



BEATRIZ GUERREIRO FILIPE

Licenciada em Bioquímica

ESTUDO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE COMPLEXOS DE VANÁDIO (IV) EM CÉLULAS TUMORAIS

MESTRADO EM GENÉTICA MOLECULAR E BIOMEDICINA

Universidade NOVA de Lisboa
Setembro 2022

ESTUDO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO DE COMPLEXOS DE VANÁDIO (IV) EM CÉLULAS TUMORAIS

BEATRIZ GUERREIRO FILIPE

Licenciada em Bioquímica

Orientadora: Prof. Doutora Maria Alexandra Nuncio de Carvalho Ramos
Fernandes,
Professora Auxiliar com Agregação da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade
NOVA de Lisboa

Júri:

Presidente: Doutora Paula Maria Theriaga Mendes Bernardo
Gonçalves
Professora Associada da Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade NOVA de Lisboa

Arguente: Doutor Oscar Lenis Rojas
Investigador do Instituto de Tecnologia Química e Biológica António
Xavier da Universidade NOVA de Lisboa

Orientadora: Doutora Maria Alexandra Nuncio de Carvalho Ramos
Fernandes
Professora Auxiliar com Agregação da Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade NOVA de Lisboa

MESTRADO EM GENÉTICA MOLECULAR E BIOMEDICINA

Universidade NOVA de Lisboa
Setembro, 2022

Estudo do efeito antiproliferativo de complexos de Vanádio (IV) em células tumorais

Copyright © Beatriz Guerreiro Filipe, 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.

Este documento foi criado com o processador de texto Microsoft Word e o *template* NOVAtesis Word.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar por agradecer à professora Doutora Alexandra Fernandes, a minha orientadora, por ter tornado possível a realização deste trabalho no seu laboratório. Queria agradecer-lhe por todo o apoio ao longo do último ano e por ter confiado em mim e nas minhas capacidades. Muito obrigado por todos os conselhos e sugestões e por se ter demonstrado sempre disponível a ajudar.

Gostaria de agradecer à Katarzyna Choroba, do grupo da Doutora Barbara Machura, que sintetizou os meus compostos e permitiu assim a realização deste trabalho.

Queria agradecer a toda a gente do laboratório 315, do grupo *Human Genetics and Cancer Therapeutics*. Um obrigado à Daniela, Margarida e à Doutora Catarina Rodrigues, por toda a ajuda e pelo que me ensinaram ao longo do último ano. E claro, um especial obrigado à Sandra. Sandra, foste como uma mentora para mim. Ajudaste-me em tudo o que pudeste, sempre pronta a ficar até mais tarde ou a entrar mais cedo por causa dos meus ensaios. Muito muito obrigado.

Queria agradecer aos meus colegas de mestrado e de laboratório, André, Maria e Susana. Só me lembro de bons momentos. Convosco este ano passou a correr e o que seria do trabalho sem um pouco de diversão à mistura?

Por último, queria agradecer à minha família. Aos meus pais, por estarem sempre prontos a ouvir-me e a tentar ajudar. Sem vocês estes 5 anos não teriam sido possíveis. Apoiaram-me muito e continuam a apoiar todos os meus sonhos. São os melhores pais do mundo e eu amo-vos muito. E ao meu avô. Tens sempre um sorriso e um abraço pronto para me oferecer. Obrigado, avô.

Este trabalho é financiado por fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P., no âmbito dos projetos PTDC/QUI/CCL/032351/2017, PTDC/QUI-QIN/0146/2020, projetos UIDP/04378/2020 e UIDB/04378/2020 da Unidade de Ciências Biomoleculares Aplicadas - UCIBIO e projeto LA/P/0140/2020 do Laboratório Associado Instituto para a Saúde e a Bioeconomia - i4HB.

RESUMO

O cancro é a segunda maior causa de morte a nível mundial e o número de novos doentes oncológicos continua a subir. Apesar das novas e melhores terapêuticas que têm surgido ao longo dos anos, continua a ser necessário encontrar novos fármacos que possuam uma maior especificidade para as células tumorais e que consigam ultrapassar a resistência adquirida pelas células cancerígenas aos agentes quimioterapêuticos utilizados atualmente.

Assim, neste trabalho foi estudado o potencial antiproliferativo de novos complexos com centro metálico de Vanádio (IV) e o mecanismo de ação dos complexos mais promissores.

Foram realizados ensaios de citotoxicidade nas linhas tumorais HCT116, HCT116-DoxR e A2780, e em fibroblastos humanos (culturas 2D). Estes ensaios demonstraram um maior potencial citotóxico dos compostos V22, V26 e Y em células HCT116-DoxR, sendo os seus valores de IC_{50} de 0,1613; 0,1701 e 1,260, respetivamente. Estes resultados de citotoxicidade podem ser correlacionados com a elevada internalização dos compostos V22 e V26 e com a menor internalização do composto Y pelas células HCT116-DoxR.

Em ensaios de citotoxicidade em esferoides (culturas 3D) de células HCT116-DoxR, os compostos V22, V26 e Y demonstraram valores de IC_{50} aproximadamente 22x, 18x e 9x, respetivamente, superiores relativamente aos ensaios com linhas celulares em monocamada (2D).

Verificou-se que estes três complexos induzem morte celular através das vias de apoptose e autofagia, nomeadamente através da produção de ROS, sendo que o composto V26 induz a via apoptótica intrínseca e o composto V22 a via extrínseca. Relativamente ao composto Y, seriam necessários mais ensaios para compreender melhor o seu mecanismo de morte celular. Estes compostos não demonstraram interferir com o ciclo celular, nem com o processo de migração celular, não apresentando potencial citostático nem pro-/anti-metastático. Nos ensaios *in vivo*, com embriões de galinha, apenas o composto V26 demonstrou algum potencial anti-angiogénico após 24h de exposição.

Palavras-chave: Cancro; Células HCT116-DoxR; Quimioterapia; Complexos metálicos; Vanádio; Morte celular.

ABSTRACT

Cancer is the second leading cause of death worldwide and the number of new cancer patients continues to rise. Despite the new and better therapies that have emerged over the years, it is still necessary to find new drugs that have greater specificity for tumor cells and that can overcome the resistance acquired by cancer cells to current chemotherapeutic agents.

Thus, in this work the antiproliferative potential of new complexes with a Vanadium (IV) metal center and the mechanism of action of the most promising complexes were studied.

Cytotoxicity assays were performed on HCT116, HCT116-DoxR and A2780 cancer cell lines, and on human fibroblasts (2D cultures). These assays revealed a higher cytotoxic potential of compounds V22, V26 and Y in HCT116-DoxR cells, their IC₅₀ values being 0.1613, 0.1701 and 1.260, respectively. These cytotoxicity results can be correlated with the high internalization of compounds V22 and V26 and the lower internalization of compound Y by HCT116-DoxR cells.

In cytotoxicity assays on spheroids (3D cultures) of HCT116-DoxR cells, compounds V22, V26, and Y, demonstrated IC₅₀ values of approximately 22x, 18x, and 9x, respectively, higher relative to assays with monolayer (2D) cultures.

These three complexes were found to induce cell death through apoptosis and autophagy pathways, namely through ROS production, with compound V26 inducing the intrinsic apoptotic pathway and compound V22 the extrinsic pathway. Regarding compound Y, further assays would be needed to better understand its mechanism of cell death. These compounds have not been shown to interfere with the cell cycle or the cell migration process, showing neither cytostatic nor pro-/anti-metastatic potential. In *in vivo* assays with chicken embryos, only compound V26 showed some anti-angiogenic potential after 24h of exposure.

Keywords: Cancer; HCT116-DoxR cells; Chemotherapy; Metal complexes; Vanadium; Cell death.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Cancro – Introdução, distribuição, incidência e mortalidade.....	1
1.2. Biologia do cancro.....	3
1.2.1. Processo de Carcinogénese	3
1.2.2. Eventos mutagénicos	4
1.2.3. Causas	5
1.2.4. Microambiente tumoral, angiogénese e metastização	6
1.3. Cancro colorretal.....	8
1.3.1. Fatores de risco associados ao CRC	9
1.3.2. Carcinogénese do CRC	10
1.3.3. <i>Pathways</i> moleculares do CRC.....	11
1.4. Regulação do ciclo celular.....	12
1.4.1. <i>Checkpoints</i> do ciclo celular.....	14
1.5. Mecanismos de morte celular.....	15
1.5.1. Apoptose.....	16
1.5.2. Autofagia.....	19
1.5.3. Necrose e necroptose	20
1.6. Terapêutica do cancro	22
1.6.1. Diagnóstico e Terapêutica no CRC.....	25
1.6.2. Resistência à quimioterapia no CRC.....	28
1.6.3. Novos compostos com centro metálico de Vanádio no tratamento do cancro	29
1.7. Modelos 2D e 3D para o estudo do CRC.....	30
1.8. Objetivos do Trabalho	33
2. MATERIAIS E MÉTODOS	35
2.1. Equipamentos	35

2.2. Complexos metálicos estudados	36
2.3. Linhas celulares humanas	36
2.3.1. Características	36
2.3.2. Preparação e manutenção das culturas celulares	37
2.4. Ensaio de citotoxicidade em culturas 2D	39
2.5. Estudos de solubilidade e estabilidade dos complexos de vanádio	40
2.6. Preparação de modelos 3D de esferoides	40
2.7. Ensaio de citotoxicidade em modelos 3D de esferoides	41
2.8. Potencial Apoptótico	41
2.8.1. Marcação com Alexa Fluor 488-Anexina V e Iodeto de Propídio	41
2.8.2. Análise da expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas por <i>Western Blot</i>	42
2.8.3. Alteração do potencial de membrana mitocondrial	45
2.8.4. Caspase-8	46
2.9. Autofagia	47
2.10. Produção de espécies reativas de oxigénio	48
2.11. Internalização celular pelo método de ICP-AES (<i>Inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry</i>)	49
2.12. Progressão do ciclo celular	49
2.13. Ensaio de migração celular	51
2.14. Ensaio <i>ex-ovo</i> CAM	51
2.15. Estatística	52
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
3.1. Solubilidade e estabilidade dos complexos de vanádio	53
3.2. Ensaio de citotoxicidade em culturas 2D	54
3.3. Ensaio de citotoxicidade em modelos 3D de esferoides	61
3.4. Avaliação dos mecanismos de morte celular	62
3.4.1. Marcação com Alexa Fluor 488-Anexina V e IP	63

3.4.2. Análise da expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas por <i>Western Blot</i>	65
3.4.3. Alteração do potencial de membrana mitocondrial	68
3.4.4. Caspase-8	70
3.4.5. Autofagia	71
3.4.6. Produção de espécies reativas de oxigénio	73
3.5. Internalização celular dos compostos pelo método de ICP-AES	75
3.6. Progressão do ciclo celular	76
3.7. Metastização e angiogénese	78
3.7.1. Ensaio de migração celular	79
3.7.2. Ensaio <i>ex-ovo</i> CAM	80
4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	81
5. BIBLIOGRAFIA	87
A ANEXOS	95
A.1 Curva de calibração padrão	95
A.2 Constituição do gel de SDS-PAGE	95
A.3 Montagem do Sistema de transferência	95
A.4 Solubilidade e estabilidade dos compostos – Espectros de absorção	96
A.5 Ensaio de viabilidade celular nas linhas HCT116 e A2780	97
A.6 Ensaio de viabilidade celular na linha HCT116-DoxR após exposição aos ligandos dos compostos de vanádio em estudo	99
A.7 Bandas de expressão das proteínas BAX, BCL-2 e PARP1 por <i>Western Blot</i>	100
A.8 Viabilidade das células HCT116-DoxR após exposição ao composto TBHP	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Incidência e mortalidade do cancro no mundo em 2020.	1
Figura 1.2 – Estimativa das taxas de incidência e mortalidade dos principais tipos de cancro padronizadas por idade, em 2020, a nível mundial, para ambos os sexos e todas as idades.	2
Figura 1.3 – Representação esquemática do processo de metastização do cancro através dos vasos sanguíneos.	7
Figura 1.4 – Representação esquemática do ciclo celular e dos principais intervenientes na sua regulação.	14
Figura 1.5 – Vias extrínseca e intrínseca da apoptose.	18
Figura 1.6 – Representação do processo de autofagia.	20
Figura 1.7 – Vias de sinalização dependentes do TNFR1.	21
Figura 1.8 – A) Vantagens, desvantagens e aplicações de alguns dos modelos utilizados hoje em dia para estudar o CRC, entre eles o modelo de cultura celular 2D, os esferoides (3D), os modelos <i>in vivo</i> e os dispositivos de microfluidica, como o <i>organ-on-a-chip</i> . B) Representação da estrutura de um esferoide, com especial atenção para a sua organização em três camadas, com a camada mais interior a corresponder ao núcleo necrótico.	32
Figura 3.1 – Viabilidade de células HCT116-DoxR após exposição a diferentes concentrações de compostos de vanádio durante 48 horas.	55
Figura 3.2 – Viabilidade de fibroblastos após exposição a diferentes concentrações de compostos de vanádio durante 48 horas.	59
Figura 3.3 – Viabilidade de esferoides HCT116-DoxR com 8 dias, após exposição a diferentes concentrações dos compostos de vanádio V22, V26 e Y durante 48 horas.	61
Figura 3.4 – Percentagem de células HCT116-DoxR viáveis, apoptóticas e necróticas, após exposição ao IC ₅₀ dos compostos V22, V26 e Y durante 48 horas.	64
Figura 3.5 – Níveis de expressão relativa das proteínas BAX (A) e BCL-2 (B) em células HCT116-DoxR após exposição ao IC ₅₀ dos compostos V22 e V26 ou a 0,1% DMSO, durante 48 horas. C) Rácio BAX/BCL-2.	66
Figura 3.6 – Níveis de expressão relativa da proteína PARP1 clivada em células HCT116-DoxR após exposição ao IC ₅₀ dos compostos V22 e V26 ou a 0,1% DMSO, durante 48 horas.	67

Figura 3.7 – Alteração do potencial mitocondrial de células HCT116-DoxR após exposição ao IC ₅₀ dos compostos V22, V26 e Y, durante 48 horas.	69
Figura 3.8 – Atividade da caspase-8 após exposição das células HCT116-DoxR ao IC ₅₀ do composto V22 durante 48 horas.....	71
Figura 3.9 – Indução de autofagia em células HCT116-DoxR após exposição ao IC ₅₀ dos compostos V22, V26 e Y, durante 48 horas.....	72
Figura 3.10 – Produção de ROS em células HCT116-DoxR após 48 horas de exposição ao IC ₅₀ dos compostos V22, V26 e Y.	74
Figura 3.11 – Progressão do ciclo celular em células HCT116-DoxR após 3, 9, 24 e 32 horas de exposição ao IC ₅₀ dos compostos V22 e V26, e a 5 µM cisplatina e 6 µM doxorubicina.	77
Figura 3.12 – Migração celular de fibroblastos após 24 horas de exposição ao IC ₅₀ dos compostos V22, V26 e Y, ou a 0,4 µM Dox.....	79
Figura 3.13 - Formação de novos vasos sanguíneos após exposição do embrião de galinha ao IC ₅₀ dos compostos V22, V26 e Y, durante 24 e 48 horas.	80

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 - Classificação de agentes quimioterapêuticos utilizados atualmente, de acordo com os seus mecanismos de ação.....	24
Tabela 2.1 - Lista dos equipamentos utilizados ao longo do trabalho prático e suas respectivas marcas.	35
Tabela 2.2 – Características dos compostos de vanádio utilizados ao longo do trabalho prático (seus ligandos e respetiva massa molar).....	36
Tabela 2.3 - Linhas celulares utilizadas ao longo do trabalho prático e suas características.	37
Tabela 3.1 – Valores de IC_{50} obtidos para cada um dos compostos de vanádio em estudo, nas linhas celulares HCT116, HCT116-DoxR, A2780 e fibroblastos e respetivo SI.	56
Tabela 3.2 – Valores de IC_{50} obtidos para os ligandos dos compostos de vanádio na linha tumoral HCT116-DoxR.....	60
Tabela 3.3 – Comparação entre os valores de IC_{50} obtidos para os compostos V22, V26 e Y em culturas 2D e 3D de células HCT116-DoxR.	62
Tabela 3.4 – Percentagem de células HCT116-DoxR viáveis, apoptóticas e necróticas após 48 horas de exposição ao IC_{50} dos compostos V22, V26 e Y e aos controlos cisplatina, doxorubicina e DMSO.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

QUÍMICOS

2D/3D	Bidimensional/Tridimensional
5-FU	5-fluorouracilo
A2780	Linha celular proveniente de carcinoma de ovário humano
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
APAF-1	<i>Apoptotic protease-activating factor-1</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
APS	<i>Ammonium persulfate</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATG	<i>Autophagy related gene</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
ATR	<i>Ataxia Telangiectasia and rad3 associated</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma protein 2</i>
BID	<i>BH3-interacting domain death agonist</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAF	<i>Cancer-associated fibroblasts</i>
CAM	<i>Chick Chorioallantoic Membrane</i>
CAPOX	Capecitabina/LV/Oxaliplatina
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>

CHK1/2	Cinase do ponto de controlo 1/2
clAP1	<i>Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1</i>
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
CIN	<i>Chromosomal instability</i>
Cis	Cisplatina
CO ₂	Dióxido de carbono
CRC	Cancro colorretal
CYLD	<i>CYLD Lysine 63 Deubiquitinase</i>
DCF	2'-7' diclorofluoresceína
DII	Doenças inflamatórias intestinais
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
Dox	Doxorrubicina
DSBs	<i>Double strand breaks</i>
DTC	<i>Disseminated tumor cell</i>
DTT	Ditiotreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FADD	<i>FAS-associated death-domain</i>
FAP	<i>Familial adenomatous polyposis</i>
FasR	Recetor Fas
FBS	Soro Fetal Bovino

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOLFIRI	5-FU/LV/irinotecano
FOLFOX	5-FU/LV/oxaliplatina
H₂DCF-DA	2',7'- diacetato de diclorohidrofluoresceína
H₂O₂	Peróxido de hidrogénio
HCT116	Linha celular proveniente de carcinoma colorretal humano
HCT116-DoxR	Linha celular proveniente de carcinoma colorretal humano resistente à doxorrubicina
HER-1	<i>Human epidermal growth factor receptor-1</i>
HPV	Vírus do papiloma humano
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IC₅₀	Concentração de composto que leva a uma redução da viabilidade celular em 50%
ICP-AES	<i>Inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry</i>
IETD	<i>Ile-Glu-Thr-Asp</i> (Isoleucina – Glutamato – Treonina – Aspartato)
IκBα	<i>NF-kappa-B inhibitor alpha</i>
IKK	<i>IκB Kinase Complex</i>
IMC	Índice de massa corporal
IP	Iodeto de Propídio
JC-1	Iodeto de 5,5,6,6' - tetracloro - 1,1' - 3,3' - tetraetilbenzimidazolcarbocianina
LV	Leucovorina
MAbs	<i>Monoclonal antibodies</i>
MLKL	<i>Mixed lineage kinase domain-like protein</i>
MMR	<i>Mismatch repair mechanism</i>
MOMP	<i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i>
mRNA	RNA mensageiro

MSI	<i>Microsatellite instability</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTS	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium</i>
NEMO	<i>NF-kappa-B essential modulator</i>
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>
NF-kB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NLRP3	<i>NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3</i>
O₂	Oxigênio
O₂^{•-}	Anião superóxido
OH[•]	Radical hidroxilo
OMS	Organização Mundial de Saúde
P13KC3	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit 3</i>
PARP1	<i>Poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1</i>
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCD	<i>Programmed cell death</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDXs	<i>Patient-derived xenografts</i>
Pen/Strep	Penicilina/Estreptomicina
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonilo
pNA	<i>p-nitroanilide</i>
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
RB	<i>Retinoblastoma protein</i>
Redox	Oxidação-redução
RIPK1/3	<i>Receptor-interacting Serine/Threonine Kinase 1/3</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>

ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
rRNA	RNA ribossomal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil sulfato de sódio
SMAC	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophage</i>
TBHP	<i>Tert-Butyl hydroperoxide</i>
TEMED	<i>Tetramethylethylenediamine</i>
TKI	<i>Tyrosine kinase inhibitor</i>
TME	<i>Tumor microenvironment</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR1	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
TRADD	<i>Tumor necrosis factor receptor-associated death domain</i>
TRAF2	<i>Telomeric repeat-binding factor 2</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
tRNA	RNA de transferência
TSG	<i>Tumor suppressor gene</i>
ULK1	<i>UNC-51-like kinase 1</i>
UV	Ultravioleta
VPS	<i>Vacuolar protein sorting</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>
$\Delta\Psi$	Potencial de membrana mitocondrial

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cancro – Introdução, distribuição, incidência e mortalidade

O corpo humano é constituído por triliões de células que crescem e se dividem ao longo da sua vida, de acordo com a sua função e necessidade do organismo. No entanto, quando estas sofrem alterações genéticas, podem proliferar de forma descontrolada e formar uma massa tumoral, que pode invadir tecidos adjacentes ao tumor ou invadir tecidos longínquos – metastização. Deste modo, o cancro engloba um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação descontrolada de células anormais e que pode ter origem em diversos órgãos ou tecidos do corpo.^{1, 2, 3}

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2020, foram diagnosticados cerca de 19,3 milhões de novos casos de cancro e aproximadamente 10 milhões de mortes. O cancro é assim uma das principais causas de morte no mundo, verificando-se uma maior taxa de mortalidade em homens (120,8 por 100000 homens) do que em mulheres (84,2 por 100000 mulheres).⁴

A taxa de incidência tem vindo a aumentar nos últimos anos e continuará a subir devido ao crescimento e envelhecimento populacional.^{3, 5} Atualmente, os países asiáticos são os mais afetados, com 49,3% dos novos casos de cancro, seguindo-se a Europa com 22,8%. Por outro lado, a Oceânia com 1,3% e África com 5,7% correspondem aos continentes menos afetados pelo cancro. A mortalidade associada ao cancro segue o mesmo padrão, com a Ásia a registar o maior número de mortes e a Oceânia a possuir o menor número de óbitos (Figura 1.1).⁶

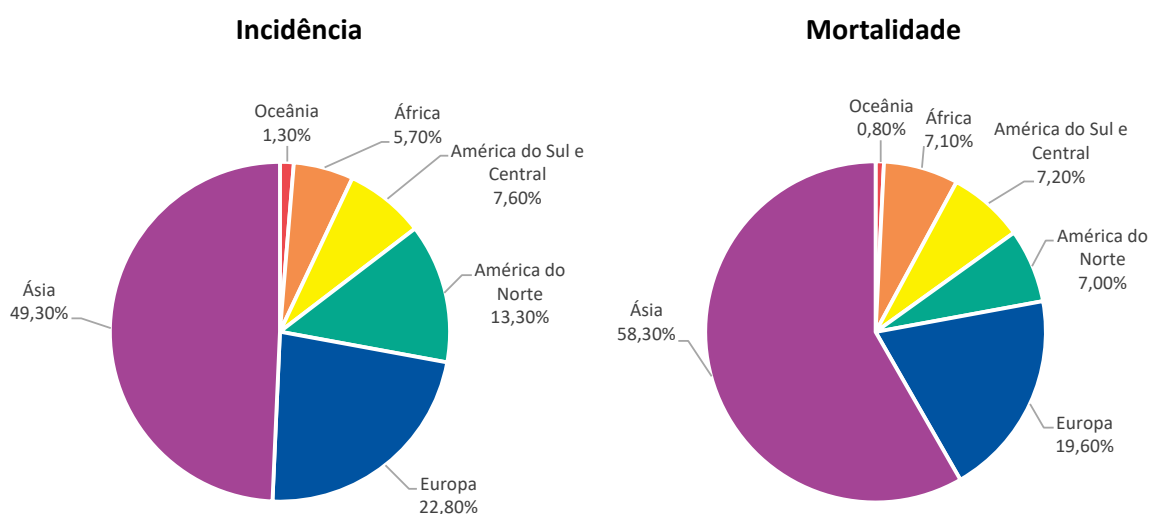


Figura 1.1 – Incidência e mortalidade do cancro no mundo em 2020. (Adaptado de GLOBOCAN 2020).⁶

O cancro da mama, próstata, pulmão, colorretal, colo do útero e estômago são exemplos dos cancros mais comuns atualmente. Por sua vez, a maior taxa de mortalidade corresponde ao cancro do pulmão, seguido do cancro da mama, colorretal e fígado (**Figura 1.2**).⁷

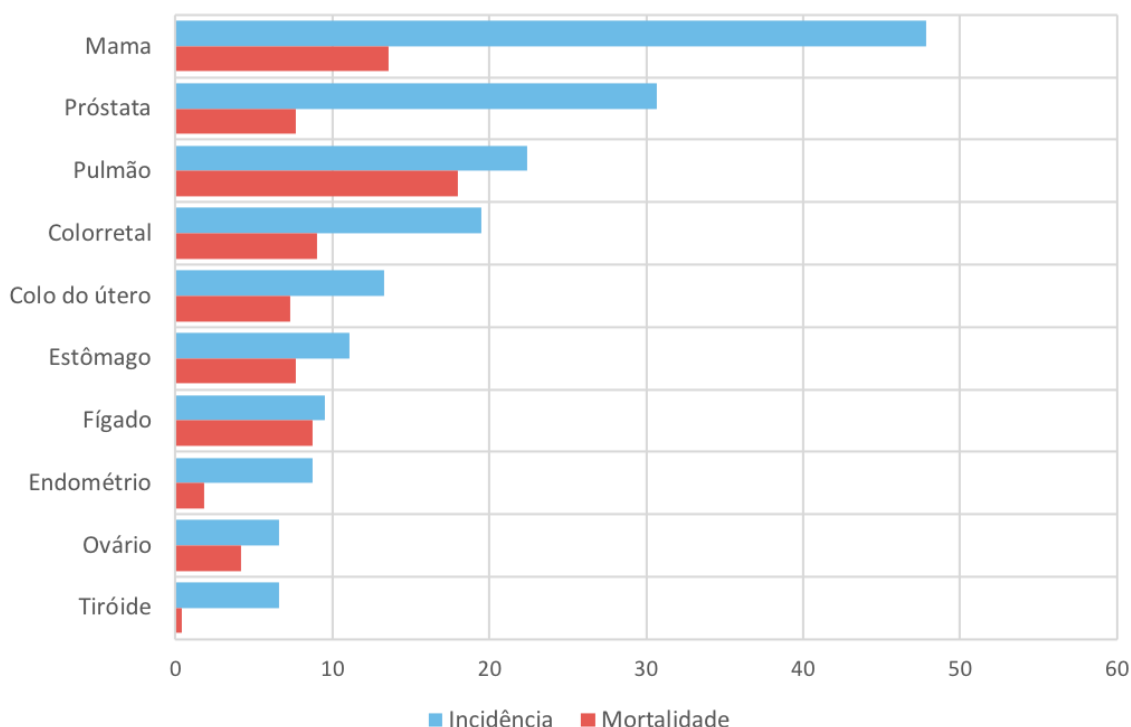


Figura 1.2 – Estimativa das taxas de incidência e mortalidade dos principais tipos de cancro padronizadas por idade, em 2020, a nível mundial, para ambos os sexos e todas as idades. *ASR "Age-standardised rates" (World) per 100 000* (Adaptado de GLOBOCAN 2020).⁷

O cancro do pulmão e o cancro da próstata são responsáveis pela maioria dos cancros diagnosticados em homens em 2020, sendo o cancro do pulmão o mais mortal. No caso das mulheres, os dois cancros mais comuns são o cancro da mama e o colorretal, sendo o cancro da mama o responsável pela maioria das mortes causadas por cancro em mulheres, no ano de 2020.⁷

Em Portugal, no ano de 2020, foram diagnosticados 60467 novos casos de cancro e ocorreram cerca de 30168 mortes de doentes oncológicos. O cancro colorretal foi o cancro com maior número de novos casos, seguindo-se o cancro da mama, próstata e só depois o do pulmão, que por sinal foi o cancro mais mortal nesse ano.⁸

As taxas de sobrevivência são menores nos países menos desenvolvidos uma vez que a maioria dos doentes são diagnosticados tardiamente e não têm acesso a bons tratamentos. Por outro lado, o diagnóstico precoce e a qualidade dos tratamentos nos países mais desenvolvidos têm vindo a aumentar nos últimos anos, promovendo uma maior sobrevivência

dos doentes de cancro.^{1, 3, 5} Fatores como o estadio, localização do tumor, outros cancros coexistentes, perfil de saúde do doente, diagnóstico precoce/tardio e os avanços em terapêuticas como a quimioterapia, cirurgia e radioterapia estão diretamente envolvidos na sobrevivência do doente de cancro. Assim, nas últimas décadas, tem-se verificado uma melhoria no tempo de sobrevivência ao cancro muito devida a estes progressos alcançados nas áreas da investigação e da medicina.⁵

1.2. Biologia do cancro

1.2.1. Processo de Carcinogénese

Ao longo do ciclo celular as células dividem-se e originam novas células, de forma precisa e controlada, para manter a homeostasia celular. No entanto, quando estas células sofrem algum tipo de alteração e se continuam a multiplicar, pode ocorrer a transformação das células saudáveis em células cancerígenas com a capacidade de crescerem autonomamente, acabando por originar a formação de um tumor que eventualmente pode acabar por invadir outros tecidos.^{1, 9, 10, 11} Este processo de transformação é denominado por carcinogénese e está dividido em três fases: a iniciação, a promoção e a progressão.¹¹ Durante a fase de iniciação, uma célula normal sofre uma mudança irreversível caracterizada pela capacidade de crescer autonomamente. A iniciação implica a alteração do DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*) celular num ou mais locais do genoma, sendo que essa alteração corresponde a um evento mutagénico. Desta forma, a iniciação e a promoção do cancro são caracterizadas pela acumulação sucessiva de mutações no DNA que acabam por resultar na alteração das funções das mais variadas proteínas envolvidas na apoptose, crescimento e diferenciação celular (ver 1.2.2).¹ Assim, a célula inicial expande clonalmente originando uma massa celular detetável que pode ser benigna ou potencialmente maligna.^{1, 11} A promoção do tumor pode ser modulada por vários fatores internos ou externos (ver 1.2.3), tais como hereditariedade, idade, sexo, dieta e equilíbrio hormonal.¹¹ Por fim, na fase de progressão, as células sofrem alterações adicionais para progredirem para uma neoplasia maligna. Durante esta fase, as neoplasias demonstram um aumento da sua capacidade de invasão e de se metastizar, adquirindo alterações bioquímicas, metabólicas e morfológicas (ver 1.2.4).^{1, 11} Todo este processo de conversão de uma célula inicial numa neoplasia totalmente maligna é geralmente prolongado, podendo demorar vários anos.¹¹

Desta forma, é possível diferenciar uma neoplasia benigna ou maligna. Uma neoplasia benigna corresponde a um crescimento localizado de tecidos bem diferenciados e não

invasivos. As neoplasias benignas geralmente crescem muito lentamente e não apresentam perigo para a saúde, a menos que possam começar a comprimir tecidos normais adjacentes e interfiram com funções vitais. As neoplasias malignas crescem rapidamente e caracterizam-se pela sua capacidade de invasão. Neste caso, o crescimento é desorganizado e estas neoplasias podem-se disseminar para tecidos adjacentes, ou metastizar para locais distantes através da circulação sanguínea e/ou linfática (ver 1.2.4).¹¹

1.2.2. Eventos mutagénicos

As mutações responsáveis pela formação do cancro geralmente ocorrem em dois grandes grupos de genes: oncogenes ou genes supressores de tumores (TSGs).^{1, 12}

1.2.2.1. Mutações em oncogenes

Os oncogenes resultam de mutações em genes envolvidos na proliferação e diferenciação celular, denominados por proto-oncogenes. Visto que os proto-oncogenes estão associados aos processos de crescimento e divisão celular, quando estes sofrem mutações e se transformam em oncogenes podem originar uma divisão, e consequente proliferação celular descontrolada. Os oncogenes resultam, portanto, na sobreexpressão de uma proteína ou na produção de uma proteína muito mais ativa. Deste modo, a mutação de um único alelo é suficiente para que a célula se torne cancerígena.^{1, 12}

O gene *RAS* corresponde ao proto-oncogene mais comumente afetado. Este gene codifica a proteína RAS, que regula a divisão celular e normalmente se encontra inativa. Quando mutada, esta proteína torna-se constitutivamente ativa, provocando um crescimento celular descontrolado que por sua vez pode resultar no desenvolvimento de um tumor. A proteína RAS encontra-se alterada em cerca de 27% dos tumores humanos.^{1, 13}

1.2.2.2. Mutações em genes supressores de tumores (TSGs)

Os TSGs são genes que geralmente estão envolvidos no controlo do ciclo celular e na indução de morte celular programada. Estes genes inibem a função de outras proteínas associadas à proliferação e, portanto, quando mutados deixam de conseguir controlar o crescimento celular.^{1, 12} Neste caso, é necessário que ambos os alelos se encontrem mutados, caso contrário o alelo funcional continuará a conseguir exercer as suas funções inibidoras.¹

Os genes *TP53*, *BRCA1* e *BRCA2* são TSGs frequentemente mutados, com papéis importantes na divisão celular e na reparação de danos no DNA.^{1, 14, 15} Quando estes genes são

afetados, os danos no DNA não são reparados e estes erros podem ser passados à próxima geração de células, podendo eventualmente originar o aparecimento de tumores.¹

O gene *TP53* codifica a proteína p53 que regula genes-alvo associados à indução de apoptose e à regulação do ciclo celular. Quando existem danos no DNA, a proteína p53 é ativada, originando a ativação de proteínas envolvidas na reparação do DNA e a paragem do ciclo celular para a possível reparação de tais danos. Caso esta reparação não seja bem-sucedida, o que ocorre muitas vezes quando existem danos nas proteínas envolvidas na reparação do DNA, a proteína p53 também pode ativar a via da apoptose. Assim, mutações neste gene promovem a sobrevivência e a proliferação da célula afetada.¹ Por sua vez, as células descendentes também não vão usufruir de genes de reparação e *TP53* funcionais, resultando numa maior acumulação de erros, instabilidade genómica e o possível desenvolvimento do cancro.¹⁶

Concluindo, mutações nestes dois conjuntos de genes originam uma acumulação de células anormais e o consequente desenvolvimento tumoral, através da estimulação da proliferação, provocada por mutações em proto-oncogenes, e através da inibição do controlo do ciclo e da morte celular, provocadas por mutações em TSGs.¹

1.2.3. Causas

As mutações genéticas que estão na base do processo de carcinogénese podem ser herdadas ou espontâneas, sendo induzidas por agentes biológicos (como vírus), agentes químicos (devidos à alimentação, por exemplo), causas físicas (como a radiação)^{1, 11, 17}:

- **Fatores genéticos** – Algumas alterações genéticas hereditárias estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de cancro e originam uma elevada prevalência de um determinado cancro dentro da mesma família. No entanto, os casos hereditários correspondem a apenas 5-10% de todos os casos de cancro existentes.¹⁷
- **Fatores externos/ambientais** – Estes fatores estão associados ao aparecimento da maior parte dos casos de cancro existentes atualmente. Agentes como o tabaco e o álcool, e substâncias como a aflatoxina, estão relacionados com o aparecimento do cancro, seja por provocarem alterações nas bases do DNA, por formarem aductos ou por se intercalarem com o DNA.¹¹ A exposição a radiação também está associada ao desenvolvimento do cancro, uma vez que promove a formação de dímeros de timina e aductos no DNA. A radiação UV (Ultravioleta), por exemplo, está associada à exposição solar e ao desenvolvimento de cancro da pele.^{1, 11, 17, 18}

- **Agentes biológicos** – Os agentes infecciosos, tais como vírus (vírus do papiloma humano, HPV)¹, parasitas (*Schistosoma haematobium*)¹⁷ e bactérias (*Helicobacter pylori*)¹¹ estão associados a cerca de 20% de todos os casos de cancro atualmente.¹⁹ O mecanismo de ação destes agentes pode ser pela expressão de proteínas oncogénicas pelo próprio agente infeccioso, ou pela produção de uma resposta inflamatória crónica ou produção de componentes mutagénicos pelo hospedeiro.²⁰ Por exemplo, no caso do vírus do papiloma humano, ocorre a produção de oncoproteínas virais que têm como alvos as proteínas p53 e RB (RB, do inglês *Retinoblastoma protein*).^{1, 18, 20}

Em conclusão, visto que a maioria dos casos de cancro são devidos a fatores ambientais, há que salientar a maior possibilidade de prevenir o aparecimento desta doença ao adotar novos comportamentos relacionados com o estilo de vida pessoal.¹⁷

1.2.4. Microambiente tumoral, angiogénese e metastização

As células tumorais por si só não conseguem invadir outros tecidos, pelo que existe a necessidade de recrutar vários outros tipos de células, como fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, células inflamatórias do sistema imunitário, entre outros, para em conjunto com a matriz extracelular (ECM, do inglês *Extracellular matrix*) poderem constituir o microambiente tumoral (TME, do inglês *tumor microenvironment*) favorável à progressão e à sobrevivência do tumor.^{21, 22, 23}

De entre os componentes do TME, os TAMs (do inglês, *tumor-associated macrophages*) e os CAFs (do inglês, *cancer-associated fibroblasts*) são dois dos principais intervenientes no desenvolvimento tumoral, ao secretarem moléculas como fatores de crescimento e metaloproteinases que promovem a proliferação, a angiogénese e os processos de invasão e colonização pelas células tumorais.^{24, 25, 26}

A angiogénese é um dos processos mais importantes para a progressão tumoral. Este processo está envolvido em mecanismos fisiológicos como o desenvolvimento embrionário, a inflamação, a cicatrização de feridas, entre outros, e consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, o que permite o transporte dos nutrientes e oxigénio necessários à proliferação tumoral. Assim, a formação destes novos vasos sanguíneos vai facilitar o processo de metastização do tumor. No entanto, para que a metastização seja possível, é necessário que ocorra a invasão do sistema circulatório pelas células cancerígenas.²²

Quando as células se tornam cancerígenas perdem a expressão de caderinas e outras moléculas importantes para a sua adesão celular.^{27, 28} Isto permite que percam a dependência

do estado aderente, que proliferem mais e ganhem a capacidade de invasão.^{27, 28, 29} O que se verifica é que as células epiteliais, por perderem as características de células aderentes³⁰, e os fibroblastos, devido à ativação criada pelo TME, ficam com morfologias diferentes.³¹ Nas primeiras, observa-se a troca de recetores e marcadores celulares, em que as células epiteliais ganham características das células mesenquimatosas, ocorrendo, portanto, uma Transição Epitelial-Mesenquimatosa.^{28, 29, 30} Os fibroblastos passam a ser capazes de produzir e secretar mais citocinas, fatores de crescimento e metaloproteínas para o recrutamento das células inflamatórias, indução da angiogénese e para a degradação da lâmina basal.^{25, 26, 31} Estes fatores de crescimento, a presença de células imunitárias e até de adipócitos fazem parte do TME que permite a invasão do tumor.²²

Para além da invasão do tumor, o processo de metastização ainda depende de outros três passos cruciais, sendo eles a intravasão, a extravasão e a colonização, como pode ser observado na **Figura 1.3**. Inicialmente, as células tumorais que invadiram o estroma ao redor do tumor primário podem entrar nos vasos sanguíneos e linfáticos através de um processo denominado de intravasão. Depois das células tumorais migrarem ao longo da corrente sanguínea, ocorre um processo denominado de migração transendotelial, significando a extravasão das células pela parede endotelial para posterior invasão dos tecidos circundantes. Por fim, o crescimento de uma colónia metastática representa a última fase da progressão tumoral. Nesta fase, ao chegarem a um novo ambiente, a maioria das células entra num estado de dormência, em que persistem como células tumorais únicas disseminadas (DTCs, do inglês *disseminated tumor cells*) ou como pequenos aglomerados micrometásticos durante semanas, meses, ou até anos.^{28, 29}

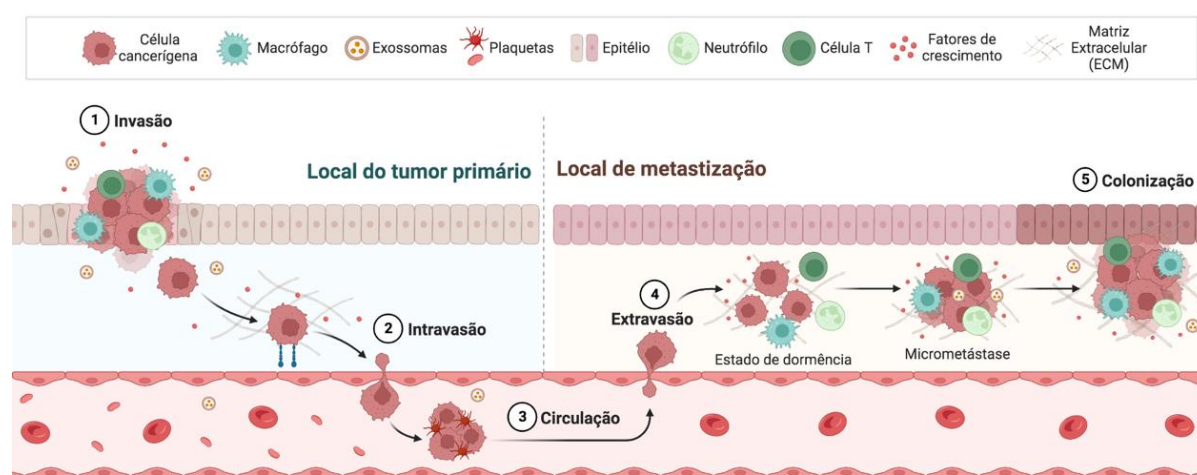


Figura 1.3 – Representação esquemática do processo de metastização do cancro através dos vasos sanguíneos. No local do tumor primário, as células tumorais tornam-se capazes de invadir o estroma e, logo de seguida, atravessam a parede endotelial. Depois do processo de intravasão, as células tumorais são transportadas ao longo dos vasos sanguíneos até saírem de circulação. Antes de ocorrer a

colonização, as células permanecem num estado de dormência até se adaptarem ao seu novo ambiente. Por fim, ocorre a etapa de colonização, concluindo o processo de metastização do cancro. Adaptado de Mittal, V. (2018) e BioRender.³⁰

1.3. Cancro colorretal

De acordo com a OMS, em 2020, o cancro colorretal (CRC) foi responsável por cerca de 10% de todos os novos casos de cancro, o que corresponde a um total de mais de 1,9 milhões de casos mundialmente. A mortalidade relativa ao CRC correspondeu a mais de 930 mil casos, ou seja, 9,4% de todas as mortes por cancro em 2020. Consequentemente, o CRC foi o terceiro cancro mais incidente na população mundial e o segundo mais mortal.^{4, 32}

O cancro colorretal é uma doença associada a uma série de mutações genéticas³³ que podem aparecer, tal como acima descrito, em oncogenes, TSGs e em genes responsáveis pelos mecanismos de reparação do DNA.³⁴ Dependendo da origem da mutação, o carcinoma colorretal pode ser classificado como esporádico, hereditário e familiar.^{33, 34}

Cerca de 70% dos casos de CRC ocorrem esporadicamente e estão associados a mutações pontuais que aparecem ao longo da vida, afetando apenas as células somáticas mutadas e as suas descendentes.^{34, 35} Tais mutações podem ocorrer pela troca de um nucleótido, pela sua deleção ou pela inserção de um nucleótido na sequência de DNA. Cerca de 70% dos casos de CRC seguem uma sequência específica de mutações com origem num TSG denominado de *APC* (do inglês, *Adenomatous polyposis coli*). A inativação do gene *APC* está associada à formação de adenomas não malignos, também designados de pólipos, os quais têm tendência a evoluir para carcinomas com o passar do tempo.³⁴ Nestes casos de cancro colorretal esporádico, a progressão de adenoma para carcinoma demora pelo menos 5 a 10 anos, o que oferece uma grande janela de oportunidade para o rastreio.³⁶

Por outro lado, entre 25 a 30% dos casos de CRC possuem histórico familiar de CRC ou o risco hereditário de desenvolver este carcinoma.³⁵

Os casos hereditários devem-se a mutações herdadas que afetam um dos alelos do gene alterado, sendo que caso ocorra uma mutação pontual no outro alelo, tal irá culminar no aparecimento da célula tumoral e, consequentemente, no carcinoma. A Polipose Adenomatosa Familiar (FAP, do inglês *Familial adenomatous polyposis*), caracterizada pela formação de múltiplos pólipos potencialmente malignos no cólon, é um exemplo de cancro colorretal hereditário.³⁴ A maioria das mutações germinativas do gene *APC* observadas em indivíduos com FAP são mutações *nonsense* ou *frameshift* que originam a síntese de uma proteína

truncada. Na FAP, observou-se ainda uma correlação entre o tipo de mutação e a penetração dos genes alterados, estimadas de acordo com o número de pólipos presentes no *colorectum*. As mutações nos codões 1250-1464 foram associadas a um maior número de pólipos, enquanto as mutações nas regiões 5' e 3' a um fenótipo suave. Por outro lado, a mutação do gene *APC* em cânceros colorretais esporádicos ocorre ao nível dos codões 1281-1256, numa região envolvida na desregulação da β -catenina. Sem colectomia cirúrgica preventiva, os pólipos associados à FAP representam um elevado risco para o cancro colorretal.³⁷ A Síndrome de Lynch, outro tipo de cancro colorretal hereditário, é devida a mutações herdadas num dos alelos que codificam proteínas associadas aos mecanismos de reparação do DNA.³⁴

Por último, o cancro colorretal familiar também é devido a mutações herdadas, sendo que o risco de um indivíduo desenvolver cancro colorretal é superior quando este possui algum parente com CRC.³⁴

1.3.1. Fatores de risco associados ao CRC

O principal fator de risco associado ao CRC é a idade, uma vez que as células vão acumulando mutações ao longo de toda a sua vida.³⁴ É desta forma que o aumento da esperança média de vida tem contribuído para o aumento da incidência do CRC na população.⁵ Para além disso, o risco de desenvolvimento de CRC está também associado ao histórico pessoal de doenças inflamatórias intestinais (DII), como a colite ulcerosa e a doença de Crohn, uma vez que a inflamação crónica das DII provoca frequentemente um crescimento anormal das células que, mais tarde, pode resultar no aparecimento de um tumor. A existência de casos de CRC na família, especialmente em parentes que tenham sido diagnosticados com menos de 50 anos de idade, é outro fator de risco.^{34, 36}

Outros fatores de risco que aumentam a possibilidade de desenvolver pólipos ou carcinoma colorretal estão associados a hábitos pessoais e podem ser reduzidos através de mudanças do estilo de vida.^{5, 34, 36}

Atualmente, o estilo de vida da maior parte da população é caracterizado por uma dieta pouco saudável (pobre em frutas e vegetais e rica em carnes vermelhas e processadas) e comportamento sedentário, o que resulta frequentemente em casos de obesidade. A obesidade e a dieta não saudável são importantes fatores de risco para o CRC. Estes fatores juntamente com o abuso de substâncias como o álcool e o tabaco resultam num aumento da incidência de doenças associadas ao estilo de vida, como é o caso do CRC.^{5, 34} Por outro lado,

a ingestão de cálcio, fibras, cereais integrais, multivitaminas, frutas e vegetais estão associados à diminuição do risco de vir a desenvolver este tipo de tumor.³⁶

Em conclusão, muitos dos casos de CRC poderiam ser prevenidos através da diminuição dos fatores de risco associados ao estilo de vida. Por outro lado, as mortes por CRC poderiam ser evitadas através da detecção precoce de pólipos e de biomarcadores com muitas das opções de rastreio já existentes.^{35, 38}

1.3.2. Carcinogénese do CRC

O CRC é um tumor que se desenvolve no intestino grosso, no cólon ou no reto, e resulta da proliferação anormal de células que apresentam a capacidade de migrar e se espalhar para outros locais do organismo.³⁹ No cólon, a evolução de células epiteliais normais para adenocarcinoma, em geral, segue uma sequência de mudanças epigenéticas e genéticas simultâneas. No modelo "clássico" de formação de cancro colorretal, este surge de um pólipo que depois evolui para um adenoma precoce. Por sua vez, o adenoma progride para um adenoma avançado, antes de finalmente se tornar num carcinoma colorretal. Este processo é impulsionado pela acumulação de mutações e alterações epigenéticas e pode demorar mais de 10 anos a ocorrer, mas pode progredir mais rapidamente em determinadas situações (como em doentes com Síndrome de Lynch).³⁶

Os mecanismos relacionados com a iniciação do tumor ainda não estão completamente estabelecidos, mas foi hipotetizado que lesões na mucosa colorretal pudessem despoletar uma resposta imunitária crónica, a qual estaria envolvida no desenvolvimento do tumor. Caso a resposta imune não fosse suficiente para reparar a lesão, formar-se-ia um microambiente rico em citocinas, fatores de crescimento e produtos da respiração celular, devido à elevada proliferação verificada no local na tentativa de reparar a lesão. Por sua vez, este microambiente originaria a acumulação de erros genéticos que transformariam as células epiteliais normais em adenocarcinomas invasivos.⁴⁰

Por outro lado, também já foi estabelecido que a iniciação do tumor está associada a mutações que ocorrem ao nível do gene *APC*, sendo responsáveis pela formação do adenoma e pelo desenvolvimento de "criptas displásicas". Após esta fase, a ocorrência de mutações adicionais ao nível dos genes *KRAS*, *TP53* e *SMAD4*, favorecem a promoção e progressão do tumor, caracterizada pelo aumento da taxa de crescimento do adenoma, a expansão de clones malignos com a consequente invasão do tumor, e metástase.³⁷

Através de um modelo animal de rato, verificou-se que a supressão do gene *APC* determinava a formação de adenomas, tanto ao nível do cólon como do intestino delgado, e que na presença de mutações adicionais ao nível dos genes *TP53* e *KRAS* era induzida a progressão de cancro do cólon. Em contrapartida, também se verificou que a restauração do gene *APC* nestes tumores induzia rapidamente a diferenciação celular e a regressão do tumor.³⁷

1.3.3. *Pathways* moleculares do CRC

O CRC é uma doença heterogênea caracterizada por instabilidade genómica, a qual pode ser adquirida por três vias diferentes, nomeadamente a instabilidade cromossómica (CIN, do inglês *chromosomal instability*), a instabilidade de microssatélites (MSI, do inglês *microsatellite instability*) e o fenótipo de metilação das ilhas CpG (CIMP, do inglês *CpG island methylator phenotype*).^{5, 34}

A via da instabilidade cromossómica representa a causa de 80 a 85% de todos os casos de CRC e deve-se à presença de aneuploidias, ou seja, a desequilíbrios no número de cromossomas. Os mecanismos subjacentes à CIN incluem alterações na segregação dos cromossomas, na disfunção dos telómeros e na resposta a danos no DNA e afetam genes importantes na manutenção da atividade celular, tais como *APC*, *KRAS*, *PI3K* e *TP53*, entre outros. A função do gene *APC* está relacionada com uma regulação negativa da via de sinalização *Wnt*, através da degradação da β -catenina. Por conseguinte, a inativação do gene *APC* induz uma ativação da via de sinalização *Wnt* e uma subsequente desregulação e acumulação nuclear de β -catenina, que como consequência incita a transcrição de genes envolvidos na tumorigénese e invasão.^{34, 37} As mutações em *KRAS* e *PI3K* levam a uma sobreativação da quinase MAP, resultando num aumento da proliferação celular e, por fim, as mutações no *TP53* resultam num ciclo celular descontrolado e na consequente promoção da tumorigénese.³⁴

A via de MSI deve-se à inativação do sistema MMR (do inglês, *Mismatch repair mechanism*) de reparação do DNA. A capacidade de reparar pequenas sequências de DNA ou repetições em tandem (duas a cinco repetições de pares de base) é menor em tumores com este tipo de instabilidade genómica, o que resulta na acumulação de mutações nestas regiões durante o processo de replicação do DNA. Consequentemente, ao se alterarem sequências de microssatélites que codifiquem oncogenes ou TSGs, ocorre o desenvolvimento de tumores.^{34, 36} A perda da expressão de genes de reparação do DNA pode ocorrer espontaneamente ou através de mutações germinais, como o que acontece na síndrome de Lynch.³⁴ A MSI pode ser

identificada através de testes de PCR (do inglês, *Polymerase chain reaction*), que comparam o DNA normal e tumoral do mesmo doente.³⁶

A instabilidade epigenética é responsável pelo fenótipo de metilação das ilhas CpG e é outra característica comum ao CRC.³⁴ As modificações na metilação do DNA associadas ao desenvolvimento do cancro costumam incluir duas alterações fundamentais, sendo elas a hipermetilação das ilhas CpG em regiões promotoras de genes, que podem silenciar TSGs, e a hipometilação de elementos genéticos repetitivos, que pode originar a instabilidade genómica ou a ativação de oncogenes.³⁶

1.4. Regulação do ciclo celular

O ciclo celular corresponde a uma sequência de eventos que leva ao crescimento e à divisão celular. Nas células eucarióticas, o ciclo celular está dividido em duas fases principais: interfase e fase M (mitótica), e a interfase está organizada em três subfases: G₁, S e G₂. A fase G₁ consiste num período de crescimento celular, onde ocorre a síntese de RNA (do inglês, *Ribonucleic acid*) e proteínas com o intuito de preparar a célula para a síntese de DNA na fase S. Durante este período, a síntese de mRNA (RNA mensageiro), rRNA (RNA ribossomal) e tRNA (RNA de transferência) aumenta, conduzindo à formação de proteínas estruturais e proteínas enzimáticas. Na fase S ocorre a replicação do DNA e a síntese de proteínas cromossómicas, como histonas e proteínas não histonas. Através da replicação do DNA, a informação genética é transmitida com precisão às duas células filhas resultantes da divisão na fase M. Portanto, a fase S é a fase mais crítica do ciclo celular, sendo que muitos agentes quimioterapêuticos atuam principalmente nesta fase. Segue-se a fase G₂, durante a qual se dá a síntese de RNA e proteínas diretamente relacionadas com a mitose, tais como microfilamentos e tubulina. A fase M está dividida em prófase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese, e consiste no processo de divisão dos cromossomas da célula mãe em duas células filhas. Nesta fase, o DNA e as proteínas da célula são divididos igualmente em duas células, completando o processo de replicação celular. Depois de um ciclo terminar, algumas células não entram diretamente no ciclo seguinte e entram na fase G₀, que corresponde a um estado de repouso. As células na fase G₀ só irão proceder para a fase G₁ sob a influência de mitogénios ou fatores de crescimento.^{10, 41}

A regulação do ciclo celular é consequência de uma série de mecanismos que envolvem a regulação de uma variedade de ciclinas, cinases dependentes de ciclinas (CDKs, do inglês *Cyclin-dependent kinases*), pontos de verificação (*checkpoints*) do ciclo celular e vias de

sinalização do ciclo celular.⁴¹ Desta forma, a progressão do ciclo celular é controlada através de vários pontos de controlo, denominados por *checkpoints*, que permitem bloquear a transição entre as diferentes fases no caso de existirem danos (**Figura 1.4**).^{9, 10, 41} Por exemplo, no caso de existirem erros no DNA são ativados *checkpoints* que atrasam a progressão do ciclo celular e assim permitem a reparação do DNA. Caso os *checkpoints* não sejam ativados em resposta a estes danos, o DNA não é reparado e o erro pode ser transmitido à próxima geração de células, provocando instabilidade genómica.^{9, 10} Estes *checkpoints* são regulados através de dois tipos de proteínas, as ciclinas e as cinases dependentes de ciclinas que, ao formarem um complexo, adquirem a capacidade de fosforilar outras proteínas envolvidas no ciclo celular.^{41, 10} A formação dos complexos CDK-ciclina depende dos níveis celulares das ciclinas em cada *checkpoint*, visto que a sua concentração varia ao longo do ciclo celular, enquanto que a concentração das CDKs permanece constante. Por sua vez, as CDKs só se tornam ativas quando em interação com as ciclinas.¹⁰

Os complexos CDK-ciclina mais importantes no ciclo celular são: CDK6 ou CDK4-ciclina D, CDK2-ciclina E, CDK2 ou CDK1-ciclina A e CDK1-ciclina B, cuja ativação ocorre em diferentes fases do ciclo celular. As CDKs 4 ou 6 em associação à ciclina D são importantes para a entrada das células na fase G₁. Estes complexos possuem a capacidade de fosforilar a proteína RB, que quando se encontra desfosforilada interage com o fator de transcrição E2F e inibe a progressão do ciclo celular para a fase S. Logo, mediante a fosforilação da proteína RB, esta altera a sua conformação e ocorre a libertação do fator E2F, originando assim a progressão do ciclo celular.^{10, 41} O complexo CDK2-ciclina E regula a passagem da fase G₁ para a fase S, enquanto que a ciclina A pode interagir com a CDK2 e promover a entrada do ciclo celular na fase G₂ ou com a CDK1 e promover a passagem da fase G₂ para a fase M. Por último, a fase M é regulada através da associação entre a ciclina B e a CDK1 (**Figura 1.4**).¹⁰

Quando as células sobreexpressam ciclinas ou não expressam CDKIs (CDKI, do inglês *Cyclin-dependent kinase inhibitor*), o crescimento das células torna-se descontrolado. Por sua vez, a regulação anormal do ciclo celular é um mecanismo importante para a proliferação de células tumorais.^{41, 42}

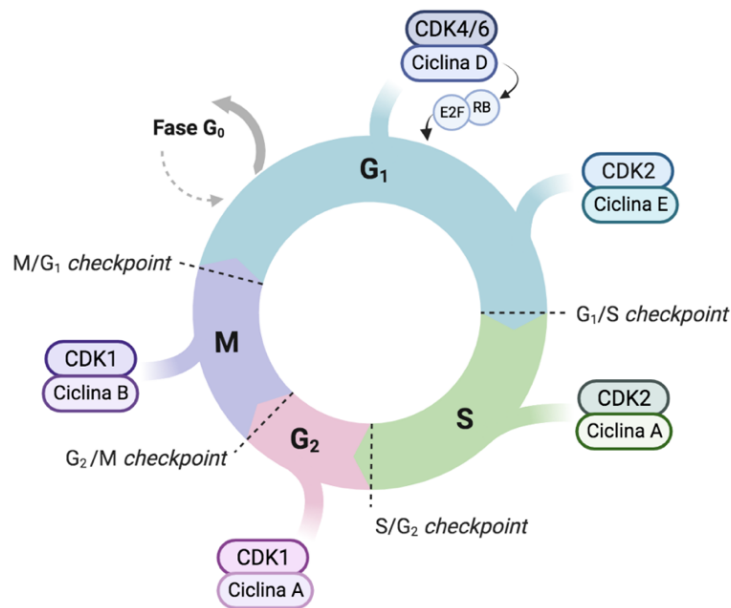


Figura 1.4 – Representação esquemática do ciclo celular e dos principais intervenientes na sua regulação. O ciclo celular é composto por quatro pontos de controlo, os chamados *checkpoints*. Nestes *checkpoints*, é verificado o estado das células e estas só prosseguem para a fase seguinte do ciclo celular caso estejam em condições de avançar. Os complexos CDK-ciclina atuam ao longo de todo o ciclo, sendo responsáveis pela ativação de proteínas implicadas na progressão do ciclo celular. CDK-*Cyclin-dependent kinase*; Fases G₀, G₁, S, G₂ e M (mitose) do ciclo celular; E2F-Fator de transcrição E2F; RB-*Retinoblastoma protein*. Adaptado de Matthews, H., *et al.*, (2022) e BioRender.¹⁰

1.4.1. *Checkpoints* do ciclo celular

Quando existem danos no DNA, os *checkpoints* induzem a sua reparação ao bloquearem o ciclo celular e promoverem a transcrição de genes que promovem a reparação do DNA.⁴¹ Existem alguns *checkpoints* principais que permitem interromper o ciclo celular para reparar os danos: o *checkpoint* em G₁, que precede a fase S do ciclo celular, o *checkpoint* S/G₂, que sucede a replicação do DNA, o *checkpoint* G₂/M e o *checkpoint* da fase M, que ocorre na transição da metáfase para a anáfase (**Figura 1.4**).^{10, 43}

A cinase *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) é induzida por *double strand breaks* (DSBs), e ativa o *checkpoint* em G₁ através da fosforilação e consequente ativação da cinase do ponto de controlo 2 (CHK2). A ATM ativa a CHK2, que por sua vez ativa o *TP53*.^{10, 41} O *TP53* participa em várias vias de sinalização importantes que controlam a proliferação e a morte das células, incluindo a regulação do ciclo celular, a reparação do DNA, o metabolismo, a senescência, a autofagia e a apoptose.^{10, 41, 42} Neste caso, a p53 evita que mutações sejam transmitidas à próxima geração, promovendo a paragem do ciclo celular.^{10, 41} Assim, quando há defeitos no *TP53*, o ciclo celular não é corretamente regulado e é devido a isso que muitas vezes o *TP53* está associado ao desenvolvimento do cancro.^{10, 42}

Quando o DNA é danificado na fase S ou incorretamente replicado, o *checkpoint* S/G₂ é ativado. Este dano é sentido pela cinase *Ataxia Telangiectasia and rad3 associated* (ATR), que induz a degradação da proteína CDC25A através da ativação da cinase do ponto de controlo 1 (CHK1) que a fosforila, ocorrendo assim o bloqueio do ciclo celular. Além disso, a ATR e CHK1 também podem desencadear *checkpoints* G₂/M, impedindo que as células com DNA danificado entrem na mitose.^{10, 41}

Após a entrada na fase M, existe ainda um *checkpoint* que verifica se a ligação dos cromossomas aos microtúbulos ocorreu corretamente, podendo bloquear o ciclo celular na metáfase. Para a célula poder prosseguir para a anáfase, é necessário que a segregação dos cromátídeos irmãos para os dois polos opostos do fuso mitótico tenha ocorrido de forma correta.^{10, 43}

1.5. Mecanismos de morte celular

A morte celular é um processo fundamental para a saúde humana. Assim, para equilibrar o processo de divisão celular, uma semelhante quantidade de células deve ser removida do organismo. Tal é conseguido através da ativação de mecanismos moleculares que têm por objetivo a destruição das células.⁴²

Por sua vez, o desenvolvimento do cancro está associado a uma maior taxa de divisão das células cancerígenas relativamente à sua taxa de morte celular. Este processo de morte celular está há muito associado ao tratamento oncológico, dado que a radiação e a quimioterapia foram idealizadas para causar a morte de células malignas, apesar de também causarem a morte de muitas células saudáveis.⁴²

Os mecanismos de morte celular estão normalmente divididos em dois tipos: os mecanismos de morte celular programada (PCD, do inglês *Programmed cell death*), que requerem energia e dependem de maquinaria molecular específica, como a apoptose e a autofagia, e os mecanismos que não requerem energia, como é o caso da morte celular por necrose.^{44, 45}

Hoje em dia, através de evidências experimentais recolhidas ao longo dos anos, já é possível distinguir estes mecanismos pelas suas diferenças morfológicas e bioquímicas.^{42, 44}

1.5.1. Apoptose

A morte celular por apoptose ocorre em várias situações fisiológicas e/ou patológicas, sendo indispensável no controlo do crescimento, na morfogénese, na regulação da homeostasia dos tecidos, entre outros.^{46, 47, 48}

Esta via é considerada a principal forma de PCD e está associada a uma série de alterações moleculares, bioquímicas e morfológicas. Por exemplo, a externalização da fosfatidilserina da bicamada lipídica é um dos primeiros marcadores moleculares de apoptose, sendo muito utilizada como forma de deteção deste tipo de morte celular.^{44, 49} A PARP1 (do inglês, *Poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase 1*) é uma enzima nuclear que é ativada em resposta a danos no DNA, estando envolvida na sua reparação. Esta proteína é clivada pela caspase-3 durante a apoptose e, desta forma, são originados fragmentos de 89 kDa e 24 kDa, considerados como outro dos principais marcadores da morte celular programada por apoptose.⁴⁹ Outras mudanças visíveis associadas à apoptose são o *shrinkage* da célula e a condensação do núcleo e da cromatina. Em fases mais tardias da apoptose, sucede-se a fragmentação do núcleo e da cromatina e a formação de estruturas ligadas à membrana designadas por corpos apoptóticos.^{44, 46}

A ocorrência desta via de morte celular é caracterizada pela ativação sequencial de uma série de proteases de cisteína, denominadas de caspases, as quais existem principalmente na sua forma inativa (procaspases) no citoplasma da maioria das células. As caspases podem ser divididas em caspases de iniciação ou de execução. As caspases de iniciação, como por exemplo a caspase-9, clivam e ativam caspases de execução a jusante, como o caso da caspase-3, que por sua vez clivam proteínas celulares.^{44, 45, 50}

A apoptose pode ser iniciada em resposta a sinais intrínsecos ou extrínsecos, segundo duas vias diferentes: a via intrínseca, também designada por via mitocondrial ou a via extrínseca, ainda conhecida como via do recetor de morte.^{44, 45, 50}

Este processo não envolve nenhuma resposta imune por parte do organismo, dado que não ocorre a libertação de material celular no espaço intersticial nem de citocinas inflamatórias pelas células envolvidas.⁴⁴

1.5.1.1. Apoptose Intrínseca

A via intrínseca da apoptose é promovida por vários tipos de stress celular, incluindo radiação, hipoxia, stress oxidativo, danos no DNA e ativação de oncogenes. Estes estímulos podem induzir a via apoptótica caso o equilíbrio entre fatores pró-apoptóticos e antiapoptóticos da célula seja alterado.⁴⁴

A via intrínseca está associada a um conjunto de proteínas pró- e antiapoptóticas pertencentes à família BCL-2 (do inglês, *B-cell lymphoma protein 2*) denominadas por *BH3-only proteins*.^{44, 46, 51} Quando há um aumento dos fatores pró-apoptóticos relativamente aos antiapoptóticos, é promovida a ativação e consequente homodimerização das proteínas BAX (do inglês, *BCL-2 associated X protein*) e BAK (do inglês, *BCL-2 homologous antagonist/killer*), que promovem a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP, do inglês *Mitochondrial outer membrane permeabilization*) através da formação de poros. A permeabilização e despolarização da membrana resultam na libertação de fatores mitocondriais pró-apoptóticos para o citoplasma, como o caso do Citocromo C. Por sua vez, o Citocromo C liga-se e ativa as proteínas citoplasmáticas APAF-1 (do inglês, *Apoptotic protease-activating factor-1*) e procaspase-9, formando uma estrutura denominada por apoptossoma que origina depois a clivagem da procaspase-9 para formar a caspase-9 ativa. Esta caspase de iniciação vai acionar uma cascata proteolítica, ativando caspases de execução como as caspases -3 e -7. Por fim, estas caspases de execução incitam a clivagem de substratos celulares que dão origem a variados eventos bioquímicos, culminando estes na morte da célula.^{44, 46, 51} Para além do Citocromo C, também a proteína SMAC (do inglês, *Second mitochondria-derived activator of caspase*) é libertada da mitocôndria para o citosol, onde neutraliza a proteína XIAP (do inglês, *X-linked inhibitor of apoptosis protein*), uma proteína inibidora da apoptose que atua ao nível das caspases -3 e -7.^{46, 52}

Caso o equilíbrio entre os fatores pró- e antiapoptóticos não seja alterado, não ocorre a indução desta via, uma vez que as proteínas antiapoptóticas da família BCL-2, como a BCL-2, BCL-X e BCL-X_L, se ligam às proteínas pró-apoptóticas, inibindo-as.^{44, 46, 51}

1.5.1.2. Apoptose Extrínseca

A via extrínseca da apoptose é iniciada pela interação entre o domínio extracelular de recetores de morte transmembranares e o seu respetivo ligando, como por exemplo o *tumor necrosis factor* (TNF), o ligando Fas (Fas-L) e o *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). Estes recetores compartilham um domínio proteico intracelular envolvido na sinalização, chamado de "domínio de morte", que juntamente com proteínas adaptadoras, como a *FAS-associated death-domain* (FADD) e as procaspases de iniciação -8 ou -10, formam o complexo DISC (do inglês, *Death-inducing signaling complex*). A montagem do complexo DISC permite a ativação autocatalítica das caspases iniciadoras, que por sua vez clivam e ativam as caspases -3 e -7, levando à apoptose.^{51, 52, 53}

Por outro lado, a caspase-8 também pode clivar a proteína pró-apoptótica BID (do inglês, *BH3-interacting domain death agonist*), pertencente à família de proteínas BCL-2. Esta proteína

é assim translocada para a mitocôndria, onde promove a permeabilização da sua membrana e a consequente libertação de proteínas pró-apoptóticas para o citosol.^{46, 51}

As duas vias apoptóticas estão representadas na **Figura 1.5**.

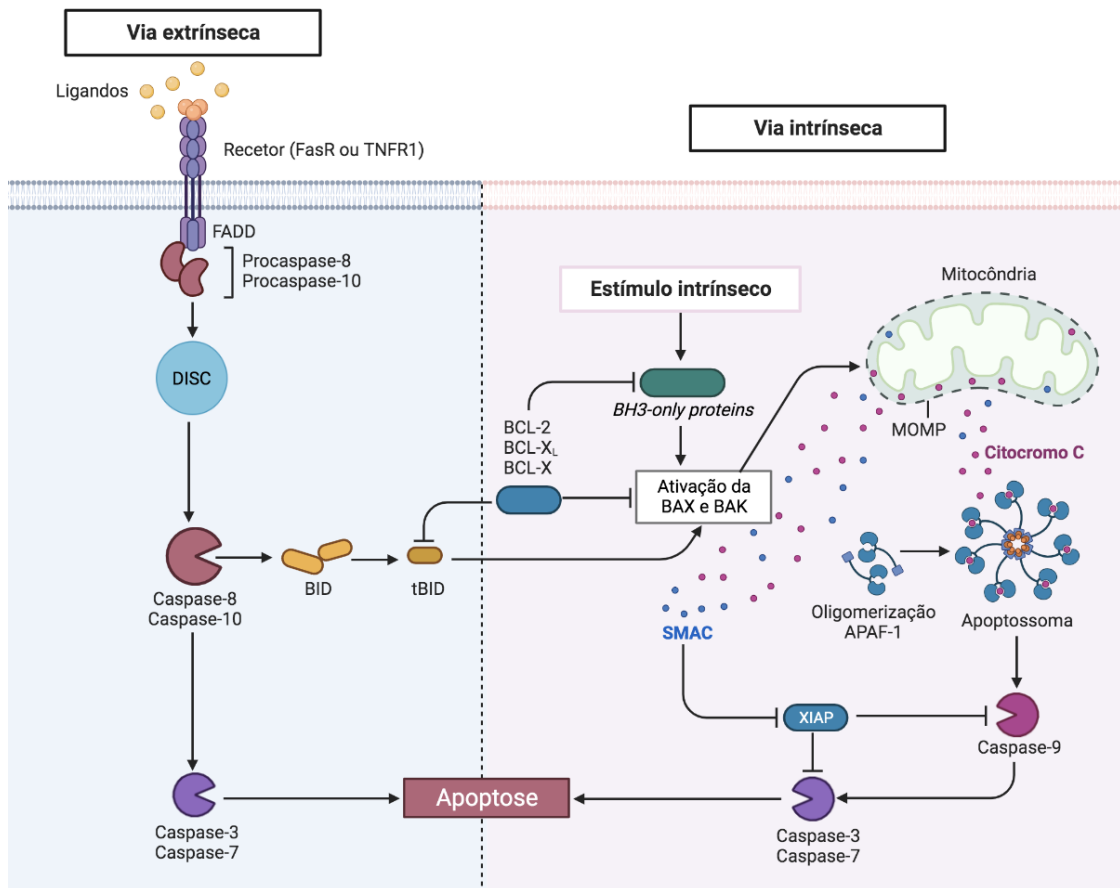


Figura 1.5 – Vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Existem duas vias apoptóticas principais: a via dos recetores de morte (via extrínseca) e a via mitocondrial (via intrínseca). Na via extrínseca, a ativação dos recetores de morte resulta no recrutamento da proteína adaptadora FADD, que por sua vez recruta a caspase-8 ou -10 e acaba por ativar as caspases de execução -3/-7. Na via intrínseca, as proteínas BAX e BAK induzem a permeabilização mitocondrial (MOMP) com a consequente libertação das proteínas Citocromo C e SMAC. O Citocromo C promove a ativação da caspase-9 através da formação do apoptossoma e, por fim, a ativação das caspases -3/-7. A proteína SMAC impede a ação da XIAP, que inibe a ativação das caspases de execução da apoptose. Há ainda uma interação entre as duas vias, mediada pela clivagem da proteína BID pela caspase-8. Esta proteína inibe as proteínas antiapoptóticas e promove a apoptose ao ativar as proteínas BAX e BAK. FasR – Recetor Fas; TNFR1 – *Tumor necrosis factor receptor 1*; FADD – *FAS-associated death-domain*; DISC – *Death-inducing signaling complex*; BID – *BH3-interacting domain death agonist*; BCL-2, BCL-X_L e BCL-X – proteínas da família BCL-2 (*B-cell lymphoma protein 2*); BAX – *BCL-2 associated X protein*; BAK – *BCL-2 homologous antagonist/killer*; MOMP – *Mitochondrial outer membrane permeabilization*; SMAC – *Second mitochondria-derived activator of caspase*; APAF-1 – *Apoptotic protease-activating factor-1*; XIAP – *X-linked inhibitor of apoptosis protein*. Adaptado de Zaman, S., *et al.*, (2014); Hotchkiss, R. S., *et al.*, (2009) e BioRender.^{46, 50}

1.5.2. Autofagia

A autofagia, outro mecanismo de PCD, é um processo utilizado pelas células para reciclar macromoléculas ou organelos (por exemplo, mitocôndrias danificadas) em casos de stress celular, como hipoxia, escassez de nutrientes, entre outros, de forma a permitir a sobrevivência e o desenvolvimento celular.^{42, 44, 50, 54} A autofagia também está envolvida na remoção de agregados proteicos e microrganismos patogênicos.^{44, 50}

Embora normalmente o processo de autofagia esteja associado à sobrevivência celular, também já foi proposto que este seja um mecanismo pelo qual as células, incluindo as células malignas, morrem por autodigestão.^{42, 54}

Neste processo, as macromoléculas ou organelos alvo são marcados para depois serem incorporados em vesículas denominadas de autofagossomas que posteriormente se fundem com lisossomas para degradação.^{42, 44, 50} Nos lisossomas, o material ingerido é transformado em novos substratos metabólicos através da ação de hidrolases ácidas.⁵⁰

Um importante regulador deste mecanismo de morte celular é a cinase mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*), que funciona como um sinal inibitório na presença de nutrientes e fatores de crescimento.⁵⁰ Desta forma, sob condições ricas em nutrientes, a cinase mTOR encontra-se associada ao complexo ULK1 (do inglês, *Unc-51-like kinase 1*), como forma de inibir o processo autofágico.⁵⁴ Em casos de stress celular ou de exposição à rapamicina, esta cinase é inibida e dá-se a sua dissociação do complexo ULK1. Por sua vez, o complexo ULK1 fosforila BECLIN-1, um membro da família BCL-2 com um domínio BH3⁵⁰, e ativa o complexo P13KC3 (do inglês, *Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit 3*), induzindo a formação e a elongação de uma membrana de isolamento, denominada de fagóforo.^{50, 54} O próximo passo deste processo consiste na formação de um autofagossoma, uma vesícula capaz de sequestrar o material citoplasmático, seguindo-se depois a sua maturação, através da sua fusão com um lisossoma. Forma-se por fim um autofagolisossoma, onde ocorre a degradação do material celular antes isolado, assim como da membrana interna do lisossoma. Todo o processo autofágico é regulado por múltiplas proteínas *autophagy-related* (ATG).^{50, 54}

A via de morte celular por autofagia está representada na **Figura 1.6**.

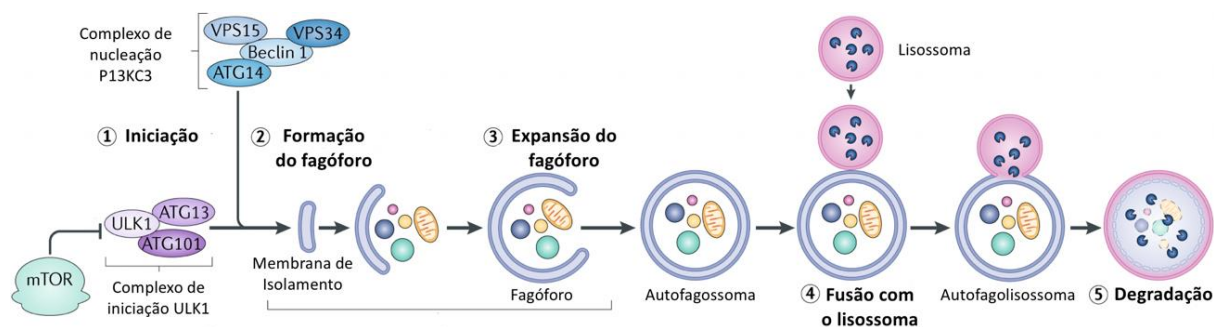


Figura 1.6 – Representação do processo de autofagia. O sensor metabólico mTOR é um dos principais reguladores da autofagia ao atuar como seu inibidor. Quando ocorre a indução da autofagia, dá-se a retenção do material citoplasmático através da formação de uma estrutura denominada de fagóforo. Esta estrutura evolui para uma vesícula de dupla membrana (autofagossoma), que posteriormente se funde com um lisossoma, originando um autofagolisossoma, onde se dá a degradação do material antes apreendido. A autofagia é constituída pelas seguintes etapas: iniciação, formação do fagóforo e sua expansão, fusão com o lisossoma e degradação, que são reguladas pelas proteínas ATG. Por sua vez, estas proteínas fazem parte de vários complexos, como o complexo de iniciação (ULK1) e o complexo de nucleação PI3KC3. PI3KC3 – *Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit 3*; VPS – *Vacuolar protein sorting*; ATG 14, 13 e 101 – proteínas *autophagy related*; mTOR – *mammalian target of rapamycin*; ULK1 – *Unc-51-like kinase 1*. Adaptado de Hansen, M., *et al.*, (2018).⁵⁵

1.5.3. Necrose e necroptose

A morte celular por necrose é, ao contrário dos processos de apoptose e autofagia, uma via de morte celular não programada. Este processo é induzido por fatores externos, como infecções, hipoxia, radiação e temperaturas e pressões extremas, e é caracterizado pelo inchaço dos organelos e rutura da sua membrana plasmática, resultando na libertação do conteúdo celular para o espaço intersticial. Por consequência, este mecanismo de morte celular é muitas vezes associado a inflamação e danos nos tecidos, sendo apenas ativado caso todas as outras vias de morte celular falhem.^{44, 50, 56}

A primeira alteração bioquímica verificada na via necrótica é a depleção de ATP (do inglês, *adenosine triphosphate*), devido ao facto da necrose estar associada à condição de hipoxia. Quando ocorre um menor suprimento de oxigénio às células, dá-se a diminuição da produção de ATP por fosforilação oxidativa nas mitocôndrias. Esta depleção de ATP resulta na falha da bomba de sódio na membrana plasmática, ocorrendo assim um influxo de cálcio e água e, consequentemente, o inchaço das células.⁵⁷

Quando as células se encontram em necrose, dá-se a libertação de fatores que são posteriormente detetados por um sensor intracelular, a proteína NLRP3 (*NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3*). Por consequência, ocorre a formação e ativação do inflamassoma NLRP3 e a libertação das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-18.⁵⁸

Inicialmente, a necrose foi vista como uma consequência de danos celulares irreparáveis, sendo considerada um processo de morte celular não controlado, mas ao longo das últimas décadas já foi demonstrado que esta via pode ser induzida de forma regulada pela célula, adotando assim o nome de necroptose. A necroptose é comum em doenças neurodegenerativas, isquêmias e infecções virais e compartilha vários processos-chave com a morte celular por apoptose.^{48, 50, 56, 57}

O processo de necroptose é mediado por recetores de morte da família do TNF, como o TNFR1 que, em resposta a certos estímulos, forma um complexo com várias proteínas, de entre as quais RIPK1 (do inglês, *Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1*) e TRADD (do inglês, *Tumor necrosis factor receptor-associated death domain*). Caso a via do NF- κ B seja inibida e a proteína RIPK1 não seja ubiquitinada, esta forma um complexo com as proteínas FADD e procaspase-8. Por sua vez, a ativação da caspase-8 e a consequente clivagem da RIPK1 resultam no processo de apoptose. Por outro lado, na ausência das caspases, a ativação do domínio cinase da proteína RIP1, leva à montagem do complexo de sinalização RIPK1/RIPK3 e consequente necroptose mediada pela proteína MLKL (do inglês, *Mixed lineage kinase domain-like protein*) (Figura 1.7).^{48, 56, 57}

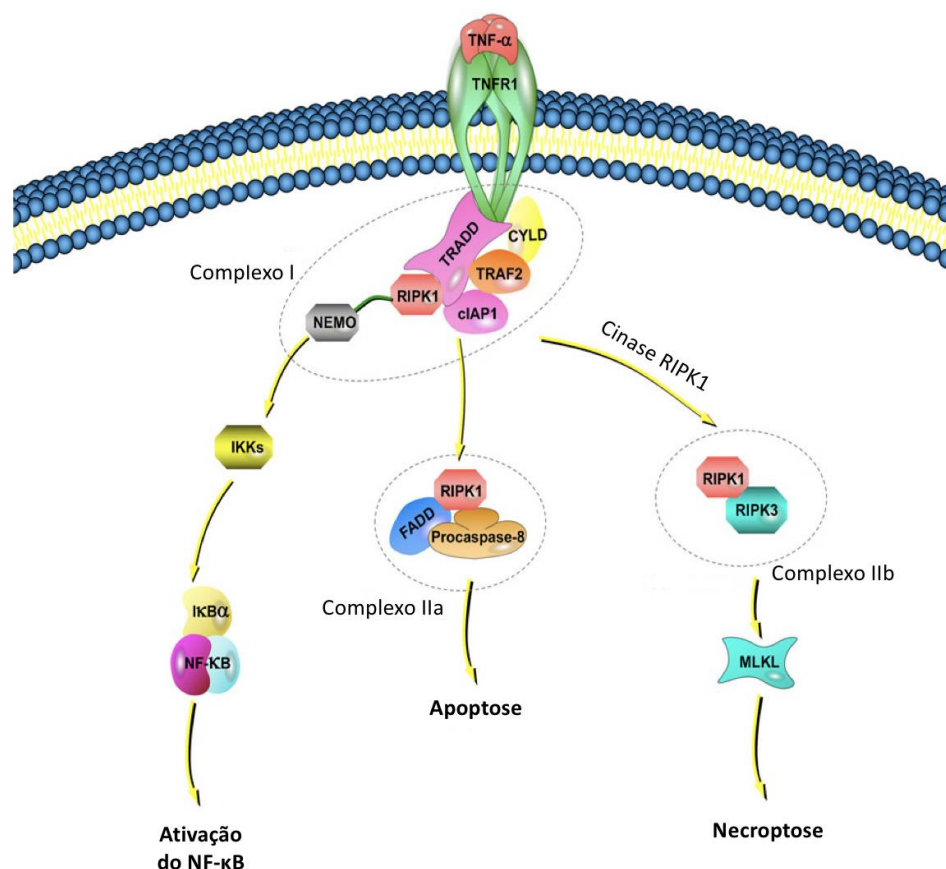


Figura 1.7 – Vias de sinalização dependentes do TNFR1. a) Após a ligação do TNF, o recetor TNFR1 sofre alterações conformacionais, resultando na montagem do complexo I, que inclui proteínas como a

TRADD, RIPK1, entre outras. Assim que I κ B α é fosforilado, a via de sinalização do NF- κ B é ativada. b) A internalização do TNFR1 origina a montagem citosólica do complexo IIa, constituído pelas proteínas FADD, procaspase-8 e RIPK1. Normalmente, a caspase-8 inativa a proteína RIPK1 e desencadeia a apoptose através da ativação das caspases de execução. c) Se a caspase-8 for inibida por intervenções farmacológicas ou genéticas, RIPK1 e RIPK3 são fosforiladas, formando o complexo IIb, que por sua vez leva à necroptose mediada pela proteína MLKL. TNF α – *Tumor necrosis factor alpha*; TNFR1 – *Tumor necrosis factor receptor 1*; TRADD – *Tumor necrosis factor receptor-associated death domain*; CYLD – *CYLD Lysine 63 Deubiquitinase*; TRAF2 – *Telomeric repeat-binding factor 2*; cIAP1 – *Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1*; RIPK 1/3 – *Receptor Interacting Serine/Threonine Kinase 1/3*; NEMO – *NF-kappa-B essential modulator*; IKKs – *I κ B Kinase Complex*; I κ B α – *NF-kappa-B inhibitor alpha*; NF- κ B – *Nuclear factor kappa B*; FADD – *FAS-associated death-domain*; MLKL – *Mixed lineage kinase domain-like protein*. Adaptado de Yu, Z., *et al.*, (2021).⁵⁶

1.6. Terapêutica do cancro

Ao longo dos últimos anos tem-se verificado um aumento da incidência do cancro, no entanto, a taxa de sobrevivência ao mesmo também tem aumentado. Isto deve-se principalmente a um diagnóstico precoce e ao desenvolvimento de melhores terapêuticas.^{14, 59} As terapêuticas mais comuns são a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, no entanto, o tratamento varia conforme o tipo de tumor e o estado de saúde do doente. É sempre necessário caracterizar o tumor, identificando a sua natureza, localização e o estadió em que se encontra. De acordo com estes parâmetros, a terapêutica pode ser realizada com o intuito curativo ou paliativo.¹⁴

A cirurgia é a principal opção terapêutica sempre que o tumor está confinado, sendo eficaz no controlo da doença. Ainda assim, mesmo quando o tumor já está metastizado, normalmente também se realiza a cirurgia para remoção do tumor primário. Exceções a esta regra podem ser tumores superficiais, como o cancro de mama ou melanomas, em que se pode optar apenas por radioterapia.^{14, 18, 59}

A radioterapia consiste na utilização de radiação que permite a indução de danos no DNA e que posteriormente conduzem à indução da apoptose. Esta terapêutica pode ser dada individualmente ou como tratamento suplementar à cirurgia, podendo ser neoadjuvante, para garantir o confinamento do tumor e/ou para diminuir o tamanho da massa tumoral antes da cirurgia, ou adjuvante, pós-cirurgia. Contudo, uma vez que os efeitos da radioterapia diminuem com o aumento da profundidade da localização do tumor, esta só é utilizada como terapêutica neoadjuvante ou adjuvante quando os tumores são superficiais.^{14, 59}

A quimioterapia, cujo principal objetivo no tratamento do cancro é induzir a morte das células cancerígenas através da sua exposição a agentes antitumorais, é uma terapêutica sistémica e também pode ser dada como terapêutica neoadjuvante ou adjuvante.^{60, 61} Esta

terapêutica é frequentemente utilizada em casos de tumores localizados em maior profundidade e/ou metastizados, uma vez que por ser uma terapia sistêmica tem maior probabilidade de eliminar as metástases.^{14, 59}

Um dos marcos na área da quimioterapia foi a descoberta do composto de coordenação Pt(II), cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂] (cisplatina) por Barnett Rosenberg em 1965, que caracterizou o aparecimento de uma nova era na área da quimioterapia do cancro.^{62, 63, 64} A cisplatina revelou-se um dos compostos metálicos com atividade antitumoral de maior sucesso, sendo aprovada pela FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) em 1978 para o tratamento de alguns tumores, como o cancro de testículo e bexiga.^{63, 64, 65} Desde então, a cisplatina tem sido utilizada no tratamento de outras neoplasias sólidas, nomeadamente pulmão, CRC, cancro do ovário, etc.^{64, 65}

Enquanto a maior parte dos fármacos administrados em quimioterapia são citotóxicos, também podem ser utilizados fármacos citostáticos que bloqueiam o ciclo celular e, consequentemente, impossibilitam a proliferação celular. Neste caso, a cisplatina atua através da formação de aductos com o DNA aquando da sua interação com o mesmo. Desta forma, há um bloqueio do ciclo celular na fase S, G₁ ou G₂-M, que posteriormente resulta na indução de morte celular por apoptose.^{61, 63, 64}

Por outro lado, a cisplatina também é caracterizada por causar diversos efeitos colaterais, nomeadamente náuseas, vômitos, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e neurotoxicidade. Para além dos efeitos tóxicos provocados pela cisplatina, outra desvantagem que se tem verificado é a resistência adquirida pelo doente ao tratamento com este composto.^{61, 64} Na maioria dos casos, as células cancerígenas quando expostas à cisplatina ativam uma resposta adaptativa que as torna menos suscetíveis aos efeitos citotóxicos do fármaco. Consequentemente, as células cancerígenas voltam a proliferar e verifica-se a recorrência do tumor.^{64, 65} Exemplos dos mecanismos envolvidos na resistência à cisplatina são a redução da acumulação intracelular do fármaco, o aumento da reparação do DNA danificado, sendo que o *Nucleotide excision repair* (NER) é considerado o principal mecanismo para remoção dos aductos formados, e ainda a inativação citosólica da cisplatina, sendo a sua conjugação com a glutatona a principal forma de inativação da cisplatina devido ao aumento da sua solubilidade.⁶¹

Os vários efeitos colaterais e a resistência à cisplatina levaram ao aparecimento de dois derivados da platina, a carboplatina e a oxaliplatina, menos tóxicos para o doente. Estes têm sido utilizados em combinação com a cisplatina no tratamento quimioterapêutico do cancro,

uma vez que a combinação de diferentes fármacos tem sido eficaz na superação da resistência aos medicamentos e na redução da sua toxicidade para o doente.^{61, 63, 64}

Para além dos derivados de platina, existem muitos outros fármacos administrados em quimioterapia que podem ser classificados de acordo com os seus mecanismos de ação (**Tabela 1.1**)^{60, 66}

Tabela 1.1 - Classificação de agentes quimioterapêuticos utilizados atualmente, de acordo com os seus mecanismos de ação. A negrito e sublinhado encontram-se alguns agentes usados no tratamento do CRC^{60, 66}.

Classificação	Mecanismo	Exemplos
Agentes alquilantes	Adicionam grupos alquilo ao DNA através de ligações covalentes, originando quebras da cadeia dupla e induzindo a morte celular.	Carboplatina; Cisplatina; <u>Oxaliplatina</u> ; Ciclofosfamida; Ifosfamida.
Antibióticos	São intercalados entre as cadeias de DNA, o que interfere com a atividade das topoisomerases e origina quebras das cadeias do DNA.	Antraciclinas; Actinomicina; Doxorrubicina.
Antimetabolitos	São análogos estruturais dos compostos precursores das sínteses de proteínas e de ácidos nucleicos, sendo assim incorporados no lugar das moléculas normais e originando um produto não funcional. Desta forma, os antimetabolitos interferem com a síntese do DNA.	Metotrexato; Mercaptopurina; <u>5-fluorouracilo</u> .
Inibidores das topoisomerases	Interferem com a atividade das topoisomerases I e II, provocando o bloqueio da replicação e transcrição do DNA.	O etoposídeo é um inibidor da topoisomerase II, enquanto o topotecano e o <u>irinotecano</u> são inibidores da topoisomerase I.

Agentes que interferem com a tubulina	Fármacos que interferem com a formação do fuso mitótico, ao se ligarem à tubulina monomérica e impedirem a sua polimerização em microtúbulos, ou que estabilizam os microtúbulos, originando a paragem do ciclo celular na mitose.	Vincristina; Vinblastina; Docetaxel.
--	--	--

Mais recentemente, com o aparecimento de terapêuticas direcionadas como o caso dos inibidores tirosina cinase (TKIs, do inglês *Tyrosine kinase inhibitors*) e dos anticorpos monoclonais (mAbs, do inglês *Monoclonal antibodies*)⁶⁷, em que os fármacos são específicos para certas alterações moleculares presentes nas células cancerígenas, tem-se verificado uma evolução nos tratamentos antes considerados padrão para muitos tipos de tumor.¹⁴

A imunoterapia, terapêutica que recruta as células do sistema imunitário do próprio doente para atacar o seu tumor, é uma das áreas atuais mais promissoras, tendo já demonstrado ser uma nova forma de tratamento do cancro com bastante potencial.⁶⁸

1.6.1. Diagnóstico e Terapêutica no CRC

Atualmente, o diagnóstico de CRC é maioritariamente realizado através de métodos endoscópicos semi-invasivos e exames de sangue fecal, no entanto, a maioria dos casos tendem a ser detetados em estadios mais avançados.^{33, 69} Desta forma, o aparecimento de novos testes moleculares não invasivos e mais específicos e sensíveis que ajudassem na identificação de marcadores moleculares, como por exemplo DNA, RNA e proteínas, poderiam melhorar significativamente as taxas de sobrevivência ao cancro colorretal. Para tal, alguns biomarcadores moleculares já estão a ser utilizados para a estratificação de risco e deteção precoce do doente oncológico.³³

Os biomarcadores dependem essencialmente do facto de uma grande parte dos tumores apresentarem certas anomalias genéticas nos estadios iniciais da tumorigénese. Por sua vez, estas anomalias estão presentes num grande número de células que são posteriormente eliminadas ao longo do desenvolvimento do tumor, podendo ser encontradas nas fezes, plasma, saliva e urina.³³

Na maioria dos países desenvolvidos, o rastreio é recomendado a partir dos 50 anos, no entanto, com o aumento da incidência de CRC em adultos com menos de 50 anos, em 2019, a

American Cancer Society recomendou o rastreio a partir dos 45 anos. Para além disso, podem ainda ser incluídas pessoas mais jovens, especialmente todas aquelas com um elevado risco de CRC (por exemplo, histórico pessoal de pólipos ou adenoma, histórico familiar de cancro colorretal ou risco hereditário), pessoas fumadoras e com IMC (Índice de massa corporal) elevado, etc.^{35, 38}

Normalmente, o tratamento do CRC requer intervenção cirúrgica e, em vários casos, também se pode aplicar tratamento neoadjuvante ou adjuvante, para reduzir o tamanho do tumor e as suas possíveis metástases.³⁶ Exemplos de agentes quimioterapêuticos utilizados no tratamento do CRC são a oxaliplatina, o 5-FU (5-fluorouracilo) e o irinotecano (**Tabela 1.1**).³⁴ A oxaliplatina é um fármaco semelhante à cisplatina e, por isso, atua através da formação de aductos com o DNA, originando a inibição da sua síntese e reparação.^{61, 63, 64} O 5-FU é um análogo do uracilo, sendo por isso considerado um antimetabolito que interfere com o metabolismo dos nucleótidos.⁶⁶ O irinotecano liga-se ao complexo topoisomerase I-DNA e inibe a função desta enzima de ligar a cadeia de DNA.⁴¹ Todos estes fármacos têm como objetivo provocar a morte celular das células cancerígenas.^{60, 61}

Também se tem verificado uma crescente aplicação de terapias direcionadas, como o caso dos TKIs e dos mAbs, que podem inibir diretamente processos como a proliferação, diferenciação e migração celular.⁶⁷ Estas moléculas atuam sobretudo na inativação de vias de sinalização, conseguindo assim interferir no crescimento do tumor e na ativação da apoptose.^{36, 69, 70}

Existem TKIs específicos para o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR, do inglês *Epidermal growth factor receptor*), como o Erlotinib e o Gefitinib, e alguns mAbs, como o Cetuximab (anti-EGFR), que têm sido utilizados no tratamento do CRC.^{36, 69}

Os recetores tirosina-quinase, como é o caso do recetor EGFR, têm um domínio extracelular que permite a ligação de um ligando específico, um domínio transmembranar e um domínio intracelular tirosina-quinase. Quando o ligando se liga ao recetor, ocorre um processo de dimerização que permite a fosforilação do domínio intracelular, através da reação entre ATP e resíduos de tirosina. Em seguida, dá-se a fosforilação de proteínas-alvo intervenientes em diversas respostas celulares, através de uma série de reações citoplasmáticas.⁷¹ Estes recetores intervêm assim em diversas vias de sinalização com funções no crescimento, metabolismo, sobrevivência e divisão celular. Adicionalmente, vários elementos destas vias podem sofrer mutações em certos cancros humanos, estando assim também envolvidos no processo de carcinogénese.⁶⁹

O recetor EGFR, conhecido por HER-1 (do inglês, *Human epidermal growth factor receptor-1*), intervém em diversos processos essenciais nas células epiteliais normais, incluindo proliferação, sobrevivência, diferenciação, adesão e migração.⁶⁹ Os membros desta família de recetores podem encontrar-se desregulados no cancro, devido a vários mecanismos, como a sobreexpressão do recetor ou dos ligandos, mutações que provocam a ativação constitutiva do domínio tirosina-quinase e ainda falhas na internalização, não ocorrendo a desativação dos recetores. Além destes mecanismos de desregulação, os recetores tirosina-quinase também podem ser estimulados por *cross-talk* com outras vias de sinalização.⁷¹ Assim, com estes processos de desregulação, as células tornam-se propensas ao desenvolvimento tumoral e necessitam de estratégias terapêuticas que possam bloquear esses processos.⁷¹

Os principais tratamentos relacionados com os recetores tirosina-quinase envolvem o uso de mAbs e TKIs, duas classes de fármacos que possuem o mesmo objetivo, mas que atuam através de mecanismos diferentes.⁶⁹ Os mAbs bloqueiam a ligação ligando-recetor ao interferirem com o domínio externo dos recetores ou com o próprio ligando, enquanto os TKIs impossibilitam a fosforilação do domínio intracelular tirosina-quinase, pois competem pelo local de ligação da molécula de ATP.³⁶

O Cetuximab é o exemplo de um anticorpo monoclonal que se liga ao domínio extracelular do EGFR humano e inibe a ligação ao seu ligando EGF. O EGFR está presente em células normais e tumorais e tem sido associado a vários tipos de cancro, uma vez que é frequentemente sobreexpresso em células tumorais. No entanto, o Cetuximab só é administrado em doentes que não possuem a mutação do *KRAS*, pois esta alteração resulta na ativação constitutiva da proteína RAS, o que contribuiria para a aquisição de resistência ao Cetuximab.⁶⁹

Para além disso, atualmente também se tem verificado a combinação de terapêuticas com agentes antitumorais que atuem em diferentes vias celulares, de forma a assegurar a morte das células cancerígenas e que, em conjunto, apresentem menos efeitos colaterais do que quando administradas individualmente.⁶⁰

A maioria dos doentes com CRC metastático são tratados com uma combinação de fármacos biológicos direcionados e citotóxicos. A quimioterapia de primeira linha com fins paliativos compreende fluoropirimidinas (como 5-FU ou capecitabina) administradas isoladamente ou combinadas com leucovorina (LV), bem como outros agentes citotóxicos, como oxaliplatina – 5-FU/LV/oxaliplatina (FOLFOX) e capecitabina/LV/oxaliplatina (CAPOX), ou irinotecano – 5-FU/LV/irinotecano (FOLFIRI). O uso de LV serve para diminuir a toxicidade

associada ao tratamento, enquanto a adição de outros agentes citotóxicos demonstrou aumentar a taxa de resposta e sobrevida ao cancro.³⁴

1.6.2. Resistência à quimioterapia no CRC

Apesar dos avanços no tratamento do cancro, já se verificou que a quimioterapia nem sempre é eficaz, principalmente devido aos seus efeitos secundários adversos que acabam por impedir a administração de doses que permitam erradicar o tumor e curar o doente. Para além disso, a resistência adquirida pelas células tumorais aos fármacos provoca frequentemente recaídas e o insucesso do tratamento.⁷²

Os principais mecanismos envolvidos na aquisição de resistência à quimioterapia incluem alterações na ação dos fármacos, diminuição da ativação do fármaco, diminuição da acumulação dos agentes quimioterapêuticos, seja por diminuição da sua internalização, seja por aumento do seu efluxo, aumento dos mecanismos de reparação dos danos induzidos pelos fármacos, inibição da apoptose e alteração dos alvos celulares dos agentes antitumorais.^{60, 66,}

⁷³

A linha celular de carcinoma colorretal resistente à doxorrubicina (HCT116-DoxR) tem sido amplamente estudada, como em Pedrosa, P., et al., (2018)⁷², Sequeira, D., *et al.*, (2021)⁷⁴, entre outros, como forma de desvendar os mecanismos relacionados com a aquisição de resistência aos fármacos utilizados em quimioterapia. Esta resistência adquirida deve-se normalmente à elevada expressão de bombas de efluxo que removem os xenobióticos do espaço intracelular. Neste caso, já foi demonstrada a elevada expressão da Glicoproteína-P 1 em HCT116-DoxR comparativamente a células HCT116 normais.⁷² A Glicoproteína-P 1 faz parte da família dos transportadores *ATP-binding cassette* (ABC) e consiste numa bomba de efluxo para xenobióticos dependente de ATP. O fármaco, neste caso a doxorrubicina (Dox), é ativamente eliminado das células que sobreexpressam os transportadores ABC. Assim sendo, esta bomba de efluxo está relacionada com a diminuição da acumulação de fármacos em células cancerígenas, e consequentemente com o desenvolvimento de resistência aos agentes antitumorais, como a Dox.^{75, 76}

1.6.3. Novos compostos com centro metálico de Vanádio no tratamento do cancro

Atualmente, a crescente resistência a fármacos utilizados em quimioterapia tem contribuído para um aumento da investigação e consequente aparecimento de novos compostos para o tratamento do cancro. O objetivo da investigação na terapêutica do cancro passa por encontrar uma forma de inibir a morte celular nos tecidos saudáveis, através de fármacos com novos mecanismos de ação e mais seletivos relativamente ao seu alvo biomolecular. Tal permitiria que os doentes recebessem regimes terapêuticos de maior intensidade, resultando numa maior probabilidade de remissão do cancro.^{42, 72}

O vanádio, um metal de transição presente no 5º grupo da tabela periódica⁷⁷, é o 18º elemento mais comum na crosta do nosso planeta e o 2º elemento mais abundante na água do mar, de entre os metais de transição.⁶³ Este metal de transição apresenta uma massa atômica de 50,94 u e três principais estados de oxidação em condições biológicas, sendo eles V (III), V (IV) e V (V). Em solução, o vanádio existe nas formas de vanadilo tetravalente (VO^{2+}) e vanadato pentavalente (HVO_4^- , VO_3^- e/ou H_2VO_4^-), enquanto que a pH fisiológico se encontra na sua forma mais estável, ou seja, no estado de oxidação pentavalente.⁷⁷

Sendo o vanádio um elemento relativamente abundante no nosso planeta^{63, 77}, os organismos são expostos a ele por várias vias, entre elas a via cutânea, por inalação e pelo trato gastrointestinal. Quando o vanádio (V) entra no organismo, ele é reduzido a vanadilo (IV) pela glutatona ou pelo ácido ascórbico e outras substâncias redutoras do plasma, sendo de seguida transportado até às células pela albumina e pela transferrina. Ao nível celular, devido ao pH neutro, a espécie predominante é novamente o vanadato (V), que é internalizado através de um mecanismo de transporte de iões, acabando por voltar a ser reduzido a vanadilo (IV) para se poder ligar às proteínas.⁷⁷

Observou-se que uma dieta com deficiência em vanádio produzia diversos efeitos colaterais, como uma menor produção de leite, baixa fertilidade, uma maior taxa de aborto espontâneo e ainda anormalidades esqueléticas.⁶³

Assim sendo, nos últimos anos tem-se verificado a descoberta de uma grande variedade de efeitos biológicos de complexos de vanádio^{63, 77}, principalmente devido à sua participação em reações com radicais livres.⁷⁷ Um dos primeiros alvos terapêuticos destes complexos foi a doença de diabetes *mellitus*, devido ao facto destes compostos terem uma ação semelhante à insulina. Para além disso, também já se verificou o potencial do vanádio na redução da hipertensão e da dislipidemia.⁷⁷ Mais recentemente, através de evidências experimentais do

potencial anticancerígeno associado aos poucos efeitos adversos que alguns complexos de vanádio demonstraram ter, foi proposto que estes complexos viessem a ser investigados como novos fármacos antitumorais.^{63, 77}

O potencial antiproliferativo de complexos de vanádio com os mais variados ligandos já foi demonstrado em várias linhas celulares tumorais. Os complexos de vanádio demonstraram atividade citotóxica através da sua capacidade de provocar danos no DNA, ora ao interagirem com o DNA, bloqueando o ciclo celular nas fases G₁ ou G₂-M, ora ao induzirem a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS), resultando em stress oxidativo e consequentes danos no DNA. Ambos estes mecanismos resultam em morte celular por apoptose. Outro mecanismo utilizado pelos complexos de vanádio foi a indução da apoptose, tanto através da permeabilização da membrana externa da mitocôndria como através da caspase-8, seguindo a via apoptótica extrínseca. Para além destes mecanismos, também se verificou que estes complexos conseguem induzir a via apoptótica através do aumento da expressão de proteínas pró-apoptóticas, como a proteína BAX.^{63, 77} Foi sugerido pela literatura que todos estes mecanismos celulares adotados pelos complexos de vanádio (indução de stress oxidativo, danos no DNA, paragem do ciclo celular e, em último caso, morte celular) dependem de fatores como o estado de oxidação do ião de vanádio, do arranjo geométrico do complexo, do tipo de células cancerígenas onde atuam e, principalmente, do tipo de ligandos, que podem promover reações redox (reações de oxidação-redução) ou aumentar a interação destes complexos com os ácidos nucleicos.^{63, 77}

1.7. Modelos 2D e 3D para o estudo do CRC

A maior parte do conhecimento que se tem hoje em dia sobre a biologia do cancro, vias de sinalização e alvos terapêuticos foram obtidos através de sistemas bidimensionais (2D) com linhas celulares tumorais imortalizadas, no entanto estes modelos apresentam diversas limitações na investigação de novos fármacos.⁷⁸ Os modelos 2D *in vitro* consistem na utilização de placas para cultura celular, onde as células tumorais crescem em monocamada num espaço limitado. Estes sistemas não reproduzem a complexidade dos tumores humanos, como o TME, as interações célula-célula e célula-ECM, e toda a vasculatura existente na zona tumoral. Além disso, a heterogeneidade das células cancerígenas é progressivamente perdida em culturas de longo prazo, tornando-se difícil obter informações precisas sobre a eficácia dos tratamentos. Por sua vez, a utilização de modelos animais permite incluir o papel do TME e da angiogénese na resposta tumoral ao tratamento, mas apresentam custos mais elevados, maior dificuldade

de manipulação e limitação ao recriar a imunobiologia humana.^{78, 79} Os xenoenxertos derivados de organoides e de doentes podem preencher o requisito de heterogeneidade tumoral, no entanto é exigido um modelo imunocomprometido. Os modelos de rato com engenharia genética, apesar de exibirem um TME semelhante ao que o CRC humano apresenta, são modelos caros e bastante demorados. Em contraste, os modelos tridimensionais (3D) *in vitro* podem ultrapassar muitas destas limitações e preencher a lacuna entre os modelos 2D demasiado simplificados e os modelos animais não representativos.⁷⁸ Os sistemas de cultura 3D podem conter células cancerígenas e outras tipologias de células que mimetizem o TME *in vivo* e exibir uma organização espacial específica, aumentando as interações célula-célula e célula-ECM, e permitem ainda o transporte de nutrientes e resíduos entre pequenas distâncias.^{78, 79}

Entre os modelos 3D, os organoides são os mais atrativos. Enquanto os esferoides são originados através da agregação de múltiplas células numa estrutura 3D, os organoides tumorais desenvolvem um formato 3D organizado com base na sua informação genética, representando mais concretamente a tumorigénese. Além disso, a utilização das próprias células de doentes em organoides tumorais recria a heterogeneidade intra- e inter-paciente, sendo crucial para o desenvolvimento de terapêuticas anticancerígenas personalizadas e constituindo uma melhor alternativa aos dispendiosos e complexos xenoenxertos tumorais derivados de doentes (PDXs, do inglês *Patient-derived xenografts*).⁷⁸

Por fim, a combinação de organoides tumorais com as técnicas de microfluidica e impressão 3D representa um novo método para o estudo do desenvolvimento, progressão, imunidade e metastização do cancro. Estes sistemas são denominados por *organ-on-a-chip* e retratam a complexidade do TME, incorporam diversos tipos de células e componentes da matriz, reproduzem o transporte de oxigénio, nutrientes, resíduos e fármacos, e apresentam redes vasculares.^{78, 79} As plataformas de microfluidica permitem o estabelecimento, num único dispositivo, de um microambiente 3D com ligações entre tecidos.⁷⁹

Na **Figura 1.8 - A** estão representados alguns dos modelos utilizados atualmente para o estudo do CRC, assim como as vantagens e desvantagens associadas à sua utilização.

De entre os modelos 3D de cultura celular, os esferoides são provavelmente os mais promissores no que diz respeito à sua acessibilidade, simplicidade e reprodutibilidade.^{78, 79} Em particular, esferoides de CRC têm vindo a ser investigados para melhorar a resposta do doente à quimioterapia. Os esferoides tumorais são agregados celulares que imitam as interações célula-célula e célula-ECM, bem como os gradientes de oxigénio, pH e nutrientes, presentes em tumores sólidos. Estes modelos 3D apresentam uma organização em três camadas, com

células proliferativas na camada exterior com acesso a oxigénio e nutrientes, células quiescentes na camada intermédia e células necróticas no núcleo, em condições de hipoxia e falta de nutrientes (Figura 1.8 - B).⁷⁸

A	Cultura celular 2D	Esferoides	Modelos animais	Organ-on-a-chip
				
	• Adesão • Expressão de genes • <i>Screening</i> de fármacos • Migração	• Proliferação • Migração • Expressão de genes • <i>Screening</i> de fármacos • <i>Cross-talk</i> com o sistema imunitário e estroma (em caso de co-cultura)	• Proliferação • Migração • Invasão • Angiogénese • Expressão de genes • <i>Screening</i> de fármacos	• Proliferação e Migração • Invasão, intravasão e extravasão • Angiogénese • <i>Cross-talk</i> com o sistema imunitário e estroma • Expressão de genes • <i>Screening</i> de fármacos
	• Simplicidade • Baixo custo • Elevada reprodutibilidade • <i>High throughput</i>	• Heterogeneidade tumoral • Possibilidade de co-cultura • Interações cél-cél e cél-matriz • Geometria e distribuição espacial	• Organismo vivo • Reproduz o TME e a heterogeneidade tumoral • Possível manipulação genética	• Reproduz o TME e a heterogeneidade tumoral • Reproduz as interações entre os vários órgãos e tecidos • Apresenta propriedades hidrodinâmicas
	• Não reproduz o TME, as interações cél-cél e cél-matriz, a arquitetura e a heterogeneidade tumoral	• Não apresenta vasculatura • Custo elevado • Dificil manter em cultura por longos períodos de tempo	• Custo e tempo elevado • Não reproduz a imunobiologia humana • Dificil manipulação • Limitações éticas	• Custo elevado • Baixa reprodutibilidade • Falta de standardização

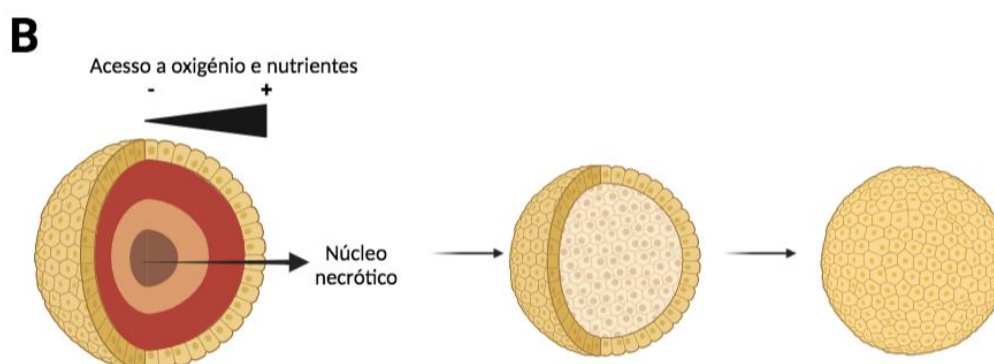


Figura 1.8 – A) Vantagens, desvantagens e aplicações de alguns dos modelos utilizados hoje em dia para estudar o CRC, entre eles o modelo de cultura celular 2D, os esferoides (3D), os modelos *in vivo* e os dispositivos de microfluidica, como o *organ-on-a-chip*. **B)** Representação da estrutura de um esferoide, com especial atenção para a sua organização em três camadas, com a camada mais interior a corresponder ao núcleo necrótico. TME - *Tumor microenvironment*; cél-cél – célula-célula. Adaptado de Castro, F., *et al.*, (2021); Yoon, P. S., *et al.*, (2021) e BioRender.^{77, 78}

1.8. Objetivos do Trabalho

Apesar dos progressos alcançados na terapêutica do cancro ao longo dos últimos anos, continua a ser necessário encontrar novos agentes quimioterapêuticos menos tóxicos para o doente e que, ao mesmo tempo, possam contornar a resistência adquirida a certos fármacos utilizados atualmente no tratamento do cancro, como por exemplo a doxorrubicina.

Assim sendo, este trabalho insere-se no contexto de avaliar o potencial citotóxico de novos complexos com centro metálico de vanádio (IV) para o tratamento do cancro, e em particular, com ênfase no CRC sensível e resistente à doxorrubicina.

Para tal, o presente estudo teve como objetivo inicial a realização de ensaios *in vitro* de forma a verificar o efeito antiproliferativo dos compostos de vanádio em várias linhas tumorais e determinar qual a linha celular mais sensível à ação dos compostos em estudo. Pretendeu-se ainda analisar a citotoxicidade destes complexos em modelos 3D, através da utilização de esferoides, de forma a comparar o efeito antiproliferativo dos complexos de vanádio em modelos 3D com culturas celulares 2D. Estes modelos 3D são muito importantes devido à sua maior capacidade de mimetizar o TME e as interações célula-célula e célula-ECM, o que não é possível em modelos 2D.

Após a análise da citotoxicidade dos complexos de vanádio, pretendeu-se estudar qual o mecanismo de morte celular adotado pelas células tumorais aquando da sua exposição a estes complexos, assim como a sua possibilidade de produção de ROS. Analisou-se também o efeito destes complexos no processo de migração celular, a sua internalização pelas células tumorais e a sua possibilidade de interferir na progressão do ciclo celular. Por último, pretendeu-se também avaliar o potencial anti-angiogénico dos complexos de vanádio *in vivo*, através da utilização de embriões de galinha.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Equipamentos

Tabela 2.1 - Lista dos equipamentos utilizados ao longo do trabalho prático e suas respectivas marcas.

Equipamentos	Marca
Câmara USB microscópica	Opti-Tekscope OT-V1
Centrífuga refrigerada	Sigma 3-16K Sartorius, Tuttlingen, Alemanha
Citômetro de fluxo	Attune® <i>Acoustic Focusing Flow Cytometer</i> , Life Technologies, Carlsbad, EUA
Espectrofotômetro	<i>Evolution</i> 300 UV-Vis, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA
Estufa de CO ₂	SANYO CO ₂ <i>Incubator</i> , Electric Biomedical Co., Osaka, Japão WTC Binder, Tuttlingen, Alemanha
Frascos T25 cm ²	SPL Life Sciences, Coreia do Sul
Hemocitômetro	Hirschmann, Eberstadt, Alemanha
Leitor de microplacas	Tecan Infinite M200, Mannedorf, Suíça
Microcentrífuga	Sigma 1-14, Göttingen, Alemanha
Microscópio invertido	Nikon Ti-U Eclipse, Tóquio, Japão
Microscópio ótico invertido	Nikon TMS, Nikon <i>Instruments</i> , Tóquio, Japão
Placas de 6, 24 e 96 poços	SPL Life Sciences, Coreia do Sul
Placas de 96 poços (esferoides)	Nunclon™ Sphera™ <i>Microplate</i> , Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA
Sistema de eletroforese	Mini-PROTEAN® <i>Tetra Vertical Electrophoresis Cell</i> + PowerPac <i>Basic Power Supply</i> , Bio-Rad, EUA
Ultrassons	UTR200, Hielscher Ultrasonics GmbH, Alemanha

2.2. Complexos metálicos estudados

Neste trabalho foram estudados 10 compostos de vanádio sintetizados por Katarzyna Choroba, investigadora doutorada no grupo da Doutora Barbara Machura, do Instituto de Química da Universidade da Silésia, Szkolna Katowice, Polónia. As estruturas dos complexos em estudo não serão divulgadas devido a questões de confidencialidade.

Na **Tabela 2.2** encontram-se as fórmulas químicas dos compostos de vanádio estudados, bem como dos ligandos e a massa molar de cada um.

Tabela 2.2 – Características dos compostos de vanádio utilizados ao longo do trabalho prático (seus ligandos e respetiva massa molar). Dipic= *Dipicolinate*; phen= *1,10-phenanthroline*; pyim= *2-(1H-imidazol-2-yl)pyridine*; pybim= *2-(2-pyridyl)benzimidazole*; bipy= *(2,2'-bipyridine)*; phtiaz= *phenothiazine*; im= *imidazole*; phendione= *1,10-phenanthroline-5,6-dione*.

Compostos	Ligandos	Massa molar (g/mol)
V18 VO(dipic)(4,7-Cl ₂ -phen)	dipic; Cl ₂ ; phen	481,13
V20 VO(dipic)(pyim) ₂	dipic; pyim	377,21
V21 VO(dipic)(pybim)	dipic; pybim	427,27
V22 VO(dipic)(4,7-(CH ₃ O) ₂ -phen)	dipic; CH ₃ O; phen	472,31
V23 VO(dipic)(bipy)	dipic; bipy	388,23
V26 VO(dipic)(4,7-Ph ₂ -phen)	dipic; Ph ₂ ; phen	564,43
X VO(dipic)(4,7-(phtiaz) ₂ -phen)	dipic; phtiaz; phen	806,76
Y VO(dipic)(phen)	dipic; phen	412,25
Z VO(dipic)(im) ₂	dipic; im	368,21
VO(dipic)(phendione)	dipic; phendione	442,23

2.3. Linhas celulares humanas

2.3.1. Características

A citotoxicidade dos compostos em estudo foi analisada em três linhas tumorais humanas e em fibroblastos provenientes da derme neonatal, uma linhagem de células

humanas não tumorais. A linha tumoral A2780 (carcinoma do ovário) foi obtida da Merck (Darmstadt, Alemanha), enquanto as culturas celulares de HCT116 (carcinoma colorretal) e de fibroblastos primários humanos foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC®, Manassas, VA, EUA). A linha de cancro colorretal resistente à doxorrubicina (HCT116-DoxR) foi derivada de células HCT116, conforme descrito em Pedrosa, P., *et al.*, (2018).⁷²

Na **Tabela 2.3** estão descritas as principais características das linhas celulares utilizadas neste trabalho prático, nomeadamente a sua origem, morfologia, modo de crescimento e o meio de cultura utilizado de acordo com a linha celular.

Tabela 2.3 - Linhas celulares utilizadas ao longo do trabalho prático e suas características. RPMI–*Roswell Park Memorial Institute Medium* (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); DMEM–*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); FBS–Soro Fetal Bovino (Invitrogen, Nova Iorque, EUA); Pen/Strep–Penicilina/Estreptomicina (antibiótico) (Invitrogen, Nova Iorque, EUA).

Linha celular	Origem	Morfologia	Modo de crescimento	Meio de Cultura % (v/v)
A2780	Carcinoma de ovário	Epitelial	Aderente	RPMI; FBS 10%; Pen/Strep 1%
HCT116	Carcinoma colorretal	Epitelial	Aderente	DMEM; FBS 10%; Pen/Strep 1%
HCT116-DoxR	Carcinoma colorretal resistente à doxorrubicina	Epitelial	Aderente	DMEM; FBS 10%; Pen/Strep 1%
Fibroblastos	Derme neonatal	Mesenquimatosa	Aderente	DMEM; FBS 10%; Pen/Strep 1%

2.3.2. Preparação e manutenção das culturas celulares

As linhas celulares HCT116 (sensível e resistente) e fibroblastos foram cultivadas em meio de cultura DMEM, enquanto a linha celular A2780 foi cultivada em meio de cultura RPMI. Estes meios foram suplementados com 10% (v/v) FBS e com uma solução a 1% (v/v) de antibiótico composta por 10000 U/mL de penicilina e 10000 µg/mL de

estreptomicina. Na cultura celular de HCT116-DoxR foi adicionada ao meio de cultura uma concentração de 3,6 μM de doxorubicina (Dox).

Todas as células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm^2 (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) e depois mantidas numa estufa de CO_2 (SANYO CO_2 *Incubator*, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO_2 e 99% (v/v) de humidade relativa até atingirem uma confluência de aproximadamente 80%.

Quando a confluência pretendida foi atingida, foi realizada uma subcultura celular para garantir a sobrevivência e o crescimento das células. Desta forma, foram realizadas subculturas celulares semanalmente. Para tal, inicialmente foi retirado o meio aos frascos de cultura e de seguida foram adicionados 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) 1x. Depois de retirado o PBS, adicionaram-se 2 mL de tripsina geneticamente modificada, TrypLE™ *Express* (Gibco®, Nova Iorque, EUA), e o frasco foi incubado a 37°C durante 5 minutos. Seguidamente, foram adicionados 2 mL de meio ao frasco, de modo a neutralizar a ação da tripsina, e a solução resultante foi distribuída por 2 *eppendorfs* (cada um com aproximadamente 2 mL de solução). Estes foram centrifugados a 500 xg durante 5 minutos (Sigma 1-14, Göttingen, Alemanha), sendo depois o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspendido em 1 mL do respetivo meio.

Foi possível calcular o volume da suspensão celular necessário para realizar as subculturas através da contagem do número de células viáveis existentes em solução, de acordo com o método de exclusão com *Trypan Blue* (Gibco™, Life Technologies, CA, EUA). Este método consiste na utilização do corante *Trypan Blue* que marca apenas as células não viáveis, devido a estas apresentarem a membrana celular comprometida. Assim, as células não viáveis são coradas de azul e as células viáveis permanecem brancas.⁸⁰ Na contagem das células utiliza-se uma solução composta por 350 μL de meio completo, 50 μL da suspensão celular e 100 μL de 0,4% (m/v) *Trypan Blue*. Esta solução é depois colocada num hemocitómetro (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha) e é analisada com recurso ao microscópio ótico invertido (Nikon TMS, Nikon *Instruments*, Tóquio, Japão).

A concentração celular (células/mL) é calculada através da expressão indicada na **Equação 2.1**, onde se multiplica o número de células viáveis contadas pelo volume do hemocitómetro (10^4 mL^{-1}) e pelo fator de diluição (10) e se divide o total pelo número de quadrantes contados.

Equação 2.1

$$\text{Concentração celular (células/mL)} = \frac{N^{\circ} \text{ células viáveis} \times 10^4 \times 10}{N^{\circ} \text{ de quadrantes}}$$

Depois de estimado o volume necessário a retirar da suspensão celular para realizar a nova subcultura, esta é incubada novamente na estufa de CO₂, nas mesmas condições referidas anteriormente.

2.4. Ensaios de citotoxicidade em culturas 2D

Após a determinação da concentração celular, as células foram semeadas numa placa de 96 poços a uma densidade celular de 0,75x10⁵ células/mL, sendo depois incubadas por um período de 24h na estufa de CO₂ (SANYO CO₂ *Incubator*, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa. Depois da incubação, o meio presente nos poços foi substituído por uma solução constituída por meio completo e uma dada concentração do composto a ser analisado.

Para cada linha celular foi testada uma gama de concentrações de composto apropriada, assim como os respetivos controlos. Os controlos analisados foram o negativo (0,1% ou 1% (v/v) DMSO (do inglês, *Dimethyl Sulfoxide*), conforme a diluição utilizada), o positivo (0,4 µM Dox), um controlo contendo apenas meio completo, um controlo contendo apenas células e ainda um controlo contendo meio completo com composto e sem células.

Após 48h de incubação na estufa de CO₂, a viabilidade celular foi medida através da utilização do *Kit CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega, Madison, EUA). Para tal, o meio presente em cada poço foi substituído por uma solução colorimétrica composta por meio completo e reagente de MTS (do inglês *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium*), numa proporção de 80 µL de meio/poço para 20 µL do reagente de MTS/poço, seguindo-se novamente um período de incubação na estufa, de 30 minutos a 1 hora e 15 minutos, de acordo com a linha celular utilizada. Por fim, a absorvância de cada poço foi medida num leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Mannedorf, Suíça) a 490 nm e a viabilidade celular dos compostos foi definida com a **Equação 2.2**.

Equação 2.2

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Abs composto} - \text{Abs composto vestigial}}{\text{Abs DMSO} - \text{Abs MTS}} \times 100$$

A partir dos valores de viabilidade celular obtidos para cada linha celular exposta aos compostos de vanádio, foi possível calcular o IC₅₀ (concentração de composto que leva a uma redução da viabilidade celular em 50%) dos respectivos compostos através da utilização do programa *GraphPadPrism 8* (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Posteriormente, foram calculados os índices de seletividade (SI) através da **Equação 2.3**, que permitem verificar a seletividade dos compostos para as linhas tumorais relativamente às células não tumorais.⁸¹

Equação 2.3

$$\text{Índice de seletividade} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ do composto na linha celular não tumoral}}{\text{IC}_{50} \text{ do composto na linha celular tumoral}}$$

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de viabilidade, os ensaios seguintes foram realizados apenas para os compostos V22, V26 e Y na linha celular HCT116-DoxR.

2.5. Estudos de solubilidade e estabilidade dos complexos de vanádio

A estabilidade dos complexos de vanádio foi analisada em condições fisiológicas, através de espectroscopia de UV-Visível. Para tal, os complexos foram inicialmente solubilizados em DMSO e, mais tarde, foram diluídos em meio RPMI incolor (sem *phenol red*) numa concentração final de 50 µM.

A análise foi executada numa gama de comprimentos de onda de 220 a 700 nm com recurso a uma *cuvette* de quartzo com 1 cm de percurso ótico. Os espectros foram obtidos depois de 0h (t₀, sem incubação), 24h e 48h de incubação numa estufa a 37°C (WTC Binder, Tuttlingen, Alemanha), num espectrofotómetro *Evolution 300 UV-Vis* (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

2.6. Preparação de modelos 3D de esferoides

Com o intuito de obter modelos 3D de culturas celulares HCT116-DoxR, as células foram cultivadas em placas de 96 poços *super low Attachment* (Nunclon™ Sphera™ *Microplate*, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) a uma densidade de 5000

células/poço e foram incubadas na estufa de CO₂ (SANYO CO₂ *Incubator*, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão), nas condições já mencionadas anteriormente.

2.7. Ensaios de citotoxicidade em modelos 3D de esferoides

Foram realizados ensaios de citotoxicidade em modelos 3D, através da utilização de esferoides com 8 dias. Para tal, ao 6º dia de crescimento, o meio de cultura dos esferoides foi substituído por uma solução constituída por meio completo e a concentração desejada do composto em estudo.

Os esferoides foram incubados por 48h na estufa de CO₂ (SANYO CO₂ *Incubator*, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa e, em seguida, o meio de cada poço foi novamente substituído por uma solução constituída pelo reagente de MTS e meio DMEM, numa proporção de 20:100.

Os esferoides foram novamente incubados na estufa de CO₂ durante 4h e, em seguida, foram transferidos para uma placa de 96 poços de fundo plano. Por fim, registou-se a absorvância a 490 nm, com recurso a um leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Mannedorf, Suíça).

2.8. Potencial Apoptótico

2.8.1. Marcação com Alexa Fluor 488-Anexina V e Iodeto de Propídio

De forma a avaliar o mecanismo envolvido no potencial citotóxico dos complexos de vanádio selecionados em células HCT116-DoxR, realizou-se o ensaio de dupla marcação com Alexa Fluor 488-Anexina V e IP (Iodeto de Propídio), com recurso ao *kit Alexa Fluor® 488 Annexin V/Dead Cell Apoptosis* (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).⁸²

Para tal, as células foram cultivadas em placas de 6 poços *high-attachment* (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) numa densidade de 1x10⁵ células/mL e foram incubadas durante 24h na estufa de CO₂ (SANYO CO₂ *Incubator*, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa. Decorrida a incubação, o meio existente nos poços foi substituído por uma solução com o IC₅₀ do composto desejado para a linha celular testada ou pelos respetivos controlos. Os controlos

utilizados neste ensaio foram: 0,1% (v/v) DMSO, 6 μ M Dox, 5 μ M cisplatina (Cis), células não marcadas e não tratadas, células tratadas com Dox e marcadas com Alexa Fluor 488-Anexina V, células tratadas com Dox e marcadas com IP e células marcadas com Alexa Fluor 488-Anexina V e IP, mas não tratadas. Sucedeu-se uma nova incubação de 48h na estufa, nas mesmas condições mencionadas anteriormente.

Após o período de incubação, o meio dos poços foi substituído por 1 mL de PBS 1x, sendo este logo substituído por 1 mL de TrypLE™ *Express* (Gibco®, Nova Iorque, EUA). As placas foram colocadas 5 minutos a incubar na estufa e, de seguida, o volume de cada poço foi transferido para *eppendorfs*. Os *eppendorfs* foram colocados a centrifugar (Sigma 1-14, Göttingen, Alemanha) durante 5 minutos e 500 xg e logo depois o seu sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspensionado em 1 mL de PBS 1x. Realizou-se nova centrifugação a 750 xg durante 5 minutos e o sobrenadante voltou a ser descartado para as células serem ressuspensionadas em 100 μ L de tampão de ligação Anexina 5x. Após este passo, adicionaram-se ainda 5 μ L de Alexa Fluor 488-Anexina V e 1 μ L de uma solução de IP a 100 μ g/mL às amostras correspondentes, sucedendo-se depois uma incubação na ausência de luz e à temperatura ambiente, durante 15 minutos.

Por fim, foram adicionados 400 μ L de tampão de ligação Anexina 5x às amostras e estas foram analisadas por citometria de fluxo com recurso ao Attune® *Acoustic Focusing Flow Cytometer* (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A análise dos resultados foi conseguida através do Attune® *software*.

2.8.2. Análise da expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas por *Western Blot*

Os ensaios de análise da expressão das proteínas BAX, BCL-2 e PARP1 por *Western Blot* foram realizados pela aluna Tatiana Fernandes, da Licenciatura em Bioquímica, com a minha supervisão.

2.8.2.1. Preparação das amostras

As células HCT116-DoxR foram cultivadas em frascos de 25 cm² (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) a uma densidade de 2×10^6 células/frasco e foram incubadas durante 24h na estufa de CO₂ (SANYO CO₂ *Incubator*, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa. Após as 24h, o meio presente em cada frasco foi substituído por meio fresco com os complexos de vanádio nas suas

concentrações de IC₅₀ ou por 0,1% (v/v) DMSO. Adicionalmente, foi preparado um frasco contendo apenas células não tratadas para controlo. Sucedeu-se depois uma nova incubação de 48h, nas mesmas condições supracitadas.

Após a incubação, as células foram lavadas com PBS frio e recolhidas para *eppendorfs* com recurso a um raspador. As amostras foram centrifugadas (Sigma 1-14, Göttingen, Alemanha) durante 5 minutos a 700 xg, o sobrenadante foi descartado e as células foram novamente ressuspensas em 1 mL de PBS 1x. Sucedeu-se uma nova centrifugação a 750 xg, durante 5 minutos e o sedimento celular resultante foi ressuspensado em 50 µL de solução de lise fresca (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH=8; 5 mM EDTA; Inibidores de fosfatases 1x (PhosStop, Roche); Inibidores de proteases 1x (Complete ULTRA Tablets, Mini, EASYpack, Roche, Suíça); 2% (v/v) NP-40 (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA); 0,1% (p/v) 1,4-ditiotreitol (DTT) (Amresco, EUA) e 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma, St. Louis, EUA)).

Por fim, as amostras foram armazenadas a -80°C até serem necessárias.

2.8.2.2. Extração e quantificação proteica

De forma a extrair proteína, as amostras foram descongeladas e submetidas a 5 ciclos de ultrassons em banho de gelo (2 minutos nos ultrassons, seguidos de 30 segundos em gelo) (UTR200, Hielscher Ultrasonics GmbH, Alemanha). Após os ciclos de ultrassons, as amostras foram centrifugadas (Sigma 1-14, Göttingen, Alemanha) durante 5 minutos a 1000 xg e os sobrenadantes foram guardados em gelo.

Foi realizada uma curva de calibração padrão de BSA (do inglês, *Bovine serum albumin*) (Nzytech, Lisboa) (0-1500 g/mL) com recurso ao *kit Pierce 660 nm Protein Assay* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), presente no Anexo **A.1**. Em seguida, as amostras foram diluídas em água MiliQ numa proporção de 1:10 e foram preparados poços, em placas de 96 poços, com 10 µL de amostra e 150 µL de reagente de *Pierce*. As placas foram colocadas a incubar durante 5 minutos à temperatura ambiente e foram depois analisadas no leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Männedorf, Suíça) a 660 nm.

Foram transferidos 20 µg de proteína para cada *eppendorf* juntamente com 5 µL de *Loading Buffer* reconstituído (5 µL (p/v) DTT 40x + 45 µL *Loading buffer* 4,4x) e estas amostras foram incubadas durante 2h à temperatura ambiente, sendo depois fervidas a 95°C durante 5 minutos. Por fim, foram adicionados 2 µL (p/v) DTT 10x a cada amostra e estas foram inseridas num gel de 10% poliacrilamida.

2.8.2.3. Gel de SDS-PAGE e transferência para a membrana de PVDF ou nitrocelulose

O gel de SDS-PAGE foi preparado de acordo com o protocolo descrito no Anexo A.2, e o sistema Mini-PROTEAN® *Tetra Vertical Electrophoresis Cell* (Bio-Rad, EUA) foi colocado a correr a 120 V durante 1h (PowerPac Basic, Bio-Rad, EUA). Após a corrida terminar, realizou-se a transferência para uma membrana de 0,45 µm de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (Amersham™ Hybond™, GE Healthcare Life Sciences, Alemanha) durante 45 minutos a 130 mA (PowerPac Basic, Bio-Rad). A sanduiche de transferência foi preparada de acordo com o esquema presente no Anexo A.3.

A proteína PARP1 foi transferida para uma membrana de nitrocelulose 0,45 µm (Amersham™ Protran™, GE Healthcare Life Sciences, Alemanha), nas mesmas condições descritas anteriormente para as outras proteínas.

Após a transferência, o gel de SDS-PAGE foi transferido e corado por uma solução de azul de *Coomassie* (Thermo Fisher Scientific, EUA) e a membrana foi incubada numa solução de *Ponceau S*. durante 5 minutos, sendo depois lavada com água destilada.

2.8.2.4. Incubação com os anticorpos primário e secundário

De modo a bloquear a membrana de ligações não específicas, utilizou-se uma solução de bloqueio de 5% (m/v) de leite em pó desnatado ou BSA, solubilizado em TBST 1x (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl e 0,1% (v/v) Tween 20, pH=7,5) e colocou-se a membrana a incubar durante 1h, sob agitação constante à temperatura ambiente.

Após a incubação, a membrana foi exposta ao respetivo anticorpo primário anti-BAX, 1:5000 (Abcam, Reino Unido) ou anti-BCL-2, 1:1000 (Sigma, St. Louis, EUA) e deixada novamente a incubar durante 1h, nas condições anteriormente referidas. Para a proteína PARP1, a membrana foi incubada com uma solução contendo o respetivo anticorpo primário, 1:750 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em 5% BSA, durante a noite e sob agitação constante.

Após a incubação com o anticorpo primário, cada membrana foi submetida a três lavagens de 5 minutos com TBST 1x, sempre sob constante agitação. Por fim, foi adicionado o anticorpo secundário (1:3000, *anti-mouse IgG, horseradish peroxidase (HPR)-linked antibody* ou 1:2000, *anti-rabbit IgG, HPR-linked antibody*; Cell Signalling Technology, EUA) e as membranas foram colocadas a incubar conforme descrito para o anticorpo primário.

2.8.2.5. Exposição do filme

De forma a identificar as bandas das proteínas pretendidas, as membranas foram tratadas com uma solução de substrato *WesternBright ECL (Enhanced chemiluminescence)* (Advansta, Califórnia, EUA). A incubação com o ECL permite a detecção das bandas proteicas da membrana devido à sua interação com o anticorpo secundário e à utilização de um substrato de HRP que emite um sinal quimioluminescente.⁸³ A membrana foi depois exposta a um filme num quarto escuro e a quantificação das bandas foi realizada com o *software* ImageJ.

De forma a normalizar os resultados, foi realizado um controlo com um anticorpo anti-actina. Deste modo, antes de se proceder à incubação com o anticorpo primário, foi necessário incubar a membrana com uma solução de *Stripping* (0,1 M glicina, 20 mM acetato de magnésio e 50 mM cloreto de potássio, pH=2,0) durante 15 minutos. De seguida, a membrana foi lavada com TBST 1x e repetiu-se o processo de incubação com o anticorpo primário: anti β -actina, 1:5000 (Sigma, St. Louis, EUA), e secundário: *anti-mouse* de actina, 1:3000, IgG *HRP-linked antibody* (Cell Signalling Technology, EUA), nas condições já descritas anteriormente na secção 2.8.2.4.

2.8.3. Alteração do potencial de membrana mitocondrial

A alteração do potencial de membrana mitocondrial foi avaliada em células HCT116-DoxR através da utilização do *kit JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Assay* (Abnova Corporation, Walnut, CA, EUA).⁸⁴ Para tal, foram semeadas placas de 6 poços *high-attachment* (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) a uma densidade celular de 1×10^5 células/mL, sendo estas depois colocadas a incubar durante 24h numa estufa de CO₂ (SANYO CO₂ Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa. Terminado o período de incubação, o meio de cada poço foi substituído por uma solução composta pelo IC₅₀ dos compostos estudados ou pelos respetivos controlos. Os controlos utilizados foram: 0,1% (v/v) DMSO, 6 μ M Dox, 5 μ M Cis, células não marcadas e não tratadas e células marcadas, mas não tratadas. Sucedeu-se uma nova incubação de 48h e, após esse período, as células foram lavadas com 1 mL de PBS 1x, destacadas com 1 mL de TrypLE™ *Express* (Gibco®, Nova Iorque, EUA) e centrifugadas (Sigma 1-14, Göttingen, Alemanha) a 500 xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e foi adicionado 1 mL PBS 1x a cada *eppendorf*, sendo estes depois centrifugados durante 5 minutos a 750 xg. O sobrenadante foi novamente removido e adicionaram-se 10 μ L de uma solução de JC-1 (iodeto de 5,5,6,6'-tetracloro-

1,1',3,3' tetraetilbenzimidazolcarbocianina) para posterior incubação de 20 minutos na estufa de CO₂, nas mesmas condições supramencionadas. Por fim, foi adicionado 1 mL de meio DMEM sem *phenol red* + 5% (v/v) FBS a cada amostra e todas elas foram analisadas no citómetro Attune® *Acoustic Focusing Flow Cytometer* (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A análise dos resultados foi conseguida através do Attune® *software*.

2.8.4. Caspase-8

A atividade da caspase-8 em células HCT116-DoxR expostas aos compostos de vanádio foi avaliada com recurso ao *kit Caspase-8 Assay (Colorimetric)* (ab39700) (Abcam, Cambridge, Reino Unido).⁸⁵

Foram semeadas placas de 6 poços *high-attachment* (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) a uma densidade de 1x10⁵ células/mL e, após 24h de incubação numa estufa de CO₂ (SANYO CO₂ *Incubator*, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa, o meio foi substituído por meio fresco suplementado com 0,1% (v/v) DMSO, 5 µM Cisplatina ou pela concentração correspondente ao IC₅₀ dos compostos de vanádio desejados.

Após uma incubação de 48h, as células foram lavadas com 1 mL de PBS 1x e recolhidas para *ependorfs* com um raspador, sendo depois centrifugadas a 4°C e 500 xg (Sigma 3-16K Sartorius, Tuttlingen, Alemanha) durante 5 minutos. As células foram novamente lavadas com 1 mL PBS frio e centrifugadas a 750 xg e 4°C, durante 5 minutos. Após a centrifugação, o *pellet* foi ressuscitado em 50 µL *Lysis Buffer* frio e as células foram incubadas em gelo durante 20 minutos, sendo depois centrifugadas a 1000 xg e 4°C, durante 10 minutos. De seguida procedeu-se à quantificação proteica de cada amostra com recurso à curva de calibração previamente obtida, presente no Anexo A.1. Foram preparados poços em duplicado numa placa de 96 poços, com 200 µg de proteína em *Lysis Buffer*, para um volume final de 50 µL de amostra. A cada poço foram adicionados 50 µL de uma *Reaction mix* preparada de fresco (1 µL DTT 1 M + 100 µL *Reaction Buffer* 2x) e ainda 5 µL de IETD-*pNA*. A placa foi depois incubada nas mesmas condições anteriormente descritas durante 2h e, em seguida, procedeu-se à leitura da absorvância a 400 nm num leitor de microplacas Tecan Infinite M200 (Mannedorf, Suíça).

2.9. Autofagia

A indução de morte celular por autofagia em células HCT116-DoxR foi avaliada com o *kit Autophagy Assay* (ab139484) (Abcam, Cambridge, Reino Unido).⁸⁶

Foram semeadas placas de 6 poços *high-attachment* (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) a uma densidade de 1×10^5 células/mL e estas foram incubadas durante 24h na estufa de CO₂ (SANYO CO₂ Incubator, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa. Após as 24h, o meio presente nos poços foi substituído por uma solução com a concentração correspondente ao IC₅₀ dos compostos desejados para a linha celular testada ou pelos controlos utilizados para este ensaio (0,1% (v/v) DMSO, 6 µM Dox, 5 µM Cis, células não marcadas e não tratadas e células marcadas não tratadas). As placas foram depois colocadas a incubar durante 48h na estufa, nas condições já referidas anteriormente. Adicionalmente, 18h antes do período de incubação terminar, foi adicionado o controlo positivo de 1500 nM Rapamicina aos poços correspondentes.

Depois das 48h, o meio presente nos poços foi transferido para *eppendorfs* e estes foram centrifugados (Sigma 1-14, Göttingen, Alemanha) a 500 xg durante 5 minutos. Paralelamente a este passo, foi adicionado 1 mL de PBS 1x a todos os poços, sendo este logo substituído por 1 mL de TrypLE™ Express (Gibco®, Nova Iorque, EUA). As placas foram colocadas 5 minutos a incubar e, de seguida, o volume de cada poço foi transferido para os respetivos *eppendorfs* já centrifugados. Os *eppendorfs* foram novamente colocados a centrifugar durante 5 minutos e 500 xg e, logo depois, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuscitado em 1 mL de meio DMEM sem *phenol red* + 5% (v/v) FBS. Realizou-se nova centrifugação a 750 xg durante 5 minutos e o sobrenadante foi novamente descartado para as células serem ressuscitadas em 250 µL de *Green Stain Solution 1x*. As células foram posteriormente colocadas a incubar na estufa durante 30 minutos, nas mesmas condições supramencionadas e, após esse período, foram centrifugadas a 750 xg durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido, o sedimento celular foi ressuscitado em 500 µL de *Assay Buffer 1x* e todos os *eppendorfs* foram novamente centrifugados a 750 xg durante 5 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e adicionaram-se 500 µL de *Assay Buffer 1x*.

As amostras foram posteriormente analisadas por citometria de fluxo com o Attune® *Acoustic Focusing Flow Cytometer* (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A análise dos resultados foi realizada com recurso ao *software* Attune®.

2.10. Produção de espécies reativas de oxigénio

De forma a detetar a presença de ROS em células HCT116-DoxR, utilizou-se a sonda 2',7'- diacetato de diclorohidrofluoresceína (H₂DCF-DA) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Para tal, foram semeadas placas de 6 poços *high-attachment* (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) a uma densidade de 1x10⁵ células/mL e, após 24h de incubação numa estufa de CO₂ (SANYO CO₂ *Incubator*, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa, o meio existente nos poços foi substituído por meio fresco contendo a concentração correspondente ao IC₅₀ dos compostos desejados ou pelos controlos utilizados neste ensaio (0,1% (v/v) DMSO, 6 µM Dox, 5 µM Cis, 42 µM TBHP (do inglês: *tert-Butyl hydroperoxide*), células não marcadas e não tratadas e células marcadas não tratadas). As placas foram novamente colocadas a incubar durante 48h na estufa, nas mesmas condições referidas anteriormente e, depois desse período, o meio dos poços foi substituído por 1 mL de PBS 1x, sendo este logo substituído por 1 mL de TrypLE™ *Express* (Gibco®, Nova Iorque, EUA). As placas foram novamente incubadas por 5 minutos e, de seguida, o volume de cada poço foi transferido para *eppendorfs*, os quais foram colocados a centrifugar (Sigma 1-14, Göttingen, Alemanha) durante 5 minutos a 500 xg. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuscitado em 1 mL de PBS 1x, seguindo-se nova centrifugação de 5 minutos a 800 xg. O sedimento celular resultante foi ressuscitado em 1 mL de uma solução de 10 µM H₂DCF-DA em PBS 1x e as amostras foram incubadas durante 20 minutos na estufa de CO₂, nas mesmas condições referidas anteriormente, sendo depois analisadas por citometria de fluxo com recurso ao Attune® *Acoustic Focusing Flow Cytometer* (Life Technologies, Carlsbad, EUA). A análise dos resultados foi realizada através do *software* Attune®.

2.11. Internalização celular pelo método de ICP-AES (*Inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry*)

Com o objetivo de avaliar a internalização dos compostos em estudo pelas células HCT116-DoxR, recorreu-se à técnica de Espectrometria de emissão atômica com plasma indutivo (ICP-AES, do inglês *Inductively coupled plasma - atomic emission spectrometry*).

Para tal, as células foram cultivadas a uma densidade celular de 5×10^5 células/frasco em frascos de cultura de 25 cm² (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) e incubadas numa estufa de CO₂ (SANYO CO₂ *Incubator*, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão), a 37°C, 5% (v/v) de CO₂ e 99% de humidade relativa, durante 24h. Após a incubação, o meio foi substituído por uma solução de meio completo contendo 10x IC₅₀ dos compostos de vanádio desejados ou 0,1% (v/v) de DMSO, e as células foram novamente colocadas a incubar na estufa de CO₂, nas condições supramencionadas, durante 3h. De seguida, o meio de cada frasco foi retirado e guardado em tubos falcon de 15 mL (tubos P), enquanto as células foram lavadas com 1 mL PBS 1x. O PBS foi depois adicionado aos respetivos tubos P e estes foram centrifugados a 800 xg (Sigma 3-16K Sartorius, Tuttlingen, Alemanha), durante 5 minutos. Depois da centrifugação, o respetivo sobrenadante foi transferido para um novo falcon de 15 mL (tubos S). Enquanto isto, as células presentes nos *t-flasks* foram tripsinizadas pela adição de 2 mL de TrypLE™ *Express* (Gibco®, Nova Iorque, EUA) e incubadas durante 5 minutos na estufa. As células foram depois transferidas para os tubos falcon de 15 mL (tubos P) e estes foram centrifugados a 750 xg, 5 min e 15°C. O sobrenadante resultante foi transferido para os respetivos tubos S e todos os tubos (S+P) foram armazenados a -80°C até próxima utilização. Um dia antes das amostras serem analisadas, foi adicionada uma solução de aqua-régia preparada de fresco.

A quantificação das amostras foi realizada por um serviço contratado (Laboratório de análises, serviço de espectroscopia de emissão atômica, Departamento de Química, FCT-UNL).

2.12. Progressão do ciclo celular

De modo a analisar a capacidade de os compostos de vanádio interferirem na progressão do ciclo celular, foram cultivadas células em placas de 6 poços *high-*

attachment (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) numa densidade de 1×10^5 células/mL e estas foram colocadas a incubar por 8h na estufa (SANYO CO₂ *Incubator*, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa. Decorridas as 8h, o meio de cada poço foi substituído por uma solução de 2 mM timidina (Sigma, St. Louis, EUA) para sincronização das células na fase S do ciclo celular e estas foram novamente colocadas a incubar durante 16h, nas mesmas condições já referidas. Passadas as 16h, o meio de cada poço foi substituído por meio fresco e as células foram incubadas por mais 8h na estufa, sendo depois realizada uma nova adição da solução de 2 mM timidina a cada poço. Sucedeu-se uma nova incubação de 16h e, após o duplo bloqueio com timidina, o meio de cada poço foi substituído por meio fresco contendo o IC₅₀ dos compostos desejados ou 0,1% (v/v) DMSO. Como controlos positivos, foram preparadas amostras de 6 µM Dox e 5 µM Cis. As placas foram incubadas durante 3h, 9h, 24h e 32h e, adicionalmente, foi preparada uma amostra controlo, submetida apenas ao duplo bloqueio com timidina.

Após cada incubação, o meio foi removido e as células foram tratadas com 1 mL de TrypLE™ *Express* (Gibco®, Nova Iorque, EUA), sendo depois recolhidas para *ependorfs* e colocadas a centrifugar (Sigma 3-16K Sartorius, Tuttlingen, Alemanha) a 650 xg, 4°C, durante 5 minutos. Depois da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuspenso em 1 mL de PBS 1x frio, sendo novamente centrifugado a 3000 xg, 4°C, durante 5 min. O sobrenadante foi removido e adicionaram-se 100 µL de PBS 1x frio à amostra, adicionando-se cuidadosamente de seguida 1 mL de uma solução de 80% (v/v) etanol frio. As amostras foram armazenadas a 4°C até posterior utilização e, depois de armazenadas, foram submetidas a nova centrifugação a 7500 xg, 4°C, durante 10 minutos. Logo depois, o sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as amostras foram deixadas a secar ao ar. Depois de secas, adicionou-se uma solução de 250 µL de RNase A (50 µg/mL) e as amostras foram incubadas numa estufa de CO₂ durante 30 minutos. Decorridos os 30 minutos, foi adicionada uma solução de 100 µL de IP (25 µg/mL) a cada amostra e, em seguida, 650 µL de PBS 1x. As amostras foram depois analisadas por citometria de fluxo com o Attune® *Acoustic Focusing Flow Cytometer* (Life Technologies, Carlsbad, EUA) e com o respetivo *software* Attune®.

2.13. Ensaio de migração celular

De forma a avaliar a capacidade de migração/regeneração celular, foram cultivados fibroblastos em placas de 24 poços (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) a uma densidade de 4×10^5 células/mL e incubados na estufa de CO₂ (SANYO CO₂ *Incubator*, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa até ser obtida uma monocamada de células confluyente.

As células foram depois expostas a 0,1% (v/v) DMSO ou às respetivas concentrações de IC₅₀ dos complexos de vanádio e, em seguida, foi realizado um riscado na monocamada celular de cada poço, com recurso a uma ponta estéril de 200 µL. Os fibroblastos foram fotografados logo após a sua exposição (0h) e 24h depois de serem incubados na estufa, nas condições já referidas, utilizando um microscópio invertido (Nikon Ti-U Eclipse, Tóquio, Japão). Os riscados foram analisados com recurso ao *software* ImageJ.

2.14. Ensaio *ex-ovo* CAM

O ensaio *ex-ovo* CAM (*Chick Chorioallantoic Membrane*) foi realizado para avaliar o potencial angiogénico dos complexos de vanádio. Para tal, foram adquiridos ovos fertilizados à empresa Pinto Valouro (Bombarral, Portugal) e estes foram colocados a incubar durante 72h numa estufa de CO₂ (SANYO CO₂ *Incubator*, Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa. Os ovos foram cuidadosamente abertos, de forma que o saco de *yolk* ficasse virado para cima, e foram novamente colocados a incubar durante 24h, nas mesmas condições descritas anteriormente.

Após a incubação, foram colocados quatro *O-rings* de silicone no saco de *yolk* de cada ovo, aos quais foram adicionados 40 µL de uma solução contendo o IC₅₀ de cada composto analisado ou 0,1% (v/v) DMSO, em PBS 1x. Os ovos foram fotografados (USB *Microscope Camera*, Opti-Tekscope OT-V1) às 0h, 24h e 48h, depois de incubados na estufa de CO₂ ao longo desse período. Os resultados obtidos foram analisados com recurso ao *software* ImageJ. Foram utilizados cinco ovos como replicados biológicos.

As experiências realizadas *in vivo* nos ensaios CAM foram concretizadas de acordo com a Diretiva 2010/63/EU do Parlamento Europeu e do Conselho de 22 de Setembro de 2010 para a proteção de animais utilizados para propósitos científicos.

2.15. Estatística

Todos os resultados apresentados estão expressos como a média $\pm$ SEM de dois ou mais ensaios biológicos independentes, salva qualquer especificação em contrário. Cada ensaio foi composto por dois duplicados técnicos ou três (no caso dos ensaios com esferoides). Para a análise dos resultados foi utilizado o *software* GraphPadPrism 8.0 e os métodos estatísticos *One-way* ANOVA e teste de *t-Student*. Os resultados com um $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Solubilidade e estabilidade dos complexos de vanádio

A solubilidade aquosa de um composto é um fator muito importante que influencia a sua absorção, distribuição e eliminação do organismo. Assim, compreender as propriedades físico-químicas, como a estabilidade e a solubilidade, de compostos é uma das etapas fundamentais nas fases iniciais do processo de desenvolvimento de novos fármacos.⁸⁷

Uma baixa solubilidade de um composto pode originar resultados biológicos *in vitro* incoerentes e/ou incorretos. Logo, utilizou-se o DMSO para preparação de todas as soluções de trabalho que envolveram os compostos em estudo.^{87, 88} O DMSO é uma molécula orgânica polar aprótica, largamente utilizada como solvente de uma ampla variedade de moléculas polares e apolares, devido à sua natureza anfipática. Para além disso, o DMSO apresenta uma baixa toxicidade celular em concentrações <10%.⁸⁸ Dada a potencial toxicidade para as células⁸⁸, todas as soluções utilizadas ao longo do trabalho experimental não excederam a concentração de 2% (v/v) DMSO.

Deste modo, foram analisadas a estabilidade e a solubilidade dos compostos V22, V26 e Y em meio de cultura RPMI, previamente dissolvidos em DMSO, em três momentos: 0 horas, 24 horas e 48 horas.

Neste caso, quando moléculas absorvem radiação eletromagnética (como UV ou visível), ocorrem transições eletrônicas entre eletrões situados em orbitais moleculares de energia mais baixa para níveis eletrônicos de maior energia. Tal resulta em espectros eletrônicos, como os representados no Anexo A.4, Figura A.3.⁸⁹

É possível verificar que todos os espectros apresentam um pico a 240 nm, o qual pode corresponder a transições entre orbitais $\pi \rightarrow \pi^*$ nos anéis aromáticos do ligando 1,10-*phenanthroline* presente nos três compostos.^{90, 91, 92, 93} No espectro correspondente ao composto V22 (Anexo A.4, Figura A.3), observam-se picos aos 255, 270, 300 e 310 nm, havendo uma conservação dos picos de absorção máxima ao longo das primeiras 24 horas e uma ligeira diminuição de absorvância máxima às 48 horas. Desta forma, não terá ocorrido nenhuma alteração estrutural do composto ao longo do tempo, tendo possivelmente ocorrido uma perda de solubilidade entre as 24 horas e as 48 horas.

No espectro do composto V26 existem picos a cerca de 270 e 280 nm e no espectro do composto Y estão presentes picos a cerca de 263 e 280 nm (Anexo A.4, Figura A.3). De acordo com a literatura^{90, 91, 92, 93}, as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ dos anéis aromáticos do ligando 1,10-*phenanthroline* também podem originar picos na zona dos 260 nm–280 nm.

Para ambos os compostos (V26 e Y) não se verificaram desvios da região espectral dos picos de absorvância ao longo dos três momentos de leitura da absorvância, o que significa que não ocorreu alteração estrutural. No entanto, para o composto Y observou-se uma diminuição da absorvância máxima potencialmente devido a uma perda de solubilidade entre as 24 e as 48 horas, tal como para o composto V22. Por sua vez, o composto V26 apresenta uma diminuição acentuada da absorvância máxima ao longo de todo o espectro (entre as 0-24 horas e entre as 24-48 horas), revelando uma perda de solubilidade ao longo do seu tempo em solução. Deste modo, para garantir a solubilidade e estabilidade dos compostos ao longo dos ensaios realizados, todas as soluções de composto foram preparadas de fresco antes da realização de cada ensaio.

3.2. Ensaios de citotoxicidade em culturas 2D

De forma a avaliar a citotoxicidade dos compostos de vanádio em estudo nas células tumorais e em células saudáveis, realizou-se o ensaio de MTS, um método colorimétrico que permite a quantificação de células viáveis presentes em solução.⁹⁴

O ensaio de MTS consiste na conversão do reagente de MTS num produto colorimétrico, o formazano, solúvel em meio de cultura celular e que pode ser quantificado através da medição da absorvância a 490 nm. Esta conversão só ocorre em células metabolicamente ativas, devido à ação de desidrogenases mitocondriais dependentes de NAD(P)H. Portanto, quanto maior for a quantidade de células viáveis existentes em solução, maior será a quantidade de formazano produzida e, consequentemente, maior será a absorvância lida a 490 nm. Esta é assim uma forma rápida, fácil e segura de avaliar o potencial citotóxico dos compostos em estudo.⁹⁴

A viabilidade celular foi determinada em três linhas celulares tumorais (HCT116, HCT116-DoxR e A2780) e em fibroblastos e, através da análise das curvas concentração/resposta obtidas, foi possível determinar o IC₅₀ relativo (concentração de composto que leva a uma redução da viabilidade celular em 50%) de cada composto na respetiva linha celular analisada.

Na **Figura 3.1**, estão representadas as gamas de concentração testadas para cada composto e os respectivos resultados de viabilidade celular obtidos para a linha celular HCT116-DoxR.

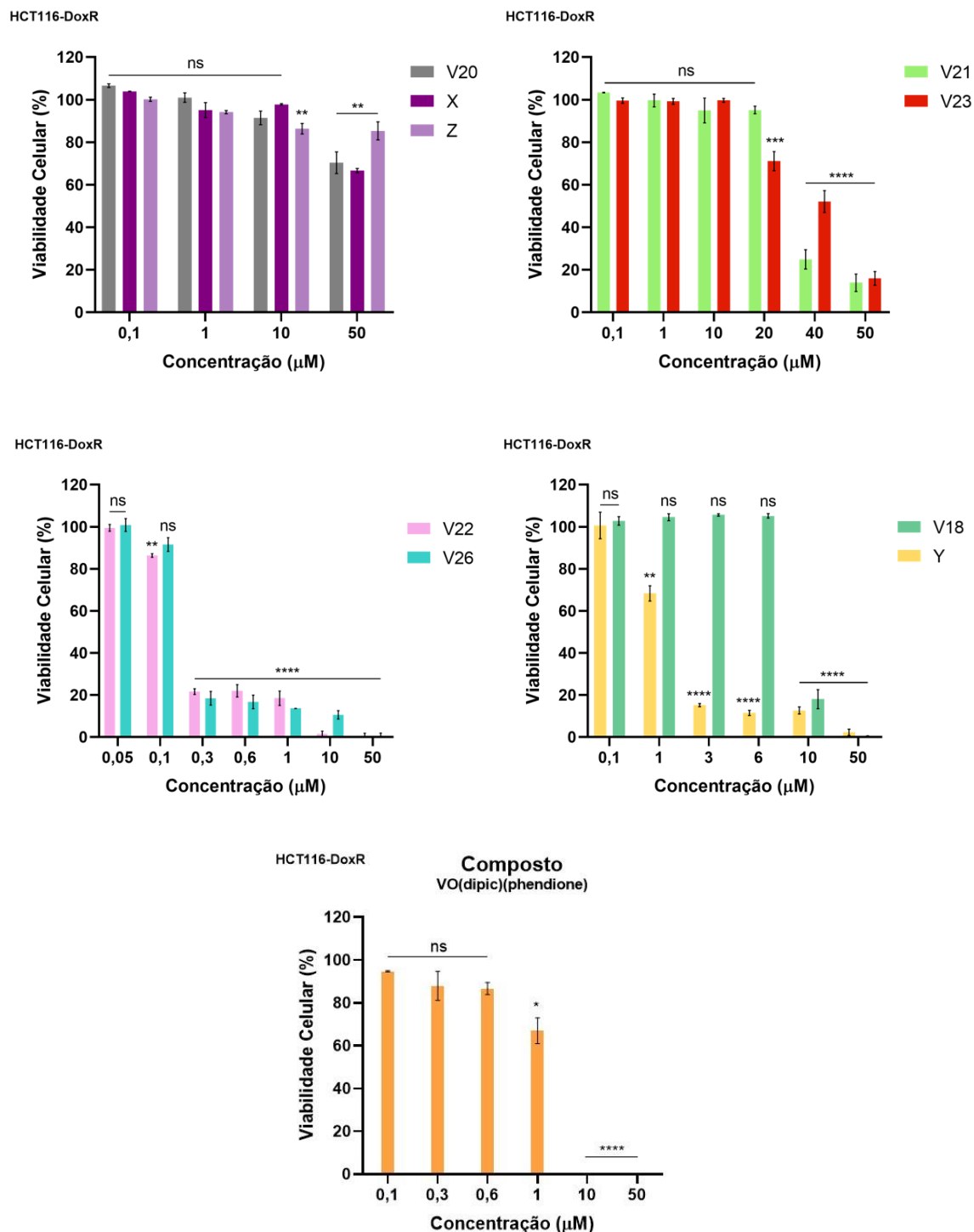


Figura 3.1 – Viabilidade de células HCT116-DoxR após exposição a diferentes concentrações de compostos de vanádio durante 48 horas. 0,1% (v/v) DMSO foi utilizado como veículo de controle.

Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM de pelo menos dois ensaios independentes (ns=estatisticamente não significativo; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p\text{-value}<0,0001$).

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 3.1**, podemos concluir que à exceção dos compostos V20, X e Z, todos os restantes compostos induzem uma perda substancial de viabilidade celular com o aumento da concentração de composto administrada. Apesar de os compostos V20, X e Z induzirem uma diminuição da viabilidade celular com o aumento da concentração, esta diminuição é pequena até concentrações de cerca de 50 μM , tendo sido obtidos valores de IC_{50} superiores a 50 μM , ou seja, característicos de uma baixa citotoxicidade na linha HCT116-DoxR (**Tabela 3.1**).

Os valores de IC_{50} obtidos para cada linha celular estão apresentados na **Tabela 3.1**, assim como os respetivos valores de índice de seletividade (SI) (razão entre o IC_{50} em fibroblastos e o IC_{50} na linha tumoral; medida de especificidade para a linhagem tumoral em análise). A comparação entre a quantidade de composto que causa efeitos tóxicos às células tumorais e a quantidade que causa efeitos tóxicos em células saudáveis, define o índice de seletividade de um dado composto. Portanto, quanto maior o SI, mais seletivo é o composto para uma dada linha tumoral.⁸¹

Tabela 3.1 – Valores de IC_{50} obtidos para cada um dos compostos de vanádio em estudo, nas linhas celulares HCT116, HCT116-DoxR, A2780 e fibroblastos e respetivo SI. Os valores de IC_{50} estão expressos como a média $\pm$ SEM de pelo menos dois ensaios independentes. A negrito encontram-se os valores de $\text{SI} \geq 3,9$.

Composto	Linha celular	IC_{50} (μM)	SI
V18	HCT116	$8,78 \pm 0,02$	1,1
	HCT116-DoxR	$8,99 \pm 0,08$	1,0
	A2780	$2,22 \pm 0,02$	4,2
	Fibroblastos	$9,24 \pm 0,01$	-
V20	HCT116	>50	>0,4
	HCT116-DoxR	>50	>0,4
	A2780	$15,01 \pm 0,02$	1,4
	Fibroblastos	$20,24 \pm 0,04$	-
V21	HCT116	>50	>0,3
	HCT116-DoxR	$31,39 \pm 0,03$	0,5
	A2780	$6,71 \pm 0,02$	2,3
	Fibroblastos	$15,73 \pm 0,04$	-
V22	HCT116	$1,75 \pm 0,04$	1,8
	HCT116-DoxR	$0,16 \pm 0,10$	19,1
	A2780	$1,31 \pm 0,01$	2,4
	Fibroblastos	$3,08 \pm 0,07$	-

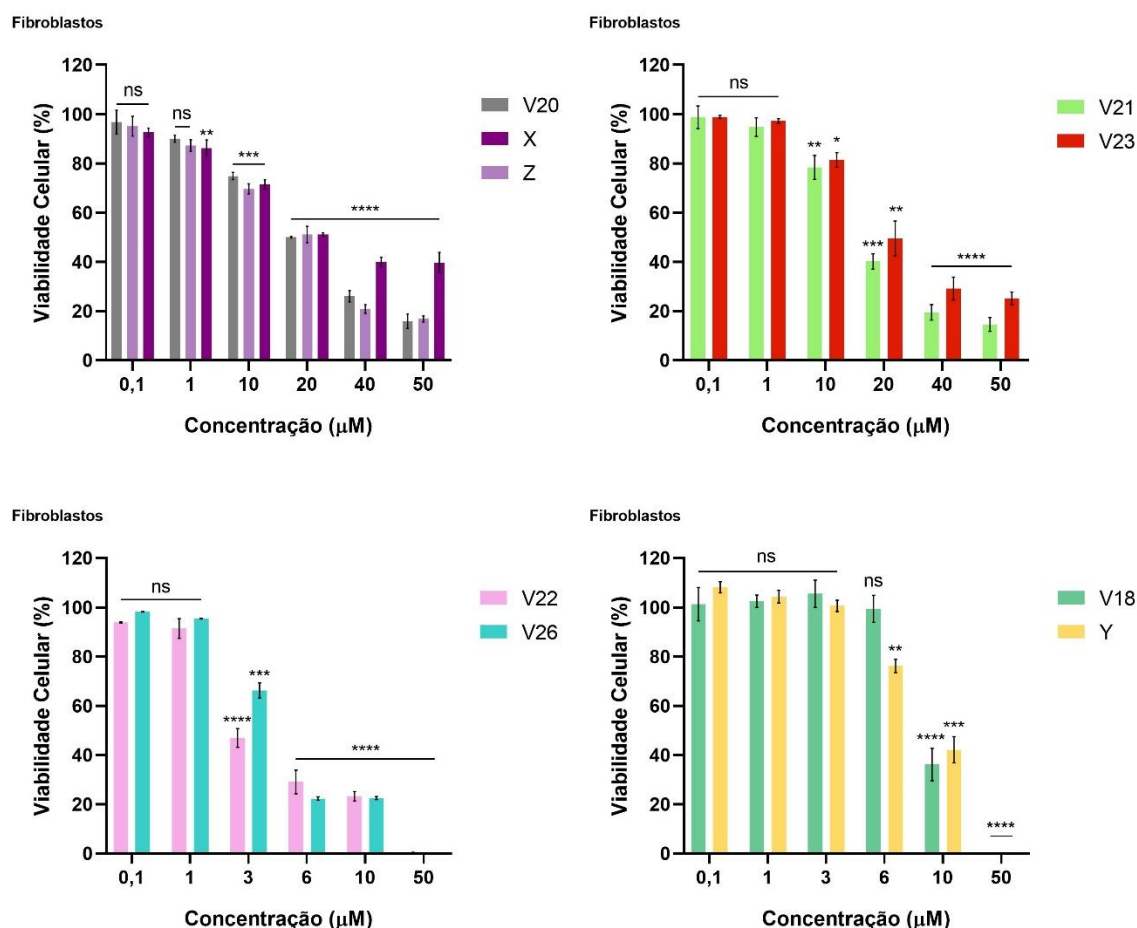
V23	HCT116	44,02 ± 0,04	0,4
	HCT116-DoxR	39,17 ± 0,09	0,4
	A2780	4,77 ± 0,02	3,4
	Fibroblastos	16,23 ± 0,04	-
V26	HCT116	0,86 ± 0,03	4,7
	HCT116-DoxR	0,17 ± 0,05	23,8
	A2780	0,18 ± 0,09	22,7
	Fibroblastos	4,04 ± 0,05	-
X	HCT116	>50	>0,4
	HCT116-DoxR	>50	>0,4
	A2780	3,10 ± 0,03	7,0
	Fibroblastos	21,71 ± 0,08	-
Y	HCT116	3,67 ± 0,01	2,3
	HCT116-DoxR	1,26 ± 0,04	6,8
	A2780	2,05 ± 0,03	4,2
	Fibroblastos	8,59 ± 0,02	-
Z	HCT116	>50	>0,4
	HCT116-DoxR	>50	>0,4
	A2780	14,67 ± 0,02	1,4
	Fibroblastos	20,08 ± 0,05	-
VO(dipic)(phendione)	HCT116	-	-
	HCT116-DoxR	1,34 ± 0,07	0,6
	A2780	0,19 ± 0,02	3,9
	Fibroblastos	0,75 ± 0,02	-

De todos os compostos testados, os compostos V22, V26, Y e VO(dipic)(phendione) aparentam ser os mais promissores na linha celular HCT116-DoxR, devido a apresentarem os valores de IC₅₀ mais baixos (<2 µM; **Tabela 3.1**). Os restantes compostos, nomeadamente V18, V21 e V23, apresentam valores de IC₅₀ mais elevados, não possuindo um potencial citotóxico tão elevado nesta linha celular (>8 µM; **Tabela 3.1**).

Os gráficos de viabilidade celular obtidos para as restantes linhas tumorais (HCT116 e A2780) encontram-se no Anexo **A.5**, **Figura A.4** e **Figura A.5**, respetivamente. Os compostos V22, V26, Y e VO(dipic)(phendione) também são dos mais promissores nas linhas tumorais HCT116 e A2780, no entanto ao comparar os resultados obtidos nestas duas linhas celulares aos obtidos para a linha celular HCT116-DoxR, é possível verificar que a linha de cancro colorretal resistente à doxorrubicina é a linha celular mais sensível à ação destes compostos, com exceção do composto VO(dipic)(phendione), que apresenta um menor valor de IC₅₀ em A2780 (**Figura 3.1**; Anexo **A.5** (**Figura A.4** e **Figura A.5**) e **Tabela 3.1**).

Deste modo, através da análise da **Tabela 3.1**, é possível confirmar que os compostos V22, V26 e Y apresentam um maior efeito citotóxico na linha tumoral HCT116-DoxR, enquanto que o composto VO(dipic)(phendione) é mais citotóxico na linha tumoral A2780 (maiores índices de seletividade, SI).

Para além das linhas tumorais, também é preciso calcular quais os valores de IC₅₀ dos compostos em células saudáveis. Uma vez que um dos principais objetivos da investigação de novos compostos é reduzir os efeitos secundários dos compostos atualmente empregues em quimioterapia, é importante que os compostos em estudo tenham valores de IC₅₀ substancialmente superiores em fibroblastos relativamente aos observados para as linhas tumorais (ou seja, valores de SI elevados). As viabilidades celulares obtidas em fibroblastos estão representadas na **Figura 3.2**.



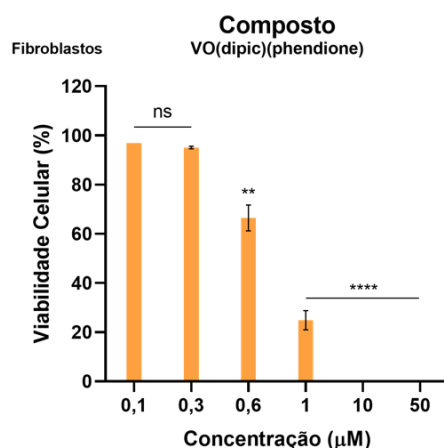


Figura 3.2 – Viabilidade de fibroblastos após exposição a diferentes concentrações de compostos de vanádio durante 48 horas. 0,1% (v/v) DMSO foi utilizado como veículo de controle. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM de pelo menos dois ensaios independentes (ns=estatisticamente não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** p -value $< 0,0001$).

De acordo com a **Figura 3.2**, verifica-se que o composto VO(dipic)(phendione) tem um potencial citotóxico bastante elevado (IC_{50} muito baixo) em fibroblastos, pelo que não será um bom composto a ser utilizado em CRC.

Os compostos V22, V26 e Y também revelam ter uma elevada toxicidade em fibroblastos, apresentando todos um valor de $IC_{50} < 10 \mu M$ (**Tabela 3.1**; **Figura 3.2**).

Através da **Tabela 3.1**, é possível verificar que o SI do composto Y é relativamente baixo, ao contrário do SI dos compostos V22 e V26 de aproximadamente 20. Apesar dos valores de IC_{50} dos compostos V22 e V26 serem baixos em fibroblastos, estes compostos são aproximadamente 20 vezes mais seletivos para a linha celular HCT116-DoxR do que para fibroblastos. Assim, de todos os compostos em estudo, V22 e V26 são aqueles que apresentam um maior potencial terapêutico.

De acordo com a **Tabela 3.1**, os compostos V18 (A2780), V26 (HCT116 e A2780), X (A2780), Y (A2780) e VO(dipic)(phendione) (A2780), representados a **negrito**, também apresentam um potencial citotóxico relativamente elevado ($SI \geq 3,9$), no entanto optou-se por se escolherem os compostos V22, V26 e Y e a linha celular HCT116-DoxR, dado que para esta linha dois compostos apresentam um SI de ~ 20 e é uma linha celular com particular relevância clínica, dado ser resistente à doxorrubicina.

De forma a avaliar se a citotoxicidade dos compostos provinha do composto de partida ou dos seus ligandos também foram realizados ensaios de citotoxicidade com os ligandos de cada composto em células HCT116-DoxR, a linha celular onde os compostos V22, V26 e Y apresentaram resultados mais promissores. Os valores de IC_{50} dos ligandos

obtidos para a linha tumoral HCT116-DoxR estão representados na **Tabela 3.2**, enquanto os gráficos de viabilidade celular estão presentes no Anexo A.6, **Figura A.6**.

Tabela 3.2 – Valores de IC₅₀ obtidos para os ligandos dos compostos de vanádio na linha tumoral HCT116-DoxR. Os valores de IC₅₀ estão expressos como a média ± SEM de pelo menos dois ensaios independentes.

Ligandos	IC ₅₀ HCT116-DoxR (μM)
dipic	> 50
pyim	> 50
bipy	> 50
4,7-(phtiaz) ₂ -phen	> 50
pybim	27,13 ± 0,04
4,7-Cl ₂ -phen	16,38 ± 0,01
phen	1,65 ± 0,03
phendione	0,69 ± 0,01
4,7-Ph ₂ -phen	0,34 ± 0,02
4,7-(CH ₃ O) ₂ -phen	0,30 ± 0,05

Analisando os ligandos dos compostos estudados (**Tabela 2.2**), é possível verificar a presença de um ligando comum, o ligando dipic. No entanto, como se pode constatar pela análise da **Tabela 3.2**, este ligando possui um elevado valor de IC₅₀ nas células HCT116-DoxR.

Com base na **Tabela 3.2**, também é possível verificar que os ligandos phen, phendione, 4,7-Ph₂-phen e 4,7-(CH₃O)₂-phen são os ligandos com maior potencial antiproliferativo nas células HCT116-DoxR, encontrando-se estes ligandos nos compostos Y, VO(dipic)(phendione), V26 e V22, respetivamente. Com base nestes resultados, é possível que o elevado potencial antiproliferativo dos compostos V22, V26 e Y seja maioritariamente devido à presença destes ligandos nas suas estruturas.

Tal como anteriormente referido, os resultados obtidos através dos ensaios de viabilidade celular demonstraram que a linha celular HCT116-DoxR foi a mais sensível à ação dos compostos V22, V26 e Y. Estes resultados são bastante promissores uma vez que esta linha celular poderá mimetizar a resistência adquirida por muitos doentes de CRC com aumento do efluxo dos agentes quimioterapêuticos.⁷² Logo, estes compostos metálicos poderão, caso os resultados assim o confirmem, vir a ultrapassar as limitações relativas a outros compostos que induzam resistência por este mecanismo.

Apesar do maior potencial terapêutico dos compostos V22 e V26 comparativamente ao composto Y, a maioria dos restantes estudos biológicos foi realizada com estes três compostos na linha HCT116-DoxR, por uma questão de comparação e de forma a perceber se poderão estar envolvidos mecanismos de ação distintos.

3.3. Ensaios de citotoxicidade em modelos 3D de esferoides

De forma a comparar o potencial antiproliferativo dos compostos de vanádio V22, V26 e Y em culturas 2D e 3D (que mimetizam melhor o tumor “in vivo”), foram realizados ensaios de viabilidade celular com o reagente de MTS em esferoides de células HCT116-DoxR.

Na **Figura 3.3** estão representadas as viabilidades celulares em função da concentração dos compostos V22, V26 e Y, obtidos para esferoides de HCT116-DoxR, enquanto na **Tabela 3.3** estão representados os valores de IC₅₀ para os compostos V22, V26 e Y obtidos para culturas 2D e 3D de células HCT116-DoxR.

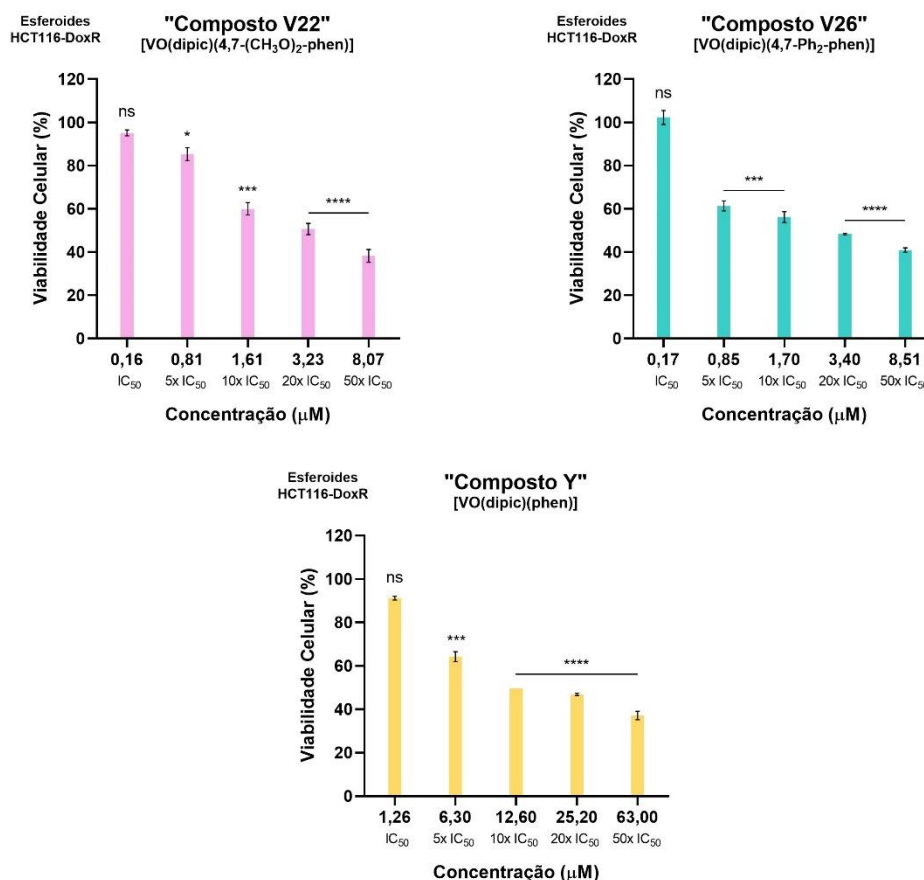


Figura 3.3 – Viabilidade de esferoides HCT116-DoxR com 8 dias, após exposição a diferentes concentrações dos compostos de vanádio V22, V26 e Y durante 48 horas. 0,1% (v/v) DMSO foi

utilizado como veículo de controlo. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM de pelo menos dois ensaios independentes (ns=estatisticamente não significativo; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p\text{-value} < 0,0001$).

Tabela 3.3 – Comparação entre os valores de IC₅₀ obtidos para os compostos V22, V26 e Y em culturas 2D e 3D de células HCT116-DoxR. Os valores de IC₅₀ estão expressos como a média $\pm$ SEM de pelo menos dois ensaios independentes.

Composto	HCT116-DoxR	
	IC ₅₀ (μM) 2D	IC ₅₀ (μM) 3D
V22	0,16 $\pm$ 0,10	3,46 $\pm$ 0,20
V26	0,17 $\pm$ 0,05	3,14 $\pm$ 0,42
Y	1,26 $\pm$ 0,04	11,73 $\pm$ 0,62

Os resultados obtidos nos ensaios de MTS em culturas 3D de células HC116-DoxR indicam um claro aumento dos valores de IC₅₀ dos compostos de vanádio relativamente aos valores obtidos para as culturas 2D destas mesmas células. Os valores de IC₅₀ em modelos 3D são aproximadamente 22x, 18x e 9x superiores para os compostos V22, V26 e Y, respetivamente, relativamente aos valores obtidos para culturas 2D (**Tabela 3.3**).

O maior valor de IC₅₀ em modelos 3D relativamente a uma monocamada terá uma maior semelhança aos valores que estes compostos apresentarão *in vivo*. Desta forma, este foi um ensaio rápido para avaliar a eficácia destes compostos em modelos 3D, verificando-se, tal como em cultura 2D, uma maior citotoxicidade para os compostos V22 e V26. Apesar dos modelos 3D mimetizarem melhor os tumores *in vivo*, os restantes ensaios biológicos para determinação dos mecanismos de ação dos compostos V22, V26 e Y foram realizados em modelos 2D por uma questão de simplicidade de metodologia.

3.4. Avaliação dos mecanismos de morte celular

Após determinar quais os compostos com maior potencial terapêutico em modelos 2D/3D, foi necessário compreender qual o mecanismo de morte celular induzido por cada um deles e que estará na base da diminuição da viabilidade celular observada anteriormente (**Figura 3.1**). Desta forma, recorreu-se à técnica de citometria de fluxo com dupla marcação com Alexa[®] Fluor 488–Anexina V e IP, uma vez que este é um ensaio rápido e permite quantificar as células em apoptose e necrose.⁹⁵

3.4.1. Marcação com Alexa Fluor 488-Anexina V e IP

A apoptose é um processo de morte celular regulado que pode ser ativado caso a célula se encontre sob condições adversas. Este processo de morte celular é caracterizado por alterações morfológicas e bioquímicas particulares, como por exemplo a compactação e fragmentação da cromatina nuclear, que permitem a sua distinção de processos como a autofagia ou a necrose.^{95, 96, 97}

A anexina V é uma proteína com elevada afinidade para a fosfatidilserina, um fosfolípido presente na superfície interna da bicamada lipídica em células viáveis. No entanto, quando as células entram em apoptose, dá-se a translocação deste fosfolípido para a camada exterior da bicamada lipídica. Desta forma, a interação da anexina V com a fosfatidilserina é favorecida e a utilização de um fluoróforo conjugado com a Anexina V possibilita a identificação de células apoptóticas através de citometria de fluxo.^{95, 96}

Além disso, a utilização de IP, que se intercala com o DNA, permite a identificação de células em necrose, visto que apenas células com a membrana comprometida serão coradas devido ao elevado peso molecular do IP.^{95, 97}

Sendo a externalização da fosfatidilserina um indicador de apoptose inicial, e a perda da integridade da membrana plasmática um indicador de apoptose tardia ou necrose, este ensaio possibilita a distinção das células presentes em solução em quatro fases. É assim possível identificar células vivas (Alexa[®] Fluor 488⁻; IP⁻), células em apoptose inicial (Alexa[®] Fluor 488⁺; IP⁻), células em apoptose tardia (Alexa[®] Fluor 488⁺; IP⁺) e células em necrose (Alexa[®] Fluor 488⁻; IP⁺).^{95, 97}

Na **Figura 3.4** e na **Tabela 3.4** estão representados os resultados obtidos para os compostos V22, V26 e Y em células HCT116-DoxR. Como veículo de controlo foi utilizado 0,1% DMSO (v/v) e como controlo positivo foram utilizados dois compostos antitumorais, cisplatina (5 µM) e doxorubicina (6 µM). A concentração de Cis teve por base ensaios realizados anteriormente no laboratório, enquanto a concentração de Dox foi utilizada de acordo com dados observados em Pedrosa, P., *et al.*, (2018)⁷².

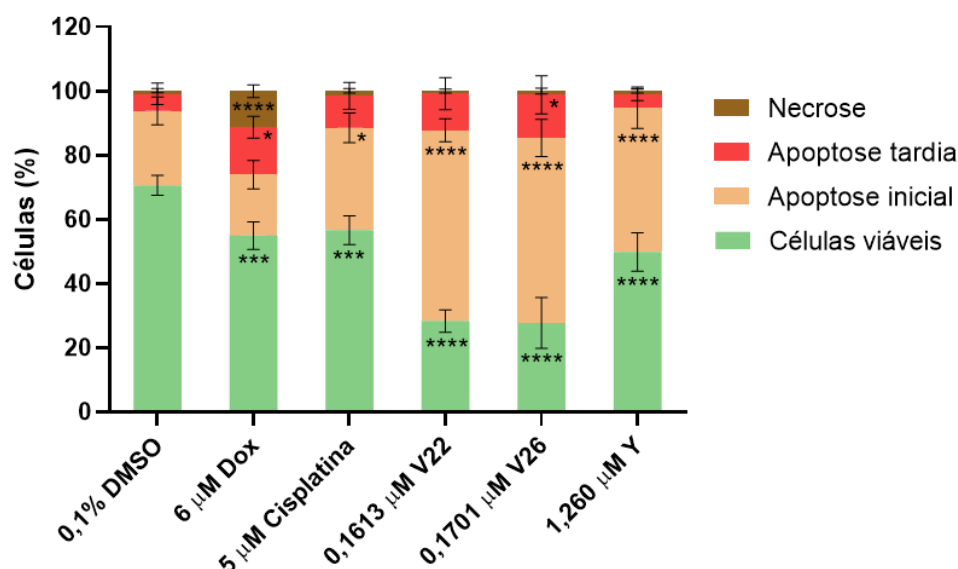


Figura 3.4 – Percentagem de células HCT116-DoxR viáveis, apoptóticas e necróticas, após exposição ao IC₅₀ dos compostos V22, V26 e Y durante 48 horas. 0,1% (v/v) DMSO foi usado como veículo de controlo, 5 µM cisplatina e 6 µM doxorubicina foram utilizadas como controlos positivos. Os dados estão expressos como a média ± SEM de dois ou mais ensaios independentes (ns=estatisticamente não significativo; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** p -value $< 0,0001$).

Tabela 3.4 – Percentagem de células HCT116-DoxR viáveis, apoptóticas e necróticas após 48 horas de exposição ao IC₅₀ dos compostos V22, V26 e Y e aos controlos cisplatina, doxorubicina e DMSO.

Composto	Células viáveis	Apoptose inicial	Apoptose tardia	Necrose
DMSO	70,6 ± 3,1	23,2 ± 4,3	5,3 ± 3,3	1,0 ± 0,6
Doxorrubicina	54,9 ± 4,3	19,0 ± 4,4	14,8 ± 3,4	11,2 ± 2,0
Cisplatina	56,6 ± 4,5	31,9 ± 4,6	10,0 ± 4,2	1,6 ± 0,7
V22	28,3 ± 3,5	59,4 ± 3,6	11,5 ± 5,0	0,8 ± 0,6
V26	27,7 ± 7,9	57,7 ± 5,8	13,4 ± 5,9	1,2 ± 0,9
Y	49,8 ± 6,0	44,8 ± 6,2	4,5 ± 2,1	0,9 ± 0,6

De acordo com a **Figura 3.4** e **Tabela 3.4** é possível observar que as células expostas aos compostos V22 e V26 apresentam uma elevada percentagem de apoptose (~70%), enquanto as células expostas ao composto Y e à cisplatina apresentam cerca de 50% e 40% de apoptose, respetivamente. Por sua vez, cerca de 70% das células expostas apenas a DMSO encontram-se viáveis, tal como esperado, enquanto 28% apresenta morte celular por apoptose e 1% por necrose (**Figura 3.4** e **Tabela 3.4**). Relativamente à doxorubicina, verifica-se que cerca de 55% das células estão viáveis, enquanto 34% morreram por apoptose e 11% por necrose (**Figura 3.4** e **Tabela 3.4**).

Ao normalizar os resultados obtidos para os compostos com os obtidos para o DMSO, obteve-se uma percentagem de células apoptóticas 2,5x superior para os compostos V22 e V26 e 1,7x superior no composto Y. Portanto, é possível afirmar que estes compostos de vanádio atuam induzindo a morte celular por apoptose, obtendo-se níveis de apoptose superiores aos dois controlos positivos (**Tabela 3.4**).

Através da análise da **Figura 3.4** e **Tabela 3.4** também se verifica que a quantidade de células em necrose foi bastante baixa em todas as condições estudadas, exceto para as células expostas à doxorrubicina (~11%), uma vez que este composto é conhecido por provocar morte celular por necrose^{66, 98}. Dado que a morte celular por necrose está associada a processos de inflamação, visto que neste processo ocorre libertação do conteúdo celular para o exterior⁴⁴, os compostos V22, V26 e Y demonstram um bom potencial terapêutico ao atuarem sobretudo por apoptose.

3.4.2. Análise da expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas por *Western Blot*

Atualmente, muitos dos fármacos utilizados em quimioterapia erradicam as células tumorais através da ativação da morte celular por apoptose, como o caso do irinotecano e do 5-FU, muito utilizados no tratamento do CRC.⁴¹ Por sua vez, a apoptose pode ser ativada pela via extrínseca ou intrínseca.

As proteínas BAX e BCL-2 fazem parte da família de proteínas BCL-2 que desempenham um papel fundamental na ativação/inibição da via intrínseca da apoptose, desencadeada pela disfunção mitocondrial. A BAX é uma proteína pró-apoptótica, dado que promove a libertação do Citocromo C da matriz mitocondrial e, conseqüentemente, auxilia a ativação de sucessivas caspases, resultando na ativação da apoptose. A BCL-2 impede a BAX de promover a libertação do Citocromo C, limitando assim a ativação da apoptose via mitocôndria, o que culmina na sobrevivência da célula.^{95, 97, 99, 100}

Quando ocorre um aumento da expressão da proteína BAX comparativamente à expressão da proteína BCL-2 é promovida a morte celular por apoptose. Por outro lado, uma maior expressão da proteína BCL-2, comparativamente aos níveis proteicos de BAX, resulta na sobrevivência da célula. Desta forma, o equilíbrio destas duas proteínas é importante na determinação do destino celular.^{95, 99, 100}

Assim sendo, a indução de apoptose pelos compostos V22 e V26 foi averiguada através da técnica de *Western Blot*, ao se analisarem os níveis de expressão das proteínas

BAX e BCL-2 e o rácio BAX/BCL-2 resultante (**Figura 3.5**). Foi ainda analisada a expressão da proteína PARP1 clivada, uma proteína que participa na reparação do DNA e que é clivada por caspases durante o processo de morte celular por apoptose^{101, 102}.

A determinação dos níveis de apoptose por *Western Blot* não foi realizada para o composto Y, uma vez que, dada a maior dificuldade da técnica, esta se aplicou apenas aos compostos que tinham demonstrado um maior índice de seletividade nos resultados de viabilidade celular (Secção 3.2: **Figura 3.1**, **Figura 3.2** e **Tabela 3.1** – compostos V22 e V26).

Os resultados de *Western Blot* para os compostos V22, V26 e para o controlo de 0,1% DMSO encontram-se no Anexo A.7.

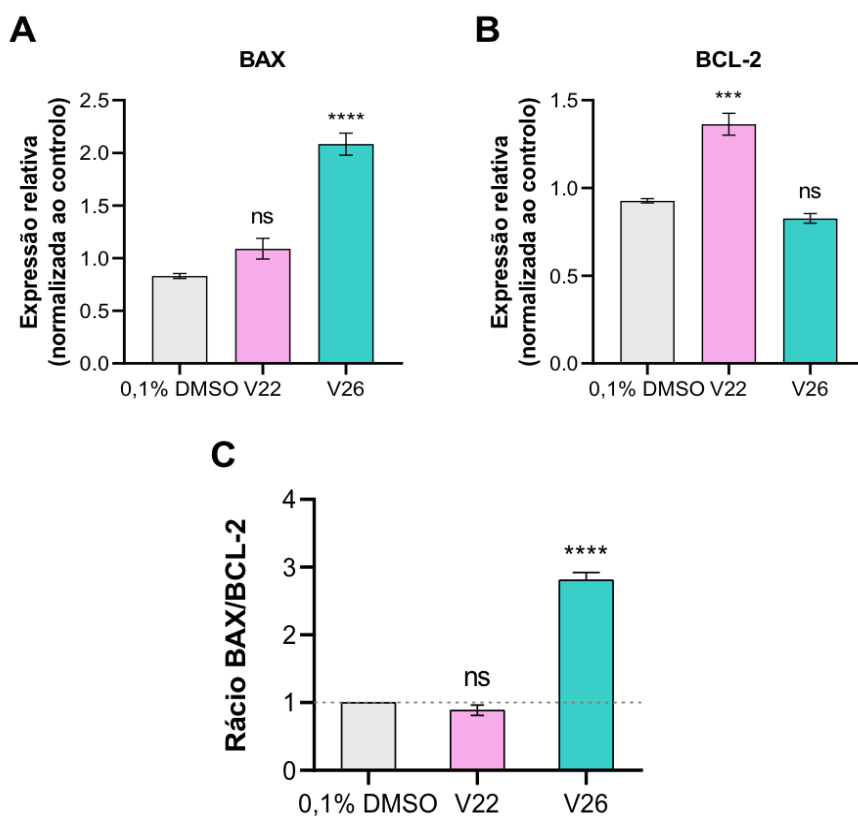


Figura 3.5 – Níveis de expressão relativa das proteínas BAX (**A**) e BCL-2 (**B**) em células HCT116-DoxR após exposição ao IC₅₀ dos compostos V22 e V26 ou a 0,1% DMSO, durante 48 horas. Os níveis de expressão de cada proteína foram normalizados relativamente a um controlo com β -actina. **C**) Rácio BAX/BCL-2. Os resultados foram normalizados relativamente ao controlo (0,1% DMSO) após uma primeira normalização com β -actina. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM (ns=estatisticamente não significativo; *** $p < 0,001$; **** p -value $< 0,0001$).

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 3.5 – A**) e **B**), observa-se um aumento da expressão das proteínas BAX e BCL-2 aquando da exposição das células

HCT116-DoxR ao composto V22, comparativamente aos níveis destas proteínas apresentados pelo controlo. No entanto, apesar de se verificar um aumento da expressão de ambas as proteínas nas células expostas ao composto V22, é de salientar que o nível de expressão da proteína BCL-2 é superior ao nível da proteína BAX. Por outro lado, nas células expostas ao composto V26, verificou-se um grande aumento da expressão da proteína BAX e uma diminuição da expressão da proteína BCL-2 comparativamente aos níveis de expressão destas proteínas observados no controlo de DMSO (**Figura 3.5**).

Observando os rácios BAX/BCL-2 presentes na **Figura 3.5 – C**), é possível verificar que o composto V26 exibe um rácio superior a 1, de aproximadamente 3x superior ao controlo, contrariamente ao composto V22, que apresenta um rácio BAX/BCL-2 próximo de 1. Estes resultados permitem indicar que o composto V26 induz a ativação da via intrínseca da apoptose em células HCT116-DoxR, enquanto o composto V22 parece não induzir a apoptose através da via mitocondrial, o que leva à possibilidade de este induzir a via apoptótica extrínseca.

Como referido anteriormente, também foram analisados os níveis de expressão da proteína PARP1 clivada (**Figura 3.6**) nas células HCT116-DoxR expostas aos compostos V22 e V26 e ao controlo de 0,1% DMSO. As bandas de expressão da proteína PARP1 obtidas para os compostos V22, V26 e para o controlo encontram-se no Anexo **A.7**.

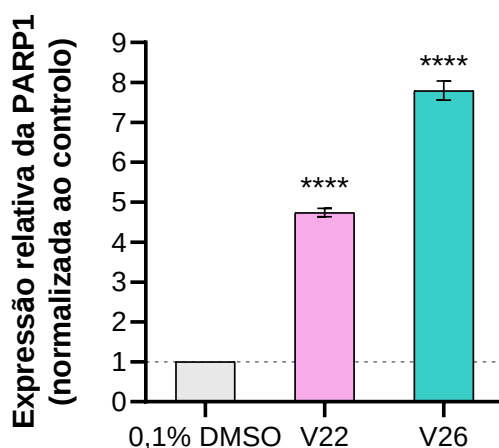


Figura 3.6 – Níveis de expressão relativa da proteína PARP1 clivada em células HCT116-DoxR após exposição ao IC₅₀ dos compostos V22 e V26 ou a 0,1% DMSO, durante 48 horas. Os resultados foram normalizados relativamente ao controlo (0,1% DMSO) após uma primeira normalização com β -actina. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM (**** p -value < 0,0001).

Os resultados obtidos na **Figura 3.6** demonstram um aumento dos níveis de expressão da proteína PARP1 nas células HCT116-DoxR expostas aos compostos V22 e V26 de cerca de 5x e 8x, respetivamente, face ao controlo de 0,1% DMSO. Estes dados

confirmam os resultados observados na **Figura 3.4** da Secção 3.4.1 (**Marcação com Alexa Fluor 488-Anexina V e IP**) e a indução de apoptose com a ativação das caspases efetoras do processo. É de salientar que este aumento da expressão da PARP1 é mais significativo para as células HCT116-DoxR expostas ao composto V26 comparativamente ao composto V22, o que vai ao encontro dos resultados apresentados na **Figura 3.4** da Secção 3.4.1.

Para confirmar que o composto V26 atua pela via intrínseca da apoptose e que o composto V22 não atua segundo esta via, também foi realizado um ensaio de deteção da alteração do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo.

3.4.3. Alteração do potencial de membrana mitocondrial

A alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi M$) é um parâmetro frequentemente utilizado como indicador do estado funcional das células¹⁰³, uma vez que a mitocôndria desempenha um papel intermediário fundamental na ocorrência da morte celular por apoptose¹⁰⁴.

Sabe-se que a maior parte da síntese de ATP nas células eucarióticas ocorre na mitocôndria através da fosforilação oxidativa. Ora, este processo consiste no transporte de eletrões entre dadores e aceptadores de eletrões através de uma série de reações redox, gerando-se assim um gradiente eletroquímico, que por sua vez impulsiona a síntese de ATP e gera a formação do potencial de membrana mitocondrial.¹⁰⁵

No entanto, em casos de exposição da célula a compostos que apresentem alguma citotoxicidade, pode ocorrer a alteração da permeabilidade mitocondrial, através da perturbação de macromoléculas localizadas na mitocôndria e, fatores como o Citocromo C, fator indutor da apoptose e procaspases, podem ser libertados para o citosol, resultando na indução da apoptose. Nestes casos, ocorre uma perda do gradiente eletroquímico e consequente alteração do potencial mitocondrial.^{103, 104, 105}

Desta forma, o estudo da alteração do $\Delta\Psi M$ é importante para compreender o estado funcional da mitocôndria e averiguar a possibilidade da morte celular pela via intrínseca da apoptose. Para tal, foi realizado um ensaio de citometria associado a uma sonda fluorescente, o marcador catiónico JC-1 (iodeto de 5,5,6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina), que permite a avaliação do comportamento mitocondrial, indicando se a membrana da mitocôndria se encontra hiperpolarizada ou despolarizada.^{104, 105}

Este ensaio consiste na capacidade do marcador JC-1 entrar na mitocôndria e mudar as suas propriedades fluorescentes de acordo com a agregação da própria sonda. Em células saudáveis, em que a mitocôndria se encontra polarizada, a sonda JC-1 irá acumular-se no seu interior e formar complexos conhecidos como J-agregados, que emitem uma intensa fluorescência vermelha na zona dos 590 nm. No entanto, em células com alterações do $\Delta\Psi_M$, em que a mitocôndria se encontra despolarizada, JC-1 não consegue permanecer na mitocôndria e sai para o citoplasma, acumulando na forma monomérica e emitindo fluorescência verde com um máximo de absorvância na zona dos 530 nm. Assim, alterações do $\Delta\Psi_M$ são refletidas pelo nível de agregação da sonda e através da técnica de citometria de fluxo podem ser determinados os valores de intensidade das fluorescências vermelha e verde. Por fim, a razão das intensidades de fluorescência vermelha/verde pode ser utilizada para indicar a polarização ou a despolarização da membrana mitocondrial (Figura 3.7).^{103, 104}

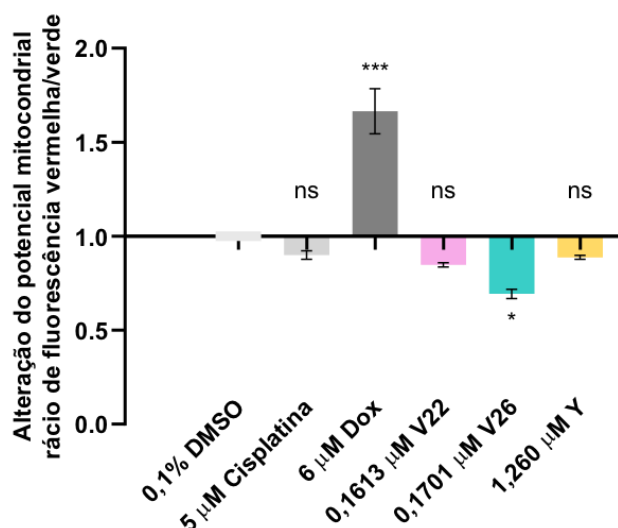


Figura 3.7 – Alteração do potencial mitocondrial de células HCT116-DoxR após exposição ao IC₅₀ dos compostos V22, V26 e Y, durante 48 horas. 0,1% (v/v) DMSO foi usado como veículo de controlo, 5 µM cisplatina e 6 µM doxorubicina foram utilizadas como controlos positivos. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM de dois ou mais ensaios independentes (ns=estatisticamente não significativo; * p <0,05; *** p <0,001).

Os resultados apresentados na **Figura 3.7** demonstram que os três compostos V22, V26 e Y induzem a alteração do potencial mitocondrial, encontrando-se a membrana da mitocôndria num estado despolarizado. No entanto, apenas a despolarização da membrana mitocondrial provocada pelo composto V26 é estatisticamente significativa, comparativamente ao controlo de 0,1% (v/v) DMSO, apresentando este composto um rácio de intensidade de fluorescência vermelha/verde de aproximadamente 0,69 (**Figura 3.7**).

Assim, tal como esperado no caso da exposição das células ao composto V26, ocorre a alteração do potencial e da permeabilidade da membrana mitocondrial, o que resulta na libertação de proteínas, como o Citocromo C, para o citosol, e na ativação da via intrínseca da apoptose tal como descrito na **Figura 3.5** da Secção 3.4.2. Estas proteínas pró-apoptóticas vão participar na ativação de cascatas de caspases com posterior clivagem das moléculas alvo, tal como a PARP1, que estão associadas ao processo de morte celular por apoptose (**Figura 3.6** – Secção 3.4.2).^{46, 104}

Por outro lado, os dados relativos aos compostos V22 e Y sugerem que estes compostos não promovem a morte celular através da ação da BAX/BCL-2, como já se tinha verificado na **Figura 3.5** da Secção 3.4.2 (para o composto V22). Uma vez que nas secções 3.4.1 e 3.4.2 (**Figura 3.4** e **Figura 3.6**, respetivamente), estes compostos apresentaram a indução de apoptose, pode estar aqui envolvida uma via alternativa de apoptose, nomeadamente a via extrínseca⁵¹, que poderá ir ao encontro da ligeira alteração do potencial de membrana mitocondrial (**Figura 3.7**). A via extrínseca da apoptose é ativada por sinais recebidos por recetores de morte presentes na membrana da célula que ativam depois a caspase-8 e -10.⁴⁶

Desta forma, para confirmar a possibilidade de os compostos V22 e Y atuarem segundo a via extrínseca da apoptose, poder-se-ia avaliar a atividade da caspase-8 depois da exposição das células a estes compostos.⁴⁶

3.4.4. Caspase-8

Dado que a caspase-8 é uma caspase iniciadora da via apoptótica extrínseca, avaliou-se a sua atividade depois das células HCT116-DoxR serem expostas ao composto V22.

Assim, utilizou-se o substrato cromogénico IETD-*pNA*, resultante da conjugação entre o péptido IETD (Ile-Glu-Thr-Asp) e o cromóforo *p-nitroanilide* (*pNA*), que ao ser clivado pela caspase-8 liberta o *pNA*, que pode ser detetado pela medição da absorvância a 400 nm.¹⁰⁶ Caso o composto V22 provoque morte celular através da via apoptótica extrínseca, é suposto ocorrer um aumento da absorvância a 400 nm relativamente à amostra controlo, o que corresponderá a um aumento da atividade da caspase-8 que é traduzida na clivagem do substrato IETD-*pNA*.

Os resultados obtidos neste ensaio estão representados na **Figura 3.8**.

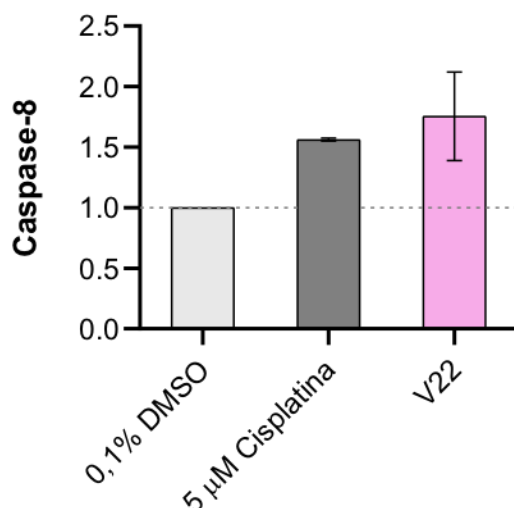


Figura 3.8 – Atividade da caspase-8 após exposição das células HCT116-DoxR ao IC₅₀ do composto V22 durante 48 horas. 0,1% (v/v) DMSO foi utilizado como veículo de controlo e 5 µM Cisplatina como controlo positivo. Os resultados foram normalizados relativamente ao controlo (0,1% DMSO).

De acordo com os resultados obtidos na **Figura 3.8**, é possível verificar que as células HCT116-DoxR quando expostas ao composto V22 apresentam um nível de caspase-8 superior ao nível apresentado depois da exposição a 0,1% DMSO. No seguimento dos resultados obtidos anteriormente nas secções **3.4.1**, **3.4.2** e **3.4.3**, estes dados vêm confirmar que o composto V22 provoca a morte celular através da via extrínseca da apoptose.

No entanto, dado que só foram realizados duplicados, seria necessário repetir este ensaio de modo a confirmar os resultados e obter um valor mais preciso para a atividade da caspase-8 nas células HCT116-DoxR.

3.4.5. Autofagia

Para além da análise de morte celular por apoptose e necrose já referidas anteriormente, também se procedeu à análise de indução de morte celular por autofagia pelos compostos V22, V26 e Y.

A autofagia é um processo catabólico ativado face a condições adversas, como privação de nutrientes e hipoxia, de forma a restaurar a homeostasia celular.⁵¹ Por sua vez, a exposição celular aos compostos de vanádio pode ser suficiente para desencadear este processo de morte celular.

Para verificar a atividade autofágica das células HCT116-DoxR depois da sua exposição aos compostos de vanádio em estudo, foi realizado um ensaio de citometria de fluxo em que se utilizou uma sonda fluorescente ("*Green Stain Solution 1x*") com a capacidade de marcar vacúolos autofágicos ao emitir fluorescência na região dos 488 nm.⁸⁶

Os resultados obtidos estão representados na **Figura 3.9**. Adicionalmente, como controlo positivo, foi utilizada uma solução de 1500 nM Rapamicina, um indutor de autofagia.⁸⁶ A concentração de Rapamicina foi otimizada para a linha celular em estudo.

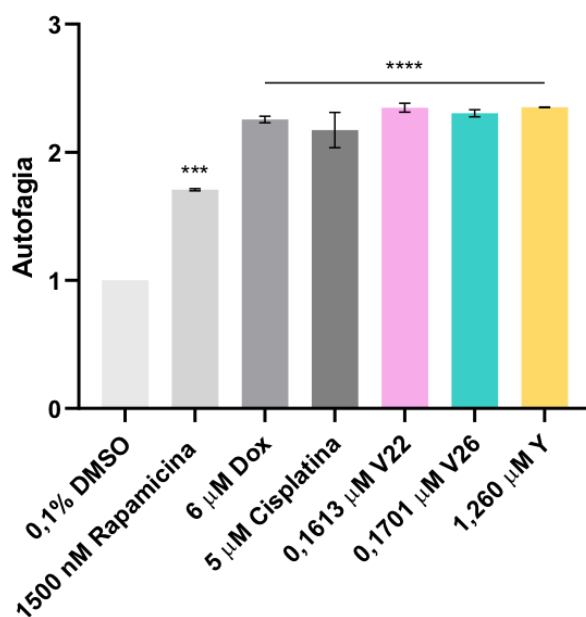


Figura 3.9 – Indução de autofagia em células HCT116-DoxR após exposição ao IC₅₀ dos compostos V22, V26 e Y, durante 48 horas. 0,1% (v/v) DMSO foi utilizado como veículo de controlo, enquanto 5 µM Cis, 6 µM Dox e 1500 nM Rapamicina foram utilizadas como controlos positivos. Os dados estão expressos como a média ± SEM de dois ou mais ensaios independentes (***) $p < 0,001$; ****) $p < 0,0001$).

Analisando os resultados representados na **Figura 3.9**, é possível verificar que todos os compostos de vanádio analisados (V22, V26 e Y) induzem o processo de autofagia nas células HCT116-DoxR. Comparando estes resultados com o controlo negativo de 0,1% DMSO, é de salientar que todos os compostos de vanádio induzem a via de autofagia em cerca de 2,3x mais do que o controlo.

De acordo com estes e com todos os resultados obtidos anteriormente nas secções 3.4.1 (**Figura 3.4**), 3.4.2 (**Figura 3.5** e **Figura 3.6**), 3.4.3 (**Figura 3.7**) e 3.4.4 (**Figura 3.8**) é possível chegar a algumas conclusões:

- O composto V26 induz a morte das células HCT116-DoxR através dos processos de autofagia e apoptose. A via de apoptose segundo a qual este composto atua é a via intrínseca.
- O composto V22 atua segundo a ativação dos processos de apoptose, pela via extrínseca, e autofagia.
- O composto Y também atua segundo os processos de autofagia e apoptose (**Figura 3.9** e **Figura 3.4**, respetivamente). No entanto, uma vez que não se realizou *Western Blot*, não é possível afirmar se este composto segue a via intrínseca ou extrínseca da apoptose. Apesar de no ensaio de alteração do potencial mitocondrial se observar uma ligeira despolarização da mitocôndria (**Figura 3.7**) e esta não ser estatisticamente significativa, poder-se-ia realizar a técnica de *Western Blot* para verificar os níveis de expressão das proteínas BAX, BCL-2 e PARP1.

3.4.6. Produção de espécies reativas de oxigénio

As ROS são constantemente produzidas nas células a uma taxa controlada, atuando como moléculas sinalizadoras em vários processos fisiológicos, como a divisão celular, inflamação, morte celular, etc. Estas espécies consistem em radicais livres derivados do oxigénio, O_2 , como o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo ($OH^{\cdot}$), entre outros, e a sua proveniência pode ser endógena ou exógena.^{51, 107}

Endogenamente, as ROS são principalmente produzidas na mitocôndria, como consequência da respiração aeróbia. Exogenamente, estas moléculas surgem da exposição à poluição, radiação, xenobióticos, tabaco e álcool.¹⁰⁷

Normalmente os níveis destas moléculas são contrabalançados por sistemas antioxidantes endógenos, no entanto, níveis excessivamente elevados podem causar stress oxidativo e consequente oxidação de lípidos, DNA e proteínas, podendo originar a interrupção da função celular e a ativação de processos de morte celular programada, como a autofagia e a apoptose.^{46, 107, 108}

Deste modo, procedeu-se à quantificação do nível de ROS presente nas células HCT116-DoxR depois da sua exposição aos compostos de vanádio em estudo, de forma a compreender a influência que estes compostos podem ter na produção destas espécies oxidantes.

Para tal, foi utilizada a sonda 2',7'-diacetato de diclorohidrofluoresceína (H₂DCF-DA), que difunde nas células e é deacetilada por esterases celulares, originando uma molécula não fluorescente. Dentro da célula, essa molécula é oxidada por ROS e origina então a molécula fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) que emite na região dos 530 nm e pode ser detetada por citometria de fluxo.¹⁰⁹

Na **Figura 3.10** estão representados os resultados obtidos no ensaio de deteção de ROS para os três compostos de vanádio avaliados. Como controlo positivo foi utilizada uma solução de 42 µM TBHP, que corresponde ao seu valor de IC₅₀ para a linha tumoral HCT116-DoxR, já determinado anteriormente (Anexo A.8).

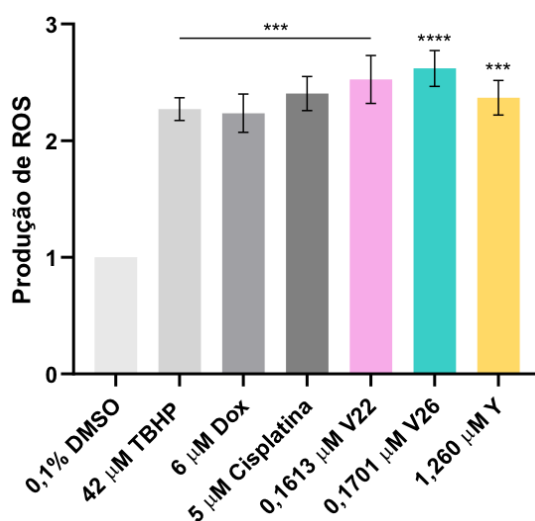


Figura 3.10 – Produção de ROS em células HCT116-DoxR após 48 horas de exposição ao IC₅₀ dos compostos V22, V26 e Y. 0,1% (v/v) DMSO foi utilizado como veículo de controlo e 42 µM TBHP, 5 µM cisplatina e 6 µM doxorrubicina como controlos positivos. Os dados estão expressos como a média ± SEM de dois ou mais ensaios independentes (***) $p < 0,001$; ****) $p\text{-value} < 0,0001$).

De acordo com os resultados observados na **Figura 3.10**, verifica-se que os três compostos de vanádio (V22, V26 e Y) induziram a produção de ROS nas células HCT116-DoxR, tendo-se obtido valores 2,5x, 2,6x e 2,4x respetivamente, superiores aos valores do controlo de DMSO. Interessantemente, nas amostras celulares expostas aos três compostos de vanádio também se verifica uma maior produção de ROS relativamente ao controlo positivo, TBHP. A Dox e a Cis também apresentam um elevado nível de produção de ROS, no entanto, os valores obtidos são ligeiramente inferiores aos valores obtidos na presença dos compostos de vanádio.

A elevada produção de ROS pelas células HCT116-DoxR depois da sua exposição aos compostos de vanádio pode levar à indução de stress oxidativo com alterações na mitocôndria que resultem na disrupção do $\Delta\Psi$ e, consequentemente, na ativação da

morte celular por apoptose e/ou autofagia^{51, 107, 110}, como verificado anteriormente, nas secções 3.4.1 (Figura 3.4) e 3.4.5 (Figura 3.9). No seu conjunto, estes resultados estão em concordância com os resultados anteriores, uma vez que os três compostos apresentam indução de produção de ROS e de morte celular por apoptose e autofagia.

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 3.10**, também se verifica uma maior indução de produção de ROS pelo composto V26. Estes resultados vão de encontro aos resultados da **Figura 3.4** e da **Figura 3.7**, onde se demonstrou que este composto induzia bastante apoptose e atuava segundo a via intrínseca da mesma. A via intrínseca da apoptose pode ser desencadeada por stress celular, o qual pode ocorrer devido à acumulação de ROS no interior da célula^{46, 107}. Desta forma, a produção de ROS pelas células HCT116-DoxR aquando da sua exposição ao composto V26 resulta num aumento do stress oxidativo sentido pelas mesmas e poderá originar uma alteração do potencial e da permeabilidade da membrana mitocondrial, o que pode causar a libertação de moléculas pró-apoptóticas para o citosol e a consequente ativação da apoptose via mitocôndria.

3.5. Internalização celular dos compostos pelo método de ICP-AES

De forma a avaliar a internalização dos compostos de vanádio V22, V26 e Y pelas células HCT116-DoxR, recorreu-se à técnica de ICP-AES, a qual permite avaliar quantitativamente o metal presente em cada amostra e, portanto, analisar se os compostos em estudo são de facto internalizados pelas células e em que quantidade essa internalização ocorre.¹¹¹

Deste modo, foi possível verificar a quantidade de vanádio internalizado pelas células HCT116-DoxR após 3 horas de exposição a 10x IC₅₀ dos compostos de vanádio em estudo, tendo-se observado que enquanto os compostos V22 e V26 tiveram valores de internalização de aproximadamente 100%, o composto Y internalizou cerca de 53,2% nas células. Tais resultados indicam que os três compostos (V22, V26 e Y) foram internalizados pelas células HCT116-DoxR, tendo-se verificado uma maior internalização dos compostos V22 e V26 em relação ao composto Y, o que vai ao encontro dos resultados de viabilidade e a um valor de IC₅₀ mais baixo para os compostos V22 e V26 comparativamente ao composto Y (**Figura 3.1** e **Tabela 3.1**).

3.6. Progressão do ciclo celular

O ciclo celular corresponde a um conjunto de eventos responsáveis pelo crescimento e divisão celular. Ao longo de todo o ciclo celular existem *checkpoints* que permitem controlar e garantir que a divisão celular só ocorre na presença de condições favoráveis. Por sua vez, a citotoxicidade de compostos metálicos pode estar associada a danos no DNA que podem ativar estes *checkpoints* e resultar na paragem do ciclo celular. Caso o dano não seja reparado, pode ocorrer a morte da célula.^{9, 41}

Assim, na tentativa de verificar o potencial citostático dos compostos de vanádio, foi avaliada a sua interferência na progressão do ciclo celular. Para tal, procedeu-se à quantificação do conteúdo de DNA em cada fase do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) por citometria de fluxo. Utilizou-se IP, um marcador que possui a capacidade de se intercalar com o DNA e que emite fluorescência na região dos 488 nm. Desta forma, quanto maior a quantidade de DNA, maior a fluorescência emitida pelo IP. Uma vez que a quantidade de DNA duplica entre as fases G1 e G2, a intensidade de fluorescência emitida pelo IP também duplicará.^{112, 113}

Neste ensaio, utilizou-se uma solução de timidina que permite bloquear as células na fase S do ciclo celular. Assim, realizou-se um duplo bloqueio das mesmas, com o objetivo de garantir que todas as células se encontravam na mesma fase do ciclo celular antes da sua exposição aos compostos metálicos.^{112, 113} Foram estudados os efeitos dos compostos V22 e V26 na progressão do ciclo celular 3, 9, 24 e 32 horas depois da exposição das células ao IC₅₀ dos compostos (**Figura 3.11**).

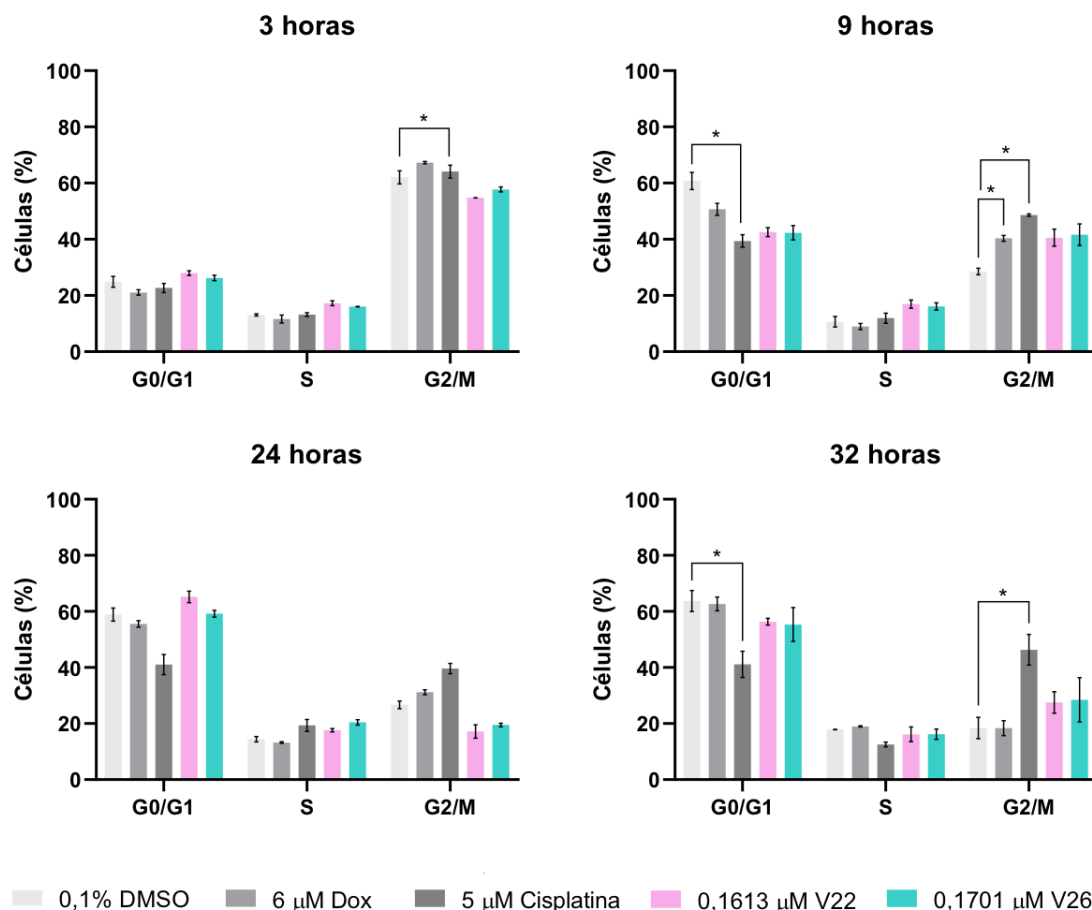


Figura 3.11 – Progressão do ciclo celular em células HCT116-DoxR após 3, 9, 24 e 32 horas de exposição ao IC₅₀ dos compostos V22 e V26, e a 5 μM cisplatina e 6 μM doxorrubicina. 0,1% (v/v) DMSO foi utilizado como veículo de controle. Os dados estão expressos como a média ± SEM de pelo menos dois ensaios independentes (ns=estatisticamente não significativo; * $p < 0,05$).

Depois de analisar a **Figura 3.11**, verifica-se que apenas ocorreu interferência na progressão do ciclo celular depois das células HCT116-DoxR serem expostas a 5 μM cisplatina, o que já seria de esperar uma vez que a cisplatina é um composto citostático.⁶¹ Tal é confirmado pela quantidade de células presente nas fases G0/G1 e G2/M na amostra de controlo (0,1% DMSO) face à amostra contendo cisplatina, às 9, 24 e 32 horas do ensaio.

Apesar de ser esperado que a Dox provocasse uma paragem do ciclo celular na fase G2/M¹¹⁴, o que também já foi verificado em dados obtidos no laboratório por Catarina Rodrigues e Beatriz Carvalho¹¹⁵ na linha tumoral A2780, tal não se verificou na exposição das células HCT116-DoxR a 6 μM Dox. Estes resultados podem ser consequência da linha celular utilizada ser resistente à Doxorrubicina e da concentração de Dox utilizada não ser suficiente para interferir com a progressão do ciclo celular, uma vez que já foi verificado, no laboratório por Catarina Rodrigues (resultados ainda não

publicados), que a exposição de células HCT116-DoxR a 12 μ M de Dox provocava a paragem do ciclo celular na fase G2/M.

Por outro lado, não parece ter ocorrido nenhuma paragem ao longo do ciclo celular nas células expostas aos compostos V22 e V26 na concentração estudada (IC₅₀), o que demonstra que estes compostos não são citostáticos nesta concentração.

3.7. Metastização e angiogénese

Existe uma grande necessidade de se descobrirem novos fármacos que apresentem um bom potencial anti-metastático, uma vez que a metastização é a principal causa de morte por cancro.¹¹⁶ Para tal, são necessários ensaios *in vitro* apropriados para identificar fármacos que inibam a migração celular, uma característica do potencial metastático das células cancerígenas.¹¹⁷ Um dos ensaios de migração mais conhecidos é o ensaio de cicatrização de feridas, ou “Wound healing assay”, que permite estudar o movimento celular *in vitro* e determinar se o fármaco em estudo tem potencial anti-metastático.^{117, 118} Embora este ensaio não reproduza a complexidade observada *in vivo* na totalidade, o baixo custo e o fácil e rápido procedimento experimental tornaram-no bastante atrativo.¹¹⁹

Por outro lado, a formação de novos vasos sanguíneos (angiogénese) ao redor do tumor é determinante para o seu desenvolvimento, uma vez que um aumento da angiogénese possibilita a nutrição das células cancerígenas e a invasão dos tecidos adjacentes pelo tumor.^{118, 119, 120} Portanto, um dos principais objetivos do tratamento do cancro é impedir que ocorra o excesso de angiogénese, uma vez que se pretende evitar o desenvolvimento e a formação de metástases pelo tumor. Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos com potencial anti-angiogénico representa uma abordagem chave para melhorar o tratamento do cancro.¹¹⁷

Para tal, foi avaliado o papel dos compostos de vanádio no processo de angiogénese através do ensaio *ex-ovo* CAM. A CAM é uma membrana extraembrionária da galinha e é frequentemente utilizada para o estudo da angiogénese *in vivo*, devido a possuir uma alta densidade de vasos sanguíneos e linfáticos.¹²¹

3.7.1. Ensaio de migração celular

No ensaio de migração celular é gerada uma região sem células, a qual é exposta aos compostos em estudo, e ao longo de 24 horas é analisada a migração celular que se baseia na capacidade das células proliferarem e voltarem a preencher a lacuna formada anteriormente.¹¹⁷

Os resultados obtidos no ensaio de migração celular encontram-se na **Figura 3.12**. Como veículo de controlo foi utilizado 0,1% DMSO (v/v).

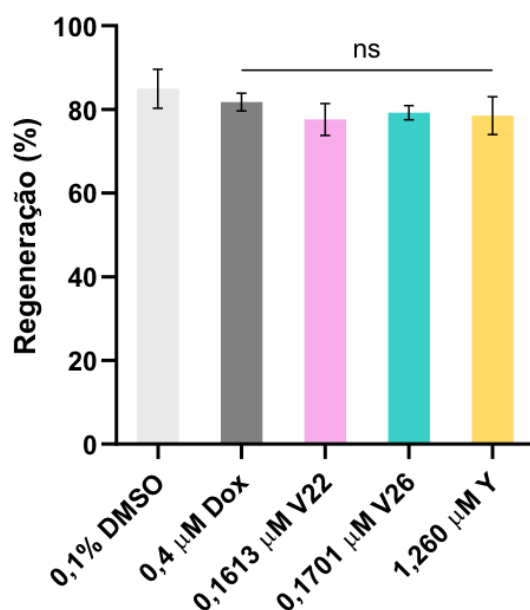


Figura 3.12 – Migração celular de fibroblastos após 24 horas de exposição ao IC₅₀ dos compostos V22, V26 e Y, ou a 0,4 µM Dox. 0,1% (v/v) DMSO foi utilizado como veículo de controlo. Os dados estão expressos como a média ± SEM de dois ou mais ensaios independentes (ns=estatisticamente não significativo).

De acordo com a **Figura 3.12**, verifica-se que todos os compostos induziram uma percentagem de remissão da ferida ligeiramente inferior à apresentada pelo controlo, não se revelando estes valores estatisticamente significativos. Pode-se assim afirmar que estes três compostos não possuem potencial anti-metastático na sua concentração de IC₅₀. No entanto, o facto de não potenciarem a metastização pode ser encarado como um fator positivo.

Poder-se-ia investigar se a terapêutica combinada destes compostos alterava alguma das suas propriedades, como o caso do seu potencial anti-metastático.¹¹⁷

3.7.2. Ensaio *ex-ovo* CAM

O ensaio *ex-ovo* CAM consiste na análise de certas zonas vascularizadas da membrana corioalantóica de um embrião de galinha. Inicialmente colocam-se o-rings cobrindo zonas vascularizadas da membrana e expõem-se essas regiões aos compostos requeridos. São depois tiradas fotos às 0, 24 e 48 horas após a exposição aos compostos em estudo e é contado e comparado o número de vasos sanguíneos existentes a cada hora.

Os resultados obtidos para o ensaio *ex-ovo* CAM encontram-se na **Figura 3.13**.

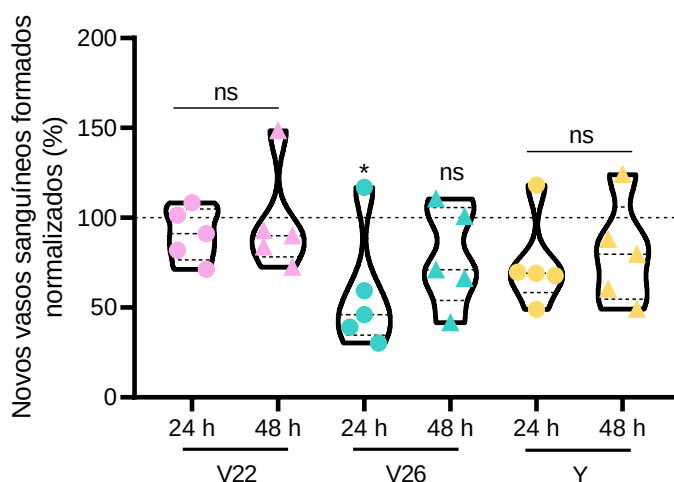


Figura 3.13 - Formação de novos vasos sanguíneos após exposição do embrião de galinha ao IC₅₀ dos compostos V22, V26 e Y, durante 24 e 48 horas. Os valores representados foram normalizados ao número de veias terciárias obtidas após exposição ao controlo (0,1% DMSO) e ao número de veias terciárias obtidas no o-ring correspondente, às 0h de incubação no mesmo embrião. O valor de 100% refere-se à amostra de 0,1% (v/v) DMSO em PBS 1x. Rosa – V22; Verde – V26; Amarelo – Y; Símbolos: Bolas – 24 horas; Triângulos – 48 horas. ns=estatisticamente não significativo; * $p < 0,05$.

Com base na **Figura 3.13**, verifica-se que apenas o composto V26 parece ter algum potencial anti-angiogénico após as 24 horas de exposição. No entanto, às 48 horas de exposição do embrião de galinha ao composto V26, a percentagem de novos vasos sanguíneos formados aumenta e o potencial anti-angiogénico já não se verifica.

Os resultados obtidos às 48 horas indicam que os compostos V22, V26 e Y não interferem na formação de novos vasos sanguíneos, não demonstrando potencial anti-/pró-angiogénico na sua concentração de IC₅₀. Não obstante, a incubação por 24 horas com o composto V26 parece ser promissora em termos de efeitos anti-angiogénicos.

Adicionalmente, verificou-se que a exposição de 48 horas à concentração de IC₅₀ dos compostos de vanádio em estudo não apresentou toxicidade para os embriões, dado a sua sobrevivência durante todo o período do ensaio.

4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

O cancro corresponde a um conjunto de doenças caracterizado pela proliferação descontrolada de células anormais que resultam na formação de uma massa tumoral, podendo eventualmente invadir outros locais do organismo para além do local do tumor primário. O número de novos casos de cancro tem vindo a aumentar, principalmente devido ao crescimento e envelhecimento populacional, sendo que no ano de 2020, o cancro colorretal foi o cancro com a maior taxa de incidência em Portugal.

Ao longo dos últimos anos têm surgido avanços nas áreas da investigação e da medicina, o que tem culminado em melhores terapêuticas e num maior número de diagnósticos precoces. Desde a descoberta da cisplatina em 1965 que se têm utilizado inúmeros compostos com centro metálico na área da quimioterapia, tendo estes contribuído para uma melhoria no tempo de sobrevida e de sobrevivência ao cancro, no entanto também têm surgido algumas adversidades. Um dos maiores problemas associados à utilização destes compostos é a sua baixa especificidade para células tumorais, o que culmina em efeitos adversos para o doente e na impossibilidade de submeter estes doentes a elevadas doses de quimioterapia de forma a erradicar de vez o tumor. Outro problema consiste na resistência à quimioterapia, dado que as células tumorais conseguem encontrar formas de escape a este tipo de tratamento. Com isto, tem-se verificado uma necessidade cada vez maior de encontrar novos compostos que possam contornar estes obstáculos.

Este trabalho foi assim realizado no âmbito de estudar o potencial antiproliferativo de novos complexos com centro metálico de Vanádio (IV) em linhas celulares de carcinoma colorretal sensível (HCT116) e resistente à doxorubicina (HCT116-DoxR), carcinoma de ovário (A2780) e ainda em fibroblastos humanos.

Desta forma, foram realizados ensaios de citotoxicidade que demonstraram um elevado potencial citotóxico dos compostos V22, V26 e Y principalmente na linha de carcinoma colorretal resistente à doxorubicina. Os valores de IC_{50} destes compostos em células HCT116-DoxR foram assim de 0,1613 μ M, 0,1701 μ M e 1,260 μ M, respetivamente. A citotoxicidade dos compostos de vanádio também foi analisada em células não tumorais (fibroblastos), onde se verificou que os compostos mencionados V22, V26 e Y eram cerca de 19x, 24x e 7x mais seletivos para células HCT116-DoxR do que para células não tumorais. Assim, de todos os compostos testados, em todas as linhas celulares testadas, escolheram-se estes três compostos para prosseguir com os restantes estudos

biológicos, e neste caso em células HCT116-DoxR, dada a sua relevância clínica - linhagem multirresistente à doxorrubicina.

Com o objetivo de comparar o potencial antiproliferativo dos compostos V22, V26 e Y em culturas celulares 2D e 3D, também foram realizados ensaios de citotoxicidade em esferoides de células HCT116-DoxR. O composto que demonstrou um maior potencial citotóxico foi o composto V26 ($IC_{50}=3,14 \mu M$), seguido pelo composto V22 ($IC_{50}=3,46 \mu M$) e, por fim, pelo composto Y ($IC_{50}=11,73 \mu M$), sendo estes valores de cerca de 22x, 18x e 9x, respetivamente, superiores relativamente aos valores de IC_{50} destes compostos em culturas celulares 2D. A utilização de culturas 3D de esferoides teve como objetivo mimetizar com uma maior semelhança os tumores *in vivo* e, portanto, inferir de uma forma mais fidedigna a concentração que induz a perda de viabilidade celular num sistema 3D.

Foi também avaliada a internalização celular destes compostos de vanádio pelo método de ICP-AES, onde se verificaram valores de internalização pelas células HCT116-DoxR de cerca de 100% para os compostos V22 e V26, e de 53,2% para o composto Y. Estes resultados demonstraram que o valor de internalização do composto pelas células HCT116-DoxR poderia estar correlacionado com os resultados de viabilidade celular, onde uma menor internalização estaria associada a um valor de IC_{50} superior (composto Y) e uma maior internalização estaria associada a um menor valor de IC_{50} (composto V22 e V26).

Depois de se determinarem quais os compostos com maior potencial citotóxico, procedeu-se à avaliação dos mecanismos que levaram à perda de viabilidade celular, analisando-se inicialmente o potencial apoptótico destes complexos através do ensaio de dupla marcação com Alexa[®] Fluor 488-Anexina V e Iodeto de Propídio. Este ensaio permitiu averiguar que os compostos V22, V26 e Y induzem um aumento das células apoptóticas em solução face ao controlo negativo (DMSO), revelando que estes três complexos atuam assim segundo a via de morte celular por apoptose. De modo a analisar qual a via apoptótica (intrínseca ou extrínseca) envolvida na morte celular causada por estes complexos, analisou-se a expressão de proteínas anti- e pró-apoptóticas como a BCL-2, BAX e PARP1, onde se observou que o composto V22 incitava uma diminuição do rácio BAX/BCL-2 relativamente ao controlo, e o composto V26 induzia um aumento deste rácio. Para além disso, verificou-se ainda um elevado nível de expressão da proteína PARP1 nas amostras de células HCT116-DoxR expostas a ambos estes compostos. Tais observações serviram assim para concluir que o composto V26

induz a apoptose através da via intrínseca, enquanto o complexo V22 muito provavelmente atua segundo a via apoptótica extrínseca, dado que este exibiu um rácio BAX/BCL-2 < 1 e uma elevada expressão de PARP1, um dos principais marcadores de PCD por apoptose. Para confirmar estes resultados, realizaram-se ensaios de alteração do potencial da membrana mitocondrial, onde se verificou que apenas o composto V26 despolarizou a mitocôndria de forma estatisticamente significativa, comprovando assim a sua ativação da via intrínseca da apoptose. Por outro lado, analisou-se a atividade da caspase-8, uma caspase iniciadora da via extrínseca da apoptose, onde se verificou um aumento da atividade desta caspase em células expostas ao composto V22, relativamente a células expostas apenas ao controlo de DMSO. Tais resultados permitiram confirmar que o composto V22 atua através da ativação da via extrínseca da apoptose. Relativamente ao composto Y, verificou-se que este apesar de possuir um elevado potencial apoptótico, não parece atuar segundo a via intrínseca da apoptose, em virtude dos resultados obtidos no ensaio de alteração do potencial de membrana mitocondrial. No entanto, dado que não foi realizado nenhum ensaio de *Western Blot* para este composto, não é possível confirmar a respetiva via de apoptose. A atuação de complexos de vanádio pela via de morte celular por apoptose já tinha sido descrita anteriormente, tal como verificado em Choroba, K., *et al.*, (2020).¹²²

Analisou-se ainda se estes compostos também poderiam ativar algum outro mecanismo de morte celular, nomeadamente a autofagia. Os resultados demonstraram que a exposição das células HCT116-DoxR aos três compostos (V22, V26 e Y), induziu cerca de 2,3x mais a produção de células autofágicas do que a exposição de células HCT116-DoxR ao controlo negativo de DMSO, demonstrando assim que para além destes compostos atuarem segundo a via de apoptose, também atuam segundo o processo de autofagia, tal como já descrito para outros complexos de vanádio em Sutradhar, M., *et al.*, (2019)¹²³.

Procedeu-se depois à quantificação dos níveis de ROS presentes em células HCT116-DoxR depois da sua exposição aos compostos de vanádio em estudo, de forma a verificar se este seria um dos modos destes compostos despoletarem a morte celular. Verificou-se então que todos os compostos induziram a produção de ROS num nível bastante superior ao verificado para o controlo negativo, demonstrando assim que a ativação das vias de morte celular por apoptose e autofagia pode estar relacionada com a indução de stress oxidativo, tal como já observado para outros compostos de vanádio em Choroba, K., *et al.*, (2020)¹²² e Sutradhar, M., *et al.*, (2019)¹²³.

Foram também realizados ensaios para verificar o potencial citostático dos compostos de vanádio em estudo, onde se verificou que os compostos V22 e V26 não interferem com a progressão do ciclo celular na sua concentração de IC_{50} , e ensaios para verificar o potencial metastático e angiogénico dos compostos de vanádio. De forma a avaliar a interferência destes compostos na migração celular, foi testada a migração celular de fibroblastos depois da sua exposição aos compostos V22, V26 e Y, onde se verificou que todos eles incitam a migração celular na mesma medida que o controlo negativo, não apresentando assim potencial anti-metastático. Adicionalmente, no ensaio *ex-ovo* CAM, um ensaio *in vivo* realizado em embriões de galinha, foi analisado o potencial angiogénico dos três compostos de vanádio, V22, V26 e Y. Verificou-se que após 24 horas de exposição, apenas o composto V26 induziu a diminuição da percentagem de novos vasos sanguíneos formados, no entanto o mesmo não se verificou passadas as 48 horas de exposição a este composto. Tal permitiu concluir que dos três compostos de vanádio estudados (V22, V26 e Y), apenas o V26 parece ter um efeito anti-angiogénico na sua concentração de IC_{50} , após as 24 horas de exposição. Verificou-se também que a exposição de 48 horas à concentração de IC_{50} destes compostos de vanádio não interfere com a sobrevivência dos embriões de galinha.

Em termos de perspetivas futuras, poderiam ser realizados estudos adicionais de forma a complementar os resultados já obtidos. Primeiramente, deveria ser repetido o ensaio de análise da atividade da caspase-8 para o composto V22, dado que este ensaio só foi realizado uma vez, de forma a obter resultados estatisticamente significativos. Depois, seria interessante determinar com maior precisão qual o mecanismo de morte celular ativado pelo composto Y. Para tal, poderia ser realizado um *Western Blot* para as proteínas BAX, BCL-2 e PARP1, de forma a verificar se este composto despoleta a apoptose através de uma via dependente de caspases e se essa via poderia ser a via apoptótica intrínseca.

Poderiam ser realizados ensaios de interação dos compostos com o DNA, de forma a verificar se estes compostos possuem potencial genotóxico. Dada a elevada produção de ROS pelas células HCT116-DoxR depois de expostas a estes compostos de vanádio, conforme verificado anteriormente, é possível que a molécula de DNA seja danificada. Ensaio de interação dos compostos com a BSA também poderiam ser interessantes, de forma a obter informações sobre a solubilidade e disponibilidade destes compostos *in vivo*. Para além destes, seria útil realizar uma análise proteómica, de modo a analisar a interferência destes complexos em várias vias celulares.

Por fim, os objetivos propostos para o presente projeto foram alcançados e os resultados obtidos parecem promissores para prosseguir com estudos *in vivo*. Caso a investigação continue com estudos *in vivo*, seria interessante tentar desenvolver um sistema de entrega destes compostos às células, como por exemplo a sua conjugação com nanopartículas, de forma a diminuir os efeitos adversos destes compostos (como foi verificado pelo seu baixo IC₅₀ em fibroblastos) e para tentar aumentar a sua solubilidade, que muitas vezes é um dos principais contratempos verificados *in vivo*.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Bertram, J. S. The molecular biology of cancer. *Mol. Asp. Med.* **21**, 167–223 (2001).
2. National Cancer Institute. About Cancer: Cancer statistics. *National Institutes of Health* [Online, acedido a 20-05-2022] <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/statistics> (2020).
3. World Health Organization. Cancer. [Online, acedido a 20-5-2022] <https://www.who.int/health-topics/cancer> (2022).
4. Sung, H. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **71**, 209–249 (2021).
5. Nikbakht, H. A. *et al.* Survival Rate of Colorectal Cancer in Eastern Mediterranean Region Countries: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancer Control* **27**, 1–15 (2020).
6. GLOBOCAN. The Global Cancer Observatory - All Cancers Fact Sheets. *Int. Agency Res. Cancer - WHO* **419**, 199–200 (2020).
7. GLOBOCAN 2020. The Global Cancer Observatory - Cancer Worldwide. *Int. Agency Res. Cancer - WHO* (2021).
8. World Health Organization. Portugal - Global Cancer Observatory. *Globocan 2020* **501**, 1–2 (2020).
9. Chao, H. X. *et al.* Orchestration of DNA damage checkpoint dynamics across the human cell cycle. *Cell Syst.* **5**, 445–459 (2017).
10. Matthews, H. K., Bertoli, C. & Bruin, R. A. M. Cell cycle control in cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **23**, 74–88 (2022).
11. Malarkey, D. E., Hoenerhoff, M. & Maronpot, R. R. *Carcinogenesis: Mechanisms and Manifestations. Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology* (2013). doi:10.1016/B978-0-12-415759-0.00005-4.
12. Nenclares, P. & Harrington, K. J. The biology of cancer. *Med. (United Kingdom)* **48**, 67–72 (2020).
13. Ryan, M. B. & Corcoran, R. B. Therapeutic strategies to target RAS-mutant cancers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **15**, 709–720 (2018).
14. Boyle, P. & Levin, B. (editors). *World Cancer Report 2008. International Agency for Research on Cancer* vol. 199 (World Health Organization, 2008).
15. Yoshida, K. & Miki, Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* **95**, 866–871 (2004).
16. Kasthuber, E. R. & Lowe, S. W. Putting p53 in Context. *Cell* **170**, 1062–1078 (2017).
17. Anand, P. *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* **25**, 2097–2116 (2008).

18. Wild, C. P., Weiderpass, E. & Stewart, B. W. (editors). *World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. International Agency for Research on Cancer* (2020).
19. Elsland, D. & Neefjes, J. Bacterial infections and cancer. *EMBO Rep.* **19**, 1–11 (2018).
20. Carrillo-Infante, C., Abbadessa, G., Bagella, L. & Giordano, A. Viral infections as a cause of cancer (Review). *Int. J. Oncol.* **30**, 1521–1528 (2007).
21. Brassart-Pasco, S. *et al.* Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression. *Front. Oncol.* **10**, 1–13 (2020).
22. Anderson, N. M. & Simon, M. C. The tumor microenvironment. *Curr. Biol.* **30**, 921–925 (2020).
23. Roma-Rodrigues, C. *et al.* Nanotheranostics targeting the tumor microenvironment. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 1–18 (2019).
24. Chen, Y. *et al.* Tumor-associated macrophages: An accomplice in solid tumor progression. *J. Biomed. Sci.* **26**, 1–13 (2019).
25. Cui, N., Hu, M. & Khalil, R. A. *Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. Progress in Molecular Biology and Translational Science* vol. 147 (Elsevier Inc., 2017).
26. Liao, Z., Tan, Z. W., Zhu, P. & Tan, N. S. Cancer-associated fibroblasts in tumor microenvironment – Accomplices in tumor malignancy. *Cell. Immunol.* **343**, 0–1 (2019).
27. Wong, S. H. M., Fang, C. M., Chuah, L. H., Leong, C. O. & Ngai, S. C. E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **121**, 11–22 (2018).
28. Zhang, Y. & Weinberg, R. A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front. Med.* **12**, 361–373 (2018).
29. Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R. & Weinberg, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell* **168**, 670–691 (2017).
30. Mittal, V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **13**, 395–412 (2018).
31. Giulia, B. & David A., T. Diversity and Biology of Cancer-Associated Fibroblasts. *Physiol. Rev.* **101**, 147–176 (2021).
32. WHO - World Health Organization. GLOBOCAN - Colorectal Cancer Incidence in The World. *Glob. Cancer Obs.* **419**, 1–2 (2020).
33. Zygulska, A. L. & Pierzchalski, P. Novel Diagnostic Biomarkers in Colorectal Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, (2022).
34. Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Dieste, A. P., Cerrada, E. & Yoldi, M. J. R. Colorectal carcinoma: A general overview and future perspectives in colorectal cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
35. Sharma, R. *et al.* Global, regional, and national burden of colorectal cancer and its risk factors, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease

- Study 2019. *Lancet Gastroenterol. Hepatol.* **7**, 627–647 (2022).
36. Kuipers, E. J. *et al.* Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **1**, (2016).
 37. Testa, U., Pelosi, E. & Castelli, G. Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells. *Med. Sci.* **6**, 31 (2018).
 38. Gupta, S. *et al.* Potential impact of family history based screening guidelines on early onset colorectal cancer detection. *Cancer* **126**, 3013–3020 (2020).
 39. Mook, O. R. F., Frederiks, W. M. & Van Noorden, C. J. F. The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1705**, 69–89 (2004).
 40. Mariani, F., Sena, P. & Roncucci, L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World J. Gastroenterol.* **20**, 9716–9731 (2014).
 41. Sun, Y., Liu, Y., Ma, X. & Hu, H. The influence of cell cycle regulation on chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1–25 (2021).
 42. Strasser, A. & Vaux, D. L. Cell Death in the Origin and Treatment of Cancer. *Mol. Cell* **78**, 1045–1054 (2020).
 43. Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F. G. & Taylor, S. S. The spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* **22**, 966–980 (2012).
 44. Tower, J. Programmed cell death in aging. *Ageing Res. Rev.* **23**, 90–100 (2015).
 45. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).
 46. Zaman, S., Wang, R. & Gandhi, V. Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies. *Leuk. Lymphoma* **55**, 1980–1992 (2014).
 47. Rothlin, C. V. & Ghosh, S. Cracking the cell death code. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **12**, (2020).
 48. Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. & Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: An ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 700–714 (2010).
 49. Darzynkiewicz, Z., Bedner, E. & Smolewski, P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis. *Semin. Hematol.* **38**, 179–193 (2001).
 50. Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E. & Swanson, P. E. Cell Death. *N. Engl. J. Med.* **361**, 1570–1583 (2009).
 51. Cooper, K. F. Till death do us part: The marriage of autophagy and apoptosis. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2018**, (2018).
 52. Kalkavan, H. & Green, D. R. MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business. *Cell Death Differ.* **25**, 1–10 (2017).
 53. Goldar, S., Khaniani, M. S., Derakhshan, S. M. & Baradaran, B. Molecular mechanisms of apoptosis and roles in cancer development and treatment. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **16**, 2129–2144 (2015).

54. Denton, D. & Kumar, S. Autophagy-dependent cell death. *Cell Death Differ.* **26**, 605–616 (2019).
55. Hansen, M., Rubinsztein, D. C. & Walker, D. W. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 579–593 (2018).
56. Yu, Z., Jiang, N., Su, W. & Zhuo, Y. Necroptosis: A Novel Pathway in Neuroinflammation. *Front. Pharmacol.* **12**, 1–13 (2021).
57. Khalid, N. & Azimpouran, M. Necrosis. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2022).
58. Swanson, K. V., Deng, M. & Ting, J. P. Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* **19**, 477–489 (2019).
59. Urruticoechea, A. *et al.* Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr. Pharm. Des.* **16**, 3–10 (2010).
60. Makin, G. Principles of chemotherapy. *Paediatr. Child Heal. (United Kingdom)* **24**, 161–165 (2014).
61. Aldossary, S. A. Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomed. Pharmacol. J.* **12**, 7–15 (2019).
62. Rosenberg, B., Vancamp, L., Trosko, J. E. & Mansour, V. H. Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents. *Nature* **222**, 385–386 (1969).
63. Kowalski, S., Wyrzykowski, D. & Inkielewicz-Stepniak, I. Molecular and Cellular Mechanisms of Cytotoxic Activity of Vanadium Compounds against Cancer Cells. *Molecules* **25**, 25 (2020).
64. Galanski, M. Recent Developments in the Field of Anticancer Platinum Complexes. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* **1**, 285–295 (2008).
65. Galluzzi, L. *et al.* Systems biology of cisplatin resistance: Past, present and future. *Cell Death Dis.* **5**, e1257-18 (2014).
66. Mihlon, F., Ray, C. E. & Messersmith, W. Chemotherapy agents: A primer for the interventional radiologist. *Semin. Intervent. Radiol.* **27**, 384–390 (2010).
67. Lee, Y. T., Tan, Y. J. & Oon, C. E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur. J. Pharmacol.* **834**, 188–196 (2018).
68. Schirmacher, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). *Int. J. Oncol.* **54**, 407–419 (2019).
69. Xie, Y. H., Chen, Y. X. & Fang, J. Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* **5**, (2020).
70. Sveen, A., Kopetz, S. & Lothe, R. A. Biomarker-guided therapy for colorectal cancer: strength in complexity. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **17**, 11–32 (2020).
71. Leite CAVG *et al.* Receptor tyrosine kinases: therapeutic implications in cancer. *Rev. Bras. Oncol. Clin.* **8**, 130–142 (2012).
72. Pedrosa, P. *et al.* Combination of chemotherapy and Au-nanoparticle phototherapy in the visible light to tackle doxorubicin resistance in cancer cells. *Sci. Rep.* **8**, 1–8

- (2018).
73. Hu, T., Li, Z., Gao, C. Y. & Cho, C. H. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World J. Gastroenterol.* **22**, 6876–6889 (2016).
 74. Sequeira, D. *et al.* Cu(i) complexes as new antiproliferative agents against sensitive and doxorubicin resistant colorectal cancer cells: synthesis, characterization, and mechanisms of action. *Dalt. Trans.* **50**, 1845–1865 (2021).
 75. Hodges, L. M. *et al.* Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics* **21**, 152–161 (2011).
 76. Kibria, G., Hatakeyama, H., Akiyama, K., Hida, K. & Harashima, H. Comparative study of the sensitivities of cancer cells to doxorubicin, and relationships between the effect of the drug-efflux pump P-gp. *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 1926–1935 (2014).
 77. Evangelou, A. M. Vanadium in cancer treatment. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **42**, 249–265 (2002).
 78. Castro, F. *et al.* Advances on colorectal cancer 3D models: The needed translational technology for nanomedicine screening. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **175**, 1–19 (2021).
 79. Yoon, P. S. *et al.* Advances in Modeling the Immune Microenvironment of Colorectal Cancer. *Front. Immunol.* **11**, 1–10 (2021).
 80. Fang, I. J. & Trewyn, B. G. *Application of mesoporous silica nanoparticles in intracellular delivery of molecules and proteins. Methods in Enzymology* vol. 508 (Elsevier Inc., 2012).
 81. Indrayanto, G., Putra, G. S. & Suhud, F. *Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology* vol. 46 (Elsevier Inc., 2021).
 82. Thermo Fisher Scientific. Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor™ 488 & Propidium Iodide (PI). *Invitrogen - User Guide* [Online, accessed a 30-05-2022] <https://www.thermofisher.com/pt/en/home/references/protocols/cell-and-tissue-analysis/flow-cytometry-protocol/apoptosis/alex-fluor-488-annexin-v-dead-cell-apoptosis-kit.html> (2022).
 83. Advanstra Corporation. *WesternBright ECL-Chemiluminescent HRP Substrate*. <https://products.advansta.com/WesternBright-ECL-user-manual> (2020).
 84. Abnova Corporation. JC-10 Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit. 2-8 [Online, accessed a 30-05-2022] http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=KA1324 (2017).
 85. Abcam. *Caspase 8 Assay Kit ab39700 (Colorimetric)*. <https://www.abcam.com/caspase-8-assay-kit-colorimetric-ab39700.html> (2020).
 86. Abcam. ab139484 - Autophagy Detection Kit. *Instructions for Use* [Online, accessed a 30-05-2022] <https://www.abcam.com/autophagy-assay-kit-ab139484.html> (2021).
 87. Balakin, K., Savchuk, N. & Tetko, I. In Silico Approaches to Prediction of Aqueous and DMSO Solubility of Drug-Like Compounds: Trends, Problems and Solutions.

Curr. Med. Chem. **13**, 223–241 (2005).

88. Galvao, J. *et al.* Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *FASEB J.* **28**, 1317–1330 (2014).
89. Jain, A., Blum, C. & Subramaniam, V. *Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging of Visible Fluorescent Proteins. Advances in Biomedical Engineering* (Elsevier, 2009). doi:10.1016/B978-0-444-53075-2.00004-6.
90. González-González, J., Nájera-Lara, M., López-Ramírez, V., Ramírez-Vázquez, J. A. & Segoviano-Garfias, J. J. N. Spectrophotometric determination of the formation constants of calcium(II) complexes with 2,2'-bipyridyl and 1,10-phenanthroline in acetonitrile. *Resour. Technol.* **2**, 240–246 (2016).
91. Najóczki, F., Szabó, M., Lihi, N., Udvardy, A. & Fábián, I. Synthesis and characterization of 1,10-phenanthroline-mono- n-oxides. *Molecules* **26**, 1–19 (2021).
92. Ruan, L., Gao, X., Zhao, J., Xu, C. & Liang, D. Preparation and characteristics of Eu(DBM)3phen: Synthesis, single-crystal structure and spectroscopic analysis. *J. Mol. Struct.* **1149**, 265–272 (2017).
93. Santos, J. R. N. *et al.* Reduced Graphene Oxide-Supported Nickel(II)-Bis(1,10-Phenanthroline) Complex as a Highly Active Electrocatalyst for Ethanol Oxidation Reaction. *Electrocatalysis* **10**, 560–572 (2019).
94. Promega Corporation. CellTiter 96 ® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay. *Www.Promega.Com/Protocols/2014-12-15* (2012).
95. Engeland, M. Van, Nieland, L. J. W., Ramaekers, F. C. S., Schutte, B. & Reutelingsperger, C. P. M. Annexin V-Affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry* **9**, 1–9 (1998).
96. Emoto, K., Toyama-Sorimachi, N., Karasuyama, H., Inoue, K. & Umeda, M. Exposure of phosphatidylethanolamine on the surface of apoptotic cells. *Exp. Cell Res.* **232**, 430–434 (1997).
97. Darzynkiewicz, Z. *et al.* Cytometry in cell necrobiology: Analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* **27**, 1–20 (1997).
98. Meredith, A. M. & Dass, C. R. Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *J. Pharm. Pharmacol.* **68**, 729–741 (2016).
99. Khodapasand, E., Jafarzadeh, N., Farrokhi, F., Kamalidehghan, B. & Houshmand, M. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? *Iran. Biomed. J.* **19**, 69–75 (2015).
100. Kulsoom, B. *et al.* Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as prognostic markers in acute myeloid leukemia: Are we ready for bcl-2-directed therapy? *Cancer Manag. Res.* **10**, 403–416 (2018).
101. Chaitanya, G. V., Alexander, J. S. & Babu, P. P. PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Commun. Signal.* **8**, 31 (2010).
102. Mashimo, M. *et al.* The 89-kDa PARP1 cleavage fragment serves as a cytoplasmic

- PAR carrier to induce AIF-mediated apoptosis. *J. Biol. Chem.* **296**, (2021).
103. Perelman, A. *et al.* JC-1: Alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* **3**, 1–7 (2012).
 104. Simeonova, E., Garstka, M., Koziol-Lipińska, J. & Mostowska, A. Monitoring the mitochondrial transmembrane potential with the JC-1 fluorochrome in programmed cell death during mesophyll leaf senescence. *Protoplasma* **223**, 143–153 (2004).
 105. Sakamuru, S., Attene-Ramos, M. S. & Xia, M. Mitochondrial Membrane Potential Assay. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1473 17–22 (2016).
 106. Roma-Rodrigues, C. *et al.* Synthesis of new hetero-arylidene-9(10H)-anthrone derivatives and their biological evaluation. *Bioorg. Chem.* **99**, 103849 (2020).
 107. Liguori, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging* **13**, 757–772 (2018).
 108. Ferreira, I. C. & Abreu, R. M. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise* vol. 2 32–39 (2007).
 109. Abcam. DCFDA / H2DCFDA - Cellular ROS Assay Kit (ab113851). *Oxidative Stress* [Online, acedido a 03-06-2022] (2022).
 110. Kashyap, D. *et al.* Reactive Oxygen Species (ROS): an Activator of Apoptosis and Autophagy in Cancer. *J. Biol. Chem. Sci.* **3**, 256–264 (2016).
 111. Nicholas P. Cheremisinoff. Elemental and Structural Characterization Tests. in *Polymer Characterization: Laboratory Techniques and Analysis* 43–81 (1996).
 112. Darzynkiewicz, Z., Huang, X. & Zhao, H. Analysis of cellular DNA content by flow cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.* **119**, 5.7.1–5.7.20 (2017).
 113. Kim, K. H. & Sederstrom, J. M. Assaying cell cycle status using flow cytometry Kang. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **111**, 28.6.1–28.6.11 (2015).
 114. Kim, H. S., Lee, Y. S. & Kim, D. K. Doxorubicin exerts cytotoxic effects through cell cycle arrest and fas-mediated cell death. *Pharmacology* **84**, 300–309 (2009).
 115. Lenis-Rojas, O. A. *et al.* Manganese(I) tricarbonyl complexes as potential anticancer agents. *J. Biol. Inorg. Chem.* **27**, 49–64 (2022).
 116. Guan, X. Cancer metastases: Challenges and opportunities. *Acta Pharm. Sin. B* **5**, 402–418 (2015).
 117. Kobelt, D., Walther, W. & Stein, U. S. Real-Time Cell Migration Monitoring to Analyze Drug Synergism in the Scratch Assay Using the IncuCyte System. in *Methods in Molecular Biology* vol. 2294 133–142 (2021).
 118. Finetti, F. & Trabalzini, L. Bidimensional In Vitro Angiogenic Assays to Study CCM Pathogenesis: Endothelial Cell Proliferation and Migration. in *Methods in Molecular Biology* vol. 2152 377–385 (2020).
 119. Hossian, A. K. M. N. & Mattheolabakis, G. Cellular Migration Assay: An In Vitro Technique to Simulate the Wound Repair Mechanism. in *Methods in Molecular Biology* vol. 2193 77–83 (2021).

120. Graça, B. *et al.* Angiogénese e cancro: Da biopatologia à terapêutica. *Acta Med. Port.* **17**, 76–93 (2004).
121. Naik, M., Brahma, P. & Dixit, M. A cost-effective and efficient chick ex-ovo cam assay protocol to assess angiogenesis. *Methods Protoc.* **1**, 1–9 (2018).
122. Choroba, K. *et al.* In vitro antiproliferative effect of vanadium complexes bearing 8-hydroxyquinoline-based ligands-the substituent effect. *Dalt. Trans.* **49**, 6596–6606 (2020).
123. Sutradhar, M. *et al.* Antiproliferative activity of heterometallic sodium and potassium-dioxidovanadium(V) polymers. *J. Inorg. Biochem.* **200**, 110811 (2019).
124. Li-cor Biosciences. *Technical Note: Protein Electrotransfer Methods and the Odyssey Infrared Imaging Imaging System.* https://www.licor.com/bio/guide/westerns/transfer_options (2009).

A. ANEXOS

A.1 Curva de calibração padrão

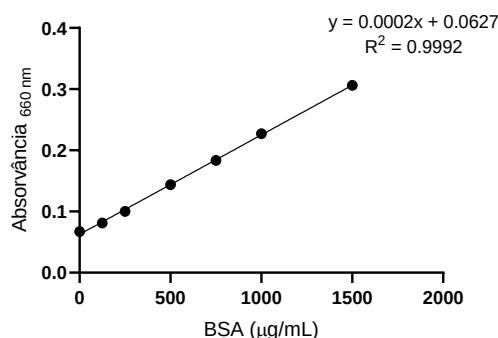


Figura A.1 – Curva de calibração de BSA (0-1500 µg/mL) realizada com recurso ao *kit Pierce 660 nm Protein Assay*. A extrapolação da concentração proteica de cada amostra foi realizada através da equação $y=0,0002x+0,0627$.

A.2 Constituição do gel de SDS-PAGE

Tabela A.1 – Constituição do gel de 10% de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE).

Reagentes	Gel de Resolução	Gel de Concentração	Marca
H ₂ O destilada	5 mL	3,4 mL	FCT-UNL
Acrilamida/Bisacrilamida (37,5:1)	2,5 mL	830 µL	Merck, Alemanha
Tampão de concentração/resolução 4x	2,5 mL	630 µL	FCT-UNL
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

A.3 Montagem do Sistema de transferência

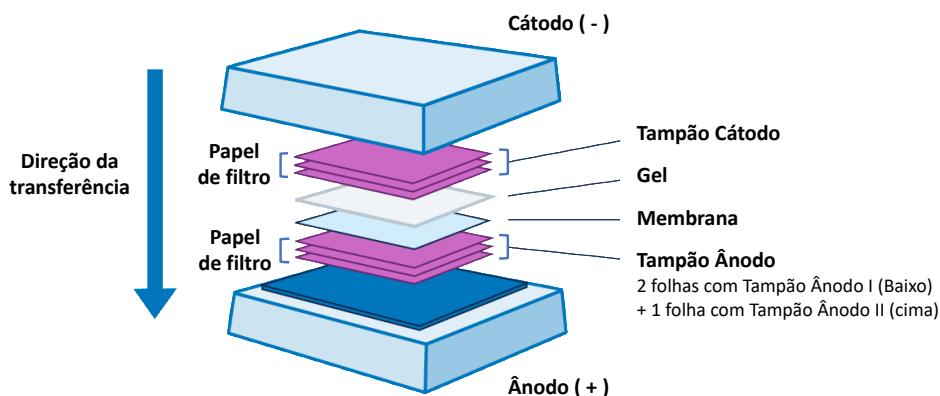


Figura A.2 – Representação esquemática da montagem do sistema de transferência. (Adaptado de LI-COR 2009).¹²⁴

A.4 Solubilidade e estabilidade dos compostos – Espectros de absorção

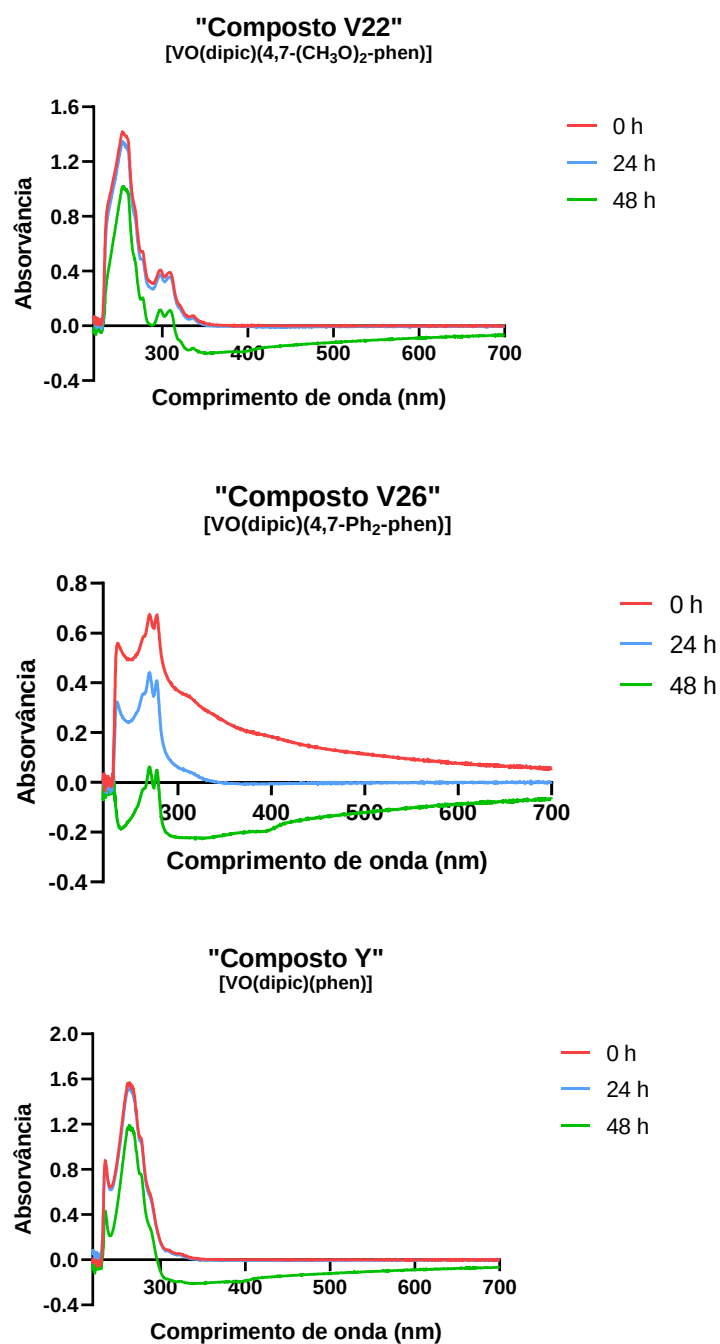


Figura A.3 – Espectros de absorção de soluções com 50 μ M de composto em meio de cultura RPMI (previamente diluídos em DMSO) a diferentes tempos de incubação: 0 horas (vermelho), 24 horas (azul) e 48 horas (verde).

A.5 Ensaios de viabilidade celular nas linhas HCT116 e A2780

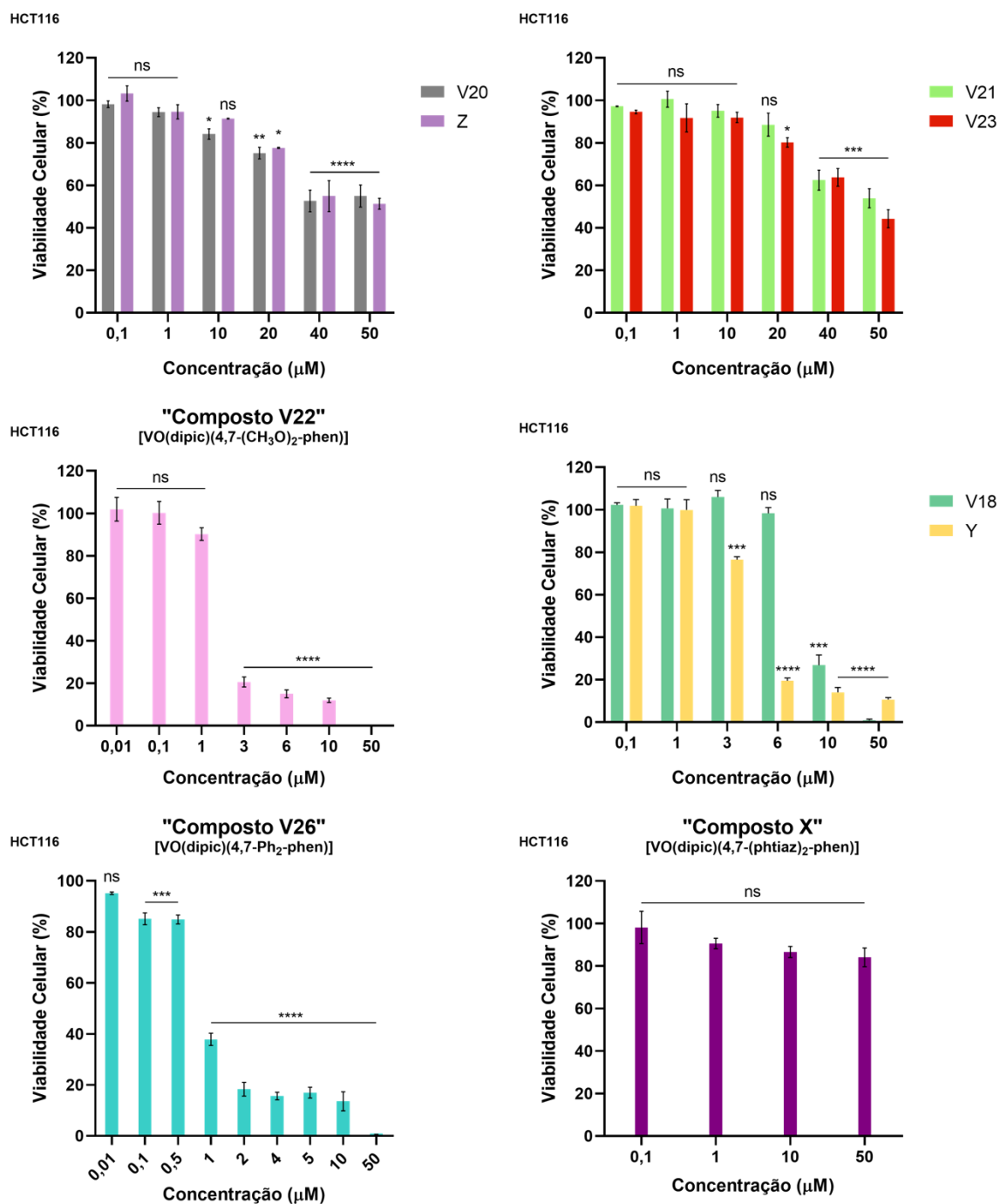


Figura A.4 – Viabilidade de células HCT116 após exposição a diferentes concentrações dos compostos de vanádio em estudo, durante 48 horas. 0,1% (v/v) DMSO foi utilizado como veículo de controlo. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM de pelo menos dois ensaios independentes (ns=estatisticamente não significativo; * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001; **** p -value<0,0001).

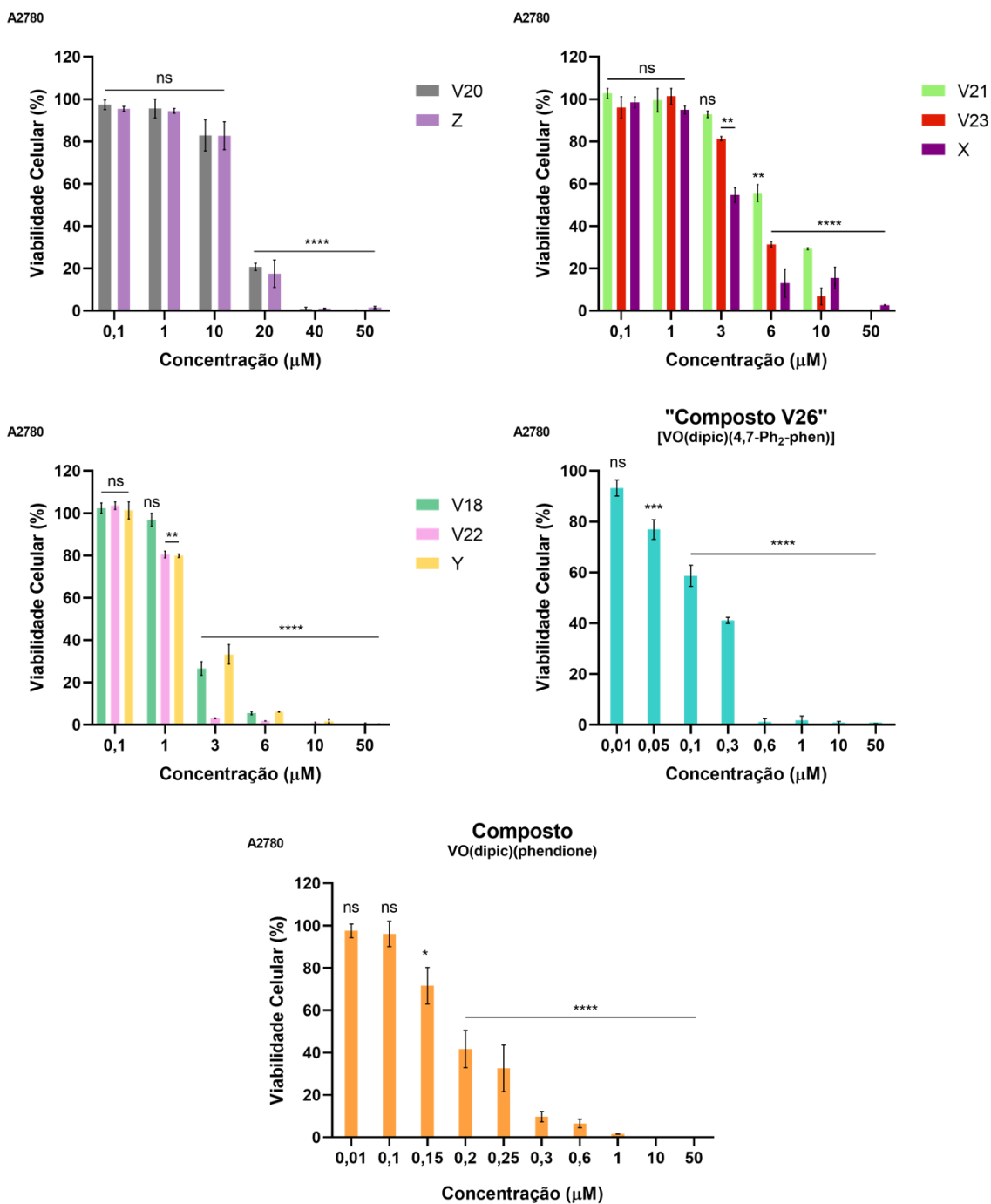


Figura A.5 – Viabilidade de células A2780 após exposição a diferentes concentrações dos compostos de vanádio em estudo, durante 48 horas. 0,1% (v/v) DMSO foi utilizado como veículo de controle. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM de pelo menos dois ensaios independentes (ns=estatisticamente não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** p -value $< 0,0001$).

A.6 Ensaios de viabilidade celular na linha HCT116-DoxR após exposição aos ligandos dos compostos de vanádio em estudo

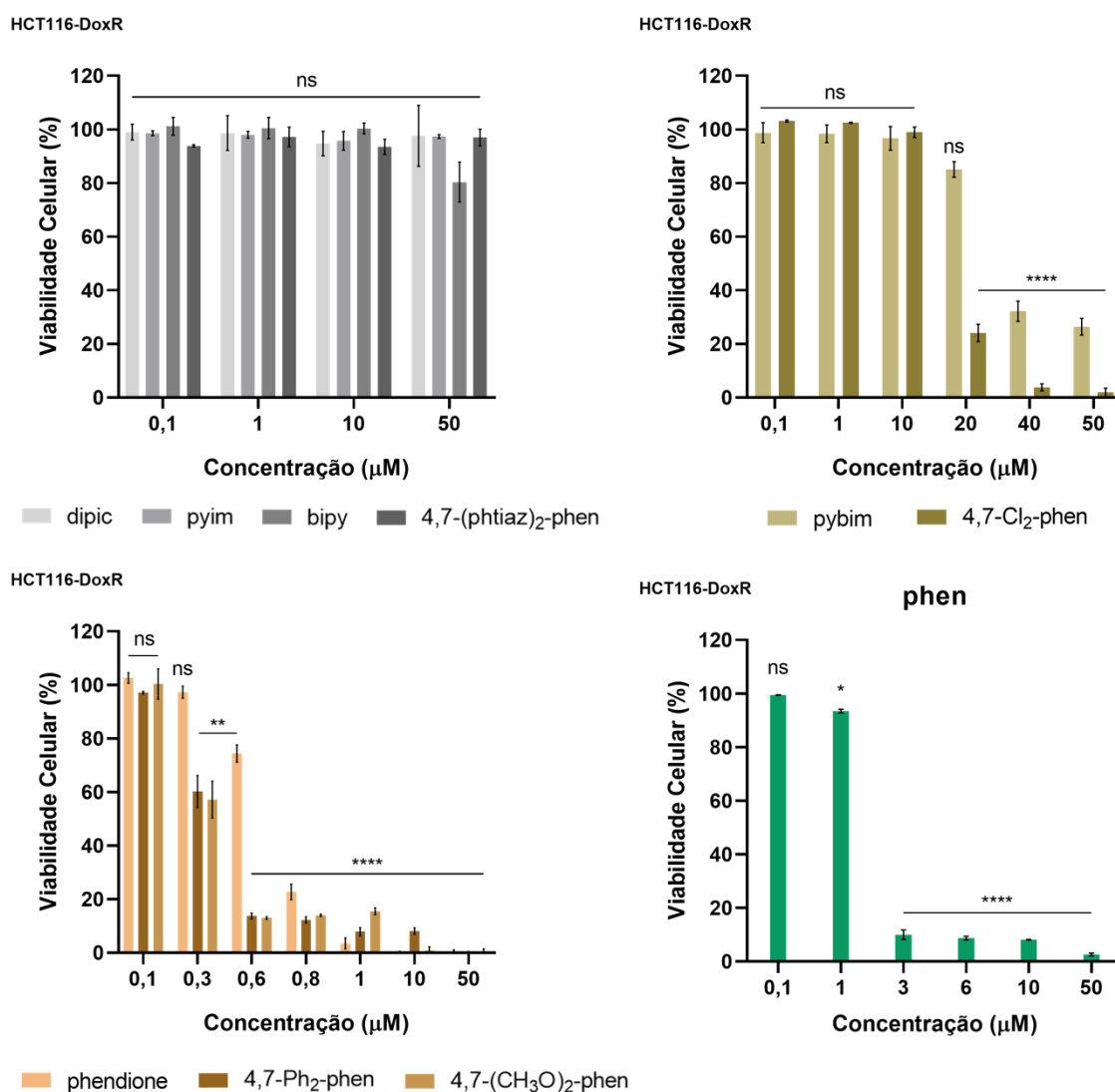
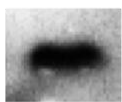
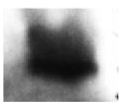
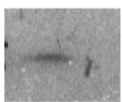
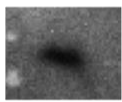
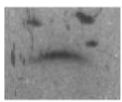
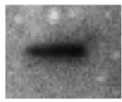
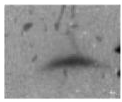


Figura A.6 – Viabilidade de células HCT116-DoxR após exposição a diferentes concentrações dos ligandos dos compostos de vanádio em estudo, durante 48 horas. 0,1% (v/v) DMSO foi utilizado como veículo de controlo. Os dados estão expressos como a média $\pm$ SEM de pelo menos dois ensaios independentes (ns=estatisticamente não significativo; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** p -value $< 0,0001$).

A.7 Bandas de expressão das proteínas BAX, BCL-2 e PARP1 por *Western Blot*

Tabela A.2 – Bandas de expressão das proteínas BAX, BCL-2 e PARP1 clivada, após 48 horas de exposição das células HCT116-DoxR ao IC₅₀ dos compostos V22 e V26. 0,1% (v/v) DMSO foi usado como veículo de controlo.

	BAX	BCL-2	PARP1
O,1% DMSO			
V22			
V26			

A.8 Viabilidade das células HCT116-DoxR após exposição ao composto TBHP

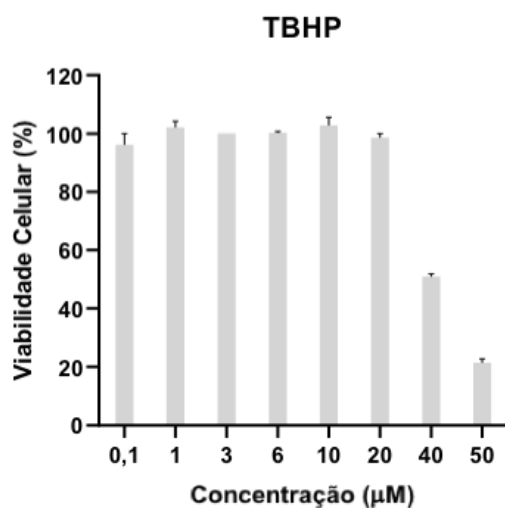


Figura A.7 – Viabilidade das células HCT116-DoxR após exposição a diferentes concentrações de TBHP, durante 48 horas. 0,1% (v/v) DMSO foi utilizado como veículo de controlo. Os dados estão expressos como a média ± SEM de um ensaio biológico.



