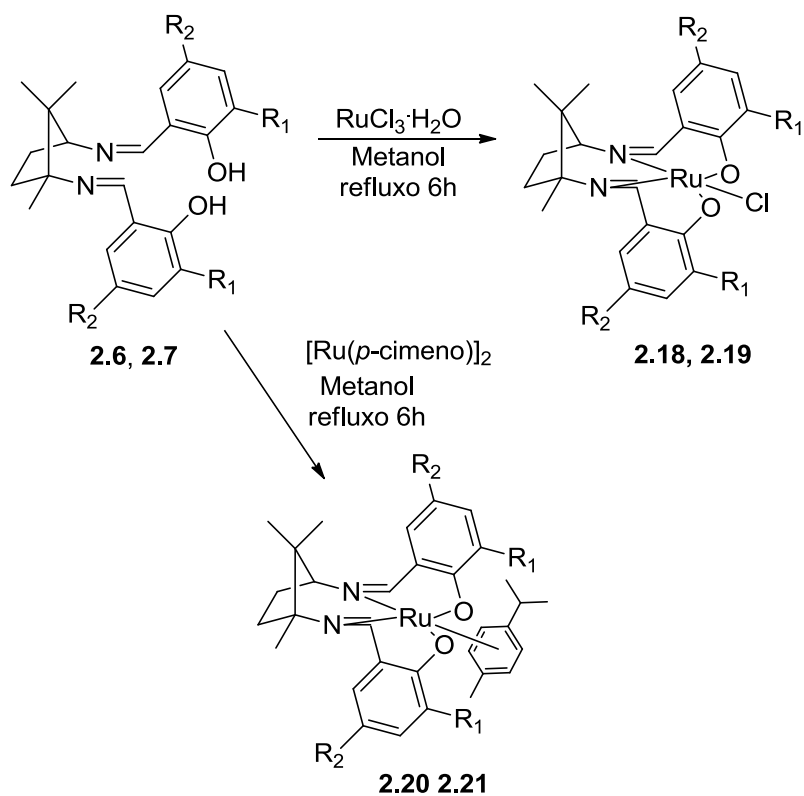
2.3 Síntese de complexos metálicos

2.3.1 Síntese de complexos de Ru(II) e Ru(III)

Com os salens **2.6** e **2.7** e salans **2.8** e **2.9**, derivados da diamina **2.3**, foram preparados complexos de Ru(II) e Ru(III) para serem posteriormente utilizados em estudos de citotoxicidade.

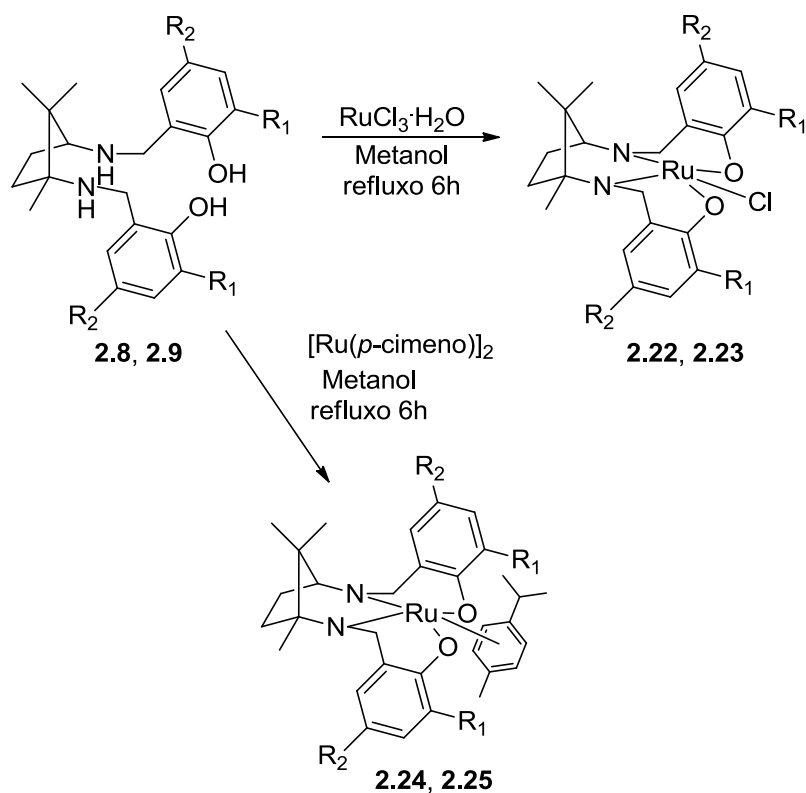
Da reação de $\text{RuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ com 1 equivalente do salen ou salan, em refluxo de metanol durante 6h resultaram os complexos metálicos **2.18**, **2.19**, **2.22** e **2.23** de Ru(III). A formação dos complexos, de cor castanha e verde escura, foi confirmada por espectroscopia de infravermelho (IV) (Esquema 2.10).

Para obtenção dos complexos de Ru(II), 1 equivalente do salen ou salan foi tratado com $[\text{Ru}(p\text{-cimeno})\text{Cl}]_2$ em refluxo de metanol durante 6h em atmosfera inerte, para dar origem aos complexos metálicos **2.20-2.21** e **2.24-2.25**. A formação destes complexos foi também confirmada por espectroscopia de infravermelho (IV) (Esquema 2.11).



Complexo	R_1	R_2	Rendimento
2.18	Cl	Cl	83%
2.19	H	Cl	87%
2.20	Cl	Cl	85%
2.21	H	Cl	63%

Esquema 2.10 Esquema da síntese dos complexos salen clorados de Ru(III) (**2.18** e **2.19**) e de Ru(II) (**2.20** e **2.21**).



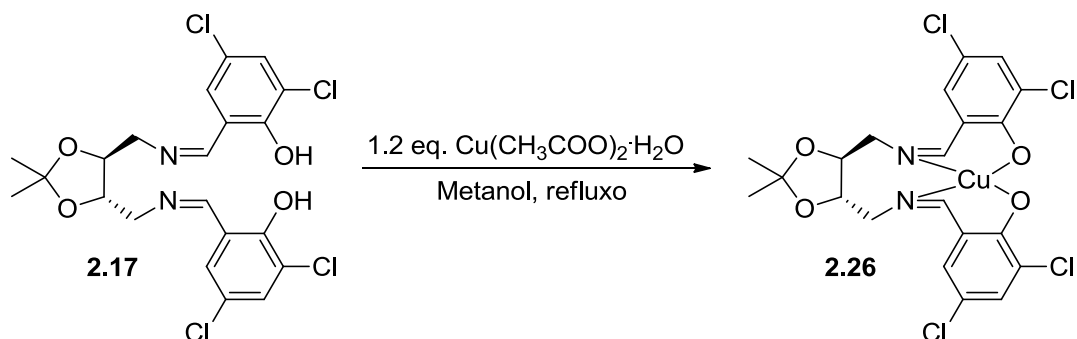
Complexo	R_1	R_2	Rendimento
2.22	Cl	Cl	90%
2.23	H	Cl	95%
2.24	Cl	Cl	86%
2.25	H	Cl	97%

Esquema 2.11 Esquema da síntese dos complexos salan clorados de Ru(III) (2.22 e 2.23) e de Ru(II) (2.24 e 2.25).

2.3.2. Síntese de um complexo de Cu(II)

Como já foi referido, o salen **2.17** foi sintetizado com o objetivo de analisar o efeito da variação da estrutura base da diamina, na citotoxicidade dos complexos metálicos. Para completar estudos já realizados, sintetizou-se o complexo de Cu(II) **2.26**, fazendo-se reagir o ligando com $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ em refluxo de metanol durante 6h. Obteve-se um sólido azul acastanhado com rendimento de 89% (Esquema 2.12).

Pretendia-se também sintetizar os complexos metálicos de Ru(II) e Ru(III) do salen 2-17, contudo, por limitações de tempo já não foi possível.



Esquema 2.12 Síntese do complexo de Cu(II) (2.26) a partir do ligando salen 2.17.

2.4 Conclusão

Neste capítulo foi demonstrado como se procedeu à síntese de complexos de Ru(III) e Ru(II) di e tetraclorados derivados do ácido canfórico. Obteve-se um total de 8 complexos: 4 deles salen e outros 4 salan, todos com rendimentos significativos. Para além disso, sintetizou-se também um complexo de Cu(II) salen tetraclorado derivado do ácido tartárico, após uma série de passos de síntese necessários para obter o ligando.

Os complexos de Ru(III) e Ru(II) salen foram de seguida testados em testes *in vitro* de culturas celulares, em linhas celulares do cancro da mama (MCF-7 e HCC1806) e em linhas celulares do cancro colorretal (LS1034 e WiDr) para avaliar a sua possível atividade antitumoral.

CAPÍTULO III

Estudios in vitro

3. Estudos *in vitro*

Os complexos salen halogenados de Ru(III) e de Ru(II) derivados do ácido (+)-canfórico, **2.18** [tetraclorado de Ru(III)], **2.19** [diclorado de Ru(III)], **2.20** [tetraclorado de Ru(II)] e **2.21** [diclorado de Ru(II)] sintetizados como descrito no capítulo anterior, foram sujeitos a estudos de citotoxicidade, tal como os seus respetivos complexos salan **2.22**, **2.23**, **2.24**, e **2.25**. Estes estudos *in vitro* foram realizados em duas linhas celulares de cancro da mama (MCF-7 e HCC1806) e em duas linhas celulares de cancro colorretal (LS1034 e WiDr) e incluíram estudos de proliferação celular. Com o composto que apresentou um efeito mais promissor na inibição da proliferação celular, realizaram-se estudos para avaliação da viabilidade celular, de alterações no ciclo celular e das vias de morte celular envolvidas, assim como, a atividade hemolítica do mesmo.

3.1 Proliferação celular

A avaliação da proliferação celular foi realizada através do estudo da atividade metabólica, por colorimetria, pelo ensaio MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio], que possibilita a quantificação das células metabolicamente ativas pela quantificação de cristais formazano produzidos, pela relação de proporcionalidade direta existente entre a quantidade de cristais e a atividade metabólica das células.

O processamento dos resultados experimentais, com recurso ao *software* OriginPro v.8.5, permitiu o estabelecimento das curvas sigmóides de melhor ajuste para cada linha celular e para cada condição, representadas na Figura 3.1 (para os complexos do tipo salen) e na Figura 3.2 (para os complexos do tipo salan). A partir das curvas dose-resposta obtidas, foi possível determinar as concentrações inibitórias médias (IC₅₀) dos oito complexos, ou seja, a concentração de composto necessária para inibir

50% da proliferação celular, cujos valores estão apresentados nas Tabelas 3.1 e 3.2 para os complexos salen e salan, respectivamente.

Relativamente aos complexos de rutênio do tipo salen (**2.18** a **2.21**), através da análise da Figura 3.1, verifica-se que os complexos de rutênio em estudo induziram efeito anti-proliferativo nas quatro linhas celulares, evidente pela diminuição da atividade metabólica com o aumento da concentração. O complexo de Ru(III) tetraclorado (**2.18**) foi o que apresenta claramente um efeito mais notório a nível da inibição da proliferação celular comparativamente aos restantes complexos em estudo, em todas as linhas celulares.

Relativamente aos complexos de rutênio do tipo salen (**2.18** a **2.21**), através da análise da Figura 3.1, verifica-se que os complexos de rutênio em estudo induzem efeito anti-proliferativo nas quatro linhas celulares, evidente pela diminuição da atividade metabólica com o aumento da concentração. O complexo de Ru(III) tetraclorado (**2.18**) é o que apresenta claramente um efeito mais notório ao nível da inibição da proliferação celular comparativamente aos restantes complexos em estudo, em todas as linhas celulares.

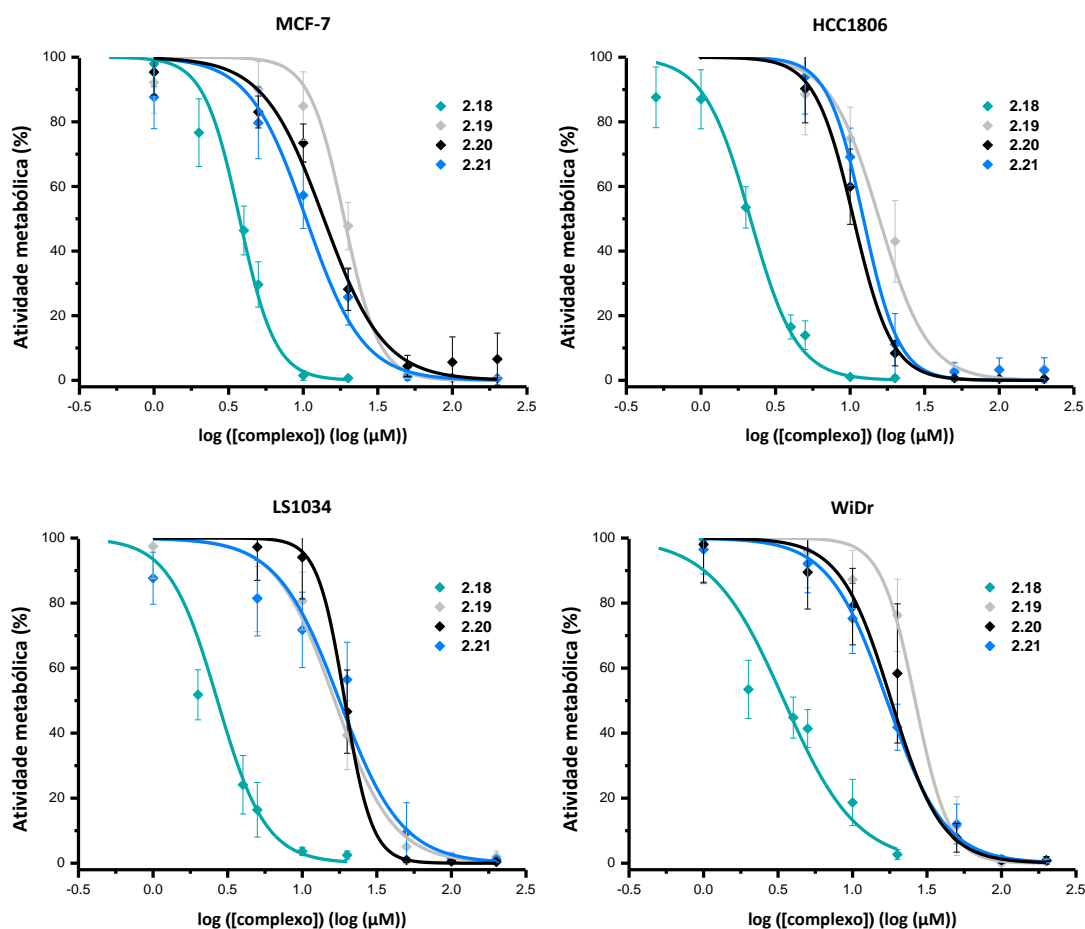


Figura 3.1 Curvas de dose-resposta correspondentes à atividade metabólica (em percentagem) das linhas celulares tumorais MCF-7, HCC1806, LS1034 e WiDr após incubação de 48 horas com os complexos salen tetraclorado de Ru(III) (**2.18**), diclorado de Ru(III) (**2.19**), tetraclorado de Ru(III) (**2.20**), e diclorado de Ru(II) (**2.21**). Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizadas em triplicado ($n \geq 9$).

A Tabela 3.1 apresenta os valores de IC_{50} dos quatro complexos salen em estudo e os respetivos coeficientes de determinação das curvas de ajuste (r^2). Verificamos que, de todos os complexos, o tetraclorado de Ru(III) (**2.18**) é o que apresenta maior atividade antiproliferativa em todas as linhas celulares, com valores de IC_{50} de 2,1 μM para as células da linha HCC1806, de 3,7 μM para as células da linha MCF-7, de 3,1 μM para as células da linha WiDr e de 2,7 μM para as células da linha LS1034. O complexo tetraclorado de Ru(II) (**2.20**) demonstrou ser mais eficaz na inibição da proliferação celular nas linhas celulares de cancro da mama HCC1806 e MCF-7, com valores de IC_{50} de 13,7 μM e de 10,6 μM , respetivamente, em comparação com as linhas celulares de cancro colorretal WiDr e LS1034, para as quais se obtiveram valores de IC_{50} de 17,2 μM e de 19,3 μM respetivamente. O mesmo se verificou com o complexo diclorado de

Ru(II) (**2.21**), que para as linhas celulares HCC1806 e MCF-7 apresenta valores de IC_{50} de 10,5 μ M e de 12,3 μ M e para as linhas celulares de cancro colorretal apresenta valores de IC_{50} de 17,0 μ M e de 17,8 μ M, respetivamente. O complexo diclorado de Ru(III) (**2.19**) foi o menos eficaz na inibição da proliferação das linhas celulares MCF-7 (IC_{50} =18,8 μ M), HCC1806 (IC_{50} =15,7 μ M) e WiDr (IC_{50} =26,3 μ M). A gama de valores de IC_{50} é bastante inferior para o complexo **2.18** com valores entre 2,1 μ M e 3,7 μ M comparativamente a todos os outros complexos com valores de entre 10,5 μ M e 26,3 μ M. Comparando as linhas celulares de cada um dos tipos de cancro em estudo, observa-se que não existem diferenças, nos efeitos induzidos pelos complexos de ruténio, que sejam dependentes do tipo de cancro.

Tabela 3.1 Valores de IC_{50} dos complexos de ruténio salen testados nas quatro linhas celulares, após 48h de incubação e os seus respetivos valores de r^2 .

Linha celular	2.18 tetraclorado Ru(III)		2.19 diclorado Ru(III)		2.20 tetraclorado Ru(II)		2.21 diclorado Ru(II)	
	IC_{50} (μ M)	r^2	IC_{50} (μ M)	r^2	IC_{50} (μ M)	r^2	IC_{50} (μ M)	r^2
MCF-7	3,7	0,99	18,8	0,95	13,7	0,98	10,5	0,94
HCC1806	2,1	0,98	15,7	0,98	10,6	0,98	12,3	0,97
LS1034	2,7	0,97	16,5	0,98	19,3	0,99	17,8	0,97
WiDr	3,1	0,96	26,3	0,98	17,2	0,99	17,0	1,00

Quanto aos complexos de ruténio do tipo salan (**2.22** a **2.25**), através da análise da Figura 3.2, verifica-se que os mesmos apresentaram um perfil antiproliferativo semelhante aos complexos salen, na medida em que se observa uma diminuição da atividade metabólica com o aumento da concentração de complexo. No entanto, neste caso, nenhum dos complexos salan se destacou relativamente à inibição da proliferação celular nas quatro linhas celulares.

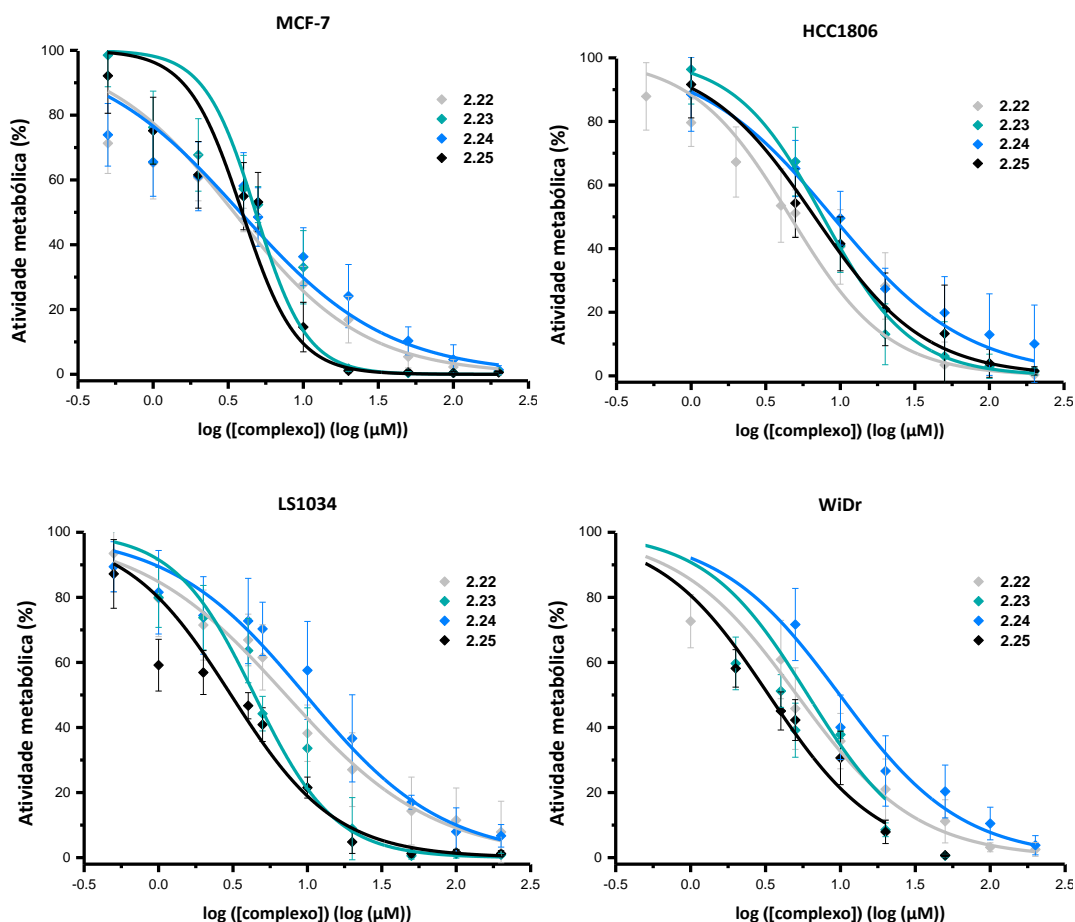


Figura 3.2 Curvas de dose-resposta correspondentes à atividade metabólica (em percentagem) das linhas celulares tumorais MCF-7, HCC1806, LS1034 e WiDr após incubação de 48 horas com os complexos de rutênio salan tetraclorado de Ru(III) (**2.22**), diclorado de Ru(III) (**2.23**), tetraclorado de Ru(II) (**2.24**), e diclorado de Ru(II) (**2.25**). Os resultados são apresentados como a média \pm desvio-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizadas em triplicado ($n \geq 9$).

A Tabela 3.2 apresenta os valores de IC_{50} dos quatro complexos salan em estudo e os respetivos coeficientes de determinação das curvas de ajuste (r^2). Numa análise geral, observamos que os valores de IC_{50} são muito semelhantes entre compostos e entre linhas celulares, no entanto, em maior detalhe observam-se diferenças. O complexo salan diclorado de Ru(II) (**2.25**) foi o que apresentou maior atividade antiproliferativa para a maioria das linhas celulares, com valores de IC_{50} de $3,9 \mu\text{M}$ para as células da linha MCF-7, de $3,3 \mu\text{M}$ para as células da linha WiDr e de $3,1 \mu\text{M}$ para as células da linha LS1034, no entanto, para as células da linha HCC1806 o IC_{50} foi superior ($6,7 \mu\text{M}$). Em contrapartida, o complexo salan que apresentou os valores de IC_{50} mais altos foi o tetraclorado de Ru(II) (**2.24**), na ordem de $8-9 \mu\text{M}$ para a maioria das linhas celulares, com exceção das células MCF-7 para as quais se obteve uma IC_{50} de $3,8 \mu\text{M}$. Relativa-

mente aos complexos salan de Ru(III), o tetraclorado (**2.22**) apresentou valores de IC₅₀ na ordem de 3 a 7 µM, enquanto que o diclorado (**2.23**) apresentou valores na ordem de 4-8 µM. A linha celular mais sensível aos complexos salan testados foi a MCF-7, na medida em que se obtiveram valores de IC₅₀ mais baixos, na ordem de 3 a 5 µM, enquanto que para as outras linhas celulares os valores de IC₅₀ variaram entre 3 e 10 µM. Em relação aos complexos salen, os complexos salan apresentaram no geral valores de IC₅₀ mais baixos, embora, neste caso, nenhum dos complexos se tenha destacado. Em analogia aos complexos salen, não existem diferenças nos efeitos induzidos pelos complexos salan de forma dependente do tipo de cancro.

Tabela 3.2 Valores de IC₅₀ dos complexos de ruténio salan testados nas quatro linhas celulares, após 48h de incubação e os seus respetivos valores de r².

Linha celular	2.22		2.23		2.24		2.25	
	tetraclorado Ru(III)		diclorado Ru(III)		tetraclorado Ru(II)		diclorado Ru(II)	
	IC ₅₀ (µM)	r ²	IC ₅₀ (µM)	r ²	IC ₅₀ (µM)	r ²	IC ₅₀ (µM)	r ²
MCF-7	3,5	0,98	4,8	0,95	3,8	0,96	3,9	0,89
HCC1806	4,6	0,97	7,6	0,99	8,9	0,98	6,7	1,00
LS1034	7,2	0,98	4,4	0,97	9,7	0,99	3,1	0,95
WiDr	5,1	0,98	6,1	0,73	9,9	0,96	3,3	0,93

A comparação dos valores de IC₅₀ obtidos com o complexo mais promissor, o complexo **2.18**, com os obtidos para os fármacos usados em quimioterapia convencional para o tratamento dos tipos de cancro em estudo (Tabela 3.3), evidenciam o potencial antitumoral do novo complexo sintetizado. De uma forma geral, verifica-se que os valores de IC₅₀ obtidos para o complexo **2.18**, foram na sua maioria inferiores nas diferentes linhas celulares, com exceção da epirrubicina, que apresentou valores de IC₅₀ de 0,320 e 0,240 µM para as linhas celulares MCF-7 e HCC1806, respetivamente.[101,120,121]

Tabela 3.3 Valores de IC₅₀ do complexo **2.18** e dos fármacos usados em quimioterapia convencional, após 48h de incubação nas linhas celulares MCF-7, HCC1806, LS1034 e WiDr. a: incubação com epirrubina; b: incubação com carboplatina; c: incubação com Docetaxel; d: incubação com 5-FU; e: incubação com irinotecano; f: incubação com oxaliplatina. [101,120,121]

Linha celular	2.18		Quimioterapia Convencional
	IC ₅₀ (μ M)	r ²	IC ₅₀ (μ M)
MCF-7	3,7	0,99	0,320 ^a
			>500 ^b
			11,90 ^c
HCC1806	2,1	0,98	0,240 ^a
			271,14 ^b
			8,35 ^c
LS1034	2,7	0,97	238 ^d
			47,5 ^e
			5,9 ^f
WiDr	3,1	0,96	442,4 ^d
			38,7 ^e
			21 ^f

Com base nos resultados obtidos, o complexo **2.18** foi o escolhido para prosseguir para estudos de viabilidade, de ciclo celular e de stresse oxidativo. Tais estudos foram realizados nas quatro linhas celulares tumorais, e para cada estudo foram testadas três condições, a condição controlo (sem administração de complexo), a condição de tratamento com a concentração correspondente à IC₅₀ e a condição de tratamento com 20 μ M do complexo **2.18**.

No entanto, antes de prosseguir para esses estudos, testou-se a atividade antiproliferativa do ligando isolado (**2.6**) e comparou-se com a do complexo (**2.18**) de modo a averiguar o papel do metal no efeito antitumoral dos complexos metálicos. Usaram-se as concentrações de 0 μ M, de 0,5 μ M, de 1 μ M, de 2 μ M e de 5 μ M de ambos os compostos e testou-se a sua atividade metabólica após 48 h de incubação, para as quatro linhas celulares tumorais. Os resultados estão presentes na Figura 3.3. Observa-se que o ligando **2.6** apresentou reduzida ou nenhuma atividade antiproliferativa em comparação com o complexo metálico **2.18**. Esta diferença de atividade antiproliferativa é mais notória nas células das linhas HCC1806 e LS1034, com diferenças

estatisticamente significativas para as concentrações de 2 μM ($p < 0,01$) e de 5 μM ($p < 0,001$) e para a concentração de 1 μM nas células da linha HCC1806 ($p = 0,007$). Para as restantes linhas celulares, o ligando mostrou ter alguma atividade antiproliferativa, mais notória na linha celular WiDr, em que chega a ser maior do que a do complexo para as concentrações de 0,5 μM ($p < 0,001$) e de 1 μM ($p = 0,002$). No entanto, para a concentração de 5 μM , a atividade antiproliferativa do complexo **2.18** foi superior à do ligando **2.6**, para as células das linhas MCF-7 e WiDr, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$ e $p = 0,01$, respetivamente).

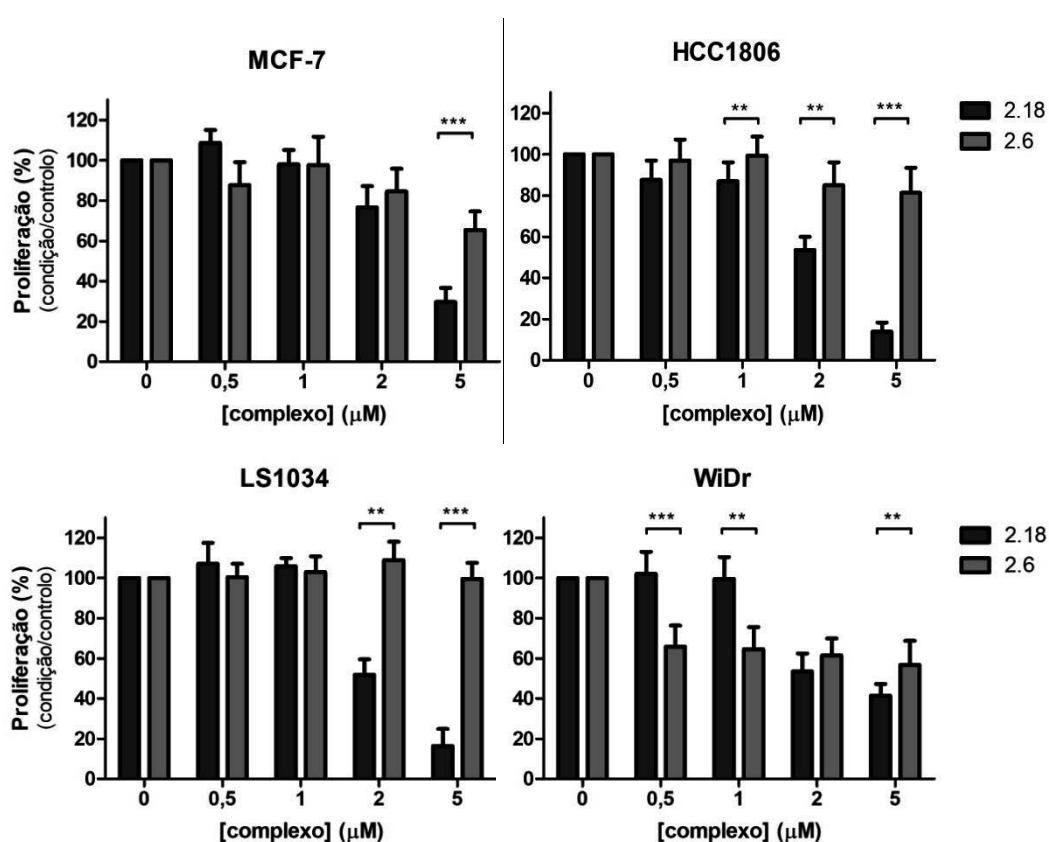


Figura 3.3 Efeito da atividade metabólica do ligando livre **2.6** nas células tumorais em estudo. As células foram tratadas com as concentrações de 0, de 0,5, de 1, de 2 e de 5 μM e após incubação de 48 horas, a proliferação celular foi avaliada pelo ensaio MTT. Os resultados são apresentados como a média \pm desvio padrão de, pelo menos, três ensaios independentes realizados em triplicado ($n \geq 9$). As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

3.2 Viabilidade e morte celular

Para averiguar até que ponto a diminuição de proliferação celular, após tratamento com o composto **2.18**, foi acompanhada por um aumento da morte celular, a viabilidade e os tipos de morte celular induzida foram avaliados recorrendo à técnica de citometria de fluxo pela dupla marcação com AV e IP. Os resultados da análise da viabilidade celular apresentados na Figura 3.4 revelam que o aumento da concentração do complexo **2.18** induz diminuição da percentagem de células viáveis em todas as linhas celulares tumorais.

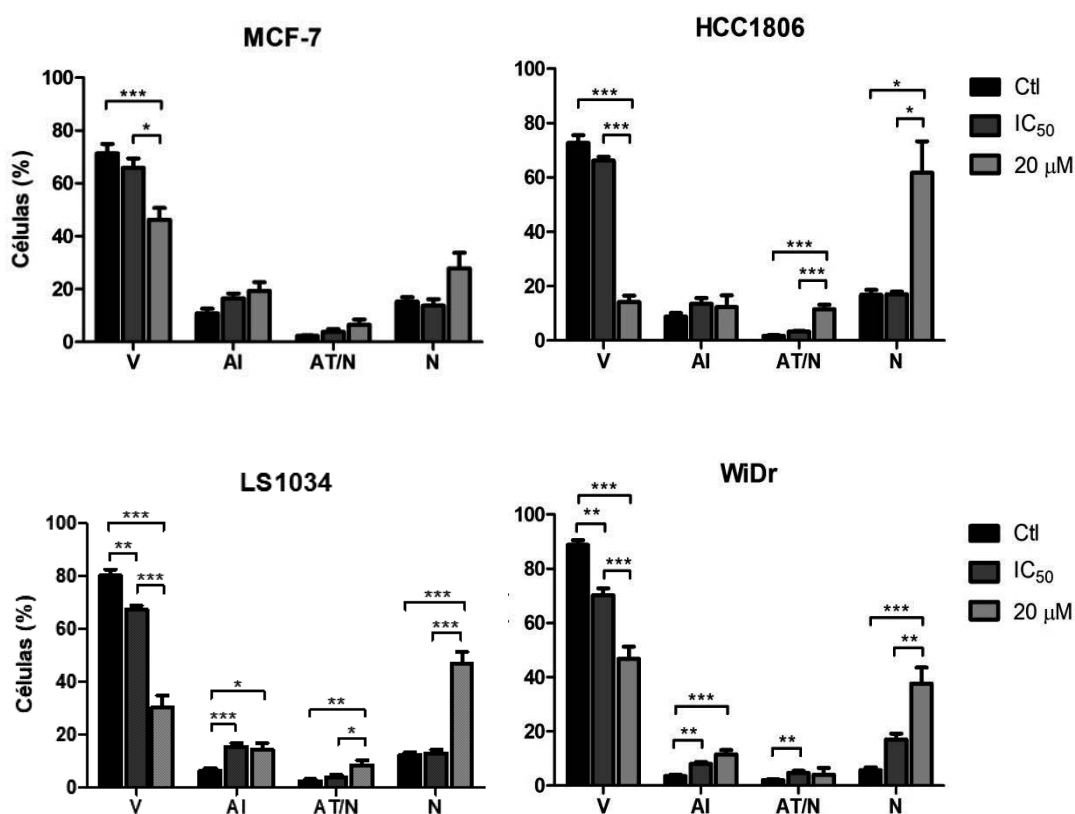


Figura 3.4 Viabilidade celular apresentada em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). As células foram tratadas durante 48 horas, sob três condições: um controlo, concentração correspondente ao respetivo valor de IC₅₀ e 20 μM do complexo **2.18**. Os valores de IC₅₀ para as diferentes linhas celulares são: MCF-7=3,7 μM; HCC1806=2,1 μM; LS1034=2,7 μM e WiDr=3,1 μM. Os resultados estão apresentados sob a forma de média ± erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizados em duplicado (n≥6). As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por * para p<0,05; ** para p<0,01 e *** para p<0,001.

Para as linhas celulares de cancro da mama, relativamente às células da linha MCF-7, a população de células viáveis foi cerca de 71,4%±3,5% no controlo, verificando-se uma diminuição de cerca de 5,5%, aquando do tratamento com 3,7 µM (IC₅₀) do complexo **2.18**, e de 25,1% com 20 µM (p<0,001). Não se verificam alterações estatisticamente significativas relativamente à percentagem de células em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose nas três condições. No caso da população de células em necrose, embora não sejam observadas diferenças estatisticamente significativas, constata-se uma tendência para o aumento desta população quando as células são tratadas com a concentração de 20 µM do complexo **2.18**.

Para as células da linha HCC1806, a diminuição da viabilidade celular foi bastante mais significativa, sendo a população de células viáveis do controlo de 72,6%±2,9% mas, quando tratadas com 2,1 µM (IC₅₀) de **2.18** diminuiu 6,5% (p<0,001) e 58,5% quando sujeitas a 20 µM (p<0,001). Não se verificam alterações estatisticamente significativas relativamente à percentagem de células em apoptose inicial nas três condições. Contudo, a diminuição da viabilidade é acompanhada pelo aumento de células em apoptose tardia/necrose quando as células são tratadas com 20 µM de complexo, em comparação com o controlo (9,8%; p<0,001) e com a condição IC₅₀ (8,2%; p<0,001). Por fim, na população de células em necrose, existe um aumento significativo entre as células controlo (16,8%±1,8%) e as tratadas com 20 µM (61,6%±8,6%; p=0,001) e entre as células tratadas com o IC₅₀ (17,0±1,0%) e com 20 µM (p=0,002). Assim, o tipo de morte predominante induzido pelo complexo **2.18** nesta linha celular é a necrose.

Relativamente às linhas celulares de cancro colorretal, para as células da linha LS1034 também se verifica claramente uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração de complexo. Assim, a população de células viáveis no controlo foi de 78,5%±2,3%, havendo uma diminuição de 48,3% quando as células foram tratadas com 20 µM (p<0,001) do complexo **2.18**. Entre a condição controlo e a IC₅₀ (2,7 µM) houve uma diminuição de 11,1% (p=0,002) e entre o IC₅₀ e 20 µM, ocorreu uma diminuição de 37,1% (p<0,001). Paralelamente, observa-se um aumento de células em apoptose inicial quando tratadas com 2,7 µM e 20 µM de **2.18** em relação ao controlo (p<0,001 e p=0,048 respetivamente), acompanhada pelo aumento do número

de células em apoptose tardia/necrose com significado estatístico entre o controlo e as células tratadas com 2,7 μM ($p=0,022$) e entre o controlo e as células tratadas com 20 μM ($p=0,002$). Para além disso, também se observou um aumento significativo da população de células em necrose, de $12,4\% \pm 1,2\%$ no controlo para $46,9\% \pm 4,3\%$ na condição de tratamento com 20 μM ($p < 0,001$).

Dentro das linhas celulares de cancro colorretal, a WiDr mostrou ser mais resistente ao complexo com diminuição da viabilidade celular de $88,8\% \pm 1,7\%$ no controlo para $46,8\% \pm 4,4\%$ após exposição a 20 μM de **2.18** ($p < 0,001$). Esta diminuição, apesar de não ser tão acentuada, foi também observada após exposição a 3,1 μM de **2.18** ($70,3\% \pm 2,5\%$; $p=0,002$). Entre as duas condições de tratamento com o complexo houve uma diminuição da viabilidade em 23,5% ($p < 0,001$). A redução da população de células WiDr viáveis após exposição a 20 μM de **2.18** foi acompanhada pelo aumento significativo ($p < 0,001$) de 8,0% de células em apoptose tardia/necrose e de 32,0% de células em necrose, ambas em relação à condição controlo.

Para complementar os resultados obtidos por citometria de fluxo realizaram-se estudos de morfologia celular, que nos permitiram analisar, a nível qualitativo, a viabilidade celular e o tipo de morte celular induzida nas células tratadas com o complexo **2.18**. Este estudo apenas foi realizado nas linhas celulares tumorais HCC1806 e LS1034, nas quais o complexo induziu maior atividade citotóxica.

Como pudemos observar na Figura 3.5, as imagens dos controlos apresentam células com a membrana celular íntegra. No entanto, quando as células foram sujeitas às concentrações IC_{50} do complexo **2.18**, observaram-se aspetos morfológicos compatíveis com necrose, isto é, alterações nas membranas celulares que permitiram o extravasamento do citoplasma, bem visível em ambas as linhas celulares. Nas células tratadas com a concentração mais alta (20 μM), os aspetos morfológicos anteriormente observados foram ainda mais evidentes, nomeadamente na linha celular HCC1806 em que se observou desintegração da membrana celular e extravasamento do citoplasma. Na linha celular LS1034 tratada com 20 μM , observaram-se ainda células com

a cromatina condensada, morfologia típica de apoptose. Estes dados morfológicos estão de acordo com os obtidos por citometria de fluxo.

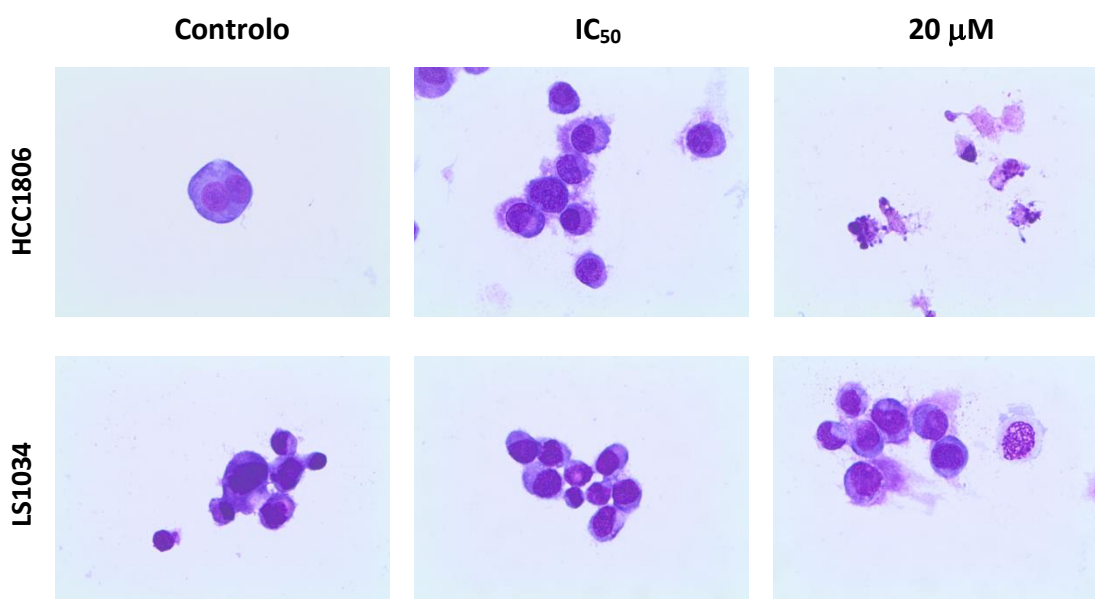


Figura 3.5 Análise morfológica das células HCC1806 e LS1034, tratadas durante 48 horas com o complexo **2.18**, nas seguintes condições: ausência do composto (controlo), concentrações correspondentes ao IC₅₀ (HCC1806=2,1 μM e LS1034=2,7 μM) e 20 μM. As imagens foram obtidas numa ampliação de 400x.

Visto que só fará sentido em termos de aplicação clínica continuar o estudo se o complexo **2.18** for seletivo para células tumorais, avaliou-se a viabilidade de duas linhas celulares de tecidos saudáveis após exposição ao mesmo. Os resultados preliminares obtidos nas células HFF1 (fibroblastos) e CCD841 CoN (colonócitos) apresentam-se na Figura 3.6. As condições testadas incluíram uma condição controlo (sem administração de composto), e duas condições de tratamento (3 e 20 μM).

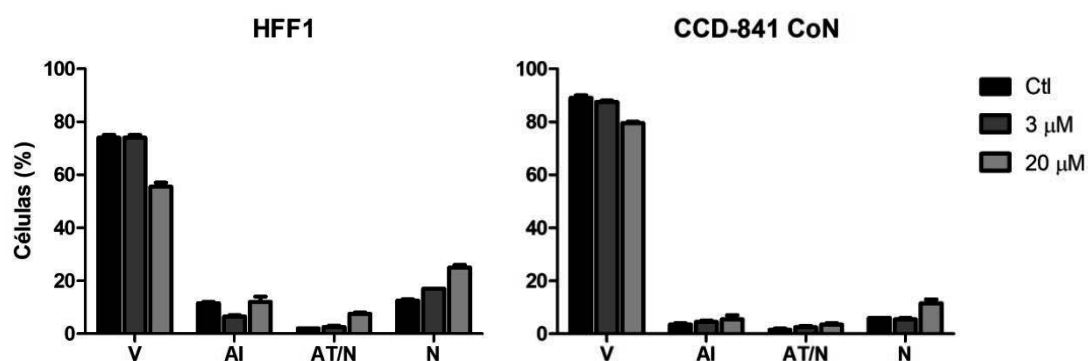


Figura 3.6 Viabilidade celular apresentada em percentagem (%) de células viáveis (V), em apoptose inicial (AI), em apoptose tardia/necrose (AT/N) e necrose (N). As células foram incubadas durante 48 horas, sendo avaliadas três condições: controlo (Ctl), concentrações de 3 μM e 20 μM do complexo **2.18**. Os resultados apresentados são preliminares, daí não apresentarem testes estatísticos, e apresentaram-se como a média ± erro-padrão de um ensaio realizado em duplicado.

Para a concentração de IC_{50} não se observou uma diminuição notória da viabilidade celular para as células saudáveis, no entanto, para as células tumorais essa inibição foi em média 10,4%. Para a concentração mais alta (20 μM) já se observa uma diferença mais notória na diminuição da viabilidade celular. Para a linha celular HFF1, em comparação com o controlo, observou-se uma ligeira diminuição de 18,5% da população de células viáveis quando tratadas com 20 μM de **2.18**. Em contrapartida para a linha celular CCD-481 CoN observou-se apenas uma pequena diminuição de 9,5% para a mesma condição. Esta diminuição da viabilidade celular foi acompanhada por um aumento ligeiro de células em necrose para ambas as linhas celulares. Assim, para as células saudáveis houve uma diminuição da viabilidade celular entre 9,5%-18,5%, bastante menos evidente do que para as células tumorais (entre 25,1%-58,5%). É de salientar que, embora o complexo **2.18** induza uma diminuição ligeira da viabilidade das células saudáveis, o mesmo induziu uma diminuição da viabilidade das linhas celulares tumorais cerca de 6 vezes superior, o que torna este composto seletivo para as células tumorais.

3.3 Avaliação do ciclo celular

Paralelamente à avaliação da viabilidade celular, avaliaram-se também os efeitos induzidos pelo composto **2.18** a nível do ciclo celular, recorrendo à técnica de citometria de fluxo, com a marcação IP/RNase. Os resultados das quatro linhas celulares estão evidenciados na Figura 3.7.

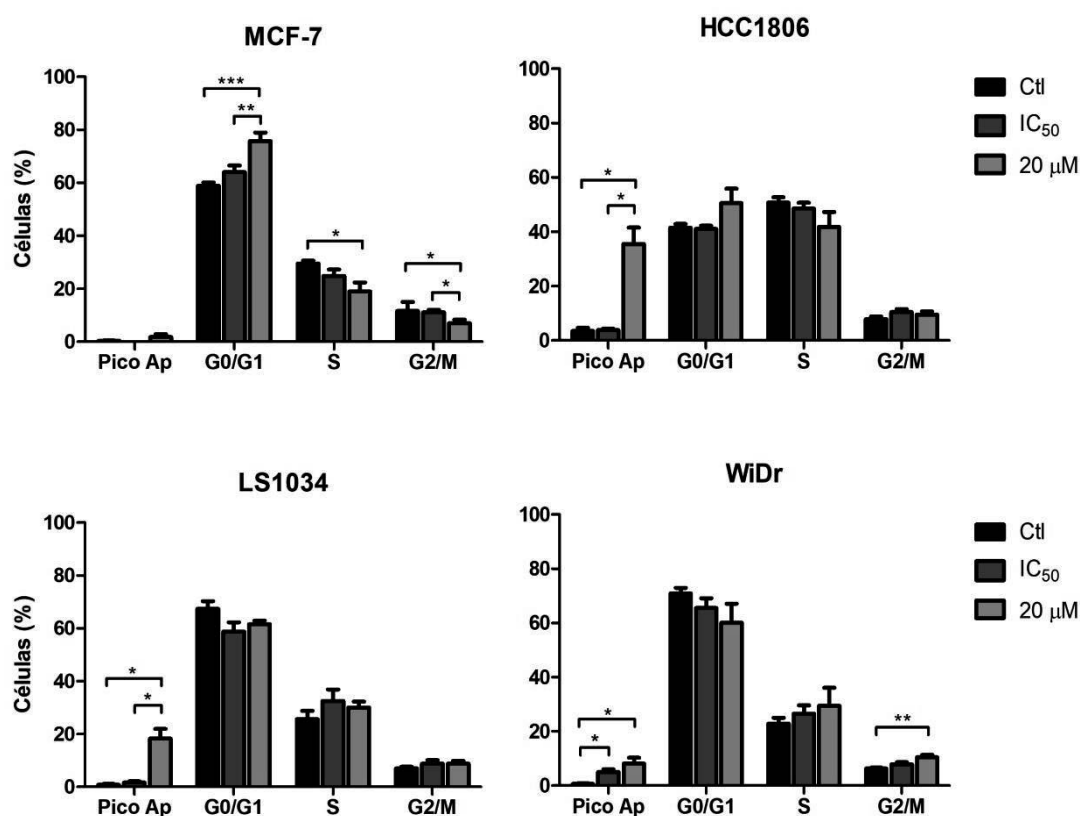


Figura 3.7 Ciclo celular apresentado em percentagem (%) de células em cada uma das fases do ciclo celular G₀/G₁, S e G₂/M. Além disso ainda está presente o pico apoptótico, que indica a indução de morte celular por apoptose. As células foram tratadas durante 48 horas, sendo realizadas três condições: controlo, concentrações IC₅₀ e 20 μM do complexo **2.18**. Os valores de IC₅₀ para as diferentes linhas celulares são: MCF-7=3,7 μM; HCC1806=2,1 μM; LS1034=2,7 μM e WiDr=3,1 μM. Os resultados apresentam-se sob a forma de média ± erro-padrão de, pelo menos, três experiências independentes realizadas em duplicado (n≥6) para as quatro linhas celulares. As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por * para p<0,05; ** para p<0,01.

Para as linhas celulares de cancro da mama, nomeadamente para a linha celular MCF-7, observou-se um bloqueio do ciclo celular na fase G₀/G₁ na presença de 20 μM do complexo **2.18**, que se traduziu num aumento de 16,8% de células relativamente ao controlo (p<0,001). Este aumento de células em fase G₀/G₁ foi acompanhado por

uma diminuição de células em fase S e em fase G₂/M com diferenças estatisticamente significativas (p=0,013 e p=0,012, respetivamente). A linha celular HCC1806 não apresentou diferenças estatisticamente significativas nas fases G₀/G₁, S e G₂/M, no entanto, quando as células foram tratadas com 20 µM de **2.18** observou-se um aumento notório do pico apoptótico de 32,0% relativamente ao controlo (p=0,024) e de (31,6%) relativamente à concentração intermédia (p=0,027).

Para as linhas celulares de cancro da mama, nomeadamente para a linha celular MCF-7, observou-se um bloqueio do ciclo celular na fase G₀/G₁ na presença de 20 µM do complexo **2.18**, que se traduziu num aumento de 16,8% de células relativamente ao controlo (p<0,001). Este aumento de células em fase G₀/G₁ foi acompanhado por uma diminuição de células em fase S e em fase G₂/M com diferenças estatisticamente significativas (p=0,013 e p=0,012, respetivamente). A linha celular HCC1806 não apresentou diferenças estatisticamente significativas nas fases G₀/G₁, S e G₂/M, no entanto, quando as células foram tratadas com 20 µM de **2.18** observou-se um aumento notório do pico apoptótico de 32,0% relativamente ao controlo (p=0,024) e de (31,6%) relativamente à concentração intermédia (p=0,027).

Para as linhas celulares de cancro colorretal, no que diz respeito à linha celular LS1034, pudemos verificar que para a população tratada com 20 µM houve um aumento estatisticamente significativo de 17,5% do pico apoptótico em relação ao controlo (p=0,036). Para a linha celular WiDr, observou-se também um aumento do pico apoptótico, de forma dependente da concentração de **2.18**. Assim, e comparando com a condição controlo, o tratamento com 3,1 µM do complexo induziu um aumento significativo de 4,4% de células nesta fase do ciclo celular (p=0,014), enquanto o tratamento com 20 µM induziu um aumento significativo de 7,5% (p=0,029). Para além disso, embora não sem diferenças estatisticamente significativas, na linha celular WiDr também se observou uma tendência para o bloqueio do ciclo celular na fase G₂/M, acompanhada pela diminuição de células na fase G₀/G₁ com o aumento da concentração de complexo.

3.4 Stresse oxidativo

Para avaliar se a citotoxicidade do complexo de rutênio **2.18** tem alguma relação com a indução de stresse oxidativo nas células tumorais, o próximo passo foi avaliar os níveis de ROS e da defesa antioxidante GSH. Para isso, analisou-se a presença intracelular de radical superóxido e de peróxidos e a expressão da defesa antioxidante GSH, recorrendo à técnica de fluorimetria. Usaram-se duas linhas celulares tumorais (HCC1806 e LS1034), que foram submetidas às três condições estudadas anteriormente: controlo, tratamento com a concentração correspondente ao valor de IC₅₀ (calculado anteriormente para cada linha celular) e tratamento com 20 µM do complexo **2.18**. As células foram submetidas a dois tempos de incubação (2 horas e 24 horas) com o complexo, de modo a perceber qual a evolução da produção destas espécies ao longo do tempo.

A produção intracelular de peróxidos em resposta ao tratamento com o complexo **2.18** pode ser observada na Figura 3.8.

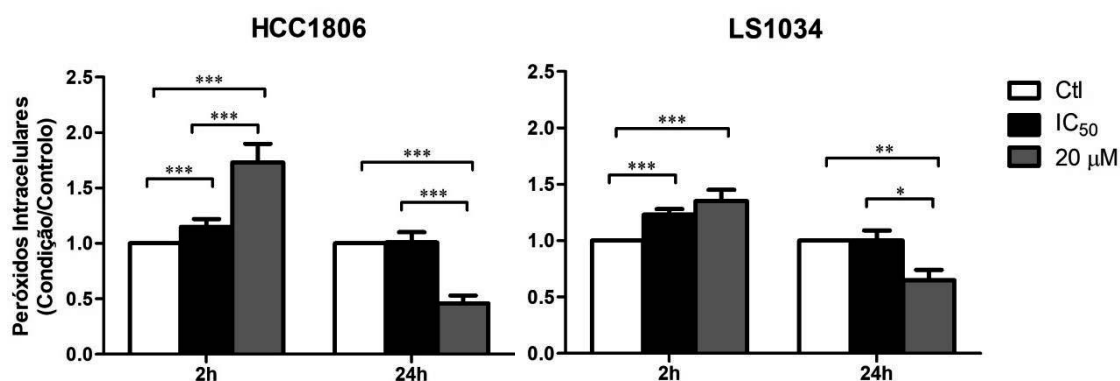


Figura 3.8 Avaliação da produção intracelular de peróxidos nas linhas celulares HCC1806 e LS1034, após a exposição ao composto **2.18** durante 2 e 24 horas. Os valores de IC₅₀ para as linhas celulares em estudo são: HCC1806=2,1 µM e LS1034=2,7 µM. Os resultados estão apresentados com normalização ao controlo, exprimindo a média ± desvio-padrão de, pelo menos, três experiências efetuadas independentemente e em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por * para $p < 0,05$; *** para $p < 0,001$.

Para a linha celular HCC1806, após 2 horas de incubação, verificou-se um aumento na produção intracelular de peróxidos com o aumento da concentração de **2.18**, com diferenças estatisticamente significativas entre todas as condições testadas

($p < 0,001$). Contudo, após 24 horas de incubação com 20 μM do composto observou-se uma diminuição para cerca de metade ($0,46 \pm 0,07$) da produção de peróxidos intracelulares, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) em comparação com o controlo.

Na linha celular LS1034, constatou-se um comportamento semelhante tanto para as células incubadas durante 2 horas, como para as células incubadas durante 24 horas, no entanto a diferença não é tão significativa como na linha celular HCC1806. Para ambos os casos, as células tratadas com a concentração correspondente à IC_{50} e com 20 μM apresentaram diferenças estatisticamente significativas em comparação com o controlo ($p < 0,001$), bem como diferenças estatisticamente significativas entre as duas condições tratadas na linha celular HCC1806 para as 2 e as 24 horas ($p < 0,001$) e a linha celular LS1034 para as 24 horas ($p < 0,05$).

A Figura 3.9 evidencia os efeitos do composto **2.18** na produção intracelular de radical superóxido pelas células em estudo.

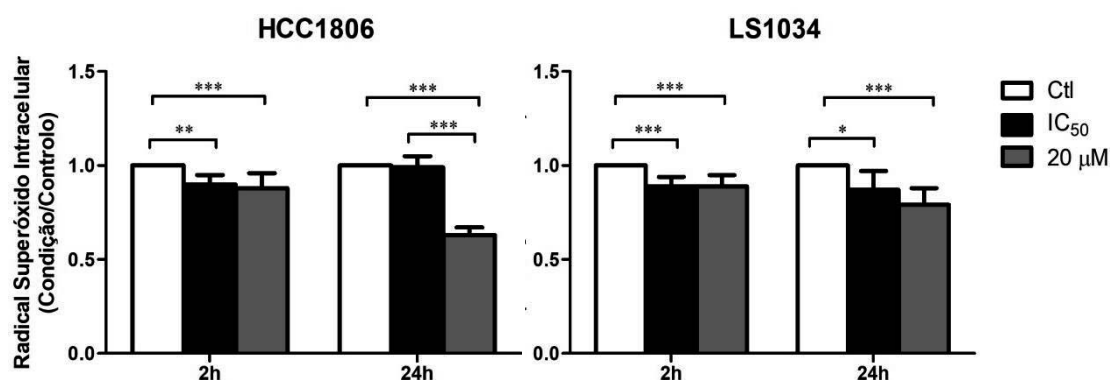


Figura 3.9 Avaliação da produção intracelular de radical superóxido nas linhas celulares HCC1806 e LS1034, após a exposição ao composto **2.18** durante 2 e 24 horas. Os valores de IC_{50} para as linhas celulares em estudo são: HCC1806=2,1 μM e LS1034=2,7 μM . Os resultados estão apresentados com normalização ao controlo, exprimindo a média e o desvio-padrão de, pelo menos, duas experiências efetuadas independentemente e em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; *** para $p < 0,001$.

Como se pode observar, o composto em estudo apresentou efeitos semelhantes nas duas linhas celulares e para os dois tempos de incubação. Assim, quando as

células HCC1806 e LS1034 foram tratadas com 20 μM de composto, observou-se uma diminuição na produção intracelular de radical superóxido para os dois tempos de incubação em relação ao controlo com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$). No entanto, essa diminuição foi mais evidente para a linha celular HCC1806 quando as células foram incubadas durante 24 horas, que atingiu o valor de $0,63\% \pm 0,04\%$, que é estatisticamente menor ($p < 0,0001$) em relação ao controlo e em relação ao tratamento com 2,1 μM . Diminuições nas células LS1034 incubadas com a concentração 2,7 μM para o tempo de incubação de 2 e de 24 horas foram também observadas em relação ao controlo, com significado estatístico ($p < 0,001$ e $p = 0,014$, respetivamente) entre estas duas condições.

Por fim, fez-se a avaliação da produção de defesa antioxidante como resposta às diferenças dos níveis de ROS, tendo sido quantificada a espécie GSH (Figura 3.10). Como se pode observar, os efeitos do complexo **2.18** influenciaram pouco a produção intracelular de GSH em ambas as linhas celulares, nos dois tempos de incubação para as condições estudadas. Houve apenas uma diminuição ligeira da produção intracelular de GSH, para o tempo de incubação de 24 horas, apresentando diferenças estatisticamente significativas entre a condição controlo e a condição tratada com 20 μM de complexo para a linha HCC1806 ($p = 0,004$) e para a linha celular LS1034 ($p = 0,024$).

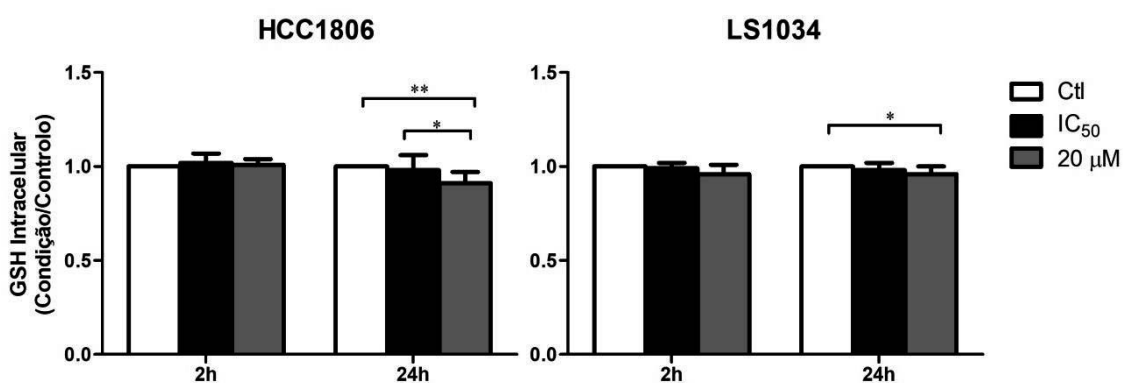


Figura 3.10 Avaliação da produção intracelular de GSH nas linhas celulares HCC1806 e LS1034, após a exposição ao composto **2.18** durante 2 e 24 horas. Os valores de IC₅₀ para as linhas celulares em estudo são: HCC1806=2,1 μM e LS1034=2,7 μM . Os resultados estão apresentados com normalização ao controlo, exprimindo a média e o desvio-padrão de, pelo menos, duas experiências efetuadas independentemente e em duplicado. As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por * para $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$.

3.5 Hemocompatibilidade

O estudo da hemocompatibilidade serviu para avaliar se o complexo **2.18** induziu alterações na integridade da membrana dos eritrócitos. Caso o complexo comprometa a integridade da membrana celular, a hemoglobina é libertada para o meio e facilmente quantificada.[121]

Para este estudo foram testadas quatro concentrações crescentes do complexo (1, 5, 20 e 100 μM) em eritrócitos de sangue humano, e usou-se um surfactante como controlo positivo (Triton X-100), responsável por induzir lise nas células. Os valores da percentagem de hemoglobina libertada após sujeição das células às diferentes condições encontram-se na Figura 3.11.

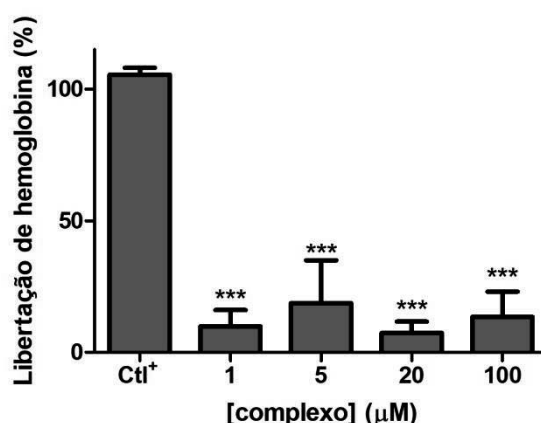


Figura 3.11 Quantificação da libertação de hemoglobina, expressa em percentagem em relação ao controlo positivo menos o controlo negativo, após a incubação dos eritrócitos com concentrações crescentes (1, 5, 20 e 100 μM) do complexo **2.18**. Os resultados apresentam-se sobre a forma de média e o desvio-padrão de três experiências efetuadas independentemente e em triplicado (n=9). As diferenças estatisticamente significativas estão apresentadas por *** para $p < 0,001$.

Os resultados obtidos demonstram que o complexo **2.18** não induziu hemólise significativa nos eritrócitos. Para as quatro condições tratadas com complexo, observou-se que não houve uma dependência da atividade hemolítica com o aumento da concentração de complexo, e que a variação de hemoglobina libertada foi entre 7 a 18% nas quatro condições, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as mesmas. Por outro lado, comparando a hemoglobina libertada pelas condi-

ções tratadas com complexo com a hemoglobina libertada pela condição controlo positivo ($105,5\% \pm 2,6\%$), observou-se que esta última foi cerca de 5 vezes superior, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,001$) entre o controlo e todas as outras condições. Mesmo para a concentração mais elevada testada, que corresponde a uma concentração 4 vezes superior à concentração de composto usada nos ensaios de citotoxicidade, a atividade hemolítica foi baixa ($13,5\% \pm 9,6\%$), constatando-se que o complexo **2.18** não induz danos significativos na membrana dos eritrócitos.

Discussão dos resultados dos estudos *in vitro*

Os complexos de ruténio derivados do ácido canfórico cuja síntese é descrita no capítulo 2, foram avaliados quanto à sua atividade antitumoral em linhas celulares de cancro da mama e de cancro colorretal. Incluído nesse objetivo principal, houve vários objetivos secundários, que justificam a síntese de 8 complexos metálicos estruturalmente semelhantes. Um dos objetivos foi perceber se o número de átomos de cloro influenciava a atividade antitumoral dos complexos, e por isso sintetizaram-se e testaram-se complexos di- e tetraclorados. Outro objetivo foi perceber se o estado de oxidação do metal influenciava a atividade citotóxica, assim se justificando a síntese e estudo de complexos de ruténio com dois estados de oxidação, Ru(II) e Ru(III). Por fim, para se estudar o efeito da redução do grupo imina (-CH=N-) do ligando a amina (-CH₂-NH-) na atividade antitumoral dos complexos, sintetizaram-se os ligandos salan di- e tetraclorados e os seus respetivos complexos de Ru(II) e Ru(III). Relativamente às linhas celulares em estudo, testou-se a atividade antiproliferativa em linhas celulares de dois tipos de cancro, o cancro da mama e o cancro colorretal. Para cada tipo de cancro, a atividade dos complexos foi avaliada em duas linhas celulares com características fenotípicas e genotípicas diferentes. Para o caso do cancro da mama, realizaram-se estudos nas linhas celulares MCF-7 e HCC1806, tendo a última menos possibilidades terapêuticas e pior prognóstico, em comparação à linha celular MCF-7, porque é derivada de um tipo de cancro de mama triplo negativo, mais agressivo e invasivo.[122] Por outro lado, relativamente ao cancro colorretal, avaliaram-se os complexos nas linhas celulares WiDr e LS1034, sendo a última linha celular descrita como sendo resis-

tente à quimioterapia, devido à presença de uma proteína de efluxo a glicoproteína-P.[123]

O primeiro estudo *in vitro* realizado foi a avaliação da atividade metabólica das células tumorais após tratamento com os diferentes complexos. Discutindo primeiramente os complexos salen, verificou-se que todos induziram a diminuição da proliferação das células tumorais de forma dependente da concentração. Concluiu-se ainda, através dos valores de IC_{50} calculados a partir das curvas dose-resposta, que o complexo tetraclorado de Ru(III) **2.18**, foi o que teve um efeito mais notório na inibição da proliferação celular. Tal efeito foi muito semelhante em todas as linhas celulares tumorais em estudo, apresentando valores de IC_{50} de 3,7 μ M, de 2,1 μ M, de 2,7 μ M e de 3,1 μ M, para as linhas MCF-7, HCC1806, LS1034 e WiDr, respetivamente. Os outros três complexos salen, **2.19**, **2.20** e **2.21** apresentaram valores de IC_{50} superiores, entre os 10,5 μ M e os 26,3 μ M revelando, por isso, menor atividade antitumoral. Estes resultados obtidos nas várias linhas celulares com os diferentes complexos salen, por serem semelhantes entre si, sugerem que o efeito dos complexos é independente do tipo de cancro em estudo.

Para avaliar a influência do número de átomos de cloro na atividade antiproliferativa dos complexos, compararam-se os valores de IC_{50} obtidos dos complexos com o mesmo número de oxidação mas que diferiam no número de átomos de cloro. Comparando os complexos salen de Ru(III), **2.18** e **2.19**, observou-se que o complexo **2.18** apresentou valores de IC_{50} entre os 2,1 μ M e os 3,7 μ M, enquanto o complexo **2.19** apresentou valores de IC_{50} entre os 15,7 μ M e os 26,3 μ M. Neste caso, pode-se concluir que o maior número de átomos de cloro favoreceu a atividade antiproliferativa dos complexos, visto que o complexo **2.18**, cuja estrutura difere apenas na presença de mais dois cloros relativamente ao complexo **2.19**, induziu uma maior inibição da proliferação celular. Uma possível justificação pode fundamentar-se na atividade lipofílica que os átomos de halogénio conferem aos complexos metálicos, propiciando assim, transporte para o interior das células e consequente interação com o alvo biológico.[107] Quanto mais átomos de cloro tiver o complexo, mais lipofílico será e maior será a sua captação celular. No entanto, o mesmo não se observa quando se compa-

ram os dois complexos salen de Ru(II), **2.20** e **2.21**, em que a presença de 4 cloros no complexo **2.20** não beneficiou a sua atividade antiproliferativa comparativamente à presença de dois cloros no complexo **2.21**, visto que ambos apresentam valores de IC₅₀ similares. Posto isto, neste caso o número de átomos de cloro não influenciou a atividade proliferativa dos complexos de Ru(II). Estudos realizados com complexos metálicos de Cu(II) com os mesmos ligandos, di- e tetraclorados demonstraram resultados bastante semelhantes aos obtidos com os complexos de Ru(III), na medida em que apresentaram menores valores de IC₅₀ para o complexo tetraclorado, do que para o diclorado.[110] Estes resultados indicam que, embora o centro metálico seja diferente, a presença destes ligandos clorados é fundamental para a atividade antiproliferativa dos complexos.

Para avaliar a influência do estado de oxidação dos complexos, compararam-se complexos com o mesmo número de cloros, mas que diferem no estado de oxidação do metal. Relativamente aos complexos tetraclorados **2.18** e **2.20** observou-se que o complexo em que o ruténio apresenta número de oxidação +3, o complexo **2.18**, apresentou uma inibição da atividade proliferativa 3 a 5 vezes superior em comparação à do complexo em que o ruténio apresenta número de oxidação +2, o complexo **2.20**. Por outro lado, comparando a influência do número de oxidação do metal nos complexos diclorados, o complexo **2.19** e o complexo **2.21**, o mesmo já não se verificou. O complexo **2.19** apresentou valores de IC₅₀ entre os 15,7 µM e os 18,8 µM com exceção das células WiDr que apresentaram um valor de IC₅₀ bastante superior, de 26,3 µM, enquanto o complexo **2.21** apresentou valores de IC₅₀ de 10,5 µM e 17,8 µM. Neste caso, o número de oxidação não teve influência significativa na atividade proliferativa dos complexos diclorados. A melhor atividade antitumoral dos complexos de Ru(III) seria de esperar porque, tal como descrito no capítulo 1, estes têm tendência a sofrer redução em ambiente tumoral, tornando-se mais ativos.[69]

Observou-se que, individualmente, o número de átomos de cloro ou o estado de oxidação do complexo, por si só, não determinou a atividade antiproliferativa dos complexos. No entanto, a presença do metal em estado de oxidação +3 e os quatro átomos de cloro, em simultâneo, induziu um aumento na atividade antiproliferativa do

complexo. Este aumento pode ser justificado porque os quatro átomos de cloro aumentam a lipofilicidade dos complexos e, conseqüentemente, permitem uma maior captação do complexo para o interior das células.[124] No interior das células tumorais, os complexos de Ru(III) sofrem ativação por redução, reação essa que é favorecida pelo facto do meio intracelular das células tumorais ser mais ácido.[125] Esta redução pode ter influência na interação do complexo com o alvo biológico, que pode ser uma interação direta ou uma interação mediada pela produção de fatores que induzem morte celular.

Para se estudar o efeito da redução dos grupos imina do ligando a amina na atividade antiproliferativa dos complexos, avaliaram-se os complexos salan di- e tetraclorados de Ru(II) e Ru(III). Nestes complexos, observou-se que os valores de IC₅₀ são muito semelhantes entre si para as diferentes linhas celulares em estudo, nomeadamente entre valores entre os 3,5 µM e os 7,2 µM para o **2.22**, entre os 4,4 µM e os 7,6 µM para o **2.23**, entre os 3,8 µM e os 9,9 µM para o **2.24** e entre os 3,1 µM e os 6,7 µM para o **2.25**. Estes resultados indicam que o efeito destes complexos salan é independente do tipo de cancro.

Comparando os complexos salan com os complexos salen, verifica-se que de uma forma geral os salan apresentaram valores de IC₅₀ inferiores, entre os 3,1 µM e os 9,9 µM, relativamente aos salen, que apresentaram valores entre os 2,1 µM e os 26,3 µM. Esta maior atividade antiproliferativa dos complexos salan poderá ser justificada pelo facto das ligações simples da diamina na sua estrutura aumentarem a sua flexibilidade e, dessa forma, facilitarem a sua interação com o alvo.[126]

A atividade antiproliferativa de todos os complexos estudados no âmbito desta dissertação foi semelhante nas diferentes linhas celulares, indicando que a sua atividade não é dependente do tipo de cancro nem do tipo de linha celular. Contudo, foi o complexo de Ru(III) do salen tetraclorado **2.18** o que apresentou valores de IC₅₀ mais baixos e portanto foi seleccionado para completar os estudos.

Dentro do mesmo tipo de cancro utilizaram-se duas linhas celulares de *background* genético e origem distintos, sendo uma delas descrita como resistente por apresentar uma proteína de efluxo (a linha celular LS1034 de cancro do cego)[123] e outra mais agressiva por ser tripla negativa (linha HCC1806 de cancro da mama)[127] mas, no entanto, a atividade antiproliferativa foi semelhante. Como são linhas celulares provenientes de tipos de cancro que apresentam pior prognóstico e alternativas terapêuticas escassas, a atividade antitumoral do complexo **2.18** nestes casos é ainda mais relevante. No caso da linha celular HCC1806, os resultados favoráveis de atividade citotóxica revelam que o complexo pode ser uma possível abordagem terapêutica eficaz no tipo de cancros da mama triplo negativos. Estes resultados permitem-nos também inferir que o complexo em estudo possivelmente apresenta um mecanismo de ação independente de recetores hormonais.

A comparação dos valores de IC_{50} obtidos com o complexo mais promissor, **2.18**, com os obtidos para os fármacos usados em quimioterapia convencional para o tratamento dos tipos de cancro em estudo (ver Tabela 3.3), evidenciam o potencial antitumoral do novo complexo sintetizado. De uma forma geral, verificou-se que os valores de IC_{50} obtidos para o complexo **2.18**, foram na sua maioria mais baixos quando comparados com os da quimioterapia convencional.

Para se perceber se a atividade antiproliferativa do complexo **2.18** foi devido à presença do metal ou era inerente ao próprio ligando, comparou-se a atividade antiproliferativa do complexo **2.18** e do ligando correspondente, o composto **2.6**. Os resultados demonstraram que o ligando só por si não apresenta efeito inibitório da proliferação celular significativo para as linhas celulares HCC1806 e LS1034, inferindo-se desta forma que a presença do centro metálico de ruténio é relevante na inibição da proliferação celular.[67,135]

A atividade antitumoral presente nos complexos de ruténio em geral pode ser justificada por fatores biológicos que influenciam a sua atividade. Um deles é a estabilidade dos complexos de Ru(II) e Ru(III) em soluções fisiológicas. Embora os últimos sejam, em geral, considerados menos reativos, têm a particularidade de agir como

profármacos quando no interior das células tumorais.[66,67] Outra característica bastante relevante, e que fundamenta a atividade citotóxica por parte dos complexos de rutênio, é a sua seletividade para as células tumorais. Os complexos de rutênio têm a capacidade de substituir os íons Fe(III) que interagem com a transferrina e, como as células tumorais têm, geralmente, uma sobre-expressão de recetores de transferrina, há um aumento da seletividade dos complexos de Ru(III) para essas células.[9,73] Estas duas propriedades foram observadas no NAMI-A, complexo de rutênio que alcançou os ensaios clínicos.[73,136] Estas características podem conferir aos complexos de rutênio propriedades que sejam responsáveis pelo aumento da sua atividade citotóxica que, para alguns complexos de rutênio, chega a ser superior à da cisplatina.[137,138] O complexo de Ru(III) **2.18** por nós testado é um exemplo, no entanto existem outros.[137,138] Cai Li e os seus colaboradores testaram a atividade antiproliferativa de uma série de complexos de Ru(III) salen contendo ligandos axiais de guanidina e de amidina, numa variedade de linhas celulares tumorais, incluindo a linha celular MCF-7. Os resultados demonstraram que alguns dos complexos tinham atividade antiproliferativa superior à da cisplatina. O complexo mais promissor para a linha celular MCF-7 apresentou uma IC₅₀ de 0,5 µM e a IC₅₀ da cisplatina foi de 12,2 µM.[106]

Quando se estudou a atividade antiproliferativa do ligando na linha celular MCF-7 e, sobretudo, na linha celular WiDr, o ligando mostrou alguma atividade antiproliferativa. Isto pode ser devido à atividade antiproliferativa inerente dos ligandos do tipo salen. Ahmet Kilik *et al.* avaliaram a atividade antiproliferativa de ligandos salen e respetivos complexos de boro em diferentes linhas celulares tumorais, tendo observado que a maioria dos ligandos apresentava maior atividade antiproliferativa do que o respetivo complexo. O mecanismo de ação por trás desta diminuição da proliferação celular do ligando mais potente envolveu a produção de ROS e indução de apoptose.[132]

Devido ao seu efeito promissor como possível fármaco para o tratamento dos tipos de cancro em estudo, a atividade antitumoral do complexo **2.18** foi avaliada em maior detalhe. Com efeito, realizaram-se estudos *in vitro* para avaliar o seu efeito cito-

tóxico e averiguar se o seu mecanismo de ação implicava o envolvimento de stresse oxidativo.

Como a diminuição da atividade metabólica pode não se traduzir em morte celular, realizaram-se testes de viabilidade celular. Um composto pode ter um mecanismo de ação que conduz à morte celular, ou induzir um bloqueio do ciclo celular que pode desencadear morte celular.[133] Por isso analisou-se a distribuição das células pelas diferentes fases do ciclo celular após exposição ao composto que apresentou uma atividade antiproliferativa mais elevada, o complexo salen tetraclorado de Ru(III) **2.18**.

Para as quatro linhas celulares tumorais em estudo, verificou-se que o aumento da concentração de complexo resulta numa diminuição da viabilidade celular. O tipo de morte celular predominante nas diferentes linhas celulares, induzida pela concentração mais alta de **2.18**, foi a necrose. No entanto, para algumas linhas celulares, também se observaram aumentos nas populações de células em apoptose inicial e/ou apoptose tardia/necrose, para as condições de tratamento. Os resultados da morfologia corroboraram os obtidos por citometria de fluxo relativamente à viabilidade celular, observando-se predominante morte por necrose. Este tipo de morte foi também observado após exposição de células MCF-7, HCC1806, LS1034 e WiDr a um complexo de Cu(II)[110] que possuía o mesmo ligando que o complexo **2.18**. Pode-se assim presumir que o ligando confere ao complexo propriedades fundamentais para o seu efeito citotóxico, podendo envolver um mecanismo de ação semelhante.

A apoptose é uma morte celular programada, extremamente ordenada e regulada, que ocorre para eliminar células defeituosas.[134] Por outro lado, a necrose é uma morte celular que está associada a uma reação inflamatória e que ocorre, normalmente, quando as células são agredidas por fatores externos, que causam lesões irreparáveis.[135] O que acontece com o composto estudado nesta dissertação é que, para concentrações intermédias, induziu predominantemente morte celular por apoptose e, para a concentração mais alta, morte celular por necrose em todas as linhas celulares tumorais em estudo. Isto pode ser justificado porque diferentes concentra-

ções do mesmo composto podem originar diferentes respostas biológicas, dependendo da severidade da agressão, fator determinante no tipo de morte celular. Esta agressão pode estar, por exemplo, associada a diferentes níveis de stresse oxidativo. Segundo a literatura, o tipo de morte celular mediada por ROS é dependente da quantidade e do tipo de ROS produzidas.[143,144]

Discutindo os resultados obtidos para o ciclo celular, na linha celular MCF-7 houve uma paragem do ciclo celular na fase G_0/G_1 . Esta fase corresponde à fase onde as células se estão a preparar para a replicação do material genético, onde há síntese de proteínas, ARN e, conseqüentemente, um aumento do tamanho celular.[137] O que pode acontecer neste caso é que o estímulo é tão exagerado que induz bloqueio antes das células conseguirem sintetizar o ADN, provavelmente devido ao *checkpoint* G_1 , responsável por detetar danos no ADN e verificar se a célula apresenta condições para se dividir (como nutrientes, fatores de crescimento e tamanho). Caso as lesões sejam corrigidas, as células continuam a sua divisão, mas nos casos em que há lesões mais graves e a célula não as consegue reparar, é induzida morte celular programada.[137] Estes resultados são apoiados pela ocorrência de morte celular por necrose observada nos estudos de viabilidade celular e corroborados pelos resultados de morfologia. Esta linha celular, foi a única que não apresentou um aumento significativo no pico apoptótico, o que está de acordo com os resultados de viabilidade celular, visto que também foi a única linha que não apresentou aumentos significativos da população em apoptose.

A linha celular HCC1806, por sua vez, não apresentou bloqueio do ciclo celular, no entanto apresentou um pico apoptótico bastante evidente para as células tratadas com a concentração mais alta. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para a viabilidade celular, onde se observou um aumento significativo da população de células em apoptose tardia/necrose na mesma condição. Por sua vez, a linha celular LS1034 apresentou um comportamento bastante semelhante à da linha celular HCC1806. No entanto, para além do aumento da população de células em apoptose tardia/necrose, esta também apresentou um aumento na população de células em apoptose inicial o que pode justificar, com mais segurança, o pico apoptótico presente

nessa linha celular. Estas duas linhas celulares ou não expressam a proteína P53, como é o caso da HCC1806[127], ou expressam-na mutada, caso da linha celular LS1034.[130] A proteína P53 é fundamental para regular o ciclo celular, visto ser responsável por parar o ciclo celular para corrigir erros de síntese do ADN, ou, caso não consiga corrigir, induzir apoptose.[138] Esta pode ser uma possível justificação para a inexistência de bloqueio do ciclo celular nestas linhas celulares.

Por fim, para a outra linha celular de cancro colorretal, a linha WiDr, observou-se uma tendência para o bloqueio do ciclo celular na fase G_2/M , acompanhada por um aumento do pico apoptótico, de forma dependente da concentração. O aumento do pico apoptótico está de acordo com o obtido para os estudos de viabilidade celular, em que há um aumento de células na população em apoptose inicial, também de forma dependente da concentração. O bloqueio do ciclo celular na fase G_2/M pode estar relacionado com o *checkpoint* G_2 , responsável por impedir que as células entrem na fase M quando o ADN está danificado. Nestas situações, há interrupção do ciclo celular e reparação das lesões, ou, caso as lesões sejam irreparáveis, a célula sofre apoptose.[139] Desta forma, o bloqueio na fase G_2/M relaciona-se com a presença de morte por apoptose e com o aumento do pico apoptótico observado após o tratamento, que pode estar relacionado com danos no ADN, como foi observado por alguns complexos de ruténio descritos na literatura.[73]

Para averiguar a seletividade do complexo **2.18**, avaliou-se a viabilidade de duas linhas celulares saudáveis, fibroblastos (HFF1) e colonócitos (CCD841 CoN). Embora os resultados sejam preliminares, observou-se uma diminuição da viabilidade celular de 9,5% a 18,5%, para cada uma das linhas celulares, respetivamente, acompanhada de um aumento do número de células em necrose. No entanto, se compararmos com as quatro linhas celulares tumorais em estudo, o complexo induziu uma diminuição da viabilidade que variou entre 25,1% e 58,5%. A seletividade dos fármacos usados em quimioterapia para as células tumorais é um fator crucial, visto que, quanto mais seletivos forem para as células de interesse, menos efeitos secundários induzem e, melhores resultados reproduzem na terapêutica. Estes resultados demonstram que o complexo **2.18** pode ser até seis vezes mais seletivo para as linhas celulares tumo-

rais, resultados bastante favoráveis para a sua aplicação clínica. Esta seletividade para as células tumorais já era espectável, porque os complexos de Ru(III) têm elevada afinidade para os sítios de ligação do ferro à transferrina e, as células tumorais sobreexpressam recetores de transferrina na sua superfície. É de esperar que, *in vivo*, este efeito seja exacerbado porque existe uma maior disponibilidade de Fe(III) e de recetores de transferrina. Por outro lado, os complexos de Ru(III) agem como profármacos, na medida em que sofrem ativação por redução em ambiente ácido, presente no interior das células tumorais.[9,73] Por este motivo espera-se que os complexos de Ru(III) exibam uma ação mais seletiva em células tumorais do que em células saudáveis.

Como abordado anteriormente, a necrose foi o principal tipo de morte induzido pelo complexo **2.18**. Este tipo de morte celular é muitas vezes provocado por um estímulo oxidativo intenso resultante da produção de ROS. Por esta razão, avaliou-se a produção de ROS e da defesa antioxidante GSH, para conseguirmos entender se o mecanismo de ação do complexo envolve a indução de stresse oxidativo. Esta análise foi feita nas linhas celulares em que o complexo induziu uma maior diminuição da viabilidade celular (HCC1806 e LS1034), após a sua exposição durante 2 e 24 horas. Neste caso em particular, a avaliação não foi feita às 48 horas porque, as ROS em geral e, o peróxido de hidrogénio e o radical superóxido em particular, têm um tempo de vida curto devido a um complexo sistema antioxidante responsável por consumir muito eficientemente essas espécies.[140]

Um aumento de peróxidos intracelulares, de forma dependente da concentração foi observado para ambas as linhas celulares em que houve exposição ao complexo durante 2 horas. Por outro lado, para o tratamento durante 24 horas com a concentração mais alta de complexo, observou-se o comportamento oposto, isto é, diminuição dos peróxidos intracelulares. Esta diminuição dos peróxidos intracelulares ao longo do tempo pode resultar do seu tempo de meia vida curto[140] ou ser devido à sua conversão noutras ROS. Os complexos de Ru(III) possuem a particularidade de substituir os iões Fe(III) na sua ligação à transferrina induzindo, desta forma, um aumento de iões Fe(III) livres. Estes iões de Fe(III) ficam disponíveis para reagir com o peróxido de

hidrogénio, com formação de radical hidroxilo, responsável por causar lesões severas a nível do ADN.[141] Estes resultados demonstram a importância de avaliar a produção de ROS em tempos curtos e com diferentes tempos de incubação com o complexo, visto que, a análise da mesma ROS com tempos de incubação diferentes origina resultados díspares. Por outro lado, a produção de ROS em tempos mais curtos (2 horas e 24 horas) repercute-se num efeito biológico mais tardio, neste caso, morte celular (avaliado às 48 horas). Neste caso, a morte celular pode ser provocada por lesões celulares induzidas diretamente pelo peróxido de hidrogénio, ou, em alternativa, pela conversão desta ROS em espécies ainda mais reativas, como o radical hidroxilo, produzido em consequência da reação de *Fenton*. [148,149]

O radical superóxido apresentou um comportamento semelhante em ambas as linhas celulares e nos dois tempos de incubação. De um modo geral, há diminuição desta ROS com o aumento da concentração de complexo, sendo essa diminuição mais notória nas células incubadas durante 24 horas com o complexo **2.18**, do que as células incubadas durante 2 horas. Neste último caso, não se observaram diferenças significativas na produção da ROS em estudo, entre a condição tratada com a concentração intermédia e a condição tratada com 20 μM , nas duas linhas celulares. Em analogia com o que acontece com os peróxidos, a diminuição do radical superóxido com o aumento do tempo de exposição pode estar relacionado com o seu curto tempo de meia vida ou com a sua conversão noutras espécies.[140] Este radical pode sofrer uma dismutação espontânea consigo mesmo, ou com o óxido nítrico, resultando na formação de peroxinitrito, molécula extremamente tóxica. Para além disso, a enzima superóxido dismutase pode sofrer dismutação em peróxido de hidrogénio que, formado na presença de ferro, poderá levar ao aumento do stresse oxidativo pela reação de *Fenton*. [148,149]

A literatura refere que o tipo de morte celular mediada por ROS é dependente da quantidade e do tipo de ROS produzidas.[143,150] Neste caso, é possível que concentrações intermédias do complexo **2.18** induzam nas células um estímulo oxidativo moderado que se associa ao tipo de morte celular observado, isto é, apoptose. Por

outro lado, verificou-se que concentrações mais elevadas estão associadas a um estímulo oxidativo mais intenso, que promove morte celular por necrose.

Por fim, a defesa antioxidante GSH apresentou uma diminuição ligeira ao longo do tempo e com o aumento da concentração de complexo **2.18** nas duas linhas celulares. Houve uma ligeira diminuição da produção desta defesa apenas no tempo incubação de 24 horas. É esperado que o aumento das ROS aumente a produção da defesa antioxidante GSH. Neste caso, das ROS em estudo, apenas os peróxidos intracelulares, com 2 h de incubação, aumentaram com o aumento da concentração de complexo. Por outro lado, era expectável que a diminuição de GSH fosse mais acentuada que a diminuição de peróxidos, porque a redução de cada molécula de peróxido consome duas moléculas de GSH.[136] No entanto, observou-se que a diminuição de peróxidos foi mais acentuada. A inexistência de uma relação entre o aumento ou diminuição da GSH com o aumento ou diminuição dos peróxidos intracelulares, pode ser justificada pela existência de um envolvimento de outras espécies reativas que reagem com a sonda DCF utilizada para medir a produção intracelular de peróxidos como, por exemplo, o radical óxido nítrico, o peroxinitrito, o hipoclorido e outras RNS.[142] Por outro lado, pode revelar que os peróxidos intracelulares se converteram noutras espécies e não foram detoxificados pela GSH.[141][143]

O complexo de ruténio em estudo, nas duas linhas celulares que apresentaram melhores resultados na diminuição da proliferação celular, demonstrou um comportamento semelhante nos estudos de viabilidade celular, de ciclo celular, de produção de ROS e de defesa antioxidante. Por isso, pressupõem-se que muito provavelmente o complexo **2.18** apresente um mecanismo de ação semelhante nessas linhas celulares. Nas duas linhas celulares, o complexo não induziu bloqueio do ciclo celular mas apresentou um pico apoptótico bastante evidente, que indica que há presença de corpos apoptóticos formados pelo processo de apoptose. O facto de o complexo não ter induzido bloqueio do ciclo celular, pode significar que o alvo biológico do complexo não é o ADN, ao contrário do que acontece com muitos complexos de ruténio, que apresentam o ADN como alvo.[66] No entanto, como abordado anteriormente, estas duas

linhas celulares ou não expressam a proteína P53, ou expressam-na mutada, o que pode justificar a inexistência de bloqueio do ciclo celular.

Foi realizado um estudo de hemocompatibilidade para verificar se o complexo **2.18** induzia lise nos eritrócitos do sangue, que permite prever se há compatibilidade da administração do complexo por via intravenosa.[144][145] O tamoxifeno, um dos fármaco anti-estrogénico mais prescritos na quimioterapia do cancro da mama, induz hemólise e, conseqüentemente, anemia hemolítica.[146] Relativamente ao complexo **2.18**, observou-se que a incubação do complexo com as células sanguíneas não provocou libertação elevada de hemoglobina, isto é, a membrana nos eritrócitos não sofreu alterações permitindo a retenção da hemoglobina no seu interior. Desta forma, infere-se que é possível a administração do complexo em estudo por via intravenosa.

Pode-se concluir que o complexo que apresentou um efeito inibitório da proliferação celular mais notório, quando comparado com os restantes, foi o complexo salen tetraclorado de Ru(III) **2.18**. Este pode considerar-se uma alternativa promissora aos fármacos antitumorais atualmente usados na clínica, pois apresenta maior atividade antiproliferativa, com valores de IC_{50} mais baixos do que a maioria dos fármacos usados em quimioterapia convencional nas mesmas linhas celulares em que o estudo do complexo **2.18** foi realizado. Paralelamente, este complexo apresentou um efeito citotóxico para além de antiproliferativo. Para concentrações intermédias apresentou morte celular por apoptose que pode resultar da produção de ROS, nomeadamente de peróxidos intracelulares que desencadeiam a reação de Fenton. Por outro lado, para a concentração mais elevada, desencadeou necrose possivelmente em resposta à severidade da agressão induzida pela elevada concentração de complexo e por estímulos oxidativos mais intensos. O complexo **2.18** não demonstrou atividade hemolítica significativa, o que possibilita a sua administração por via intravenosa. Para além disso, demonstrou ter atividade citotóxica em linhas celulares associadas a tumores com pior prognóstico e menor disponibilidade de abordagens terapêuticas eficazes e apresentou elevada seletividade para as linhas celulares tumorais em estudo. É esperada que esta seletividade, bem como a atividade antitumoral seja mais aumentada em estudos *in vivo*, visto que, como abordado no capítulo 1, os complexos de Ru(III) atuam como

pró fármacos, sofrendo ativação por redução em ambientes tumorais e de hipoxia. Adicionalmente, *in vivo* as células tumorais sobexpressam recetores de transferrina, e os complexos de Ru(III) têm demonstrado elevada afinidade para esses recetores.[69] A elevada seletividade e atividade citotóxica do complexo de Ru(III) **2.18** tornam-no num possível e promissor complexo usado no tratamento do cancro da mama e color-retal.

CAPÍTULO IV

Conclusão

Conclusão

A finalidade do trabalho descrito nesta dissertação foi a síntese de novos complexos de ruténio derivados do ácido (+)-canfórico e a avaliação da sua atividade antitumoral em linhas celulares de cancro da mama e de cancro colorretal, de forma a considerar a sua possível aplicação como alternativa aos fármacos usados atualmente na quimioterapia convencional.

Os complexos de ruténio, em geral, assim como complexos de outros metais contendo ligandos salen têm demonstrado atividade antitumoral de grande interesse na área da química medicinal. Por esta razão, sintetizaram-se oito complexos de ruténio (**2.18-2.25**) derivados do ácido canfórico, quatro deles do tipo salen e outros quatro do tipo salan, que variaram no número de átomos de cloro no ligando e no número de oxidação do metal. Para finalização de trabalhos anteriores, sintetizou-se também um complexo de cobre do tipo salen tetraclorado derivado do *L*-ácido tartárico (**2.26**).

Os oito complexos de ruténio (**2.18-2.25**) foram submetidos posteriormente a testes *in vitro* em linhas celulares de cancro da mama e de cancro colorretal. Todos os complexos sintetizados induziram uma inibição da proliferação celular de forma dependente da concentração. O complexo de Ru(III) tetraclorado (**2.18**) foi o que apresentou uma atividade antiproliferativa mais promissora, a qual se poderá dever ao facto deste complexo apresentar quatro átomos de cloro e de ter estado de oxidação +3. Os halogénios aumentam a lipofilicidade dos complexos e, conseqüentemente, facilitam a captação do complexo para o interior das células. Por outro lado, complexos de Ru(III) geralmente atuam como profármacos, na medida em que quando alcan-

çam as células tumorais, reduzem-se e ficam na sua forma ativa. Em simultâneo estas duas propriedades podem aumentar a atividade antiproliferativa do complexo.

Os complexos salan em geral apresentaram maior atividade antiproliferativa do que os complexos salen, o que pode ser justificado pelo facto dos complexos salan apresentarem na sua estrutura uma ligação simples C-N, em vez da dupla ligação da imina presente nos complexos salen e, por isso, serem mais flexíveis e apresentarem maior facilidade para interagir com o alvo.

A atividade antiproliferativa de todos os complexos estudados no âmbito desta dissertação foi semelhante nas diferentes linhas celulares, indicando que a sua atividade não é dependente do tipo de cancro nem do tipo de linha celular. Contudo, foi o complexo de Ru(III) do salen tetracolorado **2.18** o que apresentou valores de IC₅₀ mais baixos e portanto foi selecionado para completar os estudos. Paralelamente, o ligando não complexado não apresentou atividade proliferativa considerável na maioria das linhas celulares, em comparação com o complexo metálico. Dessa forma, concluiu-se que o centro metálico desempenha um papel essencial na atividade antiproliferativa demonstrada pelo complexo.

O efeito antiproliferativo do complexo **2.18** traduziu-se igualmente num efeito citotóxico em todas as linhas celulares, mais evidente nas linhas celulares associadas a tumores com piores prognósticos, isto é, tumores da mama triplo negativos e tumores do cólon resistentes à quimioterapia. Em geral, verificou-se que concentrações mais baixas do complexo **2.18** induziram morte celular por apoptose, e que mais altas por necrose. Paralelamente, o complexo **2.18** induziu o bloqueio do ciclo celular nas fases G₀/G₁ e G₂/M, dependendo da linha celular em estudo. Contudo, linhas celulares caracterizadas pela ausência ou mutação da proteína P53, não tiveram o ciclo celular afetado.

Quanto ao envolvimento do stresse oxidativo no mecanismo de ação do complexo **2.18**, verificou-se que para tempos curtos houve um aumento de peróxidos intracelulares de forma dependente da concentração e para tempos mais longos de incubação o comportamento oposto foi observado. A presença desta ROS juntamente

com um aumento dos íons de ferro, devido ao complexo de Ru(III), potenciam a reação de *Fenton*, e, conseqüentemente conversão desta ROS noutras espécies. A produção do radical superóxido e da defesa antioxidante GSH diminuiu ao longo do tempo e de forma dependente da concentração. A diminuição do radical superóxido com o aumento do tempo de exposição pode estar relacionado com o seu curto tempo de meia vida ou com a sua conversão noutras espécies altamente tóxicas, como peróxido de hidrogénio e peroxinitrito. Relativamente à defesa antioxidante GSH, a inexistência de uma relação entre a sua produção e a produção das ROS pode ser justificada pela existência de um envolvimento de outras espécies reativas que reagem com a sonda DCF utilizada para medir a produção intracelular de peróxidos, ou, por outro lado, porque os peróxidos intracelulares se converteram noutras espécies e não foram detoxificadas pela GSH.

A produção de ROS pôde repercutir-se num efeito biológico mais tardio, neste caso, morte celular. O tipo de morte celular mediada por ROS é dependente da quantidade e do tipo de ROS produzidas. Neste caso observou-se que concentrações intermédias do complexo **2.18** induziram um estímulo oxidativo moderado que se associou a morte celular por apoptose. Por outro lado, concentrações mais elevadas associaram-se a um estímulo oxidativo mais intenso que promoveu morte celular por necrose.

A avaliação da viabilidade celular do complexo **2.18** nas linhas celulares saudáveis HFF1 e CCD841 CoN permitiu inferir que este é mais seletivo para linhas celulares tumorais, do que para as saudáveis. Esta seletividade para as células tumorais possivelmente está associada à afinidade que os complexos de Ru(III) têm para os recetores de transferrina, e ao maior número de recetores de transferrina que as células tumorais apresentam em relação às células normais. Desta forma, espera-se que o complexo em estudo induza uma ação com reduzidos efeitos adversos nos tecidos adjacentes saudáveis, o que enfatiza a possível aplicabilidade do complexo na clínica.

Os estudos de hemocompatibilidade do complexo reforçam as conclusões anteriores, na medida em que a reduzida libertação de hemoglobina após exposição ao

complexo **2.18** mostra que este não induziu lesões nas membranas nos eritrócitos. Este facto pressupõe a possibilidade de administração do complexo por via intravenosa.

A elevada atividade citotóxica e seletiva para células tumorais do cancro da mama e colorretal apresentada pelo complexo **2.18**, nesta fase inicial de testes biológicos, permite-nos concluir que o complexo poderá ser um possível fármaco promissor para utilização no tratamento destes tipos de cancro. Como perspetivas futuras é importante dar continuidade aos estudos de modo a perceber melhor o seu mecanismo de ação. Estudos subsequentes poderão incluir a avaliação de diversos parâmetros, tais como: a enzima SOD, que é uma defesa antioxidante que catalisa a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogénio ou oxigénio; os danos no ADN, através do ensaio cometa; proteínas relacionadas com processos de morte celular, como a BAX e a BCL-2, que são proteínas pró- e anti-apoptóticas, respetivamente, a avaliação de recetores de transferrina na superfície das células em estudo, para confirmar se a seletividade para as células tumorais sempre se deve ao excesso de recetores de transferrina nessas células. Adicionalmente, a execução de ensaios *in vivo*, permitirá avaliar se o complexo apresenta uma atividade anti-proliferativa superior, como é esperado, e verificar se a seletividade obtida *in vitro* se mantém.

CAPÍTULO V

Experimental

5. Experimental

Este capítulo descreve os procedimentos experimentais que foram seguidos para desenvolver esta dissertação. Começa por descrever os procedimentos químicos realizados para obter os compostos descritos no capítulo II, os processos de purificação e secagem dos solventes, as técnicas de identificação, caracterização e aparelhos utilizados neste trabalho (espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C , infravermelho e ponto de fusão). A segunda parte do capítulo é relativa aos estudos *in vitro*, e caracteriza as linhas celulares, os materiais e métodos utilizados, bem como a técnica de citometria de fluxo, o ensaio de hemocompatibilidade e os aparelhos usados para desenvolver esta dissertação.

5.1 Técnicas de identificação e caracterização

Espetros de ressonância magnética nuclear

Os espetros de ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C) foram realizados à temperatura ambiente, recorrendo a um espectrómetro *Brucker Avance III* 400MHz, utilizando o tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. Os solventes usados foram clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido (DMSO- d_6).

Espetros de infravermelho

Os espetros de infravermelho foram obtidos, num espectrofotómetro *Agilent Technologies Cary 630 FTIR*, recorrendo a pastilhas de KBr.

Ponto de fusão

Os pontos de fusão foram determinados num medidor de pontos de fusão FALC (método capilar aberto).

Cromatografia

Placas de sílica 60 F264 com suporte de alumínio, fornecidas pela Merck, foram utilizadas para cromatografia de camada fina (TLC), de modo a controlar a evolução das reações.

Citometria de fluxo

As sondas fluorescentes foram detetadas tendo sido utilizado um citómetro FACS Calibur.

Ensaio de hemocompatibilidade

Nesta técnica, para a quantificação da hemoglobina libertada foi utilizado um espectrofotómetro ELISA (Biotek®, *Synergy HT*).

5.2 Purificação e secagem dos solventes e reagentes

Os reagentes foram adquiridos comercialmente apresentando alto grau de pureza, não tendo sido necessário recorrer a qualquer purificação adicional. Quanto aos solventes, estes foram destilados e secos de acordo com os procedimentos descritos de seguida.

Acetato de etilo

O solvente foi refluxado durante 2h30, na presença de K_2CO_3 .

Clorofórmio e diclorometano

Foram refluxados na presença de $CaCl_2$ durante 2h, tendo sido de seguida destilados.

DMF

Durante 24h, o solvente foi tratado com óxido de cálcio que anteriormente fora ativado a 500°C. Após decantação, foi adicionado NaOH, e agitado durante 1h. Finalmente, o DMF foi decantado e destilado.

Etanol e metanol

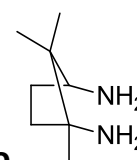
Estes solventes foram refluxados com magnésio e uma quantidade catalítica de iodo durante 2h, e depois destilados a partir dos respectivos alcóxidos, de acordo com o método de Lund e Bjerrum.

Éter etílico, hexano e THF

Foram obtidos após refluxo com sódio e na presença de benzofenona, usada como indicador (cor azul significa ausência de água no solvente) e posterior destilação.

5.3 Métodos sintéticos

5.3.1 Síntese de (1*R*, 3*S*)-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano



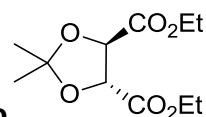
Num balão de duas tubuladuras, uma com rolha e outro condensador, adicionou-se 50 mmol de ácido canfórico a 100 mL de clorofórmio e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado. A reação foi colocada a uma temperatura de 65°C com agitação magnética. Adicionou-se lentamente 150 mmol de azida de sódio e deixou-se ocorrer a reação durante 18h à mesma temperatura. Posteriormente, adicionou-se gelo e hidróxido de sódio até atingir pH 14. Procedeu-se a extrações com porções de clorofórmio, lavou-se a fase orgânica com água, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se. Obteve-se um óleo amarelo pálido. Rendimento: 94%. A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: $[\alpha]_D^{25} = +30$ (c1, etanol). RMN ^1H (CDCl_3): 1.11 (s, 3H); 1.20 (s, 3H); 1.38 (s, 3H); 1.76-2.01 (m, 2H); 2.13-2.34 (m, 2H); 3.55 (aprox. t,

^1H , J8.8). RMN ^{13}C (CDCl_3): 17.9, 21.3, 22.8, 25.7, 34.5, 46.1, 59.2, 64.3. IV (cm^{-1}): 3427, 3404, 3322, 3049, 3028, 2988, 2970, 2933, 2933, 2903, 2885, 2886, 2842, 2812, 1600, 1522.

5.3.2 Síntese de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diaminobutano

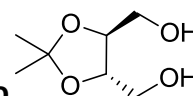
A síntese desta diamina envolveu várias etapas que são descritas de seguida.

5.3.2.1 Síntese de (*R,R*)-2,3-*O*-Isopropilideno-tartarato de dietilo



Num balão de fundo redondo, adicionou-se 50 mmole (10.3 g) de *L*-(+)-tartarato de dietilo, 70 mole (9.2 mL) de 2,2-dimetoxipropano, 125 mL de tolueno e 1 mmol (0.2 g) de ácido *p*-toluenossulfónico mono-hidratado. Manteve-se a reação em refluxo durante aproximadamente 3 horas, com controlo por TLC (AcOEt:hexano 1:1). Decorrido o tempo, deixou-se arrefecer a solução e procedeu-se a extrações com solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio. Posteriormente, secou-se a fase orgânica com Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Obteve-se um óleo acastanhado. Rendimento: 78%. A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: $[\alpha]_D^{22} = -41.9$ (c 5.25, CHCl_3). RMN ^1H (CDCl_3): 1.33 (t, 6H, J7.1); 1.50 (s, 6H); 4.29 (q, 4H, J7.1); 4.78 (s, 2H). RMN ^{13}C (CDCl_3): 13.9, 26.2, 61.7, 77.0, 113.6, 169.5. IV (cm^{-1}): 2988, 2942, 1757, 1358, 1375, 1260, 1210, 1165, 1111, 1026.

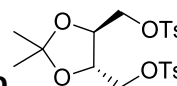
5.3.2.2 Síntese de (*S,S*)-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-di-hidroxitbutano



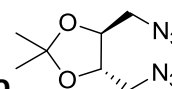
Uma solução de 40 mmole (10 g) de 2,3-*O*-Isopropilideno-tartarato de dietilo em 80 mL de THF seco foi colocada num banho de gelo. Adicionou-se lentamente 80 mmole (3.24 g) de hidreto de alumínio e lítio, controlando-se a temperatura sem dei-

xar ultrapassar os 25°C. A reação ocorreu em atmosfera inerte (uso de torre de secagem) à temperatura ambiente e sob agitação durante uma noite. Em banho de gelo, adicionou-se à mistura da reação acetato de etilo para destruir o excesso de hidretos. De seguida, foram adicionados, sequencialmente: 4 mL de água, 4 mL de NaOH 15 % e novamente 12 mL de água e deixou-se agitar a mistura reacional aproximadamente 2 horas. No final, filtrou-se a mistura reacional por celite, secou-se com Na₂SO₄ e evaporou-se o solvente. Obteve-se um óleo incolor. Rendimento: 96%. A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: $[\alpha]_D^{22} = +3.9$ (c5, CHCl₃) [+4.1 (c5, CHCl₃)]. RMN ¹H (CDCl₃): 1.42 (s, 6H); 3.70-3.74 (m, 6H); 4.95 (sl, 2H). RMN ¹³C (CDCl₃): 26.8, 62.1, 78.4, 109.2. IV (cm⁻¹): 3047, 2990, 2936, 2884, 1651, 1570, 1454, 1412, 1377, 1252, 1219. m/z: 147 [(M+H)⁺, 29.2], 131 (25.6), 87 (7.5), 69 (18.1), 59 (100.0)

5.3.2.3 Síntese de (S,S)-2,3-O-isopropilideno-1,4-ditosiloxibutano

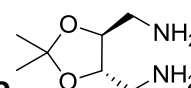


Num erlenmeyer dissolveu-se 20 mmol (3.24 g) de 2,3-O-isopropilideno-1,4-dihidroxi-butano em 20 mL de clorofórmio seco, e, arrefeceu-se a 0 °C num banho de gelo. De seguida, adicionou-se 6.5 mL (80 mmol) de piridina e adicionou-se em pequenas porções 60 mmol (11.4 g) de cloreto de tosilo, sob agitação magnética. Após concluída a reação, (aproximadamente 3 horas, controlada por TLC), procedeu-se à extração com diclorometano e água, e, seguidamente mais duas vezes com diclorometano. As fases orgânicas combinadas foram lavadas com HCl 1 M, com NaHCO₃ (10%), e por fim, com água. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Obteve-se um óleo que, após recristalização em etanol, deu origem a um sólido branco pálido. Rendimento: 68%. A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: p.f.: 67°C. $[\alpha]_D^{22} = -12.0$ (c8.8, CHCl₃) [-12.0 (c8.8, CHCl₃)]. RMN ¹H (CDCl₃): 1.30(s, 6H); 2.46 (s, 6H); 3.98-4.04 (m, 2H); 4.06-4.12 (m, 4H); 7.36 (d, 4H, J8.0); 7.78 (d, 4H, J8.0). RMN ¹³C (CDCl₃): 21.6, 26.7, 66.4, 75.0, 110.8, 127.9, 129.9, 132.4, 145.2. IV (cm⁻¹): 2980, 2930, 1597, 1597, 1380, 1360, 1190, 1175, 1098.



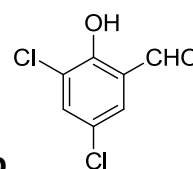
5.3.2.4. Síntese de (S,S)-2,3-O-isopropilideno-1,4-diazidobutano

Dissolveu-se 4 mmol de 2,3-O-isopropilideno-1,4-ditosiloxibutano em 20 mL de DMF seco. Adicionou-se 4 equivalentes de azida de sódio e aqueceu-se a reação a 90°C, durante aproximadamente 18 horas, em atmosfera inerte. Decorrido o tempo, deixou-se arrefecer a reação e depois evaporou-se o DMF. Ao sólido obtido, adicionou-se acetato de etilo e lavou-se três vezes com água. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente. Obteve-se um óleo castanho claro. Rendimento: 82%. A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: RMN ¹H (CDCl₃): 1.47 (s, 6H), 3.34 (dd, 2H, J₂, J₁₂), 3.36 (dd, 2H, J₂, J₁₆), 4.03-4.08 (m, 2H). IV (cm⁻¹): 3403, 2090, 1441, 1437, 1381, 1374, 983, 927, 883



5.3.2.5 Síntese de (S,S)-2,3-O-isopropilideno-1,4-diaminobutano

Num reator de hidrogenação dissolveu-se 2 g (9.43 mmol) de diazida em 40 mL de etanol seco e adicionou-se 0.13 g de Pd/C a 10%. Colocou-se o reator num hidrogenador do tipo Parr, à temperatura ambiente e sob uma pressão de hidrogénio de 1 atm durante uma noite. Filtrou-se a mistura sob celite e evaporou-se o etanol. Obteve-se um óleo transparente. Rendimento: 100%. A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: RMN ¹H (CDCl₃): 1.41 (s, 6H), 1.51 (sl, 4H) 2.81-2.96 (m, 4H), 3.79 (t, 2H, J_{2.6}).



5.3.3 Síntese de 3,5-dicloro-2-hidroxibenzaldeído

Num balão dissolveu-se 16.9 mmol de diclorofenol (2.75 g) em 16.9 mmol de hexametenotetramina (2.37 g) e 15 mL de TFA, em atmosfera inerte, com agitação contínua e a uma temperatura de 130 °C durante cerca de 24h (reação controlada por TLC). Posteriormente, adicionou-se 10 mL de HCl 4M e agitou-se durante 10 minutos. Extraíu-se a mistura da reação duas vezes com 75 mL de diclorometano e juntaram-se

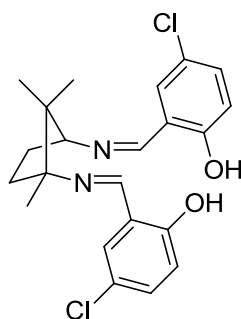
as fases orgânicas para serem extraídas com duas porções de 100 mL de HCl 4M, 100 mL de H₂O e, por fim, com uma solução saturada de NaCl. As fases orgânicas combinadas foram secas com Na₂SO₄, filtrou-se e evaporou-se. Obtém-se um sólido amarelo claro. Rendimento: 58%. A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: p.f.: 94-95 °C. RMN ¹H (CDCl₃): 7.49 (d, 1H, J2.4); 7.61 (d, 1H, J2); 9.55 (s, 1H); 11.37 (s, 1H). RMN ¹³C (CDCl₃): 121.4, 123.5, 124.7, 131.1, 136.5, 155.9, 195.0. IV (cm⁻¹): 3448, 1606, 1444, 1410, 1385, 1323, 1209, 1173, 868, 758.

5.3.4. Síntese dos salens

Procedimento geral para a síntese dos salens:

Num erlenmayer colocar 5 mmol de diamina, 10 mmol de salicilaldeído e 1.8 g de sílica em 20 mL de etanol. Colocar num banho de ultrassons até a reação estar completa, monitorizando por TLC usando mistura de AcOEt/hexano 1:3. Filtrar o produto da reação, evaporar o solvente e isolar o produto por recristalização em CH₂Cl₂/hexano.

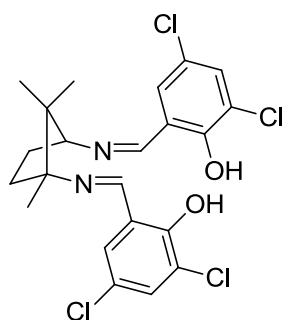
5.3.4.1 Síntese de (1*R*, 3*S*)-*N,N'*-bis[5-cloro-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano



Obtém-se um sólido amarelo. Rendimento: 65%. A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: p.f.: 176- 177 °C. RMN ¹H (CDCl₃): 1.31 (s, 3H);

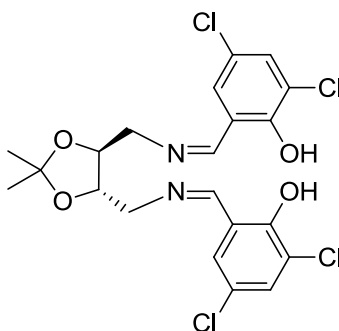
1.83 (s, 3H); 1.89 (s, 3H); 1.83-1.97 (m, 1H); 1.98-2.07 (m, 1H); 2.16-2.23 (m, 1H); 2.25-2.34 (m, 1H); 3.60 (aprox. t, 1H, $J_{8.60}$); 6.89-6.92 (d, 2H, $J_{4.20}$); 7.24-7.26 (d, 4H, $J_{4.40}$); 8.27-8.28 (d, 2H, $J_{2.4}$); 13.47 (s, 1H); 14.00 (s, 1H). RMN ^{13}C (CDCl_3): 18.9, 20.9, 24.3, 28.7, 34.1, 48.5, 71.0, 76.5, 118.6, 118.7, 119.5, 119.7, 123.0, 123.2, 130.4, 130.6, 132.0, 132.1, 156.8, 160.0, 160.4, 162.8. IV (cm^{-1}): 3440, 2983, 2968, 1633, 1483, 1379, 1281, 1186, 1124, 1061, 827, 789

5.3.4.2 Síntese de (1R, 3S)-N,N'-bis[3,5-dicloro-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano



Obtém-se um sólido amarelo. Rendimento: 71%. A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: p.f.: 101-102°C. RMN ^1H (CDCl_3): 0.97 (s, 3H); 1.00 (s, 3H); 1.34 (s, 3H); 1.86-1.92 (m, 1H); 1.93-2.08 (m, 1H); 2.20-2.27 (m, 1H); 2.30-2.37 (m, 1H); 3.66 (aprox. t, 1H, $J_{8.4}$); 7.18 (d, 2H, $J_{6.2}$); 7.42 (d, 2H, $J_{1.2}$); 8.25 (s, 2H); 14.4 (s, 1H); 14.90 (s, 1H). RMN ^{13}C (CDCl_3): 18.9, 20.7, 24.4, 27.9, 33.8, 48.6, 70.9, 75.5, 119.2, 119.3, 122.1, 122.6, 123.0, 123.3, 129.0, 129.2, 132.4, 157.0, 157.9, 160.3, 162.6. IV (cm^{-1}): 3446, 2954, 2912, 1624, 1439, 1410, 1409, 1213, 1165, 1146, 872, 754, 706.

5.3.4.3 Síntese de (2*S*, 3*S*)-*N,N'*-bis[3,5-dicloro-salicilideno]-2,3-*O*-isopropilideno-1,4-diaminobutano



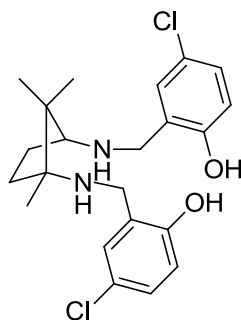
Obtém-se um sólido amarelo. Rendimento: 44%. A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: p.f.: 170-172 °C. RMN ^1H (CDCl_3): 1.37 (s, 6H); 3.87-3.89 (m, 4H); 4.20-4.22 (m, 2H); 7.16-7.40 (m, 4H); 8.31 (s, 2H); 13.90 (s, 2H). IV (cm^{-1}): 3448, 2962, 2924, 1610, 1527, 1458, 1385, 1321, 1178, 825, 710, 656

5.3.5. Síntese dos salans

Procedimento geral para a síntese dos salans:

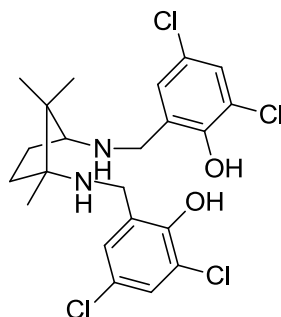
Num balão de fundo redondo adicionou-se 1 mmol de salen em 10 mL de $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3$ 1:1 durante 10 minutos, à temperatura ambiente sob agitação magnética. Decorrido o tempo, adicionou-se lentamente 10 equivalentes de boro-hidreto de sódio (0.38 g) à solução num banho de gelo. A reação foi controlada por TLC ($\text{AcOEt}:\text{hexano}$ 1:1). Finda a reação, colocou-se num banho de gelo e adicionou-se cloreto de amónia. Adicionou-se água e extraiu-se três vezes com diclorometano. Juntaram-se as fases orgânicas, secaram-se com Na_2SO_4 , filtrou-se e evaporou-se o solvente. Recristalizou-se o produto da reação em éter.

5.3.5.1 Síntese de (1*R*, 3*S*)-*N,N'*-bis[1-(5-cloro-2-hidroxifenil)metil]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano



Obtém-se um sólido branco pérola. Rendimento: 86%. A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: p.f.: decomp. 174°C. RMN ¹H (CDCl₃): 0.94 (s, 3H); 1.01 (s, 3H); 1.17 (s, 3H); 1.41-1.51 (m, 1H); 1.71-1.78 (m, 1H); 1.87-1.95 (m, 1H); 2.15-2.24 (m, 1H); 2.96 (aprox. t, 1H, J8.8); 3.82-4.09 (m, 4H); 6.73-6.77 (m, 2H); 6.97 (d, 2H, J1.2); 7.10-7.14 (m, 2H). RMN ¹³C (CDCl₃): 16.8, 21.3, 21.7, 27.0, 34.1, 46.2, 46.8, 51.1, 64.2, 64.8, 117.8, 123.7, 123.8, 123.9, 124.6, 127.9, 128.0, 128.6, 128.7, 156.8; IV (cm⁻¹): 3437, 2962, 2924, 1587, 1475, 1385, 1269, 1190, 1128, 1045, 820, 638.

5.3.5.2. Síntese de[(1*R*, 3*S*)-*N,N'*-bis[1-(3,5-dicloro-2-hidroxifenil)]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]



Obtém-se um sólido branco pérola. Rendimento: 84% A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: p.f.: decomp. 206°C. RMN ¹H (CDCl₃): 0.98 (s, 3H); 1.04 (s, 3H); 1.18 (s, 3H); 1.40-1.54 (m, 2H); 1.71-1.81 (m, 1H); 1.81-1.85 (m, 1H);

2.96 (aprox. t, 1H, J8.0); 3.85-4.09 (m, 4H); 6.89-6.90 (m, 2H); 7.24-7.26 (m, 2H). IV (cm⁻¹): 2873, 2570, 1604, 1278, 1234, 1105, 1004, 966, 802, 649, 561, 507

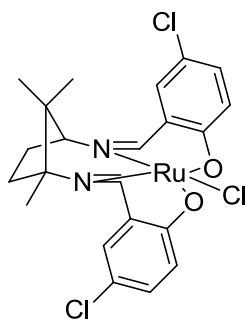
5.3.6 Síntese dos complexos de rutênio

Procedimento geral para a síntese de complexos de Ru(III):

A 0.4 mmol do ligando salen ou salan e 0.4 mmol de RuCl₃·H₂O (0.104 g) foram adicionados a 40 mL de metanol. A reação ocorreu em refluxo durante 6h com agitação magnética. Findo o tempo da reação, deixou-se arrefecer lentamente e filtrou-se o sólido obtido. Produto adicional foi obtido, evaporando o solvente e recristalizando o resíduo em éter. O produto obtido secou-se numa bomba de vácuo.

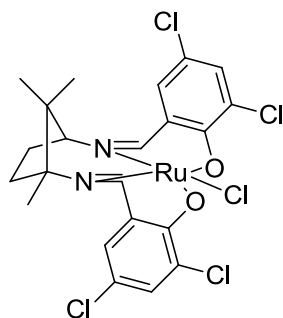
No caso da síntese dos complexos de Ru(II), é utilizado [RuCl(*p*-cimeno)]₂ e a reação ocorre sob atmosfera inerte, com uso de uma torre de secagem.

5.3.6.1 Síntese de [(1*R*,3*S*)-*N,N'*-bis[5-cloro-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Ru(III)



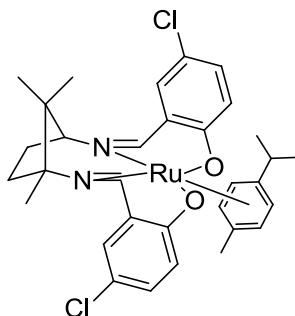
Obtém-se um sólido preto. Rendimento: 87%. p.f.: decomp 80°C. IV (cm⁻¹): 3359, 1648, 1280, 1105, 1035, 829, 740, 730, 667, 647, 543, 453.

5.3.6.2 Síntese de [(1R, 3S)-N,N' –bis[3,5-dicloro-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Ru(III)



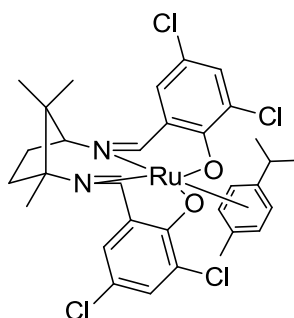
Obtém-se um sólido preto. Rendimento: 83%. P.f.: decomp. 230°C. IV (cm⁻¹): 3203, 3104, 3054, 2973, 1660, 1297, 1203, 863, 611, 561, 516, 453.

5.3.6.3 Síntese de [(1R,3S)-N,N'-bis[5-cloro-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Ru(II)



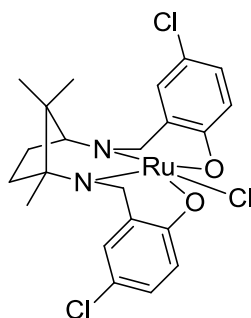
Obtém-se um sólido verde tropa. Rendimento: 63%. p.f.: decomp. 120°C. IV (cm⁻¹): 2875, 1612, 1471, 1278, 904, 543, 453.

5.3.6.4 Síntese de [(1R, 3S)-N,N' -bis[3,5-dicloro-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Ru(II)



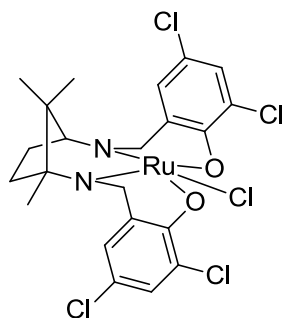
Obtém-se um sólido castanho. Rendimento: 58%. P.f.: decomp. 110°C. IV (cm⁻¹): 3424, 1627, 1521, 1400, 1385, 1319, 1290, 1213, 1174, 1112, 865, 744, 563, 476, 447

5.3.6.5 Síntese de [(1R, 3S)-N,N' -bis[1-(5-cloro-2-hidroxifenil)metil]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Ru(III)



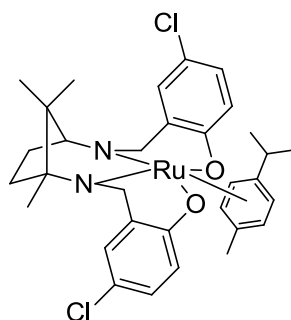
Obtém-se um sólido preto. Rendimento: 95%. P.f.: decomp. 173°C. IV (cm⁻¹): 3185, 2981, 1656, 1604, 1496, 1421, 1274, 1174, 1118, 821, 651, 553, 404

5.3.6.6 Síntese de [(1R, 3S)-N,N' –bis[1-(3,5-dicloro-hidroxifenil)]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Ru(III)



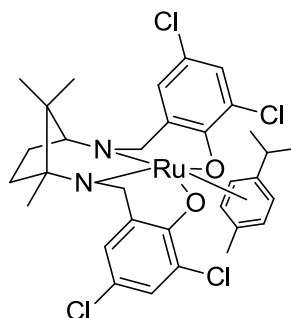
Obtém-se um sólido preto. Rendimento: 90%. P.f.: >300°C IV (cm⁻¹): 2782, 1932, 1581, 1299, 1238, 1216, 1168, 865, 727, 566

5.3.6.7 Síntese de [(1R, 3S)-N,N' –bis[1-(5-cloro-2-hidroxifenil)metil]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Ru(II)



Obtém-se um sólido castanho. Rendimento: 97%. P.f.: decomp. 129°C. IV (cm⁻¹): 3417, 1604, 1589, 1176, 1116, 873, 821, 669, 651, 553, 455

5.3.6.8 Síntese de [(1R, 3S)-N,N' -bis[1-(3,5-dicloro-hidroxifenil)]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Ru(II)

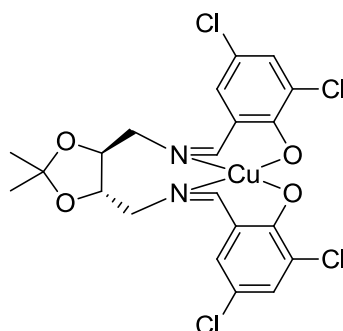


Obtém-se um sólido castanho. Rendimento: 86%. p.f.: >300°C. IV (cm⁻¹): 2402, 1579, 1471, 1238, 865, 856, 727, 566.

5.3.7 Síntese do complexo de Cu(II)

A síntese do complexo de Cu(II) ocorreu nas mesmas condições que a síntese dos complexos de Ru(III), no entanto o ligando usado foi o salen tetracolorado derivado do ácido tartárico e o metal foi (CH₃CHOO)₂Cu·H₂O.

5.3.7.1 Síntese do complexo [(1R, 3S)-N,N' -bis[3,5-dicloro-salicilideno]-1,3-diamino-1,2,2-trimetilciclopentano]Cu(II)



Obtém-se um sólido verde água. Rendimento: 89%. A caracterização está de acordo com o previamente descrito[110]: p.f.: > 300°C IV (cm⁻¹): 1666, 1427, 1385, 1279, 1209, 1173, 742, 735, 703.

5.4 Estudos *in vitro*

Neste trabalho, os estudos *in vitro* tiveram como finalidade a avaliação do efeito antitumoral causado pelos oito complexos de rutênio de salens e de salans derivados do ácido canfórico, cuja síntese foi descrita no capítulo 2.

Inicialmente realizaram-se estudos de proliferação celular pelo ensaio MTT, para verificar se os compostos apresentavam atividade antiproliferativa em quatro linhas celulares tumorais. Depois, o composto que apresentou a maior atividade antiproliferativa foi utilizado em estudos de viabilidade, de morte e de ciclo celular, realizados pela técnica de citometria de fluxo em todas as linhas celulares. Paralelamente, foram realizados estudos de microscopia ótica, que permitiram analisar a morfologia das células e, complementar a análise da morte celular induzida. Por fluorimetria, foi avaliada a produção de ROS e de uma defesa antioxidante, nas duas linhas celulares que apresentaram melhores resultados relativos à atividade anti-proliferativa. A seletividade foi também avaliada, através da avaliação da viabilidade celular do complexo

com maior efeito citotóxico em duas linhas celulares normais. Por fim, avaliou-se a atividade hemolítica do composto mais promissor, em sangue humano, para verificar a possibilidade do mesmo poder ser administrado por via intravenosa.

5.4.1 Culturas celulares

Os estudos *in vitro* foram realizados em células propagadas em monocamada aderente. Com o objetivo de avaliar o efeito antitumoral dos complexos sintetizados, recorreu-se a duas linhas celulares humanas de cancro colorretal, uma proveniente do cólon esquerdo, a WiDr (ATCC® CCL218™) e uma proveniente do cego, denominada LS1034 (ATCC® CRL2158™) e duas linhas celulares de cancro da mama, a MCF-7 (ATCC® HTB-22™) e a HCC1806 (ATCC® CRL 2335™). Para avaliar a seletividade dos compostos estudados recorreu-se a uma linha celular humana normal do cólon, denominada CCD841 CoN (ATCC® CRL-1790™) e uma linha celular humana normal do prepúcio, denominada HFF1 (ATCC® CRL-1041™). Todas as linhas celulares usadas estão certificadas pela *American Type Culture Collection* (ATCC).

A respeito das linhas celulares de cancro colorretal, usou-se a linha celular LS1034, isolada de uma biópsia do tumor primário de um doente caucasiano de 54 anos em 1989, diagnosticado com um carcinoma do cego. Estas células possuem mutações nos genes supressores tumorais *TP53* (com troca de glicina por serina na posição 245) e *APC* (com deleção no codão 1309). Uma característica importante destas células é a sobre-expressão da proteína de efluxo glicoproteína-P, responsável pela resistência a múltiplos fármacos de quimioterapia.[123] Para além da anterior, usou-se também a linha celular WiDr, proveniente de um adenocarcinoma colorretal, de localização reto-sigmoide[147], diagnosticado a uma doente de 78 anos. Também estas células epiteliais humanas possuem os genes *TP53* (com consequente troca de arginina por histidina na posição 273) e *APC* mutados.[148]

A linha celular MCF-7 de cancro da mama foi isolada pela primeira vez em 1970 a partir de uma metástase da glândula mamária de uma mulher caucasiana de 69 anos. A principal característica desta linha celular é que possui recetores de estrogénio (ER⁺) e recetores de progesterona (PR⁺).[149] Foi usada também a linha celular HCC1806, isolada da glândula mamária de uma mulher de 60 anos com cancro da mama no estágio II (TNM). Esta linha celular é característica de um tipo de cancro da mama triplo negativo, um subtipo molecular que reflete a ausência de expressão de recetores de estrogénio (RE⁻) e de progesterona (RP⁻), assim como ausência de HER-2 (HER-2⁻).[150] Para além disso esta linha celular não expressa a proteína P53. Estes tumores são geralmente biologicamente mais agressivos.[151]

Para averiguar a possível seletividade dos compostos para as células tumorais, usaram-se como controlos, duas linhas celulares não-tumorais, a linha celular CCD841 (ATCC[®] CRL-1790[™]), isolada a partir do cólon de um feto saudável com 21 semanas de gestação e a linha celular HFF1 (ACTT[®] SCRC-1041[™]), isoladas da pele do prepúcio de um recém-nascido.[152]

A propagação e o manuseamento das linhas celulares decorreram sob condições rigorosas, em ambiente estéril. Todas estas linhas celulares foram propagadas de acordo com as instruções do seu fornecedor, mantidas a 37°C em atmosfera humidificada com 95% de ar e 5% de CO₂ numa incubadora *Binder*.

As linhas celulares LS1034 e HCC1806 foram propagadas em meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute Medium*, RPMI-1640 (Sigma, R4130), e as linhas celulares MCF-7, WiDr e CCD841 CoN e HFF1 foram propagadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, DMEM (Sigma, D5648). Os meios foram suplementados com 1% de antibiótico (Sigma, A5955), 1 mM de piruvato de sódio (Gibco, 11360) para o RPMI e 0,25 mM para o DMEM e 5% de soro bovino fetal (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*, Sigma, F7524), com exceção do meio correspondente às linhas celulares normais que foram suplementados com 10% de FBS.

Como consequência de todas as linhas celulares crescerem em cultura aderente ao suporte sólido, para a realização de estudos *in vitro* foi necessário destacar as células e preparar suspensões celulares. Para isso, inicialmente procedeu-se à lavagem dos frascos com uma solução salina de tampão fosfato {PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*, constituído por 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 M de KCl (Sigma, P9333), 10 mM de NaH₂PO₄ (Sigma, S5011) e 1,8 mM de KH₂PO₄ (Sigma, P0662) [pH 7,4]}, e incubaram-se a 37°C com 2 mL de uma solução TrypLE Express™ (Gibco, 12605-028) durante o tempo necessário para a dissociação da monocamada celular. De seguida, adicionaram-se 5 mL de meio de cultura a fim de inativar a solução enzimática, homogeneizou-se a suspensão celular e procedeu-se à determinação da concentração de células. Para tal, recorreu-se ao método de exclusão do azul tripano, técnica fácil e não dispendiosa que permite fazer contagem de células numa suspensão celular.[153] Para isso, diluiu-se um volume conhecido de suspensão celular em igual volume de azul tripano e, utilizando uma câmara de *neubauer*, fez-se a contagem num microscópio invertido (Motic, AE31) com ampliação de 100 vezes. Por último, adicionou-se meio de cultura à suspensão celular de forma a obter a concentração celular pretendida, de acordo com o estudo a realizar.

5.4.2 Tratamento com os complexos em estudo

Inicialmente foram preparadas soluções de 200 µM de cada um dos oito complexos em estudo (complexos salen e salan, di- e tetraclorados de Ru(III) e Ru(II)), dissolvidos em dimetilsufóxido (DMSO, Sigma, D4540). Previamente à sua administração, foram preparadas soluções de cada um deles por diluição da solução original, de forma que o volume a adicionar às culturas fosse, no máximo, 1% do volume do meio de cultura presente em cada poço ou frasco. Este procedimento foi aplicado em todos os métodos descritos.

Como primeira análise, determinou-se a proliferação celular por MTT, na tentativa de entender qual o composto com efeito mais evidente na inibição da proliferação celular nas linhas celulares tumorais. Para além da análise da proliferação dos comple-

xos sintetizados, também se efetuou a mesma análise após tratamento das células com o ligando livre, correspondente ao complexo que apresentou a maior atividade anti-proliferativa. Desta forma, pretendeu-se averiguar até que ponto o ligando, só por si, teria atividade anti-proliferativa. Para o ensaio de MTT, as culturas celulares foram tratadas com os complexos de ruténio numa gama de concentrações que variou entre 0,5 e 200 μM , dependendo do complexo, e foram tratadas com o ligando em concentrações entre 0,5 e 5 μM . Foram utilizados dois controlos, um em que não houve administração de qualquer composto e outro em que foi administrado o solvente dos complexos metálicos, no volume correspondente a 1% do volume do meio de cultura do compartimento celular. O DMSO, utilizado como solvente, foi previamente filtrado, utilizando filtros de PTFE-S de 0,2 μm (Whatman, 10463500).

Apenas o complexo metálico **2.18**, que induziu maior inibição da proliferação celular, foi sujeito a estudos subsequentes para avaliar se o seu efeito citostático se traduzia também num efeito citotóxico. Para tal, realizaram-se estudos de citometria de fluxo, microscopia ótica e fluorimetria. Também se avaliou a viabilidade celular após exposição ao complexo **2.18** das linhas celulares normais CCD841 CoN e HFF1, para averiguar se a citotoxicidade do mesmo é seletiva para as células tumorais. As células foram tratadas durante 48 horas para os estudos de microscopia ótica e citometria de fluxo, e durante 2 e 24 horas para estudos de fluorimetria, sujeitas a três condições: controlo, no qual não foi adicionado qualquer composto; IC_{50} , no qual as células foram tratadas com a concentração correspondente à IC_{50} (calculada anteriormente para cada linha celular, Tabela 5.1); e 20 μM (concentração máxima testada para o composto mais promissor).

Tabela 5.1 Valores de IC_{50} do complexo **2.18**, para cada linha celular.

Linha celular	IC_{50} (μM)
MCF-7	3,7
HCC1806	2,1
LS1034	2,7
WiDr	3,1

Por fim, avaliou-se a atividade hemolítica do complexo com maior atividade anti-proliferativa. Esta atividade foi testada com 1, com 5, com 20 e com 100 μM do complexo. Usaram-se ainda dois controlos: um controlo positivo, triton X-100, que promove a lise das células, e um controlo negativo, DMSO, corresponde ao solvente.

5.4.3 Determinação da proliferação celular

A atividade citotóxica dos oito complexos salen e salan (tetraclorado de Ru(III), tetraclorado de Ru(II), diclorado de Ru(III) e diclorado de Ru(II)) foi primeiramente analisada através do ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio). O tempo de incubação das células com os compostos em estudo foi de 48 horas para cada uma das concentrações, após o qual foi avaliada a atividade metabólica, por colorimetria, de forma a construir uma curva dose-resposta.

O MTT é um sal de tetrazólio de cor amarela solúvel em água. Células metabolicamente ativas possuem enzimas desidrogenases capazes de protonar e clivar o anel tetrazólico do MTT, convertendo dessa maneira o MTT a cristais de formazano de cor azul-escura e insolúveis em água (figura 5.1). Estes cristais podem ser solubilizados e quantificados por espectroscopia. Posto isto, a redução do MTT a formazano, será diretamente proporcional à atividade metabólica e, assim, uma medida da proliferação celular. Este teste é considerado sensível, rápido e económico.[154–156]

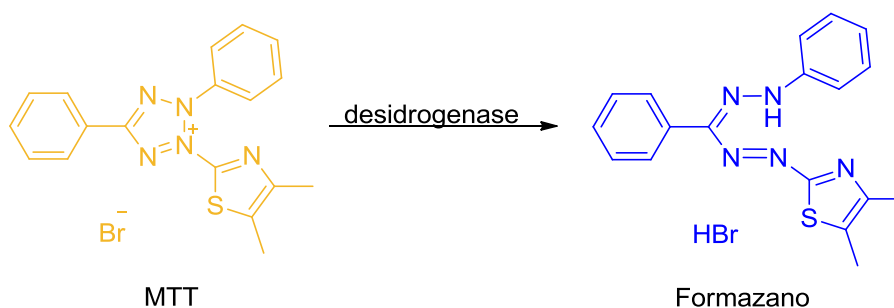


Figura 5.1 Transformação do MTT em formazano por ação de enzimas desidrogenases existente em células metabolicamente ativas.

Nestes estudos usou-se uma suspensão celular com 50×10^3 células/mL em meio de cultura para as linhas celulares WiDr e MCF-7, 60×10^3 células/mL para a linha celular HCC1806 e, uma suspensão com 70×10^3 células/mL para a linha celular LS1034. Estas suspensões foram distribuídas por placas de 48 poços, de forma a obter um volume final de 500 μ L por poço. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações de complexo metálico (0,5 a 200 μ M) ou do ligando (0,5 a 5 μ M).

Passadas as 48 horas de incubação das células com o composto, descartou-se o meio de cultura e procedeu-se a uma lavagem com PBS. Adicionaram-se 150 μ L por poço de uma solução de MTT (0,5 mg/mL; Sigma, M2128) em PBS, pH 7,4. Depois incubou-se no escuro durante aproximadamente 3 h, a 37°C até à formação dos cristais de formazano. Findo o tempo de incubação, procedeu-se à adição de 150 μ L por poço de uma solução 0,04 M de ácido clorídrico em isopropanol para a dissolução dos cristais de formazano, sob agitação durante aproximadamente 2 horas. Depois da solubilização dos cristais, o conteúdo de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços, a qual foi usada para a medição da absorvância num espectrofotómetro, usando o comprimento de onda de 570 nm e um comprimento de onda de referência de 620 nm.[157] Os resultados foram expressos em percentagem de proliferação das células tratadas com o complexo metálico em relação às células tratadas com solvente, normalizadas para 100%, utilizando a equação 5.1.

$$\% \text{ atividade metabólica} = \frac{(\text{células tratadas com solução})_{(Abs\ 570 - Abs\ 620)}}{(\text{células tratadas com DMSO})_{(Abs\ 570 - Abs\ 620)}} \times 100$$

Equação 5.1 Determinação da atividade metabólica das células tumorais.

Para processar os dados obtidos foi usado o programa Origin Pro 8.5, tendo sido possível o estabelecimento de curvas de dose-resposta e a determinação dos respetivos valores da concentração inibitória média, IC₅₀.

5.4.4 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas num líquido em fluxo. O citómetro de fluxo é o instrumento utilizado nesta técnica, que permite a análise de características químicas e físicas de uma simples célula. É um sistema constituído por 5 elementos: fonte de luz (lâmpada de mercúrio ou laser), câmara de fluxo, monocromadores para a seleção de uma faixa de comprimentos de onda específicos, fotodíodos ou fotomultiplicadores usados para converter sinais óticos em sinais eletrónicos e um computador para analisar e processar os dados recolhidos.[158]

Para a realização desta técnica adicionam-se sondas fluorescentes a uma suspensão celular, que é irradiada por um feixe de luz (normalmente *laser*). Cada uma das partículas do fluxo celular dispersa a luz que pode ser absorvida ou desviada. Aquela que é absorvida, quando apresenta o comprimento de onda apropriado, é emitida como fluorescência. Esta dispersão de luz e/ou os sinais fluorescentes desviados são detetados por uma série de fotodetetores, sendo posteriormente amplificados. Os fotodetetores são apontados ao feixe de luz no qual o fluxo atravessa, um na linha do feixe de luz (FSC, do inglês *Forward Scatter*), responsável por avaliar o volume celular, e vários perpendiculares a este (SSC, do inglês *Side Scatter*), que analisam a complexidade interna da célula (por exemplo, a forma do núcleo, a quantidade e o tipo dos grânulos citoplasmáticos e a rugosidade da membrana) além de um ou mais detetores fluorescentes.[159] Os dados obtidos podem fornecer informações valiosas sobre os aspetos físicos e químicos das partículas, porque a dispersão de luz está diretamente relacionada com as propriedades estruturais e morfológicas da célula, enquanto a emissão de fluorescência devida à sonda de fluorescência é proporcional à quantidade de sonda fluorescente ligada ao componente celular.[158]

5.4.4.1 Avaliação da viabilidade celular

A citometria de fluxo foi a técnica utilizada para avaliar a viabilidade celular e os tipos de morte celular induzidos pelo complexo **2.18**, com recurso à dupla marcação com anexina V, (AnV) acoplada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês *fluorescein isothiocyanate*) e iodeto de propídeo (IP). Esta técnica foi testada tanto nas quatro linhas celulares tumorais (MCF-7, HCC1806, LS1034, WiDr) como nas linhas celulares normais (CCD841 com e HFF1).

A AnV é uma proteína anticoagulante que se liga com elevada afinidade a fosfolípidos aniônicos, tais como a fosfatidilserina. O IP é um corante com a capacidade de se intercalar no ADN e ARN celulares.[159] A aplicação dos dois permite distinguir as células viáveis, as células mortas por apoptose inicial e as células mortas por apoptose tardia e/ou necrose. A necrose e a apoptose podem também distinguir-se com base em diferenças morfológicas existentes na membrana plasmática que ocorrem nas células durante cada processo.[160] A membrana plasmática é composta por várias espécies de fosfolípidos, incluindo a fosfatidilserina que, em células viáveis, se encontra no folheto interno da bicamada lipídica. No entanto, durante o processo apoptótico, a fosfatidilserina sofre translocação do folheto interno para o folheto externo da membrana celular, sem afetar a integridade da membrana, podendo a apoptose ser identificada através da elevada afinidade da AnV para esse fosfolípido (Figura 5.2).[161,162] Nesta situação, o IP não consegue alcançar o meio intracelular devido à existência de integridade da membrana. Por outro lado, quando a integridade da membrana se encontra comprometida já existe a possibilidade do IP entrar para o meio intracelular e intercalar o ADN e o ARN emitindo fluorescência, o que se verifica quando as células se encontram em apoptose tardia e/ou necrose.[163]

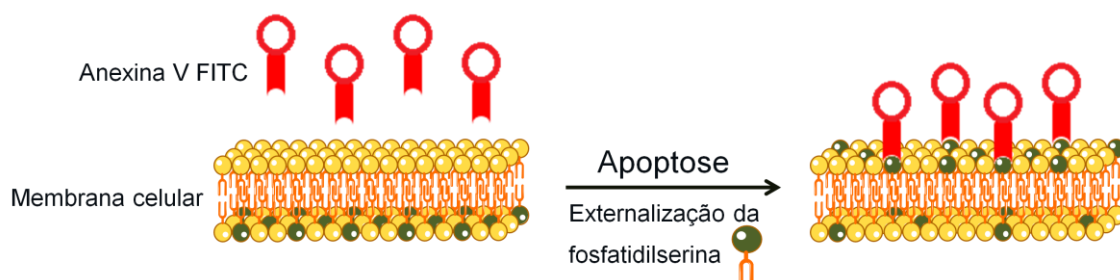


Figura 5.2 Representação esquemática do ensaio da Anexina V. Durante o processo apoptótico, a fosfatidilserina sofre translocação do folheto interno para o folheto externo da membrana celular, sem afetar a integridade da membrana, podendo a apoptose ser identificada através da elevada afinidade da AnV para esse fosfolípido. Elaborado com recurso a Servier.com (*This work is licensed under the Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>*).

Assim, através deste modelo de dupla marcação é possível agrupar e classificar a população celular em quatro grupos distintos: grupo I, células viáveis (negativa para ambas as marcações); grupo II, composto por células em apoptose inicial (apresentam marcação positiva para AnV-FITC, mas negativa para a marcação com IP); grupo III, do qual fazem parte as células em apoptose tardia/necrose (apresentam-se positivas para ambas as marcações); e, por último, o grupo IV, que engloba as células em necrose (apresentam marcação negativa para AnV-FITC e positiva para IP) (tabela 5.2).

Para a execução da avaliação de viabilidade celular, foram destacadas dos frascos um milhão de células por ensaio. As suspensões celulares foram seguidamente centrifugadas (1300 G, durante 5 minutos) e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi ressuspenso em PBS e lavado por centrifugação nas condições já referidas. Depois, o sedimento foi ressuspenso em 100 µL de tampão de ligação frio (constituído por 0,01 M de HEPES [Sigma, H7523], 0,14 M de NaCl [Sigma, S7653] e 0,25 mM de CaCl₂ [Sigma, C4901]), 2,5 µL de AnV-FITC (Immunostep, ANXVF) e 1 µL de IP (kit Immunostep) e incubado durante 15 minutos no escuro e à temperatura ambiente. Por fim, adicionaram-se 400 µL de tampão de ligação frio. A deteção foi feita num citómetro FACSCalibur, usando os comprimentos de onda de excitação de 530 nm para a AnV-FITC e 488 nm para o IP. Os resultados foram apresentados em percentagem de células identificadas em cada uma das subpopulações e baseiam-se no resultado da marcação para AnV-FITC/IP, isto é, se foi positiva ou negativa.

Tabela 5.2 Populações celulares possíveis de identificar com recurso à dupla marcação com AnV e IP: viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia/necrose e necrose.

Populações celulares	Anexina V	IP
Viáveis	-	-
Apoptose inicial	+	-
Apoptose tardia/necrose	+	+
Necrose	+	-

5.4.4.2 Avaliação do Ciclo Celular

A avaliação do ciclo celular foi também executada pela técnica de citometria de fluxo. Para este estudo recorreu-se a uma solução de IP e RNase. Como supracitado, o IP tem capacidade de intercalar o ADN e ARN. A função da enzima consiste em catalisar a degradação do ARN, para se obter a especificidade do IP para o ADN. A quantificação do ADN permite agrupar as células em quatro subpopulações de acordo com o conteúdo genético de cada uma, uma vez que as células nas fases G_2 e M possuem o dobro do conteúdo de ADN do que as células nas fases G_0 e G_1 , enquanto as células na fase S possuem um conteúdo de ADN intermédio. Para além disso, é possível detetar um pico pré- G_0/G_1 (pico apoptótico) com menor quantidade de ADN.[164,165]

Quanto ao procedimento para análise do ciclo celular, as células foram centrifugadas (1300G, durante 5 minutos) e, depois, descartou-se o sobrenadante. Para fixar as células, adicionaram-se 200 μ L de etanol a 70% aos diferentes tubos em agitação no *vórtex* e incubaram-se durante 30 min no escuro, a 4°C. Lavaram-se as células com 2 mL de PBS, tendo sido, de seguida, centrifugadas (1300 G, durante 5 minutos) e decantado o sobrenadante. Posteriormente adicionaram-se 200 μ L de solução IP/RNase (Immunostep, PI/Rnase) e incubaram-se durante 15 minutos no escuro, à temperatura ambiente. A deteção foi feita utilizando o comprimento de onda de excitação de 488 nm, com emissão a 640 nm. As análises do ciclo celular por citometria de fluxo são representadas em histogramas de intensidade de fluorescência e os dados

obtidos foram expressos em percentagem de células em cada uma das subpopulações, pré-G₀/G₁, G₀/G₁, S e G₂/M.

5.4.5 Análise da morfologia

Para completar os estudos de viabilidade celular e o tipo de morte celular induzido pelo complexo **2.18**, caracterizou-se a morfologia das células das linhas HCC1806 e LS1034, correspondentes às linhas celulares onde houve maior diminuição da viabilidade celular, devido à ação do complexo de ruténio **2.18**. Esta caracterização foi feita com recurso à coloração *May-Grünwald-Giemsa* e posterior observação ao microscópio ótico de campo claro.

O método *May Grünwald–Giemsa* permite a coloração de elementos celulares para estudos citológicos. Esta técnica baseia-se numa solução de *May-Grünwald*, que contém o corante aniónico de eosina e o corante catiónico de azul de metileno, ambos dissolvidos em metanol e, uma solução de *Giemsa* que, para além desses corantes, também contém produtos de oxidação do azul de metileno tais como azur A, azur B, violeta de metilo e azul de metilo. Todos estes corantes estão neutros enquanto são mantidos em solução de álcool metílico mas, quando a água é adicionada, ionizam e ligam-se seletivamente aos constituintes celulares, precipitando-se como sais insolúveis. Os componentes celulares de natureza aniónica (acídica) como o ADN, mitocôndrias, ribossomas e citoplasma de células ricas em ARN, ligam-se seletivamente aos corantes catiónicos pelo que coram em vários tons de azul. Os componentes celulares de natureza catiónica (básica) como por exemplo a hemoglobina e as proteínas, são seletivamente ligados ao corante ácido eosina, corando em vários tons de laranja a vermelho. Os componentes celulares que têm afinidade por ambos os tipos de corantes, coram em vários tons de violeta. Espera-se assim que os núcleos das células apareçam em cores que vão do azul ao roxo e que o citoplasma das células apareça violeta pálido ou castanho muito pálido.[166]

Para determinar os tipos de morte celular, começou-se por preparar uma suspensão celular com 100×10^3 células/mL que foi distribuída por placas de 12 poços, ficando cada poço com um volume final de 1 mL. Após 24 horas, administrou-se o complexo **2.18**. As células foram sujeitas a três condições: o controlo, a IC_{50} (Tabela 5.1) e à concentração máxima de composto testado, seguido de incubação durante 48 horas. Passado o tempo de incubação, as células foram destacadas dos frascos e as suspensões celulares foram centrifugadas a 1300 G durante 5 minutos. Após a primeira centrifugação, descartou-se o sobrenadante e centrifugou-se novamente, mas desta vez com PBS para lavar as células. O sedimento obtido foi ressuspense em 40 μ L de FBS. De seguida, 20 μ L da suspensão celular foram colocados na superfície de uma lâmina e obteve-se o esfregaço fazendo deslizar uma lamela sobre a lâmina. Os esfregaços foram fixados em metanol durante 5 min. Depois foram corados com *May-Grünwald* (Merck, 1.01424.2500) na proporção de 1:4 em metanol durante 3 minutos, seguido de *Giemsa* (Merck, 1.09204.2500) na proporção de 1:9 em água durante 8 minutos. De seguida foram lavados em água corrente durante 3 minutos, secos ao ar, diafanizados com xilol (VWR, 28973.363) e preservados com meio de montagem sintético *Entellan New* (Merck, 1.07961.0500).

As lâminas foram observadas ao microscópio ótico Olympus BX41TF e fotografadas com uma câmara Olympus SC30, na ampliação de 400x.

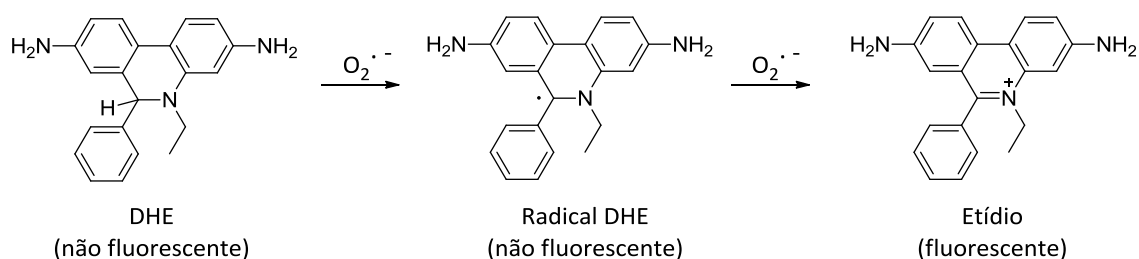
5.4.6 Avaliação do stresse oxidativo por fluorimetria

Para averiguar se o complexo de ruténio **2.18** induziu stresse oxidativo nas células, foi avaliada, a produção intracelular de ROS, em particular de radical superóxido e de peróxidos, assim como a defesa antioxidante GSH. Para executar esta técnica recorreu-se à espectroscopia de fluorescência. Este ensaio realizou-se nas linhas celulares que apresentaram uma menor viabilidade celular por ação do complexo **2.18**, a linha celular HCC1806 e a linha celular LS1034. Inicialmente foram semeadas um milhão de células por ensaio e por condição e, 24 horas depois, as células foram tratadas com o complexo (de acordo com a secção 5.4.2). Posteriormente, os níveis das espécies oxi-

dantes e antioxidantes foram avaliados 2 horas e 24 horas após o tratamento com o complexo **2.18**.

5.4.6.1 Avaliação da produção intracelular do radical superóxido

A avaliação da produção de radical superóxido foi efetuada recorrendo à técnica de espectroscopia de fluorescência com recurso à sonda DHE (do inglês *dihydroethidium*). Este composto atravessa facilmente as membranas celulares e é oxidado pelo radical superóxido a etídio (Esquema 5.1), composto fluorescente de cor vermelha que se intercala no ADN permanecendo no interior da célula. Esta reação é relativamente específica para o radical superóxido permitindo assim estimar a presença do radical superóxido a nível intracelular. [167–169]

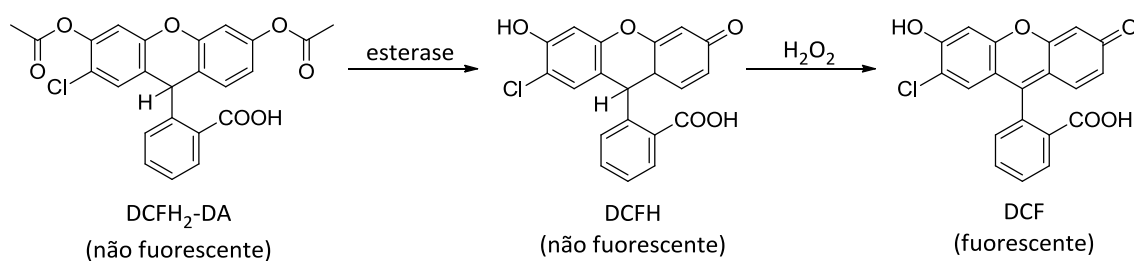


Esquema 5.1 Oxidação da sonda DHE pelo radical superóxido a radical DHE e posteriormente a etídio (composto fluorescente) para estimar a presença do radical superóxido a nível intracelular.

Relativamente ao ensaio, foram usadas um milhão de células por ensaio e por condição, inicialmente ressuspensas em 1 mL de PBS e colocadas em tubos devidamente identificados. Seguidamente, as células foram incubadas com 5 μ L de DHE na concentração de 1 mM (Sigma, D7008) durante 15 minutos, a 37°C e no escuro. Após a incubação, a suspensão celular foi lavada com PBS por centrifugação a 1300 G, durante 5 minutos e o sedimento ressuspenso em 400 μ L do mesmo. Por fim, 200 μ L de cada suspensão celular foram transferidos para uma placa de 96 poços, que foi lida num espetrofotómetro com o comprimento de onda de excitação de 620 nm.

5.4.6.2 Avaliação da produção intracelular de peróxidos

A expressão intracelular de peróxidos nas células submetidas a tratamento com o complexo de rutênio **2.18** foi determinada por fluorimetria através da oxidação intracelular da sonda não fluorescente DCFH₂-DA (do inglês *2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate*). Este composto lipofílico entra nas células e acumula-se principalmente no citoplasma, onde os seus dois grupos acetato são clivados por esterases intracelulares originando DCFH (do inglês *2',7'-dichlorodihydrofluorescein*). Este composto, não fluorescente, é rapidamente oxidado por vários agentes oxidantes, incluindo o H₂O₂, dando origem a DCF (do inglês *2',7'-dichlorofluorescein*) (Esquema 5.2), um composto que é facilmente visualizado pela emissão de fluorescência no comprimento de onda de 522 nm quando excitado a 498 nm (figura 9).[142,167] Apesar da sonda utilizada ser um bom indicador da presença de peróxidos, é necessário ter em conta que a oxidação de DCFH com formação de DCF pode ser catalisada, em menor extensão, por outras ROS, por RNS (do inglês *Reactive Nitrogen Species*) ou por peroxidases.[167,170]



Esquema 5.2 A sonda DCFH₂-DA permite estimar a presença de peróxidos no meio intracelular, visto que primeiramente é clivada intracelularmente por esterases a DCFH, composto que sofre oxidação a DCF maioritariamente por peróxido de hidrogénio.

Relativamente ao ensaio, foram usadas um milhão de células por ensaio e por condição, inicialmente ressuspensas em 1 mL de PBS e colocadas em tubos devidamente identificados. Seguidamente, as células foram incubadas com 1 µL de DCFH₂-DA na concentração de 5 µM (Sigma, D7008) durante 45 minutos, a 37°C e no escuro. Após a incubação, a suspensão celular foi lavada com PBS por centrifugação a 1300G, durante 5 minutos e o sedimento ressuspenso em 400 µL do mesmo. Por fim, 200 µL

de cada suspensão celular foram transferidos para uma placa de 96 poços, e a placa foi lida num espectrofotômetro com o comprimento de onda de excitação de 498 nm.

5.4.6.3 Avaliação da defesa antioxidante GSH

Os antioxidantes representam a defesa dos organismos contra as ROS. Um dos mecanismos de defesa antioxidante inclui defesas antioxidantes não-enzimáticas como a GSH. A GSH atua como neutralizador de ROS através da reação com o oxigênio singlete, o radical hidroxilo, o radical superóxido, entre outras.[143][171] A expressão intracelular de GSH foi também avaliada por fluorimetria, utilizando o alaranjado de mercúrio. Este composto liga-se estequiometricamente aos grupos sulfidrilo, com maior especificidade para a GSH do que para os grupos sulfidrilo das proteínas, emitindo fluorescência.

O procedimento utilizado para a determinação da presença da GSH foi semelhante ao supracitado para os peróxidos e para o radical superóxido. Neste caso, as células foram incubadas com 1 µL de alaranjado de mercúrio na concentração de 10 mM (Sigma, M7750) durante 15 minutos, a 37°C e protegido da luz, e a detecção feita com o comprimento de onda de excitação de 488 nm.

5.4.7 Avaliação da hemocompatibilidade

Os eritrócitos existem em grande número no sangue e as suas membranas podem sofrer alterações significativas nas suas propriedades estruturais, dependendo do tratamento medicamentoso.[172] Portanto, o exame *in vitro* da hemólise é uma parte fundamental dos estudos pré-clínicos de um composto para perceber se o mesmo provoca alguma lesão na membrana dos eritrócitos, ou até mesmo para avaliar a possibilidade da sua administração intravenosa.[121] A técnica usada teve por base a medição da libertação de hemoglobina. Quanto maior a hemoglobina libertada, maior

será a lesão das membranas dos eritrócitos causada pelo complexo e, conseqüentemente, menor será a possibilidade de sua administração por via intravenosa.

O procedimento para avaliar a hemocompatibilidade do complexo de rutênio **2.18** iniciou com a colheita de sangue humano (1 mL) e a sua diluição em 30 volumes de NaCl 0,85% contendo CaCl₂ 10 mM. Após 3 centrifugações (1300 G/3 min) e lavagens, obteve-se um sedimento de eritrócitos que foram suspensos em 2% em NaCl 0,85% contendo CaCl₂ 10 mM. Essa suspensão celular foi distribuída em placas de 96 poços e o complexo de rutênio **2.18** previamente dissolvido em DMSO, foi adicionado a cada um dos poços para obter concentrações finais de 1 µM, de 5 µM, de 20 µM e de 100 µM. Igual volume de triton X-100 (1%), detergente que promove a lise das células, foi usado como controlo positivo e igual volume de DMSO como controlo negativo. A placa foi incubada durante 1 hora sob agitação constante e à temperatura ambiente. As amostras foram, então, centrifugadas (5200 G/5 min) e o sobrenadante transferido para uma placa de 96 poços. A medição da absorvância foi feita num espectrofotómetro, usando o comprimento de onda de 540 nm. A hemólise foi estimada pela quantificação da hemoglobina libertada, segundo a equação descrita abaixo.

$$\% \text{ hemólise} = \frac{Abs(\text{complexo})}{Abs(\text{controlo positivo}) - Abs(\text{controlo negativo})} \times 100$$

Equação 5.2 Determinação em percentagem da hemólise de sangue humano após incubação com o complexo **2.18**.

5.4.8 Análise estatística

O *software* IBM® SPSS® Statistics, versão 24.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA) foi usado para a realização da análise estatística dos valores experimentais resultantes da avaliação da viabilidade, do ciclo celular, da produção de ROS, da defesa antioxidante e da hemocompatibilidade.

Para comparações de dois grupos, o teste *Mann-Whitney* foi usado. Para comparações de mais do que dois grupos, o teste *Analysis of Variance* (ANOVA) de um fator foi usado para distribuições normais ou caso contrário o teste Kruskal-Wallis. As comparações múltiplas foram feitas usando o teste *Tukey*, em caso de homogeneidade de variâncias ou, caso contrário, usando o teste *Games-Howel*. Para os casos em que a amostra foi constituída por menos de 10 valores, usou-se a análise não paramétrica. Considerou-se o nível de significância de 0,05.

CAPÍTULO VI

Referências

Referências

- [1] H. Doucas, D.P. Berry, Basic principles of the molecular biology of cancer I, *Surgery*. 24 (2006) 43–47. doi:10.1383/surg.2006.24.2.43.
- [2] J. Luo, N.L. Solimini, S.J. Elledge, Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction, *Cell*. 27 (2009) 339–351. doi:10.1016/j.neuron.2009.10.017.A.
- [3] A.T. Chan, S. Ogino, C.S. Fuchs, Pathogenesis of Colorectal Cancer, in: *Jama*, 2009: pp. 807–821. doi:10.1001/jama.2009.1112.
- [4] V.L. De Almeida, A. Leitão, L.D.C. Barrett Reina, C.A. Montanari, C.L. Donnici, M.T.P. Lopes, Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução, *Quim. Nova*. 28 (2005) 118–129. doi:10.1590/S0100-40422005000100021.
- [5] P. Anand, A.B. Kunnumakara, C. Sundaram, K.B. Harikumar, S.T. Tharakan, O.S. Lai, B. Sung, B.B. Aggarwal, Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes, *Pharm. Res*. 25 (2008) 2097–2116. doi:10.1007/s11095-008-9661-9.
- [6] Factores de Risco: Liga Portuguesa Contra o Cancro, (n.d.). <https://www.ligacontracancro.pt/factores-de-risco/> (accessed February 7, 2018).
- [7] H. Barros, N. Lunet, Cancro: Uma perspectiva de saúde pública, *Arq. Med*. 20 (2006) 31–36.
- [8] H.G. Moore, N.N. Baxter, J.G. Guillem, Colorectal cancer: epidemiology, etiology, and molecular basis, in: *Colon Rectal Surg.*, 2016: pp. 669–690. doi:10.1007/978-3-319-25970-3.
- [9] D. Groneberg, B. Voussen, A. Friebe, Vanadium, Ruthenium and Copper Compounds: a new class of non-platinum metallodrugs with anticancer activity, *Curr. Med. Chem*. 23 (2016) 2715–2735. doi:10.2174/09298673236661608.
- [10] WHO | Cancer, WHO. (2018).
- [11] M.J. Thun, J.O. DeLancey, M.M. Center, A. Jemal, E.M. Ward, The global burden of cancer: Priorities for prevention, *Carcinogenesis*. 31 (2009) 100–110. doi:10.1093/carcin/bgp263.
- [12] H. Wang, M. Naghavi, C. Allen, R.M. Barber, A. Carter, D.C. Casey, F.J. Charlson, A.Z. Chen, M.M. Coates, M. Coggeshall, L. Dandona, D.J. Dicker, H.E. Erskine, J.A. Haagsma, C. Fitzmaurice, K. Foreman, M.H. Forouzanfar, M.S. Fraser, N. Fullman, E.M. Goldberg, N. Graetz, J.A. Haagsma, S.I. Hay, C. Huynh, C.O. Johnson, N.J. Kassebaum, X.R. Kulikoff, M. Kutz, H.H. Kyu, H.J. Larson, J. Leung, S.S. Lim, M. Lind, R. Lozano, N. Marquez, J. Mikesell, A.H. Mokdad, M.D. Mooney, G. Nguyen, E. Nsoesie, D.M. Pigott, C. Pinho, G.A. Roth, L. Sandar, N. Silpakit, A. Sligar, R.J.D. Sorensen, J. Stanaway, C. Steiner, S. Teeples, B.A. Thomas, C. Troeger, A. VanderZanden, S.E. Vollset, V. Wang, H.A. Whiteford, T. Wolock, L. Zoeckler, T. Achoki, A. Afshin, L.T. Alexander, G.M. Anderson, B. Bell, S.

Biryukov, J.D. Blore, A. Brown, J. Brown, K. Cercy, A. Chew, A.J. Cohen, F. Daoud, E. Dossou, K. Estep, A. Flaxman, J. Friedman, J. Frostad, W.W. Godwin, J. Hancock, L. Kemmer, I.A. Khalil, P.Y. Liu, F. Masiye, A. Millear, M. Mirarefin, A. Misganaw, M. Moradi-Lakeh, K. Morgan, M. Ng, A. Pain, J. Quame-Amaglo, P. Rao, M.B. Reitsma, K.A. Shackelford, P. Sur, J.A. Wagner, T. Vos, A.D. Lopez, C.J.L. Murray, R.G. Ellenbogen, C.N. Mock, D.A. Quistberg, B.O. Anderson, C.D. Blosser, N.D. Futran, S.R. Heckbert, P.N. Jensen, T.J. Montine, D.L. Tirschwell, D.A. Watkins, Z.A. Bhutta, M.I. Nisar, N. Akseer, N.K.M. Alam, L.D. Knibbs, R. Laloo, H.N. Gouda, J.J. McGrath, P. Jeemon, R. Dandona, G.A. Kumar, P.W. Gething, C. Cooper, S.C. Darby, A. Deribew, R. Ali, D.A. Bennett, V. Jha, K. Rahimi, Y. Kinfu, I.D.A. Faghmous, S.M. Langan, M. McKee, G.V.S. Murthy, N. Pearce, B. Roberts, I.R. Campos-Nonato, J.C. Campuzano, H. Gomez-Dantes, I.B. Heredia-Pi, F. Mejia-Rodriguez, J.C. Montañez Hernandez, P. Montero, M.J. Rios Blancas, E.E. Servan-Mori, S. Villalpando, L. Duan, S. Liu, L. Wang, P. Ye, X. Liang, S. Yu, G.A. Mensah, J.A. Salomon, A.L. Thorne-Lyman, O.N. Ajala, T. Bärnighausen, E.L. Ding, M.S. Farvid, G.R. Wagner, P. James, M. Osman, M.G. Shrimel, J.R.A. Fitchett, A.K. Knudsen, C.L. Ellingsen, N.H. Krog, M. Savic, A.D. Hailu, O.F. Norheim, K.H. Abate, T.T. Gebrehiwot, A.T. Gebremedhin, C. Abbafati, K.M. Abbas, F. Abd-Allah, S.F. Abera, Y.A. Melaku, F.H. Tesfay, G.Y. Abyu, A.F. Aregay, B.D. Betsu, A.A. Gebru, G.B. Hailu, A.Z. Yalew, H.G. Yebyo, D.M.X. Abreu, E.B. Franca, L.J. Abu-Raddad, A.L. Adelekan, R.O. Akinyemi, F.A. Ojelabi, Z. Ademi, T. Fürst, P. Azzopardi, B.C. Cowie, K.B. Gibney, J.H. MacLachlan, A. Meretoja, K. Alam, S.M. Colquhoun, S.M. Colquhoun, G.C. Patton, R.G. Weintraub, C.E.I. Szoeki, L. Vijayakumar, M.A. Bohensky, H.R. Taylor, T. Wijeratne, A.K. Adou, J.C. Adsuar, K.A. Afanvi, E.E. Agardh, J. Rehm, A. Badawi, M.P. Lindsay, S. Popova, A. Agarwal, A. Agrawal, P.J. Hotez, A. Ahmad Kiadaliri, B. Norrving, A.S. Akanda, T.F. Akinyemiju, D.C. Schwebel, J.A. Singh, F.H. Al Lami, S. Alabed, Z. Al-Aly, T.R. Driscoll, A.H. Kemp, J. Leigh, A.H. Kemp, D. Alasfoor, S.F. Aldahri, K.A. Altirkawi, A.S. Terkawi, R.W. Aldridge, A. Banerjee, T. Tillmann, M.A. Alegretti, A. V. Aleman, F. Cavalleri, V. Colistro, Z.A. Alemu, S. Alhabib, A. Alkerwi, F. Alla, P. Allebeck, J.J. Carrero, S. Fereshtehnejad, E. Weiderpass, R. Havmoeller, R. Al-Raddadi, U. Alsharif, E. Alvarez Martin, N. Alvis-Guzman, A.T. Amare, L.G. Ciobanu, G.A. Tessema, A.K. Amegah, A.A. Kudom, E.A. Ameh, H. Amini, C.K. Karema, W. Ammar, H.L. Harb, S.M. Amrock, H.H. Andersen, C.A.T. Antonio, E.J.A. Faraon, J. Ärnlöv, A. Larsson, V.S. Arsic Arsenijevic, A. Barac, A. Artaman, H. Asayesh, R.J. Asghar, S. Atique, E.F.G.A. Avokpaho, F.G. Gankpé, A. Awasthi, U. Bacha, M.C. Bahit, K. Balakrishnan, S.L. Barker-Collo, S. Mohammed, L. Barregard, M. Petzold, L.H. Barrero, A. Basu, S. Basu, Y.T. Bayou, S. Bazargan-Hejazi, J. Beardsley, N. Bedi, E. Beghi, K. Deribe, H.A. Belay, A.Z. Giref, D. Haile, T. Jibat, W.A.A. Manamo, W.M. Tefera, B.D. Yirsaw, K.N. Sheth, M.L. Bell, B.J. Biroscak, A.K. Bello, I.S. Santos, I.M. Bensenor, P.A. Lotufo, A. Berhane, C.D.A. Wolfe, E. Bernabé, A.S. Beyene, M.D. Gishu, N. Bhalla, A. Bhalla, S. Biadgilign, B. Bikbov, A.A. Bin Abdulhak, E. Bjertness, A.S. Htet, D. Bose, R.R.A. Bourne, M. Brainin, C.E.G. Brayne, A. Brazinova, M. Majdan, J. Shen, N.J.K. Breitborde, H. Brenner, B. Schöttker, J.D. Brewer, T.S. Brugha, G.C. Buckle, R.A. Gosselin, Z.A. Butt, B. Calabria, A. Lal, R.M. Lucas, L. Degenhardt, S. Resnikoff, J.R. Carapetis, R. Cárdenas, D.O. Carpenter, C.A. Castañeda-Orjuela, J. Castillo Rivas, F. Catalá-López, J. Cerda, W. Chen, P.P. Chiang, M. Chibalabala, C.E. Chibueze, R. Mori, O. Chimed-Ochir, Y. Jiang, K. Takahashi, V.H. Chisumpa, C.C. Mapoma, J.J. Choi, R. Chowdhury, H. Christensen, D.J. Christopher, M. Cirillo, M. Colomar, L.T. Cooper, J.A. Crump, R.G. Poulton, J. Damsere-Derry, H. Danawi, A.H. Refaat, P.I. Dargan, J. das Neves, J. Massano, J.M. Pedro, G. Davey, A.C. Davis, F. Greaves, J.N. Newton, D. V. Davitoiu, E.F. de Castro, P. de Jager, D. De, R.P. Dellavalle, S.D. Dharmaratne, P.K. Dhillon, P. Ganguly, D.K. Lal, S. Zodepy, C. Diaz-Torné, K.P.B. dos Santos, M. Dubey, M.H.U. Rahman, A. Singh, B.B. Duncan, C. Kieling, M.I. Schmidt, I. Elyazar, A.Y. Endries, S.P. Ermakov, B. Eshrati, A. Esteghamati, N. Hafezi-Nejad, S. Fahimi, R. Malekzadeh, G.

Roshandel, S.G. Sepanlou, F. Farzadfar, A. Kasaeian, M. Parsaeian, P. Heydarpour, V. Rahimi-Movaghar, S. Sheikhabaei, M. Yaseri, T.A. Farid, A.R. Khan, C.S.E.S. Farinha, A. Faro, V.L. Feigin, B.J. Te Ao, J.G. Fernandes, J.C. Fernandes, F. Fischer, N. Foigt, I. Shiuie, F.G.R. Fowkes, R.C. Franklin, F.B. Piel, A. Majeed, S.L. Gall, K. Gambashidze, A. Gamkrelidze, M. Kereselidze, M. Shakh-Nazarova, V.J. Iyer, T. Gebre, J.M. Geleijnse, B.D. Gessner, A.G. Ghoshal, R.F. Gillum, A. Mehari, S. Gilmour, M. Inoue, N. Kawakami, K. Shibuya, M. Giroud, E. Glaser, Y.A. Halasa, D.S. Shepard, E.A. Undurraga, P. Gona, A. Goodridge, S. V. Gopalani, C.C. Gotay, N. Kisson, J.A. Kopec, S. Murthy, F. Pourmalek, A. Goto, H.C. Gughani, R. Gupta, R. Gupta, V. Gupta, R.A. Gutiérrez, R.R. Hamadeh, S. Hamidi, A.J. Handal, G.J. Hankey, P.E. Norman, Y. Hao, S. Harikrishnan, J.M. Haro, H.B. Hilderink, H.W. Hoek, A.K. Tura, R.S. Hogg, M. Horino, N. Horita, H.D. Hosgood, D.G. Hoy, M. Hsairi, M.M.T. Htike, G. Hu, C. Huang, H. Huang, L. Huiart, A. Hussein, I. Huybrechts, G. Huynh, K.M. Iburg, K. Innos, T.A. Jacobs, K.H. Jacobsen, N. Jahanmehr, M. Katibeh, Z. Rajavi, M.B. Jakovljevic, M. Javanbakht, S.P. Jayaraman, A.U. Jayatilleke, D. Prabhakaran, G. Jiang, A. Jimenez-Corona, J.B. Jonas, T.K. Joshi, Z. Kabir, R. Kamal, C.N. Kesavachandran, J. She, Z. Shen, H. Zhang, H. Kan, S. Kant, A. Karch, C. Karimkhani, D. Karletsos, G. Karthikeyan, N. Naik, V.K. Paul, A. Roy, R. Sagar, M. Satpathy, N. Tandon, A. Kaul, J.F. Kayibanda, P.N. Keiyoro, R.A. Lyons, C.D. Parry, A.P. Kengne, R. Matzopoulos, C.S. Wiysonge, D.J. Stein, B.M. Mayosi, A. Keren, Y.S. Khader, E.A. Khan, Y.H. Khang, S. Won, S. Khera, M. Tavakkoli, T.A.M. Khoja, D. Kim, Y.J. Kim, B.M. Kissela, Y. Kokubo, D. Kolte, S.T. McGarvey, S. Kosen, P.A. Koul, A. Koyanagi, B. Kuate Defo, B. Kucuk Bicer, E.J. Kuipers, V.S. Kulkarni, G.F. Kwan, S.R. Rao, H. Lam, J.O. Lam, J.B. Nachega, B.X. Tran, V.C. Lansingh, D.O. Laryea, A.A. Latif, A.E.B. Lawrynowicz, M. Levi, Y. Li, S.E. Lipshultz, J.D. Wilkinson, E.P. Simard, Y. Liu, M.R. Phillips, Q. Xiao, L. Lo, G. Logroscino, R. Lunevicius, S. Ma, V.M. Machado, M.T. Mackay, H. Magdy Abd El Razek, M. Magdy Abd El Razek, J. Mandisarisa, S. Mangalam, W. Marcenes, P.A. Meaney, D.J. Margolis, D.H. Silberberg, G.R. Martin, J. Martinez-Raga, M.B. Marzan, A.J. Mason-Jones, B.J. McMahon, M.M. Mehndiratta, S.M. Woldeyohannes, B.A. Tedla, B.M. Zeleke, P. Memiah, Z.A. Memish, W. Mendoza, T.J. Meretoja, T. Lallukka, F.A. Mhimbira, R. Micha, D. Mozaff, P. Shi, G.M. Singh, T.R. Miller, K.A. Mohammad, A. Mohammadi, V. Mohan, G.L.D. Mola, L. Monasta, M. Montico, L. Ronfani, L. Morawska, A. Werdecker, U.O. Mueller, R. Westerman, K.I. Musa, A.J. Paternina Caicedo, S. Seedat, G. Nagel, D. Rothenbacher, K.S. Naidoo, B. Sartorius, L. Naldi, G. Remuzzi, V. Nangia, D. Nash, C. Nejjari, S. Neupane, C.R. Newton, F.N. Ngalesoni, J.D. Ngirabega, Q.L. Nguyen, P.M. Nkamedjie Pete, M. Nomura, L. Nyakarahuka, F.A. Ogbo, T. Ohkubo, P.R. Olivares, B.O. Olusanya, J.O. Olusanya, J.N. Opio, E. Oren, A. Ortiz, E. Ota, R. Ozdemir, P.A. Mahesh, J.D. Pandian, P.R. Pant, C. Papachristou, E. Park, J. Park, S.B. Patten, M. Tonelli, L. Stokic Pejin, D.M. Pereira, M. Cortinovis, G. Giussani, N. Perico, K. Pesudovs, J.D. Pillay, D. Plass, J.A. Platts-Mills, S. Polinder, C.A. Pope, M. Qorbani, A. Rafay, S.M. Rana, M. Rahman, S.U. Rahman, R.K. Rai, S. Rajsic, M. Raju, I. Rakovac, C.L. Ranabhat, T. Rangaswamy, A.L. Ribeiro, S. Ricci, A. Roca, D. Rojas-Rueda, N.K. Roy, G.M. Ruhago, B.F. Sunguya, S. Saha, R. Sahathevan, M.M. Saleh, J.R. Sanabria, M.D. Sanchez-Niño, L. Sanchez-Riera, R. Sarmiento-Suarez, M. Sawhney, M.P. Schaub, I.J.C. Schneider, D.A.S. Silva, A.E. Schutte, G. Shaddick, A. Shaheen, S. Shahraz, M.A. Shaikh, R. Sharma, B.P. Shetty, M. Shin, R. Shiri, I.D. Sigfusdottir, D.G.A. Silveira, J.I. Silverberg, Y. Yano, O.P. Singh, P.K. Singh, V. Singh, S. Soneji, K. Søreide, J.B. Soriano, L.A. Sposato, C.T. Sreeramareddy, V. Stathopoulou, M.B. Stein, S. Stranges, K. Stroumpoulis, S. Swaminathan, B.L. Sykes, R. Tabarés-Seisdedos, K.M. Tabb, J.S. Takala, R.T. Talongwa, B. Taye, M. Ten Have, E.M. Tuzcu, A.J. Thomson, A.G. Thrift, G.D. Thurston, R. Topor-Madry, F. Topouzis, J.A. Towbin, J. Traebert, T. Truelsen, U. Trujillo, U.S. Uchendu, K.N. Ukwaja, O.A. Uthman, R. Van Dingenen, A. van Donkelaar, T. Vasankari, A.M.N. Vasconcelos, N. Venketasubramanian, R. Vidavalur, F.S. Violante, V. V. Vlassov, M.T.

- Wallin, S. Weichenthal, R.A. White, H.C. Williams, J.Q. Wong, A.D. Woolf, D. Xavier, G. Xu, B. Yakob, L.L. Yan, P. Yip, N. Yonemoto, G. Yonga, M.Z. Younis, Z. Zaidi, M.E. Zaki, F. Zannad, D.E. Zavala, H. Zeeb, D. Zonies, L.J. Zuhlke, Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015, *Lancet*. 388 (2016) 1459–1544. doi:10.1016/S0140-6736(16)31012-1.
- [13] Causes of death — malignant neoplasms, residents, 2014 HLTH17.png - Statistics Explained, http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/File:Causes_of_death_-_malignant_neoplasms,_residents,_2014_HLTH17.png (accessed February 7, 2018).
- [14] Direcção Geral de Saúde, Programa nacional para as doenças oncológicas, 2017. <https://www.dgs.pt/portal-da-estatistica-da-saude/diretorio-de-informacao/diretorio-de-informacao/por-serie-880762-pdf.aspx?v=11736b14-73e6-4b34-a8e8-d22502108547>.
- [15] N. Miranda, C. Portugal, Programa nacional para as doenças oncológicas, 2013. doi:2183-0746.
- [16] N. Miranda, C. Portugal, A. Dinis, F. Loureiro, F. Tavares, F.H. Correia, T. Lopes, Programa nacional para as doenças oncológicas, Direcção Geral de Saúde. (2014) 1–6.
- [17] P.N. para as D. Oncológicas, Programa nacional para as doenças oncológicas, 2017.
- [18] Y. Sun, Z. Zhao, Z. Yang, F. Xu, H. Lu, Z. Zhu, W. Shi, Risk factors and preventions of breast cancer, *Int. J. Biol. Sci.* 13 (2017) 1387–1397. doi:10.7150/ijbs.21635.
- [19] E. de Rinaldis, A. Tutt, G. Dontu, *Breast Cancer, Breast Pathol.* (2011) 352–359. doi:10.1016/B978-1-4377-1757-0.00028-7.
- [20] American Cancer Society, *Breast Cancer Facts & Figures 2012-2014*, 2013. doi:10.1007/s10549-012-2018-4.Mesothelin.
- [21] A.I. Phipps, C.I. Li, *Breast Cancer Biology and Clinical Characteristics*, in: *Breast Cancer Epidemiol.*, 2010: pp. 21–46. doi:10.1007/978-1-4419-0685-4.
- [22] Breastcancer.org, Your guide to the breast cancer pathology report, 2006.
- [23] Y. Parsa, S.A. Mirmalek, F.E. Kani, A. Aidun, S.A. Salimi-tabatabaee, S. Yadollah-damavandi, E. Jangholi, T. Parsa, E. Shahverdi, Y. Researchers, E. Club, T. Medical, S. Branch, T. Medical, S. Branch, T. Medical, S. Branch, A Review of the Clinical Implications of Breast Cancer Biology Yekta, *Electron. Physician.* (2016) 2416–2424. doi:10.14661/1412.
- [24] R. Brentani, Mutação em gene que pode definir prognóstico do câncer da mama, n.d.
- [25] The Cancer Genome Atlas Network, Comprehensive molecular portraits of human breast tumors, *Nature*. 490 (2012) 61–70. doi:10.1038/nature11412.Comprehensive.
- [26] A.R. Venkitaraman, Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2, *Cell*. 108 (2002) 171–182. doi:10.1016/S0092-8674(02)00615-3.
- [27] C.N. Arnold, A. Goel, H.E. Blum, C. Richard Boland, Molecular pathogenesis of colorectal cancer, *Cancer*. 104 (2005) 2035–2047. doi:10.1002/cncr.21462.
- [28] M. Astin, T. Griffin, R.D. Neal, P. Rose, W. Hamilton, The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care : a systematic review, *Br. J. Gen. Pract.* (2011) 231–243. doi:10.3399/bjgp11X572427.

- [29] S.D. Markowitz, M.M. Bertagnolli, Molecular basis of colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.* (2009) 2449–2460. doi:10.1056/NEJMra0804588.
- [30] M.D.M.M.B. Sanford D. Markowitz, Molecular basis of colorectal cancer, *N. Engl. J. Med.* 361 (2009) 2449–60. doi:10.1056/NEJMra0804588.
- [31] D. Treanor, P. Quirke, Pathology of colorectal cancer, *Clin. Oncol.* 19 (2007) 769–776. doi:10.1016/j.clon.2007.08.012.
- [32] B.W. Lash, P.B. Gilman, Principles of cytotoxic chemotherapy, *Medicine (Baltimore)*. 39 (2011) 711–716. doi:10.1016/B978-0-12-394296-8.00012-9.
- [33] S. Smith, S. Prewett, Principles of chemotherapy and radiotherapy, *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.* 27 (2017) 206–212. doi:10.1016/j.ogrm.2017.04.006.
- [34] J. Fernando, R. Jones, The principles of cancer treatment by chemotherapy, *Surg. (United Kingdom)*. 33 (2015) 131–135. doi:10.1016/j.mpsur.2015.01.005.
- [35] N.C. Tebbutt, E. Cattell, R. Midgley, D. Cunningham, D. Kerr, Systemic treatment of colorectal cancer., *Eur. J. Cancer*. 38 (2002) 1000–15. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.098.
- [36] E. Abraúl, D. Raimundo, C. Frutuoso, Tratamento médico do cancro da mama, in: *Man. Ginecol. - Vol. II*, 2011: pp. 289–304.
- [37] R. Hickey, M. Vouche, D.Y. Sze, E. Hohlastos, J. Collins, T. Schirmang, K. Memon, R.K. Ryu, K. Sato, R. Chen, R. Gupta, S. Resnick, J. Carr, H.B. Chrisman, A.A. Nemcek, R.L. Vogelzang, R.J. Lewandowski, R. Salem, Cancer concepts and principles: Primer for the interventional oncologist - Part II, *J. Vasc. Interv. Radiol.* 24 (2013) 1157–1164. doi:10.1016/j.jvir.2013.04.023.
- [38] E. Van Cutsem, K. Geboes, The integration of cytotoxics and biologicals in the treatment of metastatic colorectal cancer, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 21 (2007) 1089–1108. doi:10.1016/j.bpg.2007.10.020.
- [39] K.D. Holen, L.B. Saltz, New therapies, new directions: advances in the systemic treatment of metastatic colorectal cancer., *Lancet. Oncol.* 2 (2001) 290–7. doi:10.1016/S1470-2045(00)00324-7.
- [40] L.J.M. Oostendorp, P.F. Stalmeier, P.C. Pasker-De Jong, W.T. Van Der Graaf, P.B. Ottevanger, Systematic review of benefits and risks of second-line irinotecan monotherapy for advanced colorectal cancer, *Anticancer. Drugs*. 21 (2010) 749–758. doi:10.1097/CAD.0b013e32833c57cf.
- [41] R. Paul Symonds, K. Foewraker, Principles of chemotherapy and radiotherapy, *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.* 16 (2006) 100–106. doi:10.1016/j.ogrm.2017.04.006.
- [42] R.S. European, C. Care, Principles of chemotherapy, *Eur. J. Cancer Care (Engl)*. 2 (1993) 55–65. doi:https://doi.org/10.1016/j.mpm.2007.10.003.
- [43] T. Greenhalgh, R. Paul Symonds, Principles of chemotherapy and radiotherapy, *Obstet. Gynaecol. Reprod. Med.* (2014) 259–265. doi:10.1016/j.ogrm.2017.04.006.
- [44] F. Ben Abid, A. Gazzah, A. Ousbane, M. Gutierrez, E. Brain, Les alkylants, *Oncologie*. 9 (2007) 751–757. doi:10.1007/s10269-007-0785-z.
- [45] C. Riccardi, D. Musumeci, C. Irace, L. Paduano, D. Montesarchio, Ru(III) complexes for anticancer therapy: the importance of being nucleolipidic, *European J. Org. Chem.* (2017) 1100–1119. doi:10.1002/ejoc.201600943.
- [46] A.P.S. Fontes, E.T. César, H. Beraldo, A Química inorgânica na terapia do câncer, *Quim. Nova*. 6 (2005) 2–7.

- [47] J. Reedijk, New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 3611–3616. doi:10.1073/pnas.0737293100.
- [48] A.J. Di Pasqua, J. Goodisman, J.C. Dabrowiak, Understanding how the platinum anticancer drug carboplatin works: From the bottle to the cell, *Inorganica Chim. Acta.* 389 (2012) 29–35. doi:10.1016/j.ica.2012.01.028.
- [49] R.J. Mayer, M. Wolpin Brian, Systemic Treatment of Colorectal Cancer, *Gastroenterology.* 134 (2009) 1296–1310. doi:10.1053/j.gastro.2008.02.098.Systemic.
- [50] L.F. Liu, P. Duann, C.T. Lin, P. D’Arpa, J. Wu, Mechanism of action of camptothecin, in: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1996: pp. 44–49. doi:10.1111/j.1749-6632.1996.tb26375.x.
- [51] C. Bailly, Contemporary challenges in the design of topoisomerase II inhibitors for cancer chemotherapy, *Chem.Rev.* 112 (2012) 3611–3640. doi:10.1021/cr200325f.
- [52] M. Zamboni, Novas drogas no tratamento do carcinoma do pulmão não pequenas células, *Rev. Port. Pneumol.* 6 (2000) 681–686. doi:10.1016/S0873-2159(15)30940-5.
- [53] Ron H. J. Mathijssen, K.N. Robbert J. van Alphen, Jaap Verweij, Walter J. Loos, and A.S. Gerrit Stoter, Clinical pharmacokinetics and metabolism of Irinotecan (CPT-11), *Inflammopharmacology.* 7 (2001) 2182–2194. doi:10.1163/156856001300248353.
- [54] Summary of product characteristics, in: 2000: pp. 1–37.
- [55] and L.G. Minotti, G. Pierantonio Menna, Emanuela Ssalvatorelli, Gaetano Cairo, Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity, *Pharmacol. Rev.* 56 (2004) 185–229. doi:10.1124/pr.56.2.6.
- [56] W. Rosenthal, *Encyclopedia of molecular pharmacology*, 2008.
- [57] B.T. McGrogan, B. Gilmartin, D.N. Carney, A. McCann, Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer, *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 1785 (2008) 96–132. doi:10.1016/j.bbcan.2007.10.004.
- [58] W.M. Motswainyana, P.A. Ajibade, Anticancer activities of mononuclear Ruthenium(II) coordination complexes, *Adv. Chem.* 2015 (2015) 1–21. doi:10.1155/2015/859730.
- [59] M. Shimada, H. Itamochi, J. Kigawa, Nedaplatin: A cisplatin derivative in cancer chemotherapy, *Cancer Manag. Res.* 5 (2013) 67–76. doi:10.2147/CMAR.S35785.
- [60] S. Komeda, A. Casini, Next-generation anticancer metallodrugs., *Curr. Top. Med. Chem.* 12 (2012) 219–35. doi:10.2174/156802612799078964.
- [61] U. Ndagi, N. Mhlongo, M.E. Soliman, Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective, *Drug Des. Devel. Ther.* 11 (2017) 599–616. doi:10.2147/DDDT.S119488.
- [62] N. Farrell, Transition Metal Complexes as Drugs and Chemotherapeutic Agents, *Met. Complexes as Drugs Chemother. Agents.* 11 (1989) 809–840. doi:10.1007/978-94-011-7568-5.
- [63] I.P. Ejidike, P.A. Ajibade, Synthesis, characterization, anticancer, and antioxidant studies of Ru(III) complexes of monobasic tridentate Schiff bases, *Bioinorg. Chem. Appl.* (2016). doi:10.1155/2016/9672451.
- [64] R. Pettinari, A. Petrini, F. Marchetti, C. Pettinari, T. Riedel, B. Therrien, P.J. Dyson, Arene-Ruthenium(II) complexes with bioactive ortho -hydroxydibenzoylmethane ligands: synthesis, structure, and cytotoxicity, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2017) 1800–1806. doi:10.1002/ejic.201601164.

- [65] M.J. Clarke, Ruthenium metallopharmaceuticals, *Coord. Chem. Rev.* 232 (2002) 69–93. doi:10.1016/S0010-8545(02)00025-5.
- [66] I. Dragutan, V. Dragutan, A. Demonceau, Editorial of special issue ruthenium complex: The expanding chemistry of the ruthenium complexes, *Molecules*. 20 (2015) 17244–17274. doi:10.3390/molecules200917244.
- [67] A. Bergamo, G. Sava, Ruthenium anticancer compounds: myths and realities of the emerging metal-based drugs, *Dalt. Trans.* 40 (2011) 7817. doi:10.1039/c0dt01816c.
- [68] S.F.B.K.K.M.L.N.M.H.K.M. Chow, F. Ahmadipour, Synthesis, structural characterization, and anticancer activity of a monobenzyltin compound against MCF-7 breast cancer cells, *Drug Des. Devel. Ther.* 9 (2015) 6191–6201. doi:10.2147/DDDT.S87064.
- [69] I. Kostova, Ruthenium complexes as anticancer agents, *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 1085–1107. doi:10.2174/092986706776360941.
- [70] S. Leijen, S.A. Burgers, P. Baas, D. Pluim, M. Tibben, E. Van Werkhoven, E. Alessio, G. Sava, J.H. Beijnen, J.H.M. Schellens, Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy, *Invest. New Drugs*. 33 (2015) 201–214. doi:10.1007/s10637-014-0179-1.
- [71] I. Ott, R. Gust, Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs, *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 340 (2007) 117–126. doi:10.1002/ardp.200600151.
- [72] M. and C.R.R. Charlotesaux-Wauters, Iron transport and storage, *Eur. J. Biochem.* 164 (1987) 485–506. doi:10.1146/annurev.bi.49.070180.002041.
- [73] V. Brabec, O. Nováková, DNA binding mode of ruthenium complexes and relationship to tumor cell toxicity, *Drug Resist. Updat.* 9 (2006) 111–122. doi:10.1016/j.drug.2006.05.002.
- [74] I.M. Derivatives, Synthesis, molecular structure, and tumor-inhibiting properties of imidazolium trans -bis(imidazole)tetrachlororuthenate(III) and its methyl substituted derivatives, *Am. Chem. Soc.* (1987) 446–450. doi:0020-1669/87/1326.
- [75] G. Meng, Porphyrin chemistry pertaining to the design of anticancer agents, *Prog. Clin. Biochem. Med.* 10 (1993) 10–11. doi:10.1007/978-3-642-74760-1_2.
- [76] M.J. Clarke, F. Zhu, D.R. Frasca, Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2511–2534. doi:10.1021/cr9804238.
- [77] A. Bergamo, C. Gaiddon, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, G. Sava, Approaching tumour therapy beyond platinum drugs: Status of the art and perspectives of ruthenium drug candidates, *J. Inorg. Biochem.* 106 (2012) 90–99. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.09.030.
- [78] C.G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M.A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B.K. Keppler, From bench to bedside - preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A), *J. Inorg. Biochem.* 100 (2006) 891–904. doi:10.1016/j.jinorgbio.2006.02.013.
- [79] S. Parveen, M. Hanif, S. Movassaghi, M.P. Sullivan, M. Kubanik, M.A. Shaheen, T. Söhnel, S.M.F. Jamieson, C.G. Hartinger, Cationic Ru(η 6-p-cymene) complexes of 3-hydroxy-4-pyr(id)ones – lipophilic triphenylphosphine as co-ligand is key to highly stable and cytotoxic anticancer agents, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2017) 1721–1727. doi:10.1002/ejic.201601163.
- [80] C. Gaiddon, M. Pfeffer, The fate of compounds: from C–H activation to innovative anticancer therapy, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2017) 1639–1654. doi:10.1002/ejic.201601216.

- [81] E.S. Antonarakis, A. Emadi, Ruthenium-based chemotherapeutics: Are they ready for prime time?, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66 (2010) 1–9. doi:10.1007/s00280-010-1293-1.
- [82] E. Scheulen, M. Fels, Phase I clinical and pharmacokinetic study of titanocene dichloride in adults with advanced solid tumors, *Am. Assoc. Cancer Res.* 4 (1998) 2701–2708. doi:10.1200/JCO.2012.44.1055.
- [83] P. Collery, B. Keppler, C. Madoulet, B. Desoize, Gallium in cancer treatment, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 42 (2002) 283–296. doi:10.1016/S1040-8428(01)00225-6.
- [84] B. Kubista, T. Schoefl, L. Mayr, S. van Schoonhoven, P. Heffeter, R. Windhager, B.K. Keppler, W. Berger, Distinct activity of the bone-targeted gallium compound KP46 against osteosarcoma cells - synergism with autophagy inhibition, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 36 (2017) 52. doi:10.1186/s13046-017-0527-z.
- [85] C. Santini, M. Pellei, V. Gandin, M. Porchia, F. Tisato, C. Marzano, Advances in copper complexes as anticancer agents, *Chem. Rev.* 114 (2014) 815–862. doi:10.1021/cr400135x.
- [86] Z. Shokohi-Pour, H. Chiniforoshan, A.A. Momtazi-Borojeni, B. Notash, A novel Schiff base derived from the gabapentin drug and copper (II) complex: Synthesis, characterization, interaction with DNA/protein and cytotoxic activity, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 162 (2016) 34–44. doi:10.1016/j.jphotobiol.2016.06.022.
- [87] G. Gasser, I. Ott, N. Metzler-Nolte, Organometallic anticancer compounds, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 3–25. doi:10.1021/jm100020w.
- [88] U. Kalinowska-Lis, A. Felczak, L. Chęcińska, I. Szablowska-Gadomska, E. Patyna, M. Małecki, K. Lisowska, J. Ochocki, Antibacterial activity and cytotoxicity of silver(I) complexes of pyridine and (benz)imidazole derivatives. X-ray crystal structure of [Ag(2,6-di(CH₂OH)py)₂]NO₃, *Molecules.* 21 (2016). doi:10.3390/molecules21020087.
- [89] K.A. Ali, M.M. Abd-Elzaher, K. Mahmoud, Synthesis and Anticancer Properties of Silver(I) Complexes Containing 2,6-Bis(substituted)pyridine Derivatives, *Int. J. Med. Chem.* 7 (2013). doi:10.1155/2013/256836.
- [90] S.K. Bharti, G. Nath, R. Tilak, S.K. Singh, Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring, *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 651–660. doi:10.1016/j.ejmech.2009.11.008.
- [91] F. Sunday Nworie, Bis(Salicylidene)Ethylenediamine(Salen) and Bis(Salicylidene)Ethylenediamine-Metal Complexes: from Structure to Biological Activity, *J. Anal. Pharm. Res.* 3 (2016) 1–10. doi:10.15406/japlr.2016.03.00076.
- [92] A. Prakash, D. Adhikari, Application of Schiff bases and their metal complexes, *Int. J. ChemTech Res.* 3 (2011) 1891–1896.
- [93] P. Adão, S. Barroso, F. Avecilla, M.C. Oliveira, J.C. Pessoa, Cull-salan compounds: Synthesis, characterization and evaluation of their potential as oxidation catalysts, *J. Organomet. Chem.* 760 (2014) 212–223. doi:10.1016/j.jorganchem.2013.10.019.
- [94] P.G. Cozzi, Metal–Salen Schiff base complexes in catalysis: practical aspects, *Chem. Soc. Rev.* 33 (2004) 410–421. doi:10.1039/B307853C.
- [95] F.N. Al-obaidi, T.A. Al-diwan, A.S. Mahdi, Study of the coordination tendency of [N,N'-Ethylenbis (salicylidenimine)] towards transition metal ions, *J. Coord. Chem.* 5 (2010) 131–134.

- [96] M. Miller, O. Braitbard, J. Hochman, E.Y. Tshuva, Insights into molecular mechanism of action of salan titanium(IV) complex with in vitro and in vivo anticancer activity, *J. Inorg. Biochem.* (2016). doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.04.007.
- [97] H. Glasner, E.Y. Tshuva, A marked synergistic effect in antitumor activity of salan titanium(IV) complexes bearing two differently substituted aromatic rings, *J. Am. Chem. Soc.* 133 (2011) 16812–16814. doi:10.1021/ja208219f.
- [98] T.A. Immel, U. Groth, T. Huhn, O. Peter, Titanium Salan Complexes Displays Strong Antitumor Properties In Vitro and In Vivo in Mice, *PLoS One.* 6 (2011) 17869. doi:10.1371/journal.pone.0017869.
- [99] K. Matsumoto, B. Saito, T. Katsuki, Asymmetric catalysis of metal complexes with non-planar ONNO ligands: salen, salalen and salan, *Chem. Commun.* (2007) 3619. doi:10.1039/b701431g.
- [100] M.E.S. Serra, D. Murtinho, A.R. Gonçalves, P. Abreu, C. Pais, Ultrasound-Mediated Synthesis of Camphoric Acid-Based Chiral Salens for the Enantioselective Trimethylsilylcyanation of Aldehydes, *Chirality.* 22 (2010) 425–431. doi:10.1002/chir.
- [101] D. Murtinho, Z.N. Da Rocha, A.S. Pires, R.P. Jiménez, A.M. Abrantes, M. Laranjo, A.C. Mamede, J.E. Casalta-Lopes, M.F. Botelho, A.A.C.C. Pais, S.C.C. Nunes, H.D. Burrows, T. Costa, M.E.S. Serra, Synthesis, characterization and assessment of the cytotoxic activity of Cu(II), Fe(III) and Mn(III) complexes of camphoric acid-derived salen ligands, *Appl. Organomet. Chem.* 29 (2015) 425–432. doi:10.1002/aoc.3309.
- [102] S.R. Doctrow, K. Huffman, C.B. Marcus, G. Tocco, E. Malfroy, a Adinolfi, H. Kruk, K. Baker, N. Lazarowych, J. Mascarenhas, B. Malfroy, Salen – Manganese Complexes as Catalytic Scavengers of Hydrogen Peroxide and Cytoprotective Agents : Structure – Activity Relationship Studies Salen-Manganese Complexes as Catalytic Scavengers of Hydrogen Peroxide and Cytoprotective Agents : Structure-Act, *J. Med. Chem.* (2002) 4549–4558. doi:10.1021/jm020207y.
- [103] Z. Ghanbari, M.R. Housaindokht, M. Izadyar, M.R. Bozorgmehr, H. Eshtiagh-Hosseini, A.R. Bahrami, M.M. Matin, M.J. Khoshkholgh, Structure-activity relationship for Fe(III)-salen-like complexes as potent anticancer agents, *Sci. World J.* (2014). doi:10.1155/2014/745649.
- [104] K.I. Ansari, J.D. Grant, G.A. Woldemariam, S. Kasiri, S.S. Mandal, Iron(III)-salen complexes with less DNA cleavage activity exhibit more efficient apoptosis in MCF7 cells, *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 926. doi:10.1039/b816858j.
- [105] K.I. Ansari, S. Kasiri, J.D. Grant, S.S. Mandal, Fe(III)-salen and salphen complexes induce caspase activation and apoptosis in human cells, *J. Biomol. Screen.* 16 (2011) 26–35. doi:10.1177/1087057110385227.
- [106] C. Li, K.-W. Ip, W.-L. Man, D. Song, M.-L. He, S.-M. Yiu, T.-C. Lau, G. Zhu, Cytotoxic (salen)ruthenium(III) anticancer complexes exhibit different modes of cell death directed by axial ligands, *Chem. Sci.* 8 (2017) 6865–6870. doi:10.1039/C7SC02205K.
- [107] M.Z. Hernandez, S.M.T. Cavalcanti, D.R.M. Moreira, W. Filgueira, D.A. Junior, A. Cristina, L. Leite, Halogen atoms in the modern medicinal chemistry : hints for the drug design, *Curr. Drug Targets.* 11 (2010) 1–11. doi:1389-4501/10.
- [108] A.C. Serra, M. Pineiro, M. Abrantes, M. Laranjo, A.C. Santos, M.F. Botelho, Halogen atom effect on photophysical and photodynamic characteristics of derivatives of 5, 10, 15, 20-tetrakis (3-hydroxyphenyl) porphyrin, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 92 (2008) 59–65. doi:10.1016/j.jphotobiol.2008.04.006.

- [109] M.E. Silva Serra, D. Murtinho, Z.N. da Rocha, A.S. Pires, J.G. Baptista, A.M. Abrantes, M. Laranjo, J.E. Casalta-Lopes, M.F. Botelho, A.A.C.C. Pais, S.C.C. Nunes, H.D. Burrows, T. Costa, Dibrominated camphoric acid derived salen complexes: Synthesis, characterization and cytotoxic activity, *Polyhedron*. 137 (2017) 147–156. doi:10.1016/j.poly.2017.08.038.
- [110] J. Batista, Síntese de complexos metálicos de salens e salans para estudos de citotoxicidade, 2015.
- [111] C.R. Lewis, M.K. Davis, O.K. Danner, K.L. Wilson, L.R. Matthews, Camphor (*Cinnamomum camphora*), a traditional remedy with the history of treating several diseases, *Int. J. Case Reports Images*. 4 (2013) 248–251. doi:10.5348/ijcri.
- [112] Acidum Camphoricum. Camphoric Acid., *Pharm. Soc. Gt. Britain*. (n.d.). <https://www.henriettes-herb.com/eclectic/bpc1911/acidum-camp.html> (accessed June 27, 2018).
- [113] D.M.B. Murtinho, Desenvolvimento de novos catalisadores quirais para alquilação e redução, 2006.
- [114] L.F. Lindoy, G. V Meehan, N. Svenstrup, Mono- and diformylation of 4-substituted phenols: a new application of the Duff reaction, *Synthesis (Stuttg)*. (1998) 1029–1032. doi:10.1055/s-1998-2110.
- [115] J.C. Duff, E.J. Bills, Reactions between Hexamethylenetetramine and Phenolic Compounds. Part I., (2016) 35–50.
- [116] J. March, *March's Advanced Organic Chemistry*, 1985.
- [117] L.A. Rizzon, V.M.A. Sganzerla, Ácidos tartárico e málico no mosto de uva em Bento Gonçalves-RS, *Ciência Rural*. 37 (2007) 911–914. doi:10.1590/S0103-84782007000300053.
- [118] C.W. Scheele, *Ácido tartárico*, (2018).
- [119] M.E. da S. SERRA, Estudos de catálise enantioselectiva: novos catalisadores para reacções de hidrogenação, hidroformilação e hidroboração, 1998.
- [120] A.S. Pires, C.R. Marques, J.C. Encarnação, A.M. Abrantes, I.A. Marques, M. Laranjo, R. Oliveira, J.E. Casalta-Lopes, A.C. Gonçalves, A.B. Sarmiento-Ribeiro, M.F. Botelho, Ascorbic acid chemosensitizes colorectal cancer cells and synergistically inhibits tumor growth, *Front. Physiol*. 9 (2018) 1–14. doi:10.3389/fphys.2018.00911.
- [121] S. Naahidi, M. Jafari, M. Logan, F. Edalat, A. Khademhosseini, B. Dixon, P. Chen, Immuno-and hemocompatibility of amino acid pairing peptides for potential use in anticancer drug delivery, *J. Bioact. Compat. Polym*. 29 (2014) 254–269. doi:10.1177/0883911514528144.
- [122] E. Leung, J.E. Kim, M. Askarian-Amiri, G.J. Finlay, B.C. Baguley, Evidence for the existence of triple-negative variants in the MCF-7 breast cancer cell population, *Biomed Res. Int*. (2014) 1–7. doi:10.1155/2014/836769.
- [123] J. Casalta-Lopes, M.F.B. Ana Margarida Abrantes, Mafalda Laranjo, Efflux pumps modulation in colorectal adenocarcinoma cell lines: the role of nuclear medicine, *J. Cancer Ther*. 2 (2011) 408–417. doi:10.4236/jct.2011.23056.
- [124] K. Naumann, How chlorine in molecules affects biological activity, in: *Eurochlor*, 2003: pp. 1–37. www.eurochlor.org.

- [125] P. Swietach, R.D. Vaughan-Jones, A.L. Harris, A. Hulikova, The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369 (2014). doi:10.1098/rstb.2013.0099.
- [126] R. Luna-García, B.M. Damián-Murillo, V. Barba, H. Höpfl, H.I. Beltrán, L.S. Zamudio-Rivera, Structure and conformational motion of seven-coordinate diorganotin(IV) complexes derived from salen and salan type ligands, *J. Organomet. Chem.* 694 (2009) 3965–3972. doi:10.1016/j.jorganchem.2009.08.016.
- [127] L.D. Volk-Draper, S. Rajput, K.L. Hall, A. Wilber, S. Rana, Novel model for basaloid triple-negative breast cancer: behavior in vivo and response to therapy, *Neoplasia*. 14 (2012) 926–IN13. doi:10.1593/neo.12956.
- [128] V. Brabec, J. Kasparkova, Ruthenium coordination compounds of biological and biomedical significance. DNA binding agents, *Coord. Chem. Rev.* 376 (2018) 75–94. doi:10.1016/j.ccr.2018.07.012.
- [129] K. Spiewak, G. Stochel, M. Brindell, Influence of redox activation of NAMI-A on affinity to serum proteins: Transferrin and albumin, *J. Coord. Chem.* 68 (2015) 3181–3192. doi:10.1080/00958972.2015.1067692.
- [130] A. Mishra, Y.J. Jeong, J.H. Jo, S.C. Kang, H. Kim, K.W. Chi, Coordination-driven self-assembly and anticancer potency studies of arene-ruthenium-based molecular metalla-rectangles, *Organometallics*. 33 (2014) 1144–1151. doi:10.1021/om401042m.
- [131] M. Damercheli, D. Dayyani, M. Behzad, B. Mehravi, M. Shafiee Ardestani, New salen-type manganese(III) Schiff base complexes derived from meso -1,2-diphenyl-1,2-ethylenediamine: In vitro anticancer activity, mechanism of action, and molecular docking studies, *J. Coord. Chem.* 68 (2015) 1500–1513. doi:10.1080/00958972.2015.1027697.
- [132] İ.H.K. and A.G. Ahmet KILICA, İsmail KOYUNC, Mustafa DURGUN, İsmail OZASLAN, Synthesis and characterization of the hemi-salen ligands and their triboron complexes: spectroscopy and examination of anticancer properties, *ARPN J. Eng. Appl. Sci.* 12 (2017) 3218–3221. doi:10.1111/ijlh.12426.
- [133] F.Q.B. Alenzi, Links between apoptosis, proliferation and the cell cycle, *Br. J. Biomed. Sci.* 61 (2004) 99–102. doi:10.1080/09674845.2004.11732652.
- [134] A.B. da R. Ivana Grivicich, Andréa Regner, Morte celular por apoptose, *Rev. Bras. Cancerol.* 53 (2007) 335–343.
- [135] P. Syntichaki, N. Tavernarakis, Death by necrosis uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos?, *EMBO Rep.* 3 (2002) 604–609. doi:10.1093/embo-reports/kvf138.
- [136] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chem. Biol. Interact.* 160 (2006) 1–40. doi:10.1016/j.cbi.2005.12.009.
- [137] J.O. Funk, Cancer cell cycle control, *Anticancer Res.* 19 (1999) 4772–4780. doi:10.1007/978-1-4939-0888-2.
- [138] M. Oren, Regulation of the p53 tumor suppressor protein, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 36031–36034. doi:10.1074/jbc.274.51.36031.
- [139] G.R. Stark, W.R. Taylor, Analyzing the G2/M checkpoint, in: *Methods Mol. Biol.*, 2004: pp. 51–82.

- [140] S. Gáspár, Detection of superoxide and hydrogen peroxide from living cells using electrochemical sensors, in: ACS Symp. Ser., 2011. doi:10.1021/bk-2011-1083.ch010.
- [141] E.S. Henle, S. Linn, Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 19095–19098. doi:10.1074/jbc.272.31.19095.
- [142] S.G. Rhee, T.-S. Chang, W. Jeong, D. Kang, Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells, *Mol. Cells.* 29 (2010) 539–549. doi:10.1007/s10059-010-0082-3.
- [143] G. Manda, M.T. Nechifor, T.-M. Neagu, Reactive oxygen species, cancer and anti-cancer therapies, *Curr. Chem. Biol.* 3 (2009) 342–366. doi:10.2174/187231309787158271.
- [144] R.A. Brigandi, S.F. Russ, C. Petit, B. Johnson, S. Croy, P. Hodsman, F. Muller, Intravenous pharmacokinetics, local tolerability, and hemolysis of an SBE7- β -cyclodextrin formulation of the neurokinin-1 receptor antagonist vestipitant, *Clin. Pharmacol. Drug Dev.* 4 (2015) 130–136. doi:10.1002/cpdd.128.
- [145] Guidance for industry: nonclinical studies for the safety evaluation of pharmaceutical excipients., 2005.
- [146] M.C. Madeira, L.M. Almeida, B.A. Custo, Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure, *Biochim. Biophys. Acta.* 1464 (2000) 49–61.
- [147] A.M. Abrantes, L.C. Tavares, S. Pires, J. Casalta-Lopes, C. Mendes, M. Simões, M.M. Grazina, R. a Carvalho, M.F. Botelho, Metabolic effects of hypoxia in colorectal cancer by ¹³C NMR isotopomer analysis., *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 759791. doi:10.1155/2014/759791.
- [148] M. Ilyas, I.P. Tomlinson, A. Rowan, M. Pignatelli, W.F. Bodmer, Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 (1997) 10330–4. doi:10.1073/pnas.94.19.10330.
- [149] Ş. Comşa, A.M. Cîmpean, M. Raica, The story of MCF-7 breast cancer cell line: 40 Years of experience in research, *Anticancer Res.* 35 (2015) 3147–3154.
- [150] A.C. Pinto, S. André, A.R. Ferreira, B. Sousa, C. Pulido, C.S. Loewenthal, D. Pinto, E.C. Moser, H. Gervásio, H. Pereira, J.M. Ribeiro, J.C. Marques, J.L.P. Coelho, L. Costa, L. Travado, M.J. Cardoso, N. Afonso, P. Gouveia, S. Braga, S. Pedro, Cem perguntas chave no cancro da mama, 2015.
- [151] J.C. Kathryn, G. Sireesha V, L. Stanley, Triple negative breast cancer cell lines: one tool in the search for better treatment of triple negative breast cancer, *Breast Dis.* 32 (2012) 35–48. doi:10.3233/BD-2010-0307.
- [152] E. V Gaffney, A cell line (HBL-100) established from human breast milk, *Cell Tissue Res.* 100 (1982) 563–568. doi:10.1007/BF00204786.
- [153] K.D. Sarma, D. Ray, A. Antony, Improved sensitivity of trypan blue dye exclusion assay with Ni²⁺ or Co²⁺ salts, *Cytotechnology.* 32 (2000) 93–95. doi:10.1023/A:1008144527206.
- [154] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [155] Y. Liu, D.A. Peterson, H. Kimura, D. Schubert, Mechanism of Cellular 3-(4,5-Ddimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction, *J. Neurochem.* 69 (2002) 581–593. doi:10.1046/j.1471-4159.1997.69020581.x.

- [156] J. Van Meerloo, G.J.L. Kaspers, J. Cloos, Cell sensitivity assays: the MTT assay, in: *Cancer Cell Cult. Methods Mol. Biol.*, 2011: pp. 237–245. doi:10.1007/978-1-61779-080-5.
- [157] S.P. Langdon, *Cancer Cell Culture* Edited by, 2004. doi:10.1385/1592594069.
- [158] A. Adan, G. Alizada, Y. Kiraz, Y. Baran, A. Nalbant, Flow cytometry: basic principles and applications, *Crit. Rev. Biotechnol.* 37 (2017) 163–176. doi:10.3109/07388551.2015.1128876.
- [159] J.M. Tavares, *Princípios gerais de culturas de células e citometria de fluxo para avaliação dos efeitos da radiação ionizante*, 2009.
- [160] T.L. Silva, a Reis, C. Hewitt, J.C. Roseiro, *Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos*, *Bol. Biotecnol.* 77 (2004) 32–40.
- [161] I. Vermes, C. Haanen, C. Reutelingsperger, Flow cytometry of apoptotic cell death, *J. Immunol. Methods.* 243 (2000) 167–190. doi:10.1016/S0022-1759(00)00233-7.
- [162] S. Chen, A.C. Cheng, M.S. Wang, X. Peng, Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling, *World J. Gastroenterol.* 14 (2008) 2174–2178. doi:10.3748/wjg.14.2174.
- [163] Z. Darzynkiewicz, S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M.A. Hotz, P. Lassota, F. Traganos, Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, *Cytometry.* 13 (1992) 795–808. doi:10.1002/cyto.990130802.
- [164] A.D. Deitch, H. Law, R.D. White, A stable propidium iodide staining procedure for flow cytometry, *J. Histochem. Cytochem.* (1982).
- [165] G.H. Williams, K. Stoeber, The cell cycle and cancer, *J. Pathol.* 226 (2012) 352–364. doi:10.1002/path.3022.
- [166] J. Moncayo, J. Santacruz, Ma. Montes, B. Franco, M. Lopez, E. Meisel, F. Salazar, Utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para el diagnóstico de la infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con enfermedad úlcero, *Rev. Médica Risaralda.* 8 (2012) 1–7. <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistamedica/article/viewFile/8163/4949>.
- [167] D.G.H. Sergey Dikalov, Kathy K. Griendling, Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies, *Natl. Institutes Heal.* 86 (2007) 573–579. doi:10.1109/TMI.2012.2196707.
- [168] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: How should you do it and what do the results mean?, *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 231–255. doi:10.1038/sj.bjp.0705776.
- [169] H. Zhao, S. Kalivendi, H. Zhang, J. Joseph, K. Nithipatikom, J. Vásquez-Vivar, B. Kalyanaraman, Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 1359–1368. doi:10.1016/S0891-5849(03)00142-4.
- [170] and J.J.C. Kristen E. Olney, Juan Du, Thomas J. van 't Erve, Jordan R. Witmer, Zita A. Sibenaller, Brett A. Wagner, Garry R. Buettner, Inhibitors of hydroperoxide metabolism enhance ascorbate-induced cytotoxicity, 151 (2013) 414–420. doi:10.1097/CCM.0b013e31823e986a.A.
- [171] G. Barrera, Oxidative stress and lipid peroxidation products in cancer progression and therapy, *ISRN Oncol.* (2012) 1–21. doi:10.5402/2012/137289.

- [172] E.D.L. Chazin, L. Terra, W.T. Vellasco, P.D.S. Sanches, L.C. Pinto, Evaluation of 1,3-benzoxathiol-2-one and 1,3-benzothiazole derivatives as potential anticancer and antifungal agents, *Med. Chem.* 1 (2018) 1–8. doi:10.2174/1573406413666170704095113.

