



Cristiana de Jesus Rodrigues Marques
Licenciada em Biologia

Avaliação de complexos metálicos de Cobre (Cu(II)) e de Platina (Pt(II)) como agentes anti-proliferativos em células tumorais

Mestrado em Genética Molecular e Biomedicina
Universidade NOVA de Lisboa
setembro, 2023



Avaliação de complexos metálicos de Cobre (Cu(II)) e de Platina (Pt(II)) como agentes antiproliferativos em células tumorais

Cristiana de Jesus Rodrigues Marques

Licenciada em Biologia

Orientadora: Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes,
Professora Associada com Agregação, DCV, UCIBIO FCT/UNL

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Casal Ribeiro Castro Caldas Braga, Professora Auxiliar da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

Arguentes: Doutora Ana Isabel Tomaz, Professora Auxiliar da Faculdades de Ciências da Universidade de Lisboa

Orientador: Doutora Maria Alexandra Núncio de Carvalho Ramos Fernandes, Professora Associada com Agregação da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

Copyright © Cristiana de Jesus Rodrigues Marques, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade NOVA de Lisboa.

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

AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer à FCT pelos últimos dois anos, que guardarei com carinho. Agradeço à Professora Doutora Alexandra Fernandes pela oportunidade de colaborar no seu laboratório, bem como pela confiança depositada e toda a disponibilidade de orientação ao longo deste ano.

Gostaria de agradecer a todos os estudantes de doutoramento por estarem sempre disponíveis a ajudar especialmente à Sandra Cordeiro pela ajuda na condução dos ensaios.

Gostaria de agradecer às minhas amigas Helena e Rita, por todo o apoio que me proporcionaram durante este mais exigente e nos momentos mais stressantes.

À Suzana Cruz e à Beatriz Vieira, queria agradecer imensamente estes dois anos de companheirismo, apoio incondicional e amizade para a vida.

Por último, queria agradecer principalmente à minha família, pois sem eles não teria conseguido. Um obrigado por todo o apoio e amor.

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito do projeto UIDP/04378/2020 e UIDB/04378/2020 da Unidade de Ciências Biomoleculares Aplicadas - UCIBIO, do projecto LA/P/0140/2020 do Laboratório Associado Instituto para a Saúde e a Bioeconomia - i4HB e dos projetos PTDC/QUI-QIN/0146/2020 – “Arrows2cancer, PTDC/QUI-QOR/1304/2020, e 2022.04315.PTDC - NANOEAT.

"We keep moving forward, opening new doors, and doing new things because we're curious,
and curiosity keeps leading us down new paths."

(Walt Disney)

RESUMO

O cancro é uma doença complexa e devastadora que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, caracterizada pelo crescimento descontrolado de células anormais no organismo. A quimioterapia é um dos tratamentos mais comuns para o cancro, consistindo na administração de agentes químicos que visam destruir as células cancerígenas ou inibir o seu crescimento. Dentro dos agentes químicos, os complexos metálicos têm despertado o interesse na investigação médica, pois mostram elevado potencial como agentes quimioterapêuticos eficazes, devido às suas propriedades únicas que permitem a combinação com diversos ligandos existindo uma maior seletividade no ataque às células malignas, minimizando o impacto nas células saudáveis. Este avanço representa uma promissora perspectiva para o tratamento do cancro, em busca de alternativas mais eficazes, menos tóxicas e que evitem o aparecimento de resistências.

Neste trabalho, vários complexos de cobre (Cu(II)) e de platina (Pt(II)) foram testados em termos de atividade antiproliferativa em culturas 2D de carcinoma colorretal, carcinoma colorretal resistente à doxorrubicina, carcinoma do ovário e em fibroblastos primários humanos.

Entre os complexos testados, os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a mostram-se como os mais promissores com maiores índices de seletividade para as células de carcinoma de colorretal resistente à doxorrubicina (HCT116doxR; IC₅₀ de 0,239, 0,290 e 0,683 respetivamente). Os resultados revelam que estes complexos são capazes de internalizar nas células HCT116doxR ao fim de 3h levando à formação de ROS com consequente alteração do potencial de membrana mitocondrial e indução de morte celular programada pela via apoptótica intrínseca e por autofagia. Estes complexos interferem ainda na progressão do ciclo celular com formação de células senescentes, conseguem clivar o DNA plasmídico através de mecanismos oxidativos e interagir com a albumina sérica bovina (BSA). Verificou-se ainda que os três complexos atrasam

o processo de migração celular, mas apenas o complexo Pt1a parece ter algum efeito na retardação da neovascularização.

Palavras-chave: Cancro, Quimioterapia, Complexos metálicos, Cobre, Platina, Citotoxicidade

ABSTRACT

Cancer is a complex and devastating disease that affects millions of individuals worldwide. It is characterized by the uncontrolled growth of abnormal cells within the body. Chemotherapy is one of the most common treatments for cancer, involving the administration of chemical agents aimed at destroying cancer cells or inhibiting their growth. Among these chemical agents, metal complexes have attracted considerable interest in medical research due to their high potential as effective chemotherapeutic agents. This can be credited to their unique properties that enable them to combine with various ligands, allowing for greater selectivity in targeting malignant cells while minimizing the impact on healthy cells. This advancement represents a promising perspective for cancer treatment, seeking more effective and less toxic alternatives while mitigating the development of resistance.

In this study, several copper (Cu(II)) and platinum (Pt(II)) complexes were assessed for their anti-proliferative activity in 2D cultures of colorectal carcinoma, doxorubicin-resistant colorectal carcinoma, ovarian carcinoma, and primary human fibroblasts.

Among the tested complexes, Cu1a, Cu1b, and Pt1a complexes emerged as the most promising ones, displaying higher selectivity indices for doxorubicin-resistant colorectal carcinoma cells (HCT116doxR) with IC_{50} values of 0.239, 0.290, and 0.683, respectively. The results demonstrate that these complexes are capable of internalizing HCT116doxR cells within 3 hours, leading to the generation of reactive oxygen species (ROS), subsequent alteration of mitochondrial membrane potential, and induction of programmed cell death through the intrinsic apoptotic pathway and autophagy. Furthermore, these complexes interfere with cell cycle progression, induce cellular senescence, cleave plasmid DNA via oxidative mechanisms, and interact with bovine serum albumin (BSA). It was also observed that all three complexes delay the cell migration process, although only Pt1a appears to have some effect on retarding neovascularization.

Keywords: Cancer, Chemotherapy, Metal complexes, Copper, Platinum, Cytotoxicity

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Definição de Cancro.....	1
1.2	Incidência, Distribuição e Mortalidade	1
1.2.1	Carcinoma colorretal e de ovário.....	2
1.3	Regulação do Ciclo Celular.....	4
1.4	Carcinogénese.....	6
1.4.1	Oncogenes e Genes Supressores.....	8
1.4.2	Microambiente tumoral e Metástase	9
1.5	Mecanismos de morte celular	12
1.5.1	Apoptose.....	12
1.5.2	Autofagia.....	14
1.5.3	Necrose.....	16
1.6	Fatores de Risco.....	17
1.6.1	Risco do Cancro Colorretal.....	17
1.6.2	Risco do Cancro do Ovário.....	18
1.7	Cancro do Colorretal- Biologia e Genética.....	19
1.8	Cancro do Ovário- Biologia e Genética	21
1.9	Abordagens Terapêuticas	22
1.9.1	Quimioterapia.....	23
1.10	Complexos metálicos para o tratamento.....	25

1.10.1	Complexos Metálicos de Platina	26
1.10.2	Complexos Metálicos de Cobre.....	27
1.11	Tratamento de Cancro Colorretal e Ovário.....	28
1.12	Modelos 3D no desenvolvimento de terapêuticas.....	29
1.13	Contexto e Motivação	31
2	MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1	Complexos em estudo	33
2.2	Estabilidade e Solubilidade dos Complexos	34
2.3	Linhas Celulares Humanas Estudadas	35
2.3.1	Características.....	35
2.3.2	Manutenção das Culturas Celulares (2D).....	36
2.4	Ensaio de Viabilidade Celular	37
2.5	Potencial Apoptótico	39
2.5.1	Marcação com Anexina V-FITC e IP	39
2.6	Potencial de Membrana Mitocondrial.....	40
2.7	Western Blot.....	41
2.7.1	Preparação das amostras de proteína	41
2.7.2	Quantificação da proteína extraída.....	42
2.7.3	Preparação do SDS-PAGE e Transferência	43
2.7.4	Processo de Incubação com o Anticorpo Primário e Secundário	43
2.7.5	Revelação das bandas	44
2.8	Autofagia.....	45
2.9	Produção de Espécies Reativas de Oxigénio	46
2.10	Análise da Progressão do Ciclo Celular	47
2.11	Senescência Celular	48
2.12	Interação dos complexos com o DNA Plasmídico.....	49

2.12.1	Cultura de Bactérias de <i>Escherichia Coli</i> (<i>E. coli</i>) e isolamento de DNA plasmídico (pUC18)	49
2.12.2	Interação dos complexos com o DNA plasmídico extraído.....	49
2.13	Determinação do mecanismo de clivagem do pDNA pelos complexos.....	50
2.14	Potencial angiogénico in vivo	52
2.15	Migração Celular	52
2.16	ICP-AES- Internalização dos Complexos.....	53
2.17	Interação dos complexos com a albumina de soro bovino (BSA).....	54
2.17.1	Espetroscopia de absorção de UV-visível.....	54
2.17.2	Fluorescência	55
2.18	Estatística.....	55
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.1	Potencial Citotóxico	57
3.1.1	Ensaio de viabilidade celular em 2D	57
3.1.2	Ensaio de viabilidade celular em 3D	62
3.2	Estabilidade	63
3.3	Potencial Apoptótico	65
3.3.1	Marcação dupla Anexina V-FITC e IP.....	65
3.3.2	Potencial Mitocondrial	68
3.3.3	Western Blot	69
3.4	Potencial Autofágico.....	71
3.5	Produção de ROS.....	73
3.6	Ciclo Celular.....	75
3.7	Senescência	76
3.8	Interação com DNA Plasmídico	78
3.8.1	Eletroforese em gel de Agarose.....	78

3.9	Interação dos Complexos com DNA Plasmídico (pUC18) - Mecanismos de Clivagem	82
3.10	Remissão Celular	86
3.11	Potencial Angiogénico	87
3.12	Internalização dos Complexos	89
3.13	Interação dos Complexos com a BSA.....	90
3.13.1	Espetroscopia	90
3.13.2	Fluorescência	92
4	CONCLUSÕES	95
5	BIBLIOGRAFIA	99
6	ANEXOS.....	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1- Representação da regulação do ciclo celular. Identificação dos checkpoints e componentes envolvidos na regulação, CDK e ciclinas.....	5
Figura 1.2 -Representação de características adquiridas pelas células tumorais no desenvolvimento de cancro criadas (Hanahan e Weinberg).	7
Figura 1.3- Esquema representativo do processo de metástase.....	11
Figura 1.4- Ilustração representativa do processo de morte celular programada: apoptose (via intrínseca e via extrínseca).	14
Figura 1.5- Representação do mecanismo que despoleta autofagia.....	16
Figura 1.6- Fases do desenvolvimento de um carcinoma colorretal.....	20
Figura 1.7- Tipos de modalidade de tratamento no cancro..	22
Figura 1.8- Comparação entre os modelos 2D in vitro e modelos 3D in vitro de esferóides...30	
Figura 2.1- Esferóide de células HCT116doxR com 6 dias de incubação.....	39
Figura 3.1- Quantificação de células em apoptose inicial, tardia e necrose na linha tumoral HCT116doxR viáveis expostas aos complexos em estudo.	66
Figura 3.2- Potencial mitocondrial ($\Delta \Psi M$) de células tumorais HCT116doxR após exposição aos complexos em estudo.	69
Figura 3.3- Expressão relativa de BAX/BCL-2 em células HCT116doxR após exposição aos complexos em estudo.....	70
Figura 3.4- Quantificação de células tumorais HCT116doxR em autofagia após exposição complexos em estudo.....	72
Figura 3.5- Indução de espécies reativas de oxigénio (ROS) em células tumorais HCT116doxR viáveis, após exposição aos complexos em estudo.....	74
Figura 3.6- Progressão do ciclo celular em células tumorais HCT116doxR viáveis, após exposição aos complexos no estudo.....	76

Figura 3.7- Quantificação de células senescentes de HCT116doxR após a incubação com os complexos em estudo.....	77
Figura 3.8- Eletroforese em gel de agarose para verificação da integridade das amostras de pDNA expostas aos complexos em estudo em concentrações crescentes.....	79
Figura 3.9- Rácio das intensidades das isoformas circulares e superenroladas de amostras pUC18 expostas aos complexos em estudo em concentrações crescentes.....	80
Figura 3.10- Eletroforese em gel de agarose 0,8% para verificação da integridade das amostras de pDNA expostas ao complexo Pt1a diferentes tempos de incubação e concentrações.....	81
Figura 3.11- Eletroforese em gel de agarose para determinação dos mecanismos de clivagem (a partir da azida de sódio NaN_3) de pDNA pelo complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a.....	83
Figura 3.12- Rácio das intensidades das isoformas circulares e superenroladas. As amostras foram submetidas a uma incubação durante 24h aos complexos de Cu1a, Cu1b e Pt1a e controlos de DMSO, Tampão e NaN_3	84
Figura 3.13- Eletroforese em gel de agarose 1,0% para determinação dos mecanismos de clivagem de pDNA após incubação por 24h com os complexos de Cu 1a, Cu1b e Pt1a e H_2O_2 e NaN_3	85
Figura 3.14- Remissão Celular em células de fibroblastos pela exposição aos IC_{50} do Cu 1a, Cu 1b e Pt 1a após 24 horas.....	87
Figura 3.15- Potencial angiogénico dos complexos Cu 1a, Cu1b e Pt1a com concentração igual ao IC_{50} em embriões de galinha.....	88
Figura 3.16- Internalização dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a avaliada por ICP-AES na fração celular de células da linha celular HCT116doxR após exposição a 10x a concentração respetiva de cada IC_{50}	90
Figura 3.17- Espectros de absorção em UV-Visível de interação entre 200 μM de BSA e concentração variável de Cu1a, Cu1b e Pt1a.....	91
Figura 3.18- Espectro de intensidade de fluorescência para interação entre a BSA (200 μM) e o complexo Cu1a (50 μM).....	93
Figura 3.19- Espectro de intensidade de fluorescência para interação entre a BSA (200 μM) e o complexo Pt1a (50 μM).....	93
Figura 3.20- Espectro de intensidade de fluorescência para interação entre a BSA (200 μM) e o complexo Cu1b (50 μM).....	94
Figura 6.1- Espectros de absorção representativos da estabilidade dos complexos Cu1a (50 μM), Cu1b (50 μM) e Pt1a (50 μM) obtidos para diferentes tempos de incubação: 0, 3, 6, 24 e 48 horas.....	116

Figura 6.2- Viabilidade celular de células HCT116 pela exposição a diversas concentrações de complexos de Cobre e Platina.....	118
Figura 6.3- Viabilidade celular de células HCT116doxR pela exposição a diversas concentrações de complexos de Cobre e Platina.....	119
Figura 6.4- Viabilidade celular de células A2780 pela exposição a diversas concentrações de complexos Cobre e Platina.	121
Figura 6.5- Viabilidade celular de Fibroblastos após exposição a diversas concentrações de complexos Cobre e Platina.	123
Figura 6.6- Viabilidade celular de esferóides constituídos pela linha de células saudáveis de HCT116doxR após exposição a diversas concentrações dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a.	124
Figura 6.7- Viabilidade celular de células HCT116doxR após da exposição a diversas concentrações de ligandos.....	125
Figura 6.8- Viabilidade celular de células saudáveis de Fibroblastos exposição a diversas concentrações de ligandos.....	126
Figura 6.9- Revelação da expressão de Bax e BCL-2 após de exposição de HCT116doxR aos IC ₅₀ aos complexos em estudo.	127
Figura 6.10- Exemplos de áreas de CAM às 0, 24 e 48h após exposição aos complexos em estudo.....	128
Figura 6.11- Imagens representativas do ensaio de cicatrização de feridas em fibroblastos após de 0 e 24 h de incubação.	129

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 Propriedades dos complexos Cu(II) e Pt(II) utilizados no estudo.....	34
Tabela 2.2- Características principais das linhas celulares tumorais e não tumorais.	35
Tabela 2.3-Reagentes constituintes de um gel SDS-PAGE de 10% de poliacrilamida.....	43
Tabela 2.4-Anticorpos primários e secundários usados no ensaio do Western Blot.	44
Tabela 2.5- Soluções stock preparadas do complexo Pt1a incubados com pUC18, durante 5 horas, 2 horas, 30 minutos, 15 minutos e 5 minutos.....	50
Tabela 2.6- Soluções stock preparadas de cada complexo de Cu1a, Cu1b, Pt1a e de agentes sequestradores de azida de sódio (NaN ₃) incubados com pUC18.	51
Tabela 2.7- Soluções stock preparadas dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a e de agentes sequestradores de azida de sódio (NaN ₃) e o H ₂ O ₂ incubados com pUC18.....	51
Tabela 3.1- IC ₅₀ e IS relativo dos complexos nas linhas celulares HCT116, HCT116doxR, A2780 e fibroblastos.....	59
Tabela 3.2- IC ₅₀ e IS relativo dos ligandos nas linhas celulares HCT116doxR e fibroblastos.	61
Tabela 3.3- IC ₅₀ e IS relativo dos complexos selecionados nas linhas celulares HCT116doxR e em modelos esféricos constituídos por células de HCT116doxR.	62
Tabela 3.4- Percentagem de células viáveis, apoptóticas iniciais e tardias e necróticas em células HCT116doxR.....	67

SIGLAS

A2780	Linha celular tumoral proveniente de um carcinoma de ovário humano.
APAF-1	Do inglês <i>Apoptotic Protease Activating Factor-1</i>
APC	Do inglês <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
APS	Persulfato de amónio do inglês <i>Ammonium Persulfate</i>
ATCC	Do inglês <i>American Type Culture Collection</i>
ATGs	Proteínas relacionadas com a autofagia
ATM	Do inglês <i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATR	Do inglês <i>Ataxia Telangiectasia and Rad3-Related</i>
BAK	Do inglês <i>Bcl-2 Homologous Antagonist Killer</i>
BAX	Do inglês <i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL-2	Do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
BCL-xl	Do inglês <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bim	Do inglês <i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
BRCA1	Do inglês <i>Breast cancer 1 susceptibility gene</i>
BRCA2	Do inglês <i>Breast cancer 2 susceptibility gene</i>
BSA	Albumina do soro bovino do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CAM	Membrana corioalantóide do inglês <i>chorioallantoic membrane</i>
CAMs	Do inglês <i>Cancer-Associated Macrophages</i>

CAFS	Do inglês <i>Cancer-Associated Fibroblasts</i>
CCR	Cancro do Colorretal
Caspases	Do inglês <i>Cysteine-aspartic protease</i>
CDK	Cinase dependente de ciclinas do inglês <i>Cyclin-dependent protein kinase</i>
CDKI	Cinase dependente de ciclinas do inglês <i>Cyclin-dependent protein kinase inhibitor</i>
C-Flip	Do inglês <i>Cellular FLICE-inhibitory protein</i>
CIMP	Metilação de ilhas CpG do inglês <i>CpG islands methylator phenotype</i>
CIN	Instabilidade cromossômica do inglês <i>chromosome instability</i>
CIS	Cisplatina
DAMPS	Do inglês <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DCC	Do inglês <i>Netrin receptor DCC</i>
DISC	Do inglês <i>Death inducing signaling complex</i>
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ECM	Do inglês <i>Extracellular matrix</i>
E2F	Fator de transcrição E2, do inglês <i>E2 transcription factor</i>
EMT	Do inglês <i>Epithelial-mesenchymal transition</i>
FADD	Do inglês <i>Fas-associated death domain</i>
FBS	Soro fetal bovino do inglês <i>Fetal Bovine Serum</i>
FDA	Do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína do inglês <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
HCT116	Linha celular tumoral proveniente do cancro colorretal
HCT116doxR	Linha celular tumoral proveniente do cancro colorretal resistente à doxorubicina
HCT116	Linha celular tumoral proveniente do cancro colorretal

HCT116doxR	Linha celular tumoral proveniente do cancro colorretal resistente à doxorubicina
HSA	Do inglês <i>Human Serum Albumin</i>
ICP-AES	Espetrometria de emissão atômica com plasma indutivo do inglês <i>Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry</i>
IP	Iodeto de propídeo
IAP	Inibidor de Protease Associado a Apoptose
KRAS	Do inglês Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MLKL	Do inglês <i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i>
MOMP	Do inglês <i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
mTOR	Do inglês <i>Mammalian target of rapamycin</i>
p21	Do inglês <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
pUC18	Do inglês <i>Plasmid DNA</i>
PI3K	Do inglês Phosphoinositide 3-Kinase
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
Redox	Equilíbrio oxidação-redução
RIPK1	Do inglês <i>Receptor-interacting protein 1</i>
RIPK3	Do inglês <i>Receptor-interacting protein 3</i>
ROS	Espécies reativas de oxigénio do inglês <i>Reactive oxygen species</i>
RPMI	Do inglês <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
Smac	Do inglês <i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
TAMS	Do inglês <i>Tumor-associated macrophages</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral do inglês <i>Tumor necrosis factor</i>

TME	Microambiente tumoral do inglês <i>Tumor Microenvironment</i>
TLRs	Do inglês <i>Receptores Toll-Like</i>
TP53	Do inglês p53 <i>protein encoding gene</i>
ULK	Do inglês <i>Unc-51-like autophagy-activating kinase</i>
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	Do inglês <i>World Health Organization</i>
XIAP	Do inglês <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

DESIGNAÇÕES E ABREVIATURAS QUÍMICAS

DCF	2,7-diclorofluoresceína
DMSO	Do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DOX	Doxorrubicina
DTT	Ditiotreitol
ECL	Do inglês <i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
H2DCF-DA	Diclorofluorescina diacetato
H ₂ O ₂	Peróxido de oxigénio
JC-1	Do inglês <i>5,5,6,6-tetrachloro-1,1,3,3 tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide</i>
LB	Do inglês <i>Luria–Bertani liquid medium</i>
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]
NaN ₃	Azida de sódio
PBS	Tampão de fosfato salino do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PMSF	Do inglês Phenylmethylsulfonyl fluoride
TAE	Tampão tris-acetato-EDTA
TBHP	Terc-butil-hidroperóxido
TBST	Solução de Tris-Tampão Salino com <i>Tween</i>

TEMED

Do inglês *Tetramethylethylenediamine*

SÍMBOLOS E UNIDADES

% (v/v)	Porcentagem Volume/volume
°C	Do inglês <i>Celsius degrees</i>
ng	nanograma (10^{-9} g)
mL; μ L	mililitro (10^{-3} L); microlitro (10^{-6} L)
mM, μ M	milimolar (10^{-3} M), micromolar (10^{-6} M)
V	Do inglês <i>Volts</i>
$\Delta \Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial
IC ₅₀	Do inglês <i>Half Maximal Inhibitory Concentration</i>
h; min; seg	horas; minutos; segundos
mA	miliAmperes
xg	Força centrífuga relativa

INTRODUÇÃO

1.1 Definição de Cancro

O cancro é um conjunto de doenças multifatoriais que envolvem complexas modificações no genoma das células, podendo manifestar-se em qualquer tecido do corpo. Estas doenças caracterizam-se pela desregulação dos processos de divisão (ver secção 1.3), proliferação celular e morte celular (ver secções 1.4 e 1.5), resultando num crescimento excessivo inicialmente reversível, mas que, devido à acumulação sucessiva de alterações genéticas e/ou epigenéticas, culmina numa elevada instabilidade genética levando ao desenvolvimento de neoplasias malignas (Abbas & Rehman, 2018)(Adjiri, 2016).

1.2 Incidência, Distribuição e Mortalidade

O cancro representa a segunda causa mais comum de morte e constitui um desafio para o aumento da expectativa de vida em todo o mundo. No ano de 2020, estimaram-se 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes por cancro em todo o mundo de acordo com a Organização Mundial de Saúde (Hossain et al., 2022)(Ferlay et al., 2021).

Em 2020, os cancros mais prevalentes foram o cancro de mama, pulmão, cólon, reto e próstata. Para ambos os sexos, a maioria das mortes por cancro ocorreu na Ásia com uma estimativa de 58,3%, onde residem cerca de 59,5% da população global (Sung et al., 2021). Apesar de representar 9,7% da população mundial, a Europa é responsável por cerca de 22,8% dos casos totais e por 19,6% das mortes por esta doença.

Os demais casos ocorrem na América do Sul e do Norte cuja incidência corresponde a 20,9% e 14,2% da mortalidade mundial (Sung et al., 2021). Em termos de diagnóstico, o cancro da mama é o mais comumente diagnosticado, representando aproximadamente 11,7% dos casos, seguido pelo cancro de pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), próstata (7,3%) e estômago (5,6%) (Sung et al., 2021).

A maior causa de morte por cancro, é o cancro de pulmão responsável por 18,0% de todas as mortes seguido do colorretal (9,4%), fígado (8,3%), estômago (7,7%) e cancro de mama feminino (6,9%). Apesar de uma variação regional significativa, a taxa de incidência de todas as neoplasias combinadas foi superior em homens em relação a mulheres em 2020 (Sung et al., 2021).

Segundo a WHO (do inglês *World Health Organization*), em Portugal no ano de 2020, para ambos os sexos foram registados novos casos de cancro. O mais prevalente com 17,4% dos casos foi o cancro colorretal, seguido o cancro da mama com 11,6 % e cancro do pulmão com 9%. Analisando a incidência específica por género, em homens a maior ocorrência foi de cancro da próstata, representando 20% dos casos, seguido do cancro colorretal com 19%. Já em mulheres, o cancro da mama foi o mais comum com 26,4% seguido do cancro colorretal com 15,3%. Em Portugal, em termos de mortalidade o cancro do pulmão lidera como principal causa seguido do cancro colorretal (Globocan, 2021).

Estes dados são relevantes para compreender a necessidade de novas estratégias de prevenção, diagnóstico precoce e de tratamento, com o objetivo de reduzir o impacto destas doenças nas populações.

1.2.1 Carcinoma colorretal e de ovário

O cancro do colorretal é o terceiro cancro mais frequente no mundo em homens e o segundo mais comum em mulheres (Sung et al., 2021). Atualmente ocupa o segundo lugar em termos de mortalidade da população. As estatísticas são consequência de diagnósticos tardios em estadios clínicos avançados (Sung et al., 2021). Em 2020, foram diagnosticados mais de 1,9 milhões de novos casos de cancro com um registo de 935 000 mortes relacionadas à doença.

O número de casos de cancro do colorretal apresenta uma incidência aproximadamente quatro vezes maior em países desenvolvidos em comparação com países em desenvolvimento, contudo ocorre maior mortalidade em países em desenvolvimento (Rawla et al., 2019). Em países desenvolvidos, a incidência do cancro colorretal tende a aumentar

normalmente com o índice de desenvolvimento humano e por isso é considerado um marcador de desenvolvimento socioeconómico (Keum & Giovannucci, 2019). O padrão de alimentação ocidental, estilo de vida sedentário e o aumento da obesidade estão entre os fatores de risco que aumentam com o índice de industrialização do país e com o crescimento económico (Keum & Giovannucci, 2019). Assim, ao evitar tais fatores é possível diminuir os casos de cancro colorretal até 40% (Sung et al., 2021).

O cancro colorretal pode ser prevenido através de uma triagem em massa através de serviços de diagnósticos e de tratamento. Os principais métodos de diagnóstico são a colonoscopia e testes imunoquímicos fecais (Keum & Giovannucci, 2019). Através de sintomas específicos gastrointestinais pode-se suspeitar da doença. O encaminhamento para um diagnóstico está relacionado com o aparecimento de sangramentos retais, hábitos intestinais irregulares, a presença de uma massa e dor abdominal, perda de peso sem explicação e anemia por deficiência de ferro (Sawicki et al., 2021).

O cancro do ovário é uma doença grave e devastadora ocupando o lugar de maior causa de morte no mundo entre as neoplasias ginecológicas, com o pico de incidência em mulheres com idades entre os 55-64 anos. É considerada a quinta causa de morte mais frequente em mulheres com a estimativa de cerca de 295 000 mulheres diagnosticadas a cada ano (Croft et al., 2021; Debela et al., 2021).

A taxa de sobrevida dos doentes num estadio inicial é de 90%, cerca de 75% em casos de difusão regional e de 29% em casos de metástase (Debela et al., 2021) O cancro do ovário é responsável por 5% das mortes relacionadas com cancro em mulheres, uma vez que o diagnóstico só é possível em estados avançados da doença, que normalmente estão associados a um mau prognóstico e elevadas taxas de mortalidade (Mogos et al., 2022).

Vários são os fatores de risco associados: mulheres em pós-menopausa, aumento da idade, estadio avançado da doença e menores taxas de sobrevida. Este tipo de cancro apresenta vários sintomas, entre eles dor pélvica e abdominal, aumento do inchaço abdominal e dificuldade na alimentação (Dilley et al., 2020).

1.3 Regulação do Ciclo Celular

Tal como descrito acima, o desenvolvimento de cancro pressupõe a desregulação de processos intrínsecos na célula, como a divisão e proliferação celular. O controlo do ciclo celular é um processo estritamente regulado e organizado de modo a assegurar a correta duplicação do DNA (replicação), segregação dos cromossomas homólogos para lados opostos na célula e a divisão de uma célula em duas células filhas (citócinese) (Otto & Sicinski, 2017). Todos estes processos são complexos e por isso altamente controlados por várias proteínas essenciais, em pontos chave do processo, permitindo que quaisquer alterações sejam detetadas a tempo (Vermeulen et al., 2003).

O ciclo celular depende de quatro fases claramente definidas: a fase G1, S, G2 e M. Na fase G1 (Fase 1), ocorre o aumento do tamanho da célula e inicia-se a transcrição de genes, que são traduzidos em proteínas reguladoras do ciclo celular, as ciclinas. Na fase S, também conhecida como fase de síntese, ocorre a replicação de todo o genoma da célula (Tan et al., 2017). Na fase G2 (fase 2), a célula prepara-se para a divisão celular e são verificados erros de tamanho e de duplicação do DNA. A fase M inclui a mitose e a citocinese, desintegração da membrana nuclear, condensação de cromatina e segregação do DNA ($4n$) em duas células filhas diploides ($2n$). A mitose é ainda dividida em cinco subfases: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase (Wang, 2021).

Cada fase depende da conclusão adequada da fase anterior caso contrário as células podem ficar retidas na fase G0 temporariamente ou de forma permanente (Coller, 2020) (Wang, 2021).

O ciclo celular progride sob a regulação de duas classes de proteínas, nomeadamente as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas (CDK em inglês: cyclin-dependent kinases). As CDK pertencem à família de proteínas quinases serina/treonina que, em pontos específicos do ciclo são ativadas por sinais mitogénicos ou inibidas por inibidores de CDK (CDKI) (Barnum & O'Connell, 2014). Durante a progressão do ciclo celular, os níveis de proteínas CDK permanecem estáveis, porém podem ocorrer flutuações, em momentos apropriados, pela ativação de diferentes ciclinas (Barnum & O'Connell, 2014).

Durante o ciclo celular, existem proteínas específicas ativas em cada fase: CDK4, CDK6 e CDK2 durante a fase G1, CDK2 na fase S e CDK1 nas fases G2 e M (Figura 1.1) (Vermeulen et al., 2003). Na fase G0/G1, ocorre a fosforilação da proteína do retinoblastoma (RB, *retinoblastoma protein*) através de complexos CDK-ciclinas, formadas por ciclinas do tipo D em conjunto

com CDK4 e CDK6. A proteína do retinoblastoma estimula a libertação de fatores de transcrição, como E2F e ativam a transcrição dos genes responsáveis pela produção das ciclinas do tipo A e E. A transição da fase G1 para a fase S é facilitada pela ciclina E, que se associa com CDK2 e completam a fosforilação de Rb (Wang, 2021).

Durante a fase S, os níveis de ciclina A aumentam e formam um complexo com CDK2, essencial para a progressão do ciclo. No final da fase G2, o complexo ciclina A-CDK1 inicia a fase M (Vermeulen et al., 2003). Nesta fase última fase, os complexos CDK1/ciclina B conduzem à conclusão da mitose (Figura 1.1) (Wang, 2021).

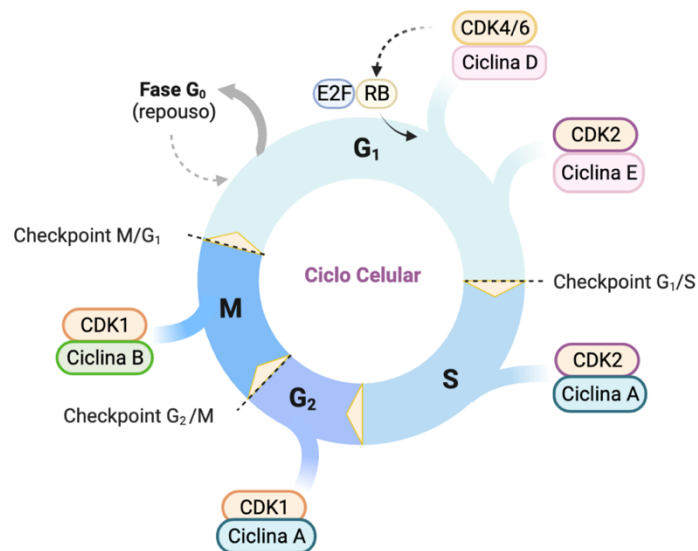


Figura 1.1- Representação da regulação do ciclo celular. Identificação dos checkpoints e componentes envolvidos na regulação, CDK e ciclinas. Adaptado de (Vermeulen et al., 2003). Criado através do Biorender.

De modo a prevenir quaisquer erros que possam ocorrer, o ciclo celular é altamente controlado por *checkpoints* durante as mudanças de fase (Tan et al., 2017). São três os pontos de controlo do ciclo celular: G1/S, G2/M e M/G1 (Figura 1.1). Em resposta a danos no DNA, existem proteínas que detetam e sinalizam esses danos de forma a interromper ciclo (Visconti et al., 2016).

Checkpoint G1/S: quando ocorrem quebras na cadeia dupla de DNA, em G₁, é acionada a quinase *ataxia telangiectasia mutated* (ATM) que sinaliza a presença de danos para proteínas reguladoras do ciclo. A ATM fosforila a quinase do *checkpoint 2* (Chk2) que ativa a sua função de verificação e desta forma, as células são impedidas de prosseguir para a fase S.

Este *checkpoint* é ainda dependente da proteína supressora tumoral codificada pelo gene *TP53*, a p53 que é fosforilada pela ATM. Quando a p53 é ativada e estabilizada induz a expressão de várias proteínas, incluindo p21. A p21 é uma proteína inibidora dos complexos ciclina A/CDK2 e ciclina E/CDK2 que impede que o ciclo progrida para a fase S (Visconti et al., 2016).

Checkpoint G2: os danos provenientes da fase S podem ser de vários tipos entre eles a estagnação das forquilhas de replicação, excisão/reparo de nucleótidos ou quebras na dupla cadeia de DNA. O dano é normalmente detetado pela proteína *Ataxia Telangiectasia and Rad3-related* (ATR) que mobiliza o *checkpoint* G2/M impedindo que as células entrem em mitose (Visconti et al., 2016). Este bloqueio é fundamental para garantir que danos no DNA não sejam transmitidos para as células filhas formadas na mitose. As células que entram forçosamente em mitose podem sofrer interrupção do crescimento ou catástrofe mitótica.

As células cancerígenas muitas vezes possuem *checkpoints* defeituosos, maioritariamente devido a mutações no *TP53* e/ou em vias de reparo de danos no DNA, que leva a que a divisão celular progrida sem controlo. No entanto é possível interromper o ciclo celular e evitar a morte por danos se os restantes *checkpoints* funcionarem corretamente (Visconti et al., 2016).

1.4 Carcinogénese

A carcinogénese é assim, um processo complexo em que células saudáveis se transformam em células tumorais hiperproliferativas por perda do controlo do ciclo celular, incapacidade de reparar danos no DNA e acumulação sucessiva de mutações que originam uma instabilidade genética exacerbada (Smith et al., 2020).

Conforme Hanahan e Weinberg, o desenvolvimento tumoral engloba várias características específicas (*Hallmarks*) que são inerentes às células tumorais (Figura 1.2) (Hanahan & Weinberg, 2011; Welch & Hurst, 2019). Entre elas encontram-se a resistência aos inibidores de crescimento, autonomia, a resistência à morte, alterações no metabolismo, imortalidade, capacidade de produzir angiogénese sustentada e inflamação/invasão (Abbas & Rehman, 2018)(Welch & Hurst, 2019) (Figura 1.2). A sobrevivência das primeiras células com características tumorigénicas deve-se em parte a falhas nos mecanismos de reparação e de indução de apoptose ou falhas na indução de senescência (Adjiri, 2016).

Nos estadios mais avançados da doença as células passam por processos de invasão local e de metastização para outras localizações/tecidos ou órgãos (Adjiri, 2016).

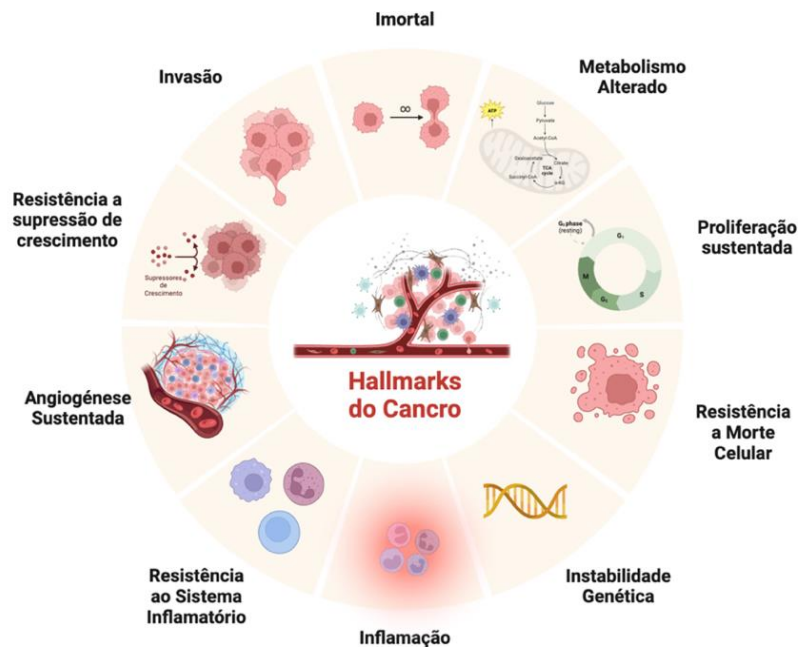


Figura 1.2 -Representação de características específicas inerentes no desenvolvimento de cancro criadas por Hanahan e Weinberg. Adaptado de (Hanahan & Weinberg, 2011) Criado com Biorender.

A carcinogénese pode ser subdividida em quatro fases fundamentais:

Iniciação do tumor:

A iniciação tumoral envolve alterações celulares espontâneas ou iniciadas maioritariamente devido à ação de um agente carcinogénico endógeno ou exógeno que normalmente, causa danos genéticos irreversíveis em células proliferativas que adquirem características que lhes permite sobreviver ao longo do tempo (Choudhuri et al., 2018; M. Yang & Park, 2012). Assim, os tumores desenvolvem-se através da aquisição de alterações ou mutações epigenéticas em genes que controlam a divisão celular. Estes são considerados eventos iniciadores tumorais pois comprometem o normal funcionamento do ciclo celular (Choudhuri et al., 2018).

Promoção do tumor:

A promoção tumoral compreende a expansão clonal de células iniciadas produzindo uma população de células com maior propensão a novas alterações genéticas. Isso afeta genes

envolvidos em importantes vias de sinalização de proliferação, resultando num crescimento descontrolado. A taxa de acumulação de mutações é proporcional à taxa de divisão celular (Choudhuri et al., 2018).

Conversão maligna:

A conversão maligna é o processo pelo qual uma célula pré-neoplásica se transforma numa célula com fenótipo maligno através de um processo que requer alterações genéticas adicionais, suficientes para conferir autonomia (ex. reparação do DNA, etc). Conforme o número de mutações somáticas aumenta, a probabilidade de formação do tumor aumenta igualmente (Hyndman, 2016).

Progressão do tumor/ metástase:

A progressão tumoral é um processo gradual em que o fenótipo maligno é expresso e as células tendem a adquirir características cada vez mais agressivas e invasivas ao longo do tempo. Isso inclui a ativação da angiogénese e a invasão de tecidos adjacentes (Choudhuri et al. 2018). A capacidade das células disseminarem para novos locais ocorre através de uma série de regulações positivas de proteases, que degradam a lâmina basal, possibilitando a invasão para os vasos sanguíneos e linfáticos (Hyndman, 2016).

1.4.1 Oncogenes e Genes Supressores

Existem três tipos de genes importantes cuja regulação é alterada em contexto de desenvolvimento tumoral: genes de reparo de DNA, proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Em condições normais, estes genes permitem a proteção das células evitando a fixação de mutações no DNA mas, quando desregulados, podem levar ao desenvolvimento de cancro (Vogelstein & Kinzler, 2004).

A ativação de oncogenes (geralmente associado à presença de mutações ativadoras em proto-oncogenes) tem um papel relevante no desenvolvimento tumoral uma vez que ativam vias de sinalização muitas delas associadas à progressão do ciclo celular e proliferação (Asimgil et al., 2022).

O gene *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (KRAS)* é um dos oncogenes mais frequentemente mutado em múltiplos tipos de cancro, bem como no cancro colorretal (Asimgil et al., 2022). O gene codifica a proteína de ligação GTP/guanosina difosfato (GDP), que pertence à família RAS da guanosina trifosfatase (GTPase). A proteína KRAS atua alterando o seu estado inativo ligado a GDP ou um estado ativo ligado a GTP (Zhu et al., 2021). Quando ocorrem mutações no local de ligação do GTP gera resistência à hidrólise de GTP pelas proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) resultando em *KRAS* constitutivamente ativo. As mutações no gene *KRAS* podem impulsionar o crescimento celular descontrolado, bem como a transição epitelial-mesenquimatosa, o que o torna um alvo de interesse para investigações como potencial aplicação terapêutica (Asimgil et al., 2022).

Os genes supressores de tumor são genes que desempenham um papel crucial na regulação do crescimento/progressão do ciclo celular. As mutações que causem a perda da função destes genes foram detetadas em vários tipos de cancro, incluindo o cancro do pulmão, colorretal, ovário, entre outros (Joyce et al., 2022). Estes genes são normalmente recessivos em tumores, o que significa que ambos os alelos se encontram inativos, resultando na perda total da função do gene. O gene supressor *TP53*, também conhecido como "Guardião do genoma", codifica para a proteína 53 (p53) que controla eventos celulares como senescência, expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, mecanismos de reparo de danos no DNA e despoleta quando necessário, o mecanismo de morte celular programada (Feroz & Sheikh, 2020; Goh et al., 2011). Em caso de dano não reparável, a p53 irá ativar proteínas pró-apoptóticas desencadeando a apoptose (Weston, 2003). Na maioria dos cancros observa-se uma mutação bialélica com perda de função do gene *TP53* (Joyce et al., 2022).

1.4.2 Microambiente tumoral e Metástase

Os tumores desenvolvem-se num microambiente complexo relativamente dinâmico e organizado que influencia o crescimento, a invasão e metástase de células cancerígenas (Arneth, 2020).

1.4.2.1 Microambiente do tumor

O microambiente tumoral (em inglês *Tumor microenvironment*- TME) é constituído por células tumorais, fibroblastos, imunes, endoteliais, matriz extracelular, e moléculas de sinalização (Arneth, 2020). As células tumorais e o TME estão em constante comunicação através de

interações célula-célula e via moléculas mediadoras dessas interações (moléculas, vesículas extracelulares, entre outros fatores). Essas interações são responsáveis pela transferência horizontal de informação genética entre os diferentes componentes (Baghban et al., 2020). Além disso, o TME desempenha um papel essencial na sobrevivência das células tumorais em todos os estádios da carcinogénese (Arneth, 2020).

O TME é altamente variável e depende das características do tumor, da localização e o estadio de progressão. Este ambiente complexo também desempenha um papel central na regulação de fenómenos de resistência a fármacos, progressão do tumor e o prognóstico do doente (Anderson & Simon, 2020; Arneth, 2020). Para além disso, favorece a heterogeneidade intratumoral e intertumoral.

As células endoteliais estão envolvidas não apenas na fase inicial da evolução do tumor, promovendo a oxigenação do tecido tumoral e fornecimento de nutrientes (Fares et al., 2020), mas também têm um papel preponderante à medida que o tumor aumenta de tamanho. Estas células auxiliam o tumor a superar as condições hóstis no seu centro, como a deficiência de nutrientes e a hipóxia, promovendo a formação de vasos por meio da excreção de fatores de crescimento endotelial vascular A (VEGFA) (Arneth, 2020).

As células imunes têm diversas funções no TME, nomeadamente os macrófagos associados ao tumor (em inglês Tumor-Associated Macrophages- *TAMs*) que apresentam a capacidade de suprimir resposta imunológica anti-tumoral e cuja presença tem sido diretamente relacionada com um prognóstico desfavorável (Arneth, 2020).

A matriz extracelular (MEC) é uma estrutura semelhante a um hidrogel que compreende uma vasta rede de macromoléculas, tais como proteínas, enzimas, glicoproteínas e colagénio, entre outras, com uma influência bastante importante no desenvolvimento e progressão de tumores. Adicionalmente, contém componentes teciduais ativos que interferem com a adesão, proliferação celular e comunicação célula-célula através de integrinas (Arneth, 2020).

Os fibroblastos associados ao cancro (conhecidos em inglês como *Cancer associated fibroblasts - CAFs*) são parte integrante do estroma do TME com um papel crucial na progressão do tumor, migração celular e imunossupressão (Bauleth-Ramos et al., 2020).

A plasticidade fenotípica das células cancerígenas permite que estas se adaptem a microambientes diversos, modelando a composição estromal de modo a irem adquirindo vantagens competitivas promovendo assim um ambiente propício à metastização (Fares et al., 2020; Ganesh & Massagué, 2021).

1.4.2.1 Metástase

A metástase é o termo usado para o desenvolvimento de tumores secundários distantes do primeiro local de origem. Ocorre quando as células tumorais deixam o local primário onde o tumor se originou, circulam através da corrente sanguínea ou do sistema linfático, fixando-se num novo local e conseguindo escapar de novo ao sistema imunológico. O processo de metástase está dividido em várias etapas: invasão e migração, intravazamento, disseminação e transporte (Figura 1.3) (Welch & Hurst, 2019).

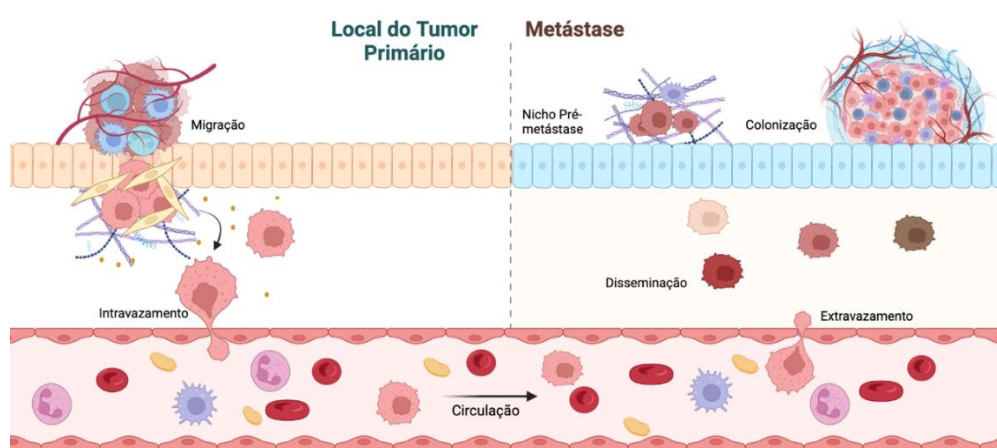


Figura 1.3- Representação do processo de metástase. O tumor primário invade e migra através do epitélio do tumor. O intravazamento através de vasos linfáticos ou sanguíneos permite o início do processo de metástase. As células tumorais disseminam-se para outras partes do corpo e colonizam. Adaptado de (Ruiz-Espigares et al., 2021). Criado através do Biorender.

A transição epitelial-mesenquimal (do inglês Epithelial-mesenchymal transition- EMT) está a ser explorada como papel fundamental no processo de metastização. As células capazes de invadir metastaticamente geralmente precisam passar por várias etapas de reprogramação, assim como de adaptação metabólica e sobrevivência (Fares et al., 2020).

Ao contrário dos tumores primários, que podem ser tratados por cirurgia local ou radioterapia, um tumor metastático passa a ser tratado como uma doença sistémica (Ganesh & Massagué, 2021). Além de estar diretamente correlacionada com a malignidade do cancro e a falha de tratamento, a metástase é a principal causa de mortalidade em mais de 90% dos doentes (Fares et al., 2020).

A compreensão das interações do microambiente tumoral ajuda a implementação de normas terapêuticas que visam a interrupção das interações das células tumorais com outros componentes.

1.5 Mecanismos de morte celular

O processo de morte celular é essencial que mantém a homeostase e o equilíbrio dos organismos multicelulares. No cancro frequentemente ocorrem alterações na indução/regulação da morte celular. De modo a desenvolver tratamentos contra o cancro é essencial entender os vários mecanismos despoletados que levam à perda de viabilidade celular pela indução de morte celular (D'Arcy, 2019).

1.5.1 Apoptose

Apoptose é uma das formas de morte celular considerada como programada (tipo I) que se manifesta por alterações morfológicas da membrana celular, retraimento das células, formação de corpos apoptóticos, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e lise da membrana nuclear (Nirmala & Lopus, 2020). Este mecanismo de morte normalmente é um alvo da terapêutica anticancerígena (Baskar et al., 2012).

A apoptose é despoletada por três diferentes vias: via intrínseca, via extrínseca e stress do retículo endoplasmático (via induzida) e distingue-se dos restantes mecanismos de morte pela ausência de dano sistémico e de inflamação. A ausência de inflamação deve-se essencialmente à libertação de nucleótidos de adenosina 5'-trifosfato (ATP) e uridina-5'-trifosfato (UTP) que servem como sinalizadores para os macrófagos que têm um papel fundamental na supressão da inflamação (Figura 1.4) (Nirmala & Lopus, 2020).

Via extrínseca: Conhecida como via dos recetores de morte desencadeada por estímulos externos (Cooper, 2018). O processo de apoptose extrínseca é iniciado pela ligação de ligantes extracelulares, como o fator de necrose tumoral (TNF) e o ligante Fas (Fas-L) aos recetores de morte transmembranares, fator de necrose 1 tumoral (TNFR1) e o recetor Fas (FasR), respetivamente (Nirmala & Lopus, 2020). A ativação destes recetores, leva ao recrutamento de outras proteínas adaptadoras e procaspases iniciadoras (pro-caspase-8 e procaspase-10) com domínios de morte e com locais de ligação para diferentes caspases (Nirmala & Lopus, 2020).

A procaspase-8 é recrutada e ativa o complexo de sinalização indutor de morte (DISC), resultando na ativação de caspases iniciadoras, geralmente a caspase-8 ou a caspase-10. As caspases iniciadoras ativam procaspases executoras (procaspase-3, procaspase-6 e procaspase-7) desencadeando a apoptose (Figura 1.4) (Nirmala & Lopus, 2020).

Via intrínseca é medida através do stress celular e mediada por mitocôndrias.

Esta via desencadeia a permeabilização da membrana mitocondrial (do inglês MOMP com o auxílio de proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2 que inclui *Bcl-2 associated X protein* (Bax)/*Bcl-2 homologous antagonist/killer* (BaK) com a capacidade de criar poros na membrana mitocondrial (Cavalcante et al., 2019). Esse processo, por sua vez, desencadeia a liberação do citocromo C que se associa ao fator de ativação da protease apoptótica 1 (APAF-1) e procaspase 9 formando o apoptossoma (Bedoui et al., 2020). No apoptossoma, a procaspase 9 é ativada em caspase 9 que ativa outras caspases a jusante (caspases 3 e 7) (Figura 1.4) (Bedoui et al., 2020). As mitocôndrias ainda libertam outras proteínas pró-apoptóticas, entre elas o fator indutor de apoptose (AIF) que se transloca para o núcleo e facilita a fragmentação do DNA e condensação da cromatina. Além disso, a endonuclease G e a *Second mitochondria-derived activator of caspase* (SMAC) inibem as proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) impedindo a inibição da caspase 9. Para além das proteínas mencionadas, a proteína Bim quando é ativada mantém a proteína anti-apoptótica *B-cell lymphoma-2* (BCL-2) inativa (Figura 1.4) (Nirmala & Lopus, 2020).

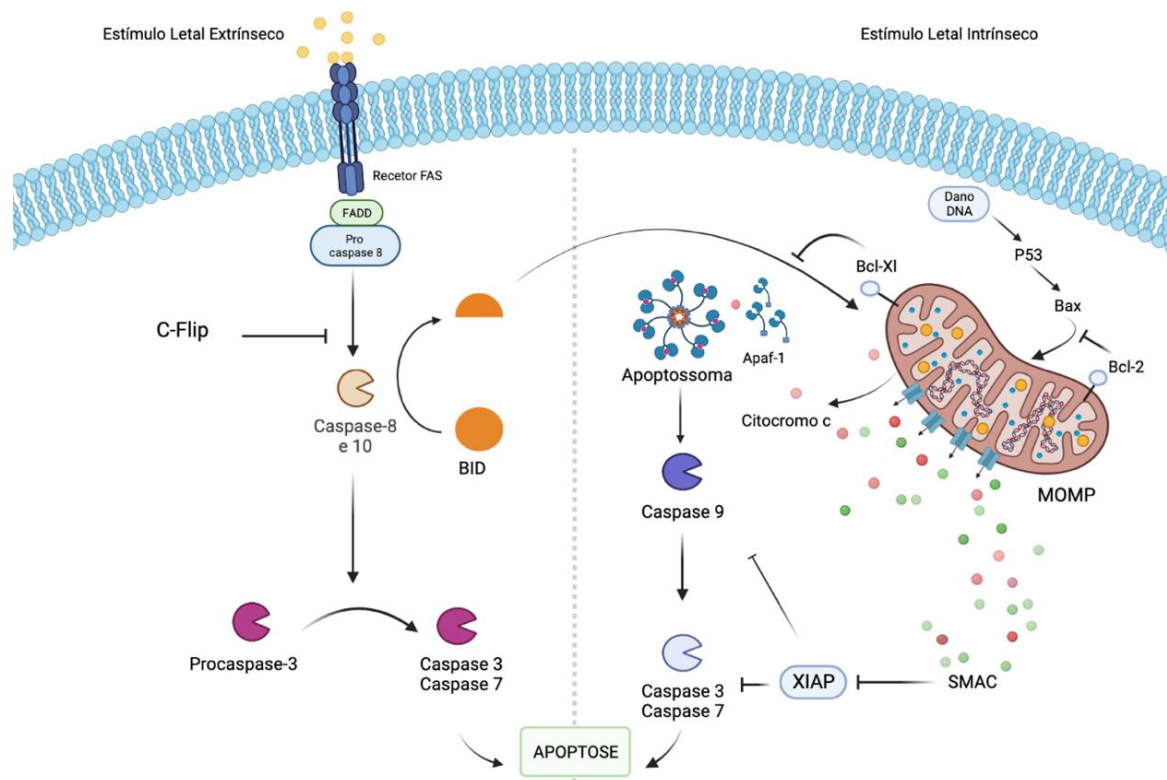


Figura 1.4- Mecanismos de morte celular através de apoptose. Duas vias estão representadas: via extrínseca (na direita) e via intrínseca (na esquerda). A via intrínseca é despoletada por estímulos internos (exemplos: Bax, BCL-2 que permitem a libertação do citocromo c e subsequente ativação das caspases. A via extrínseca é dependente de estímulos externos despoletada por recetores de morte e os seus ligantes com consequente ativação de caspases. Abreviações: Bcl-2-associated X protein (Bax); B-cell lymphoma-2 (BCL-2); mitochondrial outer membrane permeabilization (MOMP); Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1); Second mitochondria-derived activator of caspase (SMAC); X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP); BH3 Interacting Domain Death Agonist (BID); Fas Associated Via Death Domain (FADD); cellular FLICE-inhibitory protein (C-Flip); B-cell lymphoma-extra large (BCL-xl); tumor protein p53. Adaptado de (Cavalcante et al., 2019). Criado através do Biorender.

1.5.2 Autofagia

Autofagia é uma forma de morte celular programada que está intimamente ligada ao retículo endoplasmático. Neste processo, os componentes celulares sejam eles de origem endógena ou exógena, são degradados pela ação dos lisossomas, que reciclam componentes celulares danificados ou envelhecidos (Yun & Lee, 2018).

Existem 3 tipos principais de autofagia: macroautofagia (referida como autofagia), microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (Denton & Kumar, 2019). A microautofagia distingue-se das restantes pelo mecanismo de transferência dos componentes celulares através de invaginações membranares diretamente para o lisossoma. A autofagia mediada por

chaperonas envolve uma transferência seletiva de proteínas através da membrana do lisossoma mediado por chaperonas (Denton & Kumar, 2019).

A autofagia é ativada em resposta a patologias, flutuações nos níveis de nutrientes e condições de stress como hipóxia, stress oxidativo ou agregação anormal de proteínas (Denton & Kumar, 2019). É um processo complexo que abrange diversas etapas distintas de iniciação, nucleação, alongamento e maturação, fusão, degradação e reciclagem do conteúdo do autofagolisossoma (Dikic & Elazar, 2018).

A macroautofagia tem início com a formação de estruturas de dupla membrana denominados de autofagossomas, que degradam componentes celulares como proteínas com tempo de semi-vida longo, agregados de proteínas e organelos em excesso ou danificados.

O processo de autofagia é particularmente conservado e regulado por genes relacionados com a autofagia (ATGs) (Denton & Kumar, 2019). A ativação ocorre através da combinação de cinases, entre elas, proteína cinase ativada por AMP 5' (do inglês *5' AMP-activated protein kinase* -AMPK) e o alvo mecanístico da rapamicina (mTOR), que são os principais reguladores positivos e negativos da autofagia, respetivamente (Yun & Lee, 2018). Em condições de stress, mTOR é inativado e permite a expressão de proteínas codificadas por genes ATG que ativam o processo de autofagia (Figura 1.5) (Yonekawa & Thorburn, 2013).

O início da autofagia é mediado pela ativação de complexos de proteínas *Unc-51-like autophagy-activating kinase* (ULK), capazes de transduzir sinais que induzem o recrutamento de outras proteínas necessárias à formação do autofagossoma (Denton & Kumar, 2019). Este complexo desencadeia a fosforilação de componentes do complexo fosfatidilinositol 3- cinase de classe III (PI3KC3) essencial para a iniciação e maturação do autofagossoma (Figura 1.5).

Os autofagossomas fundem-se com endossomas e lisossomas e formam os autofagolisossomas (Lim et al., 2021). Através do efluxo de prótons, enzimas hidrolíticas e lípases, os autofagolisossomas libertam corpos autofágicos capazes de sofrer acidificação, permitindo a degradação do seu conteúdo. Este processo de reciclagem permite a biossíntese de novos componentes biológicos essenciais durante as condições de stress mantendo a sobrevivência celular e homeostase (Dikic & Elazar, 2018).

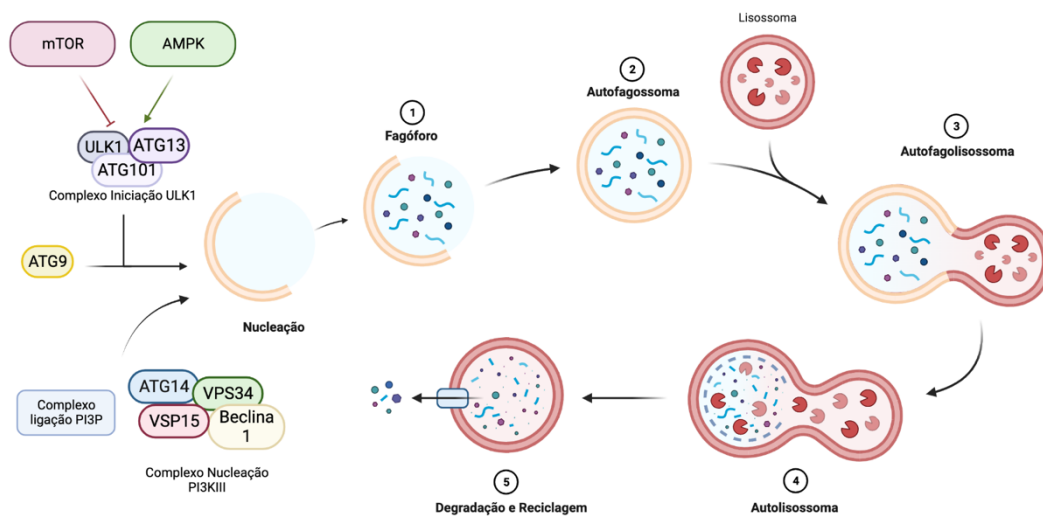


Figura 1.5- Mecanismo de autofagia. A ativação da via deve-se a condições de stress que despoletam a formação de um autofagolisossoma que a partir da ação de enzimas degrada o conteúdo citosólico para reciclagem de componentes. Adaptado de (Hansen et al., 2018). Abreviações: mammalian target of rapamycin (mTOR); 5' AMP-activated protein kinase (AMPK); Unc-51-like kinase 1 (ULK1); Autophagy Related (ATG); Vacuolar protein sorting (VSP). Criado através do Biorender.

1.5.3 Necrose

A necrose é outro tipo de morte celular alternativa, porém descontrolada e inflamatória que é induzida por lesão externa (inclui hipóxia ou inflamação). É um tipo de morte caracterizado pela rutura da integridade da membrana celular com subsequente perda dos componentes celulares para o espaço extracelular (Nirmala & Lopus, 2020). Ao contrário da apoptose, a necrose é uma morte independente de energia caracterizada por danos severos (D'Arcy, 2019). O mecanismo de necrose pode ser desencadeado por níveis intracelulares elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS), inibição de caspases e níveis baixos de ATP (D'Arcy, 2019).

A necroptose descoberta recentemente é uma forma de morte necrótica, mas regulada, que surgiu como mecanismo de proteção contra o desenvolvimento tumoral, quando os mecanismos de morte como a apoptose estão comprometidos (Choi et al., 2019).

Durante a necroptose e quando a caspase 8 se encontra inativa, os *receptor-interacting protein 1* (RIPK1) e *receptor-interacting protein 3* (RIPK3) interagem entre si, resultando na formação de um complexo heterodímero funcional o necrossoma. Este complexo promove a oligomerização do *mixed lineage kinase domain-like* (MLKL) fosforilando-o (Bedoui et al., 2020). A forma oligomérica de MLKL transloca-se para a membrana plasmática, resultando na formação de um poro que induz a resposta inflamatória (Dhuriya & Sharma, 2018).

A rutura da membrana plasmática de células necroptóticas extravasa o conteúdo celular como padrões moleculares associados a dano (do inglês DAMPs)(Bedoui et al., 2020) reconhecidos por recetores semelhantes a Toll (TLRs) que despoletam respostas inflamatórias mais robustas (Gong et al., 2019).

1.6 Fatores de Risco

Nos últimos anos, a nossa compreensão das causas do desenvolvimento tumoral deu lugar à criação de novas metodologias que visam a prevenção, a deteção precoce e tratamento o mais personalizado possível (Wu et al., 2018). De forma a reduzir o risco de incidência e de mortalidade as estratégias que se devem adotar passam por prevenções primárias e estratégias secundárias de triagem (Rawla et al., 2019). São vários os riscos que causam o aparecimento de uma neoplasia maligna.

Os riscos intrínsecos não modificáveis estão relacionados principalmente com características genéticas como, mutações espontâneas a partir de erros aleatórios na replicação do DNA.

Os riscos não intrínsecos compreendem fatores (Wu et al., 2018):

- Externos/exógenos modificáveis como: físicos (radiação ionizante, radiação ultravioleta, exposição a campos eletromagnéticos); químicos (tabaco, álcool e radiação ionizante) e biológicos (infeções virais (Hepatite B e C), bacterianos (*Helicobacter pylori*) e fúngicas;
- Estilo de vida (tabagismo, álcool, sedentarismo, atividade física e terapia hormonal);
- Fatores endógenos do hospedeiro (metabolismo, resposta a danos no DNA, níveis de hormonas).

1.6.1 Risco do Cancro Colorretal

O risco de desenvolvimento do cancro colorretal é influenciado pelo microbioma intestinal, género, idade e *status* socioeconómico. Uma história familiar positiva de cancro pode definir um risco duas vezes maior (em média) quando comparado com casos sem história familiar. A obesidade também está associada ao desenvolvimento da doença uma vez que a acumulação de gorduras excessivas e alterações hormonais podem causar efeitos mitogénicos nas células.

Estes efeitos podem promover stress oxidativo e até mesmo suprimirem a resposta imune facilitando a progressão tumoral (Rawla et al., 2019; Sawicki et al., 2021).

O sedentarismo é outro fator que aumenta o risco de desenvolvimento de cancro colorretal até 50% e por isso a atividade física é fundamental para melhorar a função do sistema imunológico, redução de stress e inflamação melhorando o bem-estar do doente (Rawla et al., 2019; Sawicki et al., 2021).

O tabagismo é reconhecido como um fator de risco amplamente estabelecido para vários tipos de cancro, incluindo o cancro do colorretal. Estudos mostram que o tabagismo está associado ao aumento 2 a 3 vezes do risco em indivíduos fumadores uma vez que o tabaco é constituído por vários agentes carcinogénicos. A ingestão de álcool pode afetar as células intestinais, que interfere com a absorção de nutrientes contribuindo para o desenvolvimento do cancro colorretal (Sawicki et al., 2021).

À medida que as pessoas envelhecem, o risco de desenvolver a doença aumenta gradualmente, e a partir dos 65 anos, esse risco é três vezes maior (Hossain et al., 2022; Sawicki et al., 2021). As condições médicas pré-existentes como colite ulcerativa e doença de Crohn aumentam a suscetibilidade para o desenvolvimento deste tipo de cancro (Hossain et al., 2022).

A adoção de um estilo de vida mais saudável e a participação em programas de triagem podem diminuir os riscos de cancro colorretal e melhorar a saúde dos indivíduos.

1.6.2 Risco do Cancro do Ovário

Um dos maiores contributos para o aparecimento do cancro de ovário é o número de ciclos ovulatórios. Por este motivo pode se considerar que a supressão da ovulação através de uso de pílulas anticoncepcionais, amamentação e gravidez possam contribuir como fatores de proteção para o cancro do ovário (Budiana et al., 2019). O aumento do índice de massa corporal, terapias de reposição hormonal e gravidez tardia (idade avançada) são dos maiores contribuintes para o aparecimento da doença assim como o tabagismo. Um dos maiores riscos da doença são os fatores genéticos, responsáveis por cerca de 20% dos casos (Whelan et al., 2022).

1.7 Cancro do Colorretal- Biologia e Genética

Os cancros colorretais (CCR) são carcinomas que se desenvolvem a partir de células do cólon e reto. As células epiteliais do revestimento do colón alteram a sua morfologia através de uma série de mutações genéticas e/ou epigenéticas conferindo-lhes vantagens seletivas, como replicação e sobrevivência anormalmente aumentadas (Rawla et al., 2019). Quando se tornam hiperproliferativas, as células podem dar origem a adenomas benignos, conhecidos como pólipos. Estes pólipos são considerados a principal lesão precursora do cancro colorretal (Pandurangan et al., 2018).

Existem três tipos de pólipos colónicos: pólipos hiperplásicos, adenomatosos e malignos. Os mais comuns são pólipos adenomatosos que têm um maior potencial para se tornarem cancerígenos (adenocarcinomas), no entanto quando diagnosticados precocemente, durante a triagem, podem ser removidos (Pandurangan et al., 2018). O risco de malignidade dos pólipos é influenciado pelo local do tumor, tamanho e características histológicas (Hossain et al., 2022). Cerca de 15% destes adenomas podem ser promovidos a um estado carcinogénico num período de 10 anos (Mármol et al., 2017). (Figura 1.6)

Os cancros colorretais podem ainda ser classificados em: esporádicos, hereditários e familiares. Aproximadamente 70 % dos cancros colorretais são esporádicos, ou seja, sem que haja histórico familiar. Neste tipo de cancro, a acumulação de alterações genéticas e epigenéticas podem atingir oncogenes, genes supressores tumorais ou genes relacionados com reparação do DNA (Mármol et al., 2017).

O cancro colorretal pode evoluir através de várias vias carcinogénicas incluindo instabilidade microssatélite (do inglês MSI), instabilidade cromossómica (do inglês CIN) e fenótipo metilador das ilhas CpG (do inglês CIMP) (Mármol et al., 2017).

A via de instabilidade cromossómica é a via clássica responsável por 85% dos casos, que pode induzir a formação de tumores aneuplóidicos ou perda de heterozigotia. Esta via afeta criticamente genes envolvidos na manutenção do equilíbrio celular como os genes *Adenomatose Polyp Coli (APC)*, *KRAS*, *PI3K* (do inglês *Phosphoinositide 3-Kinase*) e *TP53* (Hossain et al., 2022).

A mutação inicial ocorre no gene supressor de tumor APC, resultando na sobreexpressão da via Wnt/ β -catenina. A β -catenina é translocada para o núcleo, estimulando a transcrição de genes tumorigénicos, desencadeando proliferação celular desregulada e a formação de pólipos benignos (Figura 1.6). A mutação *APC* é seguida por mutações em *KRAS* e no gene

supressor tumoral *Deleted in Colorectal Cancer* (DCC) que codifica para um recetor de membrana (Duman-Scheel, 2012) que ativam proliferação celular (Figura 1.6). Finalmente, a perda de função da *TP53* causa a entrada descontrolada das células no ciclo celular, levando à formação de um carcinoma (Figura 1.6) (Mármol et al., 2017)(Tariq & Ghias, 2016).

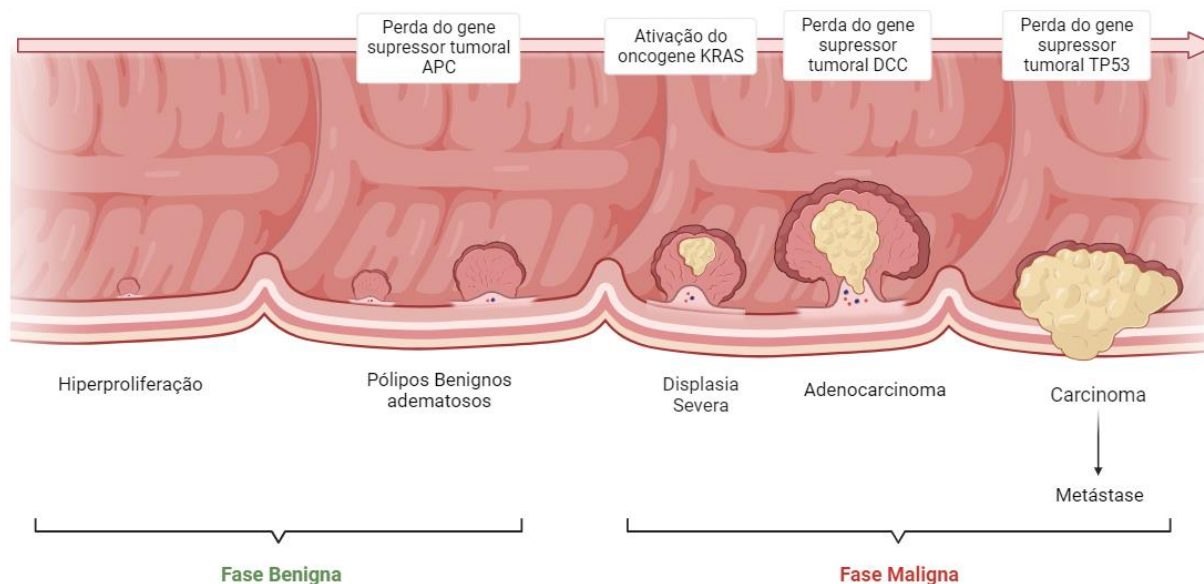


Figura 1.6- Fases do desenvolvimento de um carcinoma colorretal. Adaptado de (Hossain et al., 2022). Criado a partir do Biorender Legenda- Adenomatose Polyp Coli (APC), Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog (KRAS), Deleted in Colorectal Cancer (DCC) e Tumor Protein 53 (TP53).

No cancro colorretal verificam-se também anormalidades na linhagem germinativa afetando apenas um alelo do gene mutado, conhecidas como a síndrome de Lynch e polipose adenomatosa familiar, que representam apenas 5 % dos casos (Currais et al., 2022). Neste contexto, qualquer mutação pontual que haja no par alelo desencadeia o aparecimento tumoral.

O cancro colorretal familiar representa 25% de todos os casos, causado igualmente por mutações hereditárias, embora não sejam classificados como cancro hereditário uma vez que não se encaixam em nenhuma variante deste (Hossain et al., 2022).

As células epiteliais das vilosidades do intestino delgado e do cólon são normalmente resistentes à apoptose. As mudanças nos padrões de expressão de várias proteínas apoptóticas durante a transformação nos adenomas são importantes durante a progressão tumoral. Como a maioria dos casos do cancro estão associados a mutações no gene supressor tumoral *p53*, a transição de adenoma-carcinoma envolve a falha no mecanismo de apoptose. Por este motivo as quimioterapias que se destinam à estimulação de mecanismos de apoptose seriam fundamentais para retardar a doença (Pandurangan et al., 2018).

1.8 Cancro do Ovário- Biologia e Genética

O cancro do ovário é das neoplasias mais recorrentes em mulheres em todo o mundo. A doença tem origem nos tecidos do ovário, onde as células anormais proliferam de forma descontrolada e podem posteriormente disseminar-se para os tecidos circundantes. Os cancros ovarianos são em 90% dos casos de origem epitelial e frequentemente o doente não apresenta sintomas claros numa fase inicial (Akter et al., 2022). Os cancros de ovário podem ser geneticamente divididos em tumores do tipo I e tipo II, que se distinguem por diferentes padrões de carcinogénese, desordens genéticas, progressão, tratamento e prognóstico (Mogós et al., 2022).

O cancro do tipo I cresce lentamente na forma de tumores benignos de baixo grau, quimiorresistentes, geneticamente estáveis e com prognóstico favorável (Otsuka, 2021) (Mogós et al., 2022). Este tipo de tumor apresenta mutações genéticas em genes como *KRAS*, *V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1 (BRAF)*, *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA)*, entre outros, capazes de ativar a via oncogénica MAPK (Budiana et al., 2019).

Os carcinomas serosos de elevado (do tipo II) apresentam geralmente um prognóstico desfavorável devido à sua sensibilidade à quimioterapia e instabilidade genética, com recorrência de recívas. Estes tumores são altamente agressivos e, quando diagnosticados, geralmente já se encontram em estadios avançados (Mogós et al., 2022). Cerca de 50 a 80% dos casos de tumores do tipo II apresentam uma mutação no gene supressor tumoral *TP53* que codifica para uma proteína mutada que ganha características cada vez mais oncogénicas e aumenta a agressividade e quimiorresistência do tumor (Mogós et al., 2022). Para além disso, cerca de metade dos casos estão associados a mutações no *Breast Cancer Gene 1/2 (BRCA 1/2)* (Budiana et al., 2019).

1.9 Abordagens Terapêuticas

O cancro é uma doença complexa e desafiadora que apesar dos esforços de prevenção, muitos doentes necessitam de terapêuticas que levem a uma cura.

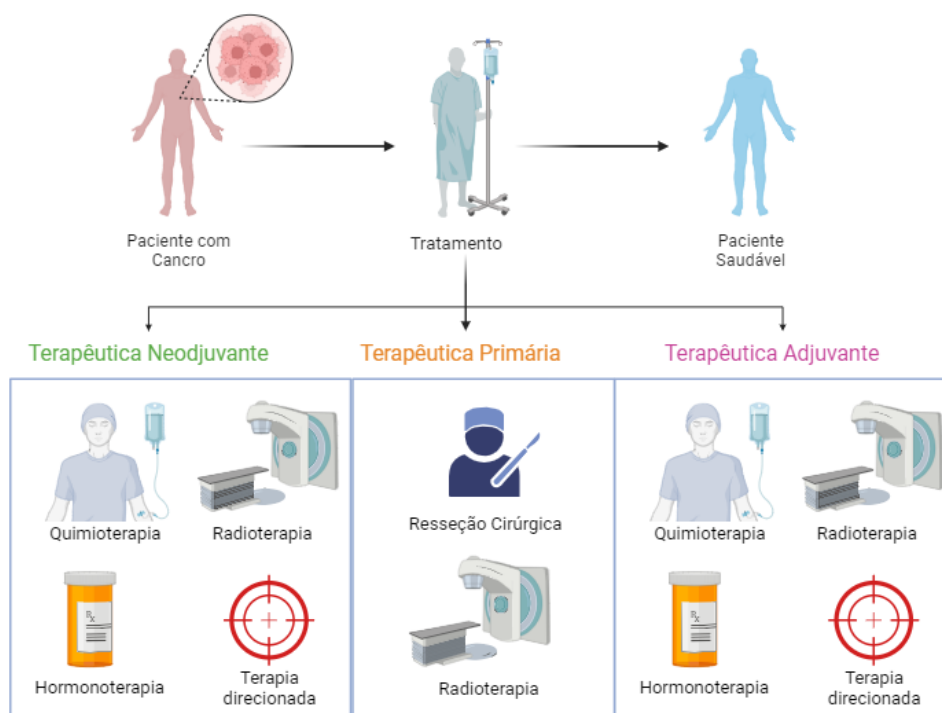


Figura 1.7- Tipos de modalidade de tratamento. Terapêutica neoadjuvante usada para reduzir o tamanho do tumor primário e eliminar as células que se espalham. Terapêutica primária implementada com o objetivo de eliminar o tumor primário. Terapêutica adjuvante tem o objetivo de eliminar as células remanescentes. Adaptado de (Caley & Jones, 2012). Criado através do Biorender.

Muitas das estratégias utilizadas atualmente não são totalmente eficazes, mesmo com o elevado número de recursos. O tratamento contra o cancro normalmente segue uma forma sequencial: terapia neoadjuvante, terapia primária e terapia adjuvante (Figura 1.7) envolvendo uma combinação de diferentes abordagens tal como cirurgia, radioterapia ou quimioterapia (Caley & Jones, 2012).

Em estadios iniciais do desenvolvimento tumoral, os doentes são submetidos à ressecção cirúrgica quando o tumor permanece localizado. Contudo, na maioria dos casos são necessários outros tratamentos, uma vez que a cirurgia pode não ser suficiente para eliminar todas as células cancerígenas, fazendo aumentar o risco de recidiva. Face a isto, uma série de modalidades terapêuticas adjuvantes são necessárias para completar a abordagem cirúrgica. Quando o tumor atinge um estádio avançado, metastático, o tratamento adotado passa por uma

abordagem sistêmica, geralmente através da corrente sanguínea que inclui terapêuticas direcionadas e quimioterapia (Bhosle & Hall, 2009) (Sak, 2012).

A radioterapia é um dos principais métodos de tratamento de cancro, pois possui a capacidade de eliminar células proliferativas tumorais assim como aquelas que lhe estão adjacentes (Adjiri, 2016). A radioterapia utiliza feixes de radiação ionizante para controlar o tumor, preservando os tecidos normais e minimizando o impacto a nível sistémico. Embora a radioterapia seja uma opção valiosa, a aquisição de radiorresistência decorrente dos ciclos pode levar à falha do tratamento (Chen & Kuo, 2017). Este tipo de tratamento falha igualmente quando o doente adquire metástases, uma vez que, dada a sua natureza localizada, deixa de ser eficaz no controlo de células distantes do local primário de tratamento (Adjiri, 2016). Para além disso, as radiações em doses subletais podem causar instabilidade genética que resulta em rearranjos cromossómicos que permitem propiciar a migração celular e a metastização (Adjiri, 2016).

Estratégias como hormoterapia são uma opção de valor para tumores dependentes de hormonas cujo objetivo é suprimir ou antagonizar a ação das hormonas que estimulam a neoplasia (Debela et al., 2021). No cancro do ovário existe a expressão frequente de recetores hormonais pelo que, este tipo de cancro pode ser sensível a este tipo de terapias. As terapias direcionadas têm o objetivo de suprimir processos específicos que estão associados à sobrevivência das células (Debela et al., 2021).

1.9.1 Quimioterapia

A quimioterapia é um dos métodos de tratamento mais eficazes e amplamente utilizado em doentes com cancro, que atua interferindo com vias bioquímicas envolvidas na replicação ou morte celular. Pode ser aplicada isoladamente ou em combinação com radioterapia. A quimioterapia tem capacidade de induzir a morte das células cancerígenas através da indução de ROS, interferência em processos metabólicos, na divisão celular e proliferação celular (H. Yang et al., 2018).

O principal alvo da quimioterapia é interrupção da maquinaria do ciclo celular especialmente após, por exemplo, ocorrerem mutações adquiridas em genes supressores tumorais ou oncogenes, que tornam as células insensíveis aos inibidores de crescimento (Bhosle & Hall, 2009). Contudo, muitos dos agentes quimioterapêuticos causam efeitos secundários em células saudáveis, especialmente em células com uma divisão/crescimento rápido.

A quimioterapia tem sido associada ao desenvolvimento de resistências ao tratamento que representa um desafio significativo no combate ao cancro. Os tumores podem adquirir resistência após início do tratamento ou podem ser intrinsecamente resistentes (Debela et al., 2021). Um fator que contribui para a resistência é a heterogeneidade do TME que apresenta condições desfavoráveis (hipóxia, baixo pH extracelular, alta pressão do fluido intersticial) e atua como uma barreira à quimioterapia uma vez que, o transporte e entrega de fármacos através do tecido tumoral é dificultado (Sak, 2012).

A quimioterapia convencional possui diversas limitações, entre elas, a dificuldade de seleção da dosagem adequada de fármaco, falta de especificidade, metabolismo rápido do fármaco ou efeitos colaterais prejudiciais (Debela et al., 2021).

São inúmeros os mecanismos de resistência à quimioterapia que promovem falhas no tratamento de vários tipos de tumores. A resistência a medicamentos pode ser causada pela redução da absorção do fármaco, uma vez que a alteração no transporte afeta a quantidade de fármaco que deveria atingir o alvo, aumento do seu efluxo através de transportadores de ABC, alterações na proteína alvo, aumento da reparação do DNA, inibição da apoptose e aumento da destoxificação (Fernando & Jones, 2015).

Durante o crescimento do tumor, as células centrais tornam-se cada vez mais hipóxicas, reduzindo o seu contacto com os vasos sanguíneos e por isso expostas a concentrações mais baixas de fármacos que induzem o aparecimento de resistências (Fernando & Jones, 2015).

Tipos de quimioterapêuticos

- Agentes alquilantes- formam ligações covalentes com moléculas de DNA e RNA. Formam adutos de DNA (Cisplatina, carboplatina, clorambucil, clofosfamida, ifosfamida)
- Anti-metabolitos- são análogos dos metabolitos naturais envolvidos na síntese de DNA e RNA. Podem substituir ou competir por uma ligação catalítica. (5-Fluorouracil, metotrexato, pemetrexed, mercaptopurina, gemcitabina).
- Antibióticos anti-tumorais- intercalam com a dupla hélice do DNA levando à quebra das cadeias através da criação de radicais livres. Antraciclinas (doxorubicina, epirubicina), bleomicina e mitoxantrone. As antraciclinas têm mecanismos de ação semelhante à topoisomerase I e II, importantes para o desdobramento e síntese do DNA
- Inibidores de topoisomerasas- as topoisomerasas são enzimas responsáveis pela abertura da dupla hélice do DNA durante a replicação.
- Fármacos que ligam à tubulina- alcalóides vinca (vincristina, vinorelbina) ligam-se à tubulina e previnem a formação dos microtúbulos importantes para a mitose e para

outros processos celulares. Os taxoides (paclitaxel, docetaxel) previnem a separação dos microtúbulos estabilizando-os inibindo a divisão celular normal (Bhosle & Hall, 2009)(Fernando & Jones, 2015).

1.10 Complexos metálicos para o tratamento

Os metais são sistemas modulares com grande adaptabilidade, fundamentais para processos que envolvem a transferência de elétrões, catálise e até funções estruturais na célula (Shumi et al., 2022). Em condições normais, a concentração de íões metálicos tais como o ferro, cobre, zinco, entre outros, é altamente regulada e crucial para o funcionamento de vários processos bioquímicos (Moustakas, 2021). Os metais têm a capacidade de formar íões carregados positivamente em soluções aquosas e de se ligar negativamente a moléculas biológicas. A carga do metal pode ser ajustada dependendo do ambiente em que está envolvido (Frezza et al., 2010). Por esta razão, os fármacos baseados em metais têm suscitado um maior interesse como possíveis agentes anticancerígenos devido à sua atividade redox e reatividade com substâncias orgânicas (Komarnicka et al., 2021).

Os complexos de coordenação metálicos têm a capacidade de coordenar diferentes ligandos (agentes orgânicos) numa estrutura tridimensional, cuja funcionalização pode ser adaptada de acordo com o alvo molecular, alterando assim a absorção celular, o acúmulo e direcionamento desses fármacos (Lelièvre et al., 2020) (Shumi et al., 2022). Geralmente, os complexos metálicos apresentam uma ação terapêutica distinta dos agentes orgânicos, devido às suas variadas configurações de coordenação, geometrias e propriedades cinéticas (Shumi et al., 2022).

No entanto, alterações nas concentrações destes metais podem estar associados ao desenvolvimento de doenças (Frezza et al., 2010). Portanto, quando se administram fármacos baseados em metais de transição deve ter-se especial cuidado, uma vez que o excesso ou a deficiência destes pode resultar numa toxicidade indesejável em células normais (Lelièvre et al., 2020).

A investigação sobre o potencial terapêutico de metais de transição teve início com a descoberta da cisplatina (cis-diamina dicloroplatina (II), cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]) na década de 1960, que apesar de aprovada pela FDA para o tratamento de diversos cancros, vê a sua utilização restringida devido à toxicidade (Frezza et al., 2010).

Consequentemente, inúmeros estudos foram conduzidos na tentativa de identificar novas moléculas que permitissem superar os efeitos secundários tóxicos e a resistência adquirida ou intrínseca. De forma a ultrapassar estas dificuldades e de melhorar o perfil de toxicidade, foram descobertos vários análogos de platina, como a carboplatina e a oxaliplatina (Sazonova et al., 2021). A carboplatina demonstra eficácia no tratamento de cancro do ovário, pulmão e cancro da cabeça e pescoço. A oxaliplatina foi clinicamente aprovada para o tratamento de cancro colorretal em doentes resistentes à cisplatina (Simpson et al., 2019).

Outros complexos metálicos têm recebido um interesse considerável como agentes quelantes de zinco (Zn(II)), ouro (Au(III)) e cobre (Cu(II)) (Ndagi et al., 2017).

1.10.1 Complexos Metálicos de Platina

Como acima descrito, são vários os fármacos à base de platina usados na prática clínica de cerca de metade dos doentes no tratamento de tumores sólidos (Hato et al., 2014). O mecanismo de ação desses fármacos é notadamente caracterizado pela internalização dos complexos de platina na célula, onde são hidrolisados. Isso culmina na formação de derivados altamente reativos capazes de estabelecer ligações covalentes com moléculas biológicas (Hato et al., 2014). Dentre essas moléculas, destacam-se grupos nucleofílicos (contendo átomos de oxigénio, nitrogénio ou enxofre) que se encontram nas cadeias laterais de aminoácidos das proteínas e nas bases purinas de RNA ou DNA (Hato et al., 2014). Estas últimas podem resultar em distorções conformacionais que interferem com o processo de transcrição e replicação, principalmente em células com rápida proliferação como as cancerígenas (Rottenberg et al., 2021).

Os medicamentos baseados em platina representam atualmente um grupo notável de agentes quimioterapêuticos, entre eles a cisplatina, que é amplamente reconhecida (Sharma et al., 2021). A cisplatina possui propriedades anti-neoplásicas eficazes que se estendem em diversos tipos de cancro, incluindo cancro do cólon, pulmão, testículo, ovário e mama. Porém, a cisplatina é um fármaco inespecífico que apresenta diversos efeitos secundários, entre eles a nefrotoxicidade, neurotoxicidade e ototoxicidade, que emergem como preocupações neste contexto (Sharma et al., 2021) (Mármol et al., 2017).

O desenvolvimento de outras substâncias relacionadas com a cisplatina, como carboplatina e a oxaliplatina, refletem avanços no campo da quimioterapia. Todos esses complexos interferem com a molécula de DNA, que é uma abordagem essencial na desativação das células cancerígenas (Rottenberg et al., 2021).

A carboplatina, que pertence à segunda geração de fármacos exibe um perfil de toxicidade relativamente reduzido em comparação com a cisplatina. Contudo, o uso prolongado deste fármaco eventualmente desencadeia o desenvolvimento de resistência (C. Zhang et al., 2022). Uma terceira geração de complexos surgiu representada pela oxiplatina. Uma das principais vantagens da oxaliplatina é não apresentar resistência cruzada com a cisplatina e não exibir a mesma incidência de efeitos colaterais (Hossain et al., 2022).

Apesar dos avanços significativos no contexto clínico, estes fármacos não se encontram isentos de desvantagens. Um dos desafios mais evidentes é a aquisição de resistência aos tratamentos atualmente aprovados por parte de alguns doentes (Johnstone et al., 2014). O aumento do reparo dos adutos de DNA produzidos pela cisplatina, a inativação do fármaco no citosol, bem como a diminuição da sua absorção são os principais mecanismos que tornam os tumores resistentes a este fármaco (Mármol et al., 2017).

É, portanto, necessário o desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos com modificações direcionadas que apresentem menor toxicidade em células normais e ausência do desenvolvimento de resistências (Salehi et al., 2022).

1.10.2 Complexos Metálicos de Cobre

O cobre é um metal endógeno essencial em vários processos celulares fisiológicos, funções enzimáticas e reações redox (Babak & Ahn, 2021). Em condições biológicas, o cobre pode-se encontrar em dois estados Cu(I) e Cu(II) que o torna ativo em reações redox em sistemas biológicos (Babak & Ahn, 2021). É um metal que desempenha papéis importantes na coagulação, no processamento de energia e até mesmo na maturação de hormonas (Ji et al., 2023). A sua concentração fisiológica é estritamente regulada pela ceruloplasmina, albumina hepática e por proteínas transportadoras de cobre, uma vez que iões de cobre livres são altamente citotóxicos para as células (Lelièvre et al., 2020).

O cobre atua em diferentes vias moleculares que podem estar associadas ao desenvolvimento tumoral, angiogénese e metástase. Em algumas situações, a concentração de cobre pode estar aumentada em áreas tumorais (Morais et al., 2018) (Lelièvre et al., 2020). Embora

níveis elevados séricos de cobre possam estar relacionados com diversos tipos de cancro, a utilização de complexos de cobre na quimioterapia é uma estratégia terapêutica que se baseia em processos bioquímicos específicos (Lucaciu et al., 2022). Os complexos de cobre são projetados para interferir seletivamente em processos celulares específicos envolvidos na sobrevivência de células cancerígenas. Estes podem atuar como inibidores da proliferação celular, induzir mecanismos de morte programada e até afetar outras vias de sinalização importantes para o crescimento tumoral (Lucaciu et al., 2022). Devido à sua natureza, estes complexos podem apresentar efeitos menos tóxicos em células normais, permitindo a sua acumulação em maiores concentrações nas células tumorais de rápida divisão, constituindo assim uma opção atraente para o desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos (Lucaciu et al., 2022).

Os complexos metálicos de cobre fazem parte da classe de agentes antitumorais que podem exercer o seu mecanismo de ação por meio de interações com o DNA. Podem intercalar-se entre dois pares de bases adjacentes na ligação *Van der Waals* ou ligar-se a nucleótidos na *minor groove* da cadeia de DNA. Essas interações têm capacidade de causar danos no material genético, indução de apoptose, produção de ROS e inibir do processo de angiogénese (da Silva et al., 2022) (Sequeira et al., 2021).

A homeostase deste elemento está altamente desregulada em vários tipos de cancro podendo ser uma das causas da carcinogénese (Lelièvre et al., 2020). Num tumor, as células normalmente apresentam vascularização e níveis de oxigénio reduzidos. Deste modo, é atraente o desenvolvimento de novos fármacos que estejam ativos em ambientes redutores, como a hipóxia tumoral. Neste sentido os complexos de cobre através dos seus dois estados redox podem desencadear stress oxidativo pró-apoptótico (Lucaciu et al., 2022).

1.11 Tratamento de Cancro Colorretal e Ovário

Os carcinomas colorretais compreendem um diverso número de doenças causadas por mutações em diferentes genes, que condiciona a escolha de uma terapêutica enquadrada para todos os doentes (Hossain et al., 2022). Na primeira linha de tratamento ocorre uma abordagem multimodal que tem em consideração as características do tumor (número, localização de metástases, progressão do tumor e a presença ou ausência de marcadores químicos) e do doente (Mármol et al., 2017).

Os doentes com doença metastática são tratados com uma combinação de agentes biológicos citotóxicos e direcionados. São quatro os estadios possíveis da doença com abordagens terapêuticas específicas para cada uma delas: assim, a cirurgia é o tratamento padrão dos doentes no estadio 0 até ao II, no entanto, nos estadios mais avançados (III e IV) o doente necessita de terapia adjuvante, nomeadamente quimioterapia e/ou outras terapias direcionadas uma vez que ocorre invasão do peritoneu visceral e metastização (Hossain et al., 2022).

A oxaliplatina é um fármaco que pertence à classe das platinas assim como a cisplatina, mais comumente usado no tratamento do cancro colorretal em conjunto com o 5-fluorouracil.

Para o cancro do ovário o padrão de tratamento começa com cirurgia citoredutora seguida de quimioterapia e /ou radioterapia. Os agentes quimioterapêuticos mais usados são baseados em platina, tais como a cisplatina e a carboplatina, assim como fármacos da família dos taxanos (docetaxel e paclitaxel)(Akter et al., 2022).

1.12 Modelos 3D no desenvolvimento de terapêuticas

A investigação para descoberta de potenciais complexos anticancerígenos tem aumentado ao longo da última década. A partir de ensaios *in vitro* utilizando culturas de células em monocamada evitam-se inúmeros testes *in vivo* e todas as limitações associadas à legislação e princípio dos 3Rs (Ekert et al., 2014). No entanto, estes modelos celulares em monocamada (2D) estão muito longe de reproduzir o ambiente tumoral tridimensional complexo e, portanto, torna-se importante desenvolver modelos celulares mais complexos que reproduzam melhor os tecidos fisiológicos no contexto do microambiente tumoral, que ultrapassem as abordagens clássicas de culturas 2D (Ekert et al., 2014).

As culturas 2D são incapazes de mimetizar a fisiopatologia das células tumorais, a matriz extracelular e interações celulares fundamentais. Não consegue igualmente mimetizar os gradientes dos fármacos, de gases e dos nutrientes característicos dos tumores (Chaicharoenaudomrung et al., 2019; Ekert et al., 2014).

Neste modelo 2D, as interações célula-célula assim como célula-matriz são reduzidas e o nível de resposta celular é, portanto, restrito e limitado. Deste modo, os modelos 3D foram desenvolvidos de forma a mimetizar as condições e propriedades do tecido *in vivo*, crucial para o metabolismo e o seu crescimento (Figura 1.8) (Sambale et al., 2015).

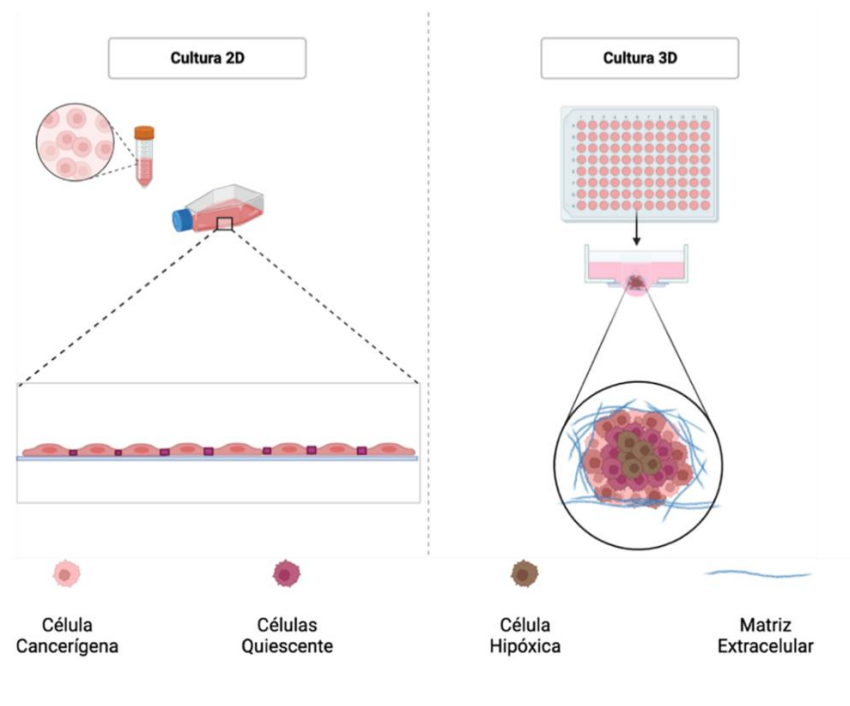


Figura 1.8- Diferenças entre os modelos 2D e modelos 3D *in vitro* de esferóides. Adaptado de (Salinas-Vera et al., 2022). Criado através do Biorender.

Os esferóides são modelos de sistemas tridimensionais bem caracterizados e usados para identificação de novas moléculas. Apresentam características como: simplicidade, reprodutibilidade e semelhança com os tecidos fisiológicos. Os esferóides são aglomerados de células que prezam pela interação célula-célula e em que as células se encontram em diferentes estados metabólicos (células necróticas, hipóxicas, quiescentes e proliferativas) (Chaicharoenadomrung et al., 2019; Ekert et al., 2014).

As culturas 3D são utilizadas extensamente nas investigações do cancro, nomeadamente na avaliação de toxicidade de substâncias e eficácia de potenciais fármacos. Para além destas vantagens, este modelo permite a existência de elevados níveis de marcadores específicos e padrões de expressão genética não reproduzíveis em cultura 2D (Białkowska et al., 2020).

Os modelos 3D permitem ainda estudar os efeitos dos fármacos ao longo prazo uma vez que podem ser cultivados até três semanas. A aplicação destes modelos parece ser a abordagem mais adequada de replicar do ambiente fisiológico *in vivo*, com elevado potencial para ser utilizado para testagem de fármacos (Fang & Eglén, 2017).

1.13 Contexto e Motivação

Atualmente os desafios associados ao uso de agentes quimioterapêuticos são elevados. Três das principais desvantagens são: a notória falta de especificidade para um alvo, efeitos secundários adversos para os doentes e o inevitável surgimento de resistência por parte das células cancerígenas.

Neste sentido, a identificação de novas moléculas que consigam ultrapassar estas desvantagens é crucial. Esta tese tem assim como principal objetivo, a avaliação do potencial citotóxico de novos complexos metálicos de Cobre (Cu(II)) e de Platina (Pt(II)) em linhas celulares tumorais de carcinoma colorretal sensível e resistente à doxorrubicina e em carcinoma de ovário e comparar com a respetiva atividade em células normais humanas (fibroblastos dérmicos). A partir destes ensaios é possível identificar e selecionar os complexos mais seletivos e mais citotóxicos para uma das linhas celulares tumorais. Posteriormente são analisados os mecanismos de morte celular ativados por estes, paralelamente é estudada a interferência dos complexos na despolarização da membrana mitocondrial e a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS). Foram conduzidos outros estudos de forma a entender a capacidade dos complexos interagirem com o ciclo celular e material genético (DNA). Finalmente, a análise estende-se na avaliação do efeito na migração celular e na formação de novos vasos sanguíneos em modelos *in vivo*.

Desta forma, este estudo almeja contribuir substancialmente para o desenvolvimento de abordagens mais eficientes e menos prejudiciais no tratamento de cancro.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Complexos em estudo

Nesta tese foram estudados sete complexos metálicos de platina (Pt(II)) e sete complexos metálicos de cobre (Cu(II)) (Tabela 2.1) contendo ligandos específicos (L1a, L1b, L1d, L2a, L2b, L2c e L2d), previamente sintetizados pela Doutora Anna Maron do Instituto de Química na Universidade de Silensia, em Katowice. Por questões de proteção da propriedade industrial, os ligandos bem como a estrutura dos complexos metálicos não serão aqui apresentados, mas, a sua síntese foi baseada nos resultados obtidos para os complexos metálicos de Au(II), Pt(II) e Cu(II) contendo ligandos de 2,2':6',2"-terpiridina (L1c) descritos em Dalton Trans., 2018,47, 6444-6463.

Estes complexos encontram-se em forma de pó, tendo sido armazenados à temperatura ambiente ($\sim 25^\circ\text{C}$) em *ependorfs*. Uma vez que os complexos apresentam baixa solubilidade em água foi utilizado o dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente.

O DMSO é um solvente orgânico de natureza anfipática usado em coordenação com metais de transição (Ridgway et al., 2017). É um solvente com capacidade de dissolver moléculas polares e apolares pouco solúveis e amplamente utilizado em farmacologia (Verheijen et al., 2019). Todos os ensaios biológicos foram realizados partindo de soluções stock frescas dos respectivos complexos e ligandos em 100% (v/v) DMSO. Posteriormente, estas soluções foram diluídas em meio de cultura para as concentrações de interesse, garantindo que a concentração de DMSO final no meio de cultura não excedesse os 0,1% (v/v) para evitar toxicidade celular.

Tabela 2.1 Propriedades dos complexos Cu(II) e Pt(II) utilizados no estudo: designação e massa molecular.

Complexos	Massa Molar (g/mol)
Cu1a	493,87
Cu1b	493,87
Cu1d	523,90
Cu2a	505,93
Cu2b	505,93
Cu2c	535,96
Cu2d	535,96
Pt1a	739,02
Pt1b	739,02
Pt1d	769,05
Pt2a	751,08
Pt2b	751,08
Pt2c	781,10
Pt2d	781,10

2.2 Estabilidade e Solubilidade dos Complexos

Antes de avaliar qualquer atividade biológica é crucial verificar a estabilidade dos complexos metálicos tanto em meio de cultura como no respetivo solvente (DMSO) através da técnica de espectroscopia de UV-Visível (Evolution 300, Thermo Scientific, MA, EUA). Deste modo, soluções dos complexos metálicos foram preparadas em DMSO e em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute medium* (Invitrogen, EUA)) sem fenol *red* à concentração final de 50 μ M (garantindo que a concentração final de DMSO não exceda os 0,1% (v/v)). A absorvância foi medida na gama de 220-800 nm utilizando cuvettes (percurso ótico de 1 cm). Os espetros foram analisados no tempo inicial (0h) e após 3h, 6h, 24h e 48h de incubação numa estufa a 37°C, com CO₂ a 5% (v/v) e humidade relativa a 99% (v/v) (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão).

2.3 Linhas Celulares Humanas Estudadas

2.3.1 Características

Nesta tese foram utilizadas três linhas celulares tumorais, HCT116 (linha celular derivada de um doente com carcinoma colorretal), HCT116 resistente à doxorubicina (Dox) (obtida a partir da linha sensível HCT116 por exposição consecutiva a concentrações crescentes de Doxorubicina, e a sua manutenção por exposição constante a 3,6 μM de Dox (Pedrosa et al., 2018)) e A2780 (linha celular derivada de um doente com carcinoma de ovário) e uma linhagem primária não tumoral de fibroblastos neonatais dérmicos.

As linhagens celulares utilizadas foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC) (www.atcc.org/) (Choroba et al., 2023) e as suas características estão descritas na tabela 2.

Tabela 2.2- Características das linhas celulares tumorais e não tumorais (origem, morfologia celular e meio de cultura correspondente) utilizadas nos ensaios biológicos dos complexos metálicos em estudo. DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Invitrogen, EUA); RPMI – *Roswell Park Memorial Institute medium* (Invitrogen, EUA); FBS – *Fetal Bovine Serum* (Invitrogen, EUA); Pen/Strep – Penicilina/ Estreptomicina (Invitrogen, EUA) Adaptado de (Almeida, 2018).

Linha Celular	Origem	Morfologia	Meio de Cultura % (v/v)
HCT116	Carcinoma colorretal	Epitelial	DMEM, FBS 10%, Pen/Strep 1%
HCT116doxR	Carcinoma colorretal HCT116	Epitelial	DMEM, FBS 10%, Pen/Strep 1%
A2780	Carcinoma de ovário	Epitelial	RPMI, FBS 10%, Pen/Strep 1%
Fibroblastos	Derme neonatal	Mesenquimatosas (fusiformes)	DMEM, FBS 10%, Pen/Strep 1%

2.3.2 Manutenção das Culturas Celulares (2D)

As linhas celulares HCT116, HCT116doxR, A2780 e fibroblastos foram cultivadas em meios de cultura de acordo com a Tabela 2.2 tendo sido mantidas numa estufa a 37°C, com CO₂ a 5% (v/v) e humidade relativa e 99% (v/v) (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) em frascos de cultura de 25 cm² (SPL Life Sciences, Coreia do Sul). A confluência das culturas foi avaliada utilizando um microscópio invertido (Nikon TMS, Nikon Instruments, Tóquio, Japão) e sempre que a confluência atingiu os 80% foram feitas subculturas de modo a prevenir a exaustão de nutrientes essenciais para o crescimento celular e a inibição por contato.

Para tal, o meio de cultura presente no *T-flask* 25 cm² foi removido, adicionou-se 2 mL de *TrypLE TM Express* (Invitrogen, EUA) e as células incubadas por 5 minutos a 37°C. Em seguida foi adicionado 1 mL de meio de cultura (neutralização da ação da tripsina) e a cultura celular foi transferida para 2 *ependorfs*, centrifugada (5 minutos a 500xg) (Sigma 1-14, Alemanha) descartado o sobrenadante e o *pellet* ressuspendido num mL de meio completo.

A fim de determinar do número de células viáveis realizou-se o método de exclusão com *Trypan Blue*. A contagem foi realizada num hemocitómetro (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha) utilizando uma solução composta por 50 µL de suspensão celular, 350 µL de meio completo e 100 µL do corante *Trypan Blue* 0,4% (v/v) (SigmaAldrich, EUA). O corante identifica as células que possuem a membrana comprometida permitindo diferenciar as células vivas (brancas) das células mortas (azuis). Este procedimento foi adaptado de (Carvalho, 2020). A concentração celular (células/mL) foi calculada multiplicando o número de células contadas pelo volume do hemocitómetro (10⁴ mL⁻¹) e pelo fator de diluição (10), a dividir pelo número de quadrantes onde foram contadas células (Almeida, 2018), conforme representado na equação 1:

$$\text{Densidade Celular (células/mL)} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células viáveis contadas} \times 10^4 \times 10}{\text{N}^{\circ} \text{ de quadrantes}} \quad \text{equação 1}$$

A equação 1 permite o cálculo do volume de suspensão celular necessário para transferir para um novo frasco de cultura contendo 5 mL de meio completo (Adaptado de (Cabral, 2020).

2.4 Ensaios de Viabilidade Celular

O potencial antiproliferativo (*in vitro*) dos complexos metálicos foi avaliado através da análise da viabilidade mitocondrial determinada usando o kit *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, WI, USA) (Lenis-Rojas et al., 2021), de acordo com as instruções do fabricante, após a exposição das células tumorais e não tumorais a concentrações crescentes dos complexos e respetivos ligandos. Neste método, o reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -5-(3-carboxymetoxifenil) -2-(4-sulfofenil) -2H-tetrazólio] (MTS, tetrazólio amarelo solúvel) é reduzido intracelularmente pelas desidrogenases mitocondriais de células saudáveis formando o *formazan* (roxo) (Lenis-Rojas et al., 2021).

Para isso, as células foram cultivadas em placas *high attachment* de 96 poços (SPL Life Sciences, Coreia) numa densidade celular de $0,75 \times 10^5$ células/mL e incubadas durante 24 horas numa estufa a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão), permitindo a adesão das células. Após a incubação, o meio dos poços foi descartado e substituído por meio fresco contendo uma determinada concentração de cada complexo e/ou ligando (entre 0,1 e 50 µM), juntamente com um controlo negativo (DMSO na mesma % presente no complexo e não superior a 0,1%), controlo positivo (doxorrubicina a 0,4 µM), um controlo só com meio completo e outro controlo com meio completo e com cada complexo mas sem células (este último para verificação se os complexos/ligandos não interferem nas medições). A placa foi incubada por 48 horas nas condições acima descritas.

Após esta incubação, o meio presente em cada poço foi descartado e substituído por 100 µl de uma solução do reagente MTS e meio de cultura fresco numa proporção de 20:80 (v/v). A placa foi colocada a incubar na estufa durante 25 minutos para HCT116, 30 minutos para HCT116 resistente à doxorrubicina, 1 hora para A2780 e 1 hora e 20 minutos para fibroblastos.

Após o tempo de incubação as placas foram medidas num leitor de microplacas (Infinite® M200, Tecan, Suíça) a uma absorvância de 490 nm. Através da equação 2 é possível calcular a viabilidade celular:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs complexo}}{\text{Abs DMSO} - \text{Abs meio sem células}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Os valores de IC₅₀ relativos - concentração de complexo/ligando relativa que leva a uma redução de 50% no valor da viabilidade celular foram calculados pelo *software* GraphPadPrism 8 (Graph Pad Software Inc., San Diego, EUA)(Almeida, 2018). A partir dos valores de IC₅₀ é possível calcular os índices de seletividade (IS) que representam uma medida da seletividade dos complexos/ligandos para cada linhagem e é calculada com base no rácio IC₅₀ fibroblastos/IC₅₀ da célula tumoral e que quando se aproxima de 1 é um indicador de elevada citotoxicidade em células normais.

Através destes cálculos foi possível selecionar os complexos mais promissores e a respetiva linha celular onde a citotoxicidade é maior nas células tumorais. Assim, os ensaios biológicos subsequentes foram realizados para esses complexos na linha celular selecionada.

A determinação da viabilidade celular e dos respetivos IC₅₀, foi realizada igualmente em culturas 3D (esferóides) de HCT116 resistentes à doxorrubicina para os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a para efeitos comparativos com os valores obtidos em culturas 2D (acima descritos). Antes do início do ensaio em 3D, as células foram mantidas num *T-flask* 25 cm² numa densidade de 5x10⁴ células/mL tal como indicado na secção 2.3.2.

Para a obtenção dos esferóides, as células foram cultivadas outras placas *Ultra-Low Attachment surface* de 96 poços (SPL Life Sciences, Coreia) durante 6 dias até a incubação com cada um dos complexos (durante 48 h) (Figura 2.1) tal como descrito anteriormente (Choroba et al., 2023). O restante procedimento foi realizado como acima descrito.

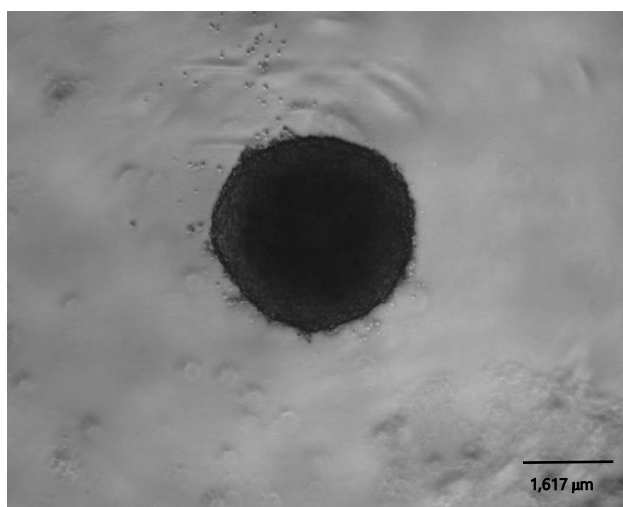


Figura 2.1- Esferóide constituído por células tumorais de HCT116doxR com 6 dias de incubação a 37°C. A imagem foi obtida a partir de um microscópio invertido com ampliação de 4x.

2.5 Potencial Apoptótico

2.5.1 Marcação com Anexina V-FITC e IP

Foi utilizado o *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (v13245) (Invitrogen, EUA). A anexina V (conjugada com um fluoróforo *Fluorescein Isothiocyanate* (FITC)) tem elevada afinidade para a fosfatidilserina externalizada na superfície da membrana celular em fases iniciais de apoptose e emite fluorescência quando excitado no comprimento de onda de 494 nm e um máximo de emissão a 518 nm (Zeinabad et al., 2016). Além disso, o kit inclui um fluoróforo intercalante do DNA que apenas penetra em células com membranas comprometidas designado iodeto de propídio (IP), cujo comprimento de onda máximo de excitação e emissão é 535 nm e 617 nm, respetivamente. As células viáveis não irão apresentar qualquer fluorescência (Zeinabad et al., 2016).

O objetivo deste ensaio é quantificar a % de células viáveis (sem marcação) *versus* a % de células em apoptose inicial (marcação com anexina V), apoptose tardia (marcação com anexina V e IP) e as células em necrose (marcação com IP).

As células HCT116doxR foram cultivadas em placas de 6 poços (SPL Life Sciences, Co-reia) numa densidade celular de 1×10^5 células/mL. De seguida, as placas foram incubadas a 37°C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical

Co., Osaka, Japão), durante 24 horas. Na sequência, o meio foi substituído por meio fresco contendo o IC₅₀ dos complexos Cu 1a, Cu1b e Pt1a ou o controlo negativo (DMSO 0,1%), e os dois controlos positivos doxorubicina (Dox 6 µM) e cisplatina (Cis 5 µM), células marcadas não tratadas com doxorubicina e células não tratadas não marcadas.

As células foram incubadas sob as condições previamente mencionadas durante 48 horas. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS 1x, tripsinizadas, recolhidas em *ependorfs* e centrifugadas (Sigma 1-14, Alemanha) a 500 xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 1 mL de PBS 1x. As células foram centrifugadas novamente (Sigma 1-14, Alemanha) a 800 xg durante 5 minutos. O *pellet* foi ressuscitado em 100 µL de tampão de ligação Anexina V-FITC 1x, 5 µL de Anexina V-FITC e 1 µL de IP. De seguida, as amostras foram incubadas (temperatura ambiente) na ausência de luz durante 15 minutos. Após a incubação foram adicionados 400 µL de tampão de ligação da Anexina V-FITC 1x. Este procedimento foi adaptado de (Cabral, 2020)(Choroba et al., 2023).

As amostras foram analisadas conforme anteriormente mencionado na secção 2.5.1.

2.6 Potencial de Membrana Mitocondrial

Neste ensaio foi avaliado o potencial mitocondrial ($\Delta\Psi_M$) através do *JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit* (KA1324) (Abnova Corporation, Walnut, California, EUA). As mudanças no potencial mitocondrial são refletidas nas mudanças de fluorescência da sonda *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide* (JC-1). JC-1 pode apresentar dois tipos de fluorescência, quando encontrada em forma de agregados apresenta uma intensa fluorescência vermelha (excitação/emissão=535/590 nm) e na forma monomérica exibe fluorescência verde (excitação/ emissão = 485/535 nm) (Abnova Corporation, Walnut, California, EUA).

As células foram inicialmente cultivadas numa placa de 6 poços (fabricada pela SPL Life Sciences, Coreia) com uma densidade celular de 1×10^5 células/mL em meio completo. A placa foi colocada a incubar numa estufa a 37°C, CO₂ a 5% (v/v) com humidade relativa a 99% (v/v) (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) e mantida por 24 horas permitindo que as células aderiram ao fundo dos poços da placa. Após este período de

incubação, o meio foi substituído por meio contendo os complexos a testar em concentração igual ao IC₅₀.

Foi ainda utilizado como controlo negativo veículo DMSO 0,1% (v/v), enquanto a doxorrubicina (6 µM) e cisplatina (5 µM) foram utilizados como controlos positivos. As células foram incubadas nas condições acima referidas durante 48 horas. Após a incubação, procedeu-se à remoção do meio de cultura, lavagem com PBS 1x seguido da adição de 1 mL de tripsina a cada poço. A placa foi mantida incubada a 37°C durante 5 minutos.

O conteúdo dos poços foi centrifugado (Sigma 1-14, Alemanha) durante 5 minutos a 500 xg. Após descartar o sobrenadante, o sedimento celular foi ressuspensionado em 1 mL de PBS 1x e novamente centrifugado a 750 xg durante 5 minutos (Sigma 1-14, Alemanha). Após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente removido. A ressuspensão do sedimento foi efetuada recorrendo a uma solução composta por DMEM sem fenol *red* contendo 5% (v/v) FBS e a sonda JC-1. As amostras foram incubadas durante 20 minutos na ausência de luz à temperatura ambiente. Depois, as amostras foram centrifugadas a 750 xg durante 5 min e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL de DMEM sem fenol *red* com 5% (v/v) de FBS. Procedimento adaptado de (Cabral, 2020; Choroba et al., 2023).

Posteriormente, as amostras foram analisadas através da técnica de citometria de fluxo onde foram adquiridos pelo menos 10 000 eventos por amostra. O programa *Attune® Cytometric software* foi utilizado para análise dos resultados.

2.7 Western Blot

A análise da expressão de proteínas Bax e BCL-2 através de Western Blot foi realizado pela aluna de Licenciatura Rita Sequeira sob minha supervisão.

2.7.1 Preparação das amostras de proteína

As células HCT116 resistente à doxorrubicina foram cultivadas num *T-flask* 25 cm² (SPL Life Sciences, Coreia do Sul), numa densidade de 2x10⁶ células/mL. Após uma incubação de 24h a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ com 99 % de humidade relativa (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão), o meio do T25 foi substituído contendo o IC₅₀ dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a e o controlo negativo de DMSO 0,1%. As amostras foram incubadas durante 48h. Após este tempo, o sobrenadante foi retirado, as células aderentes lavadas com 3 mL de

PBS 1x e posteriormente, adicionou-se 2 mL de PBS 1x frio aos T25 para recolher as células com o apoio de um raspador. As amostras foram centrifugadas (Sigma 1-14, Alemanha) durante 5 minutos a 700 xg e o *pellet* posteriormente ressuspendido com 1 mL de PBS 1x.

No seguimento, as amostras foram centrifugadas (Sigma 1-14, Alemanha) a 750 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi excluído e feito um *spin* para remoção do restante sobrenadante. O *pellet* foi ressuspendido em 50 µL de solução de lise contendo NaCl Tris- EDTA (NaCl 150mM; 50 mM Tris, pH=8; EDTA 5 mM), inibidores de protéases 1x (Complete ULTRA tablets, mini, eazypack, Roche), inibidores fosfatase 1x (PhosStop, Roche), NP-40, DTT 10% e PMSF 100 mM. Posteriormente, as amostras foram armazenadas no mínimo durante 2 horas a -80°C.

Após o tempo de armazenamento, as amostras foram descongeladas através de pulsos de ultrassons contínuos (sonicador Elma, D-78224 Singen/Htw, Alemanha) durante 2 minutos e 30 segundos. O processo foi repetido por 5 ciclos com as amplitudes de 60, 70, 80, 70 e 60. Após os 5 ciclos as amostras foram centrifugadas a 10000 xg durante 5 minutos (Sigma 1-14, Alemanha) e o sobrenadante recuperado para um tubo *ependorf* de 1,5 mL.

2.7.2 Quantificação da proteína extraída

Para a quantificação de proteína extraída foi necessário realizar-se uma curva de calibração com soluções padrão de BSA do *kit Pierce Protein Assay* (ThermoFisher Scientific, MA, EUA), com concentrações de 0 a 2000 µg/mL (125, 250, 500, 750, 1000, 1500 e 2000 µg/mL) (Thermo Scientific, MA, EUA). Como controlos foi utilizada uma solução de água MiliQ (18.2 MΩ.cm⁻¹ a 25 °C) e de tampão de lise numa proporção de (1:10 com água). Após a preparação das soluções padrão de BSA, foi adicionada a cada uma 150 µL de reagente *Pierce* (ThermoFisher Scientific) e posteriormente estas foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente na ausência de luz.

A absorvância das amostras foi analisada a partir de um leitor de microplacas Tecan Infinite F200 Microplate Reader (Tecan, Männedorf, Suíça) a um comprimento de onda de 660 nm. Após a quantificação das amostras de proteínas extraídas anteriormente, transferiu-se para um novo tubo *ependorf* contendo uma solução de *loading buffer* constituída por tampão de Dodecilsulfato de Sódio (SDS) 4x, DTT 30 % (p/v) e 20 µg de proteína. As amostras foram incubadas pelo menos 16 horas à temperatura ambiente.

2.7.3 Preparação do SDS-PAGE e Transferência

Preparou-se o sistema com os vidros e espaçadores, previamente limpos com etanol. O gel de SDS-PAGE foi preparado conforme indicado na Tabela 2.3.

Tabela 2.3-Reagentes constituintes de um gel SDS-PAGE de 10% de poli(acrilamida).

	Gel de Resolução	Gel de Concentração	Marca
H ₂ O destilada	5 mL	3,4 mL	FCT
Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1)	2,5 mL	830 µL	Merck, Alemanha
Tampão resolução/concentração 4x	2,5 mL	630 µL	FCT
SDS 20%	25 µL	25 µL	VWR, Europa
APS 10%	100 µL	50 µL	Amresco, EUA
TEMED	10 µL	5 µL	Sigma, St Louis, EUA

Após a montagem do sistema são adicionados os tampões catódicos e anódicos iniciando a corrida a 120 Volts durante 1 hora e 20 minutos. Após a conclusão da eletroforese em gel SDS-PAGE procedeu-se a transferência para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare Life Sciences, Alemanha) por 45 minutos a 130 mA. Após a transferência, o gel de SDS-PAGE foi submetido ao corante azul de *Coomassie* e colocado a incubar durante 30 minutos a 55 °C. A membrana foi posteriormente submetida a uma incubação com *Ponceau S*. por 5 minutos e, posteriormente lavada com água destilada até remover completamente o reagente.

2.7.4 Processo de Incubação com o Anticorpo Primário e Secundário

De forma a bloquear a membrana contra interações não específicas é usada uma solução de *Blocking* contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado em TBST 1x (50 mM Tris, 150 mM NaCl e 0,1% (v/v) Tween 20, pH = 7,5). A membrana foi incubada durante 1 hora, à temperatura ambiente com agitação. De seguida, foi novamente incubada durante 1h em agitação com soluções 5 % (p/v) de leite não gordo em TBST 1x contendo os diferentes anticorpos primários (anti-Bax (diluição de 1:5000) ou anti BCL-2 (diluição de 1:1000)) (Tabela 2.4). Após

a incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST 1x por 5 minutos, em constante agitação. Para a incubação com o anticorpo secundário realizou-se o procedimento anteriormente descrito para os anticorpos primários, tendo-se apenas substituído pelos anticorpos secundários (Tabela 2.4).

Para controlo da quantidade de proteína em cada membrana e normalização dos resultados, as membranas foram incubadas, tal como descrito acima, mas utilizando como anticorpo primário o anticorpo da β -actina (Tabela 2.4). No entanto, antes de se proceder a estas incubações, foi feito o *stripping* de todas as membranas a fim de remover os anticorpos previamente hibridados. Assim, as membranas foram submetidas a uma incubação com tampão *stripping* contendo 0,1 M de glicina, 20 mM de acetato de magnésio e 50 mM de cloreto de potássio durante 30 minutos e de seguida, incubadas com o anticorpo primário da actina e posteriormente o respetivo secundário (Tabela 2.4).

Tabela 2.4-Anticorpos primários e secundários usados no ensaio do Western Blot.

		Diluição	Marca	
Anticorpos	Primários	BCL-2	1:1000	Sigma, B3170
		Bax	1:5000	Abcam, 32503
		β -actina	1:5000	Sigma, A5441
	Secundários	Anti-rabbit (Bax)	1:2000	Cell signalling
		Anti-mouse (BCL-2, actina)	1:3000	Cell signalling

2.7.5 Revelação das bandas

Para a revelação das membranas foi preparada uma solução com *Hyperfil ECL* (GE Healthcare). O ECL (do inglês Enhanced Chemiluminescence) é um substrato quimioluminescente usado para detetar a atividade da peroxidase de rabano induzida pelos anticorpos secundários. A membrana foi completamente imersa pelo reagente e incubada durante 5 minutos na ausência de luz. Sequencialmente, a membrana foi exposta a um filme numa sala escura para capturar a imagem das bandas de proteínas reveladas. A quantificação das intensidades das bandas foi realizada usando o *software ImageJ*.

2.8 Autofagia

O mecanismo de morte celular por autofagia foi detetado recorrendo ao *Autophagy Assay Kit* (ab139484, Abcam, Cambridge, Reino Unido). O kit utiliza um fluoróforo verde que marca as vesículas autofágicas cujo comprimento de onda excitação ~480 nm e emissão ~530 nm.

As células foram cultivadas em meio DMEM completo numa densidade de 1×10^5 células/mL numa placa de 6 poços (SPL Life Sciences, Coreia do Sul). A placa foi incubada numa estufa a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa (SANYOCO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão), durante 24 horas.

No final da incubação, procedeu-se à substituição do meio de cultura por meio fresco contendo o complexo em avaliação na concentração igual ao seu IC₅₀. Foi igualmente utilizado DMSO 0,1% (v/v) como controlo negativo (veículo), e doxorubicina (6 µM) e cisplatina (5 µM), ambos como controlos positivos. As células foram incubadas novamente na estufa a 37°C durante 48 horas. Foi igualmente adicionada rapamicina (1500 nM) como controlo positivo, tendo esta sido adicionada 18 horas antes do fim da incubação de 48h. No fim deste período, o meio do poço foi recolhido para tubos *ependorfs* e centrifugado (Sigma 1-14, Alemanha) durante 5 minutos a 500 xg. O sobrenadante foi descartado e cada poço lavado com 1mL de PBS 1x e posteriormente adicionou-se 1 mL de tripsina para destacar as células aderentes (na estufa a 37°C durante 5 minutos). A solução de células tripsinizadas foi transferida para um *ependorf* e centrifugada a 500 xg durante 5 minutos (Sigma 1-14, Alemanha). Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de meio DMEM sem fenol *red* (incolor) contendo 5% (v/v) de FBS. Uma nova centrifugação foi realizada durante 5 minutos a 800 xg (Sigma 1-14, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 250 µL de *Green Stain Solution* diluída 1:1000 em meio DMEM incolor contendo 5% (v/v) FBS. As amostras foram incubadas durante 30 minutos numa estufa a 37°C na presença da sonda. Seguido este tempo, as amostras foram centrifugadas (Sigma 1-14, Alemanha) durante 5 minutos a 750 xg e posteriormente tendo-se descartado o sobrenadante. O sedimento foi ressuspenso em 500 µL de *Assay Buffer* 10x em água. Realizou-se uma nova centrifugação durante 5 minutos a 700 xg (Sigma 1-14, Alemanha). Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso novamente em 500 µL de *Assay Buffer* 10x em água.

Através de citometria de fluxo as amostras foram analisadas de forma a adquirir pelo menos 10 000 eventos por amostra e os dados adquiridos a partir do programa *Attune® Cytometric software*.

2.9 Produção de Espécies Reativas de Oxigénio

A quantificação da produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) foi realizada utilizando a sonda diclorofluoresceína di-acetato (H₂DCF-DA) (Molecular Probes: Reactive Oxygen Species (ROS) Detection Reagents, Invitrogen, EUA). Esta sonda, na presença de espécies reativas de oxigénio converte-se no composto fluorescente 2,7- diclorofluoresceína (DCF) (Ex/Em: ~492–495/517–527 nm) (Mucha et al., 2019).

As células foram cultivadas numa placa de 6 poços com uma densidade de 1×10^5 células/mL em meio DMEM completo e deixadas a incubar numa estufa a 37°C, 5% (v/v) de CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão), durante 24 horas para adesão celular. Concluído o período de incubação, o meio foi substituído por meio fresco contendo os complexos a testar numa concentração igual aos respetivos IC₅₀. Utilizou-se como controlo negativo DMSO a 0,1% (v/v) e como controlos positivos doxorubicina (6 µM), cisplatina (5 µM) e *Tert Butyl Hydroperoxide* (TBHP) (42 µM). As células foram novamente incubadas na estufa a 37°C nas mesmas condições acima referidas durante 48 horas. Após a incubação, procedeu-se à remoção do meio de cultura, lavagem com 1mL de PBS 1x e à adição de 1 mL de tripsina a cada poço tendo-se deixado a incubar durante 5 minutos. Após este tempo, o conteúdo dos poços foi transferido para um tubo *ependorf* e centrifugado (Sigma 1-14, Alemanha) durante 5 minutos a 500 xg. Após a remoção do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de PBS 1x e novamente centrifugado a 800 xg durante 5 minutos (Sigma 1-14, Alemanha). Finalizada a centrifugação, o sobrenadante é novamente descartado e o sedimento ressuspenso numa solução de PBS 1x com H₂DCF-DA a 10 µM. As amostras foram incubadas a 37°C durante 20 minutos na ausência de luz.

As amostras foram posteriormente analisadas por citometria de fluxo (adquiridos pelo menos 10 000 eventos por amostra) no Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A análise dos resultados foi efetuada com o programa *Attune® Cytometric software*.

2.10 Análise da Progressão do Ciclo Celular

Neste ensaio, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (SPL Life Sciences, Coréia do Sul) com uma densidade de 1×10^5 células/mL em meio DMEM completo e deixadas a incubar numa estufa a 37°C, 5% (v/v) de CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão), durante 8 horas. Para assegurar que as células se encontravam na mesma fase do ciclo celular, estas foram submetidas a um duplo bloqueio com timidina para sincronização. No final da incubação, o meio de cultura foi substituído por 2 mM de timidina em meio completo e as células colocadas a incubar numa estufa de 37°C por 16 horas.

Após a incubação, o meio de cultura com timidina foi substituído por meio completo sem timidina e as células incubadas por mais 8h. Após este tempo, foi aplicado um segundo bloqueio com timidina, conforme descrito anteriormente.

No final da incubação, o meio de cultura com timidina foi substituído por meio fresco contendo os complexos numa concentração igual ao seu IC₅₀. Foi igualmente utilizado, DMSO a 0,1% (v/v) (veículo), doxorubicina (6 µM) e cisplatina (5 µM), ambos controlos positivos. As células foram novamente incubadas numa estufa a 37°C durante 9, 12, 18 e 24 horas. Imediatamente após a exposição (0 h) e no final de cada incubação, o meio foi removido e adicionado 1 mL de tripsina a cada poço e a placa deixada a incubar durante 5 minutos a 37 °C. Após este tempo, o conteúdo dos poços foi recolhido em *ependorfs* e centrifugados (Sigma 3-16K 10280, Tuttingen, Alemanha) durante 5 minutos a 650 xg a 4 °C. Depois de descartar o sobrenadante, o sedimento foi ressuscitado em 1 mL de PBS 1x frio e centrifugado (Sigma 3-16K 10280, Tuttingen, Alemanha) a 3000 xg durante 5 minutos a 4°C. Após esta centrifugação o sobrenadante foi novamente descartado e o sedimento ressuscitado em 100 µL de PBS 1x frio. No passo seguinte, a cada tubo foi adicionado 1 mL de etanol 80 % (v/v) a 4°C gota a gota.

As amostras foram mantidas a 4°C por um mínimo de 16 horas. Após este tempo, as amostras foram centrifugadas (Sigma 3-16K 10280, Tuttingen, Alemanha) durante 10 minutos a 7500 xg e 4°C. O sobrenadante descartado e as amostras deixadas a secar ao ar de forma a evaporar o etanol. De seguida, o *pellet* foi ressuscitado em 250 µL de RNase 50 µg/mL em PBS 1x (incubação de 30 minutos a 37°C). Após isso, foram adicionados 100 µL de IP 25 µg/mL em PBS 1x e 650 µL de PBS 1x.

As amostras foram submetidas à análise utilizando um citómetro de fluxo Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer (Life Technologies, Carlsbad, EUA) (adquiridos pelo menos 10 000 eventos). A interpretação dos resultados foi conduzida por meio do *software Attune® Cytometric*.

2.11 Senescência Celular

Neste ensaio foi utilizado o *Senescence Assay Kit (Beta Galactosidase, Fluorescence)* (ab228562) (Abcam, Reino Unido).

As células foram cultivadas em placas de 24 poços (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) em meio DMEM completo numa densidade de 5×10^5 células/poço e colocadas a incubar numa estufa a 37°C, CO₂ a 5% (v/v) e 99% (v/v) de humidade relativa (SANYO CO₂ Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão), durante 24 horas. Desta forma, as células aderem ao fundo dos poços da placa. Após a incubação, o meio de cultura foi substituído por meio contendo os complexos a testar na mesma concentração do IC₅₀. Adicionalmente foi utilizado DMSO 0,1% (v/v) como controlo (veículo), doxorubicina (6 µM) e cisplatina (5 µM) como controlos positivos. As células foram incubadas na estufa a 37°C, nas condições anteriores durante 48 horas.

Finalizado o período de incubação, o meio foi removido e adicionado 500 µL de meio DMEM com 1,5 µL de *Senescence dye*. As placas foram submetidas a uma segunda incubação entre 1-2 horas numa estufa a 37° C. Seguidamente o meio dos poços foi retirado e as células lavadas duas vezes com Tampão de Lavagem (fornecido pelo Kit). As células dos poços foram tripsinizadas em 200 µL de tripsina modificada e recolhidas em eppendorfs. Posteriormente foram centrifugadas (Sigma 1-14, Alemanha) durante 5 minutos a 500 xg. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 500 µL de Tampão de Lavagem. As amostras foram novamente centrifugadas (Sigma 1-14, Alemanha) a 750 xg durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi novamente descartado e ressuscitado em 500 µL de Tampão de Lavagem.

As amostras foram analisadas posteriormente por citometria de fluxo (adquiridos pelo menos 10 000 eventos) num citómetro Attune® Acoustic Focusing Flow Cytometer (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A interpretação dos resultados foi efetuada com o programa Attune® Cytometric.

2.12 Interação dos complexos com o DNA Plasmídico

2.12.1 Cultura de Bactérias de *Escherichia Coli* (*E. coli*) e isolamento de DNA plasmídico (pUC18)

Uma amostra de *E. coli* transformada com pUC18 (pDNA) foi inoculada numa placa contendo meio LB-agar (Luria-Bertani) suplementado com ampicilina (100 µg/mL). O inóculo foi incubado durante 24 horas numa estufa a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa. Posteriormente as bactérias *E. coli* foram inoculadas em meio LB líquido, suplementado com ampicilina (50 µg/mL), durante 24 horas numa estufa a 37°C em constante agitação. Após este período de incubação, extraiu-se o DNA plasmídico (pDNA) das bactérias recorrendo ao *Kit NZYSpeedy Miniprep* (NZYtech) de acordo com o protocolo do fabricante.

2.12.2 Interação dos complexos com o DNA plasmídico extraído

Foram realizados ensaios com o DNA de pUC18 extraído. O DNA plasmídico foi incubado com os complexos para um volume final de 20 µL e todas as amostras foram incubadas a 37°C durante 24 horas em tampão Tris-HCl, 50 mM NaCl (pH=7).

Desta forma, no primeiro ensaio, incubou-se 100 ng de DNA de pUC18 com concentrações crescentes dos complexos Cu1a, Cu 1b e Pt1a (5, 25, 50, 75 e 100 µM) ou na sua ausência (apenas pUC18 com ou sem 0,1 % DMSO (v/v), ambos controlos negativos). Para este ensaio, foi realizado um controlo positivo contendo DNA pUC18 (100 ng) incubado previamente com a enzima HindIII de forma a linearizar o plasmídeo.

Após os tempos de incubação, foi adicionado a cada amostra 6 µL de *loading buffer* 6,6x (25 mM Tris-HCl, 25 mM EDTA (pH 8.0), 50 % glicerol, 0,1 % orange dye). De seguida, as amostras foram aplicadas num gel de agarose 0,8% (p/v) e analisadas por eletroforese em tampão TAE 1x com *Gel Red* 0,0015% e uma corrente constante de 70 V aplicada durante 80 minutos. Os géis obtidos após cada eletroforese foram analisados e registados num sistema *Bio-Rad GelDoc EZ Gel Imaging System*, usando o *software Quantity One* para aquisição de imagem. A quantificação das bandas foi feita recorrendo ao *software ImageJ*.

Após este ensaio inicial foram realizados ensaios independentes pelo aluno de Licenciatura em Bioquímica Diogo Afonso sob supervisão. Num dos ensaios subsequentes utilizou-se diferentes concentrações do complexo Pt1a com diferentes tempos de incubação de forma a verificar se o tempo de incubação afetava a interação com o DNA plasmídico (Tabela 2.5).

Tabela 2.5-Soluções stock preparadas do complexo Pt1a incubados com DNA plasmídico (pDNA) pUC18, durante 5 horas, 2 horas, 30 minutos, 15 minutos e 5 minutos a 37°C.

Complexo	[Concentrações] μM	Tempo de Incubação (a 37°C)
Pt1a	10 μM , 25 μM	5 horas
	10 μM , 25 μM	2 horas
	10 μM , 25 μM	30 minutos
	10 μM , 25 μM	15 minutos
	10 μM , 25 μM	5 minutos

2.13 Determinação do mecanismo de clivagem do pDNA pelos complexos

De modo a determinar o mecanismo pelo qual os complexos conseguem clivar o pDNA foram realizados vários ensaios por exposição do pDNA obtido na secção 2.12.1 com agentes sequestradores de espécies reativas de oxigénio (ROS) nomeadamente azida de sódio (NaN_3) que sequestra radicais singletos de oxigénio (Nsubuga et al., 2021); ou de um agente indutor de danos oxidativos - peróxido de hidrogénio (H_2O_2) que via reação de Fenton leva à formação de radicais hidroxilo. Assim, espera-se determinar se os complexos têm capacidade de clivar o pDNA, se o mecanismo de clivagem ocorre pela presença de radicais de oxigénio e se o H_2O_2 tem capacidade de potenciar o efeito.

Assim para o efeito foram feitos vários ensaios de acordo com as condições identificadas nas Tabelas 2.6, 2.7.

Tabela 2.6-Soluções stock preparadas de cada complexo de Cu1a, Cu1b, Pt1a e de agentes sequestradores de azida de sódio (NaN₃) incubados com DNA plasmídico (pDNA) pUC18, durante 24h a 37°C.

Amostras	[Concentrações] µM
Azida de Sódio (NaN₃)	50 µM
Complexos	50 µM de Cu1a 50 µM de Cu1b 50 µM de Pt1a
Complexos+ NaN₃	50 µM Cu1a+ 50 µM de NaN ₃ ; 50 µM Cu1b+ 50 µM de NaN ₃ , 50 µM Pt1a+ 50 µM de NaN ₃

Foi realizado um terceiro ensaio com o agente azida de sódio (NaN₃) e peróxido de hidrogénio (H₂O₂) (Tabela 2.7).

Tabela 2.7-Soluções stock preparadas dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a e de agentes sequestradores de azida de sódio (NaN₃) e o controlo positivo H₂O₂ incubados com DNA plasmídico (pDNA) pUC18, durante 24 horas a 37°C.

Amostras	[Concentrações] µM
Azida de Sódio (NaN₃)	50 µM
H₂O₂	50 µM
Complexos	50 µM de Cu1a 50 µM de Cu1b 50 µM de Pt1a
Complexos+ NaN₃	50 µM Pt1a+ 50 µM de NaN ₃
Complexos+ H₂O₂	50 µM Cu1a+ 100 µM H ₂ O ₂ 50 µM Cu1b+ 100 µM H ₂ O ₂ 50 µM Pt1a+ 100 µM H ₂ O ₂

Todas as amostras acima descritas foram programadas para um volume final de 20 µL incubadas durante 24 horas, a 37°C.

Foram ainda preparadas amostras com 2 minutos de incubação a 37°C:

- 50 µM de Pt1a
- 50 µM Pt1a+ 100 µM H₂O₂

Todas as amostras foram preparadas em tampão Tris-HCl, 50 mM NaCl (pH 7). Foram também realizados controlos onde se expôs 100 ng de pUC18 a: tampão Tris-HCl, 50 mM NaCl (pH 7), DMSO 0,1% e à atividade da enzima de restrição HindIII (controlo de plasmídeo linearizado) durante 24 horas. Todas as amostras acima descritas (Tabela 2.6 e 2.7) foram programadas para um volume final de 20 µL incubadas durante 24 horas, a 37°C (salvo exceções indicadas).

As amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 0,8% (Tabela 2.6) e 1,0% (Tabela 2.7) em tampão TAE 1x com *Gel Red* 0,0015% e uma corrente constante de 70 V aplicada durante 90 minutos. Os géis foram obtidos tal como mencionado anteriormente (ver secção 2.12.2).

2.14 Potencial angiogénico *in vivo*

De forma a avaliar o potencial angiogénico dos complexos recorreram-se a modelos *in vivo* de ovos de galinha pelo método *ex-ovo* CAM (*Chick Chorioallantoic Membrane*). Estes foram adquiridos no Bombarral através da empresa Pinto Valouro. Os ovos fertilizados foram incubados a 37°C, durante 72 horas. Após o tempo de incubação os ovos foram abertos e estabilizados durante 24h numa estufa a 37 °C em caixas individuais de pesagem (perfuradas), garantindo que o embrião e vasos sanguíneos se encontrassem visíveis.

Após a incubação, 4 O-rings de silicone foram colocados sobre as zonas com maior número de vasos sanguíneos. A cada O-Ring foram colocados 40 µL de PBS 1x com concentração igual ao IC₅₀ dos complexos Cu1a, Cu1b, Pt1a e o respetivo controlo veículo de DMSO 0,1% (v/v) em PBS 1x.

A região limitada por cada O-ring foi fotografada imediatamente após a adição dos complexos, bem como após 24 horas e 48 horas de incubação a 37°C. As imagens foram capturadas com uma câmara microscópica digital USB (Opti-Tekscope OT-V1). A análise das imagens foi realizada através do *software ImageJ*.

2.15 Migração Celular

A motilidade e direcionamento das células cancerígenas constitui um desafio na eficácia de tratamentos contra o cancro. Por esse motivo foi realizado um ensaio que demonstra a capacidade do complexo metálico interagir com fibroblastos através da sua capacidade migratória.

Numa placa de 24 poços (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) foram cultivados fibroblastos numa densidade celular 1×10^5 células/mL. As placas foram incubadas durante 24h numa estufa a 37°C, CO₂ a 5% (v/v) e humidade relativa a 99% (v/v) (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão), até obter uma monocamada confluyente de células.

Após a incubação, foi realizado um risco no centro de cada poço das placas, usando uma ponta de 200 µL estéril. Seguidamente, o meio foi substituído por meio com o IC₅₀ dos complexos ou com os respetivos controlos de DMSO 0,1% (veículo), cisplatina (5 µM) e doxorubicina (6 µM), estes dois últimos como controlos positivos e as placas foram colocadas a incubar numa estufa a 37°C. As placas foram fotografadas num microscópio invertido (Nikon TMS, Nikon Instruments, Tóquio, Japão) com ampliação 4x (logo após a exposição aos complexos (0 h), 24 h e 48 h seguintes).

Através do *software ImageJ* foi realizada uma medição a largura do risco e, com base nesses dados foi calculada a percentagem de remissão do mesmo (associada à capacidade de migração dos fibroblastos).

2.16 ICP-AES- Internalização dos Complexos

De forma a avaliar a internalização dos complexos de cobre Cu(II) e de platina, Pt(II) nas células recorreu-se à técnica de Espetrometria de emissão atómica com plasma indutivo (ICP-AES, do inglês: *Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectroscopy*) para a linha celular HCT116doxR e para os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a.

Para este ensaio, as células foram cultivadas numa densidade celular de 4×10^6 células/mL num frasco de cultura de 25 cm² (SPL Life Sciences, Coreia do Sul). As placas foram incubadas durante 24 horas, numa estufa de CO₂, a 37 °C, 5 % (v/v) de CO₂ e 99 % de humidade relativa (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão).

Após este tempo, o meio foi substituído por uma solução de meio DMEM completo contendo 10 vezes a concentração igual ao IC₅₀ dos complexos ou 0,1 % (v/v) de DMSO (veículo). As células foram incubadas nas mesmas condições anteriores durante 3 e 6 horas.

Após os tempos de incubação, os 5 mL de meio em que se encontravam as células e 1ml de PBS 1x usado para lavar os poços foram retirados e guardados em tubos *falcon* de 15 ml (Tubos P) (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) e centrifugados (800 xg durante 5 minutos)

(Sigma 3-16K 10280, Tuttlingen, Alemanha). Depois da centrifugação, os sobrenadantes foram transferidos para num novo tubo de 15 mL (Tubos S) (SPL Life Sciences, Coreia do Sul).

As células contidas nos poços foram tripsinizadas com 2 mL de *TrypLETM Express*. A tripsina é recolhida nos tubos falcon de 15 mL (Tubos S) e foram colocados a centrifugar a 750 xg, 5 minutos (Sigma 3-16K 10280, Tuttlingen, Alemanha). Antes das amostras serem analisadas foi adicionada Aqua-regia preparada de fresco.

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

2.17 Interação dos complexos com a albumina de soro bovino (BSA)

A capacidade dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a de interagir com proteínas foi avaliada através de espectroscopia de UV-Visível.

A albumina é a proteína plasmática mais abundante nos organismos vertebrados e tem sido fortemente utilizada como modelo proteico para avaliar a capacidade de interação/afinidade de pequenas moléculas para a mesma (Topală et al., 2014) (Shi et al., 2018). Dada a semelhança entre a albumina sérica bovina (BSA) e a albumina sérica humana (HSA) esta tem sido usada em inúmeros estudos de complexos metálicos (Samari et al., 2012; Sengupta et al., 2022; Wongsuwan et al., 2023).

2.17.1 Espetroscopia de absorção de UV-visível

Para os ensaios de espectroscopia UV-Vis usou-se uma concentração de BSA constante de 200 μM e concentrações de complexos a variar entre 10 e 100 μM . As amostras foram preparadas e diluídas em tampão fosfato 10 mM pH 7/NaCl 150 mM. Os espectros de absorção UV-Visível foram adquiridos através do espectrofotómetro Evolution 300 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) após uma incubação de 24 horas numa estufa a 37°C (SANYO CO2 Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão). As absorvâncias foram medidas numa gama de comprimentos de onda entre 245-500 nm em cuvettes de quartzo.

Paralelamente foram realizados controlos em que as soluções de BSA foram incubadas com DMSO nas mesmas concentrações presentes nas diferentes soluções de complexos.

2.17.2 Fluorescência

A fluorescência das amostras referidas na secção 2.17.1 foi igualmente analisada no fluorímetro CARY Eclipse (VARIAN, Califórnia, EUA), por excitação da molécula de BSA a 278 nm (pico máximo de absorção) e emissão entre os 290 e 500 nm. O setup foi colocado na velocidade lenta (120 nm/minutos) utilizando slits de 5 nm. O valor de absorvância do tampão contendo DMSO (nas respetivas %) foi descontado a cada amostra.

2.18 Estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm SEM de pelo menos dois a três ensaios biológicos independentes, com duplicados técnicos em cada um. Para análise dos resultados foi conduzida utilizando o *software GraphPadPrism 8.0* e os métodos estatísticos utilizados foram *One-way ANOVA* ou *Student's t-test*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos para um $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Potencial Citotóxico

O ensaio de MTS é uma técnica comum e amplamente utilizada para avaliar a viabilidade celular (mais concretamente a viabilidade mitocondrial) e a citotoxicidade de complexos em diferentes linhas celulares.

A viabilidade celular foi obtida após a incubação durante 48 horas numa gama inicial de concentrações (0,1-50 μM) dos complexos de Cu(II) e de Pt(II) em três linhagens de células tumorais. As linhas celulares utilizadas têm o objetivo de proporcionar uma compreensão mais aprofundada sobre a eficácia dos complexos em diferentes tipos de cancros, nomeadamente cancro colorretal, HCT116, cancro colorretal com resistência a agentes quimioterapêuticos, HCT116doxR, e carcinoma do ovário, A2780. Foi igualmente analisada a viabilidade celular em fibroblastos primários saudáveis originários da derme, para efeitos comparativos de citotoxicidade. Esta abordagem multifacetada foi adotada com a finalidade de identificar a linha celular mais seletiva e promissora para prosseguir com estudos subsequentes. Por meio desta análise foi possível obter uma visão mais abrangente da capacidade antiproliferativa dos complexos em células tumorais específicas.

3.1.1 Ensaios viabilidade celular em 2D

As viabilidades celulares em HCT116 e HCT116doxR em função das várias concentrações de complexos de Cu(II) e Pt(II) estão representadas nas Figuras 6.2 – 6.3 (Anexo 2).

Por análise das Figuras 6.2 – 6.3 (Anexo A2), observa-se uma diminuição da viabilidade celular à medida que as concentrações dos complexos de cobre (Cu1a, Cu1b, Cu1d, Cu2c) e dos complexos de platina (Pt1a, Pt1b e Pt1d) aumentam. A partir das Figuras 6.2-6.5, é possível verificar que os complexos Pt2a, Pt2b, Pt2c, Pt2d, Cu2a, Cu2b, Cu2d não apresentaram qualquer efeito antiproliferativo significativo para ambas as linhas celulares tumorais de carcinoma colorretal (HCT116 e HCT116doxR) assim como na linha tumoral do carcinoma do ovário (A2780) e em fibroblastos, uma vez que não se observa uma redução da viabilidade celular significativa para concentrações até 50 μM .

A partir dos dados de viabilidade celular, foram calculados os valores de IC_{50} relativos (concentração à qual se obtém 50% da viabilidade celular) de cada complexo para as linhas celulares respectivas (Tabela 3.1) (Lenis-Rojas et al., 2021).

Ao comparar os valores de viabilidades celulares (Anexo 2) e os respectivos IC_{50} (Tabela 3.1) entre as diferentes linhas celulares, a linha HCT116doxR destaca-se como a linha em que a maioria dos complexos apresenta uma maior citotoxicidade (menor IC_{50}).

Acresce que ao analisar a Tabela 3.1 e a Figura 6.4 (em anexo), é possível verificar que todos os complexos testados exibem uma menor citotoxicidade na linha celular A2780, em comparação com as outras linhas tumorais, seguindo a ordem de citotoxicidade: Cu1d>Cu1a>Cu1b>Pt1a>Pt1b>Pt1d>Cu2c.

Na linha celular HCT116doxR, os complexos Cu1a e Cu1b, bem como o complexo de Pt1a destacam-se como os mais promissores dado que apresentam menores IC_{50} (inferiores a 1 μM ; ou seja, maior citotoxicidade), seguindo a ordem Cu1a<Cu1b< Pt1a, quando comparadas com a linha celular HCT116 sensível. Estes resultados são particularmente relevantes dado que esta linha celular mimetiza a resistência adquirida, por muitos dos doentes com cancro colorretal, via a ativação da P-glicoproteína (Pg-P), um transportador de efluxo de fármacos que constitui um alvo fundamental na resistência à doxorubicina (Pedrosa et al., 2018). O complexo Cu1d revelou ser o quarto mais citotóxico em HCT116 sensível (Figura 6.2) e em HCT116doxR (Figura 6.3), com IC_{50} em torno de 0,3. Quanto ao complexo Pt1d, este exibiu citotoxicidade moderada nestas linhagens com um IC_{50} de cerca de 3 μM . O complexo Cu2c foi o que apresentou menor citotoxicidade dentro dos complexos com atividade antiproliferativa, apresentando um IC_{50} de 15 μM em HCT116doxR e 22,25 μM em HCT116.

Tabela 3.1-Valores de IC₅₀ e IS relativo dos complexos nas linhas celulares HCT116, HCT116doxR, A2780 e fibroblastos após a exposição aos complexos por 48 horas. Estes valores correspondem ao valor médio + SEM de pelo menos dois ensaios independentes.

Complexos	IC ₅₀				IS		
	HCT116	HCT116 doxR	A2780	Fibroblastos	HCT116	HCT116 doxR	A2780
Pt 1a	1,184 ± 0,01	0,683 ± 0,03	2,317± 0,1	IC ₅₀ >50	42,2	73,1	21,6
Pt 1b	1,660 ± 0,05	2,144 ± 0,04	5,681 ± 0,04	IC ₅₀ >50	30,1	23,3	8,9
Pt 1d	3,011 ± 0,03	2,450 ± 0,1	6,057 ± 0,2	IC ₅₀ >50	16,6	20,4	8,3
Pt 2a	IC ₅₀ >50	IC ₅₀ >50	-	IC ₅₀ >50	-	-	-
Pt 2b	IC ₅₀ >50	IC ₅₀ >50	-	IC ₅₀ >50	-	-	-
Pt 2c	IC ₅₀ >50	-	-	IC ₅₀ >50	-	-	-
Pt 2d	IC ₅₀ >50	IC ₅₀ >50	-	IC ₅₀ >50	-	-	-
Cu 1a	0,284 ± 0,03	0,239 ± 0,02	0,533 ± 0,07	9,259 ± 0,9	32,5	38,6	17,4
Cu 1b	0,213 ± 0,05	0,290± 0,02	0,569 ± 0,06	13,3 ± 1,0	62,4	45,8	23,4
Cu 1d	0,359 ± 0,04	0,310 ± 0,01	0,481 ± 0,08	6,421 ± 0,5	17,8	20,7	13,3
Cu 2a	IC ₅₀ >50	IC ₅₀ >50	-	IC ₅₀ >50	-	-	-
Cu 2b	IC ₅₀ >50	IC ₅₀ >50	-	IC ₅₀ >50	-	-	-
Cu 2c	22,250 ± 0,2	15,220 ± 0,05	-	15,58 ± 1,1	0,7	1,0	-
Cu 2d	IC ₅₀ >50	IC ₅₀ >50	-	IC ₅₀ >50	-	-	-

É importante salientar que na identificação de novos complexos metálicos para o tratamento do cancro, deve ter-se em consideração o impacto que estas moléculas podem ter em células saudáveis. Por essa razão, este ensaio foi também realizado numa linhagem de células humanas saudáveis de fibroblastos primários (Figura 6.5 em anexo). Estas células desempenham um papel crucial no microambiente tumoral, tornando seu estudo fundamental (Roma-Rodrigues et al., 2019). Os valores de viabilidade celular e IC₅₀ foram determinados nos fibroblastos primários, e os índices de seletividade IS (do inglês Selectivity Index) foram calculados como a razão entre o IC₅₀ dos fibroblastos e o IC₅₀ da linhagem celular tumoral

correspondente (Tabela 3.1). Quando analisamos os valores de IC_{50} , em fibroblastos, para os complexos mais promissores (Cu1a, Cu1b e Pt1a), estes apresentam-se relativamente mais elevados que os valores nas respetivas linhagens tumorais, indicando a menor citotoxicidade neste tipo de células saudáveis (Tabela 3.1). O complexo Cu2c é o único dos complexos testados que é mais citotóxico em fibroblastos comparativamente às linhas tumorais ($IS \leq 1$), uma indicação de que este complexo não será promissor para o tratamento destes tipos de cancro (Tabela 3.1).

É de notar que, os complexos mais promissores (Cu1a, Cu1b e Pt1a) também são os que apresentam maiores IS, na ordem Pt1a > Cu1b > Cu1a, em ambas as linhas celulares de carcinoma colorretal, sensível e resistente e com exceção do Cu1b, estes valores são superiores em HCT116doxR relativamente a HCT116 (Tabela 3.1). Assim na Tabela 3.1 destaca-se o complexo Pt1a como um complexo que não apresenta qualquer efeito antiproliferativo em fibroblastos ($IC_{50} > 50 \mu M$) e um IS de aproximadamente 73, que indica a sua capacidade de seletivamente afetar as células HCT116doxR, e um elevado potencial como futuro agente quimioterapêutico direcionado para esse contexto celular específico. Pelo contrário, os complexos Cu1a e Cu1b, embora apresentem um menor IC_{50} entre os complexos ($\sim 2 \mu M$), exibem alguma citotoxicidade em fibroblastos. Ainda assim, estes complexos continuam a possuir os maiores índices de seletividade na linha HCT116doxR. Embora o Cu1b apresente menor IC_{50} e maior IS, em HCT116, a escolha da linhagem celular recaiu sobre a HCT116doxR pela capacidade de simular a resistência adquirida por muitos dos doentes.

Na linha celular A2780, a maioria dos complexos apresentou índices de seletividade inferiores em comparação com as outras duas linhas tumorais (Tabela 3.1). Salieta-se que os 3 complexos mais promissores (complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a) continuam a apresentar IS mais elevados quando comparados com os restantes complexos, surgindo novamente como os mais promissores.

Assim, os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a são os que apresentam uma maior janela terapêutica para todas as linhas, em particular HCT116doxR.

De modo a perceber se a citotoxicidade dos complexos é atribuída aos seus respetivos ligandos, é importante avaliar igualmente a sua citotoxicidade em HCT116doxR (a linhagem selecionada) e em fibroblastos. Os valores de IC_{50} e de IS estão detalhados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Valores de IC₅₀ relativo e IS dos ligandos nas linhas celulares HCT116doxR e fibroblastos. As células foram expostas aos complexos durante 48 horas. Valores correspondem ao valor médio + SEM de pelo menos dois ensaios independentes.

Ligandos	IC ₅₀		IS
	HCT116doxR	Fibroblastos	HCT116doxR
L1a	~0,175	IC ₅₀ >50	285,1
L1b	0,241 ± 0,4	IC ₅₀ >50	207,8
L1d	0,200 ± 0,05	19,080 ± 0,1	95,4
L2a	IC ₅₀ >50	IC ₅₀ >50	-
L2b	IC ₅₀ >50	IC ₅₀ >50	-
L2c	~11,500	~40,81	3,5
L2d	~14,650	IC ₅₀ >50	3,4

Através dos resultados de viabilidade (Figura 6.7, em anexo A2), podemos inferir que o ligando L1a, compartilhado pelos complexos Cu1a e Pt1a, apresenta citotoxicidade em HCT116doxR, no entanto, não exibe qualquer citotoxicidade em fibroblastos. Isso sugere que, o ligando quando complexado com o metal têm menor impacto citotóxico em células tumorais. Por outro lado, o ligando L1b, que está associado ao complexo Cu1b, demonstrou um valor de IC₅₀ praticamente equivalente ao do Cu1b nas células HCT116doxR, no entanto, não exibiu qualquer efeito citotóxico em fibroblastos. Já o ligando L1d, que está presente nos complexos Cu1d e Pt1d, apresentou maior citotoxicidade em fibroblastos quando testado isoladamente. O ligando L2c compartilhado pelo complexo Cu2c mostra menor toxicidade em fibroblastos do que o próprio complexo.

3.1.2 Ensaios viabilidade celular em 3D

A citotoxicidade dos complexos mais promissores foi também avaliada em modelos 3D de esferóides de HCT116doxR de modo a comparar o potencial antiproliferativo dos complexos de Cu 1a, Cu1b e Pt1a em culturas 2D e 3D. O ensaio de MTS foi realizado em esferóides com 6 dias de incubação seguida de uma exposição aos complexos por 48h. Os resultados das viabilidades celulares e dos valores de IC₅₀ respetivos, encontram-se em anexo na Figura 6.6 e na Tabela 3.3.

Tabela 3.3- Valores de IC₅₀ relativo e IS dos complexos selecionados na linha celular HCT116doxR e em modelos esferóides constituídos por células de HCT116doxR. As células foram expostas aos complexos por 48 horas. Os valores correspondem ao valor médio + SEM de pelo menos dois ensaios independentes.

Complexos	IC ₅₀		IS
	HCT116doxR	3D HCT116doxR	3D HCT116doxR
Pt 1a	0,683 ± 0,03	IC50 >75	0,7
Cu 1a	0,239 ± 0,02	~10	0,9
Cu 1b	0,290 ± 0,02	33,86 ± 0,4	0,4

O valor de IC₅₀ dos esferóides expostos a Pt1a mostrou ser maior que 75 µM (110x maior), enquanto o valor do IC₅₀ do Cu1a foi 50x e para o Cu1b foi 116x superior ao obtido em cultura 2D de HCT116doxR. O aumento de IC₅₀ à medida que aumenta a complexidade celular é um fenómeno comum em estudos de toxicologia e farmacologia (Zanoni et al., 2016). Isso sugere que os esferóides requerem uma concentração maior dos complexos metálicos para alcançar o mesmo efeito biológico. Esta diferença é atribuída essencialmente à complexidade dos tumores sólidos que apresentam um gradiente associado e um processo de difusão mais lento e irregular, que conseqüentemente leva a uma resposta celular diferencial. Deste modo a concentração usada para esferóides será mais semelhante à concentração utilizada em ensaios *in vivo* (Choroba et al., 2023).

Os modelos de cultura 2D são limitados em reproduzir fielmente as propriedades encontradas nos tumores sólidos e não conseguem mimetizar adequadamente a resistência tumoral à terapia (Zanoni et al., 2016). Por outro lado, os esferóides (modelos 3D) proporcionam uma estrutura mais organizada e complexa que é capaz de imitar as características dos tumores, incluindo um perfil de resistência semelhante ao observado *in vivo* (Nunes et al., 2019).

Contudo, é importante salientar que, os ensaios em esferóides também têm algumas desvantagens, como a falta de métodos padronizados e simplificados em comparação com os modelos 2D (Nunes et al., 2019). Os modelos 2D têm a vantagem de contar com uma literatura extensa e uma variedade de técnicas e tecnologias disponíveis para análises mais rápidas e eficazes (Nunes et al., 2019). Por essa razão, os ensaios subsequentes foram realizados em modelos 2D pela necessidade de equilibrar a representatividade dos resultados com a praticidade e a disponibilidade de recursos para a investigação.

3.2 Estabilidade

Antes de continuar os estudos biológicos é fundamental avaliar a estabilidade e a solubilidade dos complexos, dado que estes fatores desempenham um papel crucial no sucesso dos ensaios.

A estabilidade dos complexos foi avaliada por meio de espectroscopia de UV-visível através da variação dos picos de absorvância ao longo do tempo. No contexto desta análise, os complexos em forma de pó foram inicialmente solubilizados no solvente DMSO 100% e, posteriormente, em meio de cultura RPMI 0% FBS sem fenol *red* numa concentração final de 50 μM . Estas soluções, bem como os respetivos controlos negativos (meio RPMI sem a presença de complexos e com a mesma % de DMSO que em cada solução de complexo) foram incubados ao tempo 0h (após dissolução) e após 3, 6, 24 e 48h numa estufa a 37°C. Após este tempo os espectros de absorção (Anexo A1 Figura 6.1) foram traçados numa faixa de comprimentos de onda de 220-800 nm.

As bandas de absorção de alta energia correspondem a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ e $n \rightarrow \pi^*$ com picos na faixa dos 230-330 nm e 330-400 nm que podem corresponder aos anéis aromáticos de terpiridina presente em todos os complexos (Choroba et al., 2023; Maroń et al., 2018).

Para os espetros correspondentes ao complexo Cu1a, é possível identificar 3 picos nas regiões de 230-270 nm, 270-300 nm, 300-360 nm (Fig. 6.1 (A, B, C)). Analisando a Figura 6.1 (A), observa-se uma elevada perda de solubilidade entre a 0h e as 48h, salientando-se

igualmente uma alteração espectral com redução do pico intermédio às 48h. Com o objetivo de avaliar se esta alteração também é evidente em diferentes tempos de incubação, foram realizadas incubações às 3, 6, e 24h (Fig. 6.1 (B) e (C)). Observa-se assim uma contínua perda de solubilidade, mas parece haver uma manutenção dos 3 picos característicos até às 24h (Fig. 6.1 (B)).

Os espectros do complexo Cu1b apresentam igualmente as 3 bandas de absorvância a 230-260 nm, 260-300 nm e um pico menor a 310-360 nm (Fig. 6.1 (D, E e F)). Este complexo, apresenta uma grande perda de solubilidade e alterações espectrais entre as 0h e as 48h de incubação (Fig. 6.1 (D)). Quando se analisou outros tempos de incubação, observa-se que até às 6h apesar de haver uma redução da intensidade dos picos, associada a uma perda de solubilidade, mantém todas as características (Fig. 6.1 (E e F)). Às 24h, observa-se uma redução quase total do pico máximo (pico em comprimentos de onda intermédios - 260-300 nm), que é ainda mais significativa às 48h (Fig. 6.1 (D)).

O complexo de Pt1a exhibe picos na mesma região espectral que o complexo Cu1b (Fig. 6.1 (G, H)). Após o período de incubação de 24 horas, verifica-se uma diminuição na solubilidade do complexo (Fig. 6.1 (G, H)). No entanto, observam-se poucas variações na intensidade das absorvâncias ao longo do tempo que possam acarretar problemas substanciais de solubilidade e estabilidade (Choroba et al., 2023).

A estabilidade diminuída de complexos de cobre (Cu(II)) quando comparada com complexos de platina (Pt(II)) já tinha sido descrita por outros (Maroñ et al., 2018).

De uma forma geral, todos os complexos mantêm a sua estabilidade nas primeiras horas de incubação (0-6h), tempo que geralmente é necessário para a internalização dos complexos nas células (Choroba et al., 2021, 2023; Lenis-Rojas, Roma-Rodrigues, et al., 2022) (Figura 6.1).

De qualquer modo, para garantir o máximo de solubilidade e estabilidade dos complexos durante os ensaios, todas as soluções utilizadas nos ensaios biológicos foram preparadas de fresco e bem homogeneizadas, antes de realizar cada ensaio.

3.3 Potencial Apoptótico

3.3.1 Marcação dupla Anexina V-FITC e IP

De forma a perceber o mecanismo pela qual as células HCT116doxR perdem viabilidade, e nomeadamente o tipo de morte celular que está a ser induzida, começou-se por estudar a uma das formas mais comuns de morte programada de células epiteliais, a apoptose (Peng et al., 2022), inicialmente utilizando um ensaio quantitativo com dupla marcação com anexina V-FITC (FITC, *fluorescein isothiocyanate*) e iodeto de propídio (IP) através de citometria de fluxo (Maroñ et al., 2018).

A anexina V-FITC é uma sonda que se liga preferencialmente ao fosfolípido iónico fosfatidilserina (PS) (Amiri Rudbari et al., 2022). Em células saudáveis, o PS está localizado predominantemente no lado interno da membrana plasmática. Nos estádios iniciais de apoptose, a membrana sofre alterações estruturais que permitem a translocação do PS para a membrana externa plasmática (Mendo et al., 2015). Em contrapartida, o iodeto de propídio é um agente intercalante do DNA que permite marcar células com comprometimento da membrana plasmática (geralmente estádios finais de apoptose ou necrose), emitindo fluorescência vermelha quando interage com os ácidos nucleicos (Lenis-Rojas et al., 2021).

Assim, este ensaio permite distinguir células em 4 diferentes condições: as células viáveis (FITC-, IP-), em apoptose inicial (FITC+, IP-), apoptose tardia (FITC+, IP+) e necrose (FITC-, IP+).

Os resultados da exposição de células HCT116doxR aos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a, bem como ao controlo negativo de DMSO 0,1% (v/v) e ainda aos controlos positivos de doxorrubicina (6 μ M) e cisplatina (5 μ M) encontram-se na Figura 3.1 e Tabela 3.4. Assim, podemos observar que, no controlo negativo de DMSO 0,1%, a taxa de viabilidade celular foi de 87,4%, em conformidade com que era esperado (Choroba et al., 2023) (Sequeira et al., 2021) (Figura 3.1 e Tabela 3.4). Verificou-se adicionalmente uma proporção de 9,5% de células em apoptose inicial, 1,6% de apoptose tardia e 1,5% de necrose. Em relação às células tratadas com doxorrubicina, observou-se uma menor percentagem de células viáveis, cerca de 59,8%, com 26,6% de apoptose inicial, 13,9% de apoptose tardia e a maior percentagem de necrose de 9,8%, dados que são corroborados em literatura (Sequeira et al., 2021). Como controlo positivo foi utilizada a cisplatina, que exibiu a maior percentagem de células em apoptose inicial com 40,1% e 25,8% em apoptose tardia. Tais resultados estão em concordância com Susilo et al.

em que demonstraram a indução de apoptose tanto pela cisplatina como pela doxorrubicina (Susilo et al., 2021). As concentrações de cisplatina e doxorrubicina usadas no estudo foram determinadas com base em ensaios prévios realizados no laboratório (Choroba et al., 2023).

Os resultados demonstrados na Figura 3.1 e Tabela 3.4 indicam que as células expostas aos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a exibem um aumento estatisticamente significativo da percentagem de células em processo apoptótico, quando expostas a concentrações correspondentes ao IC₅₀.

No caso das células expostas ao complexo Cu1a, foi observada uma taxa de sobrevivência celular de 23,1%, sendo a maioria das células encontradas em apoptose inicial (55,2%), 21,7% em apoptose tardia e ausência de necrose (Figura 3.1 e Tabela 3.4). Por outro lado, os complexos Cu1b e Pt1a apresentam uma percentagem aproximadamente 30-40% de células em apoptose inicial e 6-10% em apoptose tardia. O complexo Cu1a, à semelhança com a cisplatina, induz uma maior percentagem de células em apoptose comparado com os complexos Cu1b e Pt1a (Palion-Gazda et al., 2021)(Figura 3.1 e Tabela 3.4).

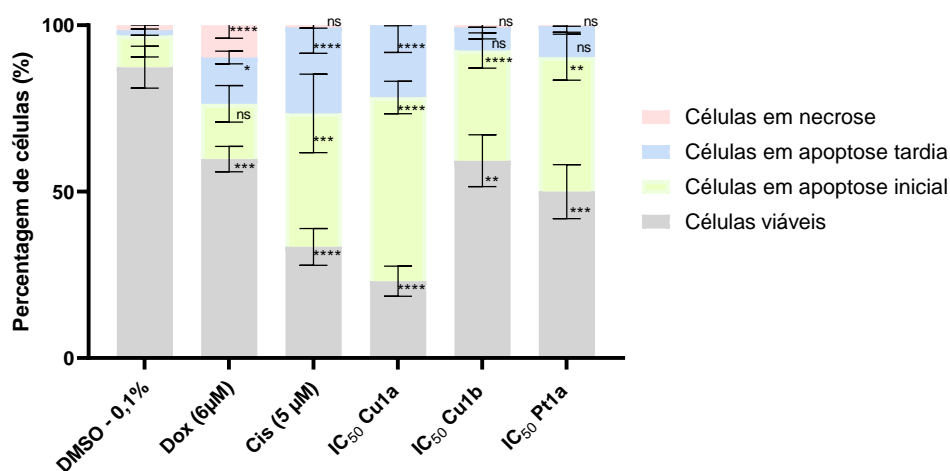


Figura 3.1- Quantificação de células tumorais HCT116doxR viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose marcadas com Anexina V-FITC e IP foi realizada por citometria de fluxo após exposição aos complexos Cu 1a, Cu 1b e Pt1a por 48 horas numa concentração correspondente ao IC₅₀ respetivo. São representados igualmente 3 controlos (DMSO 0,1%, cisplatina e doxorrubicina). Os resultados fornecidos são representados em média ± SEM obtidos a partir de pelo menos dois ensaios biológicos independentes. Para avaliar a significância estatística destes resultados em relação ao grupo de controlo tratado com DMSO foi utilizado o método *One-Way ANOVA* (* p ≤ 0,05; ** p ≤ 0,005; *** p ≤ 0,0005; **** p ≤ 0,0001).

Tabela 3.4- Percentagem de células viáveis, apoptóticas iniciais e tardias e necróticas em células HCT116doxR expostas aos controlos de DMSO 0,1% (controlo veículo), Doxorubicina e Cisplatina como controlos positivos, exposição ao IC₅₀ dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a. As células foram expostas num período de incubação de 48h. Os valores foram obtidos a partir da Figura 3.1.

Controlos	Células Viáveis	Apoptose Inicial	Apoptose Tardia	Necrose
Células Marcadas	73,5% ± 7,9	22,7% ± 8,8	3,3% ± 1,1	0,5% ± 0,4
DMSO	87,4% ± 6,3	9,5% ± 6,4	1,6% ± 1,5	1,5% ± 1,1
Cisplatina	33,4 % ± 5,5	40,1% ± 11,8	25,8% ± 7,7	0,9 % ± 1,1
Doxorrubicina	59,8% ± 3,8	16,6% ± 5,5	13,9% ± 1,9	9,8% ± 4,0
Complexos				
Cu1a	23,1% ± 4,5	55,2 % ± 4,9	21,7% ± 8,2	0,0% ± 0,1
Cu1b	59,3% ± 7,8	33,1% ± 5,3	6,9 % ± 3,4	0,7% ± 0,6
Pt1a	50% ± 8,1	40,4% ± 6,9	9,3% ± 1,8	0,3% ± 0,3

Notavelmente, o complexo Cu1a mostra um potencial terapêutico mais elevado e apresenta maior citotoxicidade (Tabela 3.1). As células tratadas com os complexos metálicos encontram-se predominantemente em apoptose inicial.

A capacidade de complexos de Cu(II) e de Pt(II) induzirem apoptose já havia sido descrita anteriormente (Sequeira et al., 2021; Maroń et al., 2018).

A percentagem de células que se encontram em necrose foi inferior a 1% em todas as condições estudadas, com exceção das células expostas à doxorubicina (9,8%) e DMSO (1,5%), sugerindo que os complexos não induzem necrose de modo significativo. Dado que o mecanismo de necrose envolve o recrutamento de moléculas inflamatórias e está associado à progressão tumoral, os complexos parecem ser promissores neste sentido.

Em condições de stress, a proteína pró-apoptótica BAX sofre uma mudança conformacional e adquire a capacidade de se translocar para a membrana externa mitocondrial. Isto resulta na disrupção do potencial de membrana e, conseqüentemente formação de poros (Lenis-Rojas, Carvalho, et al., 2022). Por este motivo, torna-se relevante investigar se o nível das proteínas pró- e anti-apoptóticas é alterado e se os complexos induzem alterações do potencial de membrana ($\Delta\Psi_m$) (Mendo et al., 2015).

3.3.2 Potencial Mitocondrial

Em fases iniciais da apoptose, a rutura da membrana externa mitocondrial e a dissipação do potencial membranar (Ψ_M) são características que a distingue (Roma-Rodrigues et al., 2020). As alterações do potencial de membrana podem ser medidas através de técnicas como citometria de fluxo e representam um parâmetro essencial indicador do estado funcional da mitocôndria.

Para realizar esta análise, foi utilizada a sonda catiónica lipofílica *5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide* (JC-1) que permite avaliar despolarização ou hiperpolarização da membrana mitocondrial (Perelman et al., 2012). Em células saudáveis, a JC-1 acumula-se no interior eletronegativo da mitocôndria sob forma de agregados (fluorescência vermelha) quando o potencial de membrana é carregado positivamente (hiperpolarizado) (Roma-Rodrigues et al., 2020). No entanto, quando ocorre a despolarização do potencial da membrana mitocondrial existe uma diminuição na proporção da intensidade de fluorescência agregados/monómeros JC-1. Assim quando a integridade da membrana mitocondrial está comprometida a sonda JC-1 permanece sob forma de monómeros (fluorescência verde) (Roma-Rodrigues et al., 2020) (Amiri Rudbari et al., 2022).

Deste modo, células HCT116doxR foram expostas a concentrações correspondentes aos IC₅₀ de Cu1a, Cu1b e Pt1a. Posteriormente, as células foram marcadas com a sonda JC-1 e submetidas à análise por citometria de fluxo, com intuito de confirmar possíveis alterações no potencial de membrana mitocondrial induzidas pelos complexos cujos resultados se encontram na Figura 3.2.

A análise da Figura 3.2, revela que o rácio fluorescência vermelha para verde é inferior a 1 para os três complexos, bem como para o controlo positivo de cisplatina. O complexo Cu1a foi o complexo que induziu a maior despolarização com rácio de aproximadamente 0,79, seguido pelo Pt1a com um rácio de 0,82 e pelo Cu1b um rácio de 0,88.

Isto indica que a sonda JC-1 se encontra predominantemente na forma monomérica indicando uma perda do potencial de membrana e despolarização com significância estatística. Importa mencionar que a doxorubicina não induziu despolarização da membrana dado que a linhagem celular utilizada é resistente à doxorubicina e a concentração utilizada permite manter a resistência (Pedrosa et al., 2018) mas não é suficiente para uma alteração do potencial mitocondrial tal como observado por Choroba et al (Choroba et al., 2023).

Estes resultados para os três complexos vão ao encontro dos resultados obtidos na secção 3.3.1 e indução de apoptose (Figura 3.1 e Tabela 3.4).

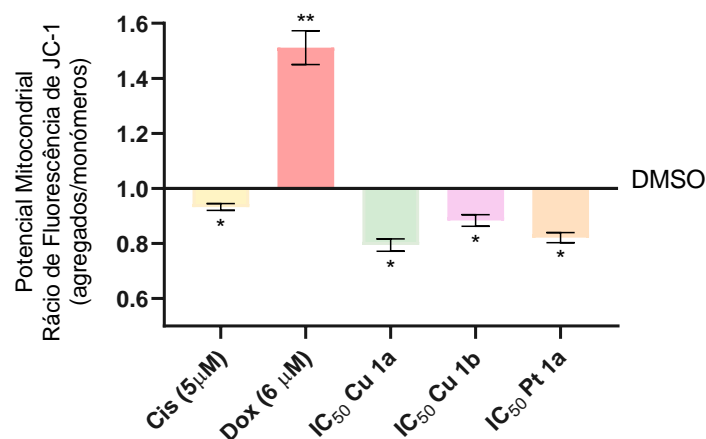


Figura 3.2- Potencial mitocondrial em células tumorais HCT116doxR após 48h de exposição a uma concentração correspondente ao IC₅₀ dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a. As células foram expostas ao controlo veículo de DMSO 0,1% e controlos positivos de cisplatina (5 µM) e doxorubicina (6 µM). Os dados representados encontram-se normalizados ao DMSO e apresentados como média ± SEM de dois ensaios independentes utilizando o método T-Student (** p ≤ 0.005 * p ≤ 0.05).

A perda da permeabilidade da membrana mitocondrial pode estar diretamente relacionada com o aumento de poros na membrana pelas proteínas apoptóticas, como a Bax com simultânea diminuição das proteínas anti-apoptóticas. Assim, é importante confirmar realmente este processo e se os complexos podem desencadear o mecanismo de apoptose pela via intrínseca.

3.3.3 Western Blot

A desregulação da via mitocondrial da apoptose é um dos eventos mais cruciais no contexto da carcinogénese. A família de proteínas BCL-2 desempenha uma função crucial na regulação desta via intrínseca compreendendo proteínas anti-apoptóticas (por exemplo, BCL-2 e BCL-xl) que previnem a disrupção membranar e pró-apoptóticas (por exemplo, Bax, Bak) que promovem a apoptose (Khodapasand et al., 2015) (Lenis-Rojas, Carvalho, et al., 2022).

O equilíbrio entre o rácio BAX/BCL-2 determina a suscetibilidade das células em optar pela via apoptótica intrínseca (rácio > 1) ou favorecer a sobrevivência celular (rácio < 1) (Lenis-

Rojas, Roma-Rodrigues, et al., 2022). Baixos níveis deste rácio podem resultar na resistência das células cancerígenas à apoptose. Portanto, existe uma clara relação entre a razão Bax/BCL-2 e o impacto na progressão e na agressividade do tumoral (Khodapasand et al., 2015).

A expressão de ambas as proteínas foram quantificadas pelas bandas obtidas por Western Blot após as células HCT116doxR serem incubadas durante 48h a concentrações correspondentes ao IC₅₀ dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a (Anexo A3 Figura 6.9). Como controlo negativo foi usado o DMSO 0,1% e a proteína β-actina utilizada para a normalização da quantidade total de proteína.

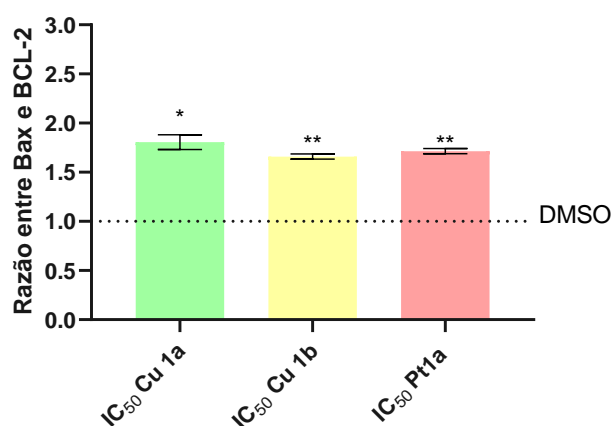


Figura 3.3- Rácio BAX/BCL-2 em células HCT116doxR após a incubação por 48h com o controlo veículo de DMSO 0,1% e o IC₅₀ dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a. Os dados foram normalizados ao controlo posteriormente normalizados com os resultados de β-actina. Os resultados fornecidos são representados em média ± SEM obtidos a partir de pelo menos dois ensaios biológicos independentes. Para avaliar a significância estatística destes resultados em relação ao grupo de controlo tratado com DMSO foi utilizado T-Student (* p≤ 0.05; ** p≤ 0.005).

Ao observar a Figura 3.3, é notório que, para todos os complexos o rácio BAX/BCL-2 foi superior 1, que indica de forma significativa níveis mais elevados da proteína pró-apoptótica BAX em comparação com a BCL-2, quando comparadas com o controlo com DMSO 0,1%. O complexo Cu1a foi o complexo que apresentou os níveis mais elevados de expressão, com um rácio de 1,80, seguido pelo Pt1a com rácio 1,71 e por último Cu1b com rácio 1,65. Estes resultados, que vão ao encontro aos resultados obtidos nas secções 3.3.1 e 3.3.2, que reforçam a hipótese de todos os complexos desencadeiam morte por apoptose intrínseca ou mitocondrial.

Apesar da confirmação da indução da apoptose, dada a heterogeneidade das células tumorais, onde algumas células na população total podem ter esses mecanismos inibidos (Peng et al., 2022)(Fitzgerald et al., 2022), torna-se importante perceber se os complexos têm capacidade de simultaneamente induzir outras vias de morte.

3.4 Potencial Autofágico

A autofagia é um processo catabólico amplamente conservado e fundamental para manter a homeostase celular. É um processo que envolve a degradação intracelular por meio de autofagolisossomas responsáveis por degradar o conteúdo luminal e permitir a reciclagem dos componentes celulares (Cooper, 2018).

A avaliação da capacidade dos complexos induzirem a autofagia foi realizada por citometria de fluxo, utilizando a sonda CYTO-ID® Green Detection Reagent Cyto- ID. Esta sonda emite fluorescência verde ao marcar os vacúolos autofágicos presentes na célula, sendo que quanto maior a fluorescência maior a proporção de autofagolisossomas (Lenis-Rojas, Roma-Rodrigues, et al., 2022)

Foram utilizados três controlos positivos: a doxorubicina, a cisplatina e o controlo de rapamicina (1500 nM) cuja concentração foi otimizada anteriormente em laboratório para a linha celular HCT116doxR utilizada (Choroba et al., 2023). A rapamicina é conhecida por induzir o processo de autofagia através do seu alvo mecanístico, o mTOR.

Na Figura 3.4, observa-se um aumento da intensidade da fluorescência verde em células expostas aos controlos de cisplatina, doxorubicina e rapamicina, assim como nos três complexos, em comparação com o controlo de DMSO 0,1%. Ao analisar de forma específica os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a revelaram um aumento de cerca de 2 vezes mais vesículas autofágicas. A doxorubicina foi o controlo positivo que apresentou a maior indução de autofagia entre todos controlos, com um aumento de 2,2 vezes maior em comparação com o controlo negativo (Figura 3.4).

Em resumo, os resultados reforçam a capacidade dos complexos induzirem o processo de autofagia, exibindo níveis comparáveis com os controlos positivos de doxorubicina e de cisplatina, embora ligeiramente superiores à rapamicina.

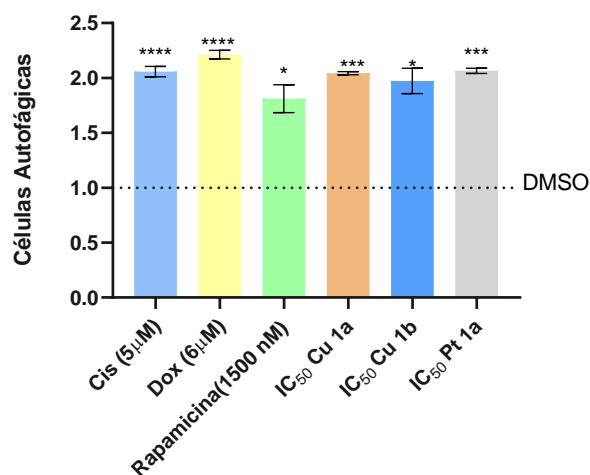


Figura 3.4- Quantificação das células tumorais HCT116doxR em autofagia por citometria de fluxo. Após exposição por 48 horas aos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a em concentração correspondente ao IC₅₀ respetivo. São representados igualmente 4 controlos (DMSO 0,1%, cisplatina e doxorubicina e rapamicina). Os resultados fornecidos são representados em média ± SEM obtidos a partir de pelo menos dois ensaios biológicos independentes. Para avaliar a significância estatística destes resultados em relação ao grupo de controlo tratado com DMSO foi utilizado o método T-Student (**** $p \leq 0,0001$; *** $p \leq 0,0005$; ** $p \leq 0,005$; * $p \leq 0,05$).

É bem documentado que a autofagia desempenha um papel significativo em resposta à exposição de células tumorais à cisplatina, assim como em complexos de platina (Choroba et al., 2021). Além disso, estudos anteriores têm evidenciado que complexos contendo derivados de terpiridina têm a capacidade de despoletar tanto mecanismos de apoptose como de autofagia em células cancerígenas de forma simultânea (Choroba et al., 2021). Esta convergência de vias de morte pode derivar de uma resposta adaptativa da população celular tumoral heterogénea (Choroba et al., 2021). Neste sentido, torna-se importante perceber o mecanismo pela qual as células perdem viabilidade na presença dos 3 complexos com indução simultânea de morte por apoptose e autofagia. Encontra-se amplamente descrito na literatura a relação entre a indução destes tipos de morte celular programadas e a produção de ROS (Khan et al., 2021; Nakamura & Takada, 2021; Poillet-Perez et al., 2015).

3.5 Produção de ROS

As espécies reativas de oxigénio (ROS) são produzidas naturalmente no decorrer do metabolismo celular. Este grupo inclui radicais livres de oxigénio extremamente reativos, além do peróxido de hidrogénio (H_2O_2). A geração de ROS acontece principalmente devido à libertação de eletrões nas mitocôndrias durante a cadeia transportadora de eletrões durante a respiração celular (Cooper, 2018). Os ROS podem surgir de fontes endógenas ou exógenas que desempenham um papel na carcinogénese e no desenvolvimento tumoral, causando danos ao DNA. A acumulação de níveis elevados ROS resulta em stress oxidativo nas células cancerígenas, uma condição que pode ser explorada, potenciando limites que ultrapassam a capacidade antioxidante intrínseca das células tumorais, como uma abordagem terapêutica direcionada (Khan et al., 2021). Sabe-se que complexos de Cu(II) e Pt(II) levam à indução de ROS (Choroba et al., 2021).

A produção de espécies reativas de oxigénio foi quantificada através da sonda *2',7-dichlorodihydrofluorescein diacetate* ($H_2DCF-DA$) que é rapidamente oxidada na presença de ROS, originando o composto *2',7-dichlorodihydrofluorescein* (DCF), cuja fluorescência emitida a 530 nm pode ser detetada por citometria de fluxo (Roma-Rodrigues et al., 2020). A intensidade da fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de ROS formadas.

No âmbito deste ensaio, as células HCT116doxR foram expostas durante 48h a 37°C aos complexos Cu1a, Cu1b, Pt1a. Como controlos positivos, foram utilizados a cisplatina, a doxorubicina e como controlo veículo o DMSO 0,1%. Foi usada como controlo positivo, uma solução de hidroperóxido de terc-butila (TBHP) a 42 μM correspondente ao IC_{50} determinado previamente em laboratório para a linha celular HCT116doxR. O TBHP é um peróxido orgânico altamente utilizado em estudos de stress oxidativo uma vez que ativa o mecanismo de apoptose mediada por caspases e a produção de ROS (Zhao et al., 2017).

Através da Figura 3.5, é possível verificar que os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a induziram níveis de produção de ROS 1,42x, 1,48x e 1,63x, respetivamente, superiores ao controlo de DMSO. Apesar da produção de ROS por parte dos complexos não ser superior à registada para os controlos positivos de doxorubicina e cisplatina, o valor induzido pelo Pt1a, é ligeiramente superior ao nível de ROS que o controlo de TBHP induz. As células expostas aos controlos de cisplatina e doxorubicina apresentaram uma produção de ROS superior à dos complexos cerca de 2,2x e 1,8 x mais respetivamente, ultrapassando até mesmo controlo positivo de TBHP (Figura 3.5).

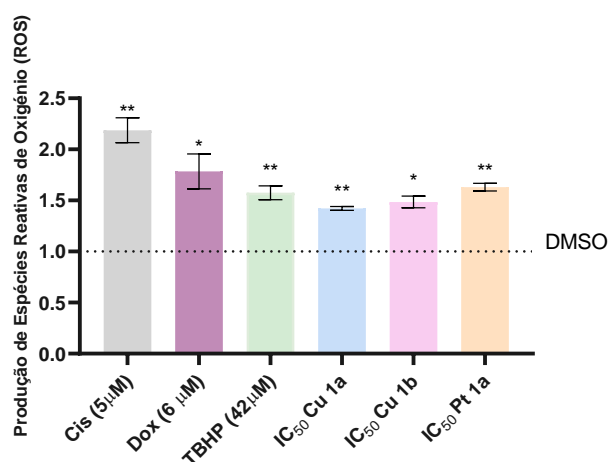


Figura 3.5-Quantificação da indução de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células tumorais HCT116doxR viáveis, após exposição aos complexos Cu 1a, Cu 1b e Pt1a em concentração correspondente ao IC₅₀ respetivo por 48 horas. São representados igualmente 4 controlos (DMSO 0,1%, cisplatina e doxorrubicina e TBHP). Gráfico normalizado para o DMSO. Os resultados fornecidos são representados em média ± SEM obtidos a partir de pelo menos dois ensaios biológicos independentes. Para avaliar a significância estatística destes resultados em relação ao grupo de controlo tratado com DMSO foi utilizado o método T-Student (***) $p \leq 0,0005$; ** $p \leq 0,005$; * $p \leq 0,05$).

A exposição das células ao complexo Pt1a mostrou a maior indução de ROS quando comparada com os restantes complexos, resultados estes que se encontram alinhados com os resultados obtidos para a alteração do potencial mitocondrial (Ver secção 3.3.2). Estudos anteriores já relataram a correlação entre o aumento de ROS e a morte celular, envolvendo complexos de Au(II), Cu(II) e Pt(II) com ligandos de terpiridina em células HCT116 (Choroba et al., 2021).

Os resultados obtidos na Figura 3.5 indicam então que quando as células HCT116doxR são expostas aos complexos metálicos Cu1a, Cu1b e Pt1a, ocorre um aumento significativo da produção de ROS que despoleta os mecanismos de morte por apoptose e autofagia (Figuras 3.1-3.4). É importante notar que a exposição a ROS pode desencadear stress genotóxico, um efeito frequentemente associado à quimioterapia (Srinivas et al., 2019). Com o objetivo de confirmar se o DNA pode ser um alvo dos complexos, foram realizados ensaios de progressão do ciclo celular, bem como ensaios de eletroforese em gel para analisar a interação e potencial clivagem dos complexos ao DNA plasmídico (pDNA).

3.6 Ciclo Celular

O ciclo celular compreende um conjunto sequencial de eventos celulares que asseguram a replicação e segregação do DNA. Ao longo do ciclo celular, existem vários pontos de verificação (*checkpoints*) que regulam as transições entre diferentes fases, quando as células se encontram em condições de stress. Um exemplo de *checkpoint* é o de danos no DNA que pode desencadear apoptose ou senescência (Chao et al., 2017).

Neste ensaio, foi investigado o efeito citostático dos complexos metálicos Cu1a, Cu1b e Pt1a, bem como a sua influência na progressão do ciclo celular, utilizando o IP. Este fluoróforo intercalante do DNA, permite a análise do conteúdo de DNA nas várias fases do ciclo (G0/G1, S e G2/M) (a intensidade da fluorescência emitida pelo IP duplica com a duplicação da quantidade de DNA nas fases G1 e G2) (Reigosa-Chamorro et al., 2021) cuja detecção pode ser realizada por citometria de fluxo. As células HCT116doxR foram expostas às concentrações correspondentes ao IC₅₀ dos complexos por 9, 12, 18 e 24 horas de incubação. Foi ainda usada uma solução de DMSO 0,1% (v/v) como controlo veículo e a doxorubicina e a cisplatina como controlos positivos.

Para garantir que todas as células se encontrassem na mesma fase no ciclo (fase S) quando expostas aos três complexos metálicos e controlos, utilizou-se um duplo bloqueio de timidina (Morais et al., 2018).

Os resultados ilustrados na Figura 3.6, através da percentagem de células, mostram que o controlo de cisplatina teve efeito citostático em G2/M após 24 horas de incubação. A doxorubicina não apresentou paragem ou retardo do ciclo celular consequência da resistência induzida nesta linha celular. Por outro lado, os complexos de cobre, Cu1a e Cu1b, apresentam um atraso no ciclo celular em G2/M após 12 horas de incubação. O complexo Pt1a ocasionou um atraso em G0/G1 ao fim 18h de incubação. Além disso, os complexos Cu1a e Cu1b também apresentam um atraso no ciclo celular em G0/G1 às 18h, possivelmente devido à falta de recuperação do atraso observado após as 12 horas de incubação.

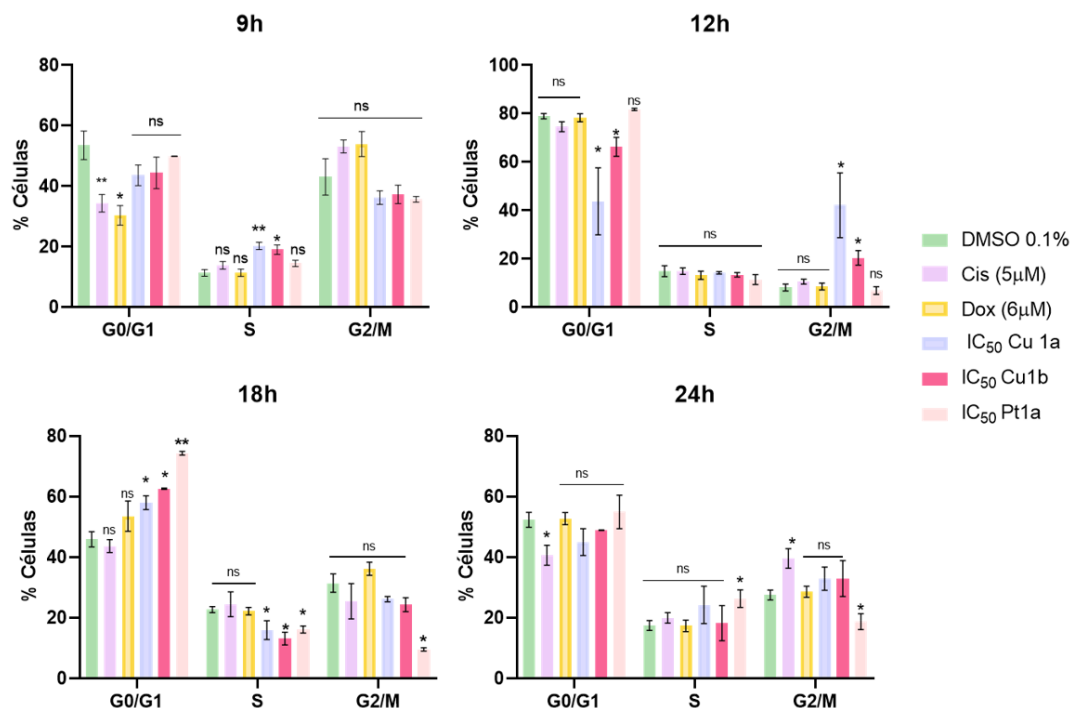


Figura 3.6- Progressão do ciclo celular em células tumorais HCT116doxR viáveis, após exposição por 48 horas aos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a em concentração igual ao IC₅₀. São representados igualmente 3 controlos (DMSO 0,1%, cisplatina e doxorubicina). Os resultados fornecidos são representados em média ± SEM obtidos a partir de pelo menos dois ensaios biológicos independentes. Para avaliar a significância estatística destes resultados em relação ao grupo de controlo tratado com DMSO foi utilizado o método T-Student (***) $p \leq 0,0005$; ** $p \leq 0,005$; * $p \leq 0,05$).

Estes resultados (Figura 3.6) sugerem que os complexos de cobre e platina apresentam um efeito citostático para além do efeito citotóxico (secção 3.1.1) dadas as alterações significativas na progressão do ciclo celular. De acordo com a literatura outros complexos de cobre tiveram a capacidade de bloquear o ciclo celular na fase G0/G1 (Sequeira et al., 2021).

3.7 Senescência

A senescência é um processo que envolve uma paragem estável do ciclo celular, não reversível com o intuito de regular o destino celular (Lenis-Rojas, Roma-Rodrigues, et al., 2022). A senescência é normalmente ativada pelo desenvolvimento de estímulos intrínsecos e extrínsecos à célula que induzem danos no DNA, stress oxidativo ou falta de nutrientes. Por norma, a resposta celular a estímulos ou danos varia de acordo com o tipo celular e da

intensidade e natureza do estímulo e responder com indução do reparo de danos, morte celular ou senescência (Lenis-Rojas, Roma-Rodrigues, et al., 2022). A percentagem de células senescentes foi avaliada através do *Senescence Assay Kit* (Abcam) que permite a quantificação da expressão da atividade da beta-galactosidade através de citometria de fluxo.

A senescência das células HCT116doxR foi analisada após a exposição ao IC₅₀ dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a durante 48 horas de incubação a 37 °C. Foi usada uma solução de DMSO 0,1% (v/v) como controlo veículo e a doxorrubicina e a cisplatina como controlos positivos.

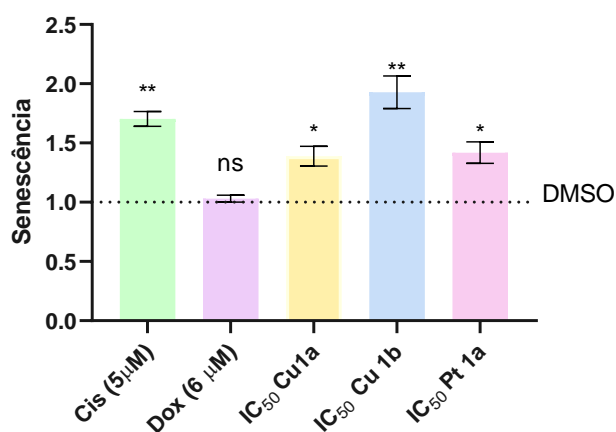


Figura 3.7-Quantificação de células senescentes de HCT116doxR após a incubação de 48h a 37°C com IC₅₀ dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt 1a. Como controlos foram utilizados o DMSO como controlo veículo, Doxorrubicina (6 µM) e cisplatina (5 µM). Os resultados fornecidos são representados em média ± SEM obtidos a partir de pelo menos dois ensaios biológicos independentes. Para avaliar a significância estatística destes resultados em relação ao grupo de controlo tratado com DMSO foi utilizado o método T-Student (* p≤ 0.05 ** p≤ 0.005).

Os resultados presentes na Figura 3.7 indicam um aumento da percentagem de células senescentes após a incubação com os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a. Notavelmente, o complexo Cu1b apresentou a maior quantidade de células em senescência, o que está em consonância com os resultados obtidos no ciclo celular (Figura 3.6). Este complexo demonstra o maior atraso no ciclo celular, com uma parada no ciclo entre 12h-18h, resultando num aumento da formação de células em senescência.

Podemos concluir que os complexos têm a capacidade de interferir com o ciclo celular (ver secção 3.6) e têm capacidade de induzir senescência celular prematura devido essencialmente ao aumento da produção de ROS (Figura 3.5).

3.8 Interação com DNA Plasmídico

3.8.1 Eletroforese em gel de Agarose

Com o objetivo de avaliar a interação dos complexos de Cu(II) e Pt(II) com o DNA, foram realizados ensaios utilizando DNA plasmídico. O procedimento envolveu a exposição de 100 ng de DNA plasmídico (pUC18) a concentrações crescentes dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a (5, 25, 50, 75 e 100 μ M) incubadas a 37 °C durante um período de 24 horas. Foram realizados ainda controlos com pUC18 em tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 em 1% (v/v) DMSO, além de um controlo de pUC18 incubado previamente com a enzima de restrição HindIII durante duas horas. Este é um controlo positivo de plasmídeo linearizado, uma vez que a HindIII é uma endonuclease de restrição que quebra as ligações fosfodiéster da estrutura do DNA (Lenis-Rojas et al., 2021).

O plasmídeo pUC18 é tipicamente encontrado numa conformação superenrolada. No entanto quando ocorre clivagem de uma das cadeias pode adotar uma conformação circular (*nicked*). Alternativamente, se ambas as cadeias forem clivadas apresenta uma conformação linear.

Através da análise da Figura 3.8, é possível identificar 3 bandas distintas no gel que correspondem às isoformas do plasmídeo. A isoforma circular (*nicked* (N)) é identificada como a banda mais acima no gel, seguida pela banda intermediária representada pela isoforma linear (L), e, por fim, a banda mais abaixo no gel corresponde à forma superenrolada (SE), que sofre maior migração devido à sua estrutura compacta. Nos controlos de DMSO e de Tampão (0), observa-se a presença de apenas duas isoformas, a circular e a superenrolada, enquanto o controlo positivo de forma linear com a enzima HindIII apresenta apenas uma banda que corresponde à isoforma linear.

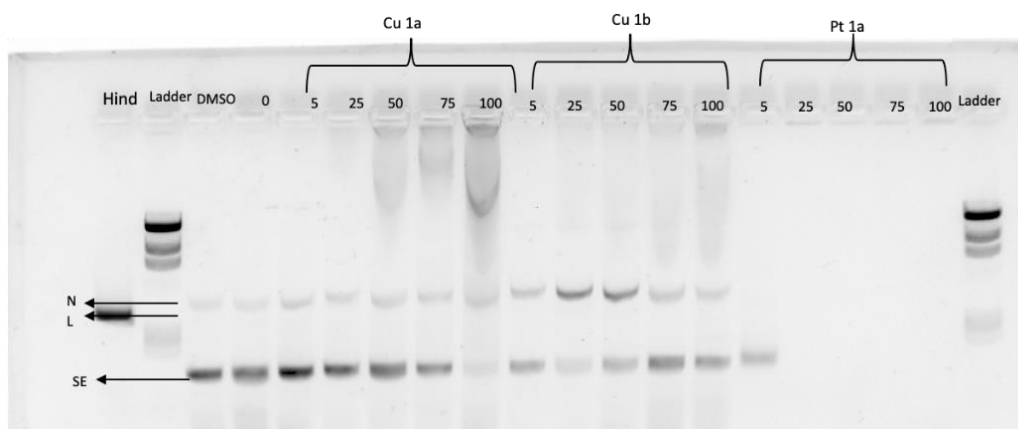


Figura 3.8- Eletroforese em gel de agarose para verificação da integridade de todas as amostras expostas aos complexos. As condições da eletroforese foram: gel de agarose 0,8% em TAE 1x com *Gel Red* 0,0015%, corrente de 90 V (90 minutos). Todas as amostras contendo os complexos foram incubadas numa estufa a 37 °C durante 24h. Cada uma das amostras contém 100 ng de pDNA de células. Legenda geral das figuras: ladder - marcador de pesos moleculares lambda HindIII; Hind – Amostra de pUC18 incubado com HindIII durante 2 horas; 0– Amostra de pUC18 exposto à solução tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 durante 24 horas; DMSO - Amostra de pUC18 exposto à solução tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 e a DMSO a 1% (v/v) por 24 horas; 5 - Amostra de pUC18 exposto a 5 μM dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a indicados; 25 - Amostra de pUC18 exposto a 25 μM dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a indicados; 50 - Amostra de pUC18 exposto a 50 μM dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a indicados; 75 - Amostra de pUC18 exposto a 75 μM dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a indicados; 100 - Amostra de pUC18 exposto a 100 μM dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a indicados. As setas a preto correspondem às isoformas do plasmídeo pUC18, N –isoforma circular (nicked); L – isoforma linear; SE –isoformas superenroladas.

Ao analisar as amostras expostas a concentrações crescentes do complexo Cu1a, observam-se diferenças nos padrões de migração e diferentes rácios (Figura 3.8 e 3.9). É observado que para o complexo Cu1a as bandas correspondentes à forma circular do DNA apresentam maior intensidade em comparação com os controlos negativos. A partir da concentração de 50 μM, observa-se uma retenção do complexo no poço, o que pode indicar uma interação do complexo com o pDNA e uma modificação no seu perfil migratório. Na concentração de 100 μM, é observado uma diminuição da intensidade da banda que corresponde à forma superenrolada (Figura 3.8) que pode ser atribuído essencialmente a uma maior retenção no poço.

A exposição a diferentes concentrações de Cu1b resultou na diminuição das formas superenroladas e aumento da intensidade da isoforma circular para as concentrações 25 e 50 μM. No entanto, estas formas foram revertidas para as concentrações de 75 e 100 μM, nas quais ocorreu uma maior retenção nos poços.

Quanto ao complexo Pt1a verificou-se apenas uma banda correspondente à isoforma superenrolada (SE) à concentração de 5 μM. Para as demais concentrações não foram

detetadas quaisquer bandas, sugerindo a possibilidade de uma interferência do complexo na interação do pDNA com o corante *Gel Red*.

Desta forma, este ensaio demonstrou que os complexos de cobre têm a capacidade de interagir com o pDNA e induzir a sua clivagem, sendo que essa interação atinge a saturação na concentração de 50 μM .

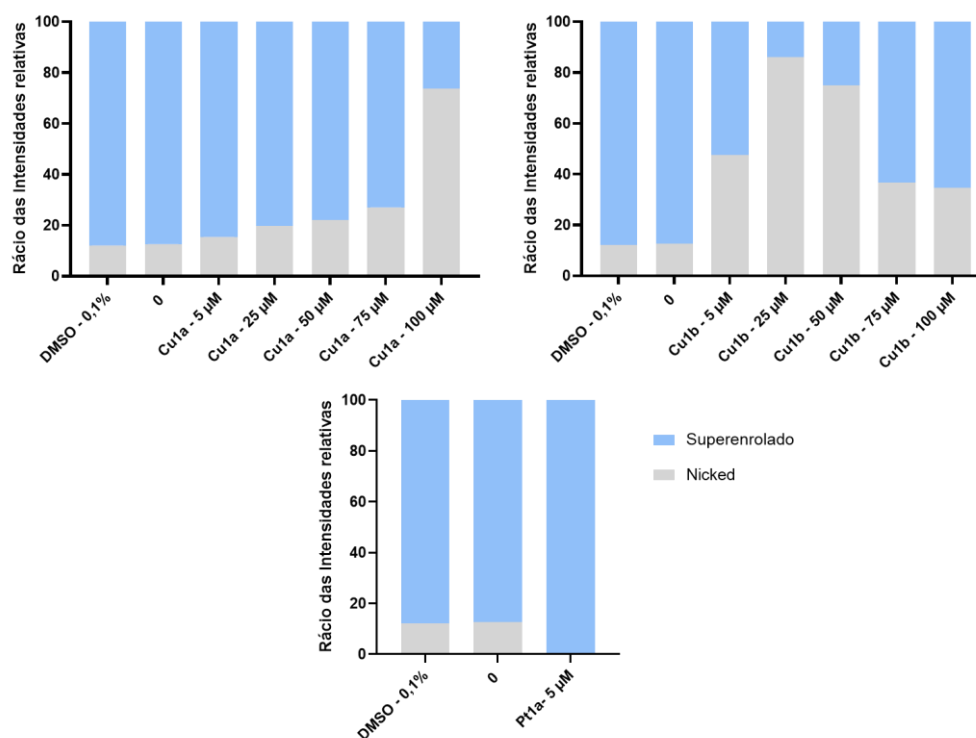


Figura 3.9- Rácio das intensidades das isoformas circulares e superenroladas. As amostras foram incubadas a 37 °C durante 24h e submetidas a diferentes concentrações dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a.

Uma vez que não obtivemos resultados para o complexo Pt1a no gel anterior, foi necessário um ensaio que tentasse avaliar se o tempo de incubação e diferentes concentrações afetavam o aparecimento de bandas no gel (Figura 3.10). Neste caso, já foi possível identificar duas bandas correspondentes a diferentes isoformas do plasmídeo pUC18, a banda com menor migração no gel correspondente à forma circular (nicked) e a banda de maior migração que corresponde à forma superenrolada do plasmídeo para tempos de incubação mais baixos. A análise da Figura 3.10, revela que o tempo de incubação do complexo Pt1a desempenha um papel significativo no padrão de bandas observado no gel de eletroforese.

Após um período de incubação de 5 horas nenhuma banda é observada; após 2 horas de incubação uma banda ténue (correspondente a SE) é observada na presença de 10 μM de

Pt1a. As amostras incubadas durante 30 minutos mostram duas bandas da isoforma superenrolada pouco nítidas em ambas as concentrações testadas. Nas amostras incubadas por 15 minutos e 5 minutos são observadas duas bandas relativamente nítidas da isoforma superenrolada e ténues correspondentes à isoforma circular para ambas as concentrações. A influência do complexo não parece ser tão sensível às variações de concentração, mas sim ao tempo de incubação. A partir de 2h de incubação e a concentração de 25 μM de complexo já não são observadas bandas.



Figura 3.10- Eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1x com *Gel Red* 0,0015%, corrente de 90 V aplicada durante 90 minutos, para verificação da integridade das amostras expostas ao complexo Pt1a. Cada uma das amostras contem 100 ng de pDNA de células. Legenda geral das figuras: Ladder - marcador de pesos moleculares lambda HindIII; 0- Amostra de pUC18 exposto à solução tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 durante 5 horas; DMSO - Amostra de pUC18 exposto à solução tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 e a DMSO a 1% (v/v) por 5 horas; 10 - Amostra de pUC18 exposto a 10 μM do complexo Pt1a indicados durante 5 horas, 2 horas, 30 minutos, 15 minutos e 5 minutos; 25 - Amostra de pUC18 exposto a 25 μM do complexo e Pt1a indicados durante 5 horas, 2 horas, 30 minutos, 15 minutos e 5 minutos; A seta a preto corresponde à SE - isoforma superenrolada e N- isoforma circular.

Com base nesses resultados, é possível conjecturar que o complexo pode impedir o corante *Gel Red* de se ligar aos *grooves* do DNA. Desta forma, podemos concluir que o tempo de incubação/concentração de complexo potencia este fenómeno e impede a visualização das isoformas no gel.

3.9 Interação dos Complexos com DNA Plasmídico (pUC18) - Mecanismos de Clivagem

Considerando todos os resultados obtidos até agora, particularmente a capacidade dos complexos induzirem espécies reativas de oxigénio (ROS) (ver secção 3.5) e após determinar a concentração ideal pela qual os complexos realizam a clivagem do pDNA (50 μ M), foi determinado o mecanismo subjacente à clivagem.

Para isso foi utilizado o agente sequestrador azida de sódio (NaN_3) capaz de sequestrar singletos de oxigénio $^1\text{O}_2$. Além disso, o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) foi usado como um controlo positivo conhecido por clivar o DNA por mecanismos oxidativos na presença de ROS (Sequeira et al., 2021).

Através da análise da Figura 3.11, é possível identificar 3 bandas que correspondem às isoformas do plasmídeo no gel. A isoforma circular (*nicked-N*) corresponde à banda mais acima, a banda do meio corresponde à isoforma linear (L) e a banda mais abaixo no gel corresponde à forma superenrolada que sofre maior migração. Para os controlos de DMSO e de Tampão (0) observa-se a presença de apenas duas bandas, indicando as formas circulares e as superenroladas. Em contraste, o controlo de HindIII apresenta somente a banda correspondente ao DNA linear, dada a sua atividade de clivagem específica.

O agente sequestrador NaN_3 , quando utilizado isoladamente, não demonstrou capacidade de clivar o pDNA, apresentando um perfil de bandas semelhantes aos dos controlos negativos. Para o complexo Cu1a é possível observar bandas de baixa intensidade correspondentes à da isoforma circular e superenrolada, principalmente devido à retenção significativa cujo rácio se encontra na Figura 3.12. No entanto, quando este complexo foi conjugado com o agente sequestrador foi observado um aumento da isoforma superenrolada e uma menor retenção no poço.

Para o complexo Cu1b, os resultados indicam que à concentração de 50 μ M ocorre a clivagem de uma das cadeias do DNA evidenciado no gel com uma banda correspondente à isoforma circular. O Cu1b quando interage com NaN_3 aumenta a sua forma superenrolada e diminui a clivagem do DNA.

Para o complexo Pt1a a 50 μ M, embora não apresente bandas observáveis, quando conjugada com o sequestrador surgem bandas correspondentes à isoforma circular, linear e com maior intensidade, a isoforma superenrolada. Esta observação pode ser atribuída ao facto

de, quando o complexo interage com o agente sequestrador, o corante *Gel Red* fica livre para atuar, resultando na formação das bandas observadas no gel de eletroforese.

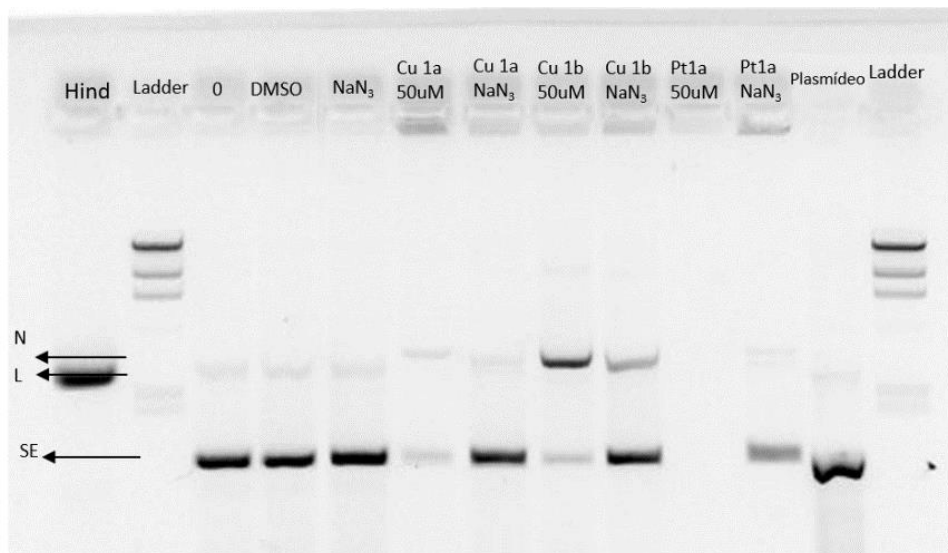


Figura 3.11- Eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE 1x com Gel Red 0,0015%, corrente de 70 V aplicada durante 90 minutos, para determinação dos mecanismos de clivagem de DNA pelo complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a após incubação a 37 °C durante 24h. Legenda: Ladder- marcador de pesos moleculares lambda HindIII; 0- Amostra de pUC18 exposto à solução tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 durante 24 horas; DMSO - Amostra de pUC18 exposto à solução tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 e a DMSO a 1% (v/v) durante 24 horas; Hind- Amostra de pUC18 exposto à atividade da HindIII por 2 horas; NaN₃- Amostra de pUC18 exposto a 50 μM de NaN₃; Cu1a 50 μM - Amostra de pUC18 exposto a 50 μM; Cu1b 50 μM - Amostra de pUC18 exposto a 50 μM de Cu1b; Pt1a 50 μM - Amostra de pUC18 exposto a 50 μM de Pt1a; Cu1a NaN₃- Amostra de pUC18 exposto a 50 μM de Cu1a e 50 μM de NaN₃; Cu1b NaN₃- Amostra de pUC18 exposto a 50 μM de Cu1b e 50 μM de NaN₃; Pt1a NaN₃- Amostra de pUC18 exposto a 50 μM de Pt1a e 50 μM de NaN₃. As setas a preto representam as isoformas de pUC18 identificadas no gel: N- isoforma nicked; L- isoforma linear do pUC18; SE- isoforma superenrolada.

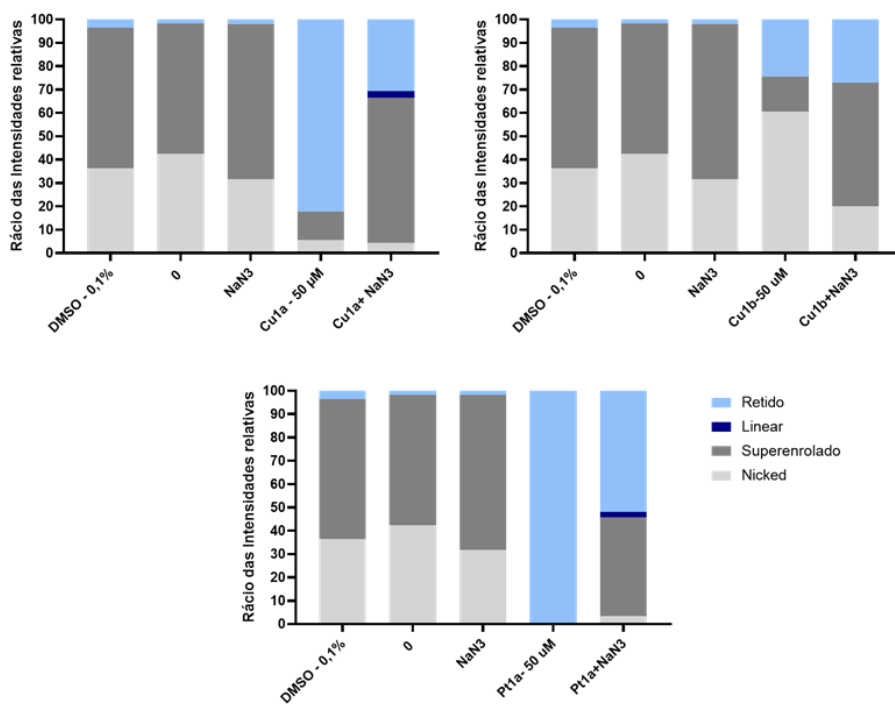


Figura 3.12- Rácio das intensidades das isoformas circulares e superenroladas. As amostras foram submetidas a uma incubação durante 24h aos complexos de Cu1a, Cu1b e Pt1a e controlos de DMSO, Tampão e NaN3.

Para todos os complexos existe alguma retenção nos poços (observada na Figura 3.12) pelo que se pode deduzir que o complexo intercala com o DNA plasmídico alterando a sua migração.

Concluindo, a análise dos resultados permite concluir que o mecanismo de clivagem do pDNA pelos 3 complexos é dependente de radicais de oxigénio singuleto 1O_2 . Esta conclusão está alinhada com os resultados obtidos no ensaio de produção de ROS, onde foi demonstrado que esses complexos têm a propensão de gerar tais espécies (secção 3.5, Figura 3.5).

No próximo ensaio utilizou-se o controlo positivo de H_2O_2 (100µM), um agente oxidante, que possui a capacidade de criar danos na molécula de DNA.

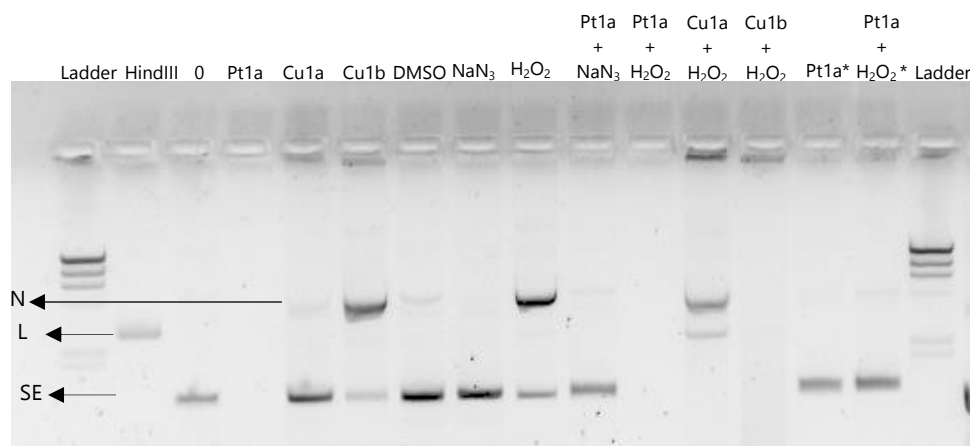


Figura 3.13- Eletroforese em gel de agarose 1,0% em TAE 1x com *Gel Red* 0,0015%, corrente de 80 V aplicada durante 90 minutos, para determinação dos mecanismos de clivagem de pDNA após incubação do pDNA com os complexos de Cu(II) e Pt(II) por 24 h a 37°C (salvo indicado na legenda respetiva). Legenda: M- marcador de pesos moleculares lambda HindIII; 0- Amostra de pUC18 exposto à solução tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 durante 24 horas; DMSO - Amostra de pUC18 exposto à solução tampão 5 mM Tris-HCl e 50 mM NaCl pH=7,2 e a DMSO a 1% (v/v) por 24 horas; HindIII- Amostra de pUC18 exposto à atividade da HindIII (2h); Cu1a - Amostra de pUC18 exposto a 50 µM de Cu1a; Cu1b - Amostra de pUC18 exposto a 50 µM de Cu1b; Pt1a - Amostra de pUC18 exposto a 50 µM de Pt1a; NaN₃- Amostra de pUC18 exposto a 50 µM de NaN₃; H₂O₂- Amostra de pUC18 exposto a 100 µM de H₂O₂; Pt1a+ NaN₃- Amostra de pUC18 exposto a 50 µM de Pt1a e 50 µM de NaN₃; Pt1a+H₂O₂- Amostra de pUC18 exposto a 50 µM de Pt1a e 100 µM de H₂O₂; Cu1a + H₂O₂- Amostra de pUC18 exposto a 50 µM de Cu1a e 100 µM de H₂O₂; Cu1b + H₂O₂- Amostra de pUC18 exposto a 50 µM de Cu1b e 100 µM de H₂O₂; Pt1a* - Amostra de pUC18 exposto a 50 µM de Pt1a com 2 minutos de incubação a 37°C; Pt1a + H₂O₂*- Amostra de pUC18 exposto a 50 µM de Pt1a e 100 µM de H₂O₂ incubado durante 2 minutos a 37°C. As setas a preto representam às isoformas de pUC18 identificadas no gel: N- isoforma circular (nicked); L- isoforma linear do pUC18; SE- isoforma superenrolada.

Através da Figura 3.13, observa-se como esperado a capacidade do peróxido de hidrogénio (H₂O₂) sozinho de atuar sobre o pDNA, clivando-o (Sequeira et al., 2021). Isto é evidenciado pela diminuição da forma superenrolada e um aumento na intensidade da banda correspondente à isoforma circular. É possível visualizar ainda uma linha ténue da isoforma linear (Figura 3.13).

Pelo contrário, quando se incuba o pDNA com o complexo Pt1a e o H₂O₂, não se observa uma potenciação do efeito. No entanto, uma vez mais quando este complexo é incubado com o sequestrador azida de sódio observa-se uma banda de elevada intensidade correspondente à forma superenrolada e à isoforma circular (nicked). Nas amostras de Pt1a incubadas com apenas 2 min (Pt1a*) podemos observar, uma única banda intensa correspondente à forma superenrolada e quando incubada com H₂O₂ por apenas 2 min, uma banda circular de baixa intensidade significando que o peróxido de hidrogénio potencia a clivagem do pDNA.

Desta forma podemos novamente concluir que o tempo de incubação afeta o modo de ação do complexo Pt1a.

Em relação às amostras de cobre, é evidente que Cu1b quando conjugado com H₂O₂ apenas resultou na retenção do poço, possivelmente devido a erros de pipetagem. Já para o complexo Cu1a incubado com H₂O₂ foi observada uma clivagem do DNA apresentando bandas correspondentes à isoforma linear e circular (*nicked*), com o desaparecimento completo da isoforma superenrolada.

3.10 Remissão Celular

Migração celular é o movimento individual das células de um local para o outro (Hulkower & Herber, 2011). Este processo de migração é parte integrante do processo de metastização e de cicatrização de feridas (Lenis-Rojas et al., 2021).

Neste contexto, foi analisada a influência dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a na migração celular, como parte da necessidade de investigar novos quimioterapêuticos como potenciais agentes antimetastáticos. Através do ensaio de cicatrização de feridas (em inglês, wound healing assay) *in vitro*, procurou-se entender como os complexos afetam a migração celular, através do preenchimento de um *gap* previamente formado na placa onde as células são cultivadas (Anexo A5). Neste ensaio, foram utilizados fibroblastos primários dérmicos, um modelo de células associado ao processo de cicatrização de feridas, sendo para isso expostos a concentrações iguais ao IC₅₀ dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a durante 24h a 37°C. Adicionalmente as células foram submetidas ao controlo veículo de DMSO 0,1% e ao controlo positivo de doxorrubicina (6 µM) e calculou-se a percentagem de remissão/regeneração (Figura 3.14).

Analisando Figura 3.14, é possível observar que após 24 horas de incubação, o controlo veículo de DMSO apresentou regeneração completa da ferida (100%) (Anexo A5 Figura 6.11). Por outro lado, os complexos Cu1a e Pt1a induziram uma percentagem ligeiramente inferior de regeneração, com cerca de 66% e o complexo Cu1b com 69% de remissão quando comparados com o controlo de DMSO (Figura 3.14). O controlo de doxorrubicina induziu 68% de regeneração celular. Este resultado sugere que os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a têm a capacidade de inibir a migração celular, importante no contexto terapêutico. De facto, embora os complexos tenham demonstrado a capacidade de inibir a migração celular *in vitro*, é importante considerar que a utilização desses complexos em estágios avançados do tumor pode enfrentar obstáculos. A complexidade do ambiente tumoral, a interação com outros

componentes celulares e as condições em modelos *in vivo* diferem substancialmente das condições *in vitro* utilizadas.

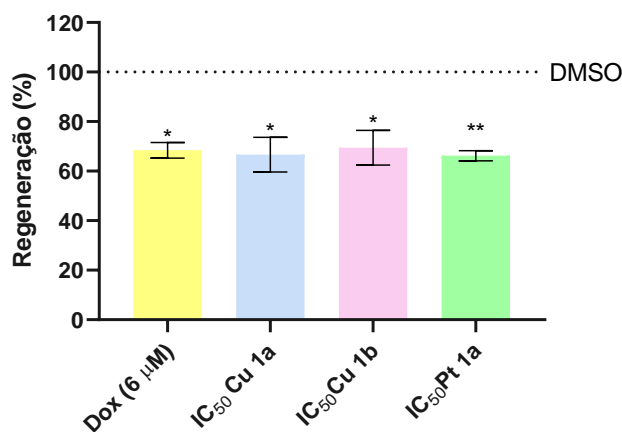


Figura 3.14- Remissão Celular de fibroblastos dérmicos expostos à concentração igual ao IC₅₀ dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a após 24 horas de incubação a 37 °C . Como controlos foram utilizados o DMSO 0,1% e doxorrubicina. Os resultados fornecidos são representados em média ± SEM obtidos a partir de pelo menos dois ensaios biológicos independentes. Para avaliar a significância estatística destes resultados em relação ao grupo de controlo tratado com DMSO foi utilizado o método T-Student (* p≤ 0.05 ** p≤ 0.005).

Estes resultados assemelham-se com resultados já descritos na literatura em que complexos metálicos de ruténio (Ru (II)) e de manganês (Mn (II)) têm a capacidade de diminuir a remissão celular como relatado por Lenis-Rojas et al (Lenis-Rojas et al., 2021) (Lenis-Rojas, Carvalho, et al., 2022).

3.11 Potencial Angiogénico

O método Ex- ovo chorioallantoic membrane (CAM) tornou-se um modelo pré-clínico de escolha que permite avaliar a citotoxicidade dos complexos de Cu(II) e de Pt(II) no processo de angiogénese *in vivo* (Choroba et al., 2021). A CAM é uma membrana extraembrionária formada por camadas mesodérmicas que embora comprometida, possui elevada densidade de vasos sanguíneos, ideal para estudar a angiogénese e anti-angiogénese em resposta a biomoléculas e fármacos (Naik et al., 2018). Portanto o desenvolvimento de medicamentos com potencial anti-angiogénico representa uma possibilidade de um tratamento mais eficaz do cancro.

Nestes ensaios, foram estudadas regiões altamente vascularizadas cercadas pelos O-rings na membrana corioalantóide do embrião de galinha (Anexo A4 Figura 6.10). As áreas delimitadas foram expostas aos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a, assim como ao controlo de DMSO 0,1% em PBS 1x. Foram utilizados 8 embriões como replicados biológicos. As imagens foram tiradas logo após a exposição aos complexos e controlo (0 horas) e 24 horas depois. Os valores foram normalizados para o número de veias terciárias após a exposição do controlo de DMSO com PBS e encontram-se representados na Figura 3.15.

De entre os três complexos, apenas o Pt1a parece apresentar algum efeito anti-angiogénico. Os complexos Cu1a e Cu1b não exibiram propriedades pró ou anti-angiogénicas significativas. Neste último, caso o facto de os O-Rings se terem deslocado do local inicial pode ter levado à perda da sensibilidade deste ensaio.

Com base nos resultados, podemos concluir que os complexos estudados de Cu(II) não interferem na formação de novos vasos (Figura 3.15).

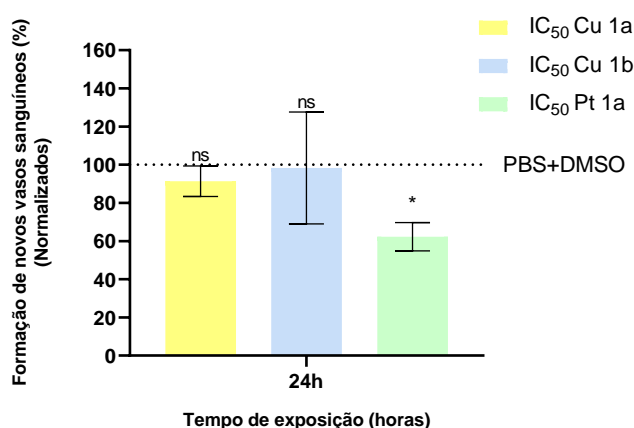


Figura 3.15- Potencial angiogénico em ovos de galinha. Os valores foram normalizados para o número de veias terciárias obtidas após exposição ao controlo (PBS) e para o número de veias terciárias obtidas na área CAM correspondente às 0 h de incubação em o mesmo embrião. A concentração dos complexos utilizados foi igual ao valor IC₅₀ do Cu1a, Cu1b e Pt1a. Como controlos foram utilizados o PBS 1x em DMSO 0,1%. Como método estatístico foi usado o T-Student (* p≤ 0.05 e ns- não significativo). As barras de erro representam o desvio padrão da média de oito ovos independentes.

Notavelmente, todos os complexos não induziram a morte de nenhum dos embriões durante este período analisado, indicando a sua ausência de toxicidade *in vivo*. Estes resultados são semelhantes aos obtidos para outros complexos, por exemplo de Ruténio (Ru (II)) (Lenis-

Rojas et al., 2021). Assim, a exposição dos complexos embora induzam perda de viabilidade em HCT116doxR não desencadeou a morte do embrião estudado.

3.12 Internalização dos Complexos

De forma a confirmar se os resultados observados *in vitro* em células HCT116doxR são realmente devidos à internalização dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a e perceber se este processo é rápido, analisou-se a quantidade de cobre e platina pela metodologia de *Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy* (ICP-AES) nas células e no sobrenadante celular. O ensaio foi realizado a 37°C pelo que a internalização dos complexos pode ocorrer via transporte ativo ou passivo.

Uma vez que o valor de IC₅₀ dos complexos é baixo, foi utilizada uma concentração de complexos 10x IC₅₀ para assegurar que estamos acima do limite de deteção da técnica utilizada, garantindo quantidades mensuráveis dos complexos. Assim, as células HCT116doxR foram expostas à concentração correspondente a 10x IC₅₀ por 3h e 6h de incubação a 37°C.

Pela análise da Figura 3.16, é possível verificar que todos os complexos foram internalizados após 3h de incubação, na ordem Cu1a (~80%) > Cu1b (~65%) > Pt1a (~60%). Estes resultados indicam que a citotoxicidade celular de um complexo estará correlacionada com a sua % de internalização tal como já descrito por outros autores (Choroba et al., 2021) e por isso, o complexo Pt1a que teve a menor % de internalização de entre todos os complexos, é o que apresenta o IC₅₀ mais elevado (Tabela 3.1 da secção 3.3.1). Do mesmo modo a % de internalização para os complexos de Cu(II) segue a mesma tendência, Cu 1a > Cu1b, e que segue a citotoxicidade observada (Tabela 3.1 da secção 3.3.1 e Figura 6.3).

Curiosamente, às 6h não se observa um aumento da % de internalização de todos os complexos, observando-se valores semelhantes aos observados às 3h. Isto pode significar que o mecanismo molecular usado para a internalização dos complexos chegou a uma saturação e toda a internalização possível ocorre até às 3h. Este resultado é extremamente importante visto que esta rápida internalização dos complexos leva a que a sua perda de solubilidade/estabilidade em meio de cultura a partir das 6h (secção 3.2; Anexo A1) não terá elevado impacto na respetiva internalização, e que após internalizarem as células poderão desencadear a sua atividade citotóxica.

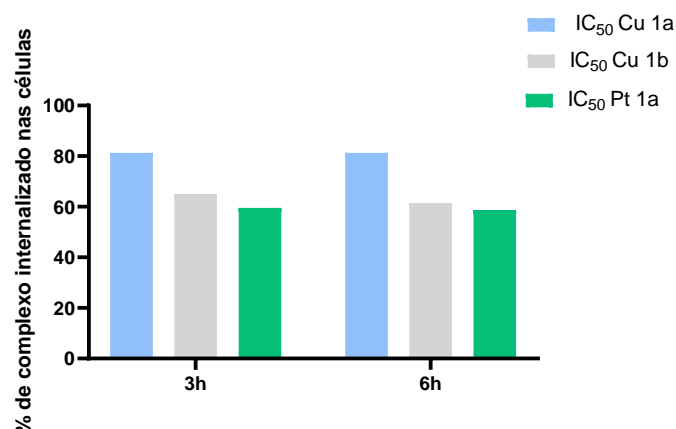


Figura 3.16- Internalização dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a avaliada por ICP-AES na fração celular da linha celular HCT116doxR após 3 e 6 horas de incubação a 37°C de exposição a 10x a concentração respectiva de cada IC₅₀. Os resultados foram normalizados ao controlo de DMSO e à respectiva concentração do respetivo complexo adicionado a células.

3.13 Interação dos Complexos com a BSA

3.13.1 Espectroscopia

Na perspetiva de uma translação dos complexos para a prática clínica e na sua administração e distribuição no corpo humano, é importante considerar que a albumina está presente no plasma humano em elevadas concentrações (Shi et al., 2018), e por essa razão foi estudada a capacidade dos complexos de Cu(II) e Pt(II) poderem interagir com a albumina. Neste sentido, a albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como modelo (Topală et al., 2014). A BSA é a proteína plasmática mais abundante nos organismos vertebrados que possui cerca de 76% de semelhança com a albumina sérica humana (HSA), constituída por cadeias polipeptídicas únicas com 583 aminoácidos (Sengupta et al., 2022) (Shi et al., 2018).

A espectroscopia UV-Visível é um método eficaz que prevê as mudanças conformacionais das proteínas quando interagem com pequenas moléculas como fármacos (Liu et al., 2018). A interação da BSA com os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a foi caracterizada utilizando técnicas de espectroscopia de UV-visível e fluorescência, dada a fluorescência intrínseca dos resíduos de triptofano da BSA. Na Figura 3.17, são exibidos os espectros UV-visível obtidos para a BSA, BSA em combinação com DMSO 0,1% e a BSA na presença de concentrações crescentes dos complexos metálicos.

As absorvâncias foram medidas numa gama de concentrações de 245-500 nm. Os resíduos aromáticos presentes na proteína BSA, como triptofano, tirosina e fenilalanina, possuem transições eletrónicas $\pi-\pi^*$ que resultam em picos máximos de absorvância em torno de 280 nm (Lou et al., 2017; Shi et al., 2018)

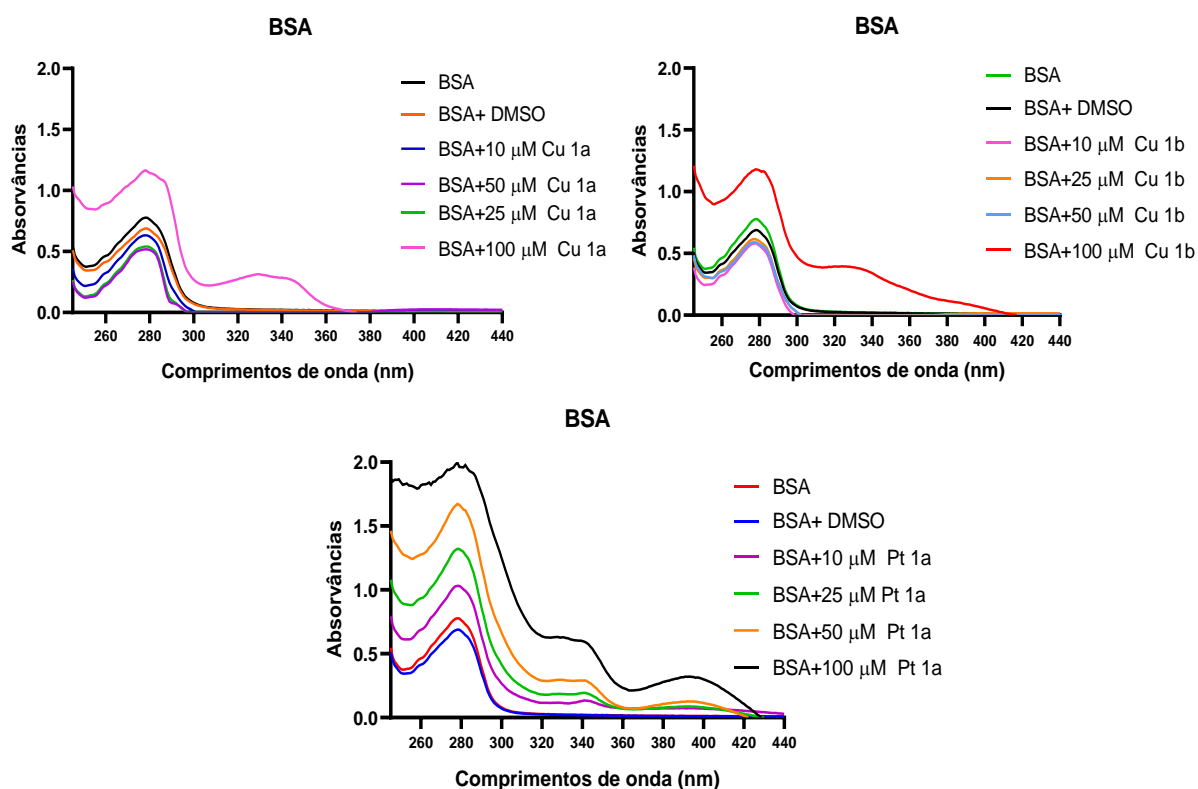


Figura 3.17- Espectros de absorção em UV-Visível de interação entre 200 μM de BSA e exposta a concentrações variáveis de Cu1a, Cu1b e Pt1a. Diferentes rácios de interação após um período de 24 horas de incubação a 37 $^{\circ}\text{C}$. Este espectro encontra-se normalizado em relação à absorvância da amostra de proteína individual BSA, de modo a facilitar a interpretação do efeito das interações.

Os espectros de absorção (Figura 3.17) mostram que os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a exibiram picos de absorvância em torno de 280 nm, correspondendo à absorção dos resíduos aromáticos da BSA. Além disso, em concentrações mais altas dos complexos (100 μM), novos picos de absorvância menores surgiram em diferentes comprimentos de onda como 310-360 nm para Cu1a; 310-360 nm para Cu1b; 340 nm e 390 nm para Pt1a.

Essas mudanças espectrais indicam a interação entre os complexos e a BSA, possivelmente levando a alterações no ambiente em torno dos resíduos aromáticos da proteína. É verificado que a adição de maiores concentrações dos complexos (100) μM conjugadas com a BSA resulta no aparecimento de novos picos com maior de absorvância para os três complexos.

À medida que se aumenta a concentração do complexo Pt1a aumenta a absorvância da BSA, para além de ter atingido maior absorvância máxima quando conjugada com a BSA na concentração de 100 μM . Para os complexos Cu1a e Cu1b é possível verificar que quando a BSA é conjugada com as concentrações de 10, 25 e 50 μM a sua absorvância diminui (hipocromismo)(Wongsuwan et al., 2023) e apenas aumenta com um pico de absorvância máximo à concentração de 100 μM . Estes resultados indicam uma interação entre os complexos e a BSA uma vez que a diminuição da absorção da luz pela BSA indica mudanças na estrutura e ambiente que pode afetar a capacidade da desta proteína absorver luz em comprimentos de onda específicos, pode ocorrer bloqueio de grupos cromóforos ou mudanças conformacionais que impeçam essa atividade (Pan et al., 2021).

3.13.2 Fluorescência

Os resultados obtidos por espectroscopia de fluorescência reforçam a evidência da interação entre os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a e a proteína BSA. A técnica de espectroscopia de fluorescência é especialmente sensível na deteção de mudanças conformacionais na proteína. A fluorescência intrínseca da BSA é exclusivamente derivada dos resíduos de triptofano (Trp) uma vez que a fenilalanina (Phe) tem um rendimento quântico relativamente baixo e resíduos de tirosina (Tyr) não apresentam praticamente fluorescência (Liu et al., 2018; Xu et al., 2013).

Nas Figura 3.18, 3.19 e 3.20, estão representados os espectros de fluorescência obtidos para a BSA e para BSA conjugada com concentrações crescentes dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a. É possível verificar que os resultados mostram uma diminuição da intensidade de fluorescência, conhecido como efeito de *quenching* (atenuação), ou hipocromismo da BSA na presença de concentrações crescentes dos complexos (Wongsuwan et al., 2023). Esse efeito *quenching* pode ser interpretado como uma indicação de que os complexos estão a interagir com a BSA, causando mudanças no ambiente ao redor dos resíduos de triptofano que afetam sua fluorescência intrínseca. Isto acontece uma vez que o aumento das concentrações dos complexos pode saturar todos os locais de ligação disponíveis na BSA suprimindo a sua fluorescência emitida.

Especificamente, o gráfico presente na Figura 3.18 indica que o complexo Cu1a, quando presente em concentrações máximas, resultou numa completa atenuação da fluorescência da

BSA. Isso pode estar relacionado com o mecanismo de extinção de fluorescência, possivelmente devido a uma interação forte e próxima entre o complexo e a BSA.

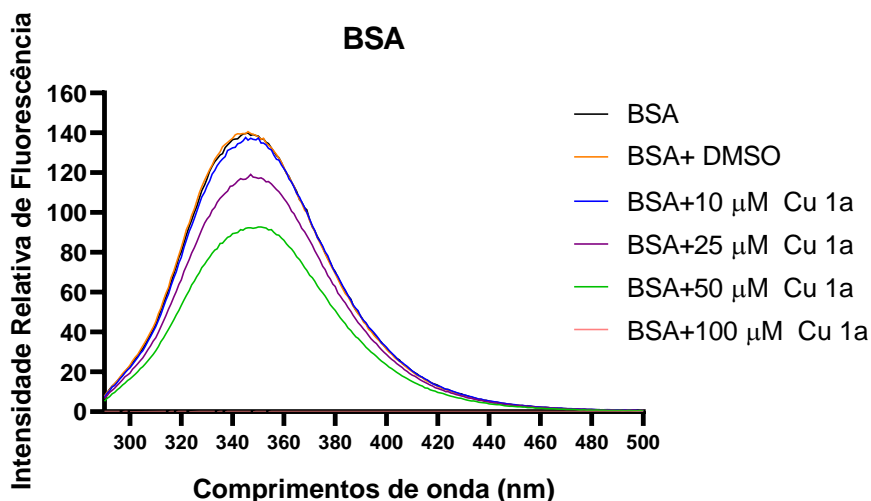


Figura 3.18- Espectro de intensidade de fluorescência para interação entre albumina e o complexo Cu1a. A concentração da BSA é fixa (200 µM), sendo que as concentrações do complexo variam entre 10-100µM. Os ensaios foram realizados após um período de incubação a 37 °C por 24 horas. Este espectro encontra-se normalizado em função da fluorescência da amostra de proteína individual de modo a facilitar a interpretação da influência das interações.

No caso do complexo Pt1a (Figura 3.19) é observado diminuição da fluorescência detectável à medida que as concentrações deste complexo aumentam, que mostra um efeito de *quenching*.

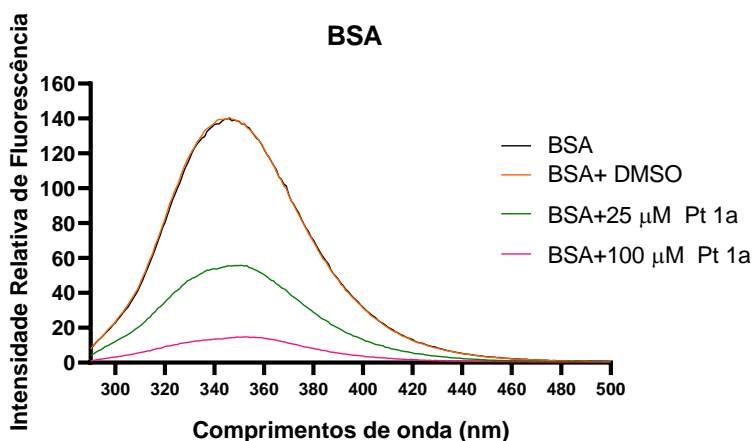


Figura 3.19- Espectro de intensidade de fluorescência para interação entre albumina e o complexo Pt1a. A concentração da BSA é fixa (200 µM), sendo que as concentrações do complexo variam entre 10-100µM. Os ensaios foram realizados após um período de incubação de 24 horas a 37 °C. Este espectro encontra-se normalizado em função da fluorescência da amostra de proteína individual de modo a facilitar a interpretação da influência das interações.

Para os espectros do complexo Cu1b (Figura 3.20) é possível concluir que quanto maior a concentração maior é o efeito de *quenching* quando conjugado com BSA.

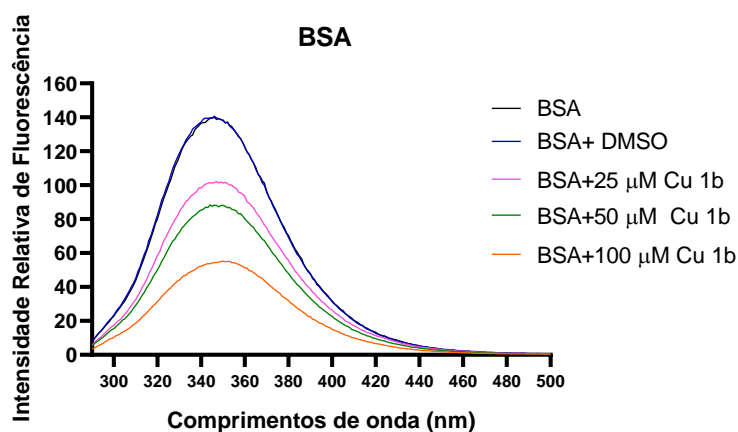


Figura 3.20- Espectro de intensidade de fluorescência para interação entre albumina e o complexo Cu1b. A concentração da BSA é fixa (200 μM), sendo que as concentrações do complexo variam entre 10-100μM. Os ensaios foram realizados após um período de incubação de 24 horas a 37 °C. Este espectro encontra-se normalizado em função da fluorescência da amostra de proteína individual de modo a facilitar a interpretação da influência das interações.

Com base nestes resultados é possível concluir que os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a interagem com a proteína BSA. Para as concentrações de 25 e 100 μM é possível verificar que Pt1a é o complexo com maior potencial de *quenching* em relação à BSA quando comparado com os complexos de cobre. Essas interações são importantes pois indicam que os complexos podem usar a HSA como transportador em contextos humanos, permitindo uma melhor distribuição e potenciando uma atividade terapêutica.

Naveen et al. conduziram a investigação da interação de ligação de complexos de rutênio (Ru (II)) com a BSA, que obteve resultados semelhantes (Naveen et al., 2018). Outros estudos foram obtidos por J. Zhang et al. que complexos metálicos de Cu(II) têm capacidade de interagir com a proteína BSA (J. Zhang et al., 2018).

CONCLUSÕES

O cancro mantém-se um desafio global na saúde sendo uma doença multifatorial devastadora que persiste como uma das principais causas de morte em todo mundo. A cada ano, o número de casos aumenta exponencialmente impulsionado pelo crescimento populacional e pelo envelhecimento da população mundial. Enfrentar este tipo de doença requer abordagens inovadoras e multifacetadas.

Para isso um pilar fundamental para o tratamento do cancro é a quimioterapia que faz o uso de substâncias químicas que interrompem o crescimento e a divisão das células cancerígenas. Apesar de demonstrar efeitos antiproliferativos e citotóxicos em células tumorais, ainda apresenta desvantagens consideráveis. Entre elas, destacam-se a toxicidade que pode afetar os tecidos saudáveis, os efeitos colaterais indesejados, desafios relacionados com a especificidade e dosagem, além de um problema mais complexo que é a resistência associada aos fármacos. Esta resistência pode resultar na falha do tratamento e subsequente progressão tumoral. É imperativo a busca de novos quimioterapêuticos mais eficazes e menos tóxicos e, neste contexto, os complexos metálicos têm sido investigados pelas suas propriedades únicas.

Esta tese teve como objetivo investigar o potencial antiproliferativo de novos complexos de Cu(II) e de Pt(II) como alternativas aos atualmente utilizados.

O ensaio de avaliação do potencial antiproliferativo revelou que os complexos mais promissores foram o Cu1a, Cu1b e Pt1a dado que mostraram um elevado potencial antiproliferativo nas linhas celulares tumorais enquanto apresentaram baixa citotoxicidade em fibroblastos. No entanto, de entre as 3 linhas celulares tumorais, destaca-se o seu potencial antiproliferativo na linha celular de HCT116doxR com valores de IC_{50} de 0,239, 0,290 e 0,683, respetivamente. Tal como esperado, em modelos 3D de esferóides de HCT116doxR os valores de IC_{50} mostraram-se superiores aos valores obtidos em 2D assim como escrito na literatura (Choroba et al.,

2023), em grande parte devido à maior complexidade do microambiente tumoral, e mais perto dos resultados esperados em modelos *in vivo*.

A compreensão do mecanismo de ação desses complexos é fundamental para entender como afetam as células tumorais em nível molecular. Para isso, foram conduzidos ensaios de citometria de fluxo a fim de analisar os mecanismos de morte celular ativados por esses complexos.

Observou-se que os complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a induzem um aumento das células em apoptose inicial, com praticamente ausência de necrose. Além disso, a análise dos níveis de proteínas pró e anti-apoptóticas, como BAX e BCL-2, confirmou que esses complexos desencadeiam a apoptose pela via intrínseca, bem como a perda do potencial de membrana mitocondrial devido ao aumento da expressão da proteína pró-apoptótica BAX. Estes resultados são confirmados através de literatura (Sequeira et al., 2021; Maroń et al., 2018; Choroba et al., 2021)

Foi investigada outra forma de morte celular programada do tipo II, e observou-se que os três complexos têm a capacidade de desencadear a morte por autofagia assim como mencionado em literatura (Choroba et al., 2021). Essas vias costumam ser ativadas pela ação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e foi confirmado que esses complexos são realmente capazes de induzir ROS. Dado o reconhecimento na literatura de que as ROS podem ter um impacto no DNA celular quando presentes em quantidades excessivas ou não controladas pelo sistema antioxidante, o efeito genotóxico dos complexos foi avaliado por meio da exposição ao DNA plasmídico.

Foi verificado que os complexos Cu1a e Cu1b manifestam a capacidade de interagir com ácidos nucleicos e induzir quebras na cadeia por meio de mecanismos oxidativos via singuleto de oxigênio como descrito em literatura para outros complexos de cobre (Sequeira et al., 2021). Foram igualmente estudados os efeitos dos 3 complexos no ciclo celular de células HCT116doxR demonstrando as suas propriedades citostáticas, induzindo senescência celular, para além de citotóxicas.

O potencial de anti-metastático dos três complexos também foi avaliado, tendo-se observado que ao fim de 24h houve uma diminuição da capacidade de migração celular, indicando um potencial anti-metastático como relatado em literatura por Lenis-Rojas et al para outros complexos metálicos Ru (II) e (Mn (II)). No entanto, apenas o complexo Pt1a demonstrou algum potencial anti-angiogénico, conforme evidenciado por um ensaio de CAM. Este potencial anti-angiogénico já foi descrito para outros complexos de platina (Choroba et al., 2021)

Através da técnica ICP-AES, foi possível detetar a internalização dos complexos nas células sendo que maioria foi internalizado após 3 horas de incubação. Além disso, os três complexos mostraram interação com a albumina de soro bovino que pode fornecer informações sobre a potencial biodistribuição e biodisponibilidade dos complexos nos organismos vivos.

Através deste trabalho, é possível demonstrar o potencial dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a para estudos futuros antes de uma aplicação e translação para a prática clínica.

Assim, são ainda necessários estudos adicionais para completar os resultados obtidos de modo a aprofundar o seu efeito celular e confirmar realmente o seu potencial. Especificamente, a internalização dos complexos poderia ser avaliada a 4°C para distinguir se essa internalização ocorre por transporte ativo ou passivo. Poderiam ser realizados estudos de proteómica a fim de identificar os efeitos dos complexos nas proteínas e como essas interações podem afetar o funcionamento celular e os resultados terapêuticos.

Outros estudos deveriam ser conduzidos para determinar com maior precisão a capacidade genotóxica num contexto celular. Para além disso a realização de ensaios *in vivo* em modelos de xenógrafos seriam interessantes para complementar os resultados obtidos em 2D e 3D e perceber realmente o seu efeito antitumoral.

Os objetivos propostos foram bem sucedidos e os resultados obtidos são promissores para que esses complexos possam ser considerados em futuros ensaios clínicos e na prática da quimioterapia. Nas próximas fases da investigação, é essencial realizar ensaios em modelos 3D e experimentos *in vivo* com modelos de ratinhos, e, se os resultados se mostrarem promissores, considerar ensaios clínicos com seres humanos.

5 BIBLIOGRAFIA

- Abbas, Z., & Rehman, S. (2018). An Overview of Cancer Treatment Modalities. In *Neoplasms*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.76558>
- Adjiri, A. (2016). Identifying and Targeting the Cause of Cancer is Needed to Cure Cancer. *Oncology and Therapy*, 4(1), 17–33. <https://doi.org/10.1007/s40487-015-0015-6>
- Akter, S., Rahman, M. A., Hasan, M. N., Akhter, H., Noor, P., Islam, R., Shin, Y., Rahman, M. H., Gazi, M. S., Huda, M. N., Nam, N. M., Chung, J., Han, S., Kim, B., Kang, I., Ha, J., Choe, W., Choi, T. G., & Kim, S. S. (2022). Recent Advances in Ovarian Cancer: Therapeutic Strategies, Potential Biomarkers, and Technological Improvements. In *Cells* (Vol. 11, Issue 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11040650>
- Almeida, J. P. (2018). *Caracterização do potencial antiproliferativo de novo composto de prata (Ag 2 tmps 2)*.
- Amiri Rudbari, H., Saadati, A., Aryaeifar, M., Blacque, O., Cuevas-Vicario, J. V., Cabral, R., Raposo, L. R., & Fernandes, A. R. (2022). Platinum(II) and Copper(II) complexes of asymmetric halogen-substituted [NN'O] ligands: Synthesis, characterization, structural investigations and antiproliferative activity. *Bioorganic Chemistry*, 119. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105556>
- Anderson, N. M., & Simon, M. C. (2020). The tumor microenvironment. In *Current Biology* (Vol. 30, Issue 16, pp. R921–R925). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.06.081>
- Arneth, B. (2020). Tumor microenvironment. In *Medicina (Lithuania)* (Vol. 56, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/medicina56010015>
- Asimgil, H., Ertetik, U., Çevik, N. C., Ekizce, M., Doğruöz, A., Gökalp, M., Arık-Sever, E., Istvanffy, R., Friess, H., Ceyhan, G. O., & Demir, I. E. (2022). R E V I E W Targeting the undruggable oncogenic KRAS: the dawn of hope. *Reference Information: JCI Insight*, 7(1), 153688. <https://doi.org/10.1172/jci>

- Babak, M. v., & Ahn, D. (2021). Modulation of intracellular copper levels as the mechanism of action of anticancer copper complexes: Clinical relevance. *Biomedicines*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9080852>
- Baghban, R., Roshangar, L., Jahanban-Esfahlan, R., Seidi, K., Ebrahimi-Kalan, A., Jaymand, M., Kolahian, S., Javaheri, T., & Zare, P. (2020). Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. In *Cell Communication and Signaling* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12964-020-0530-4>
- Barnum, K. J., & O'Connell, M. J. (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. *Methods in Molecular Biology*, 1170, 29–40. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2
- Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. In *International Journal of Medical Sciences* (Vol. 9, Issue 3, pp. 193–199). <https://doi.org/10.7150/ijms.3635>
- Bauleth-Ramos, T., Feijão, T., Gonçalves, A., Shahbazi, M. A., Liu, Z., Barrias, C., Oliveira, M. J., Granja, P., Santos, H. A., & Sarmiento, B. (2020). Colorectal cancer triple co-culture spheroid model to assess the biocompatibility and anticancer properties of polymeric nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 323, 398–411. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.04.025>
- Bedoui, S., Herold, M. J., & Strasser, A. (2020). Emerging connectivity of programmed cell death pathways and its physiological implications. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 21, Issue 11, pp. 678–695). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0270-8>
- Bhosle, J., & Hall, G. (2009). Principles of cancer treatment by chemotherapy. In *Surgery* (Vol. 27, Issue 4, pp. 173–177). <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2009.01.006>
- Białkowska, K., Komorowski, P., Bryszewska, M., & Miłowska, K. (2020). Spheroids as a type of three-dimensional cell cultures—examples of methods of preparation and the most important application. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 17, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21176225>
- Budiana, I. N. G., Angelina, M., & Pemayun, T. G. A. (2019). Ovarian cancer: Pathogenesis and current recommendations for prophylactic surgery. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association*, 20(1), 47–54. <https://doi.org/10.4274/jtgga.galenos.2018.2018.0119>
- Cabral, R. M. P. (2020). *Validação de novos compostos metálicos para o tratamento de cancro*.
- Caley, A., & Jones, R. (2012). The principles of cancer treatment by chemotherapy. In *Surgery* (Vol. 30, Issue 4, pp. 186–190). <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2012.01.004>
- Carvalho, B. (2020). *Avaliação de novos complexos metálicos de Ru(II) e Mn(I) como agentes antiproliferativos em células tumorais*.

- Cavalcante, G. C., Schaan, A. P., Cabral, G. F., Santana-Da-Silva, M. N., Pinto, P., Vidal, A. F., & Ribeiro-Dos-Santos, Â. (2019). A cell's fate: An overview of the molecular biology and genetics of apoptosis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20174133>
- Chaicharoenaudomrung, N., Kunhorm, P., & Noisa, P. (2019). Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. In *World Journal of Stem Cells* (Vol. 11, Issue 12, pp. 1065–1083). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i12.1065>
- Chao, H. X., Poovey, C. E., Privette, A. A., Grant, G. D., Chao, H. Y., Cook, J. G., & Purvis, J. E. (2017). Orchestration of DNA Damage Checkpoint Dynamics across the Human Cell Cycle. *Cell Systems*, 5(5), 445-459.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.09.015>
- Chen, H. H. W., & Kuo, M. T. (2017). *Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges*. www.impactjournals.com/oncotarget
- Choi, M. E., Price, D. R., Ryter, S. W., & Choi, A. M. K. (2019). Necroptosis: A crucial pathogenic mediator of human disease. In *JCI Insight* (Vol. 4, Issue 15). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.128834>
- Choroba, K., Filipe, B., Świtlicka, A., Penkala, M., Machura, B., Bieńko, A., Cordeiro, S., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2023). In Vitro and In Vivo Biological Activities of Dipicolinate Oxovanadium(IV) Complexes. *Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c00255>
- Choroba, K., Machura, B., Szlapa-Kula, A., Malecki, J. G., Raposo, L., Roma-Rodrigues, C., Cordeiro, S., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2021). Square planar Au(III), Pt(II) and Cu(II) complexes with quinoline-substituted 2,2':6',2"-terpyridine ligands: From in vitro to in vivo biological properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 218. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113404>
- Choudhuri, S., Chanderbhan, R., & Mattia, A. (2018). Carcinogenesis: Mechanisms and Models. In *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles: Third Edition* (pp. 339–354). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00020-9>
- Coller, H. A. (2020). Regulation of cell cycle entry and exit: A single cell perspective. *Comprehensive Physiology*, 10(1), 317–344. <https://doi.org/10.1002/cphy.c190014>
- Cooper, K. F. (2018). Till death do us part: The marriage of autophagy and apoptosis. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2018). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2018/4701275>

- Croft, P. K. de, Sharma, S., Godbole, N., Rice, G. E., & Salomon, C. (2021). Ovarian-cancer-associated extracellular vesicles: Microenvironmental regulation and potential clinical applications. In *Cells* (Vol. 10, Issue 9). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10092272>
- Currais, P., Rosa, I., & Claro, I. (2022). Colorectal cancer carcinogenesis: From bench to bedside. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, *14*(3), 654–663. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v14.i3.654>
- da Silva, D. A., De Luca, A., Squitti, R., Rongioletti, M., Rossi, L., Machado, C. M. L., & Cerchiaro, G. (2022). Copper in tumors and the use of copper-based compounds in cancer treatment. In *Journal of Inorganic Biochemistry* (Vol. 226). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111634>
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. In *Cell Biology International* (Vol. 43, Issue 6, pp. 582–592). Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Debela, D. T., Muzazu, S. G., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Medicine*, *9*, 205031212110343. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>
- Denton, D., & Kumar, S. (2019). Autophagy-dependent cell death. In *Cell Death and Differentiation* (Vol. 26, Issue 4, pp. 605–616). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0252-y>
- Dhuriya, Y. K., & Sharma, D. (2018). Necroptosis: A regulated inflammatory mode of cell death. In *Journal of Neuroinflammation* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1235-0>
- Dikic, I., & Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Issue 6, pp. 349–364). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0003-4>
- Dilley, J., Burnell, M., Gentry-Maharaj, A., Ryan, A., Neophytou, C., Apostolidou, S., Karpinskyj, C., Kalsi, J., Mould, T., Woolas, R., Singh, N., Widschwendter, M., Fallowfield, L., Campbell, S., Skates, S. J., McGuire, A., Parmar, M., Jacobs, I., & Menon, U. (2020). Ovarian cancer symptoms, routes to diagnosis and survival – Population cohort study in the ‘no screen’ arm of the UK Collaborative Trial of Ovarian Cancer Screening (UKCTOCS). *Gynecologic Oncology*, *158*(2), 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.05.002>
- Duman-Scheel, M. (2012). *Deleted in Colorectal Cancer (DCC) Pathfinding: Axon Guidance Gene Finally Turned Tumor Suppressor.*

- Ekert, J. E., Johnson, K., Strake, B., Pardinas, J., Jarantow, S., Perkinson, R., & Colter, D. C. (2014). Three-dimensional lung tumor microenvironment modulates therapeutic compound responsiveness in vitro - Implication for drug development. *PLoS ONE*, *9*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092248>
- Fang, Y., & Eglén, R. M. (2017). Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. In *SLAS Discovery* (Vol. 22, Issue 5, pp. 456–472). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1177/1087057117696795>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 5, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, *149*(4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Fernando, J., & Jones, R. (2015). The principles of cancer treatment by chemotherapy. In *Surgery (United Kingdom)* (Vol. 33, Issue 3, pp. 131–135). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2015.01.005>
- Feroz, W., & Sheikh, A. M. A. (2020). Exploring the multiple roles of guardian of the genome: P53. In *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* (Vol. 21, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s43042-020-00089-x>
- Fitzgerald, M. C., O'Halloran, P. J., Connolly, N. M. C., & Murphy, B. M. (2022). Targeting the apoptosis pathway to treat tumours of the paediatric nervous system. In *Cell Death and Disease* (Vol. 13, Issue 5). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04900-y>
- Frezza, M., Hindo, S., Chen, D., Davenport, A., Schmitt, S., Tomco, D., & Dou, Q. P. (2010). *Novel Metals and Metal Complexes as Platforms for Cancer Therapy*.
- Ganesh, K., & Massagué, J. (2021). Targeting metastatic cancer. In *Nature Medicine* (Vol. 27, Issue 1, pp. 34–44). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-01195-4>
- Globocan. (2021). *Portugal Source: Globocan Incidence, Mortality and Prevalence by cancer site*.
- Goh, A. M., Coffill, C. R., & Lane, D. P. (2011). The role of mutant p53 in human cancer. In *Journal of Pathology* (Vol. 223, Issue 2, pp. 116–126). <https://doi.org/10.1002/path.2784>
- Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., Cheng, H., Jin, K., Ni, Q., Yu, X., & Liu, C. (2019). The role of necroptosis in cancer biology and therapy. In *Molecular Cancer* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hansen, M., Rubinsztein, D. C., & Walker, D. W. (2018). Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Issue 9, pp. 579–593). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>
- Hato, S. v., Khong, A., de Vries, I. J. M., & Lesterhuis, W. J. (2014). Molecular pathways: The immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics. *Clinical Cancer Research*, 20(11), 2831–2837. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3141>
- Hossain, M. S., Karuniawati, H., Jairoun, A. A., Urbi, Z., Ooi, D. J., John, A., Lim, Y. C., Kaderi Kibria, K. M., Mohiuddin, A. K. M., Ming, L. C., Goh, K. W., & Hadi, M. A. (2022). Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. In *Cancers* (Vol. 14, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers14071732>
- Hulkower, K. I., & Herber, R. L. (2011). Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. In *Pharmaceutics* (Vol. 3, Issue 1, pp. 107–124). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3010107>
- Hyndman, I. J. (2016). Review: the Contribution of both Nature and Nurture to Carcinogenesis and Progression in Solid Tumours. In *Cancer Microenvironment* (Vol. 9, Issue 1, pp. 63–69). Springer New York LLC. <https://doi.org/10.1007/s12307-016-0183-4>
- Ji, P., Wang, P., Chen, H., Xu, Y., Ge, J., Tian, Z., & Yan, Z. (2023). Potential of Copper and Copper Compounds for Anticancer Applications. In *Pharmaceuticals* (Vol. 16, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph16020234>
- Johnstone, T. C., Park, G. Y., & Lippard, S. J. (2014). *Understanding and Improving Platinum Anticancer Drugs-Phenanthriplatin*.
- Joyce, C., Rayi, A., & Kasi, A. (2022). *Tumor-Suppressor Genes*.
- Keum, N. N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 16, Issue 12, pp. 713–732). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>
- Khan, A. Q., Rashid, K., AlAmodi, A. A., Agha, M. V., Akhtar, S., Hakeem, I., Raza, S. S., & Uddin, S. (2021). Reactive oxygen species (ROS) in cancer pathogenesis and therapy: An update on the role of ROS in anticancer action of benzophenanthridine alkaloids. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 143). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112142>

- Khodapasand, E., Jafarzadeh, N., Farrokhi, F., Kamalidehghan, B., & Houshmand, M. (2015). Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? *Iranian Biomedical Journal*, *19*(2), 69–75. <https://doi.org/10.6091/ibj.1366.2015>
- Komarnicka, U. K., Pucelik, B., Wojtala, D., Lesiów, M. K., Stochel, G., & Kyzioł, A. (2021). Evaluation of anticancer activity in vitro of a stable copper(I) complex with phosphine-peptide conjugate. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03352-2>
- Lelièvre, P., Sancey, L., Coll, J. L., Deniaud, A., & Busser, B. (2020). The multifaceted roles of copper in cancer: A trace metal element with dysregulated metabolism, but also a target or a bullet for therapy. In *Cancers* (Vol. 12, Issue 12, pp. 1–25). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers12123594>
- Lenis-Rojas, O. A., Cabral, R., Carvalho, B., Friães, S., Roma-Rodrigues, C., Fernández, J. A. A., Vila, S. F., Sanchez, L., Gomes, C. S. B., Fernandes, A. R., & Royo, B. (2021). Triazole-Based Half-Sandwich Ruthenium(II) Compounds: From in Vitro Antiproliferative Potential to in Vivo Toxicity Evaluation. *Inorganic Chemistry*, *60*(11), 8011–8026. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.1c00527>
- Lenis-Rojas, O. A., Carvalho, B., Cabral, R., Silva, M., Friães, S., Roma-Rodrigues, C., Meireles, M. S. H., Gomes, C. S. B., Fernández, J. A. A., Vila, S. F., Rubiolo, J. A., Sanchez, L., Baptista, P. V., Fernandes, A. R., & Royo, B. (2022). Manganese(I) tricarbonyl complexes as potential anticancer agents. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *27*(1), 49–64. <https://doi.org/10.1007/s00775-021-01910-7>
- Lenis-Rojas, O. A., Roma-Rodrigues, C., Carvalho, B., Cabezas-Sainz, P., Fernández Vila, S., Sánchez, L., Baptista, P. V., Fernandes, A. R., & Royo, B. (2022). In Vitro and In Vivo Biological Activity of Ruthenium 1,10-Phenanthroline-5,6-dione Arene Complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(21). <https://doi.org/10.3390/ijms232113594>
- Lim, S. M., Mohamad Hanif, E. A., & Chin, S. F. (2021). Is targeting autophagy mechanism in cancer a good approach? The possible double-edge sword effect. In *Cell and Bioscience* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00570-z>
- Liu, J., He, Y., Liu, D., He, Y., Tang, Z., Lou, H., Huo, Y., & Cao, X. (2018). Characterizing the binding interaction of astilbin with bovine serum albumin: A spectroscopic study in combination with molecular docking technology. *RSC Advances*, *8*(13), 7280–7286. <https://doi.org/10.1039/c7ra13272g>
- Lou, Y. Y., Zhou, K. L., Pan, D. Q., Shen, J. Le, & Shi, J. H. (2017). Spectroscopic and molecular docking approaches for investigating conformation and binding characteristics of

- clonazepam with bovine serum albumin (BSA). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, *167*, 158–167. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.029>
- Lucaciu, R. L., Hangan, A. C., Sevastre, B., & Oprean, L. S. (2022). Metallo-Drugs in Cancer Therapy: Past, Present and Future. In *Molecules* (Vol. 27, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules27196485>
- Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Dieste, A. P., Cerrada, E., & Yoldi, M. J. R. (2017). Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms18010197>
- Maroń, A., Czerwińska, K., Machura, B., Raposo, L., Roma-Rodrigues, C., Fernandes, A. R., Matecki, J. G., Szlapa-Kula, A., Kula, S., & Krompiec, S. (2018). Spectroscopy, electrochemistry and antiproliferative properties of Au(III), Pt(II) and Cu(II) complexes bearing modified 2,2':6',2''-terpyridine ligands. *Dalton Transactions*, *47*(18), 6444–6463. <https://doi.org/10.1039/c8dt00558c>
- Mendo, A. S., Figueiredo, S., Roma-Rodrigues, C., Videira, P. A., Ma, Z., Diniz, M., Larginho, M., Costa, P. M., Lima, J. C., Pombeiro, A. J. L., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2015). Characterization of antiproliferative potential and biological targets of a copper compound containing 4'-phenyl terpyridine. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *20*(6), 935–948. <https://doi.org/10.1007/s00775-015-1277-z>
- Mogos, R., Popovici, R., Tanase, A., Calistru, T., Popovici, P., Grigore, M., & Carauleanu, A. (2022). New approaches in ovarian cancer based on genetics and carcinogenesis hypotheses (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, *23*(6). <https://doi.org/10.3892/etm.2022.11351>
- Morais, T. S., Jousseume, Y., Piedade, M. F. M., Roma-Rodrigues, C., Fernandes, A. R., Marques, F., Villa De Brito, M. J., & Helena Garcia, M. (2018). Important cytotoxic and cytostatic effects of new copper(I)-phosphane compounds with N,N, N,O and N,S bidentate ligands. *Dalton Transactions*, *47*(23), 7819–7829. <https://doi.org/10.1039/c8dt01653d>
- Moustakas, M. (2021). The role of metal ions in biology, biochemistry and medicine. In *Materials* (Vol. 14, Issue 3, pp. 1–4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma14030549>
- Mucha, P., Hikisz, P., Gwoździński, K., Krajewska, U., Leniart, A., & Budzisz, E. (2019). Cytotoxic effect, generation of reactive oxygen/nitrogen species and electrochemical properties of Cu(II) complexes in comparison to half-sandwich complexes of Ru(II) with aminochromone derivatives. *RSC Advances*, *9*(55), 31943–31952. <https://doi.org/10.1039/c9ra05971g>

- Naik, M., Brahma, P., & Dixit, M. (2018). A cost-effective and efficient chick ex-ovo cam assay protocol to assess angiogenesis. *Methods and Protocols*, 1(2), 1–9. <https://doi.org/10.3390/mps1020019>
- Nakamura, H., & Takada, K. (2021). Reactive oxygen species in cancer: Current findings and future directions. In *Cancer Science* (Vol. 112, Issue 10, pp. 3945–3952). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/cas.15068>
- Naveen, P., Dallemer, F., Butcher, R. J., & Prabhakaran, R. (2018). New Ru(II) complexes containing tris(2-pyridylmethyl)amine. Synthesis, structural, CT-DNA/albumin interaction, antioxidant and cytotoxicity studies. *Inorganica Chimica Acta*, 471, 724–734. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2017.12.010>
- Ndagi, U., Mhlongo, N., & Soliman, M. E. (2017). Metal complexes in cancer therapy – An update from drug design perspective. In *Drug Design, Development and Therapy* (Vol. 11, pp. 599–616). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S119488>
- Nirmala, J. G., & Lopus, M. (2020). Cell death mechanisms in eukaryotes. In *Cell Biology and Toxicology* (Vol. 36, Issue 2, pp. 145–164). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10565-019-09496-2>
- Nsubuga, A., Mandl, G. A., & Capobianco, J. A. (2021). Investigating the reactive oxygen species production of Rose Bengal and Merocyanine 540-loaded radioluminescent nanoparticles. *Nanoscale Advances*, 3(5), 1375–1381. <https://doi.org/10.1039/d0na00964d>
- Nunes, A. S., Barros, A. S., Costa, E. C., Moreira, A. F., & Correia, I. J. (2019). 3D tumor spheroids as in vitro models to mimic in vivo human solid tumors resistance to therapeutic drugs. In *Biotechnology and Bioengineering* (Vol. 116, Issue 1, pp. 206–226). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/bit.26845>
- Otsuka, I. (2021). Molecular Sciences Mechanisms of High-Grade Serous Carcinogenesis in the Fallopian Tube and Ovary: Current Hypotheses, Etiologic Factors, and Molecular Alterations. *Int. J. Mol. Sci*, 22, 4409. <https://doi.org/10.3390/ijms>
- Otto, T., & Sicinski, P. (2017). Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 17, Issue 2, pp. 93–115). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.138>
- Palion-Gazda, J., Luz, A., Raposo, L. R., Choroba, K., Nycz, J. E., Bieńko, A., Lewińska, A., Erfurt, K., Baptista, P. V., Machura, B., Fernandes, A. R., Shul'pina, L. S., Ikonnikov, N. S., & Shul'pin, G. B. (2021). Vanadium(IV) complexes with methyl-substituted 8-hydroxyquinolines: Catalytic potential in the oxidation of hydrocarbons and alcohols with peroxides and biological activity. *Molecules*, 26(21). <https://doi.org/10.3390/molecules26216364>

- Pan, A., Mitra, I., Mukherjee, S., Ghosh, S., Chatterji, U., & Moi, S. C. (2021). Development of Anticancer Activity of the Pt(II) Complex with N-Heterocyclic Amine: Its in Vitro Pharmacokinetics with Thiol and Thio-Ethers, DNA and BSA Binding, and Cell Cycle Arrest. *ACS Applied Bio Materials*, *4*(1), 853–868. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c01374>
- Pandurangan, A. kumar, Divya, T., Kumar, K., Dineshababu, V., Velavan, B., & Sudhandiran, G. (2018). Colorectal carcinogenesis: Insights into the cell death and signal transduction pathways: A review. In *World Journal of Gastrointestinal Oncology* (Vol. 10, Issue 9, pp. 244–259). Baishideng Publishing Group Co. <https://doi.org/10.4251/wjgo.v10.i9.244>
- Pedrosa, P., Mendes, R., Cabral, R., Martins, L. M. D. R. S., Baptista, P. V., & Fernandes, A. R. (2018). Combination of chemotherapy and Au-nanoparticle phototherapy in the visible light to tackle doxorubicin resistance in cancer cells. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29870-0>
- Peng, F., Liao, M., Qin, R., Zhu, S., Peng, C., Fu, L., Chen, Y., & Han, B. (2022). Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 7, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01110-y>
- Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., & Tzur, A. (2012). JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death and Disease*, *3*(11). <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.171>
- Poillet-Perez, L., Despouy, G., Delage-Mourroux, R., & Boyer-Guittaut, M. (2015). Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. In *Redox Biology* (Vol. 4, pp. 184–192). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.12.003>
- Rawla, P., Sunkara, T., & Barsouk, A. (2019). Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. In *Przeglad Gastroenterologiczny* (Vol. 14, Issue 2, pp. 89–103). Termedia Publishing House Ltd. <https://doi.org/10.5114/pg.2018.81072>
- Reigosa-Chamorro, F., Raposo, L. R., Munín-Cruz, P., Pereira, M. T., Roma-Rodrigues, C., Baptista, P. V., Fernandes, A. R., & Vila, J. M. (2021). In Vitro and in Vivo Effect of Palladacycles: Targeting A2780 Ovarian Carcinoma Cells and Modulation of Angiogenesis. *Inorganic Chemistry*, *60*(6), 3939–3951. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.0c03763>
- Ridgway, B. M., Foi, A., Corrêa, R. S., Bikiel, D. E., Ellena, J., Doctorovich, F., & Di Salvo, F. (2017). Conformational and structural diversity of iridium dimethyl sulfoxide complexes. *Acta Crystallographica Section B: Structural Science, Crystal Engineering and Materials*, *73*(6), 1032–1042. <https://doi.org/10.1107/S2052520617011490>

- Roma-Rodrigues, C., Malta, G., Peixoto, D., Ferreira, L. M., Baptista, P. V., Fernandes, A. R., & Branco, P. S. (2020). Synthesis of new hetero-arylidene-9(10H)-anthrone derivatives and their biological evaluation. *Bioorganic Chemistry*, *99*. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103849>
- Rottenberg, S., Disler, C., & Perego, P. (2021). The rediscovery of platinum-based cancer therapy. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 21, Issue 1, pp. 37–50). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41568-020-00308-y>
- Ruiz-Espigares, J., Nieto, D., Moroni, L., Jiménez, G., & Marchal, J. A. (2021). Evolution of Metastasis Study Models toward Metastasis-On-A-Chip: The Ultimate Model? In *Small* (Vol. 17, Issue 14). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/smll.202006009>
- Sak, K. (2012). Chemotherapy and Dietary Phytochemical Agents. *Chemotherapy Research and Practice*, *2012*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2012/282570>
- Salehi, R., Abyar, S., Ramazani, F., Khandar, A. A., Hosseini-Yazdi, S. A., White, J. M., Edalati, M., Kahroba, H., & Talebi, M. (2022). Enhanced anticancer potency with reduced nephrotoxicity of newly synthesized platinum-based complexes compared with cisplatin. *Scientific Reports*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11904-3>
- Samari, F., Hemmateenejad, B., Shamsipur, M., Rashidi, M., & Samouei, H. (2012). Affinity of two novel five-coordinated anticancer Pt(II) complexes to human and bovine serum albumins: A spectroscopic approach. *Inorganic Chemistry*, *51*(6), 3454–3464. <https://doi.org/10.1021/ic202141g>
- Sambale, F., Lavrentieva, A., Stahl, F., Blume, C., Stiesch, M., Kasper, C., Bahnemann, D., & Scheper, T. (2015). Three dimensional spheroid cell culture for nanoparticle safety testing. *Journal of Biotechnology*, *205*, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.001>
- Sawicki, T., Ruszkowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., & Przybyłowicz, K. E. (2021). A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. In *Cancers* (Vol. 13, Issue 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>
- Sazonova, E. v., Kopeina, G. S., Imyanitov, E. N., & Zhivotovsky, B. (2021). Platinum drugs and taxanes: can we overcome resistance? In *Cell Death Discovery* (Vol. 7, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00554-5>
- Sengupta, P., Pal, U., Roy, P., Samanta, T., Chattopadhyay, N., Sen, K., & Bose, A. (2022). Effect of a Metal Ion in Modulating the Binding Interaction of a Dietary Flavonoid with Bovine Serum Albumin and DNA: A Spectroscopic and Theoretical Approach. *ACS Food Science and Technology*, *2*(1), 114–124. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.1c00361>

- Sequeira, D., Baptista, P. V., Valente, R., Piedade, M. F. M., Garcia, M. H., Morais, T. S., & Fernandes, A. R. (2021). Cu(i) complexes as new antiproliferative agents against sensitive and doxorubicin resistant colorectal cancer cells: synthesis, characterization, and mechanisms of action. *Dalton Transactions*, 50(5), 1845–1865. <https://doi.org/10.1039/d0dt03566a>
- Sharma, R., Singh, V. J., & Chawla, P. A. (2021). Advancements in the Use of Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 22(5), 821–835. <https://doi.org/10.2174/1871520621666210805150705>
- Shi, J. H., Zhou, K. L., Lou, Y. Y., & Pan, D. Q. (2018). Multi-spectroscopic and molecular modeling approaches to elucidate the binding interaction between bovine serum albumin and darunavir, a HIV protease inhibitor. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 188, 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.07.040>
- Shumi, G., Desalegn, T., Demissie, T. B., Ramachandran, V. P., & Eswaramoorthy, R. (2022). Metal Complexes in Target-Specific Anticancer Therapy: Recent Trends and Challenges. In *Journal of Chemistry* (Vol. 2022). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2022/9261683>
- Simpson, P. v., Desai, N. M., Casari, I., Massi, M., & Falasca, M. (2019). Metal-based antitumor compounds: Beyond cisplatin. In *Future Medicinal Chemistry* (Vol. 11, Issue 2, pp. 119–135). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0248>
- Smith, M. T., Guyton, K. Z., Kleinstreuer, N., Borrel, A., Cardenas, A., Chiu, W. A., Felsher, D. W., Gibbons, C. F., Goodson, W. H., Houck, K. A., Kane, A. B., la Merrill, M. A., Lebec, H., Lowe, L., McHale, C. M., Minocherhomji, S., Rieswijk, L., Sandy, M. S., Sone, H., ... Fielden, M. (2020). The key characteristics of carcinogens: Relationship to the hallmarks of cancer, relevant biomarkers, and assays to measure them. In *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* (Vol. 29, Issue 10, pp. 1887–1903). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-19-1346>
- Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., & Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. In *Redox Biology* (Vol. 25). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101084>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Susilo, I., Maulida, H., Alimsardjono, L., Fauziah, D., & Pertiwi, H. (2021). Apoptosis-Inducing Factor, Protein Expression, and Apoptosis Changes with Glutamine in Podocytes Cells

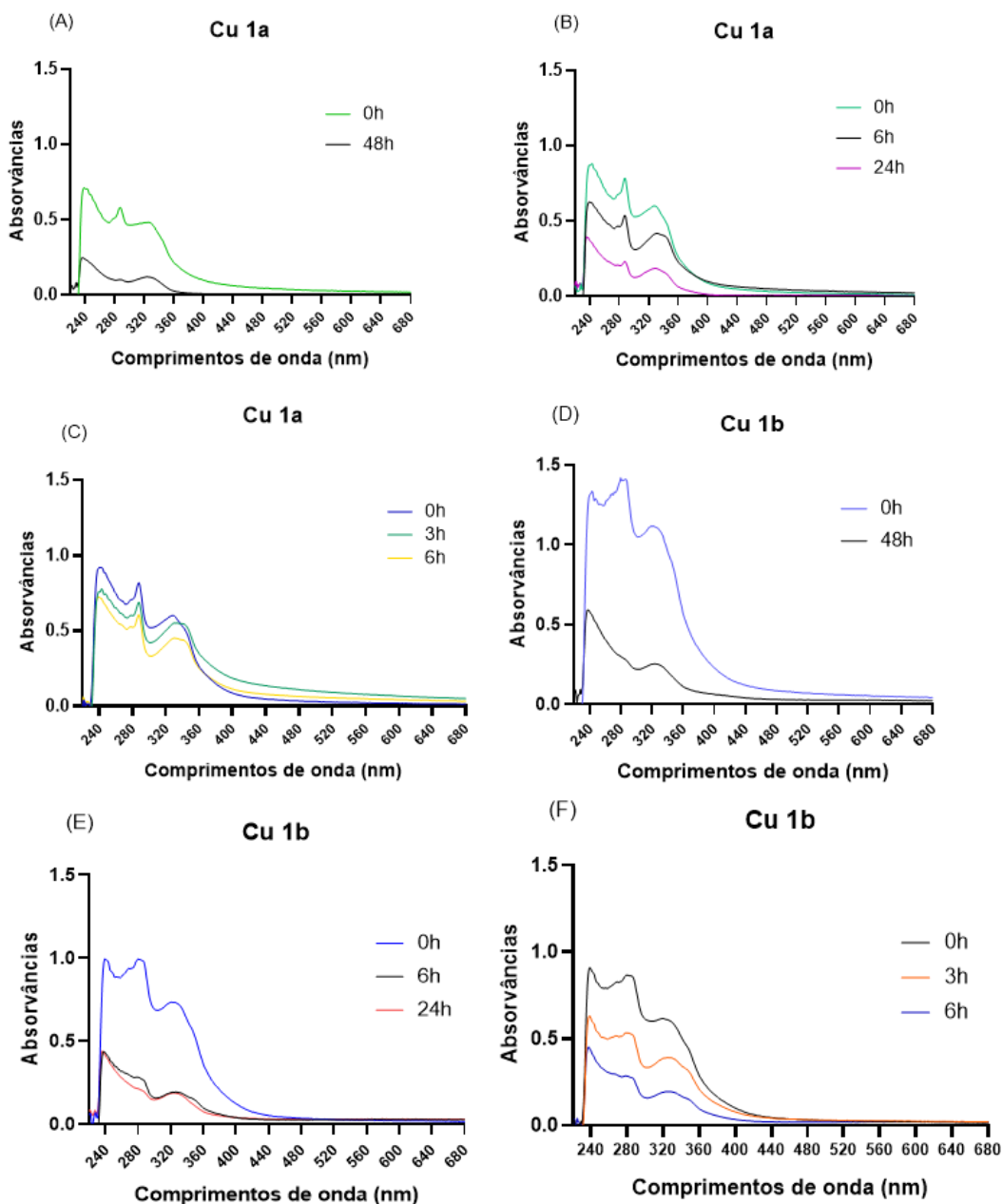
- Exposed with Cisplatin. *Veterinary Medicine International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5599452>
- Tan, E. P., Duncan, F. E., & Slawson, C. (2017). The sweet side of the cell cycle. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 45, Issue 2, pp. 313–322). Portland Press Ltd. <https://doi.org/10.1042/BST20160145>
- Tariq, K., & Ghias, K. (2016). Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. In *Cancer Biology and Medicine* (Vol. 13, Issue 1, pp. 120–135). Cancer Biology and Medicine. <https://doi.org/10.28092/j.issn.2095-3941.2015.0103>
- Topală, T., Bodoki, A., Oprean, L., & Oprean, R. (2014). Bovine serum albumin interactions with metal complexes. *Clujul Medical*, 87(4), 5. <https://doi.org/10.15386/cjmed-357>
- Verheijen, M., Lienhard, M., Schrooders, Y., Clayton, O., Nudischer, R., Boerno, S., Timmermann, B., Selevsek, N., Schlapbach, R., Gmuender, H., Gotta, S., Geraedts, J., Herwig, R., Kleinjans, J., & Caiment, F. (2019). DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0>
- Vermeulen, K., van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. In *Cell Prolif* (Vol. 36).
- Visconti, R., della Monica, R., & Grieco, D. (2016). Cell cycle checkpoint in cancer: A therapeutically targetable double-edged sword. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 35, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0433-9>
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (2004). Cancer genes and the pathways they control. In *Nature Medicine* (Vol. 10, Issue 8, pp. 789–799). <https://doi.org/10.1038/nm1087>
- Wang, Z. (2021). Regulation of cell cycle progression by growth factor-induced cell signaling. In *Cells* (Vol. 10, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells10123327>
- Welch, D. R., & Hurst, D. R. (2019). Defining the Hallmarks of Metastasis. In *Cancer Research* (Vol. 79, Issue 12, pp. 3011–3027). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0458>
- Weston, A. , & H. C. C. (2003). Multistage Carcinogenesis. In P. R. W. R. et al Kufe DW (Ed.), *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13982/>
- Whelan, E., Kalliala, I., Semertzidou, A., Raglan, O., Bowden, S., Kechagias, K., Markozannes, G., Cividini, S., McNeish, I., Marchesi, J., Macintyre, D., Bennett, P., Tsilidis, K., & Kyrgiou, M. (2022). Risk Factors for Ovarian Cancer: An Umbrella Review of the Literature. In *Cancers* (Vol. 14, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cancers14112708>

- Wongsuwan, S., Chatwichien, J., Sirisaksoontorn, W., Chainok, K., Songsasen, A., & Chotima, R. (2023). Novel Pd(ii) pincer complexes bearing salicylaldimine-based benzothiazole derivatives: synthesis, structural characterization, DNA/BSA binding, and biological evaluation. *New Journal of Chemistry*, *47*(22), 10624–10637. <https://doi.org/10.1039/d3nj00458a>
- Wu, S., Zhu, W., Thompson, P., & Hannun, Y. A. (2018). Evaluating intrinsic and non-intrinsic cancer risk factors. In *Nature Communications* (Vol. 9, Issue 1). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05467-z>
- Xu, H., Yao, N., Xu, H., Wang, T., Li, G., & Li, Z. (2013). Characterization of the interaction between eupatorin and bovine serum albumin by spectroscopic and molecular modeling methods. *International Journal of Molecular Sciences*, *14*(7), 14185–14203. <https://doi.org/10.3390/ijms140714185>
- Yang, H., Villani, R. M., Wang, H., Simpson, M. J., Roberts, M. S., Tang, M., & Liang, X. (2018). The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. In *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research* (Vol. 37, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0909-x>
- Yang, M., & Park, J. Y. (2012). DNA methylation in promoter region as biomarkers in prostate cancer. *Methods in Molecular Biology*, *863*, 67–109. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-612-8_5
- Yonekawa, T., & Thorburn, A. (2013). Autophagy and cell death. *Essays in Biochemistry*, *55*(1), 105–117. <https://doi.org/10.1042/BSE0550105>
- Yun, C. W., & Lee, S. H. (2018). The roles of autophagy in cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19113466>
- Zanoni, M., Piccinini, F., Arienti, C., Zamagni, A., Santi, S., Polico, R., Bevilacqua, A., & Tesei, A. (2016). 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: A systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep19103>
- Zeinabad, H. A., Zarrabian, A., Saboury, A. A., Alizadeh, A. M. O., & Falahati, M. (2016). Interaction of single and multi wall carbon nanotubes with the biological systems: Tau protein and PC12 cells as targets. *Scientific Reports*, *6*. <https://doi.org/10.1038/srep26508>
- Zhang, C., Xu, C., Gao, X., & Yao, Q. (2022). Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. In *Theranostics* (Vol. 12, Issue 5, pp. 2115–2132). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/thno.69424>

- Zhang, J., Yang, H., Li, D., & Dou, J. (2018). Copper(II) complexes based on aminohydroxamic acids: Synthesis, structures, in vitro cytotoxicities and DNA/BSA interactions. *Crystals*, 8(5). <https://doi.org/10.3390/cryst8050201>
- Zhao, W., Feng, H., Sun, W., Liu, K., Lu, J. J., & Chen, X. (2017). Tert-butyl hydroperoxide (t-BHP) induced apoptosis and necroptosis in endothelial cells: Roles of NOX4 and mitochondrion. *Redox Biology*, 11, 524–534. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.036>
- Zhu, G., Pei, L., Xia, H., Tang, Q., & Bi, F. (2021). Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. In *Molecular Cancer* (Vol. 20, Issue 1). Bio-Med Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01441-4>

6 ANEXOS

A.1 Estabilidade e Solubilidade dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a



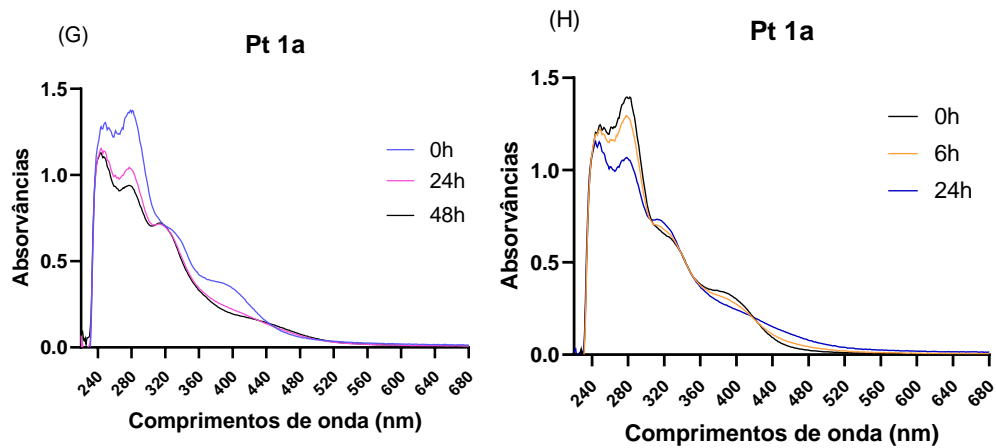
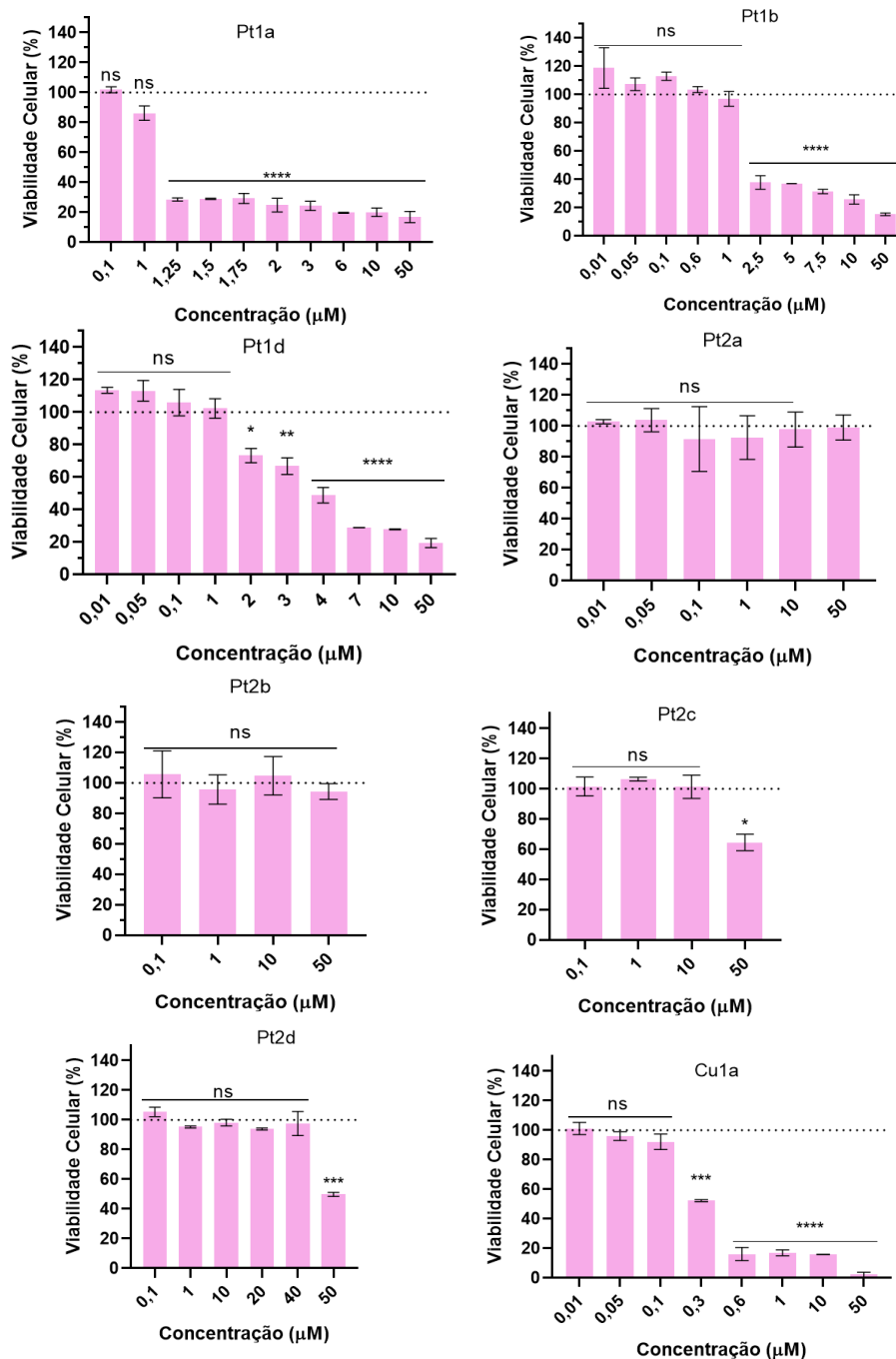


Figura 6.1- Espectros de absorção representativos da estabilidade do (A) (B) e (C) complexo Cu1a (50 μ M) (D) (E) e (F) complexo Cu1b (50 μ M) e (G) e (H) complexo Pt1a (50 μ M) em RPMI. Os espectros foram obtidos para diferentes tempos de incubação: 0, 3, 6, 24 e 48 horas, sendo o armazenamento feito a 37°C.

A.2 Ensaios de viabilidade celular HCT116, HCT116doxR, A2780, Fibroblastos e esferóides de HCT116doxR

HCT116



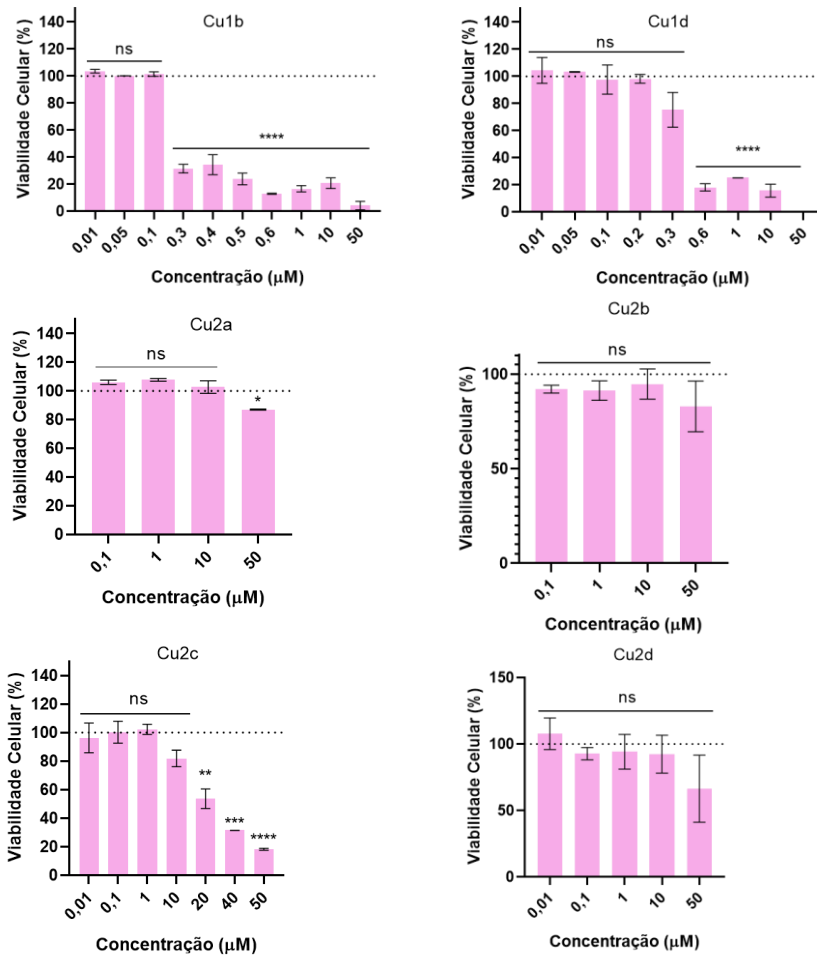
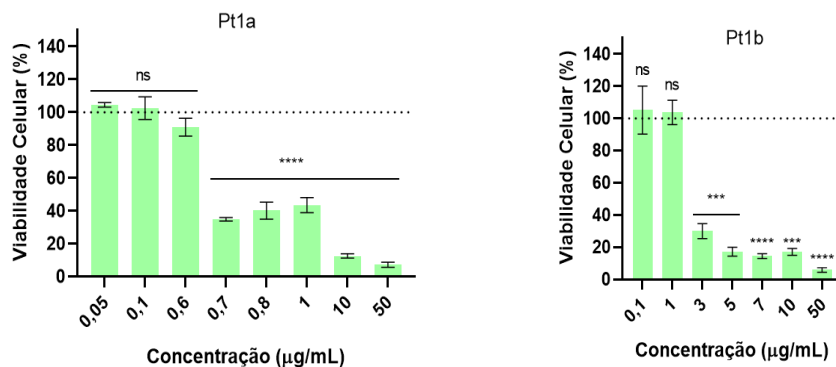


Figura 6.2- Viabilidade celular da linha tumoral HCT116 após 48 horas de exposição a diversas concentrações de complexos. DMSO 0,1% (v/v) foi utilizado como veículo de controle (corresponde à linha a tracejado). Os valores apresentados correspondem à média \pm SEM de dois ensaios biológicos independentes e a significância estatística foi avaliada em relação ao controle de DMSO) pelo método T-Student e One-Way ANOVA (* p-value \leq 0,05; ** p-value \leq 0,005; *** p-value \leq 0,0005; **** p-value \leq 0,0001).

HCT116doxR



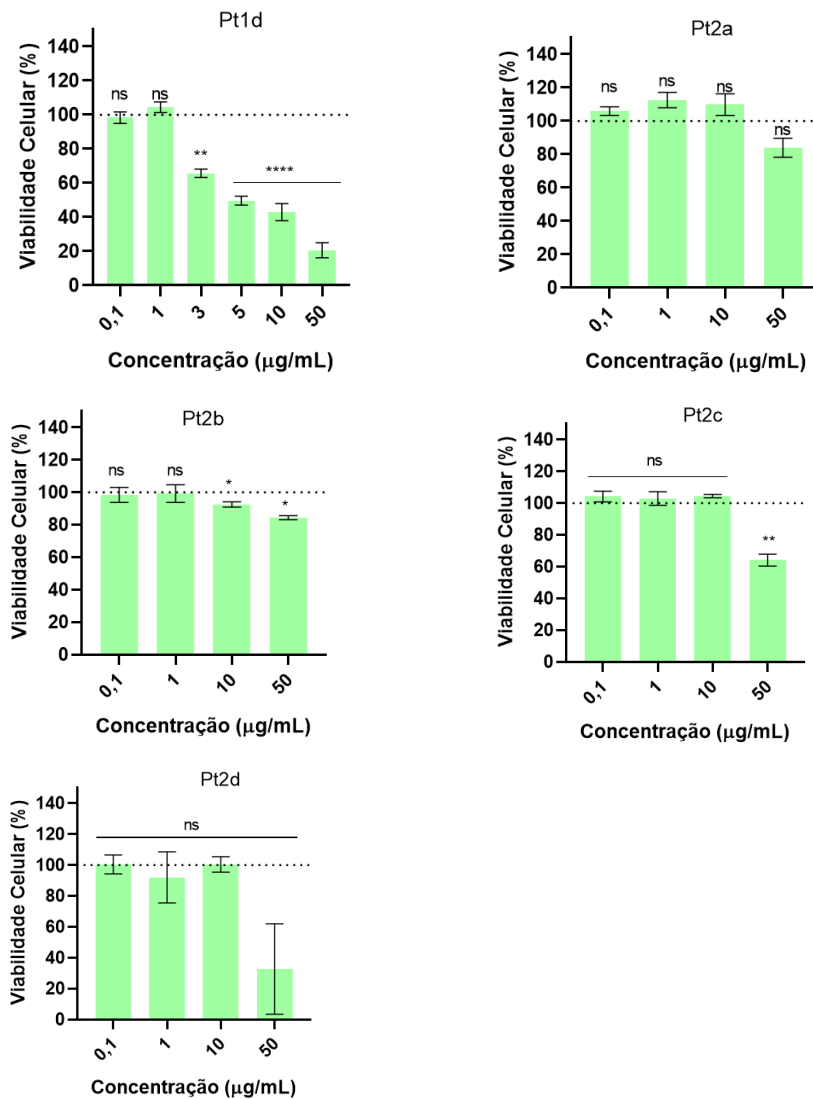
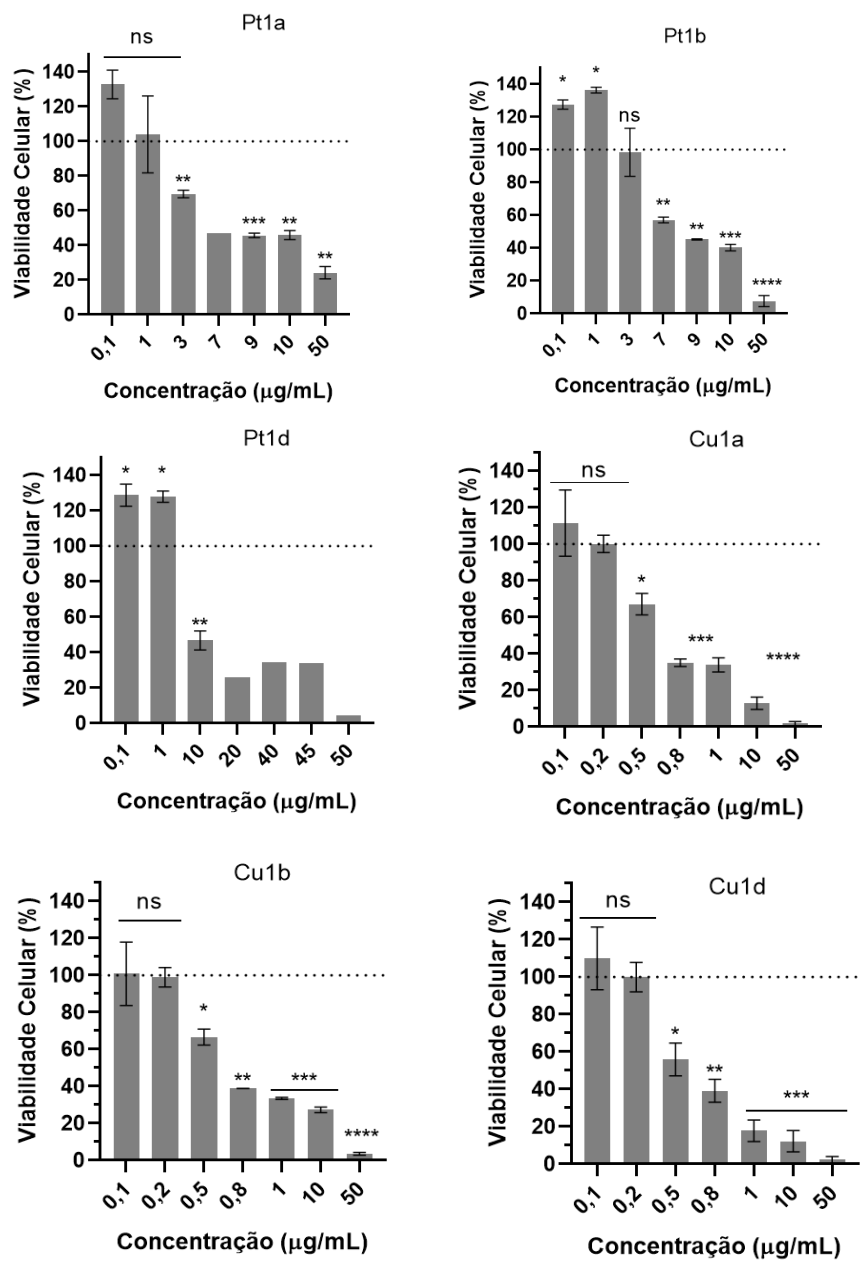


Figura 6.3- Viabilidade celular da linha tumoral HCT116doxR após 48 horas de exposição a diversas concentrações de com-plexos. DMSO 0,1% (v/v) foi utilizado como veículo de controlo. Os valores apresentados correspondem à média \pm SEM de dois ensaios biológicos independentes e a significância estatística foi avaliada em relação ao controlo de DMSO) pelo método T-Student e One-Way ANOVA (* p-value \leq 0,05; ** p-value \leq 0,005; *** p-value \leq 0,0005; **** p-value \leq 0,0001).

A2780



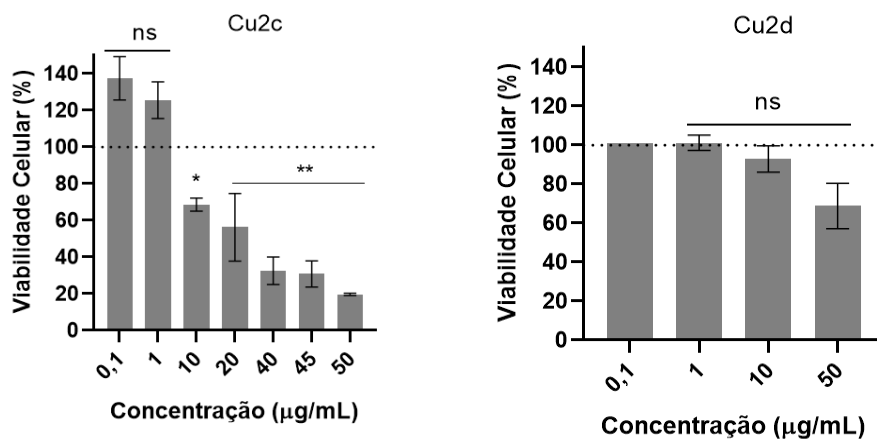
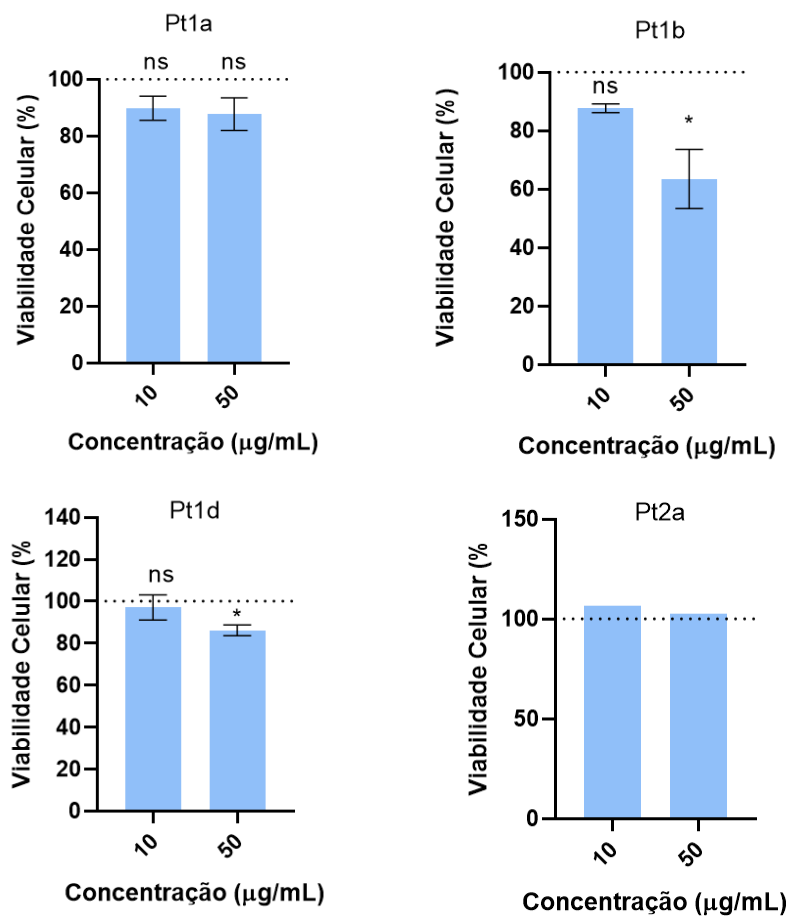
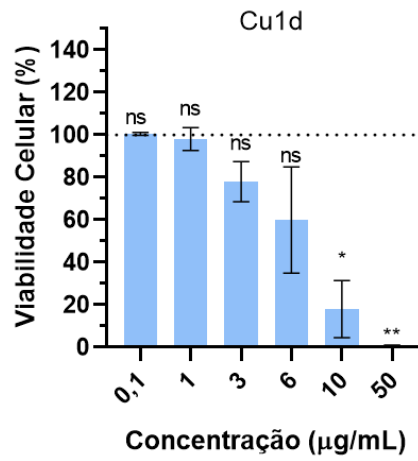
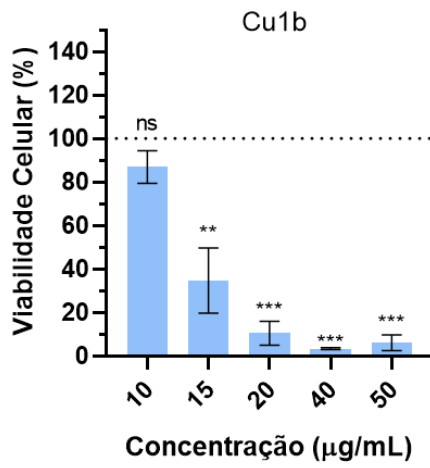
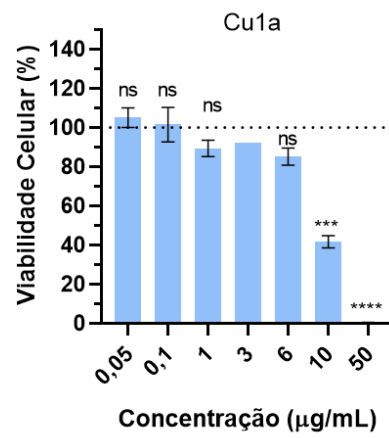
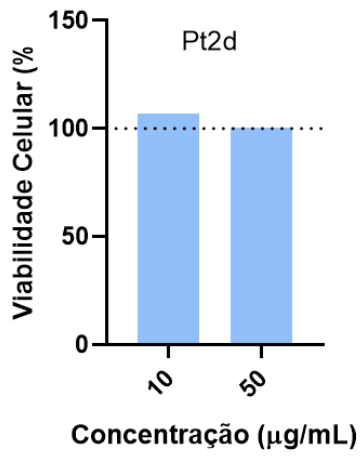
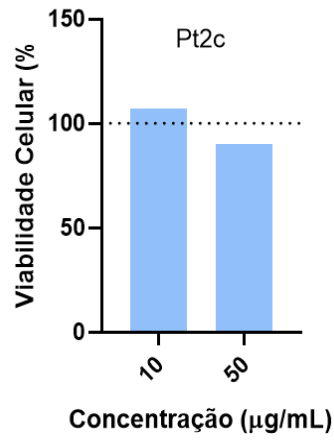
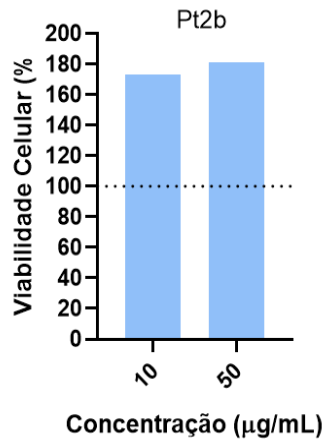


Figura 6.4- Viabilidade celular da linha tumoral A2780 após 48 horas de exposição a diversas concentrações de complexos. DMSO 0,1% (v/v) foi utilizado como veículo de controlo. Os valores apresentados correspondem à média \pm SEM de dois ensaios biológicos independentes e a significância estatística foi avaliada em relação ao controlo de DMSO) pelo método T-Student e One-Way ANOVA (* p-value \leq 0,05; ** p-value \leq 0,005; *** p-value \leq 0,0005; **** p-value \leq 0,0001).

Fibroblastos





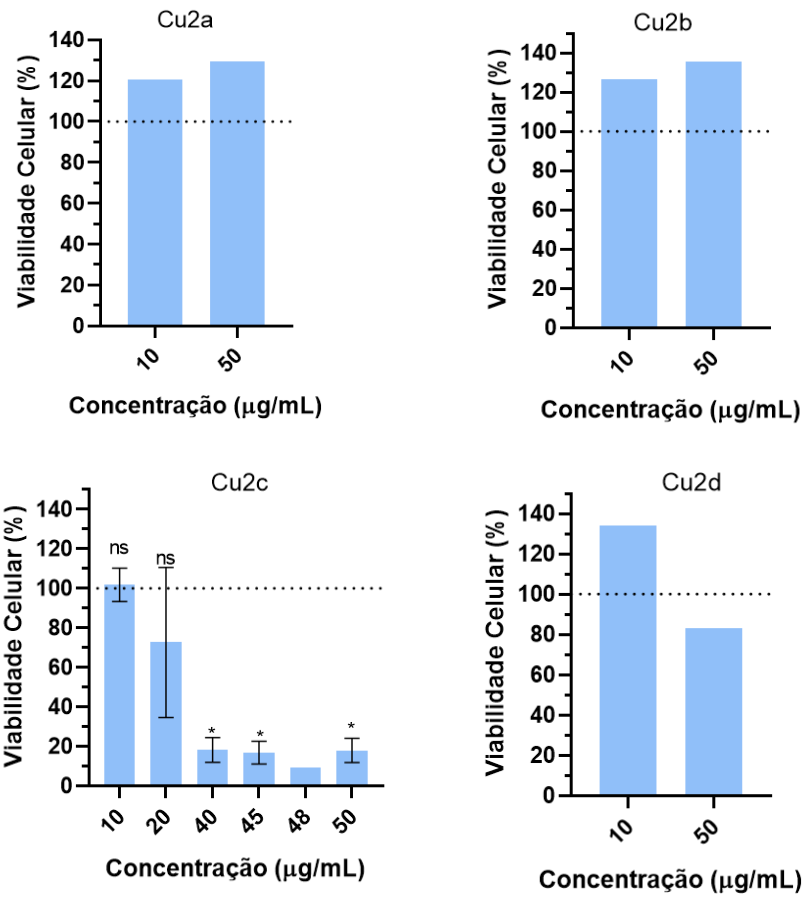


Figura 6.5- Viabilidade celular da linha de células saudáveis (Fibroblastos) após 48 horas de exposição a diversas concentrações de complexos. DMSO 0,1% (v/v) foi utilizado como veículo de controlo. Os valores apresentados correspondem à média \pm SEM de dois ensaios biológicos independentes e a significância estatística foi avaliada em relação ao controlo de DMSO) pelo método T-Student e One-Way ANOVA (* p-value \leq 0,05; ** p-value \leq 0,005; *** p-value \leq 0,0005; **** p-value \leq 0,0001).

Esferóides HCT116doxR

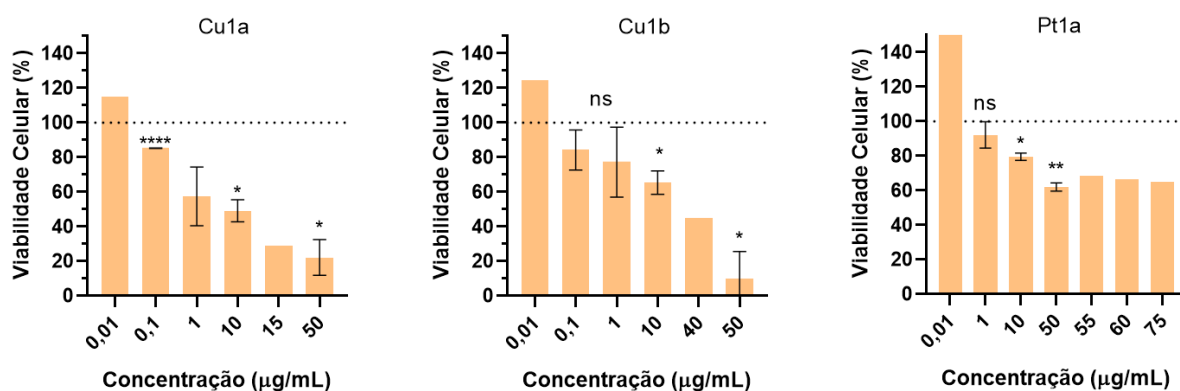
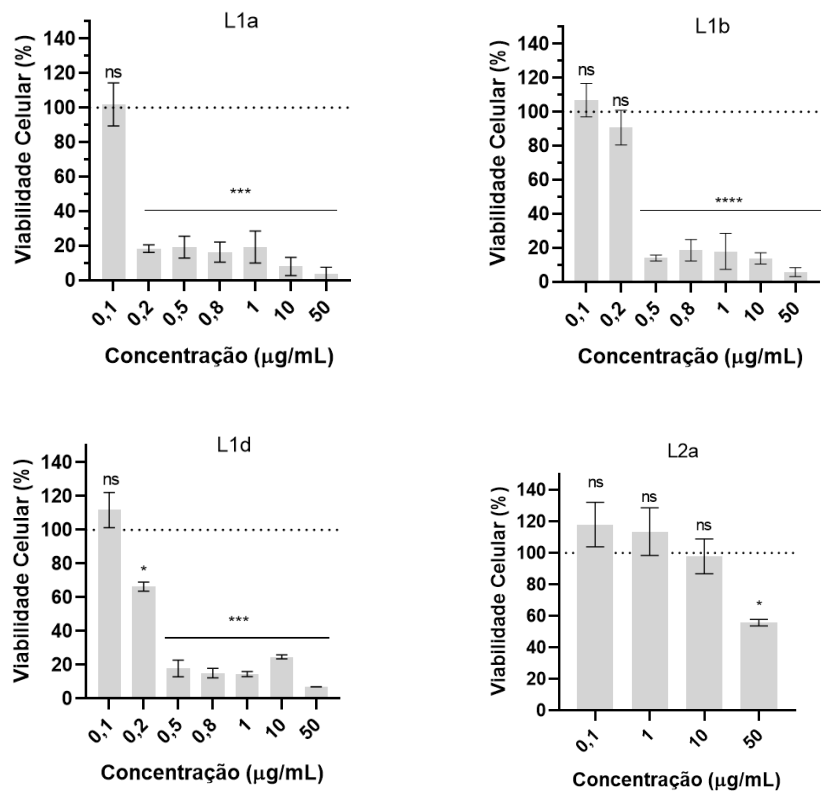


Figura 6.6- Viabilidade celular de esferóides constituídos pela linha de células saudáveis de HCT116doxR após 48 horas de exposição a diversas concentrações dos complexos Cu1a, Cu1b e Pt1a. DMSO 0,1% (v/v) foi utilizado como veículo de controlo. Os valores apresentados correspondem à média \pm SEM de dois ensaios biológicos independentes e a significância estatística foi avaliada em relação ao controlo de DMSO) pelo método T-Student e One-Way ANOVA (* p-value \leq 0,05; ** p-value \leq 0,005; *** p-value \leq 0,0005; **** p-value \leq 0,0001).

Ligandos HCT116doxR



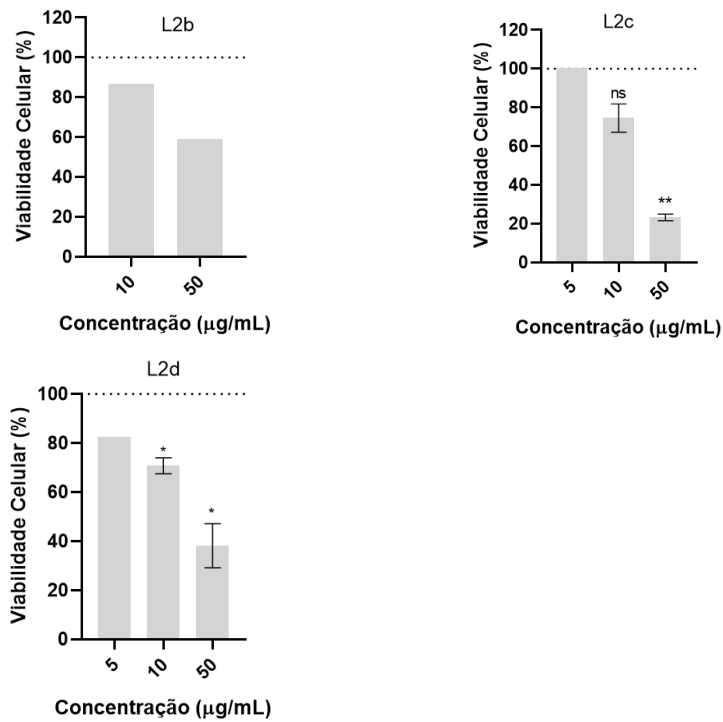
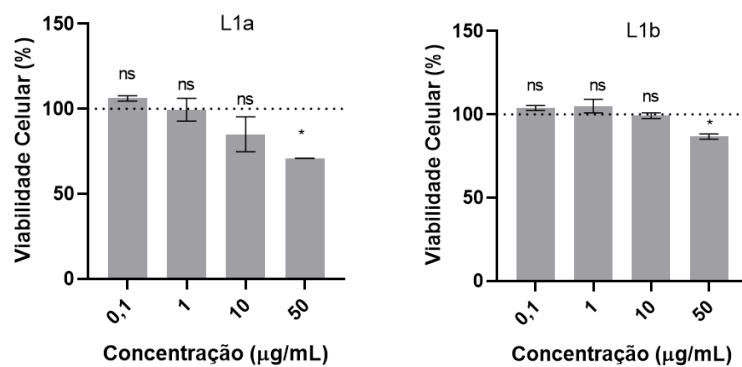


Figura 6.7- Viabilidade celular da linha de células tumorais de HCT116doxR após 48 horas de exposição a diversas concentrações de ligandos. DMSO 0,1% (v/v) foi utilizado como veículo de controlo. Os valores apresentados correspondem à média \pm SEM de dois ensaios biológicos independentes e a significância estatística foi avaliada em relação ao controlo de DMSO pelo método T-Student e One-Way ANOVA (* p-value \leq 0,05; ** p-value \leq 0,005; *** p-value \leq 0,0005; **** p-value \leq 0,0001).

Ligandos Fibroblastos



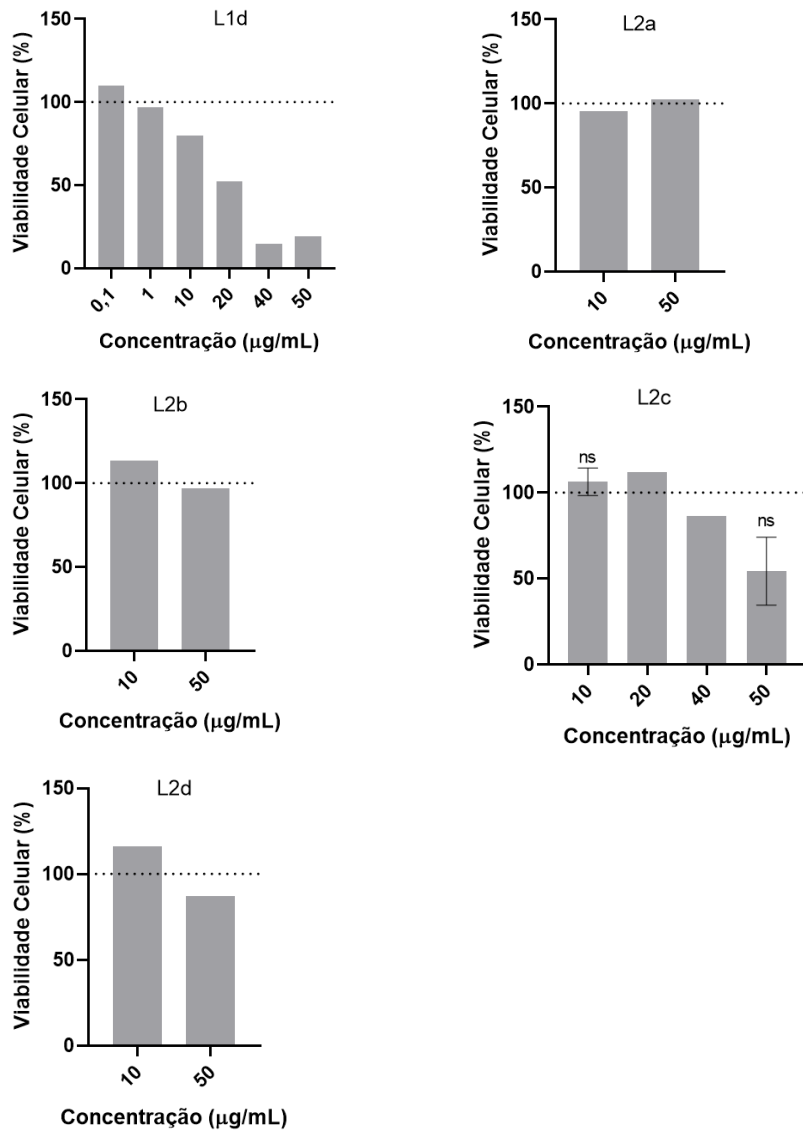


Figura 6.8- Viabilidade celular da linha de células saudáveis de Fibroblastos após 48 horas de exposição a diversas concentrações de ligandos. DMSO 0,1% (v/v) foi utilizado como veículo de controlo. Os valores apresentados correspondem à média \pm SEM de dois ensaios biológicos independentes e a significância estatística foi avaliada em relação ao controlo de DMSO) pelo método T-Student e One-Way ANOVA (* p-value \leq 0,05; ** p-value \leq 0,005; *** p-value \leq 0,0005; **** p-value \leq 0,0001).

A.3 Ensaio de Western Blot - Expressão de Bax e BCL-2

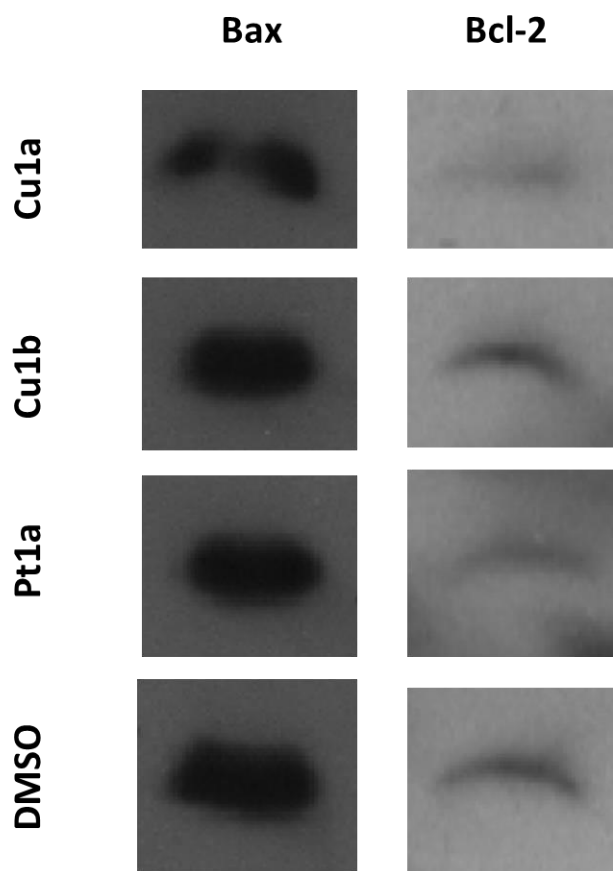


Figura 6.9- Imagens da revelação da expressão de Bax e BCL-2 após 48 horas de exposição de HCT116doxR aos IC50 de Cu1a, Cu1a e Pt1a e 0,1% (v/v) DMSO usado como veículo de controlo.

A.4 Ensaio de Potencial angiogénico *in vivo* em ovos de galinha

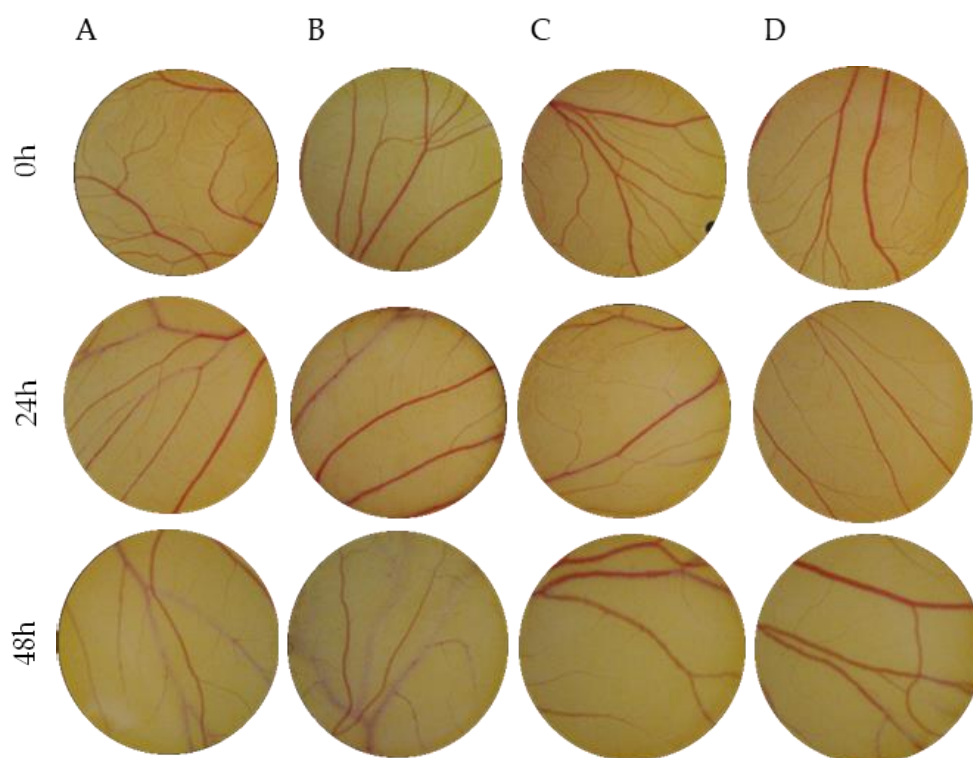


Figura 6.10- Exemplos de áreas de CAM às 0, 24 e 48h após exposição a A) controlo de PBS B) complexo Cu1a C) complexo Cu1b e D) o complexo Pt1a.

A.5 Ensaio de Migração Celular em Fibroblastos

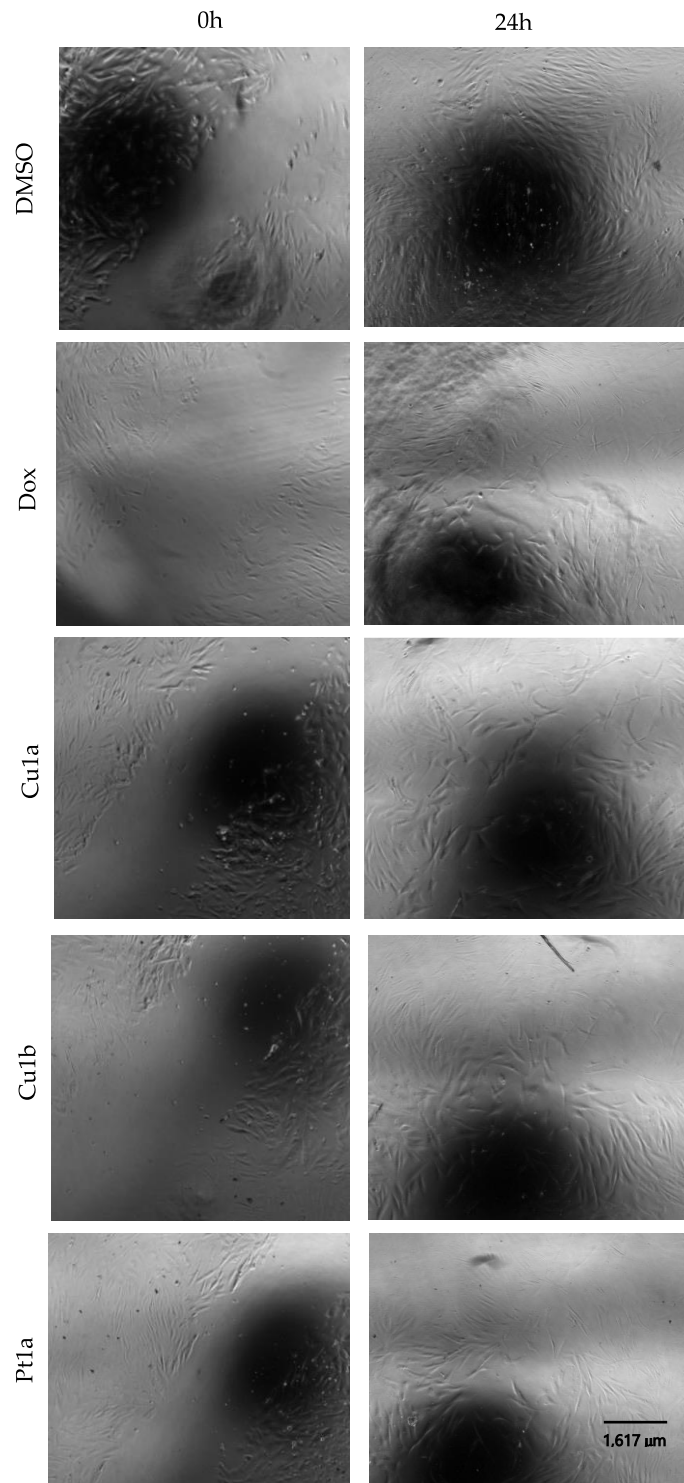


Figura 6.11- Imagens representativas do ensaio de cicatrização de feridas (em inglês *wound-healing assay*) em fibroblastos após a incubação de 0 e 24 h. Microscópio invertido com ampliação 4x.



2023

Cristiana Marques

Avaliação de complexos metálicos de Cobre (Cu(II)) e de Platina (Pt(II))
como agentes an-tiproliferativos em células tumorais