



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

# **Estudo da Citotoxicidade de Compostos Derivados das Cianinas em Culturas Celulares**

**Susana Marisa Azevedo Ferreira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Luíza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro

Co-orientador: Prof. Doutor Renato Emanuel Félix Boto

**Covilhã, outubro de 2015**

A parte experimental desta dissertação foi realizada no Centro de Investigação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior.

*O conteúdo da presente Dissertação é da exclusiva responsabilidade da autora*

---

(Susana Marisa Azevedo Ferreira)

*“Tudo é ousado para quem a nada se atreve”*

**Fernando Pessoa**

## Agradecimentos

Ao longo deste ano pude contar com o apoio e ajuda de muitas pessoas, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho e, sem as quais, o resultado desta dissertação não teria sido o mesmo. Agradeço especialmente,

À minha orientadora, Professora Doutora Luíza Granadeiro, por ter acreditado em mim, pela oportunidade de trabalhar com ela, pelo apoio incondicional, pela sua inteira disponibilidade, paciência e por toda a confiança que sempre depositou em mim. Todos os conhecimentos que me transmitiu foram muito importantes para a realização deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Renato Boto, por todo o apoio, disponibilidade e partilha de conhecimentos.

Ao Professor Doutor Paulo Almeida, por toda a disponibilidade e entreaajuda.

Aos colegas de laboratório e do CICS, por toda a ajuda, apoio e por todas as palavras encorajadoras, com a vossa companhia o tempo passava sempre mais rápido. Obrigada Ana, Joana, Mariana, Maria Inês, Catarina, Eduarda, Nanci, Nuno, Maria, Patrícia, Margarida, Ana Raquel e Ana Catarina.

Aquelas que passaram de colegas de curso a amigas e que durante estes anos têm estado sempre comigo, Maria, Fabiana, Margarida e Filipa.

Aos meus amigos de sempre, que estão ao meu lado em tudo e têm uma paciência incrível para mim, sem vocês nada seria igual. Obrigada Maria, Nádia, Ana, Andreia, Mélodie, Filipe, João e Beto.

Ao Roberto, por todo o apoio, amizade, carinho, paciência e disponibilidade para me aturar nos momentos menos bons.

A toda a minha família, por estarem sempre ao meu lado. Em especial, à minha titia e à minha madrinha, por todos os conselhos e carinho que me dão.

Ao meu irmão, apesar de estar longe nunca deixou de se preocupar, de me apoiar e me dar força.

E para terminar, aos mais importantes, os meus pais, pelo amor incondicional, essencial para o meu bem estar, conselhos, apoio, paciência, compreensão, educação e por todo o esforço que fizeram, sem vocês nunca conseguiria percorrer este caminho.

## Resumo

A descoberta da mauveína, por William Perkin, em 1856, marcou a indústria da síntese de corantes. Desde então, as cianinas têm vindo a ser sintetizadas com diversos fins, nomeadamente, como sensibilizadores fotográficos. As possíveis aplicações na medicina têm vindo a ser intensivamente estudadas, como é exemplo o tratamento de tecidos tumorais, com auxílio da terapia fotodinâmica, sugerindo que há uma ação predominante na produção de espécies reativas de oxigénio, induzindo o *stress* oxidativo nas células cancerígenas. As glutatonas S-transferases são uma superfamília de enzimas multifuncionais ubiquitárias que desempenham um papel fundamental na resposta da célula ao *stress* oxidativo e são consideradas enzimas de destoxificação. As enzimas envolvidas na destoxificação podem desempenhar um papel importante na suscetibilidade ao cancro. Alguns polimorfismos dos genes das glutatonas S-transferases, os genes *GSTM1* e *GSTT1*, parecem constituir um fator de risco e têm sido associados a uma maior suscetibilidade ao cancro da mama.

O objetivo principal deste trabalho é efetuar um estudo preliminar sobre os efeitos das tiocarbocianinas com cadeia *N*-alquílica em células humanas. Para tal, utilizou-se um ensaio para estudar a viabilidade celular (ensaio de MTT) e analisou-se a expressão dos genes *GSTM1* e *GSTT1* por PCR em tempo real nas células epiteliais com carcinoma da mama (MCF-7), e em fibroblastos saudáveis da derme humana (NHDF), após incubação e recuperação com os compostos em estudo.

Os nossos resultados mostraram que as tiocarbocianinas estudadas, com cadeia *N*-alquílica, demonstraram maior toxicidade na linha celular MCF-7 em comparação com as NHDF. Estas tiocarbocianinas, também mostraram, entre os possíveis mecanismos de toxicidade, o envolvimento em processos que promovem o *stress* oxidativo às células.

## Palavras-chave

Cianinas, glutatonas S-transferases, *stress* oxidativo, ensaios de viabilidade celular.

## Abstract

The discovery of mauveine, by William Perkin in 1856, marked the synthesis of the dye industry. Since then, cyanines have been synthesized with different purposes in particular as photographic sensitizers. Possible applications in the medicine have been intensively studied, as for example the treatment of tumor tissues with the aid of photodynamic therapy, suggesting that there is a predominant action in the production of reactive oxygen species, inducing oxidative stress on cells cancer. Glutathione S-transferases constitute a super-family of ubiquitous, multifunctional enzymes, which play a central role in cell response to the oxidative stress and are considered detoxification enzymes. The enzymes involved in the detoxification may play a significant role in cancer susceptibility. Some polymorphisms present in glutathione S-transferases, *GSTM1* and *GSTT1* genes, appear to be a risk factor and have been linked to an increased susceptibility to breast cancer.

The aim of this study was to perform a preliminary study on the effects of thiocarbocyanines with *N*-alkyl chain in human cells. For such, was used an assay for studying cell viability (MTT assay) and analyzed, *GSTM1* and *GSTT1* genes expression by real time PCR in the epithelial cells with breast carcinoma (MCF-7), and in normal human dermal fibroblasts (NHDF) after incubation and recovery with the test compounds.

The results showed that the thiocarbocyanines studied with *N*-alkyl chain demonstrated higher toxicity in MCF-7 cell line comparing to NHDF. These cyanines have also showed a possible mechanism of toxicity, involving processes that promote oxidative stress to cells.

## Keywords

Cyanine, glutathione S-transferases, oxidative stress, viability assay.

# Índice

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vi
Abstract .....	vii
Índice .....	viii
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas .....	xiii
Lista de Acrónimos e Abreviaturas.....	xiv
I. Introdução .....	1
1. Glutathione S-Transferase .....	2
1.1. Classificação.....	2
1.2. Distribuição e função fisiológica.....	3
1.3. Mecanismo de ação.....	3
1.4. Localização cromossómica .....	5
1.5. Polimorfismos estudados .....	6
2. Cianinas .....	7
2.1. Características .....	8
2.2. Aplicações.....	8
2.3. Compostos em estudo.....	9
3. Stress oxidativo .....	10
3.1. Stress oxidativo e as GST.....	11

3.2.	<i>Stress</i> oxidativo e as cianinas .....	12
<b>II.</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>13</b>
<b>III.</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>15</b>
1.	Linhas celulares .....	16
1.1.	Cultura de células .....	16
1.2.	Passagem de células .....	17
1.3.	Contagem de células .....	17
1.4.	Armazenamento de células .....	18
2.	Ensaio de viabilidade celular - MTT .....	18
3.	RNA total .....	20
3.1.	Extração de RNA total .....	20
3.2.	Determinação da Integridade do RNA total .....	21
3.3.	Quantificação do RNA total .....	21
4.	Transcrição Reversa .....	21
5.	PCR em Tempo Real .....	22
6.	“Flowchart” da experiência .....	23
7.	Análise Estatística .....	23
<b>IV.</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>25</b>
1.	Estudos de viabilidade celular .....	26
1.1.	Otimização das concentrações .....	26
1.2.	Efeito das tiocarbocianinas .....	26
2.	Expressão Relativa.....	29

<b>V. Conclusão e Perspetivas Futuras .....</b>	<b>35</b>
<b>VI. Referências Bibliográficas .....</b>	<b>37</b>

## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Conjugação da glutathiona (GSH) com um xenobiótico (X) catalisada pela glutathiona S-transferase (GST), resultando na formação de um conjugado de S-glutathiona.....	4
<b>Figura 2</b> - Organização cromossômica dos genes da classe mu.....	5
<b>Figura 3</b> - Organização cromossômica dos genes da classe theta.....	6
<b>Figura 4</b> - Estrutura geral das cianinas. ....	8
<b>Figura 5</b> - Estruturas dos sais de amônio quaternário. ....	9
<b>Figura 6</b> - Estruturas das tiocarbocianinas. ....	10
<b>Figura 7</b> - Desenho da placa de PCR em Tempo Real. ....	22
<b>Figura 8</b> - Esquema das experiências realizadas, ensaio de MTT (placas A) e PCR em Tempo Real (placas B). ....	23
<b>Figura 9</b> - Efeito das tiocarbocianinas com cadeia <i>N</i> -alquílica 1-4 na linha celular MCF-7. ...	26
<b>Figura 10</b> - Efeito das tiocarbocianinas com cadeia <i>N</i> -alquílica 1-4 na linha celular NHDF....	27
<b>Figura 11</b> - Efeito das tiocarbocianinas com cadeia <i>N</i> -alquílica 1-4 nas linhas celulares MCF-7 e NHDF. ....	28
<b>Figura 12</b> - Níveis de expressão do mRNA do gene <i>GSTM1</i> em relação a <i>β</i> -2-microglobulina na linha celular MCF-7, após 48 horas de incubação com as tiocarbocianinas 1-4 (5 µg/mL) e após o mesmo período de recuperação através de PCR em tempo real. ....	30
<b>Figura 13</b> - Níveis de expressão do mRNA do gene <i>GSTT1</i> em relação a <i>β</i> -2-microglobulina na linha celular MCF-7, após 48 horas de incubação com as tiocarbocianinas 1-4 (5 µg/mL) e após o mesmo período de recuperação através de PCR em tempo real. ....	30
<b>Figura 14</b> - Níveis de expressão do mRNA do gene <i>GSTM1</i> em relação a <i>β</i> -2-microglobulina na linha celular NHDF, após 48 horas de incubação com as tiocarbocianinas 1-4 (5 µg/mL) e após o mesmo período de recuperação através de PCR em tempo real. ....	32

**Figura 15** - Níveis de expressão do mRNA do gene *GSTT1* em relação a  $\beta$ -2-microglobulina na linha celular NHDF, após 48 horas de incubação com as tiocarbocianinas 1-4 (5  $\mu$ g/mL) e após o mesmo período de recuperação através de PCR em tempo real. .... 32

## Lista de Tabelas

**Tabela 1** - Estrutura das tiocarbocianinas com cadeia *N*-alquílica usadas nos ensaios. .... 19

**Tabela 2** - Resumo dos resultados obtidos nos ensaios experimentais, ensaio de MTT e PCR em tempo real, representados nos gráficos das figuras 9 - 15. .... 33

## Lista de Acrónimos e Abreviaturas

ATP	Adenosina trifosfato
Br	Bromo
CAT	Catalase
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CH <sub>3</sub>	Metilo
Cis	Cisteína
COOH	Ácido carboxílico
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle médium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Desoxirribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT	Dithiothreitol (Ditiotreitol)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilenodiaminotetracético)
FBS	Fetal bovine serum (Soro fetal bovino)
Gli	Glicina
GSH	Glutationa
GSH-Px	Glutationa peroxidase
GSH-R	Glutationa redutase
GSSG	Glutationa oxidada
GSSG/GSH	Par glutationa oxidada/glutationa
GST	Glutationas S-transferases
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid [Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico]
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus type 1</i> (vírus da imunodeficiência humana de tipo 1)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
I	Iodo
IV	Infravermelho
kb	Kilo - bases
MAPEG	<i>Membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i> (Proteínas associadas à membrana no metabolismo de eicosanóides e glutationa)
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i> (Linha celular de adenocarcinoma mamário)
M-MLV	<i>Moloney-Murine Leukaemia Virus</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NHDF	<i>Neutral Human Dermal Fibroblasts</i> (Fibroblastos saudáveis da derme humana)
nm	Nanómetro
$O_2^{\cdot-}$	Anião superóxido
$OH^{\cdot}$	Radical hidroxilo
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> (Tampão de fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reação em cadeia de polimerase)
rRNA	Ácido ribonucleico ribossómico
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Roswell park memorial institute
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (Espécies reativas de oxigénio)
SH	Grupo tiol
SOD	Superóxido dismutase
UV	Ultravioleta
$\gamma$ GCS	$\gamma$ -glutamil-cisteína sintetase
$\gamma$ GT	$\gamma$ -glutamil transferase
$\lambda$	Comprimento de onda

## **I. Introdução**

## 1. Glutathione S-Transferase

As Glutathione S-Transferases (GST) são uma superfamília de enzimas multifuncionais ubíquias que desempenham um papel fundamental na fase II de biotransformação (Di Pietro et al., 2010; Parl, 2005). Metabolizam xenobióticos, agentes cancerígenos, químicos e poluentes ambientais. Para além destas características inerentes à sua função, desempenham um papel importante nos mecanismos de defesa da célula (Andonova et al., 2010; De Aguiar et al., 2012; Di Pietro et al., 2010). Nos seres humanos, em relação à sua localização celular, a superfamília das GSTs subdivide-se em três grandes famílias de proteínas: as citosólicas, as mitocondriais e as microsossomais (Di Pietro et al., 2010; Hayes et al., 2005; Ramalinho et al., 2011).

### 1.1. Classificação

As GSTs podem ser classificadas segundo dois critérios. O primeiro critério classifica-as de acordo com a sua localização celular. As citosólicas e as mitocondriais são enzimas solúveis, ao invés, as do tipo microsossomal que se encontram associadas à membrana e estão envolvidas, maioritariamente, no metabolismo dos eicosanóides e da glutathione (GSH) razão pela são designadas como *membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism* (MAPEG) (Hayes et al., 2005; Huber and Almeida, 2008; Ramalinho et al., 2011). O segundo critério de classificação é baseado na sequência homóloga e reatividade imunológica (Huber and Almeida, 2008).

As semelhanças na sequência de aminoácidos revelam que a estrutura genética e a reatividade imunológica cruzada das GSTs citosólicas humanas fizeram com que as mesmas fossem agrupadas em sete classes, designadas por alpha (GSTA, cinco membros), mu (GSTM, cinco membros), pi (GSTP, um membro), sigma (GSTS, um membro), theta (GSTT, dois membros), omega (GSTO, dois membros), e zeta (GSTZ, um membro) (Di Pietro et al., 2010; Parl, 2005; Ramalinho et al., 2011; Wu and Dong, 2012). As semelhanças entre as GSTs citosólicas indicam que, presumivelmente, surgiram de um ancestral comum. A sua especificidade e diversidade ao substrato têm sido alvo de estudo, sugerindo que a sua modificação se deve à existência da duplicação de genes, da recombinação genética e de uma acumulação de mutações (Parl, 2005). Refere-se, ainda, que as mesmas têm múltiplas isoformas e uma função amplamente citoprotetora (Andonova et al., 2010).

## 1.2. Distribuição e função fisiológica

As principais funções das GSTs estão associadas aos processos de metabolização e desintoxicação de substâncias químicas eletrófilas, tais como agentes carcinogêneos, poluentes e produtos do *stress* oxidativo (Andonova et al., 2010; Curran et al., 2000; Di Pietro et al., 2010; Hayes et al., 2005; Wu and Dong, 2012), responsáveis por causar danos no DNA e nos lípidos da membrana, facilitando a sua excreção pelo aumento da hidrofiliabilidade (Di Pietro et al., 2010; Hayes et al., 2005; Leme et al., 2010; Ramalhinho et al., 2012).

As GSTs também exercem um papel importante no metabolismo de eicosanóides, prostaglandinas e esteroides, e no catabolismo e apoptose da tirosina (Hayes et al., 2005; Wu and Dong, 2012). A classe das enzimas theta tem uma atividade sulfatase, enquanto que a classe zeta tem atividade maleilacetoacetato isomerase (Hayes et al., 2005; Wu and Dong, 2012). O papel no metabolismo de prostaglandinas é assegurado pela classe sigma, que atua como uma prostaglandina D-sintetase, um mediador de respostas alérgicas e inflamatórias, e a família MAPEG está envolvida na síntese de leucotrienos (Hayes et al., 2005; Wu and Dong, 2012). Este papel nos eicosanóides e prostaglandinas tem um grande impacto na expressão de genes, devido à ativação de diferentes vias reguladoras (Hayes et al., 2005; Wu and Dong, 2012). Enzimas da classe omega são cruciais na manutenção de ácido ascórbico no cérebro, uma vez que apresentam uma atividade desidroascorbato redutase (Hayes et al., 2005; Wu and Dong, 2012; Zhou et al., 2012).

Todas as classes têm uma propriedade peculiar, a capacidade de ligar vários não-substratos, como a bilirrubina, esteroides e xenobióticos. A ligação ocorre preferencialmente na interface do dímero. No entanto, quando um não-substrato está ligado, mesmo no local não ativo, o local ativo é afetado e leva à inibição ou inativação da enzima (Wu and Dong, 2012).

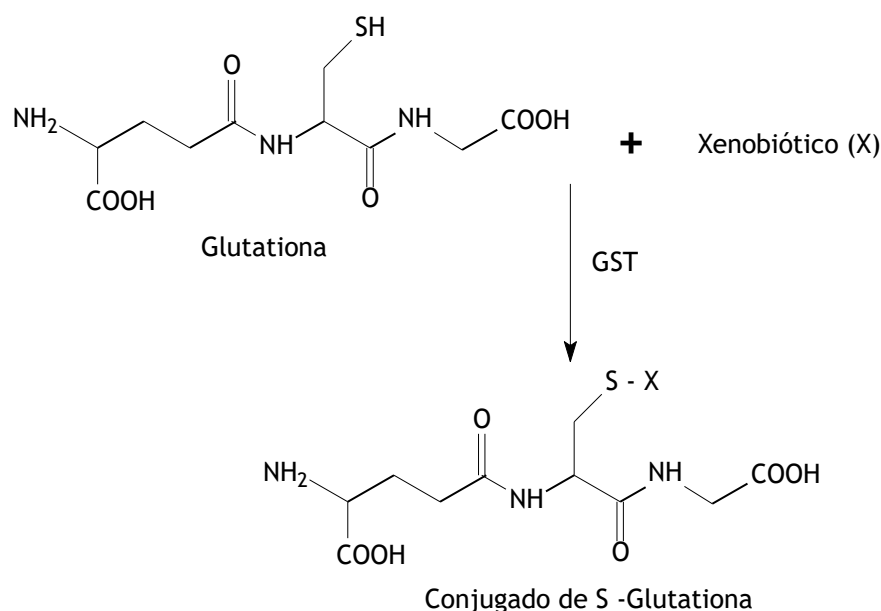
As GSTs são ubiquamente expressas pelas células. Contudo, nem todas as subclasses são expressas uniformemente por todos os tecidos, havendo diferenças ao nível da expressão e distribuição nos diferentes tecidos. Tomando como exemplo o tecido hepático, verifica-se que este expressa GSTM1 e GSTT1, o que não se verifica com a GSTP1 (Pettigrew and Colman, 2001).

## 1.3. Mecanismo de ação

A GSH é o tripéptido mais abundante nas células e é composto por três aminoácidos: glutamato, cisteína (Cis) e glicina (Gli). É sintetizada no citoplasma por ação de duas enzimas, a  $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetase ( $\gamma$ GCS) e a glutatona sintetase (Dringen, 2000; Hayes

et al., 2005), ambas requerem ATP (adenosina trifosfato) e são inibidas por elevadas concentrações de GSH (Dringen, 2000).

As GSTs catalisam a conjugação da GSH, como mostra a figura 1, com uma ampla variedade de compostos tóxicos, tanto endógenos como exógenos, que têm na sua estrutura grupos eletrófilos funcionais (Chirilă et al., 2014; Parl, 2005), como por exemplo, agentes cancerígenos, xenobióticos, poluentes ambientais e produtos do *stress* oxidativo (Andonova et al., 2010; Parl, 2005; Wu and Dong, 2012). As GSTs também podem participar em reações de isomerização e redução dos referidos compostos (Wu and Dong, 2012). A reação de conjugação minimiza os efeitos oxidativos que os radicais livres causam nas estruturas celulares, reduzindo-os a produtos mais estáveis e menos reativos, mais solúvel e mais fáceis de excretar (Andonova et al., 2010; Hayes et al., 2005; Ramalhinho et al., 2011; Wu and Dong, 2012).



**Figura 1** - Conjugação da glutaciona (GSH) com um xenobiótico (X) catalisada pela glutaciona S-transferase (GST), resultando na formação de um conjugado de S-glutaciona. (Adaptado de Townsend and Tew, 2003).

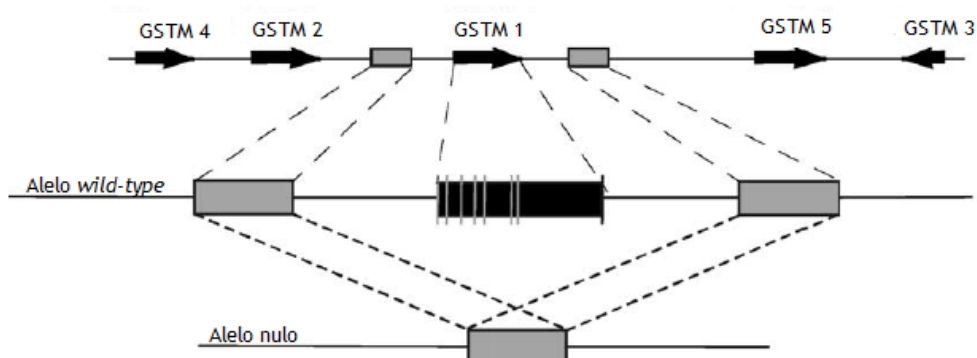
A reação de conjugação típica (figura 1) envolve a ativação do grupo tiol (-SH) da Cis para reagir com os compostos xenobióticos (Hayes et al., 2005; Pastore et al., 2003). Após a conjugação, seguem-se diversos passos para completar a excreção do substrato, sendo um deles a degradação da GSH nos aminoácidos que a constituem, pela  $\gamma$ -glutamil transferase ( $\gamma$ GT), este processo ocorre a nível extracelular (Dringen, 2000). No entanto, em algumas circunstâncias, os produtos resultantes desta reação são ainda mais reativos que o substrato (Hayes et al., 2005). Por exemplo, os halogenetos de alquilo de cadeia curta que contêm dois grupos funcionais (Hayes et al., 2005; Wheeler et al., 2001) e os 1,2-di-haloetanos

(Guengerich et al., 2003; Hayes et al., 2005) são grupos que podem levar a este efeito, pois resultam em conjugados de glutatona instáveis que possuem um centro eletrófilo capaz de modificar o DNA (Guengerich et al., 2003; Hayes et al., 2005; Wheeler et al., 2001).

#### 1.4. Localização cromossômica

Cada classe das GSTs tem a sua própria família de genes e cada uma está localizada em cromossomas diferentes. No caso das GSTs solúveis, a alfa está no cromossoma 6, a mu no cromossoma 1, a pi no cromossoma 11, a sigma no cromossoma 4, a theta no cromossoma 22, a omega no cromossoma 10 e a zeta no cromossoma 14 (Di Pietro et al., 2010; Mannervik et al., 2005; Strange et al., 2001; Townsend and Tew, 2003). Foram identificados diversos polimorfismos em vários desses genes. Contudo, toma-se como foco, para fazer parte do nosso estudo, aqueles que apresentam alelismo e que vão fazer parte do nosso estudo, ou seja, as classes mu e theta.

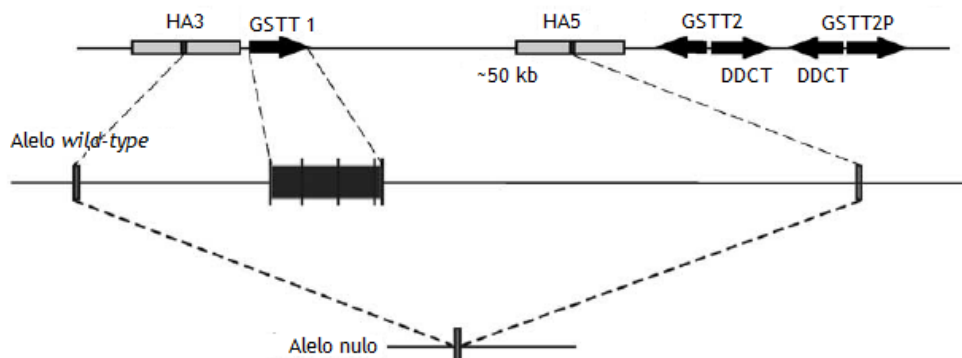
Os genes da classe mu são codificados por um grupo de genes em *cluster* de cerca de 100 kb que estão organizados em *tandem* (5'-*GSTM4-GSTM2-GSTM1-GSTM5-GSTM3*-3') no cromossoma 1p13.3, como mostra a figura 2 (Di Pietro et al., 2010; Parl, 2005; Strange et al., 2001).



**Figura 2** - Organização cromossômica dos genes da classe mu. O gene *GSTM1* é parte do *cluster* dos genes *GSTM*. Este (caixa preta) é composto por 8 exões, que variam em tamanho, de 36 a 112 pb, enquanto os intrões variam de 87 a 2641 bp. *GSTM1* está inserido numa região com uma extensa homologia, entre duas regiões idênticas, de 4.2 kb, que o flanqueiam (caixas cinzentas). O alelo nulo *GSTM1* surge por recombinação homóloga destas regiões (adaptado de Parl, 2005).

A deleção do gene *GSTM1* normalmente afeta ambos os alelos, ou seja, é uma deleção homozigótica, resultando num genótipo nulo do gene *GSTM1*, originando a ausência total de um produto funcional do gene, e, conseqüentemente, uma ausência total da respetiva atividade enzimática (Di Pietro et al., 2010; Leme et al., 2010; Parl, 2005; Ramalhinho et al., 2011).

A classe theta está localizada no cromossoma 22q11.2, contém dois genes, o *GSTT1* e *GSTT2*, que estão separados por cerca de 50 kb, como mostra a figura 3 (Di Pietro et al., 2010; Parl, 2005; Strange et al., 2001).



**Figura 3** - Organização cromossômica dos genes da classe theta. O gene *GSTT1* é parte do *cluster* dos genes *GSTT*. Este (caixa preta) é composto por cinco exões, que variam em tamanho, de 88 a 195 pb, enquanto os intrões variam de 205 a 2363 pb. O gene *GSTT1* é incorporado numa região com extensa homologia, entre duas regiões idênticas, de 18 kb, HA3 e HA5 (caixas cinzas), que o flanqueiam. O alelo nulo *GSTT1* surge por recombinação homóloga destas regiões (adaptado de Parl, 2005).

O gene *GSTT1* tem uma variante genética que consiste numa deleção completa de todo o gene (genótipo nulo), conduzindo à ausência total da proteína codificada e, conseqüentemente, à inexistência da atividade enzimática (Di Pietro et al., 2010; Leme et al., 2010; Parl, 2005; Ramalinho et al., 2011).

### 1.5. Polimorfismos estudados

Os polimorfismos genéticos em genes relacionados com o metabolismo de xenobióticos, tais como, os genes da superfamília da GST (*GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1*), têm sido associados com um risco aumentado de cancro da mama (De Aguiar et al., 2012; Masoodi et al., 2012; Ramalinho et al., 2011). As isoenzimas *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* estão presentes em ambos os tecidos, normais e tumorais, da mama, sendo das classes mais bem estudadas (Ramalinho et al., 2011).

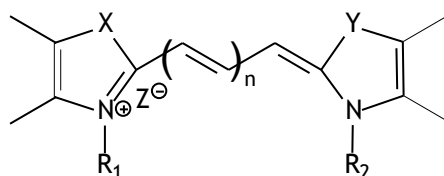
A deleção dos genes *GSTM1* e *GSTT1* afeta, na maioria das vezes, ambos os alelos (genótipo nulo), estas variantes de deleção conduzem a uma ausência total da proteína codificada, com conseqüente perda completa da atividade enzimática, favorecendo mecanismos que aumentam a suscetibilidade ao cancro (Leme et al., 2010; Masoodi et al., 2012; Ramalinho et al., 2011). A frequência do polimorfismo do gene *GSTM1* afeta entre 20% a 50% da população que possui uma deleção homozigótica do gene, o que resulta na não expressão do seu produto, sendo a frequência mais alta em caucasianos, asiáticos e árabes do que em

africanos. No que diz respeito ao *GSTT1*, o alelo nulo foi observado com uma frequência de 20% a 60%, em diferentes populações humanas, sendo a frequência mais alta em asiáticos do que em caucasianos (De Aguiar et al., 2012; Di Pietro et al., 2010; Leme et al., 2010; Parl, 2005).

## 2. Cianinas

Em 1856, William Perkin marcou a indústria da síntese de corantes com a descoberta da mauveína, o primeiro corante sintético com algum interesse comercial (Abrahart et al., 1968; Zollinger et al., 1991). No mesmo ano foi acidentalmente obtida, em laboratório, uma substância colorida preparada por Greville Williams, ao aquecer quinolina, que continha lepidina como impureza, com iodeto de isoamilo e hidróxido de sódio. Esta substância foi designada de cianina por apresentar um intensa cor azul, vindo o seu nome do grego *Kyanos*, que significa azul-escuro (Mishra et al., 2000; Zollinger et al., 1991). Desde então, o termo cianina tornou-se o nome geral deste tipo de corantes, apesar de apresentarem um número infundável de cores, as quais dependem das suas características estruturais. Mais tarde, em 1873, H. W. Vogel começou a usar cianinas como sensibilizadores fotográficos e com grande sucesso. Foi esta aplicação que levou a um aumento da procura destes corantes, provocando assim um grande desenvolvimento neste tipo de compostos (Hamer, 1964).

As cianinas enquadram-se nos corantes polimetínicos (Almeida, 1999; Hamer, 1964; Panigrahi et al., 2012) e são caracterizadas por possuírem, na sua constituição, dois núcleos heterocíclicos com um átomo de azoto cada, ligados por uma cadeia com um ou mais grupos metino, como se pode verificar na figura 4 (Boto et al., 2009; Carmona et al., 2015; Mishra et al., 2000; Panigrahi et al., 2012). Os núcleos heterocíclicos mais comuns apresentam anéis de benzotiazole, benzoxazole, benzimidazole, indole e quinolina (Panigrahi et al., 2012). Estes corantes têm diferentes designações dependendo do comprimento da cadeia metínica,  $n$ , que pode ter valores de 0, 1, 2, 3 ou mais, referentes ao número de grupos metino na cadeia conjugada. Podem ser designadas de cianinas ou monometinocianinas ( $n=0$ ), carbocianinas ou trimetinocianinas ( $n=1$ ), dicarbocianinas ou pentametincianinas ( $n=2$ ), tricarbocianinas ou heptametincianinas ( $n=3$ ), e assim sucessivamente. É ainda de referir que o comprimento da cadeia e a instabilidade aumentam na mesma relação, ou seja, quanto maior for a cadeia metínica mais instável tende a ser a cianina (Hamer, 1964).



X = Y ou X ≠ Y = S, Se, O, C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, CH=CH, etc.

R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> ou R<sub>1</sub> ≠ R<sub>2</sub> = alquilo ou alquilsustituído

Z = I, Br, Cl, Tos, ClO<sub>4</sub>, etc.

n = 0, 1, 2, 3, etc

Figura 4 - Estrutura geral das cianinas (Adaptado de Almeida, 1999).

## 2.1. Características

As cianinas são amplamente utilizadas devido ao baixo custo dos corantes sintéticos, à sua resistência, à degradação biológica e química (Silva et al., 2013) e por serem facilmente sintetizadas (Almeida, 1999). Para além disso, costumam apresentar elevada fluorescência e estabilidade (Almeida, 1999), altos valores de coeficientes de extinção molar (Carmona et al., 2015; Fu et al., 2009; Owens et al., 2015) e uma vasta gama de comprimento de onda ( $\lambda$ ) de absorção máxima (Fu et al., 2009; Hamer, 1964; Voznyak et al., 2010). Estes compostos, absorvem radiação no espectro eletromagnético, desde o ultravioleta (UV) até ao infravermelho (IV), passando por todas as cores da região do visível, podendo assumir valores desde os 340 aos 1400 nm, (Almeida, 1999; Carmona et al., 2015; Owens et al., 2015).

## 2.2. Aplicações

A principal aplicação destes corantes, ao contrário do sentido imperativo da palavra, não é como agentes de coloração, mas sim como corantes funcionais. As cianinas apresentam um campo alargado de aplicações, uma vez que podem sofrer uma grande variedade de alterações estruturais (Matsuoka, 1990). Algumas dessas alterações podem induzir a aplicação destes compostos na alta tecnologia, nomeadamente, na fotografia, como sensibilizadores fotográficos à luz, não só no visível, mas também no infravermelho (Almeida, 1999; Owens et al., 2015). Uma das aplicações na área da medicina, onde este tipo de compostos têm sido bastante estudados, é na terapia fotodinâmica, no tratamento de tecidos tumorais (Bazylińska et al., 2012; Wezgowiec et al., 2013; Wilk et al., 2012). Contudo, estes compostos também têm sido estudados como marcadores fluorescentes para biomoléculas, incluindo proteínas específicas do HIV-1 (Almeida, 1999); como agente anti-tumoral, embora com atividade relativamente baixa, (Panigrahi et al., 2012); como sondas fluorescentes na deteção e sequenciação de ácidos nucleicos (Deligeorgiev et al., 2011; Lopalco et al., 2009; Owens et al., 2015); na citometria de fluxo (Lopalco et al., 2009) e, até mesmo, como ligandos, para a

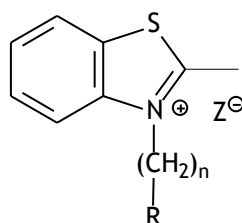
separação de biomoléculas por cromatografia de afinidade (Almeida, 1999; Boto et al., 2009). Outra aplicação inerente é a sua utilização em tintas industriais (Panigrahi et al., 2012) e como indicadores em titulações ácido-base (Almeida, 1999).

### 2.3. Compostos em estudo

As cianinas podem ser sintetizadas como simétricas ou assimétricas. As simétricas têm dois grupos heterocíclicos e cadeias laterais iguais, enquanto que as assimétricas podem conter dois núcleos heterocíclicos ou cadeias laterais diferentes (Yarmoluk et al., 2008).

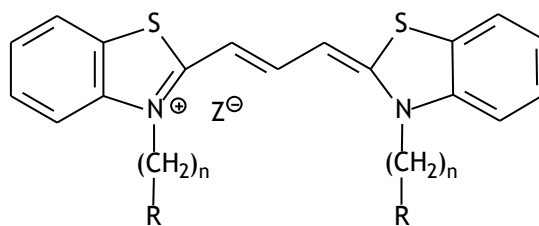
Ao longo de todos estes anos, foram muitas as cianinas sintetizadas e aplicadas nas diversas áreas. Mais recentemente, este tipo de compostos têm sido utilizados em estudos, direcionados para o tratamento de cancro (Bazylińska et al., 2012; Wezgowiec et al., 2013). Neste trabalho, foram estudados um conjunto de tiocarbocianinas simétricas com cadeias *N*-alquílicas e *N*-carboxialquílicas de vários tamanhos, bem como os sais de amónio quaternários, seus precursores. Estes compostos foram anteriormente sintetizados na Universidade da Beira Interior, por Boto e colaboradores (Boto et al., 2001; Boto et al., 2007).

Os sais de amónio quaternário em estudo eram muito semelhantes, sendo derivados do 2-metilbenzotiazole com cadeias *N*-alquílicas ou *N*-carboxialquílicas com vários comprimentos da cadeia ( $n=1, 2, 4$  e  $10$ ), tal como representado na figura 5.



**Figura 5** - Estruturas dos sais de amónio quaternário. Quando  $R=CH_3$  e  $Z=I$  são sais de amónio quaternários com cadeias *N*-alquílicas, se  $R=COOH$  e  $Z=Br$  são sais de amónio quaternários com cadeias *N*-carboxialquílicas. Sendo que  $n$  pode tomar valores de 1, 2, 4 e 10 (Adaptado de Boto et al., 2001; Boto et al., 2007).

As estruturas das tiocarbocianinas estudadas, figura 6, são em tudo análogas às dos sais de amónio quaternário, variando apenas o grupo R. As tiocarbocianinas com cadeias *N*-alquílicas têm associado um grupo  $CH_3$  na cadeia lateral, já as tiocarbocianinas com cadeias *N*-carboxialquílicas têm um grupo  $COOH$  na cadeia lateral. Dentro dos dois tipos de tiocarbocianinas há diferentes compostos 1-4, onde foi variado o comprimento da cadeia, o composto 1 toma valor para  $n=1$ , o 2 para  $n=2$ , o 3 para  $n=4$  e o 4 para  $n=10$ .



**Figura 6** - Estruturas das tiocarbocianinas. Quando R=CH<sub>3</sub> e Z=I são tiocarbocianinas com cadeias *N*-alquílicas, se R=COOH e Z=Br são tiocarbocianinas com cadeias *N*-carboxialquílicas. Sendo que n pode tomar valores de 1, 2, 4 e 10 (Adaptado de Boto et al., 2001; Boto et al., 2007).

### 3. Stress oxidativo

Os radicais livres são moléculas ou grupos funcionais da molécula que têm um ou mais elétrons desemparelhados. Estes elétrons conferem um grau de reatividade ao radical livre, uma vez que tornam estas espécies químicas instáveis e reativas. Os radicais derivados de oxigênio representam a classe mais importante de espécies de radicais geradas (Fang et al., 2002; Valko et al., 2007).

Em organismos aeróbios, os radicais livres são produzidos durante o funcionamento normal das células, na maior parte sob a forma de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Fang et al., 2002; Valko et al., 2007). Os radicais livres são removidos, em grande parte, pelas defesas antioxidantes. A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal do organismo (Valko et al., 2007). Em concentrações baixas ou moderadas, as ROS podem ser benéficas para a célula, pois estão envolvidos em vários processos fisiológicos de sinalização e de regulação (Gutowski and Kowalczyk, 2013; Valko et al., 2007). Quando este equilíbrio é afetado, devido à produção excessiva de ROS ou a uma deficiência nas defesas antioxidantes da célula, há um aumento da produção de radicais livres, resultando em *stress* oxidativo (Kumaraguruparan et al., 2002). Nestas situações, os radicais livres em excesso podem oxidar e danificar lípidos celulares, proteínas e ácidos nucleicos, inibindo a sua função normal, conduzindo a várias doenças (vários tipos de cancro, diabetes, doenças cardiovasculares), estando também ligado ao envelhecimento (Gutowski and Kowalczyk, 2013; Valko et al., 2007).

A produção de radicais livres é impossível de evitar, uma vez que as principais vias metabólicas no ser humano produzem estes compostos. A produção destas espécies, tais como o anião superóxido (O<sub>2</sub><sup>-•</sup>), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radical hidroxilo (HO<sup>•</sup>), surgem da redução parcial do O<sub>2</sub>, uma consequência da fosforilação oxidativa, que ocorre na mitocôndria através da cadeia respiratória, composta por proteínas transmembranares existentes na membrana interna mitocondrial. A formação de ROS ocorre perto da membrana, o que

reverte num fácil acesso aos lípidos da membrana, especialmente sensíveis a fenómenos de ataques de radicais livres (Gutowski and Kowalczyk, 2013; Valko et al., 2007). A produção de ROS também pode ocorrer através da 5-lipoxigenase, ciclo-oxigenase, reações catalisadas pelo citocromo P450 e xantina oxidase. Mesmo quando combinado com as proteínas de defesa antioxidante, a degradação destas espécies pode resultar em produtos que são citotóxicos e mutagénicos (Hayes et al., 2005; Sureda et al., 2005). A mitocôndria é então uma das principais fontes de ROS e também um local sensível à sua ação destrutiva, pois é um dos primeiros alvos, sendo, também, um dos locais da célula onde existe maior número de defesas antioxidantes (Abreu et al., 2000; McCord, 2000).

### 3.1. *Stress oxidativo e as GST*

A exposição do organismo a radicais livres levou-o a desenvolver mecanismos de defesa para os eliminar. Estas defesas são a resposta da evolução à necessidade da existência de radicais de oxigénio em condições de vida aeróbia, podendo ser enzimáticas ou não enzimáticas. As defesas antioxidantes enzimáticas estão distribuídas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular, como por exemplo, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Px). Entre as defesas antioxidantes não enzimáticas destacam-se compostos como a GSH, vitamina E, ácido ascórbico (vitamina C), ácido lipóico, carotenóides e flavonóides (Akimoto et al., 2010; Fang et al., 2002; Gutowski and Kowalczyk, 2013; Valko et al., 2007).

As enzimas da fase II de desintoxicação são os agentes mais importantes para atenuar os seus efeitos. Portanto, a GSH e as GSTs são muito importantes para manter o equilíbrio oxidativo. A GSH é muito abundante no meio intercelular, sendo o seu principal antioxidante. Como defesa antioxidante, desempenha várias funções. É um quelante de radicais livres ( $\text{OH}\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), quer reagindo diretamente com estes, quer indiretamente como co-fator de enzimas antioxidantes, como por exemplo a GSH-Px. No processo de neutralização dos radicais livres, a GSH é oxidada, levando a formação do radical  $\text{GS}\cdot$ , este também é reativo mas rapidamente reage com um segundo radical  $\text{GS}\cdot$ , formando a molécula de glutatona oxidada (GSSG). A GSSG é novamente reduzida a duas GSH pela enzima glutatona redutase (GSH-R). A GSH é utilizada para regenerar outras moléculas antioxidantes, a vitamina C e a vitamina E, esta capacidade está ligada ao estado *redox* do par glutatona oxidada/glutatona (GSSG/GSH) (Pastore et al., 2003). A GSH também pode reagir com uma grande variedade de xenobióticos eletrófilos, conjuntamente com a enzima GST, tornando-os mais solúveis e mais fáceis de excretar (Andonova et al., 2010; Chirilă et al., 2014; Fang et al., 2002; Hayes et al., 2005; Parl, 2005; Ramalhinho et al., 2011; Valko et al., 2007; Wu and Dong, 2012).

Em 2001, Ambrosone e colaboradores descreveram que doentes com cancro da mama que receberam terapia de radiação e quimioterapia, sofreram aumentos significativos nos níveis de ROS. Se associarmos este facto com a inexistência de atividade enzimática e um aumento da suscetibilidade ao cancro da mama, promovidos pelas deleções nos genes *GSTM1* e *GSTT1*, (Leme et al., 2010; Masoodi et al., 2012; Ramalinho et al., 2011), pode-se sugerir que pessoas com cancro da mama têm maior hipótese de apresentarem défice destas enzimas antioxidantes e como a terapêutica existente para o tratamento de cancro provoca uma produção exagerada de ROS, são necessárias novas terapêuticas para evitar a produção desregulada de compostos tóxicos, minimizando possíveis danos nos órgãos saudáveis do indivíduo.

### **3.2. Stress oxidativo e as cianinas**

O mecanismo de ação dominante das cianinas é a superprodução de ROS, devido à interação com substratos biológicos ou com o oxigénio molecular, induzindo *stress oxidativo* às células. As ROS vão reagir com lípidos, proteínas e DNA, causando lesões nos tecidos cancerígenos (Wezgowiec et al., 2013; Wilk et al., 2012). Apesar deste mecanismo ser favorável para a morte das células cancerígenas, a peroxidação lipídica é prejudicial, pois a sua propagação leva à formação de outros radicais que podem provocar danos superiores aos provocados pelas ROS (Wilk et al., 2012).

O grupo de compostos em estudo, tal como foi referido no ponto 2, apresentam diferenças estruturais e, como tal, deverão promover diferentes níveis de *stress oxidativo* às células.

## **II. Objetivos**

Este trabalho tem como objetivo principal estudar o efeito das diversas cianinas e seus precursores em culturas de células humanas.

Para alcançar este objetivo, desenvolveram-se, os seguintes estudos:

- Otimização dos protocolos experimentais para a determinação da viabilidade celular;
- Ação das diferentes cianinas na viabilidade celular em células epiteliais cancerígenas (MCF-7) e em fibroblastos saudáveis da derme humana (NHDF);
- Ação das diferentes cianinas na expressão dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1*.

### **III. Materiais e Métodos**

## 1. Linhas celulares

Uma linha celular permite definir uma população de células que são mantidas em cultura por um determinado período de tempo, consideradas células imortalizadas. Estas células são retiradas do tecido e são modificadas para proliferarem indefinidamente, permitindo que sejam usadas muitas vezes (Gstraunthaler, 2003). Para a realização deste estudo, foram utilizadas 2 linhas celulares distintas: células epiteliais humanas de cancro da mama (MCF-7) e fibroblastos saudáveis da derme humana (NHDF).

As MCF-7 são uma linha celular de células epiteliais, isoladas a partir de uma efusão pleural de uma mulher caucasiana de 69 anos com cancro da mama metastático. MCF-7 é o acrónimo de *Michigan Cancer Foundation-7*, referindo-se ao instituto onde estas células foram isoladas pela primeira vez. Esta linha celular deriva de um adenocarcinoma mamário humano. As células possuem características aderentes e crescimento em monocamada (Levenson and Jordan, 1997).

As NHDF são fibroblastos saudáveis derivados da derme humana (Haczynski et al., 2002). Estas possuem características aderentes, mas ainda não se encontram completamente caracterizadas.

### 1.1. Cultura de células

As linhas celulares MCF-7 foram mantidas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose* (DMEM, Sigma-Aldrich®, USA), 10% de Soro fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich®, USA) e 1% de antibiótico e antifúngico num frasco de cultura.

As linhas celulares NHDF foram mantidas em *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI, Sigma-Aldrich®, Missouri, USA), 10% de FBS, 1% de antibiótico e antifúngico, 10 nM de HEPES (Sigma-Aldrich®, Missouri, USA), 20 nM de L-glutamina (Sigma-Aldrich®, Missouri, USA) e 1 nM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich®, Missouri, USA) num frasco de cultura.

Após preparação, cada um dos meios foi esterilizado através da filtração por uma membrana com um poro de 0,2 µm e diâmetro de 50 mm, e sistema de vácuo em câmara de fluxo laminar vertical. Para utilização dos meios de cultura nas linhas celulares, foi necessário um aquecimento prévio num banho de água a 37°C. O armazenamento dos mesmos foi a uma temperatura de 4°C.

Os ensaios decorreram com as duas linhas celulares numa incubadora AutoFlow DHD CO<sub>2</sub> Air-Jacketed Incubator (NuAire, USA) a 37°C com uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 95% Ar. O meio

de cultura foi substituído a cada 2 a 3 dias e as células foram divididas por novos frascos de cultura quando atingiam uma confluência de 80-90%.

## 1.2. Passagem de células

O processo de passagem celular efetuou-se sempre que a confluência atingiu cerca de 80-90% e, desta forma, permitiu diminuir a densidade celular para assegurar a expansão contínua da linha celular. Visto que as células MCF-7 e NHDF são aderentes, há necessidade de as retirar, com adição de tripsina. Aspirou-se o meio de cultura e adicionou-se tripsina-EDTA 0,025% (Sigma-Aldrich®, Missouri, USA), num volume suficiente para cobrir as células, deixando-a atuar entre 3 a 5 minutos. Quando as células se encontravam em solução, por observação microscópica, recolheu-se a suspensão para um tudo *falcon* com meio de cultura, o dobro do volume usado de tripsina, de forma a parar a ação da enzima. Centrifugou-se durante 8 minutos a 1000 rpm e a uma temperatura de 25°C. De seguida, aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* celular em meio de cultura. A suspensão celular resultante foi dividida por novos frascos de cultura e estes colocados na incubadora.

## 1.3. Contagem de células

A contagem celular foi efetuada quando a confluência atingiu cerca de 80-90%, podendo realizar-se sempre que as células se encontrem em suspensão. Assim, retiraram-se 10 µL da suspensão celular, adicionou-se igual volume de Azul de Tripano e homogeneizou-se. Da mistura colocaram-se 20 µL na câmara de *Neubauer* (Marienfeld, Germany) de forma a contar as células viáveis. Após contagem das células nos diferentes quadrantes, estimou-se o número de células por mL e o número total de células no frasco de cultura, através das seguintes fórmulas:

$$\text{N}^\circ \text{ Células/mL} = \text{Média de células nos quadrantes} \times 2 \times 10^4$$

$$\text{N}^\circ \text{ Total Células} = \text{N}^\circ \text{ Células/mL} \times \text{Volume de ressuspensão celular}$$

#### 1.4. Armazenamento de células

O armazenamento a longo termo é efetuado através de congelamento de células, de modo a assegurar a eternização da linha celular. Para tal, foi necessário proceder à adição de tripsina, como descrito anteriormente. As células foram diluídas em meio de cultura e adicionou-se um reagente crioprotector (dimetilsulfóxido - DMSO), que previne a formação de cristais de água capazes de lisar as células. Numa primeira fase, as alíquotas de células foram mantidas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante uma hora, passando depois para  $-80^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram *overnight*, sendo posteriormente armazenadas em azoto líquido ( $-180^{\circ}\text{C}$ ).

O processo de descongelamento envolveu a ressuspensão das células criopreservadas em meio de cultura suplementado com 10% FBS e 1% de antibiótico e antifúngico (DMEM caso se tratasse da linha celular MCF-7 ou RPMI caso se tratasse da linha celular NHDF), após o descongelamento à temperatura ambiente. De seguida, a ressuspensão foi centrifugada durante 8 minutos a 1000 rpm, aspirou-se o sobrenadante e lavaram-se novamente as células em meio de cultura. Após uma centrifugação durante 8 minutos a 1000 rpm, procedeu-se à cultura celular, como descrito anteriormente.

## 2. Ensaio de viabilidade celular - MTT

A viabilidade das células MCF-7 e NHDF foi quantificada utilizando o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) (MTT; Sigma-Aldrich®, Missouri, USA). O sal MTT é reduzido pelas desidrogenases das células para um precipitado insolúvel em água que foi solubilizado com a adição de DMSO. Este é um ensaio colorimétrico descrito como um método muito útil para a quantificação da viabilidade e proliferação celular *in vitro* (Van Meerloo et al., 2011).

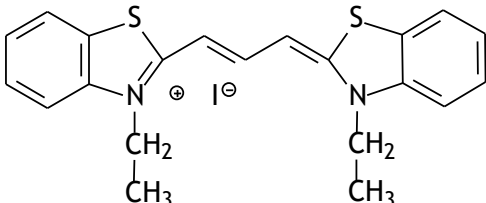
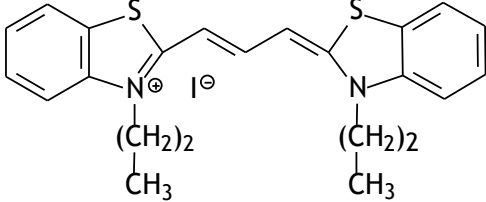
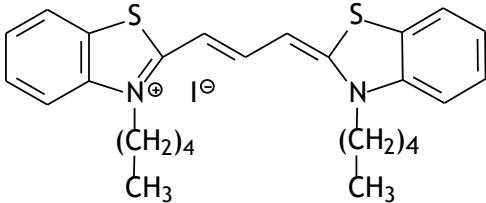
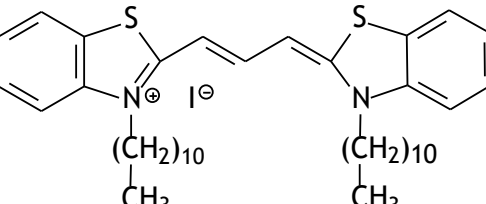
Numa primeira fase as concentrações dos compostos foram otimizadas testando-se diferentes concentrações para cada um dos compostos: 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , tendo as experiências sido efetuadas em triplicado. A concentração escolhida foi a de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e apenas um dos compostos foi selecionado, as tiocarbocianinas com cadeia *N*-alquílica.

Após as linhas celulares serem incubadas (os tempos de incubação estão presentes na figura 8) com 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dos quatro diferentes compostos das tiocarbocianinas de diferentes tamanhos com cadeia *N*-alquílica (Tabela 1), o meio de cultura dos poços foi aspirado e aplicou-se a solução de MTT (com uma concentração de 0,5 mg/mL em tampão de fosfato salino - PBS). Esta solução esteve em contacto com as células durante 3 horas, a  $37^{\circ}\text{C}$  com uma atmosfera de 5%  $\text{CO}_2$  e 95% Ar e desprovida de luz.

Após a exposição à solução de MTT, aspirou-se o conteúdo existente na placa e colocou-se em cada poço 200  $\mu\text{L}$  de DMSO e 20  $\mu\text{L}$  de tampão Gli. O DMSO permite a solubilização dos cristais de formazano, de forma a obtermos cor, e o tampão Gli permitiu estabilizar a cor obtida. Depois, transferiu-se o conteúdo de cada poço para uma microplaca de 96 poços, que foi introduzida no leitor de microplacas xMark™ (Microplate Spectrophotometer, Bio-Rad®, California, USA). A cor desenvolvida foi quantificada a uma densidade ótica de 570 nm.

Foi realizada uma leitura para todos os compostos estudados. Cada um dos compostos em estudo foi testado em triplicado; obtivemos três valores de absorvência para cada concentração estudada, para os quais foi calculada a média e o desvio padrão respectivo.

**Tabela 1** - Estrutura das tiocarbocianinas com cadeia *N*-alquílica usadas nos ensaios.

Tiocarbocianinas	Estrutura
1	
2	
3	
4	

### 3. RNA total

Realizou-se extração de RNA total a partir de células MCF-7 e NHDF. Todo o procedimento foi realizado em gelo para diminuir a degradação enzimática por ribonucleases (RNases) e para se conseguir obter sequências de RNA íntegras. Trabalhar com RNA exige um certo cuidado, principalmente, devido à degradação enzimática, como já referido, pelo que é necessário utilizar fortes agentes desnaturantes, que efetuem lise celular e inativem as RNases, e água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC).

#### 3.1. Extração de RNA total

A extração de RNA total foi efetuada utilizando *TRizol*® *Reagent* (Life Technologies™, California, USA), uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato, de acordo com as recomendações do fabricante (1 mL *TRizol*/10 cm<sup>2</sup> de área de superfície). Assim, adicionou-se *TRizol* a cada poço da placa com células e homogeneizou-se manualmente de forma a permitir o rompimento celular e a dissolução de vários componentes celulares. Após uma incubação durante 10 minutos à temperatura ambiente, que permitiu a completa dissociação de complexos de nucleoproteínas, transferiu-se para um microtubo de 1,5 mL, e centrifugou-se (MIKRO 200R, Hettich Zentrifugen, Germany) a 4°C durante 10 minutos a 12000 g. Após centrifugação, adicionou-se clorofórmio (200 µL de clorofórmio/1 mL de *TRizol*) e homogeneizou-se a amostra no vórtex. As amostras foram então incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas posteriormente a 4°C durante 20 minutos a 12000 g. Após centrifugação, a solução separou-se em três fases: no fundo do tubo obteve-se a fase orgânica (cor rosada) contendo as proteínas e resíduos de fenol e clorofórmio; a interfase contendo o DNA; e a fase aquosa (transparente), contendo o RNA. Deste modo, a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo de 1,5 mL, ao qual se adicionou isopropanol (500 µL de isopropanol/1 mL de *TRizol*) e misturou-se por inversão, de forma a permitir a recuperação do RNA por precipitação. Após incubação durante 30 minutos a -20°C e 5 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se a 4°C durante 20 minutos a 12000 g, tendo-se rejeitado o sobrenadante. O RNA, sob a forma de um precipitado branco (*pellet*), foi lavado com 500 µL de etanol 75% em água DEPC (-20°C), centrifugou-se a 4°C durante 10 minutos a 7500 g. Por fim, retirou-se o etanol excedente e deixou-se secar o precipitado ao ar. Após este período, o precipitado de RNA total foi re-hidratado em água DEPC e foi a incubar a 60°C durante 10 minutos. O RNA total foi armazenado a -80°C para posterior utilização.

### 3.2. Determinação da Integridade do RNA total

A integridade do RNA total foi avaliada por eletroforese do RNA total em gel de agarose a 1% (Lonza Walkersville Inc, Walkersville, USA) corado com *GreenSafe* (NZYTech®, Lisboa, Portugal). A qualidade do RNA foi confirmada pela presença de 2 bandas de rRNA - 18S e 28S - em que a banda 28S apresenta o dobro da intensidade da 18S. Caso o RNA estivesse degradado, esta proporção estaria alterada, podendo mesmo observar-se arrastamento. Para efetuar este procedimento preparou-se um gel de agarose a 1% em Tampão TAE 1x diluído em água DEPC ao qual se adicionaram 20 µL de *GreenSafe*, agente intercalante dos ácidos nucleicos. As amostras foram preparadas com 2 µL de amostra de RNA, 8 µL de H<sub>2</sub>O estéril e 2 µL de Loading Buffer 10x, e depositadas no gel. Após a corrida da eletroforese a 100 V durante 30 minutos no *PowerPac™ Universal Power Supply* (Bio-Rad®, California, USA), visualizou-se o gel no transiluminador *UVITEC* (UVitec®, Cambridge, UK).

### 3.3. Quantificação do RNA total

A quantificação do RNA total foi realizada utilizando o nanoespectrofotómetro *Nanophotometer™* (Implen, Germany), que fornece diretamente a concentração de RNA total (µg/µL) e a razão A260/A280, que indica o grau de pureza do RNA total com base na leitura de absorvência a 260 e 280 nm, comprimentos de onda aos quais os ácidos nucleicos e as proteínas absorvem. Considera-se que o RNA total está puro quando a razão entre as absorvências se encontrar no intervalo entre 1,8 e 2,1.

## 4. Transcrição Reversa

A síntese de DNA complementar (cDNA) é feita com uma transcriptase reversa que atua no RNA, sendo necessária a presença de iniciadores de síntese (*primers*). O cDNA é sintetizado a partir da transcrição reversa do mRNA, obtendo-se uma cópia exata dos genes expressos, sem intrões. A transcrição reversa do mRNA deste trabalho foi realizada usando a enzima *M-MLV Reverse Transcriptase* (NZYTech®, Lisboa, Portugal), seguindo as instruções do fabricante. Primeiro, colocou-se por amostra 2,5 µL de *Random Primer* (NZYTech®, Lisboa, Portugal) e 1 µL de dNTP (10 mM, Fermentas, Massachusetts, USA), em cada tubo de PCR. De seguida, adicionaram-se 1 µg de RNA total extraído de cada amostra, perfazendo um volume total de 12,5 µL com água estéril. Os tubos foram então colocados no termociclador (T100™ Thermal Cycler, Bio-Rad®, California, USA) a 65°C durante 5 minutos após os quais permaneceram a 37°C. De seguida preparou-se uma MIX num microtubo de 1,5 mL, com 2 µL de 10x *Reaction Buffer Reverse Transcriptase* (NZYTech®, Lisboa, Portugal), 1 µL de Dithiothreitol (DTT: 0,1

M) e 1  $\mu\text{L}$  de *M-MLV Reverse Transcriptase* (NZYTech®, Lisboa, Portugal) por cada amostra. Adicionaram-se 4  $\mu\text{L}$  da MIX a cada tubo PCR e seguiram-se uma série de incubações: a 25°C durante 10 minutos e a 37°C durante 50 minutos. Finalmente, a reação foi parada com uma incubação a 70°C durante 15 minutos e o cDNA foi armazenado a -20°C para posterior utilização.

## 5. PCR em Tempo Real

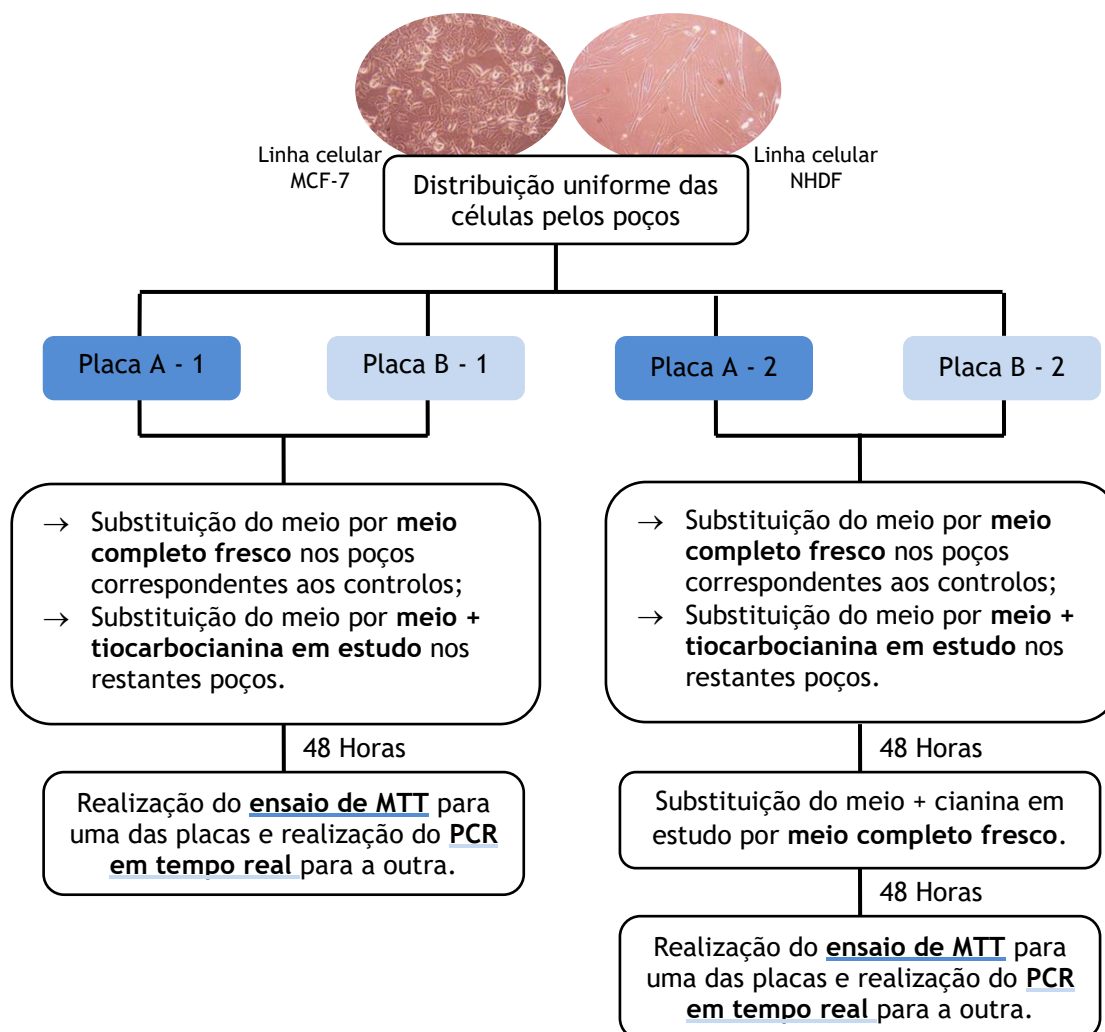
A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em tempo real permitiu quantificar a expressão relativa dos genes *GSTT1* e *GSTM1*. As condições usadas já tinham sido otimizadas pelo nosso grupo de investigação. O gene da 2- $\beta$  microglobulina foi utilizado como controlo endógeno para normalizar os níveis de expressão dos genes. Por cada análise, adicionaram-se à placa (Bio-Rad®, California, USA), figura 7, 10  $\mu\text{L}$  de *SYBR®Green* (Fermentas, Massachusetts, USA), 1  $\mu\text{L}$  de *primer forward* e 1  $\mu\text{L}$  de *primer reverse*, diluídos 1:20, 1  $\mu\text{L}$  cDNA e perpez-se com água estéril para um volume de 20  $\mu\text{L}$ . As condições de amplificação utilizadas foram as seguintes: desnaturação do DNA a partir de 95°C durante 3 minutos, seguido por 50 ciclos de amplificação (consistindo na desnaturação a 95°C durante 15 segundos, emparelhamento a 58°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos) num termociclador iQ™5 (Bio-Rad®, California, USA). Os dados foram tratados através do modelo matemático proposto por Pfaffl:  $2^{-(\Delta\Delta\text{Ct})}$  (Pfaffl, 2001), o que permite a determinação das diferenças significativas entre as células tratadas e não tratadas (controlos), tendo em conta a normalização do gene de referência, 2- $\beta$  microglobulina.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	2	2	2	3	3	3	4	4	4
B	5	5	5	6	6	6	7	7	7	8	8	8
C	9	9	9	10	10	10	11	11	11	12	12	12
D	13	13	13	14	14	14	15	15	15	1	2	3
E	16	16	16	17	17	17	18	18	18	19	19	19
F	20	20	20	21	21	21	22	22	22	23	23	23
G	24	24	24	25	25	25	26	26	26	27	27	27
H	28	28	28	29	29	29	30	30	30			

**Figura 7 - Desenho da placa de PCR em Tempo Real.** Os poços representados pelos quadrados eram relativamente aos genes alvos, *GSTT1* e *GSTM1*, e ao gene endógeno, 2- $\beta$  microglobulina. Os poços com um quadrado girado no interior representam os controlos negativos, em que cDNA tinha sido substituído por água. A numeração representa as diferentes amostras com cada um dos genes, cada amostra com cada gene foi realizada em triplicado.

## 6. “Flowchart” da experiência

Os ensaios de viabilidade celular e de PCR em tempo real foram feitos do seguinte modo:



**Figura 8** - Esquema das experiências realizadas, ensaio de MTT (placas A) e PCR em Tempo Real (placas B). Para cada experiência foram usadas duas placas, as placas 1 correspondem à incubação com a cianina em estudo, e as placas 2 dizem respeito ao período de recuperação. Tanto o período de incubação como o de recuperação foi de 48 horas.

## 7. Análise Estatística

Todos os resultados apresentados foram expressos com média e desvio padrão, e para a análise dos mesmos foi utilizado o *GraphPad Prism 6*. Para a comparação das médias entre dois grupos foi aplicado o *t-test* e para comparação das médias entre três ou mais grupos foi aplicado o teste *One-Way ANOVA* seguido pelo teste de *Dunnet*, e os dados foram expressos

em média  $\pm$  SEM. Consideramos que os resultados era estatisticamente significativos aquelas cujo o valor de  $p < 0,05$ .

O *t-test* foi aplicado para comparar a resposta da viabilidade celular obtida na incubação e na recuperação de cada tiocarbocianinas; da viabilidade celular obtida nas incubações de cada tiocarbocianinas entre as diferentes linhas celulares e respetiva recuperação; e da expressão dos genes obtida na incubação e na recuperação a cada tiocarbocianinas.

No caso do teste *One-Way ANOVA*, foi aplicado para comparar a resposta de viabilidade celular obtida pelo controlo e pelas diferentes tiocarbocianinas; da expressão dos genes de interesse obtida pelo controlo e pelas diferentes tiocarbocianinas, tanto na incubação como na recuperação.

## **IV. Resultados e Discussão**

## 1. Estudos de viabilidade celular

### 1.1. Otimização das concentrações

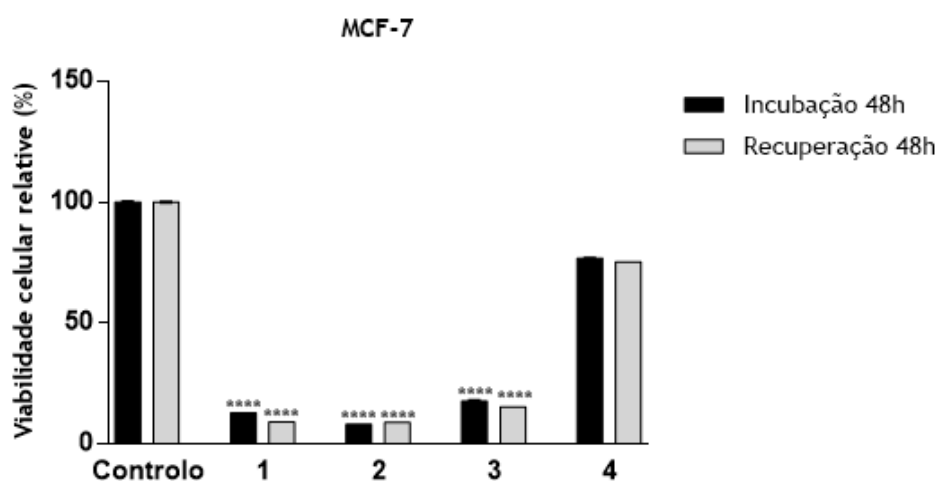
De forma a responder aos objetivos delineados, foram testadas quatro concentrações de 5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, de cada um dos compostos.

Nas concentrações 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL a viabilidade celular era muito próxima de zero, tanto para os sais de amónio quaternário, como para as tiocarbocianinas. No caso da menor concentração (5 µg/mL) os sais de amónio quaternário e as tiocarbocianinas com cadeia *N*-carboxialquílicas apresentavam viabilidade próxima de 100%. Esta condição, só não se verificou para as tiocarbocianinas com cadeia *N*-alquílica, sendo este o composto escolhido para todos os ensaios.

### 1.2. Efeito das tiocarbocianinas

O efeito das diferentes tiocarbocianinas com cadeia *N*-alquílica (tabela 1), nas linhas celulares MCF-7 e NHDF, foi estudado pela quantificação da viabilidade celular, através do ensaio de MTT, que pode ser estimado pela leitura espectrofotométrica (Van Meerloo et al., 2011).

Os resultados obtidos para as 48 horas de incubação com os compostos de interesse, e respetiva recuperação, estão representados no gráfico da figura 9. As barras dos gráficos representam a incubação com os compostos e posterior recuperação das células.



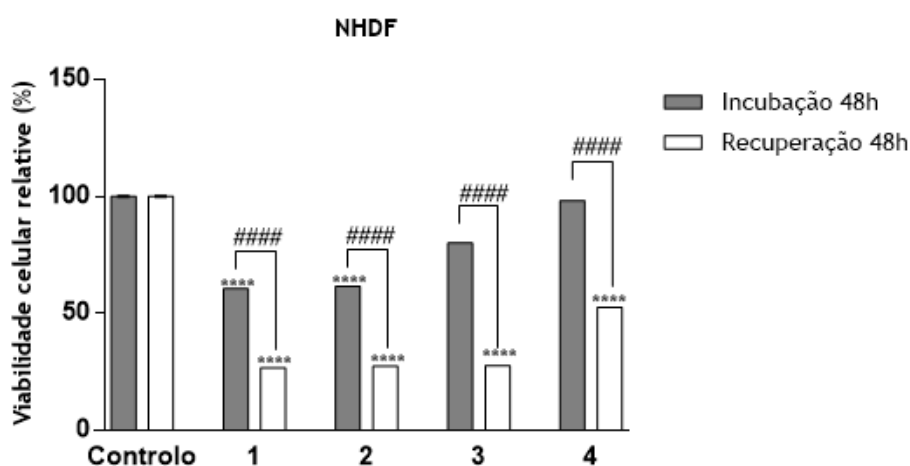
**Figura 9** - Efeito das tiocarbocianinas com cadeia *N*-alquílica 1-4 na linha celular MCF-7. O efeito estudado foi a viabilidade celular relativa: após 48 horas de incubação com as tiocarbocianinas 1-4 (5 µg/mL) e após o mesmo período de recuperação por meio de quantificação da viabilidade celular. \*-Diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade celular relativa do controlo e de um determinado composto após 48 horas de incubação ( $p < 0,0001$ ) e após 48 horas de recuperação ( $p < 0,0001$ ) - aplicação do teste *One-way ANOVA*, seguido pelo teste de *Dunnett*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$  e os gráficos de barras representam médias  $\pm$  SEM com um  $n \geq 3$ .

Começou-se por analisar a viabilidade celular relativa na linha celular MCF-7. Quando esta linha celular é incubada 48 horas com as tiocarbocianinas 1-4 com *N*-alquílica com diferentes comprimentos, há uma diminuição da viabilidade celular em relação ao controlo. Esta diminuição é bastante acentuada para as tiocarbocianinas 1, 2 e 3, não ultrapassando os 20% de viabilidade celular relativa, sendo a diferença estatisticamente significativa. Mas para a tiocarbocianina 4, a diminuição não é tão acentuada, ou seja, as tiocarbocianinas 1, 2 e 3 são mais tóxicas do que a tiocarbocianina 4, para a linha celular MCF-7.

Estes ensaios permitiram verificar que, após a exposição às tiocarbocianinas, as células não conseguiram recuperar. Na figura 9 podemos observar que não houve recuperação celular, pois a percentagem da recuperação celular das células após o contato com as diferentes tiocarbocianinas é muito próxima da viabilidade celular da incubação com as mesmas. Em relação ao controlo e à tiocarbocianina 4, a viabilidade celular é bastante inferior com diferenças estatisticamente significativas, no caso das tiocarbocianinas 1,2 e 3.

Uma vez que a diferença entre as tiocarbocianinas se verifica no comprimento da cadeia lateral e sabendo que o MTT é reduzido pelas desidrogenases intracelulares, colocou-se a hipótese da tiocarbocianina 4 apresentar uma menor permeabilidade através da membrana devido ao tamanho da sua cadeia lateral. Um estudo, com outro tipo de cianinas, mostrou que o comprimento da cadeia lateral afeta a biodistribuição, sendo as cianinas com cadeia mais longas as menos absorvidas pelas células (Onoe et al., 2014).

Os resultados obtidos para as 48 horas de incubação com os compostos de interesse, e respetiva recuperação, para a linha celular NHDF, estão representados no gráfico da figura 10.

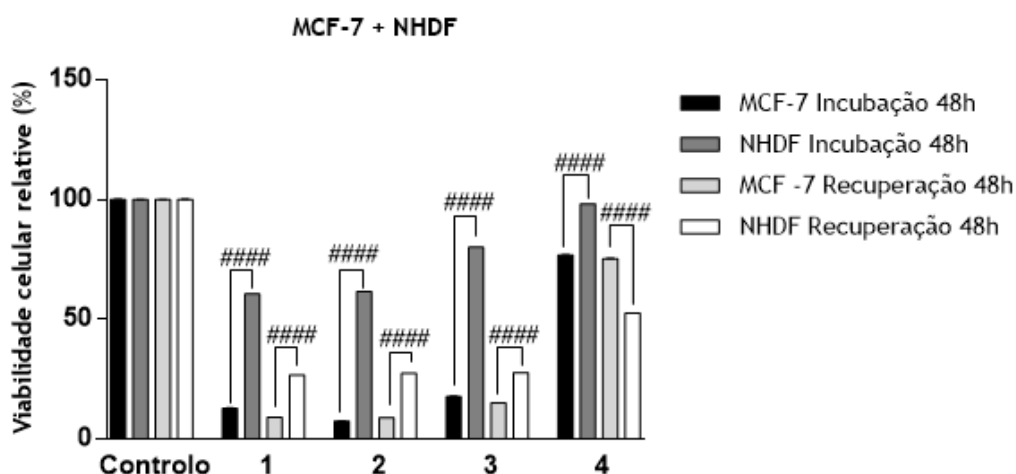


**Figura 10** - Efeito das tiocarbocianinas com cadeia *N*-alquílica 1-4 na linha celular NHDF. O efeito estudado foi a viabilidade celular relativa: após 48 horas de incubação com as tiocarbocianinas 1-4 (5 µg/mL) e após o mesmo período de recuperação por meio de quantificação da viabilidade celular. #-Diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade celular relativa do composto após 48 horas de incubação e após 48 horas de recuperação - aplicação do *t*-teste (##### $p < 0,0001$ ). \*-Diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade celular relativa do controlo e de um determinado composto após 48 horas de incubação ( $p < 0,0001$ ) e após 48 horas de recuperação ( $p < 0,0001$ ) - aplicação do teste *One-way ANOVA*, seguido pelo teste de *Dunnnett*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$  e os gráficos de barras representam médias  $\pm$  SEM com um  $n \geq 3$ .

Ao estudarem-se os mesmos efeitos na linha celular NHDF, verifica-se que quando as células são incubadas 48 horas com as diferentes tiocarbocianinas, há uma diminuição da viabilidade celular, mas no caso da tiocarbocianina 4 esta diminuição quase não é observada, tendo uma percentagem de viabilidade celular próxima de 100%. As células incubadas com as tiocarbocianinas 1 e 2 sofreram uma diminuição da viabilidade celular maior e são as únicas que apresentaram significado estatístico.

Na figura 10 verifica-se que a percentagem de recuperação celular tem diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes tiocarbocianinas, havendo uma diminuição da viabilidade celular, em relação ao controlo mas também em relação à percentagem da viabilidade celular da incubação com as tiocarbocianinas. Também se pode observar que, para além de não ter havido recuperação celular, o efeito das tiocarbocianinas continua mesmo na sua ausência no meio de cultura, o que pode indicar uma maior penetração das tiocarbocianinas nas células NHDF e uma possível ação genómica das mesmas.

Deve-se então comparar o efeito das duas linhas celulares: células cancerígenas e células saudáveis. O resultado desta análise pode ser observado no gráfico da figura 11. Este gráfico permite obter uma melhor compreensão das diferenças entre as duas linhas celulares.



**Figura 11** - Efeito das tiocarbocianinas com cadeia *N*-alquílica 1-4 nas linhas celulares MCF-7 e NHDF. O efeito estudado foi a viabilidade celular relativa: após 48 horas de incubação com tiocarbocianinas 1-4 (5 µg/mL) e após o mesmo período de recuperação por meio de quantificação da viabilidade celular. #-Diferenças estatisticamente significativas entre a viabilidade celular relativa nas linhas celulares MCF-7 e NHDF após 48 horas de incubação e após 48 horas de recuperação - aplicação do *t*-teste (####*p*<0,0001). Os gráficos de barras representam médias ± SEM com um *n*≥3.

Ao analisarem-se as duas linhas celulares na incubação e na recuperação verificou-se que há diferenças estatisticamente significativas em todas as tiocarbocianinas. Quando as células são incubadas com as diferentes tiocarbocianinas, há uma diminuição da viabilidade celular nas duas linhas celulares, mas nas células NHDF a viabilidade celular relativa é sempre superior a 60%, há toxicidade das tiocarbocianinas nestas células mas em menor percentagem, quando comparadas com as células MCF-7. Pode-se afirmar que existe toxicidade seletiva das

tiocarbocianinas para as células MCF-7 e que essa toxicidade é imediata, não havendo alteração no período de recuperação. Contudo, a diferença do efeito das tiocarbocianinas nas células não fica por aqui, enquanto o efeito tóxico parece ser imediato nas células MCF-7, nas NHDF o efeito tóxico *major* verifica-se na ausência das tiocarbocianinas do meio. O que, possivelmente, se deve a uma maior penetração das tiocarbocianinas para o interior das células NHDF ou uma possível maior ação genómica sobre as mesmas, como já foi referido.

Já se verificou, anteriormente, que não houve recuperação celular em nenhuma das linhas celulares, mas analisando os resultados em conjunto verificou-se que, apesar de não haver recuperação celular, na linha celular NHDF a viabilidade celular na recuperação é superior à da linha celular MCF-7, com exceção das células que tiveram em contacto com a tiocarbocianina 4, onde se verifica o oposto.

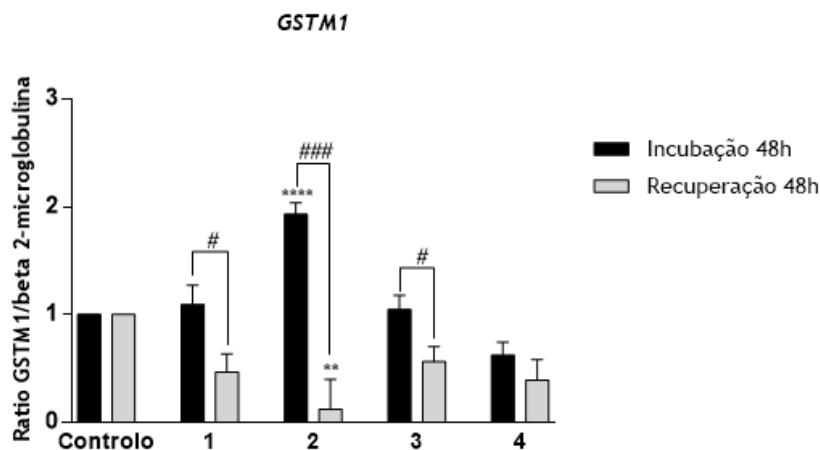
## 2. Expressão Relativa

A técnica de PCR em tempo real permitiu analisar as diferenças dos níveis de expressão do mRNA dos genes *GSTM1* e *GSTT1* nas linhas celulares MCF-7 e NHDF quando incubadas 48 horas com as tiocarbocianinas 1-4 com cadeia *N*-alquílica (5 µg/mL) e posterior recuperação das células, quando as tiocarbocianinas eram retiradas do meio. Para normalizar os níveis de expressão dos genes, foi utilizado o gene *β-2-microglobulina* como controlo endógeno. As barras dos gráficos representam o rácio entre a expressão dos genes e da *β-2-microglobulina* para cada linha celular com as diferentes tiocarbocianinas. No final, e após aplicação do modelo matemático proposto por Pfaffl:  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  (Pfaffl, 2001), os dados foram tratados estatisticamente usando o *t-test* e *One-Way ANOVA* com resultado estatístico significativo quando  $p < 0,05$ .

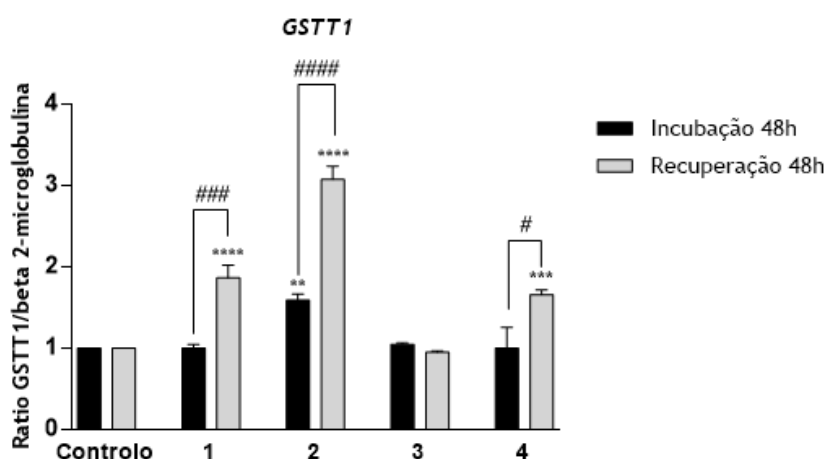
Analisam-se agora os níveis de expressão do mRNA dos genes *GSTM1* e *GSTT1* nas linhas celulares MCF-7 e NHDF, quando incubadas 48 horas com as tiocarbocianinas 1-4 com cadeia *N*-alquílica e após o mesmo período de recuperação. Estabelecem-se dois controlos: um para a expressão quando as células são incubadas 48 horas, e outro para a expressão dos genes depois da recuperação de 48 horas.

A expressão do mRNA dos genes na linha celular MCF-7 está representada nos gráficos das figuras 12 e 13. A figura 12 diz respeito aos níveis de expressão do mRNA do gene *GSTM1* em relação a *β-2 microglobulina* na linha celular MCF-7, cuja comparação da expressão das células expostas às tiocarbocianinas com os controlos apenas apresenta diferenças estatisticamente significativas no caso da tiocarbocianina 2. Em relação à diferença entre a incubação e a recuperação, o efeito das tiocarbocianinas 1, 2 e 3 reflete diferenças significativas. A figura 13 corresponde aos níveis de expressão do mRNA do gene *GSTT1* em

relação a  $\beta$ -2 *microglobulina* na linha celular MCF-7, a expressão tende a aumentar, comparando com os controlos, havendo significado estatístico na recuperação das células que estiveram em contacto com as tiocarbocianinas 1 e 4, e na incubação e na recuperação da tiocarbocianina 2, a tiocarbocianina 3 não tem significado estatístico em relação aos controlos. No que diz respeito às diferenças entre o período de incubação e de recuperação, o efeito das tiocarbocianinas 1, 2 e 4 é significativo; já no caso da tiocarbocianina 3, os valores são muito próximos.



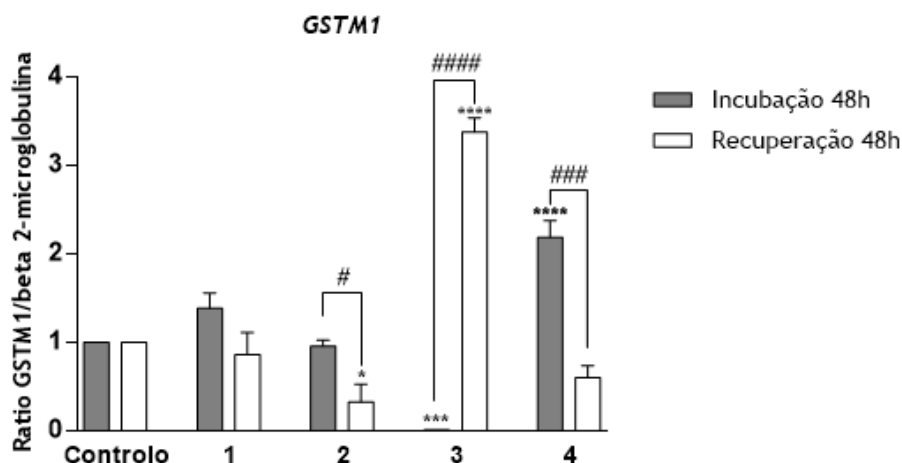
**Figura 12** - Níveis de expressão do mRNA do gene *GSTM1* em relação a  $\beta$ -2-*microglobulina* na linha celular MCF-7, após 48 horas de incubação com as tiocarbocianinas 1-4 (5  $\mu$ g/mL) e após o mesmo período de recuperação através de PCR em tempo real. #-Diferenças estatisticamente significativas entre a expressão do mRNA do composto após 48 horas de incubação e após 48 horas de recuperação - aplicação do *t*-teste (# $p$ <0,05; ### $p$ <0,001). \*-Diferenças estatisticamente significativas entre a expressão do mRNA do controlo e de um determinado composto após 48 horas de incubação ( $p$ <0,0001) e após 48 horas de recuperação ( $p$ =0,0361) - aplicação do teste *One-way ANOVA*, seguido pelo teste de *Dunnnett*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p$ <0,05 e os gráficos de barras representam médias  $\pm$  SEM com um  $n \geq 3$ .



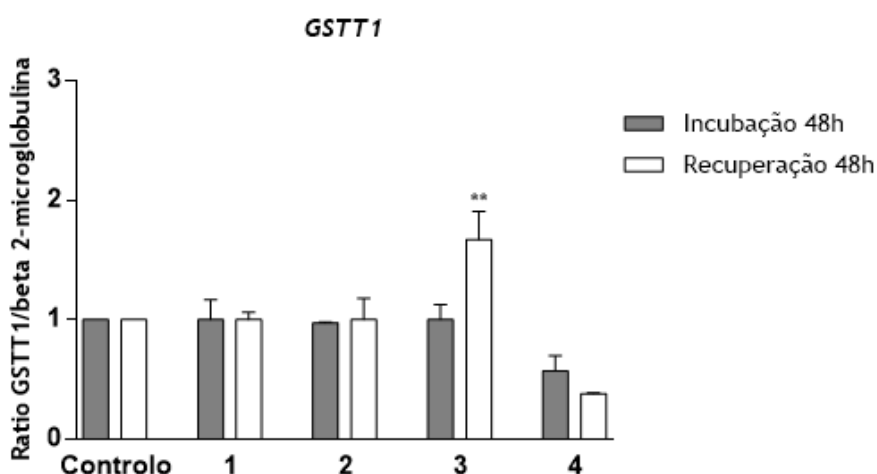
**Figura 13** - Níveis de expressão do mRNA do gene *GSTT1* em relação a  $\beta$ -2-*microglobulina* na linha celular MCF-7, após 48 horas de incubação com as tiocarbocianinas 1-4 (5  $\mu$ g/mL) e após o mesmo período de recuperação através de PCR em tempo real. #-Diferenças estatisticamente significativas entre a expressão do mRNA do composto após 48 horas de incubação e após 48 horas de recuperação - aplicação do *t*-teste (# $p$ <0,05; ### $p$ <0,001; #### $p$ <0,0001). \*-Diferenças estatisticamente significativas entre a expressão do mRNA do controlo e de um determinado composto após 48 horas de incubação ( $p$ =0,0087) e após 48 horas de recuperação ( $p$ <0,0001) - aplicação do teste *One-way ANOVA*, seguido pelo teste de *Dunnnett*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p$ <0,05 e os gráficos de barras representam médias  $\pm$  SEM com um  $n \geq 3$ .

Em suma, a expressão génica relativa para o *GSTM1* na linha celular MCF-7 revelou que há uma tendência para o aumento da expressão do gene, em relação ao controlo, quando incubadas 48 horas com as tiocarbocianinas. Ao longo do tempo, após o período de recuperação, os valores obtidos diminuem, tanto em relação ao controlo como em relação aos valores da incubação, possivelmente, há uma inibição da expressão do gene *GSTM1*. É de evidenciar o aumento da expressão do gene *GSTM1* pela presença da tiocarbocianina 2, no período de incubação, e a diminuição promovida pela presença da tiocarbocianina 4. No caso do *GSTT1*, para a mesma linha celular, verificamos uma tendência para um aumento da expressão após o período de recuperação, sendo estes valores superiores aos da incubação, à exceção da exposição com a tiocarbocianina 3, onde se verifica o oposto. No gene *GSTT1*, o efeito indutor parece resultar de uma ação genómica, pois só se verifica no período de recuperação, o que significa que poderá haver uma possível indução da expressão do gene *GSTT1*. O efeito das tiocarbocianinas na expressão do *GSTM1*, nas MCF-7, parece resultar fundamentalmente na iniciação da sua expressão e eventualmente uma indução inicial efetuada pela tiocarbocianina 2.

A expressão do mRNA dos genes na linha celular NHDF está representada nos gráficos das figuras 14 e 15. Os níveis de expressão do mRNA do gene *GSTM1* em relação a  $\beta$ -2 *microglobulina* na linha celular NHDF encontra-se representado na figura 14, cuja expressão das células comparadas com os controlos apresentam significado estatístico no caso da recuperação da tiocarbocianina 2, da incubação e recuperação da tiocarbocianina 3 e da incubação da tiocarbocianina 4; em relação às diferenças entre a incubação e recuperação, as tiocarbocianinas 2, 3 e 4 apresentam diferenças significativas. A figura 15 diz respeito de expressão do mRNA do gene *GSTT1* em relação a  $\beta$ -2 *microglobulina* na linha celular NHDF, onde apenas a recuperação das células que tiveram em contacto com a tiocarbocianina 3 em relação ao controlo, apresenta significado estatístico.



**Figura 14** - Níveis de expressão do mRNA do gene *GSTM1* em relação a  $\beta$ -2-microglobulina na linha celular NHDF, após 48 horas de incubação com as tiocarbocianinas 1-4 (5  $\mu$ g/mL) e após o mesmo período de recuperação através de PCR em tempo real. #-Diferenças estatisticamente significativas entre a expressão do mRNA do composto após 48 horas de incubação e após 48 horas de recuperação - aplicação do *t*-teste (# $p$ <0,05; ### $p$ <0,001; #### $p$ <0,0001). \*-Diferenças estatisticamente significativas entre a expressão do mRNA do controlo e de um determinado composto após 48 horas de incubação ( $p$ <0,0001) e após 48 horas de recuperação ( $p$ <0,0001) - aplicação do teste *One-way ANOVA*, seguido pelo teste de *Dunnnett*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p$ <0,05 e os gráficos de barras representam médias  $\pm$  SEM com um  $n \geq 3$ .



**Figura 15** - Níveis de expressão do mRNA do gene *GSTT1* em relação a  $\beta$ -2-microglobulina na linha celular NHDF, após 48 horas de incubação com as tiocarbocianinas 1-4 (5  $\mu$ g/mL) e após o mesmo período de recuperação através de PCR em tempo real. \*-Diferenças estatisticamente significativas entre a expressão do mRNA do controlo e de um determinado composto após 48 horas de incubação e após 48 horas de recuperação ( $p=0,0030$ ) - aplicação do teste *One-way ANOVA*, seguido pelo teste de *Dunnnett*. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p$ <0,05 e os gráficos de barras representam médias  $\pm$  SEM com um  $n \geq 3$ .

A expressão génica relativa na linha celular NHDF, para o gene *GSTM1*, revelou que apenas os efeitos das tiocarbocianinas 1 e 4 têm um aumento da expressão do gene, na incubação, e esta diminui após a recuperação; as células expostas à tiocarbocianina 2 comportam-se de forma semelhante mas com valores de expressão inferiores. Neste gene destaca-se o efeito da tiocarbocianina 3, por praticamente não ter expressão génica na incubação e na recuperação aumentar a expressão para valores bastante superiores ao controlo. No caso do *GSTT1*, para a

mesma linha celular, a expressão do gene não nos permite verificar as diferenças entre as cianinas, apenas no caso do efeito da tiocarbocianina 3 verificou-se um aumento da expressão após o período de recuperação, tal como aconteceu na expressão do gene *GSTM1*.

**Tabela 2** - Resumo dos resultados obtidos nos ensaios experimentais, ensaio de MTT e PCR em tempo real, representados nos gráficos das figuras 9 - 15.

Tiocarbocianina com cadeia N-alquílica	MCF-7				NHDF			
	Ensaio de MTT		PCR em tempo real		Ensaio de MTT		PCR em tempo real	
	Toxicidade	Ação	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>	Toxicidade	Ação	<i>GSTM1</i>	<i>GSTT1</i>
1	Muito tóxico	Ação tóxica imediata		Indução posterior	Ligeiramente Tóxico	Ação tóxica tardia	Indução imediata e inibição posterior	
2	Muito tóxico	Ação tóxica imediata	Indução imediata e inibição posterior	Indução imediata e posterior	Ligeiramente Tóxico	Ação tóxica tardia	Inibição posterior	
3	Muito tóxico	Ação tóxica imediata	Inibição posterior		Ligeiramente Tóxico	Ação tóxica tardia	Inibição imediata e indução posterior	Indução posterior
4	Não tóxico		Inibição imediata	Indução posterior	Não tóxico	Ação tóxica tardia	Indução imediata e inibição posterior	Inibição imediata

Comparando os resultados de viabilidade, observa-se que a toxicidade é seletiva, é mais tóxico para as MCF-7 do que para as NHDF. Está descrito que a toxicidade das cianinas está envolvida na superprodução de ROS (Wezgowiec et al., 2013; Wilk et al., 2012), a hipótese que se coloca é que as tiocarbocianinas em estudo promovam alguma alteração nas enzimas antioxidantes GSTs.

Para interpretar os resultados de expressão da *GSTM1* e *GSTT1*, seguiu-se o seguinte raciocínio: se a expressão foi mais elevada do que o controlo, considera-se que houve uma

indução da sua expressão; se a expressão diminuir em relação ao controlo, considera-se que, ou houve inibição, ou a tiocarbocianina é substrato para a GST em causa.

A toxicidade seletiva parece resultar das diferentes dimensões das cadeias laterais, que parecem estar associadas a diferentes mecanismos de ação e das características das diferentes células (diferente regulação da expressão das GSTs).

Apesar deste estudo ser preliminar, uma das razões que nos levou a desenvolver este trabalho foi avaliar a possibilidade em relação à possível aplicação das tiocarbocianinas na terapêutica do cancro. Em relação a essa possibilidade, verificou-se que:

- a tiocarbocianina 3 é aquela que apresenta resultados como possível coadjuvante na terapêutica, pois apresenta toxicidade seletiva em relação à viabilidade e à diferença que apresenta relativamente ao efeito sobre as GSTs. A tiocarbocianina 3, apesar de apresentar uma ação tóxica e indução das GSTs nas células saudáveis, é muito mais tóxica para as células cancerígenas e não apresenta indução destas GSTs, pelo contrário, inibe a *GSTM1*.
- este estudo não permite excluir a utilização das tiocarbocianinas 1, 2 e 4, pois a indução prévia, das defesas antioxidantes, a uma terapêutica agressiva pode ser benéfica.
- na presença, por exemplo, de um fármaco anticancerígeno, é importante que se considere a utilização das tiocarbocianinas 1,2 e 4, pois podem promover resistência a esse fármaco, caso ele seja metabolizado por umas destas GSTs, ou seja, sempre que há indução das GSTs tem de se colocar a possibilidade de resistência (Enache and Oliveira-Brett, 2015).

## **V. Conclusão e Perspetivas Futuras**

Este trabalho permitiu verificar que as tiocarbocianinas estudadas com cadeia *N*-alquílica apresentam toxicidade seletiva - são mais tóxicas para a linha celular MCF-7 do que para a NHDF. Permitiu também confirmar que as células MCF-7 e NHDF respondem de forma diferente às tiocarbocianinas com cadeia *N*-alquílica. O efeito na expressão das GSTs permitiu-nos colocar a hipótese do envolvimento dos processos de *stress* oxidativo no mecanismo de ação das tiocarbocianinas.

Futuramente, é necessária uma investigação mais profunda sobre estes compostos. É importante que sejam feitas incubações com concentrações mais baixas, para percebermos qual a concentração mínima que pode ser usada para provocar diminuição na viabilidade celular das células MCF-7.

A longo prazo, poderá ser possível aplicar as tiocarbocianinas com a cadeia *N*-alquílica como coadjuvantes no tratamento de células cancerígenas.

## **VI. Referências Bibliográficas**

- Abrahart E. N., (1968), "Dyes and their intermediates". Oxford, Pergamon Press.
- Abreu R. M., Santos D. J. S. L., Moreno A. J. M., (2000). "Effects of carvedilol and its analog BM-910228 on mitochondrial function and oxidative stress". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295(3): 1022-1030.
- Akimoto A. K., Miranda-Vilela A. L., Alves P. C. Z., Pereira L. C. S., Lordelo G. S., Hiragi C. O., Da Silva I. C. R., Grisolia C. K., Klautau-Guimarães M. N., (2010). "Evaluation of gene polymorphisms in exercise-induced oxidative stress and damage". *Free Radical Research*, 44(3): 322-331.
- Almeida, P., (1999). "Cianinas, a Cor não Visível da Fotografia". *Química - Boletim da SPQ - A Cor*, 73: 9-12.
- Ambrosone C. B., Sweeney C., Coles B. F., Thompson P. A., McClure G. Y., Korourian S., Fares M. Y., Stone A., Kadlubar F. F., Hutchins L. F., (2001). "Polymorphisms in Glutathione S-Transferases (GSTM1 and GSTT1) and Survival after Treatment for Breast Cancer". *Cancer Research*, 61: 7130-7135.
- Andonova I. E., Justenhoven C., Winter S., Hamann U., Baisch C., Rabstein S., Spickenheuer A., Harth V., Pesch B., Brüning T., Ko Y.-D., Ganev V., Brauch H., (2010). "No evidence for glutathione S-transferases GSTA2, GSTM2, GSTO1, GSTO2, and GSTZ1 in breast cancer risk". *Breast Cancer Research and Treatment*, 121(2): 497-502.
- Bazylińska U., Pietkiewicz J., Saczko J., Nattich-Rak M., Rossowska J., Garbiec A., Wilk K. A., (2012). "Nanoemulsion-templated multilayer nanocapsules for cyanine-type photosensitizer delivery to human breast carcinoma cells". *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47(2): 406-420.
- Boto R. E. F., Oliveira A. S., Vieira Ferreira L. F., Almeida P., (2001). "Study of N,N'-dicarboxyalkylthiacarbocyanines as cyanine direactive dyes covalently bound to cellulose". *Dyes and Pigments*, 48(2): 71-84.
- Boto R. E. F., El-Shishtawy R. M., Santos P. F., Reis L. V., Almeida P., (2007). "Synthesis and characterization of novel mono- and dicarboxyalkylthiacarbocyanines and their ester derivatives". *Dyes and Pigments*, 73(2): 195-205.
- Boto R. E. F., Anyanwu U., Sousa F., Almeida P., Queiroz J. A., (2009). "Thiacarbocyanine as ligand in dye-affinity chromatography for protein purification. II. Dynamic binding capacity using lysozyme as a model". *Biomedical Chromatography*, 23(9): 987-993.

- Carmona T., Marcelo G., Rinaldi L., Martina K., Cravotto G., Mendicuti F., (2015). "Soluble cyanine dye/ $\beta$ -cyclodextrin derivatives: Potential carriers for drug delivery and optical imaging". *Dyes and Pigments*, 114: 204-214.
- Chirilă D. N., Bălăcescu O., Popp R., Oprea A., Constantea N. A., Vesa S., Ciuce C., (2014). "GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in Patients with Multiple Breast Cancers and Breast Cancer in Association with another Type of Cancer". *Chirurgia*, 109(5): 626-633.
- Curran J. E., Weinstein S. R., Griffiths L. R., (2000). "Polymorphisms of glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and breast cancer susceptibility". *Cancer Letters*, 153: 113-120.
- De Aguiar E. S., Giacomazzi J., Schmidt V. A., Bock H., Saraiva-Pereira M. L., Schuler-Faccini L., Filho D. D., dos Santos P. A., Giugliani R., Caleffi M., Camey S. A., Ashton-Prolla P., (2012). "GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphisms, breast cancer risk factors and mammographic density in women submitted to breast cancer screening". *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 15(2): 246-255.
- Deligeorgiev T., Kaloyanova S., Vasilev A., (2011). "A novel general method for preparation of neutral monomethine cyanine dyes". *Dyes and Pigments*, 90(2): 170-176.
- Di Pietro G., Magno L. A. V, Rios-Santos F., (2010). "Glutathione S-transferases: an overview in cancer research". *Expert Opinion on Drug Metabolism Toxicology*, 6(2): 153-170.
- Dringen R., (2000). "Metabolism and functions of glutathione in brain". *Progress in Neurobiology*, 62(6): 649-671.
- Enache T. A., Oliveira-Brett A. M., (2015). "Electrochemical evaluation of glutathione S-transferase kinetic parameters". *Bioelectrochemistry*, 101: 46-51.
- Fang Y.-Z., Yang S., Wu G., (2002). "Free radicals, antioxidants, and nutrition". *Nutrition*, 18(10): 872-879.
- Fu Y.L., Huang W., Li C.-L., Wang L.-Y., Wei Y.-S., Huang Y., Zhang X.-H., Wen Z.-Y., Zhang Z.-X., (2009). "Monomethine cyanine dyes with an indole nucleus: Microwave-assisted solvent-free synthesis, spectral properties and theoretical studies". *Dyes and Pigments*, 82(3): 409-415.
- Gstraunthaler G., (2003). "AlteRNA totalives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture". *ALTEX: AlteRNA totaliven Zu Tierexperimenten*, 20(4): 275-281.

- Guengerich F. P., McCormick W. A., Wheeler J. B., (2003). "Analysis of the kinetic mechanism of haloalkane conjugation by mammalian theta-class glutathione transferases". *Chemical Research in Toxicology*, 16(11): 1493-1499.
- Gutowski M., Kowalczyk S., (2013). "A study of free radical chemistry: their role and pathophysiological significance". *Acta Biochimica Polonica*, 60(1): 1-16.
- Haczynski J., Tarkowski R., Jarzabek K., Slomczynska M., Wolczynski S., Magoffin D. A., Jakowicki J. A., Jakimiuk A. J., (2002). "Human cultured skin fibroblasts express estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ ". *InterNA totalional Journal of Molecuar Medicine*, 10(2): 149-53.
- Hamer F. M., (1964). "The Cyanines Dyes and Related Compounds in The Chemistry of Heterocyclic Compounds". New York, Intercience Publishers.
- Hayes J. D., Flanagan J. U., Jowsey I. R., (2005). "Glutathione transferases". *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45: 51-88.
- Huber P. C., Almeida W. P., (2008). "Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos". *Química Nova*, 31(5): 1170-1179.
- Kumaraguruparan R., Subapriya R., Viswanathan P., Nagini S., (2002). "Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast". *Clinica Chimica Acta; InterNA totalional Journal of Clinical Chemistry*, 325(1-2): 165-170.
- Leme C. V. D., Raposo L. S., Ruiz M. T., Biselli J. M., Galbiatti A. L. S., Maniglia J. V., Pavarino-Bertelli E. C., Goloni-Bertollo E. M., (2010). "Análise dos genes GSTM1 e GSTT1 em pacientes com câncer de cabeça e pescoço". *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 56(3): 299-303.
- Levenson A. S., Jordan V. C., (1997). "MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line". *Cancer Research*, 57(15): 3071-3078.
- Lopalco M., Koini E. N., Cho J. K., Bradley M., (2009). "Catch and release microwave mediated synthesis of cyanine dyes". *Organic & Biomolecular Chemistry*, 7(5): 856-859.
- Mannervik B., Board P. G., Hayes J. D., Listowsky I., Pearson W. R., (2005). "Nomenclature for mammalian soluble glutathione transferases". *Methods in Enzymology*, 401(5): 1-8.

- Masoodi T. A., Rao Talluri V., Shaik N. A., Al-Aama J. Y., Hasan Q., (2012). "Functional genomics based prioritization of potential nsSNPs in EPHX1, GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genes for breast cancer susceptibility studies". *Genomics*, 99(6):330-9.
- Matsuoka M., (1990). "Infrared Absorbing Dyes - Topics in Applied Chemistry". New York, Plenum Press.
- McCord J. M., (2000). "The evolution of free radicals and oxidative stress". *American Journal of Medicine*, 108(8): 652-659.
- Mishra A., Behera R. K., Behera P. K., Mishra B. K., Behera G. B., (2000). "Cyanines during the 1990s: a review". *Chemical Reviews*, 100(6): 1973-2011.
- Mujumdar S. R., Mujumdar R. B., Grant C. M., Waggoner A. S., (1996). "Cyanine-labeling reagents: sulfobenzindocyanine succinimidyl esters". *Bioconjugate Chemistry*, 7(3): 356-362.
- Onoe S., Temma T., Shimizu Y., Ono M., Saji H., (2014). "Investigation of cyanine dyes for in vivo optical imaging of altered mitochondrial membrane potential in tumors". *Cancer Medicine*, 3(4): 775-786.
- Owens E. A., Bruschi N., Tawney J. G., Henary M., (2015). "A microwave-assisted and environmentally benign approach to the synthesis of near-infrared fluorescent pentamethine cyanine dyes". *Dyes and Pigments*, 113: 27-37.
- Panigrahi M., Dash S., Patel S., Mishra B. K., (2012). "Syntheses of cyanines: A review". *Tetrahedron*, 68(3): 781-805.
- Parl F. F., (2005). "Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk". *Cancer Letters*, 221(2): 123-129.
- Pastore A., Federici G., Bertini E., Piemonte F., (2003). "Analysis of glutathione: Implication in redox and detoxification". *Clinica Chimica Acta*, 333(1-2): 19-39.
- Pettigrew N. E., Colman R. F., (2001). "Heterodimers of glutathione S-transferase can form between isoenzyme classes pi and mu". *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 396(2): 225-230.
- Pfaffl M. W., (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR". *Nucleic Acids Research*, 29(9): 2002-2007.

- Pham W., Medarova Z., Moore A., (2005). "Synthesis and application of a water-soluble near-infrared dye for cancer detection using optical imaging". *Bioconjugate Chemistry*, 16(3): 735-740.
- Ramalhinho A. C., Fonseca-Moutinho J. A., Breitenfeld L., (2011). "Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 genotypes and breast cancer risk: a study in a Portuguese population". *Molecular and Cellular Biochemistry*, 355(1-2): 265-271.
- Ramalhinho A. C. M., Fonseca-Moutinho J. A., Granadeiro L. A. T. G. B., (2012). "Positive Association of Polymorphisms in Estrogen Biosynthesis Gene, CYP19A1, and Metabolism, GST, in Breast Cancer Susceptibility". *DNA and Cell Biology*, 31(6): 1100-1106.
- Silva M. S., Graça V. C., Reis L. V., Santos P. F., Almeida P., Queiroz J. A., Sousa F., (2013). "Protein purification by aminosquarylium cyanine dye-affinity chromatography". *Biomedical Chromatography*, 27(12): 1671-1679.
- Strange R. C., Spiteri M. A., Ramachandran S., Fryer A. A., (2001). "Glutathione-S-transferase family of enzymes". *Mutation Research*, 482(1-2): 21-26.
- Sureda A., Tauler P., Aguiló A., Cases N., Fuentespina E., Córdova A., Tur J. A., Pons A., (2005). "Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise". *Free Radical Research*, 39(12): 1317-1324.
- Timofeeva M., Jäger B., Rosenberger A., Sauter W., Wichmann H.-E., Group K. S., Bickeböller H., Risch A., (2009). "A multiplex real-time PCR method for detection of GSTM1 and GSTT1 copy numbers". *Clinical Biochemistry*, 42(6): 500-509.
- Townsend D. M., Tew K. D., (2003). "The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance". *Oncogene*, 22(47): 7369-7375.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M. T. D., Mazur M., Telser J., (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1): 44-84.
- Van Meerloo J., Kaspers G. J. L., Cloos J., (2011)., "Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay". *Cancer Cell Culture*, 731: 237-245.
- Voznyak D. A., Chibisov A. K., Petrov N. Kh., Alfimov M. V., (2010). "Primary photoprocesses in molecules of carbocyanine dyes in binary solvent mixtures". *Photochemistry*, 44(1): 27-32

- Wezgowiec J., Kotulska M., Saczko J., Derylo M. B., Teissie J., Rols M. P., Orio J., arbiec A., Kulbacka J., (2013). "Cyanines in photodynamic reaction assisted by reversible electroporation-in vitro study on human breast carcinoma cells". *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10(4): 490-502.
- Wheeler J. B., Stourman N. V., Thier R., Dommermuth A., Vuilleumier S., Rose J. A., Armstrong R. N., Guengerich F. P., (2001). "Conjugation of haloalkanes by bacterial and mammalian glutathione transferases: mono- and dihalomethanes". *Chemical Research in Toxicology*, 14(8): 1118-1127.
- Wilk K. A., Zielińska K., Pietkiewicz J., Skońska N., Choromańska A., Rossowska J., Garbiec A., Saczko J., (2012). "Photo-oxidative action in MCF-7 cancer cells induced by hydrophobic cyanines loaded in biodegradable microemulsion-templated nanocapsules". *InterNA totalional Journal of Oncology*, 41(1): 105-116.
- Wu B., Dong D., (2012). "Human cytosolic glutathione transferases: Structure, function, and drug discovery". *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(12): 656-668.
- Yarmoluk S. M., Kovalska V. B., Losytskyy M. Y., (2008). "Symmetric cyanine dyes for detecting nucleic acids". *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission*, 83(3): 131-145.
- Zhou H., Brock J., Liu D., Board P. G., Oakley A. J., (2012). "Structural insights into the dehydroascorbate reductase activity of human omega-class glutathione transferases". *Journal of Molecular Biology*, 420(3): 190-203.
- Zollinger H., (1991). "Color Chemistry: Syntheses, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments". Weinheim, VHC, 2<sup>nd</sup> revision edition.