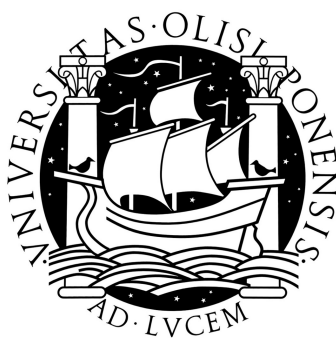


**U N I V E R S I D A D E D E L I S B O A**

**Faculdade de Farmácia**

**Mestrado em Análises Clínicas**



**Estudo do efeito anti-tumoral dos pró-fármacos de triazenos em linhas celulares de melanoma**

**Joana Freitas de Almeida**

Lisboa  
Outubro 2011

U N I V E R S I D A D E D E L I S B O A

**Faculdade de Farmácia**

**Mestrado em Análises Clínicas**



**Estudo do efeito anti-tumoral dos pró-fármacos de triazenos em linhas celulares de melanoma**

**Joana Freitas de Almeida**

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas.

Orientadora: Professora Doutora Paula Videira

Co-orientadora: Professora Doutora Maria Eduarda Mendes

Lisboa  
Outubro 2011





## ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE ESQUEMAS .....</b>	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS .....</b>	<b>VI</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>IX</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>XI</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>XV</b>
<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>3</b>
<b>1. GENERALIDADES .....</b>	<b>3</b>
1.1. A PELE .....	3
1.2. MELANOGÉNESE .....	4
1.2.1. Tirosinase .....	6
<b>2. MELANOMA MALIGNO .....</b>	<b>9</b>
<b>3. QUIMIOTERAPIA DO MELANOMA .....</b>	<b>13</b>
3.1. TRIAZENOS: UMA CLASSE DOS AGENTES ALQUILANTES .....	14
3.1.1. Resistência das células de melanoma aos triazenos .....	17
3.1.2. Inespecificidade dos triazenos utilizados no tratamento de melanoma maligno .....	18
3.2. NOVAS ESTRATÉGIAS PARA O TRATAMENTO DE MELANOMA MALIGNO .....	19
3.2.1. Melanocytod-Directed Enzyme Prodrug Therapy (MDEPT) .....	21
<b>4. ÂMBITO DA TESE .....</b>	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>29</b>
<b>1. CULTURA DE CÉLULAS .....</b>	<b>29</b>
<b>2. CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TIROSINASE EM LINHAS CELULARES .....</b>	<b>30</b>
2.1. PREPARAÇÃO DE LISADOS DAS LINHAS CELULARES .....	30
2.2. QUANTIFICAÇÃO PROTEICA SEGUNDO O MÉTODO DE LOWRY .....	31
2.3. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ENZIMÁTICA .....	32
<b>3. SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS N-ACETIL-L-TIROSINA-MMT .....</b>	<b>33</b>

3.1. REACÇÃO POR ACTIVAÇÃO DO DCC/DMAP .....	35
3.2. REACÇÃO POR ACTIVAÇÃO DO TBTU .....	36
3.3. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL.....	37
3.3.1. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear: <sup>1</sup> H-RMN e <sup>13</sup> C-RMN.....	37
3.3.2. Espectros de Infra-vermelho (IV) .....	37
3.3.3. Ponto de fusão .....	38
<b>4. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE PRÓ-FÁRMACOS.....</b>	<b>38</b>
<b>5. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR DOS PRÓ-FÁRMACOS NAS LINHAS CELULARES DE MELANOMA.....</b>	<b>40</b>
5.1. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE MITOCONDRIAL PELO MÉTODO DE MTS .....	40
5.2. AVALIAÇÃO DA APOPTOSE/NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	41
<b>6. ESTUDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS PRÓ-FÁRMACOS.....</b>	<b>43</b>
<b>7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>44</b>
<b>8. REAGENTES E SOLVENTES .....</b>	<b>45</b>
<b><u>CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....</u></b>	<b><u>49</u></b>
<b>1. SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS N-ACETIL-L-TIROSINA-MMT: COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE SÍNTESE .....</b>	<b>49</b>
1.1. REACÇÃO POR ACTIVAÇÃO DO DCC.....	49
1.2. REACÇÃO POR ACTIVAÇÃO DO TBTU .....	49
1.3. CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS PRÓ-FÁRMACOS .....	51
1.3.1. Pró-fármaco A (X=COCH <sub>3</sub> ) .....	51
1.3.2. Pró-fármaco C com o (X=CN).....	53
<b>2. CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TIROSINASE EM LINHAS CELULARES DE MELANOMA .....</b>	<b>57</b>
<b>3. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE CELULAR DOS PRÓ-FÁRMACOS NAS LINHAS CELULARES DE MELANOMA.....</b>	<b>59</b>
3.1. ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DOS PFs COM BASE NO MÉTODO DE MTS .....	59
3.2. ESTUDO DA CITOTOXICIDADE DOS PFs COM BASE NA DETERMINAÇÃO DAS CÉLULAS APOPTÓTICAS/NECRÓTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	62
3.3. SENSIBILIDADE DAS LINHAS CELULARES DE MELANOMA AO PF C, TENDO EM CONTA O NÍVEL DE EXPRESSÃO DA ENZIMA TIROSINASE.....	71
3.4. SENSIBILIDADE DAS LINHAS CELULARES DE MELANOMA AO TEMOZOLOMIDE.....	79
<b>4. ESTUDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS PRÓ-FÁRMACOS.....</b>	<b>85</b>
<b><u>CAPÍTULO 4. CONCLUSÃO .....</u></b>	<b><u>93</u></b>

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 97**

**ANEXOS ..... 111**

<b>1. GRÁFICOS DA PERCENTAGEM DE CÉLULAS APOPTÓTICAS/NECRÓTICAS DO ESTUDO DA SENSIBILIDADE DAS LINHAS CELULARES DE MELANOMA AO PF C</b>	<b>111</b>
<b>2. ESPECTROS DE <sup>1</sup>H-RMN, <sup>13</sup>C-RMN E IV</b>	<b>113</b>
2.1. PRÓ-FÁRMACO A COM O SUBSTITUINTE COCH <sub>3</sub>	113
2.2. PRÓ-FÁRMACO C COM O SUBSTITUINTE CN	115
<b>3. CROMATOGRAMAS DE HPLC</b>	<b>117</b>
3.1. PADRÕES DE PRÓ-FÁRMACO C, MMT-CN E AMINA	117
3.2. PRÓ-FÁRMACO C NO LISADO DA LINHA CELULAR MNT-1	118
3.3. PRÓ-FÁRMACO C NO LISADO DA LINHA CELULAR DE M8	119

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática de um corte de pele fina, demonstrando a localização da epiderme e da derme ( <i>in (3)</i> ).....	3
Figura 2 - Representação do processo de melanogénese localizado no melanossoma ( <i>in (3)</i> )..	5
Figura 3 - Domínios da enzima tirosinase ( <i>adaptado (6)</i> ).....	7
Figura 4 - Progressão na transformação maligna dos melanócitos ( <i>adaptado (31)</i> ).....	10
Figura 5 - Representação química dos anti-tumorais triazenos.....	15
Figura 6 - Representação química dos agentes anti-tumorais triazenos, Dacarbazina (DTIC) e Temozolomide (TMZ) .....	16
Figura 7 - Representação das estratégias que utilizam enzimas para a activação do pró-fármaco <i>in loco</i> . ( <i>in (67)</i> ).....	20
Figura 8 - Diagrama representativo do sistema de libertação selectiva do fármaco citotóxico no tumor mediado pela enzima tirosinase ( <i>adaptado (84)</i> ).....	22
Figura 9 - Estrutura geral dos pró-fármacos de triazenos sintetizados ( <i>in (66)</i> ).....	33
Figura 10 - Síntese dos N-acetil-L-tirosina-aciltriazenos ( <i>in (53; 66)</i> ).....	34
Figura 11 - Representação química do pró-fármaco A (X=COCH <sub>3</sub> ). .....	51
Figura 12 - Representação química do pró-fármaco C (X=CN).....	53
Figura 13 - Representação gráfica da actividade específica (U/mg) da enzima tirosinase de cada linha celular estudada, nomeadamente SK-MEL-30, MNT-1 e M8. Como controlo positivo da reacção enzimática usou-se a tirosinase de Cogumelo (TyrC). N=2.....	57
Figura 14 - Estudo da citotoxicidade do pró-fármaco A (X=COCH <sub>3</sub> ), dissolvido em DMSO nas linhas celulares, SK-MEL-30 e MNT-1, pelo método de MTS. N=1. ....	60
Figura 15 - Estudo da citotoxicidade do pró-fármaco B (X=COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), dissolvido em DMSO nas linhas celulares MNT-1, SK-MEL-30 e M8, pelo método de MTS. N=1. ....	61
Figura 16 - Estudo da citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método de MTS. N=1.....	62
Figura 17 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco A (X=COCH <sub>3</sub> ), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.....	63
Figura 18 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco A (X=COCH <sub>3</sub> ), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.....	64
Figura 19 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco B (X=COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.....	65

Figura 20 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco B (X=COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.....	66
Figura 21 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. 67	
Figura 22 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. 68	
Figura 23 - Estudo comparativo de citotoxicidade dos pró-fármacos A, B e C, dissolvidos em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.....	69
Figura 24 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. 72	
Figura 25 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular SK-MEL-30, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.....	73
Figura 26 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular M8, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. ....	74
Figura 27 - Estudo comparativo de citotoxicidade do pró-fármaco C, dissolvido em DMSO nas linhas celulares MNT-1, SK-MEL-30, M8, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.....	76
Figura 28 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco TMZ, dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.....	80
Figura 29 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco TMZ, dissolvido em DMSO na linha celular SK-MEL-30, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. ....	80
Figura 30 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco TMZ, dissolvido em DMSO na linha celular M8, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.....	81
Figura 31 - Estudo comparativo de citotoxicidade do pró-fármaco TMZ, dissolvido em DMSO nas linhas celulares MNT-1, SK-MEL-30, M8, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. ....	82
Figura 32 - Representação gráfica do estudo de hidrólise enzimática do PF C, no lisado da linha celular MNT-1, em tampão fosfato pH 7.4, 0.01 M, a 37°C. N=1. ....	86
Figura 33 - Representação gráfica do estudo de hidrólise enzimática do PF C, no lisado da linha celular M8, em tampão fosfato pH 7.4, 0.01 M, a 37°C. N=1. ....	86
Figura 34 - Representação gráfica da relação existente entre o PF C e a Amina correspondente durante o estudo de hidrólise enzimática, no lisado da linha celular MNT-1, em tampão fosfato pH 7.4, 0,01 M, a 37°C. N=1. ....	87
Figura 35 - Representação gráfica da relação existente entre o PF C e a Amina correspondente durante o estudo de hidrólise enzimática, no lisado da linha celular M8, em tampão fosfato pH 7.4, 0,01 M, a 37°C. N=1. ....	87

Figura 36 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. .... 111

Figura 37 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular SK-MEL-30, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose..... 111

Figura 38 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular M8, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. .... 112

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Biossíntese das melaninas (*adaptado* (26)). ..... 8

Esquema 2 - Via metabólica dos dimetiltriazenos (*in* (55)). ..... 17

Esquema 3 - Mecanismo de libertação do fármaco através da tirosinase (*in* (88)). ..... 23

Esquema 4 - Mecanismo de libertação do fármaco através da tirosinase (*in* (89)). ..... 23

Esquema 5 - Mecanismo de libertação do fármaco através da tirosinase (*in* (89)). ..... 24

Esquema 6 - Mecanismo de decomposição dos N-acetil-L-tirosina-MMT (*in* (53)) ..... 43

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes grupos substituintes do anel benzénico dos triazenos, utilizados neste trabalho..... 33

Tabela 2 - Resumo dos diferentes solventes de eluição em coluna, TLC e recristalização. .... 37

Tabela 3 - Grupo de novos pró-fármacos em estudo e a respectiva massa molecular relativa ( $M_R$ ). ..... 38

Tabela 4 - Reagentes e Solventes utilizados neste trabalho, com respectiva sigla. .... 45

Tabela 5 - Desvios químicos obtidos para o pró-fármaco A (X=COCH<sub>3</sub>) ..... 51

Tabela 6 - Desvios químicos obtidos para o pró-fármaco C (X=CN)..... 53

Tabela 7 - Valores de Log P dos PF A, B e C (*in* (66)) ..... 70

Tabela 8 - Valores das percentagens de células viáveis e mortas da linha celular MNT-1, após o tratamento com 50 e 100  $\mu$ M de PF C. .... 72

Tabela 9 - Valores das percentagens de células viáveis e mortas da linha celular SK-MEL-30, após o tratamento com 50 e 100  $\mu$ M de PF C. .... 73

Tabela 10 - Valores das percentagens de células viáveis e mortas da linha celular M8, após o tratamento com 50 e 100  $\mu$ M de PF C. .... 75

Tabela 11 - Valores das constantes de velocidade observadas e respectivos valores de tempo de semi-vida do PF C, em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C, nos lisados das linhas celulares MNT-1 e M8. N=1.....88



## **AGRADECIMENTOS**

O desenvolvimento e a conclusão desta tese teriam sido incomparavelmente mais pobres, caso não tivessem sido auxiliados pela colaboração directa ou indirecta de diversas pessoas, que passarei a enunciar e a expressar o meu agradecimento.

Gostaria por isso de agradecer aos meus orientadores, a Professora Doutora Paula Videira e a Professora Doutora Maria Eduarda Mendes, pela sua dedicação e entrega à realização deste trabalho, pela sua sempre valiosa orientação científica e visão crítica dos diferentes desenvolvimentos que culminaram na concretização desta tese.

À Professora Doutora Maria de Jesus Perry e Professora Doutora Ana Paula Francisco, por todo o apoio prestado e disponibilidade oferecida ao longo deste ano.

À Professora Doutora Guadalupe Cabral, pela amizade, confiança, paciência, disponibilidade, orientação e úteis ensinamentos.

Ao Departamento de Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas por me terem disponibilizado todos os recursos necessários para desenvolver este trabalho.

À Dra. Zélia Silva, Paulo Severino, Hélio Crespo, Mylène Carrascal e Teresa Veríssimo pela amizade, ajuda constante e bons conselhos. Em especial, à Mariana Silva pela amizade e companheirismo.

Aos restantes integrantes do Departamento de Imunologia, especialmente à Dr.<sup>a</sup> Catarina Martins, à Glória Nunes, Manuela Correia, Luísa, Idalina, Amélia, Elisabete e Filomena, pelo auxílio e disponibilidade demonstrada ao longo deste ano.

Finalmente, gostaria de agradecer a toda a minha família e amigos por todo o apoio dado nesta caminhada. Um obrigada especial aos meus pais, à minha irmã Diana e ao Carlos por todo o interesse demonstrado e, acima de tudo, por me fazerem acreditar que é sempre possível.



## RESUMO

O melanoma é um tumor maligno com grande capacidade de metastizar e quando diagnosticado tardiamente torna-se fatal. Além disso, é a malignidade com maior resistência ao tratamento, pelo que novos casos continuam a ser descritos e a sua incidência continua a aumentar, excedendo outros tipos de cancro. Assim sendo, no âmbito da quimioterapia alquilante, os triazenos tornam-se o recurso de primeira linha no tratamento de doentes com melanoma maligno em estado avançado.

Há no entanto uma necessidade crescente de encontrar novas formas de tratamento de melanoma, mais eficientes e capazes de solucionar os problemas relacionados com a quimioterapia sistémica até agora utilizada, tal como a baixa selectividade entre as células tumorais e as células saudáveis.

A terapia MDEPT (Melanocyte-Directed-Enzyme Prodrug Therapy) é uma estratégia potencialmente eficaz no tratamento de melanomas e baseia-se no facto de nos melanócitos malignos existir uma elevada actividade de uma enzima específica: a tirosinase. Esta estratégia consiste no desenvolvimento de pró-fármacos (PFs) que possuam um substrato da tirosinase (como a tirosina), que ao atingirem o melanócito maligno, possam ser metabolizados por esta enzima libertando o fármaco citotóxico *in loco*. Desta forma, aumenta-se a especificidade do fármaco, diminuindo a sua citotoxicidade para as células saudáveis. Mediante a síntese de novos PFs com base nesta estratégia, através da ligação de um MMT (monometiltriazeno) à tirosina, os objectivos deste estudo foram: **(1)** comparar os métodos de síntese destes PFs, utilizando diferentes agentes de acoplamento nomeadamente o DCC e o TBTU; **(2)** verificar o efeito citotóxico destes, bem como a sua especificidade; **(3)** caracterizar a actividade da tirosinase em linhas celulares; e **(4)** estudar a hidrólise enzimática do PF em lisados de linhas celulares de melanoma.

Nestes estudos, foram usadas linhas celulares de melanoma com diferentes níveis de actividade tirosinásica.

Os resultados desta investigação sugerem que estes PFs apresentam acção citotóxica dependente da tirosinase, portanto eventualmente específica para as células de melanoma. Relativamente à síntese, verificou-se que o método de activação pelo TBTU com auxílio a microondas apresentou vantagens em termos de rapidez e eficiência em comparação com o método tradicional com DCC à temperatura ambiente.

Os resultados obtidos sugerem assim que estes PFs tenham potencial para virem a ser utilizados como terapêutica no tratamento do melanoma.

**PALAVRAS-CHAVE:** melanoma, triazenos, tirosinase, MDEPT, citotoxicidade, pró-fármacos (PFs)

## ABSTRACT

Melanoma is a malign tumour with a high metastatic capacity that when diagnosed late becomes fatal. Furthermore, it is the malignancy with the highest resistance to treatment. That is why new cases are still being reported and with increasing numbers, making this type of cancer one of the commonest ones. Therefore, in the field of alkylating chemotherapy the triazenes become the first line of treatment in patients with advanced malign melanoma.

There is an increasing necessity of finding new ways of treatment, more efficient and capable of overcoming the problems associated with the so far used systemic therapy; problems such as the low selectivity between healthy and tumorous cells.

The MDEPT therapy is a potential strategy in treating melanomas and it is based on the fact that in melanocytes there is a high activity of a specific enzyme: the tyrosinase. This strategy is based on the development of prodrugs (PDs) that contain a tyrosinase substrate (such as tyrosine), that when in contact with the malign melanocyte, can be metabolized by this enzyme and release the cytotoxic agent *in loco*. In this way the specificity of the pharmaceutical is increased, diminishing its cytotoxicity to healthy cells. Using this strategy to synthesize new PDs, by the attachment of a MMT (monomethyltriazene) to tyrosine, the objectives of this study were: **(1)** to compare the synthesis methods of these PDs, namely DCC and TBTU; **(2)** to verify the cytotoxic effect, as well as the specificity of these PDs; **(3)** characterize the activity of tyrosinase in cellular lines; and **(4)** to study the enzymatic hydrolysis of PDs in melanoma cellular lysates.

In these studies different melanoma cell lines were used with different levels of tyrosinase activity.

The results of this investigation showed that these PDs have a cytotoxic effect dependent of tyrosinase and therefore specific of melanoma cells. Regarding the synthesis, it was observed that the method using the coupling reagent TBTU with microwaves technology presented advantages in terms of

speed and higher efficiency despite the traditional method with coupling reagent DCC, at room temperature.

These results are quite optimistic and suggest that they can be used as a potential treatment for melanomas.

**KEYWORDS:** melanoma, triazenes, tyrosinase, MDEPT, cytotoxic, prodrugs (PDs).

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>7-AAD</b>	7-Amino-actinomicina
<b>ADEPT</b>	Antibody-directed-enzyme-prodrug therapy
<b>Anexina V-APC</b>	Anexina V conjugada à aloficocianina
<b>DAPI</b>	Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole
<b>DCC</b>	N,N'-Diciclohexilcarboiimida
<b>DHI</b>	5,6-dihidroindol
<b>DHICA</b>	5,6-dihidroindol-2-ácido carboxílico
<b>DMAP</b>	4-Dimetilaminopiridina
<b>DMT</b>	Dimetiltriazeno
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTIC</b>	Dacarbazina
<b>Et<sub>3</sub>N</b>	Trietilamina
<b>GDEPT</b>	Gene-directed-enzyme-prodrug therapy
<b>GPAT</b>	Genetic prodrug activation therapy
<b>HMT</b>	Hidroximetiltriazeno
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>IV</b>	Infra-vermelho
<b>L-DOPA</b>	3,4-dihidroxifenilalanina
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>Log P</b>	Logaritmo de coeficiente de partilha
<b>MDEPT</b>	Melanocyte-directed-enzyme-prodrug therapy
<b>MeN<sub>2</sub><sup>+</sup></b>	Catião metildiazónico
<b>MMT</b>	Monometiltriazeno
<b>MMT-X</b>	Monometiltriazeno com um substituinte X, podendo ser COCH <sub>3</sub> , COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> E CN
<b>MTS</b>	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
<b>MW</b>	Microondas
<b>OGAT</b>	O <sup>6</sup> -alquilguanina-DNA-alquiltransferase
<b>PDEPT</b>	Polymer-directed-enzyme-prodrug therapy
<b>PF</b>	Pró-fármaco
<b>Pf</b>	Ponto de fusão
<b>RER</b>	Retículo endoplasmático rugoso
<b>RGP</b>	Fase de crescimento radial
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Tempo de semi-vida

<b>TBTU</b>	N-[1H-benzotriazol-1-il](dimetilamino)metileno]-N-metilmetanoaminio tetrafluorborato N-óxido
<b>TLC</b>	Cromatografia de camada fina
<b>TMZ</b>	Temozolomide
<b>Trp1</b>	Tyrosinase-related protein 1
<b>Trp2</b>	Tyrosinase-related protein 2
<b>TyrC</b>	Tirosinase de Cogumelo
<b>VDEPT</b>	Virus-directed-enzyme-prodrug therapy
<b>VPG</b>	Fase de crescimento vertical
<b>K<sub>obs</sub></b>	Constante de velocidade

# **CAPÍTULO 1.**

## **INTRODUÇÃO**



## CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

### 1. GENERALIDADES

#### 1.1. A Pele

A pele é um órgão complexo que nos protege das agressões do ambiente e, ao mesmo tempo, permite interações com o mesmo (1; 2). Histologicamente divide-se em epiderme, derme e hipoderme (Figura 1).

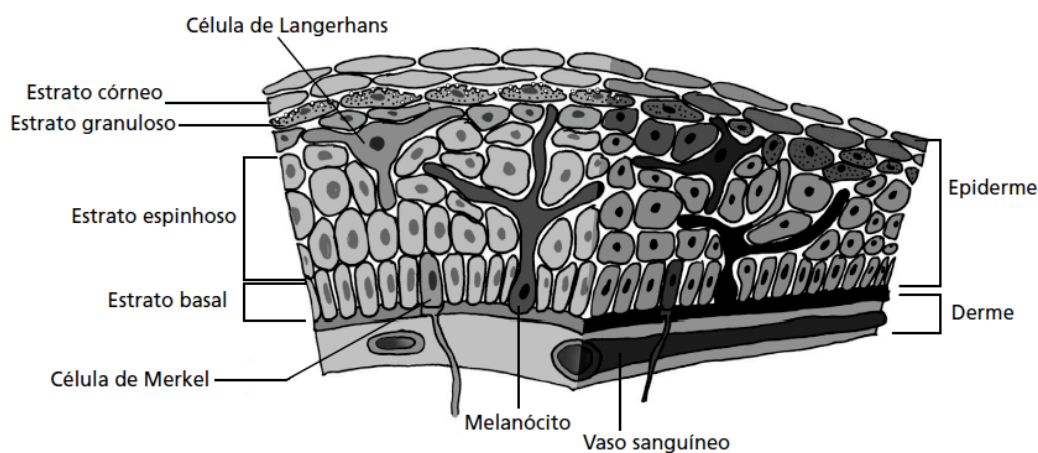


Figura 1 - Representação esquemática de um corte de pele fina, demonstrando a localização da epiderme e da derme (*in* (3)).

A primeira é a camada mais superficial da pele e é altamente estratificada, pavimentosa, queratinizada e avascular. Maioritariamente constituída por queratinócitos (células produtoras de queratina, uma proteína resistente e impermeável responsável pela protecção da pele), representando cerca de 90% da sua constituição sendo que, os restantes 10% correspondem a melanócitos, células de Langerhans (responsáveis pela resposta imunológica) e de Merkel (4).

A segunda camada, a derme caracteriza-se por um tecido conjuntivo altamente vascularizado com funções de suporte, regulação da temperatura corporal e nutrição da epiderme. Como a epiderme não possui vasos

sanguíneos, todos os nutrientes e o oxigénio chegam a esta camada por difusão, utilizando a vasculatura da derme. Aqui são encontradas algumas células como os fibroblastos, macrófagos, mastócitos e células circulantes do sistema imunitário (4).

A última camada designa-se por hipoderme e está localizada abaixo da derme. É um tecido subcutâneo com funções de reserva energética, e por isso é rica em tecido adiposo. Os principais componentes desta última camada da pele são as células adiposas ou adipócitos, especializados na síntese e acumulação de energia (5).

## **1.2. Melanogénese**

A pigmentação da pele é determinada pela existência de células produtoras de pigmento chamadas melanócitos.

Os melanócitos são originados a partir dos melanoblastos que migram da crista neural para a epiderme bem como outros locais do corpo humano (olhos, folículos capilares, parte interna da orelha, membranas mucosas e sistema nervoso central) (6; 7).

Estas células são especializadas na produção de melanina e no seu transporte para as células vizinhas através dos seus prolongamentos dendríticos. A síntese de melanina está localizada nos melanossomas (organelo intracitoplasmático provido de membrana do melanócito) onde a enzima tirosinase actua no aminoácido tirosina, que resulta na formação de L-DOPA (8; 9; 6). Por sua vez, a tirosinase actua sobre a L-DOPA produzindo assim dopaquinona que em sequência de inúmeras reacções converte-se em melanina. Quando concluída a sua síntese, há uma grande quantidade de melanina no melanossoma, o que leva à inactivação da tirosinase, passando assim a designar-se o melanossoma repleto de melanina por grânulo de melanina. Estes migram pelos prolongamentos dos melanócitos e são transferidos para os queratinócitos (Figura 2) (10).

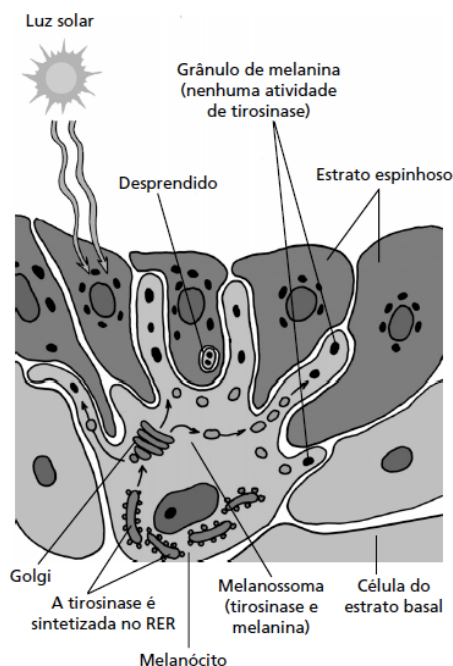


Figura 2 - Representação do processo de melanogênese localizado no melanossoma (in (3)).

A melanina sintetizada por cada melanócito é transferida em média para 36 queratinócitos (2). Estas células têm um papel importante na fotoproteção, uma vez que, a radiação UV (UVA e UVB) leva ao escurecimento da melanina pré-existente, aumento da produção da melanina e a transferência da mesma para os queratinócitos, de modo a protegê-los de danos no DNA (11; 10).

A classificação dos fototipos de pele em I-VI foi baseada na capacidade dos indivíduos com diferentes constituições de pigmentação responderem à exposição solar através do bronzeado. Deste modo, o fototipo I representa os indivíduos com pele muito clara, com susceptibilidade elevada a escaldões e que não se bronzeiam durante a exposição solar. O fototipo II corresponde a indivíduos que se bronzeiam levemente e que apanham com alguma regularidade escaldões. Os fototipos seguintes, III e IV, bronzeiam-se com facilidade e raramente apanham escaldões. Finalmente, os indivíduos com fototipo V e VI têm pele muito escura, nunca apanham escaldões e, para além disso, não se bronzeiam (12; 13).

Independentemente do fototipo de cada indivíduo, a melanina possui características químicas e físicas com implicações na protecção do organismo aos danos provocados pelas radiações UV (14; 15; 16; 17).

### 1.2.1. Tirosinase

A melanogénese, como anteriormente descrito, designa-se como via bioquímica responsável pela síntese de melanina que reside nos melanossomas (6). Durante o desenvolvimento embrionário, o melanossoma adquire três metalo-enzimas melanogénicas essenciais para a síntese de melanina: **(1)** tirosinase, **(2)** tyrosinase-related protein 1 (Trp1) e **(3)** tyrosinase-related protein 2 (Trp2), sendo a primeira crítica neste processo (6).

A tirosinase (EC 1.14.18.1) é uma glicoproteína bifuncional composta por 511 aminoácidos com peso molecular entre 60-75 kDa. (18) Os átomos de cobre, identificados no centro activo da tirosinase, possuem um papel essencial para a actividade catalítica (19).

A sua síntese é feita pelos ribossomas do retículo endoplasmático rugoso (RER) (10). Posteriormente, é transportada para o complexo de Golgi, onde é N-glicosilada por glicosiltransferases, antes da sua exportação para os melanossomas (6). O seu padrão de glicosilação é fundamental para que a sua estrutura e função sejam normais (20; 8). Esta enzima foi dividida em três domínios (Figura 3): **(1)** domínio interior que reside na parte interna dos melanossomas, **(2)** domínio transmembranar e **(3)** domínio citoplasmático que se estende no citoplasma dos melanócitos (6).

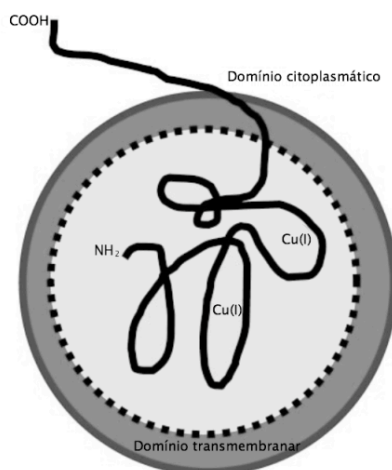


Figura 3 - Domínios da enzima tirosinase (*adaptado* (6))

Legenda: NH<sub>2</sub>=aminoácido terminal da tirosinase; COOH=terminal carboxílico da tirosinase; Cu(I)=átomos de cobre encontrados no centro activo.

A via biossintética do pigmento melanina (Esquema 1) é iniciada pela tirosinase com duas reacções limitantes de conversão, onde o aminoácido L-tirosina é o precursor metabólico para a melanina.

As reacções iniciam-se com oxidações enzimáticas mediadas pela tirosinase: **(reacção 1)** o aminoácido L-tirosina é transformado em 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e posteriormente, **(reacção 2)** a L-DOPA é oxidada em dopaquinona (3,4-dihidroxifenilalanina quinona) (21; 22; 23; 24; 25; 26).

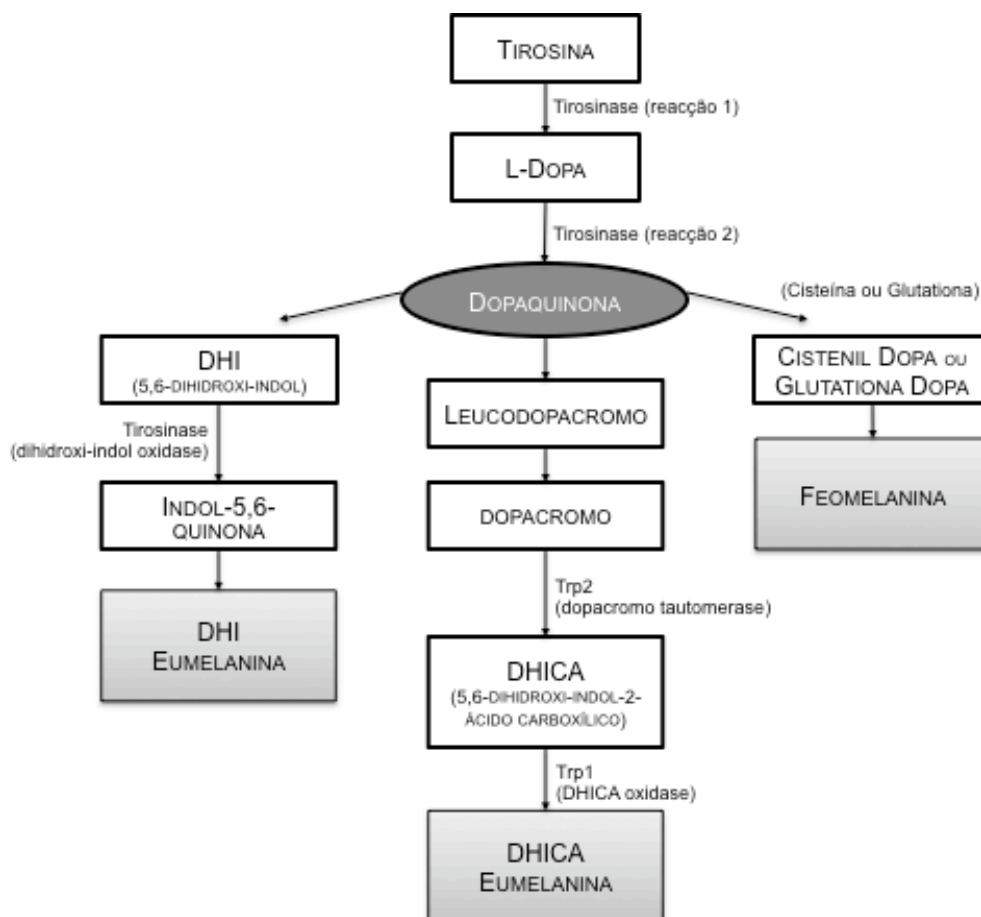
A auto-oxidação de L-dopaquinona em leucodopacromo e este último, em dopacromo inicia uma cascata de reacções redox que termina com a formação de dois compostos intermediários: 5,6-dihidroxi-indol (DHI) e 5,6-dihidroxi-indol-2-ácido carboxílico (DHICA). Estes, por sua vez, polimerizam para formar eumelanina (21; 22; 23; 24; 25; 26).

A Trp2 (dopacromo tautomerase) catalisa a tautomerização do dopacromo em 5,6-dihidroxi-indol-2-ácido carboxílico (DHICA). De seguida, a enzima Trp1 (DHICA oxidase) catalisa a conversão de DHICA no pigmento castanho-escuro, a eumelanina (21; 22; 23; 24; 25; 26).

Ao mesmo tempo, o dopacromo pode sofrer uma descarboxilação espontânea que resulta na formação de 5,6-dihidroxi-indol (DHI) e, este, é

convertido pela tirosinase (que actua como uma dihidroxi-indol oxidase) em indol-5,6-quinona, produto final da formação de eumelanina (14; 15; 16; 17).

Por outra via, pode haver conjugação da dopaquinona com cisteína ou glutatona resultando na conversão em cisteinil DOPA ou glutatona DOPA, que passam por uma série de biotransformações levando à formação do pigmento vermelho-amarelo, a felomelanina (14; 15; 16; 17).



Esquema 1 - Biossíntese das melaninas (adaptado (26)).

A eumelanina é considerada como um polímero fotoestável e fotoprotector, por ser responsável pelo *scavenge* de espécies reactivas de oxigénio após exposição à radiação solar, enquanto que a felomelanina é fotolábil e fotosensibilizadora (14; 15; 16; 17).

## 2. MELANOMA MALIGNO

Melanoma maligno é um dos cancros mais agressivos e cada vez mais comum entre a população mundial. Apesar da incidência ser de cerca 5% entre os tumores malignos da pele, o melanoma maligno apresenta 60% de letalidade. Esta situação deve-se ao facto deste cancro se espalhar muito rapidamente para os nódulos linfáticos e para diferentes áreas do corpo, comparativamente com outros tipos de cancro de pele e, nesta fase passa a ser denominado por melanoma metastático (27).

Define-se por ser um tumor que resulta da transformação maligna de melanócitos, por acumulação de alterações genéticas e moleculares, distribuídos homoganeamente na camada basal da epiderme, ou seja, resulta do crescimento e proliferação anormal destes (6; 28; 29).

Mutações em genes reguladores do crescimento, a produção de factores de crescimento autócrinos e a perda de receptores de adesão contribuem para alterações na sinalização intracelular nos melanócitos, permitindo o escape à regulação feita pelos queratinócitos (30).

Consequentemente, os melanócitos proliferam descontroladamente e espalham-se levando à formação de *nevus*. Os *nevi* são geralmente benignos, mas podem progredir para melanoma de crescimento radial (RGP), sendo esta uma lesão intra-epidérmica com microinvasão da derme. Estas células podem progredir para uma fase de crescimento vertical (VPG), em que estas têm potencial metastático (Figura 4) (28).

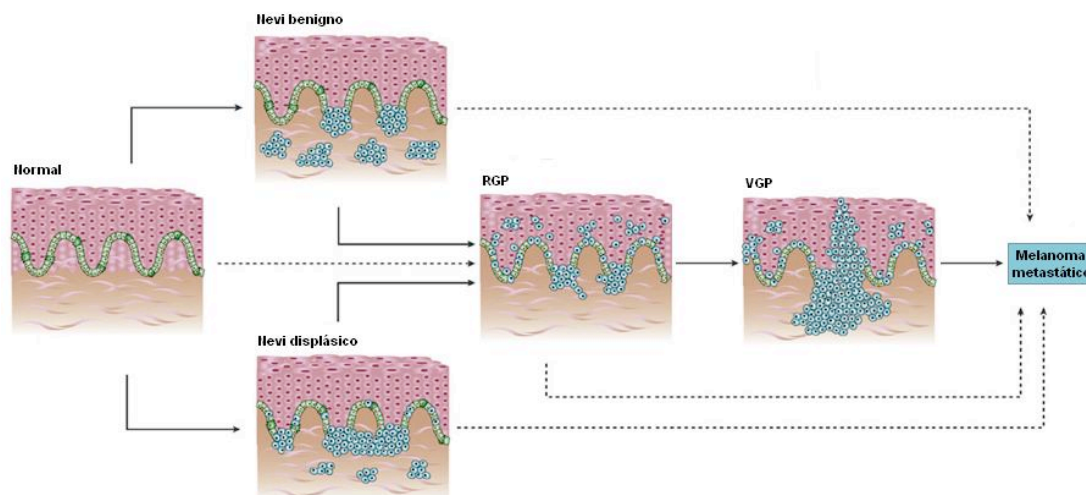


Figura 4 - Progressão na transformação maligna dos melanócitos (adaptado (31)).

Dos factores de risco para o desenvolvimento de melanoma destacam-se a exposição solar (cumulativa ou esporádica), o fototipo baixo (doentes com pele clara susceptível a queimaduras solares, sardas, cabelo e olhos claros), bem com a presença de múltiplos *nevi* melanocíticos, *nevi* clinicamente atípicos e *nevi* congénitos gigantes (28). A história familiar, os antecedentes de neoplasias não melanocíticas e a presença de imunossupressão afectam igualmente a probabilidade de desenvolver a doença (28). Quanto à predisposição genética, foram descritas em 8-12% das famílias com história clínica de melanoma, mutações no gene supressor de tumor cinase inibidora dependente de ciclina 2A (CDKN2A), que parecem estar envolvidas na patogénese do melanoma (32).

Apesar de existirem diferentes factores de risco para esta doença, cerca de 65% dos melanomas malignos estão relacionados com a exposição solar (33). Em resposta às radiações UV, os queratinócitos secretam factores que regulam os melanócitos na sua sobrevivência, diferenciação, proliferação e mobilidade, estimulando-os assim a produzirem melanina, como resposta protectora aos efeitos dos UV e desta forma, como prevenção “intrínseca” do cancro de pele (34).

O diagnóstico precoce pode começar pelo auto-exame cutâneo e o sistema ABCDE (A: Assimetria da lesão, B: Bordo irregular, C: Cor

heterogénea, D: Diâmetro superior a 5 mm e E: Evolução brusca de morfologia) (35).

Perante a suspeita clínica de melanoma, em lesões com margem entre 3-5 mm é necessário proceder à excisão cirúrgica para se proceder a classificação por análise histológica. Excepcionalmente, em melanomas de grandes dimensões ou cuja excisão seja mutilante poder-se-á fazer uma biopsia parcial (35).

A classificação da lesão deve ser feita segundo métodos internacionais como, por exemplo, o da AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) que se baseia na combinação de 3 factores: **(1)** invasão do tumor (T) descrito como índice de Breslow que avalia a sua espessura em milímetros, **(2)** presença de gânglios linfáticos (N) por dissecação da área ganglionar ou biopsia ganglionar e que inclui metástases satélite e em trânsito e **(3)** metástases à distância (M). Este último inclui os níveis plasmáticos de lactato desidrogenase (LDH - marcador bioquímico de integridade celular) que é um factor prognóstico em todos os tipos de metástases (36).

A combinação dos factores anteriormente descritos leva à classificação em 4 estadios evolutivos (I, II, III e IV). Os estadios I e II correspondem ao tumor primitivo localizado *in loco*, o estadio III quando existe afecção dos gânglios linfáticos e/ou metástases satélite e em trânsito, e no quarto e último estadio encontram-se os melanomas quando há metástases noutros órgãos ou seja, disseminação generalizada (35; 37; 36; 38).

Quando o diagnóstico é feito numa fase precoce, ou seja, na fase de crescimento radial (RGP), em que a doença é localizada e restrita à epiderme, o prognóstico é bastante favorável porque a remoção cirúrgica do *nevus* pode resultar na cura clínica (39).

A remoção cirúrgica do *nevus* consiste na sua excisão bem como a região circundante de pele não afectada. O diagnóstico e o tratamento prematuro implicam que a percentagem de cura seja superior a 95% (35).

Contudo, quando a doença já está numa fase de crescimento vertical (VGP), os melanócitos penetram a camada basal da epiderme próxima de vasos sanguíneos e linfáticos e, para além disso, crescem intraderme como um nódulo. Nesta situação, o prognóstico de sobrevivência diminui significativamente.

O melanoma metastático desenvolve-se quando os melanócitos se dissociam da lesão inicial e migram através do estroma e invadem os vasos sanguíneos e linfáticos, para a formação de tumores secundários noutros locais (28). A disseminação pode ocorrer para qualquer órgão, sendo os locais mais comuns a pele, os tecidos subcutâneos, os nódulos linfáticos e os órgãos (em ordem decrescente de ocorrência, pulmões, fígado, cérebro, osso e tracto gastrointestinal) (37).

Quando esta capacidade de metastização se inicia, o tumor torna-se resistente às terapias actuais, por este facto, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é imprescindível (40).

### 3. QUIMIOTERAPIA DO MELANOMA

A quimioterapia é considerada como uma terapia sistémica em que os fármacos através da circulação sanguínea se distribuem por todo o organismo. Tem o pressuposto da utilização de um ou mais fármacos anti-tumorais de baixo peso molecular que interferem com o DNA das células em divisão celular muito rápida, de forma a induzir apoptose. Por este facto, estes agentes anti-tumorais também irão afectar células saudáveis cuja divisão também é rápida, como por exemplo as células localizadas na medula óssea, folículos capilares, tracto digestivo, entre outras (41). A maioria dos agentes quimioterapêuticos podem ser divididos em agentes alquilantes, anti-metabolitos, inibidores das topoisomerasas, anti-microtúbulos, plantas alcalóides e antibióticos anti-tumorais (42; 43).

Ao longo de décadas tem existido um grande desenvolvimento da quimioterapia no tratamento do cancro, porém os inúmeros fármacos existentes são pouco eficazes e, apresentam efeitos secundários severos, devido à sua inespecificidade para as células tumorais. Assim, é urgente o desenvolvimento de novos agentes anti-tumorais mais eficientes para o tratamento desta doença e que não afectem as células saudáveis cujo crescimento também é rápido. Desta forma, muitos dos efeitos secundários poderão ser contornados (alopecia, mielossupressão, entre outros).

Além disso, o melanoma disseminado constitui a doença maligna com maior resistência a fármacos citotóxicos. Neste tipo de tumores, a resistência à quimioterapia não é necessariamente uma consequência primária de alterações genéticas adquiridas, durante e/ou após o tratamento, mas sim, uma característica presente em lesões não tratadas. Para além disto, os mecanismos de sobrevivência intrínsecos são “apurados” por alterações adicionais, durante a progressão tumoral, o que contribui para fracas respostas ao tratamento, observadas na prática clínica (44; 34). Pensa-se que estas propriedades de elevada sobrevivência se devem ao

facto dos melanócitos serem provenientes de células com elevada mobilidade (34).

A maioria das células respondem às radiações ionizantes com a sua morte ou com a paragem do seu ciclo celular, numa tentativa de reparar os danos provocados no DNA. Contudo, os melanócitos e os seus precursores quando expostos à radiação UV, são activados para produzir melanina e proteger as suas células vizinhas nomeadamente, os queratinócitos e outras células da epiderme, funcionando como fotoprotectores naturais da pele (45). Assim, os melanócitos estão programados para sobreviver em condições desfavoráveis, durante o seu desenvolvimento apresentando níveis reduzidos de apoptose espontânea *in vivo*, comparativamente a outros tipos de células tumorais (44). Por essa razão são também mais resistentes à apoptose *in vitro* induzida por fármacos (44).

### **3.1. Triazenos: uma classe dos agentes alquilantes**

A quimioterapia em monoterapia (estratégia de terapia em que se usa apenas um fármaco) com agentes quimioterapêuticos é a estratégia mais utilizada no tratamento de melanoma em estado avançado, mais especificamente para o melanoma metastático. A quimioterapia utilizada inclui dacarbazina, temozolomide, nitrosureias (carmustina, lomustina, fotemustina), análogos de platina (cisplatina, carboplatina), alcalóides da vinca (vimblastina, vincristina, vindesina e vinorelbina) e taxanos (paclitaxel e docetaxel). As combinações de fármacos não melhoram a sobrevivência e quando comparados com a monoterapia trazem menos benefícios em termos de efeitos secundários (46).

Testes clínicos com estes agentes, demonstraram actividade contra o melanoma metastático, porém não houve mais de 20% de resposta, sendo em geral de curta duração (47; 48; 49; 50).

Em 2011, a imunomodulação com Ipilimumab, um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 (antigénio-4 associado aos linfócitos T citotóxicos), foi aprovada para pacientes com melanoma em estado avançado pela FDA

(Food and Drug Administration) como tratamento de primeira e segunda linha e pela EMA (European Medicines Agency) como tratamento de segunda linha. O estudo comparou os efeitos da combinação do ipilimumab com a dacarbazina versus monoterapia com a dacarbazina. Descreve-se um aumento significativo na sobrevida dos pacientes submetidos à terapia combinada com o ipilimumab e a dacarbazina comparativamente à monoterapia com a dacarbazina (que nunca havia sido descrita por aumentar a sobrevida global nesta população de pacientes) (51).

Todavia, para o tratamento de melanoma maligno metastático, os agentes quimioterapêuticos utilizados actualmente como tratamento de primeira linha, pela sua eficiência clínica comparativamente aos restantes, são os agentes alquilantes mais precisamente da classe dos triazenos, que são fármacos anti-tumorais com acção alquilante do DNA (isto é, compostos capazes de substituir um protão de uma outra molécula por um grupo alquilo). Conforme representado na Figura 5, são caracterizados estruturalmente pela existência de uma ligação entre três átomos de azoto, do tipo N=N-N, e que se encontra muitas vezes adjacente a um anel aromático.

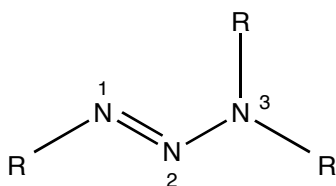


Figura 5 - Representação química dos anti-tumorais triazenos.

Os compostos de triazenos com aplicação clínica no tratamento de melanoma metastático são a dacarbazina (5-(3,3-dimetil-1-triazeno)imidazol-4-carboxamida, DTIC) e o temozolomide (3,4-dihidro-3-metil-4-oxoimidazo[5,1-d]-as-tetrazina-8-carboxamida, TMZ), que para além de serem ambos pró-fármacos, apresentam semelhanças nas suas propriedades química, física, anti-tumoral e mutagénica (Figura 6).

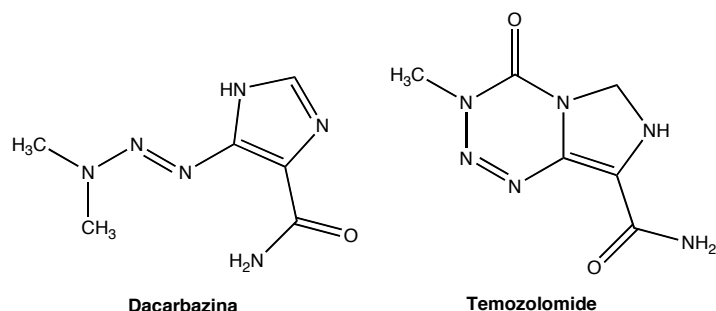
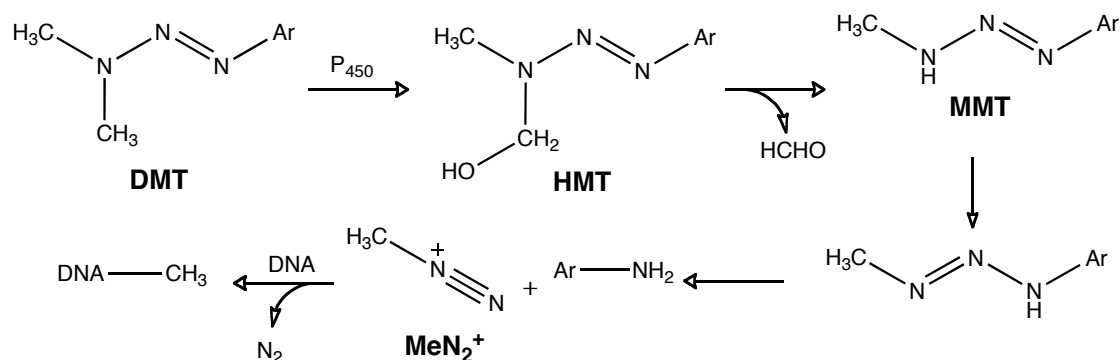


Figura 6 - Representação química dos agentes anti-tumorais triazenos, Dacarbazina (DTIC) e Temozolomide (TMZ)

O seu mecanismo de acção envolve a alquilação das bases de guanina, nas posições O<sub>6</sub> e N<sub>7</sub> do *major groove*, por um catião metildiazónio (MeN<sub>2</sub><sup>+</sup>), agente resultante da decomposição do MMT (1-aryl-3-metiltriazeno ou monometiltriazeno).

Os dimetiltriazenos ou 1-alkil-3,3-dimetiltriazenos (DMT) são pró-fármacos, que quando são administrados no organismo, necessitam de ser biotransformados, em meio aquoso e pH fisiológico, no respectivo metabolito activo citotóxico, o monometiltriazeno (MMT). Posteriormente, o monometiltriazeno liberta uma espécie muito reactiva alquilante do DNA, o catião metildiazónio.

O mecanismo de activação varia consoante o composto (TMZ e DTIC). No caso do TMZ há clivagem química por hidrólise do anel tetrazinóico, originando o MMT, que por sua vez, quebra e origina o 5-aminoimidazol-4-carboxamida e o catião metildiazónio (MeN<sub>2</sub><sup>+</sup>) (52). Já a DTIC é metabolizada enzimaticamente pelas enzimas microsossomais hepáticas, mais precisamente, sofre N-desmetilação oxidativa, a nível hepático pelo citocromo P450, envolvendo a formação de 1-aryl-3-hidroximetil-3-metiltriazeno (hidroximetiltriazeno, HMT). Em meio aquoso ou ligeiramente acídico, o HMT é hidrolisado em formaldeído e MMT. O MMT, em meio aquoso, sofre hidrólise espontânea, da qual resulta a formação da amina aromática e do catião metildiazónio (MeN<sub>2</sub><sup>+</sup>). O catião metildiazónio alquila os ácidos nucleicos (Esquema 2) (52; 53; 54).



Esquema 2 - Via metabólica dos dimetiltriazenos (in (55)).

Da dose de dacarbazina administrada via endovenosa cerca de 50% é excretada na urina sem sofrer metabolização. Por outro lado, o seu análogo TMZ, quando administrado oralmente, 100% da dose está biodisponível, uma vez que o seu mecanismo de activação não depende da metabolização por enzimas (53; 56; 57; 58). Além disso, o temozolomide tem a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica, com uma concentração média no líquor de 30% da concentração plasmática, com eficácia similar ao DTIC. Por isto, o TMZ poderá ser usado em alternativa à DTIC no tratamento de doentes com melanoma maligno que possuam metástases cerebrais, uma vez que a DTIC é ineficaz nestes casos (59; 60).

Entre os agentes citotóxicos, a dacarbazina em monoterapia proporciona respostas entre 14 e 20% após quatro a seis meses de tratamento, nomeadamente reduções objectivas do tumor, diminuição das metástases localizadas na pele, nos tecidos subcutâneos e nos nódulos linfáticos (53). Mas menos de 5% de respostas foram totalmente eficazes (61). Recentemente um estudo clínico em fase III descreve que as respostas ao tratamento com a dacarbazina não vão além dos 12% (62).

### 3.1.1. Resistência das células de melanoma aos triazenos

A resistência das células de melanoma aos fármacos normalmente utilizados tem sido problemática, porque limita a acção alquilante destes agentes. O mecanismo de resistência que tem sido apresentado relaciona a

capacidade de reparação das células face aos danos induzidos pelos fármacos com acção anti-tumoral. Como já referido anteriormente, os triazenos formam aductos de DNA, sendo a O<sub>6</sub>-alquilguanina a principal lesão citotóxica e mutagénica. Geralmente, como consequência destas alterações, procede-se à sua reparação, mediada pela enzima O<sub>6</sub>-alquilguanina-DNA-alquiltransferase (OGAT). Após a reparação, as células afectadas ficam saturadas, até uma nova síntese de novas moléculas da enzima reparadora.

Os níveis elevados de actividade de OGAT são o principal elemento responsável pela resistência a estes fármacos. No entanto foi demonstrado que os triazenos têm capacidade para inactivar a enzima OGAT, por mecanismos directos e indirectos e, por isso, tornaram-se bons candidatos para **(1)** aumentar a citotoxicidade própria e **(2)** reverter a resistência das células tumorais aos diferentes compostos triazénicos anti-tumorais que alquilam a O<sub>6</sub>-guanina (63; 64).

### **3.1.2. Inespecificidade dos triazenos utilizados no tratamento de melanoma maligno**

Os fármacos existentes na prática clínica com acção anti-tumoral, afectam células em proliferação de modo sistémico, principalmente as células em divisão activa, independentemente da fase em que se encontram (síntese, replicação ou processamento). Por este facto, têm capacidade para matar grande número de células tumorais (que se encontram em divisão descontrolada) (65).

No entanto, a problemática destes fármacos coloca-se não pela fraca citotoxicidade, mas sim, pela falta de selectividade/especificidade para as células malignas. A concentração de fármaco que atinge o tumor é reduzida para uma boa eficácia terapêutica. Além disso, a fraca selectividade provoca uma toxicidade sistémica por não haver distinção entre células saudáveis e células tumorais, provocando alterações drásticas na proliferação das células saudáveis (66; 67).

### 3.2. Novas estratégias para o tratamento de melanoma maligno

Novas estratégias surgiram para solucionar os problemas anteriormente descritos: a baixa concentração de fármaco *in loco*, a toxicidade sistémica, a falta de selectividade entre células tumorais e saudáveis e o aparecimento de mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células tumorais (67; 68; 69; 70; 71).

Com a perspectiva de aumentar a especificidade dos fármacos e consequentemente, aumentar a sua eficácia clínica têm vindo a desenvolver-se os pró-fármacos, que são agentes quimioterapêuticos que podem ser selectivamente activados no local, onde é suposto actuarem. Mais especificamente, os pró-fármacos são compostos farmacologicamente inactivos que só após a sua transformação, quer por metabolização quer por hidrólise química espontânea, se tornam em espécies farmacologicamente activas, libertando o metabolito com acção citotóxica (72; 65; 63; 53; 73).

Uma possibilidade pode consistir na ligação do fármaco activo a um transportador que seja substrato da enzima activadora (tirosinase), como por exemplo os aminoácidos. A utilização destes constitui uma estratégia promissora, porque existe o transporte do fármaco de forma específica e selectiva para as células tumorais. Tendo em conta que os aminoácidos são moléculas biológicas, possuem toxicidade limitada para o organismo.

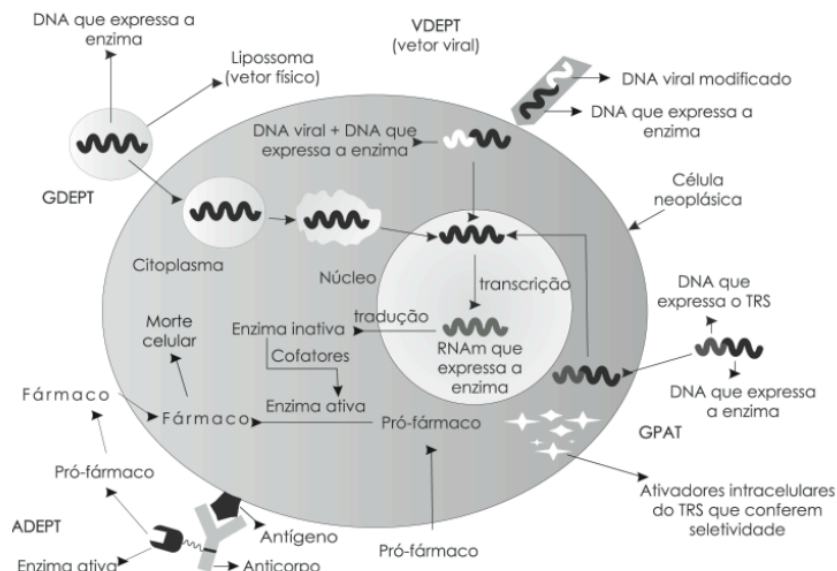
As células tumorais necessitam de um grande *uptake* de aminoácidos essenciais por terem uma divisão celular aumentada (embora as células saudáveis também necessitem destas moléculas, as células tumorais como crescem mais rapidamente, têm maiores necessidades proteicas). Assim, nestas circunstâncias com a utilização dos transportadores de membrana específicos de aminoácidos, a biodisponibilidade do fármaco é aumentada (74).

Nesta perspectiva, o fármaco atingirá o local alvo de forma simples, usando os mecanismos de transporte de proteínas, havendo assim um maior sucesso terapêutico.

Outra forma de direccionar o fármaco é com a utilização de anticorpos que possuam marcadores de superfície das células tumorais (66; 75).

Além dos sistemas de transporte, anteriormente descritos vários têm sido os sistemas desenvolvidos baseados na estratégia que direcciona enzimas para o local do tumor (ilustrados na Figura 7), nomeadamente ADEPT (*antibody-directed enzyme prodrug therapy*), PDEPT (*polymer-directed enzyme prodrug therapy*), GDEPT (*gene-directed enzyme prodrug therapy*), VDEPT (*gene-directed enzyme prodrug therapy*) e GPAT (*genetic prodrug activation therapy*) (76; 77).

Estes sistemas de transporte em que se utilizam enzimas que activam os pró-fármacos, são divididos em duas etapas: **(1)** a enzima activadora do pró-fármaco é administrada e direccionada para a célula alvo (varia consoante o sistema utilizado); **(2)** o pró-fármaco é administrado e, posteriormente, é convertido pela acção da enzima, que já se encontra na célula alvo (76; 77).



**Figura 7 - Representação das estratégias que utilizam enzimas para a activação do pró-fármaco *in loco*. (in (67))**

Estes sistemas que utilizam a enzima activadora podem ainda ser divididos em duas classes: **(1)** a activação da enzima será mediada por um anticorpo monoclonal (ADEPT) ou por um polímero (PDEPT), **(2)** transcrição

da enzima activadora, dentro da célula alvo, por um gene (GDEPT, VDEPT e GPAT) (78).

### 3.2.1. Melanocytid-Directed Enzyme Prodrug Therapy (MDEPT)

*Melanocytid-Directed Enzyme Prodrug Therapy* (MDEPT) é a estratégia que se baseia no desenvolvimento de novos pró-fármacos, que são activados exclusivamente por uma enzima constitutivamente expressa pelas células tumorais do melanoma (52). Esta ideia surgiu com base na observação dos genes envolvidos na melanogénese dos melanócitos malignos. Verificou-se que os genes codificantes da tirosinase, tornam-se sobreexpressos e, conseqüentemente, conduzem ao aumento significativo dos níveis da tirosinase, nos melanócitos malignos, enquanto que nas outras células saudáveis a sua concentração é baixa ou mesmo até ausente (79; 80; 81). Estudos com a tirosinase descrevem que em amostras de pele saudável e de uma lesão de melanoma metastático, de um mesmo indivíduo, foram quantificadas 46-95 unidades/mg e 17000-19500 unidades/mg da enzima, respectivamente (82).

A vantagem da estratégia com utilização de enzimas é que uma enzima poderá converter inúmeras moléculas de pró-fármaco em moléculas de fármaco activo, isto porque, uma enzima tem capacidade para catalisar 1000 moléculas de pró-fármaco em fármaco activo por minuto, o que aumenta significativamente a concentração de fármaco activo “in situ” (83).

A síntese de novos pró-fármacos com base na técnica MDEPT implica a ligação do fármaco anti-tumoral a um substrato da tirosinase (a tirosina ou análogos), e desta forma, quando presentes à enzima libertam os fármacos com acção citotóxica *in loco*. Desta forma, há especificidade de actuação em melanócitos malignos e, não em melanócitos saudáveis e outras células saudáveis (Figura 8).

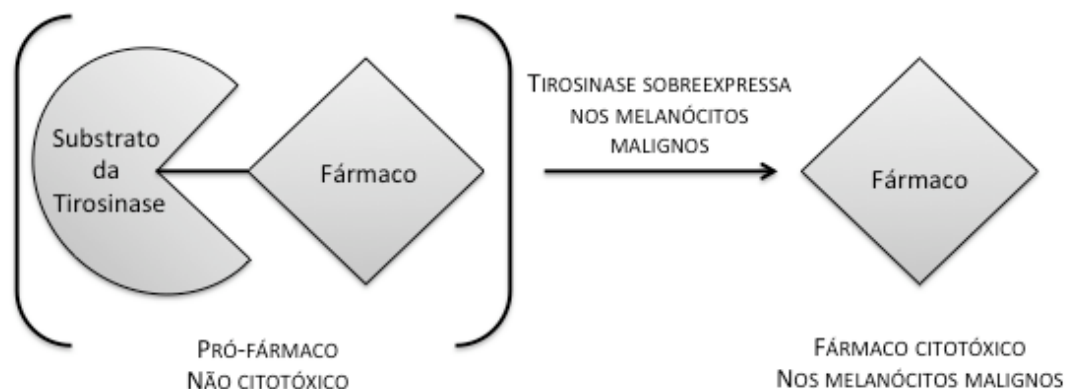
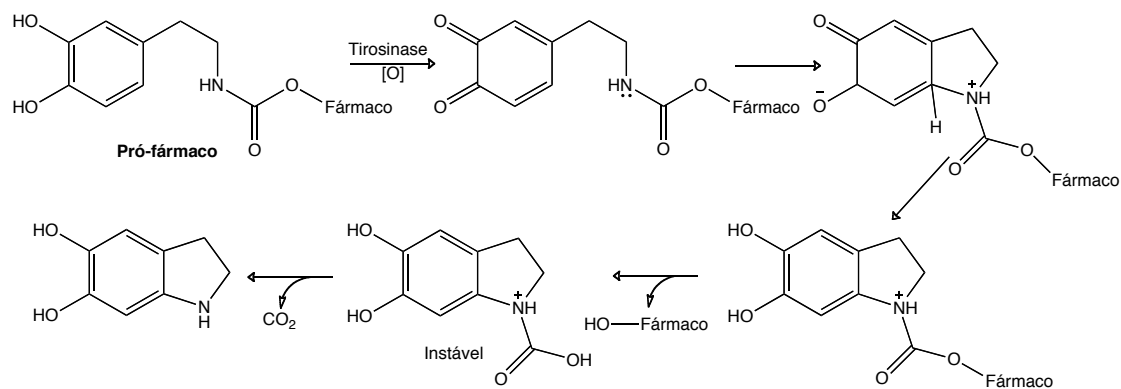


Figura 8 - Diagrama representativo do sistema de libertação selectiva do fármaco citotóxico no tumor mediado pela enzima tirosinase (adaptado (84))

Para que esta estratégia tenha bons resultados é importante que a enzima e os pró-fármacos (PF) possuam determinadas características. A enzima deverá estar acessível, converter o PF com uma boa actividade enzimática às condições fisiológicas (temperatura a 37°C e pH neutro ou próximo), a reacção deve ser irreversível e a expressão da enzima deverá estar em quantidade suficiente nas células alvo (85). A presença de enzimas homólogas em tecidos humanos convém ser evitada e, se presente, que seja expressa em baixas concentrações desta forma, os efeitos colaterais em células saudáveis são eliminados (67). Se a concentração enzimática em tecidos humanos for alta, maior é a conversão de PF em fármaco activo e desta forma, maior a toxicidade nas células alvo (86; 87).

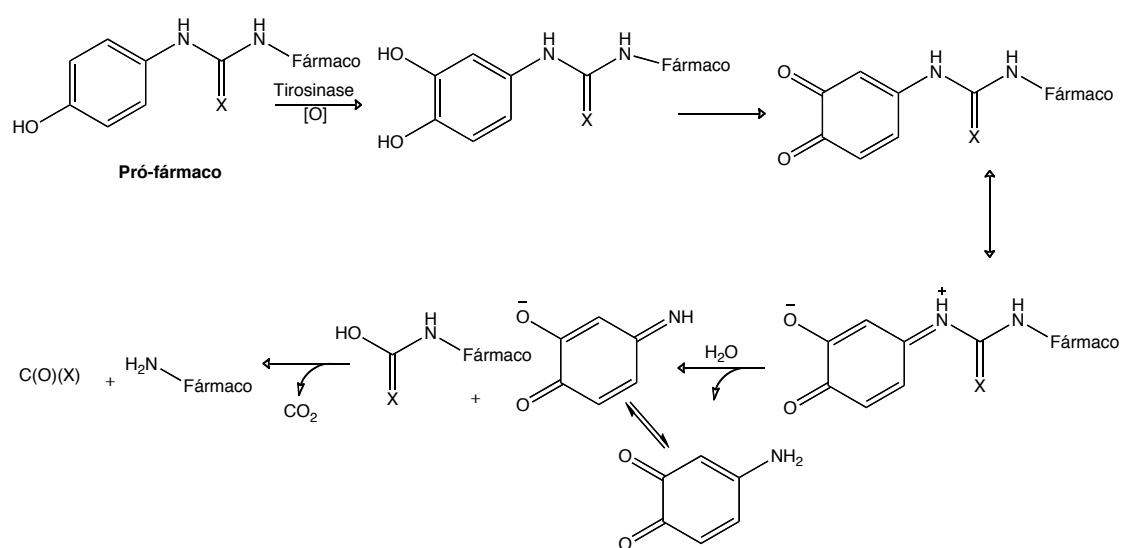
Quanto às características do PF, este deve ser um bom substrato para a enzima expressa nas células alvo e não ser activado por outras enzimas endógenas presentes noutros tecidos (67). O pró-fármaco deverá ter boa capacidade de difusão entre as membranas celulares, por outro lado, o fármaco activo deverá ter um tempo de semi-vida suficientemente longo para matar as células vizinhas do tumor, que não expressam a enzima. Contudo este tempo deverá ser curto para evitar que o fármaco activo penetre na corrente sanguínea (85).

*Jordan* e co-autores (1999), propõem pela primeira vez o mecanismo de libertação do fármaco citotóxico mediada pela enzima tirosinase, a partir da ciclização do pró-fármaco, como representado no Esquema 3.

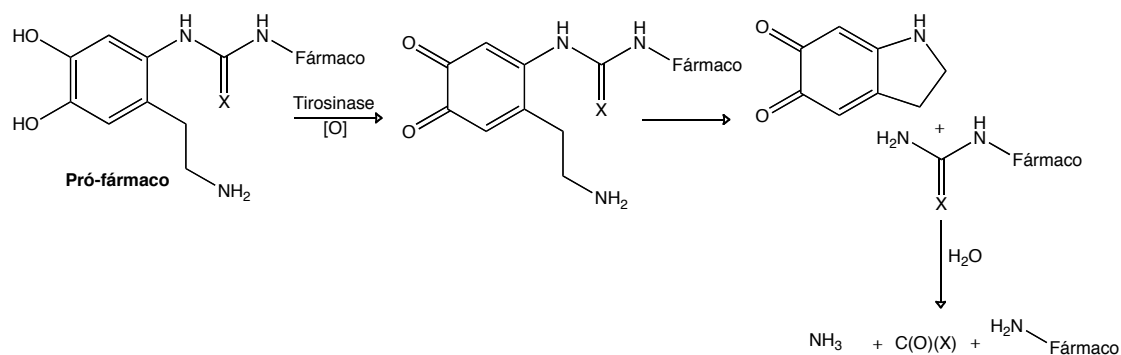


**Esquema 3 - Mecanismo de libertação do fármaco através da tirosinase (in (88)).**  
**Legenda: Fármaco=Mostardas de azoto**

Mais tarde, em 2005, Knaggs propõe dois mecanismos possíveis para acção da tirosinase sobre o pró-fármaco na libertação do respectivo fármaco citotóxico, como representados nos Esquemas 4 e 5.



**Esquema 4 - Mecanismo de libertação do fármaco através da tirosinase (in (89)).**  
**Legenda: X=S ou O; Drug=Mostardas de azoto.**



**Esquema 5 - Mecanismo de libertação do fármaco através da tirosinase (*in* (89)).**

**Legenda: X=S ou O; Drug=Mostardas de azoto.**

Assim, para que ocorra, conforme exemplificado nos esquemas anteriores, a activação do pró-fármaco (monometiltriazeno acoplado ao substrato natural da enzima, L-tirosina), o composto tem que obedecer a determinados requisitos: **(1)** possuir um anel catecol ou fenol para permitir que ocorra o primeiro passo da activação, a oxidação pela tirosinase e libertação do fármaco citotóxico; **(2)** o braço de ligação ao fármaco deverá ser estável até à libertação do fármaco, por exemplo uma ligação carbamato ou outro tipo (88; 90).

O desenvolvimento de pró-fármacos derivados de triazenos é pertinente porque dentro dos agentes alquilantes, esta classe é a que obtém melhores resultados clínicos, ou seja, a sua acção citotóxica é eficiente. Por esta razão, com a estratégia MDEPT, a sua falta de especificidade para as células malignas poderá ser contornada, uma vez que com o recurso aos pró-fármacos a sua acção irá ser direccionada para os locais específicos de acção (melanócitos) (65).

#### 4. ÂMBITO DA TESE

O melanoma disseminado representa a malignidade com maior resistência ao tratamento pelo que, novos casos continuam a ser descritos e a sua incidência a aumentar, excedendo outros tipos de cancro.

A quimioterapia constitui o método de tratamento mais utilizado para o cancro. Destacando a quimioterapia alquilante, os triazenos transformam-se no recurso de primeira linha de tratamento, em pacientes com melanoma maligno em estado avançado. No contexto dos compostos de triazenos, os que possuem aplicação clínica no tratamento de melanoma metastático são a dacarbazina (DTIC) e o temozolomide (TMZ). Como tentativa de solucionar os problemas destes, tais como a baixa concentração de fármaco *in loco*, a toxicidade sistémica, a falta de selectividade entre células tumorais e saudáveis e o aparecimento de mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células tumorais, novas estratégias surgiram com a perspectiva de aumentar a especificidade destes fármacos, e por sua vez aumentar a sua eficácia clínica. *Melanocyt-Directed Enzyme Prodrug Therapy* (MDEPT) é a estratégia que se baseia no desenvolvimento de novos pró-fármacos, que são activados exclusivamente por uma enzima, a tirosinase, constitutivamente expressa pelas células tumorais do melanoma.

Este estudo teve como primeiro objectivo a síntese e caracterização espectroscópica de pró-fármacos de triazenos ligados ao substrato da enzima tirosinase, a N-acetil-L-tirosina.

Após a síntese destes derivados, foi feita a avaliação da acção citotóxica dos pró-fármacos sintetizados em diferentes linhas celulares de melanoma (SK-MEL-30, MNT-1 e M8). Adicionalmente, realizou-se um estudo comparativo de citotoxicidade entre o PF em estudo e o efeito do temozolomide, sendo que este último se distingue por ser activado quimicamente num triazeno alquilante (MMT, monometiltriazeno).

Pretendeu-se também avaliar a especificidade destes PFs e para tal, caracterizaram-se as diferentes linhas celulares de melanoma utilizadas nesta investigação, segundo o seu padrão de actividade tirosinásica.

Por fim, avaliou-se a estabilidade dos PFs sintetizados na presença das enzimas existentes nos lisados das linhas celulares de melanoma, nomeadamente a tirosinase.

Neste trabalho pretendemos determinar se os pró-fármacos sintetizados têm boa acção citotóxica e, se esta é específica de tirosinase perante as linhas celulares de melanoma.

# **CAPÍTULO 2.**

## **MATERIAIS E MÉTODOS**



## **CAPÍTULO 2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **1. CULTURA DE CÉLULAS**

As linhas celulares de melanoma maligno, designadas por SK-MEL-30, M8 e MNT-1, foram mantidas numa estufa, em frascos de cultura, a 37°C e com uma atmosfera humedecida com 5% de CO<sub>2</sub>.

O meio de cultura para manutenção das linhas celulares de melanoma maligno varia consoante o tipo da linha celular.

As células de melanoma maligno SK-MEL-30 e M8 foram cultivadas em meio de cultura completo constituído por RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 100µg/mL de penicilina/estreptomicina, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de piruvato de sódio.

As células de melanoma maligno, MNT-1, foram cultivadas em meio de cultura completo constituído por DMEM suplementado com os mesmos suplementos descritos anteriormente.

A manutenção das culturas foi feita a cada dois dias, sempre que as culturas apresentavam um máximo de confluência de cerca 80%. Sendo células caracteristicamente aderentes, sempre que se pretendeu remover as células do frasco de cultura, foi utilizada Tripsina/EDTA, para desaderir as células do plástico. Mais especificamente, a remoção das células de um frasco de cultura, envolve a remoção do meio de cultura, a lavagem das células com PBS aquecido, sem fluxo directo, a incubação das células a 37°C, por um período máximo de 5 min em Tripsina/EDTA (1X), para permitir a desaderência das células. Por fim, o sedimento de células é ressuspensionado em meio de cultura fresco e cultivado novamente com uma concentração celular de 10<sup>6</sup> células/mL.

O armazenamento das linhas celulares foi feito a -80°C e em azoto líquido, em criotubos com meio de congelação constituído por meio RPMI 1640 suplementado com 20% soro fetal bovino e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

Periodicamente, as culturas foram avaliadas quanto à possível contaminação com Mycoplasma, através de uma coloração com DAPI (Dihidrocloreto de 4',6-diamidino-2-fenilindole), um corante com afinidade para ácidos nucleicos. Neste procedimento, as células são cultivadas sob uma lamela, fixadas com paraformaldeído 2%, durante 15 min. A coloração com DAPI é feita através da adição da solução a 0,5 g/ml (diluída em PBS 1X) durante 5 min. Após lavagem do corante, retira-se a lamela e procede-se à preparação para observação num microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse 80i), com filtro UV (330 nm-380 nm) (91), numa ampliação 200X. Células em que só o núcleo apareceu corado com coloração azulada (característica do DAPI), foram consideradas livres de contaminação. Células em que para além do núcleo corado, também apresentavam pequenos corpos corados no citoplasma, correspondente a material genético bacteriano, foram consideradas positivas para a contaminação com micoplasma e rejeitadas.

## **2. CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TIROSINASE EM LINHAS CELULARES**

### **2.1. Preparação de lisados das linhas celulares**

Para a avaliação da actividade da enzima tirosinase em cada uma das linhas celulares de melanoma prepararam-se lisados celulares como se descreve em seguida. As células foram recolhidas do frasco de cultura por tripsinização. O sedimento celular foi lavado duas vezes com PBS 1X (de modo a eliminar vestígios de meio de cultura e tripsina) por centrifugação durante 5 min a 1200 rpms.

Quando terminada a última centrifugação, o sobrenadante é eliminado, o sedimento é ressuspendido em PBS 1X, transferido para um eppendorf e centrifugado durante 1 minuto a 10000rpm numa centrífuga de eppendorfs (5415D, Eppendorf).

Por fim, com o auxílio de uma bomba de vácuo o sedimento é seco de modo a eliminar todo o PBS 1X. O armazenamento dos sedimentos celulares foi feito a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Posteriormente, os sedimentos de cada linha celular são lisados com PBS 1X com 1% de Triton X-100, a pH 6.8. Neste passo, a lise dos sedimentos é feita inicialmente com água destilada a pH 6.8 e, posteriormente é adicionado PBS 10X com 10% de Triton X-100 (de forma a que o tampão de lise no final esteja com uma concentração de PBS 1X com 1% de Triton X-100).

## **2.2. Quantificação proteica segundo o método de Lowry**

Utilizou-se o método de Lowry modificado para a quantificação da proteína total dos lisados. O método de Lowry é baseado na reacção das ligações peptídicas das proteínas com o reagente Folin-Ciocalteu (mistura de molibdato, tungstato e ácido fosfórico) na presença de cobre (II) e de tartarato de sódio e potássio (estabilizador do reagente). Esta reacção produz um composto de cor azulada com um máximo de absorção a 750 nm (92).

O método utilizado consiste em três reacções fundamentais, em que na primeira ocorre a ligação com reagente de cobre e tartarato; de seguida há reacção com o reagente Folin-Ciocalteu; por fim há formação do complexo corado em que a detecção é feita espectrofotometricamente no comprimento de onda de 750 nm (UV1700 Pharmaspec, Shimadzu).

Em cada ensaio foi realizada uma curva de calibração usando o mesmo método, mas em que se usaram soluções de albumina de soro bovino (BSA) com concentrações conhecidas. A recta de calibração foi então calculada com base no valor de absorvância a 750nm destes padrões (ordenadas) tendo em conta a concentração de BSA adicionada (abscissas).

A quantidade de proteína das amostras em estudo foi calculada a partir do ajuste da recta obtida, multiplicando-se pelo factor de diluição, sendo os valores de proteína dos extractos expressos em mg/ml.

### 2.3. Determinação da actividade enzimática

A determinação da actividade enzimática foi estimada através da medição da oxidação de L-DOPA em dopaquinona. A dopaquinona, produto final da reacção catalisada pela tirosinase, por auto-oxidação é convertida em dopacromo que apresenta uma coloração vermelha e um máximo de absorção aos 475 nm.

Para este ensaio foram preparados lisados de cada linha celular com tampão fosfato salino (PBS) 1X com 1% de Triton X-100, a pH 6.8 (conforme referido acima).

O substrato L-DOPA foi preparado no mesmo tampão fosfato usado para a lise, sem adição de Triton X-100, à concentração final de 2 mg/ml.

Como controlo positivo neste ensaio de actividade foi também preparada uma solução de BSA com 0,1% de tirosinase de cogumelo em PBS 1X com 1% de Triton X-100 a pH 6.8, de modo a mimetizar as condições dos lisados das linhas celulares, uma vez que, apenas 0,1% da proteína total quantificada corresponde à enzima tirosinase (93).

A reacção enzimática foi realizada numa placa de 96 poços e, em cada poço, foram adicionados 30  $\mu$ L de cada lisado celular com concentração de 60  $\mu$ g/ml de proteína total (para a obtenção da concentração desejada, as diluições foram feitas com a adição do mesmo tampão do lisado, PBS 1X com 1% de Triton X-100), quantificada como descrito anteriormente. O início da reacção enzimática ocorreu com a adição de 70  $\mu$ L da solução de L-DOPA, a 37°C. As absorvâncias foram lidas a 475 nm, durante 60 minutos (em intervalos de 10 minutos), num leitor de placas de ELISA (STATFAX 200, Inova). Tendo em conta o coeficiente de absorção molar ( $\epsilon=3600 \text{ cm}^{-1}\text{mol}^{-1}\text{L}$ ) do dopacromo, os valores de actividade calculados correspondem à concentração deste produto (em  $\mu$ mol/ml) que se formou num minuto. Para o cálculo da actividade específica, os valores de actividade foram divididos pela concentração de proteína total no ensaio (expressa em mg/mL).

### 3. SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS N-ACETIL-L-TIROSINA-MMT

A síntese deste grupo de pró-fármacos de triazenos, para aplicação nos estudos de citotoxicidade, envolve o acoplamento de um acilaminoácido (N-acetil-L-tirosina), que corresponde ao substrato da enzima tirosinase, a um triazeno anti-tumoral o MMT, através de uma ligação amida, tal como representado na Figura 9.

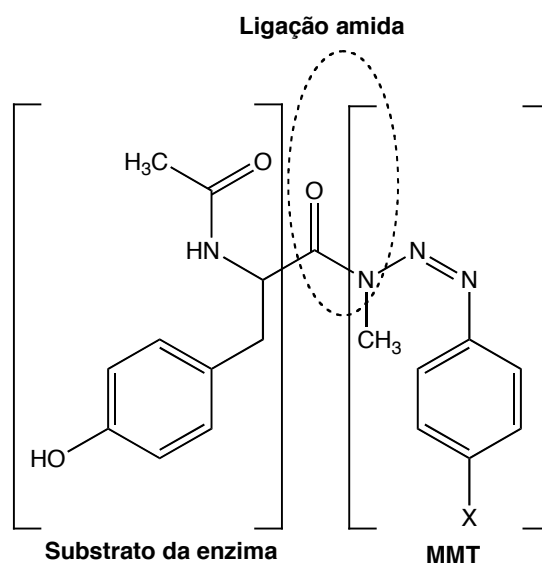


Figura 9 - Estrutura geral dos pró-fármacos de triazenos sintetizados (in (66))

Foram sintetizados três derivados de triazenos e da N-acetil-L-tirosina, possuindo diferentes grupos no substituinte do anel benzénico dos triazenos (Tabela 1) (66).

Tabela 1 - Diferentes grupos substituintes do anel benzénico dos triazenos, utilizados neste trabalho.

Composto	Grupo X
PF A	COCH <sub>3</sub>
PF B	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
PF C	CN

Para a formação de ligações amida a partir de ácidos carboxílicos, é necessário a activação do grupo carboxílico e posterior reacção com o azoto nucleofílico. Para tal, são utilizados reagentes de acoplamento peptídico como as carbodiimidas disubstituídas. O processo é iniciado com a adição de

diciclohexilcarbodiimida (DCC) levando à formação do agente de acilação – a O-acilisourea (Figura 10).

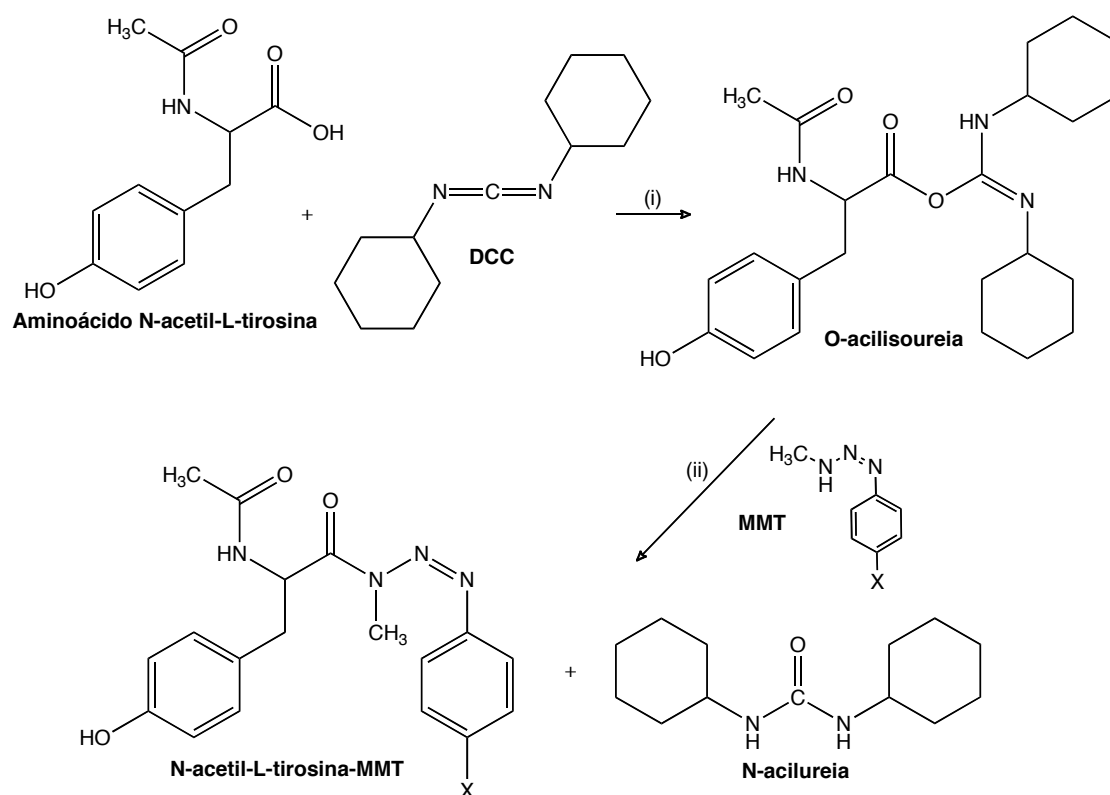


Figura 10 - Síntese dos N-acetil-L-tirosina-acyltriazenos (*in* (53; 66))

Legenda: X=COCH<sub>3</sub>, COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> ou CN; (i)- THF, à temperatura ambiente (ii)- DMAP e trietilamina.

Posteriormente, a adição de quantidades catalíticas de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) e ainda de trietilamina, acelera a formação da ligação amida, ocorrendo uma diminuição da quantidade de produtos secundários. O THF (tetrahidrofurano) é o solvente utilizado nesta reacção de síntese (55).

Para além da utilização do acoplador peptídico DCC foi testada a utilização do TBTU (N-[1H-benzotriazol-1-il](dimetilamino)metileno]-N-metilmetanoaminio tetrafluorborato N-óxido). Este método de activação foi complementado com o recurso à irradiação por microondas, desenvolvido por *Santagada* e co-autores (2001) (94), na medida em que permite a obtenção dos pró-fármacos num curto espaço de tempo, contrariamente ao método de

síntese anteriormente descrito. Assim proporciona-se reacções com baixas taxas de racemização e com produtos secundários que são facilmente removidos através de um *work-up* aquoso e a diminuição dos tempos de reacção.

Neste trabalho foram efectuadas duas sínteses com métodos de activação diferentes, numa primeira fase optou-se por sintetizar o pró-fármaco A pelo método de activação com o DCC à temperatura ambiente. Contudo devido à necessidade de melhores rendimentos e na tentativa de optimização do tempo de síntese optou-se por sintetizar o pró-fármaco C pelo método de activação com o TBTU recorrendo à tecnologia microondas.

### 3.1. Reacção por activação do DCC/DMAP

Este método de síntese de derivados de triazenos é baseado no descrito por *Perry* e co-autores (2009).

Desta forma, dissolveu-se o aminoácido N-acetil-L-tirosina (0.250 g, 1.12 mmol) em 3 mL de THF (tetrahidrofurano), adicionou-se DCC (0.506 g, 2.45 mmol), deixando-se reagir cerca de 1h. À parte, juntou-se o MMT (1.96 mmol) com o NaH (hidreto de sódio) (0.0783 g, 1.96 mmol) dissolvidos em THF (3 mL). Adicionou-se a solução de MMT à solução do aminoácido com DCC, juntamente com Et<sub>3</sub>N (trietilamina) (0.263 mL, 1.96 mmol), DMAP (0.0239 g, 0.196 mmol) e 5 mL de diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Após 48 horas à temperatura ambiente, a N,N'-díciclohexilureia é removida por filtração e o solvente removido a pressão reduzida.

Os compostos foram isolados por cromatografia em coluna (utilizando sílica Kieselgel 60, de granulometria de 40-63 nm) e recristalizados. Enquanto a separação por cromatografia em coluna decorre vão sendo efectuadas as TLC (cromatografia de camada fina) com placas de sílica para a detecção da eluição do composto de interesse. As cromatografias de camada fina preparativas, foram efectuadas com sílica Kieselgel 60 GF254

com 1.5 mm de espessura e reveladas usando a câmara CAMG de UV, com um comprimento de onda de 254 nm.

Os respectivos eluentes de eluição da coluna e de recristalização apresentam-se na Tabela 2.

### **3.2. Reacção por activação do TBTU**

Os reagentes são colocados dentro de um tubo de vidro para MW em mistura, no solvente DMF (dimetilformamida).

Dissolveu-se em 3 mL de DMF, o aminoácido N-acetil-L-tirosina (0.223 g, 1 mmol), o TBTU (0.337 g, 1 mmol), o MMT (0.176g, 1 mmol) e a trietilamina (0.292 mL, 1 mmol). Colocou-se um agitador magnético, o tubo é selado e colocado dentro do sintetizador de microondas (MW) (CEM Discover).

Programou-se a reacção por microondas em duas fases: a primeira decorreu com um tempo de corrida total de 16 minutos, com 1 minuto para atingir a temperatura de 55° C e 15 minutos a reagir com uma potência de 200 W; a segunda fase com um tempo total de 16 minutos, com 1 minuto para atingir a temperatura de 60°C e 15 minutos a reagir com uma potência de 300 W.

Após o término do tempo de reacção, a mistura é transferida para uma ampola de decantação, diluída com 5 mL de acetato de etilo e lavada sucessivamente com a solução de ácido cítrico a 5%, para a remoção do DMF (de difícil evaporação), solução de bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) e solução saturada de cloreto de sódio (NaCl sat.), para retirar a água e algum ácido cítrico. As fases orgânicas obtidas ao longo deste processo são secas com sulfato de sódio anidro e depois evapora-se em rotavapor o acetato de etilo.

Os compostos são isolados por eluição em coluna de cromatografia e recristalizados.

Os respectivos eluentes de eluição da coluna e de recristalização apresentam-se na Tabela 2.

**Tabela 2 - Resumo dos diferentes solventes de eluição em coluna, TLC e recristalização.**

Composto	Grupo X	Solventes de Eluição	
		Coluna	Solvente de Recristalização
PF A	COCH <sub>3</sub>	Éter etílico:MeOH (gradiente)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , MeOH, n-hexano
PF C	CN		

### 3.3. Caracterização estrutural

#### 3.3.1. Espectros de Ressonância Magnética Nuclear: <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de protão (<sup>1</sup>H-RMN) e de carbono (<sup>13</sup>C-RMN) foram traçados num espectrómetro Bruker 400 Ultra-Shield usando clorofórmio deuterado como solvente. A frequência de funcionamento do aparelho, para a determinação dos espectros de RMN de protão (<sup>1</sup>H-RMN) é de 300 MHz e no traçado dos espectros de RMN de carbono (<sup>13</sup>C-RMN) é de 100 MHz.

Os dados referentes a cada espectro encontram-se de acordo com a seguinte norma: desvio químico (em ppm, partes por milhão), multiplicidade do sinal, apresentando-se como *s* (singuleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *t* (triplete), *q* (quarteto) ou *m* (multiplete) e constante de acoplamento (*J* em Hz).

#### 3.3.2. Espectros de Infra-vermelho (IV)

Os espectros de Infra-Vermelho (IV) foram executados num Perkin-Elmer 1310 Infrared Spectrofotometer (FTIR), sob a forma de pastilhas de brometo de potássio.

### 3.3.3. Ponto de fusão

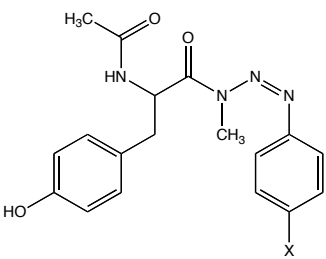
Os pontos de fusão foram determinados através de uma placa Kofler Bock Monoscop M.

## 4. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE PRÓ-FÁRMACOS

Os PFs sintetizados não são solúveis em água, daí que numa primeira fase, tenha sido realizado um estudo sobre a solubilidade destes compostos em vários solventes, tais como DMSO, acetonitrilo, etanol, PBS e ainda com o auxílio do detergente Tween 80 (que se revelou bastante tóxico para as células). Depois de se terem experimentado várias estratégias de solubilização, escolheu-se o DMSO, uma vez que com este solvente foi possível de solubilizar completamente os PFs em estudo, na concentração stock pretendida.

Na tabela seguinte estão sumariadas as estruturas químicas e as massas moleculares relativas dos pró-fármacos a solubilizar para o estudo do seu efeito anti-tumoral.

Tabela 3 - Grupo de novos pró-fármacos em estudo e a respectiva massa molecular relativa ( $M_R$ ).

Grupo de Compostos	Grupo X	$M_R$ (g/mol)	
	PF A	COCH <sub>3</sub>	382.41
	PF B	COOCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	412.44
	PF C	CN	365.39

Assim, prepararam-se as soluções dos PFs como se descreve em seguida:

### **Estratégia para a solubilização do pró-fármaco com o substituinte COCH<sub>3</sub> (PF A)**

Pesaram-se 0.9 mg de PF A e dissolveram-se em 11.75 µL de DMSO (obteve-se uma solução stock com uma concentração de 0.2 M)

Fez-se ainda uma diluição de 1:2000 em meio de cultura, de modo a ficarmos com 0.05% de DMSO e uma concentração máxima de PF de 0.1 mM.

### **Estratégia para a solubilização do pró-fármaco com o substituinte COCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub> (PF B)**

Pesaram-se 0.9 mg e dissolveram-se em 32.7 µL de DMSO (obteve-se uma concentração de solução stock com concentração de 0,2 M)

Fez-se uma diluição 3:2000 em meio de cultura para reduzir a percentagem final de DMSO para 0.15% e, desta forma, obteve-se uma concentração máxima de PF B de 0.1 mM.

### **Estratégia para a solubilização do pró-fármaco com o substituinte CN (PF C)**

Pesaram-se 0.9 mg e dissolveram-se em 12.3 µL de DMSO (obteve-se uma concentração de solução stock com concentração de 0,2 M)

Fez-se uma diluição 1:2000 em meio de cultura para reduzir a percentagem final de DMSO para 0.05% e, desta forma, obteve-se uma concentração máxima de PF C de 0.1 mM.

### **Estratégia para a solubilização do pró-fármaco Temozolomide (TMZ)**

Pesaram-se 0.9 mg e dissolveram-se em 46.4 µL de DMSO (obteve-se uma concentração de solução stock com concentração de 0,1 M)

Fez-se uma diluição 1:1000 em meio de cultura para reduzir a percentagem final de DMSO para 0.1% e, desta forma, obteve-se uma concentração máxima de PF C de 0.1 mM

## **5. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE CELULAR DOS PRÓ-FÁRMACOS NAS LINHAS CELULARES DE MELANOMA**

### **5.1. Avaliação da actividade mitocondrial pelo método de MTS**

A viabilidade das células em proliferação foi avaliada na ausência (controlo) ou presença de concentrações crescentes do PF em estudo através da medição da sua actividade mitocondrial, com base no método colorimétrico de redução do composto MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), incluído no *kit* comercial, *CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay*. Este método consiste na absorção do sal MTS e na sua redução, no interior da mitocôndria, a cristais de formazan, que podem ser quantificados espectrofotometricamente. Os valores de absorvância a 490 nm são então proporcionais à actividade mitocondrial e portanto dão-nos uma estimativa das células metabolicamente activas.

Para a determinação da citotoxicidade de uma gama alargada de concentrações de cada PF, as culturas foram cultivadas com uma concentração celular de  $0.015 \times 10^6$  células/poço, em placas de 96 poços, durante 24 horas nas condições de cultura anteriormente definidas. Após este período, as células foram tratadas com o pró-fármaco em estudo, num intervalo de concentrações de 0 a 100  $\mu\text{M}$ . Todos os testes foram realizados em duplicado. O tempo de tratamento foi de 48 horas, mantendo-se as condições da cultura. Após esse período, o meio de cultura como PF foi removido do poço e substituído por 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura fresco. Adicionaram-se então 20  $\mu\text{L}$  da solução *CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay* e incubaram-se as placas durante 30 minutos nas mesmas condições de cultura já referidas. Após este tempo, a placa foi gentilmente agitada, durante alguns segundos, num agitador (MD3000, Medline Scientific Ltd.) até o precipitado estar completamente dissolvido.

Posteriormente a absorvância foi determinada num leitor de placas de ELISA (STATFAX 200, Inova) a um comprimento de onda de 490 nm.

Os valores de absorvância foram normalizados, considerando-se que a viabilidade celular no poço controlo (sem adição de pró-fármaco) era igual a 100 %.

## **5.2. Avaliação da apoptose/necrose por Citometria de Fluxo**

Para além da determinação da citotoxicidade dos PFs através do método anteriormente descrito (MTS), também se procedeu à avaliação da capacidade destes compostos induzirem a entrada das células das linhas celulares de melanoma em apoptose ou eventualmente as destruírem por necrose. Esta avaliação foi realizada recorrendo à tecnologia da citometria de fluxo.

Resumidamente, a citometria de fluxo é uma tecnologia que permite fazer uma análise multiparamétrica de partículas em suspensão, uma a uma. O citómetro de fluxo capta e digitaliza a dispersão de fotões, provocada pela passagem de partículas em suspensão de forma alinhada, num fluxo laminar, frente a um feixe de luz. A interacção destas com o feixe gera sinais que são captados por detectores apropriados. A informação produzida pode ser gerada pela dispersão do feixe de luz ou pela luz emitida por fluorocromos após excitação pelo feixe de luz. O feixe de radiação de excitação ao interceptar a célula na câmara, sofre dispersão quer na direcção frontal (*forward scattering* - FSC), quer lateral (*side scattering* - SSC). A intensidade da dispersão frontal é proporcional ao tamanho das partículas por outro lado, a intensidade da dispersão na direcção lateral é proporcional ao tamanho, granularidade e morfologia das partículas. Compostos com fluorescência intrínseca ou compostos passíveis de se ligarem a corantes fluorescentes, permitem a diferenciação selectiva de subpopulações com base na combinação de vários fluorocromos (95).

A determinação da percentagem de células apoptóticas após o tratamento das culturas de células de melanoma com o PF, tirou partido desta tecnologia, uma vez que o método utilizado se baseia precisamente na utilização de compostos fluorescentes, nomeadamente Anexina-V e 7-AAD

(7-amino-actinomicina D), passíveis de serem analisados por citometria de fluxo.

A anexina V possui afinidade para a fosfatidilserina (componente membranar que se encontra normalmente no lado interno da membrana das células vivas mas num estado precoce de apoptose esse fosfolípido é exposto para o exterior). O 7-AAD é um corante com afinidade para ácidos nucleicos, usado para discriminar as células vivas das mortas, uma vez que as células vivas são impermeáveis a este composto enquanto que as células apoptóticas tardias e necróticas são permeáveis, devido à ocorrência de poros na membrana plasmática.

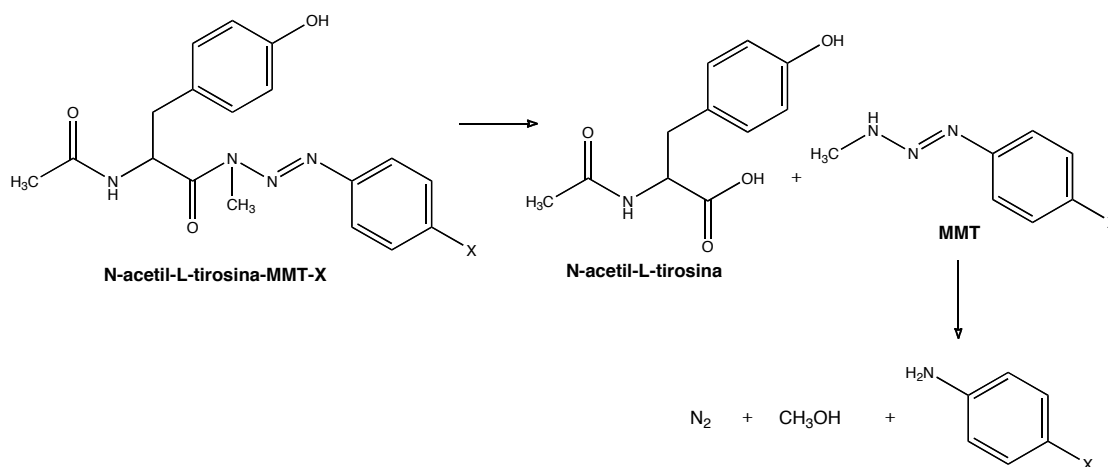
Para a determinação da células apoptóticas, foram cultivadas  $0.08 \times 10^6$  células/poço em placas de 12 poços, durante 24 horas (nos primeiros ensaios de apoptose, os resultados obtidos na secção 3.1., foram cultivadas  $0.15 \times 10^6$  células/poço). Após adesão, foram tratadas com as concentrações de 0, 50 e 100  $\mu\text{M}$  de pró-fármaco durante 48 horas nas mesmas condições. Após este tempo procedeu-se à recolha das células, por adição de tripsina como anteriormente descrito, mas tendo o cuidado, neste caso, de não descartar o meio de cultura onde as células se encontravam, nem o meio das lavagens, que poderiam conter células apoptóticas/necróticas importantes para a análise. Assim procedeu-se à centrifugação de uma suspensão contendo o sobrenadante da cultura, as células que foram desaderidas por acção da tripsina e ainda o meio usado para as lavagens, a 2000 rpm durante 10 min. Os sedimento celular resultante desta centrifugação (mais prolongada do que habitualmente e com rpms mais elevadas, para mais facilmente permitir a deposição de material apoptótico/necrótico) foram ressuspensos em 200  $\mu\text{L}$  de tampão de ligação da Anexina V 1X. Dessa suspensão celular, foram retirados 185  $\mu\text{L}$  para um tubo de próprio para citometria de fluxo, onde se procedeu à marcação com os corantes fluorescentes acima referidos. Nomeadamente, adicionaram-se ainda neste tubo 5  $\mu\text{L}$  de Anexina V-APC (anexina V conjugada à aloficocianina) (BD Biosciences) e 10  $\mu\text{L}$  de uma solução 7-AAD (1X)

Incubaram-se então estas misturas durante 15 min, no escuro à temperatura ambiente.

Após a marcação, foram adicionados 200  $\mu$ L do tampão de ligação da Anexina V 1X em cada tubo e estes foram analisados num citómetro de fluxo (FacsCalibur, Becton Dickinson), adquirindo, por cada análise, 10000 eventos. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa Paint-a-Gate 3.0.2 PPC (BD Biosciences)

## 6. ESTUDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS PRÓ-FÁRMACOS

Neste ensaio os N-acetil-L-tirosina-MMT quando presentes à tirosinase formam os seus correspondentes MMT, resultante de uma hidrólise enzimática. Todavia, em tampão fosfato o MMT sofre decomposição, por hidrólise primária, na respectiva amina aromática, conforme representado no Esquema 6.



Esquema 6 - Mecanismo de decomposição dos N-acetil-L-tirosina-MMT (*in* (53))

O estudo de hidrólise enzimática dos pró-fármacos foi efectuado em lisados das linhas celulares de melanoma. Os lisados de cada linha celular foram preparados como descrito anteriormente na secção 2.1 do Capítulo 2.

Para a determinação da hidrólise enzimática colocou-se num frasco o lisado celular e perfez-se o volume até aos 3 mL com tampão fosfato salino. Esse frasco foi colocado num banho de água à temperatura de 37°C, e

quando a temperatura da mistura normalizou, adicionaram-se 15  $\mu\text{L}$  de solução  $10^{-2}$  M do pró-fármaco em estudo (dissolvido em DMSO).

A reacção de hidrólise foi monitorizada, até serem detectadas as três semi-vidas. Para isso, foram sendo retiradas alíquotas (100  $\mu\text{L}$ ), ao longo do tempo, e foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo (para desnaturar as proteínas). De seguida, as alíquotas são centrifugadas durante 10 minutos, o que provoca a precipitação do extracto proteico. O sobrenadante foi colhido num eppendorf e, por HPLC quantificou-se o desaparecimento do substrato. Como eluente utilizou-se uma mistura constituída por 45 partes de metanol (MeOH) e 55 partes de água desionizada.

Para todas as reacções cinéticas determinaram-se os valores de  $K_{\text{obs}}$  a partir dos gráficos do logaritmo da área,  $\ln(\text{área})_t$ , em função do tempo.

A identificação dos produtos foi feita por comparação dos seus tempos de retenção com os tempos de retenção dos padrões (pró-fármaco, o MMT e a amina), injectados previamente.

Nos estudos enzimáticos da hidrólise dos N-acetil-L-tirosina-MMT por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizou-se um sistema Merck constituído por uma bomba Merck-Hitachi L-7110 La Chrom com um injector de 20 l Rheodyne, um detector de Ultra-Violeta Merck-Hitachi L-7400 La Chrom, um integrador Merck-Hitachi D-7500 e uma coluna Lichrocart® 125-4 RP-8 (5  $\mu\text{m}$ ) 250x4mm.

## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos experimentalmente foi realizada pelo software GraphPad Prism 5 (Mac OS X). Os dados foram, estatisticamente, analisados pelo Teste de t-Student e um valor de  $P < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo (\* significa que o valor  $P$  é inferior a 0.05; \*\* que o  $P$  é inferior a 0.01 e \*\*\* que o  $P$  é inferior a 0.0001).

## 8. REAGENTES E SOLVENTES

Para a realização dos ensaios descritos nas secções do Capítulo 2, foram necessários reagentes e solventes, que se encontram sumariados na Tabela 4, abaixo descrita.

**Tabela 4 - Reagentes e Solventes utilizados neste trabalho, com respectiva sigla.**

Nome	Sigla	Origem
4-Dimetilaminopiridina	DMAP	Sigma-Aldrich
7-Amino-actinomicina	7-AAD	BD Biosciences
Acetato de etilo	AcOEt	Valente e Ribeiro
Acetonitrilo para HPLC	-	Scharlau
Ácido cítrico	-	Valente e Ribeiro
Albumina de soro bovino	BSA	Sigma-Aldrich
Aminoácidos não essenciais	-	Gibco/Invitrogen
Anexina V conjugada à alofococianina	Anexina V-APC	BD Biosciences
Bicarbonato de sódio	NaHCO <sub>3</sub>	Valente e Ribeiro
Cloreto de sódio	NaCl	Valente e Ribeiro
Clorofórmio deuterado	CDCl <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Diclorometano	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Valente e Ribeiro
Dimetilformamida	DMF	Merck
Dimetilsulfóxido (ref <sup>a</sup> D2438)	DMSO	Sigma-Aldrich
Etanol absoluto	-	Merck
Éter etílico	-	António M. S. Cruz
Folhas de alumínio revestidas de sílica gel 60 F <sub>254</sub>	-	Merck
Frascos de cultura	-	Nunc Brand Products
Hidreto de sódio	NaH	Sigma-Aldrich
Kit CellTiter 96 Aqueous One Solution Assay	MTS	Promega
L-Dihidroxifenilalanina	L-Dopa	Sigma-Aldrich
L-Glutamina	-	Sigma-Aldrich
Meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium	DMEM	Sigma-Aldrich
Meio de cultura RPMI 1640	RPMI 1640	Sigma-Aldrich
Metanol	MeOH	António M. S. Cruz

Metanol para HPLC	-	Carlo Erba Reagents
N-[1H-benzotriazol-1-il](dimetilamino)metileno]-N-metilmetanoaminio tetrafluorborato N-óxido	TBTU	Merck
N-acetil-L-tirosina E.C. 208-671-3	-	Sigma-Aldrich
n-Hexano	n-hex	Valente e Ribeiro
N, N'-díciclohexilcarbodiimida	DCC	Merck
Penicilina/Estreptomicina	-	Gibco
Piruvato de sódio	-	Gibco/Invitrogen
Sílica gel 60 (0.040-0.063 mm)	-	Merck
Soro fetal bovino	-	Sigma-Aldrich
Sulfato de sódio anidro	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Scharlau
Tampão fosfato salino	PBS	Sigma-Aldrich
Tetrahidrofurano	THF	Panreac
Tirosinase de cogumelo E.C. 232-653-4	-	Sigma-Aldrich
Trietilamina	Et <sub>3</sub> N	Merck
Tripsina/EDTA	-	Gibco
Triton X-100	-	Merck
Tween 80	-	Merck
X-Monometiltriazeno	MMT-X	Sintetizado no laboratório. <b>(53)</b>

O tampão fosfato salino (PBS) foi preparado dissolvendo-se uma pastilha deste em 200 ml de água desionizada, obtendo-se pH 7.4, 0.01 M, a 25°C.

Nos estudos em HPLC utilizou-se água desionizada obtida através da passagem de água bidestilada numa resina de troca iónica Millipore, sendo recolhida com uma resistividade de 18 MΩ cm.

# **CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS**



## **CAPÍTULO 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS**

### **1. SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS N-ACETIL-L-TIROSINA-MMT: COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS DE SÍNTESE**

O principal objectivo desta tese foi estudar o efeito anti-tumoral de derivados de triazenos em linhas celulares de melanoma. Para tal, foi realizada a síntese de pró-fármacos N-acetil-L-tirosina-MMT através do acoplamento do triazeno ao aminoácido N-acetil-L-tirosina, um substrato da tirosinase.

#### **1.1. Reacção por activação do DCC**

Para a síntese do pró-fármaco A (PF A) com o substituinte  $\text{COCH}_3$  utilizou-se o método de activação com o DCC à temperatura ambiente.

A purificação deste composto exigiu a elaboração de várias cromatografias em coluna bastante demoradas pelo que levou à perda do produto desejado. Para além disto, a utilização do DCC, como substância activadora do grupo carboxílico, quando se faz reagir o O-acilsoureia com o triazeno, leva à libertação de um composto, o ureído, o qual contamina a mistura reaccional.

Na fase de recristalização do composto, como o ureído precipita em primeiro lugar, por vezes, é necessário repetir este procedimento. Todos estes factores influenciam negativamente o rendimento da síntese, na medida que levam à perda do composto. O rendimento obtido na síntese do PF A foi de 38%.

#### **1.2. Reacção por activação do TBTU**

Para a síntese do pró-fármaco C (PF C) com o substituinte CN utilizou-se o método de activação do TBTU com auxílio de microondas.

Com o objectivo de melhorar o método de síntese e obter melhores rendimentos sintetizou-se o PF C, recorrendo a um outro reagente de acoplamento o TBTU.

A fase de purificação do composto comparativamente à anterior, foi bastante mais rápida visto que, com este método não há formação de produtos secundários contaminantes, como o ureído.

As vantagens da utilização do TBTU incluem: uma maior estabilidade, solubilidade do composto na maioria dos solventes orgânicos e formação de um produto secundário solúvel em água (96; 97). Desta forma, o manuseamento da amostra torna-se bastante mais simples e rápido, em que se procede apenas a extracções das fases orgânicas.

Apesar do rendimento obtido ser inferior, cerca de 12%, esta síntese acaba por ser efectivamente mais vantajosa tendo em conta que a síntese com o TBTU foi efectuada em apenas 1 dia enquanto que na anterior demorou cerca de 5 dias. A redução do tempo deve-se ao facto da reacção ser de aproximadamente de 30 minutos e a purificação do composto, por cromatografia em coluna ser bastante mais rápida e simples, pois a formação de produtos secundários que contaminavam a mistura foi ultrapassada.

A fase de extracção das fases orgânicas poderá ainda ser optimizada porque se observou que as fases aquosas rejeitadas tinham um aspecto amarelo forte, uma característica dos PF em estudo, o que indica a presença do composto sintetizado na mistura. Assim, o aperfeiçoamento do método destas extracções, mais especificamente, com a escolha de outros solventes para a separação das fases orgânica e aquosa, poderá conduzir a uma maior quantidade de composto, ou seja o rendimento reaccional.

Assim pode-se concluir que a síntese com o método do TBTU é mais eficiente e rentável do que na síntese com o método do DCC, embora se tenha obtido menor quantidade do composto.

### 1.3. Caracterização estrutural dos pró-fármacos

Após o término de síntese propriamente dita é necessária a sua caracterização estrutural por técnicas espectroscópicas de  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN e IV. Adicionalmente foi determinado o ponto de fusão para cada composto sintetizado.

#### 1.3.1. Pró-fármaco A ( $\text{X}=\text{COCH}_3$ )

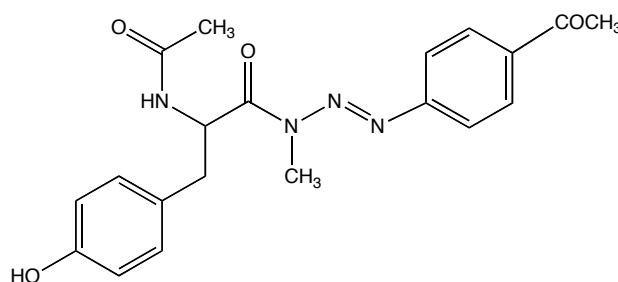


Figura 11 - Representação química do pró-fármaco A ( $\text{X}=\text{COCH}_3$ ).

#### $^1\text{H}$ -RMN

Tabela 5 - Desvios químicos obtidos para o pró-fármaco A ( $\text{X}=\text{COCH}_3$ )

$\delta/\text{ppm}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400.1325 MHz)				
$\text{NCH}_3$	$\text{NHCOCH}_3$	$\text{Ar-X}$	$\alpha\text{-CH}$	$\text{CH}_2\text{ArOH}$
		2.67 (3H, s, $\text{COCH}_3$ );		3.01 ( $\text{H}_B$ , dd, $J=6.8$ e $J=13.6$ , $\text{CH}_2$ );
3.44 (3H, s)	2.05 (3H, s, $\text{CH}_3$ )	7.67 (2H, AA'XX', $J=8.4$ );	5.99 (1H, dd, $J=6.4$ e $J=6.4$ )	3.12 ( $\text{H}_A$ , dd, $J=6.4$ e $J=14$ , $\text{CH}_2$ );
	6.41 (1H, d, $J=7.2$ , NH);	8.05 (2H, AA'XX', $J=8.4$ )		6.65 (2 H, AA'XX', $J=8.4$ );
				6.95 (2 H, AA'XX', $J=8.4$ )

Para análise do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN, calculou-se a razão  $\Delta\nu/J$  e obtiveram-se resultados superiores a 10 (para ambos anéis aromáticos), o que indica que estes sistemas são do tipo AA'XX e não AA'BB.

O sinal do anel aromático (para dissubstituído) apresenta-se como um sistema AA'XX' ( $J > 10$ ), fácil de reconhecer pelo seu aspecto de par de dupletos. Os desvios químicos encontram-se entre 3.01 e 3.12 ppm, no caso do anel aromático correspondente à parte do aminoácido e, entre 7.67 e 8.05 ppm, no caso do anel aromático correspondente à parte triazénica.

Salienta-se o pico correspondente ao grupo Ar-COCH<sub>3</sub> a 2.67 ppm.

O grupo N-CH<sub>3</sub> da metade triazeno surge como um singuleto com um desvio químico ( $\delta$ ) de 3.44 ppm.

O próton N-H do grupo amida do N-acetil-L-tirosina-MMT manifesta-se como um duplete de baixa resolução com valor de desvio químico de 6.41 ppm.

### <sup>13</sup>C-RMN

$\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): 23.30 (COCH<sub>3</sub>); 26.82 (NCH<sub>3</sub> triaz); 28.26 (COCH<sub>3</sub>); 38.67 (CHCH<sub>2Ar</sub>); 52.05 (CH); 115.44 (C<sub>Ar</sub>); 122.49 (C<sub>Ar</sub>); 127.27 (C<sub>Ar</sub>); 129.55 (C<sub>Ar</sub>); 130.22 (C<sub>Ar</sub>); 137.29 (C<sub>Ar</sub>); 151.46 (C<sub>Ar</sub>); 155.25 (C<sub>Ar</sub>); 169.86 (C=O); 174.38 (C=O); 197.47 (C=O)

A análise por <sup>13</sup>C-RMN vem confirmar a existência dos carbonos correspondentes a cada um desses hidrogénios. Salientam-se os carbonos dos três grupos carbonilo a 169.86, 174.38 e 197.3 ppm, que correspondem respectivamente a NHCOCH<sub>3</sub>, N=N-N-N-CO e CH<sub>3</sub>COAr. Confirma-se, também, a presença de 8 sinais correspondentes aos carbonos dos dois anéis aromáticos.

### IV

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3317.60 ( $\nu_{\text{NH}}$ ); 1709.09 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1682.79 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1640.91 ( $\nu_{\text{C=O}}$ )

No espectro de IV identificaram-se três bandas características correspondentes aos três grupos carbonilo (C=O) do composto,

nomeadamente a 1640,91, 1682.79 e 1709.09  $\text{cm}^{-1}$ . A 3317.60  $\text{cm}^{-1}$  surge uma banda de *stretching* do N-H do grupo amida.

### Ponto de fusão (Pf)

Pf=172°-176°C

### 1.3.2. Pró-fármaco C com o (X=CN)

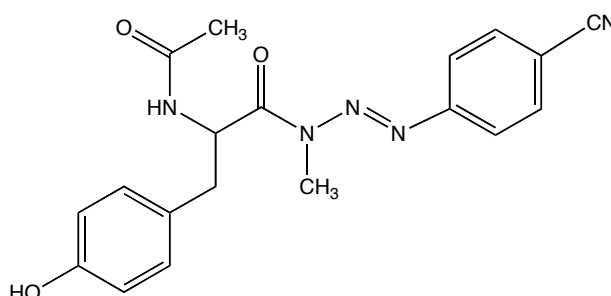


Figura 12 - Representação química do pró-fármaco C (X=CN).

### <sup>1</sup>H-RMN

Tabela 6 - Desvios químicos obtidos para o pró-fármaco C (X=CN)

$\delta/\text{ppm}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 400.1325 MHz)				
NCH <sub>3</sub>	NHCOCH <sub>3</sub>	Ar-X	$\alpha$ -CH	CH <sub>2</sub> ArOH
				2.84 (H <sub>A</sub> , dd, J= 8.0 e J=13.6, CH <sub>2</sub> );
	1.83 (3H, s, CH <sub>3</sub> );	7.67 (2H, AA'XX', J=8.0);		2.91 (H <sub>B</sub> , dd, J= 7.2 e J=13.6, CH <sub>2</sub> );
3.32 (3H, s)	8.53 (1H, d, J=7.2, NH);	8.00 (2H, AA'XX', J=8.4)	5.56 (1H, dd, J=7.2 e J=7.6)	6.54 (2 H, AA'XX', J=8.0);
				6.95 (2 H, AA'XX', J=8.0);
				9.16 (1H, s, OH)

Tal como no composto anterior, para análise do espectro de <sup>1</sup>H-RMN, calculou-se a razão  $\Delta\nu/J$  e obtiveram-se resultados inferiores a 10 (para

ambos anéis aromáticos), o que indica que estes sistemas são do tipo AA'XX e não AA'BB.

O sinal do anel aromático (para dissubstituído) apresenta-se como um sistema AA'XX' ( $J > 10$ ), fácil de reconhecer pelo seu aspecto de par de dupletos. Os desvios químicos encontram-se entre 6.54 e 6.95 ppm, no caso do anel aromático correspondente à parte do aminoácido e, entre 7.67 e 8.00 ppm, no caso do anel aromático correspondente à parte triazénica.

O grupo N-CH<sub>3</sub> da metade triazeno surge como um singuleto com um desvio químico ( $\delta$ ) de 3.32 ppm.

O próton N-H do grupo amida do N-acetil-L-tirosina-MMT manifesta-se como um duplete de baixa resolução com valor de desvio químico de 8.53 ppm.

### <sup>13</sup>C-RMN

$\delta$ /ppm (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): 22.676 (COCH<sub>3</sub>); 28.508 (NCH<sub>3</sub> triaz); 37.040 (CHCH<sub>2Ar</sub>); 52.655 (CH); 111.677 (CN); 115.416 (C<sub>Ar</sub>); 119.017 (C<sub>Ar</sub>); 123.198 (C<sub>Ar</sub>); 127.469 (C<sub>Ar</sub>); 130.350 (C<sub>Ar</sub>); 134.218 (C<sub>Ar</sub>); 151.661 (C<sub>Ar</sub>); 156.447 (C<sub>Ar</sub>); 169.810 (C=O); 175.126 (C=O)

A análise por <sup>13</sup>C-RMN vem confirmar a existência dos carbonos correspondentes a cada um desses hidrogénios. Salientam-se os carbonos dos dois grupos carbonilo a 169.810 e 175.126 ppm, que correspondem respectivamente a NHCOCH<sub>3</sub> e N=N-N-N-CO. Confirma-se, também, a presença de 8 sinais correspondentes aos carbonos dos dois anéis aromáticos.

### IV

$\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 3327.33 ( $\nu_{\text{NH}}$ ); 2226.52 ( $\nu_{\text{C=N}}$ ); 1702.07 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ); 1634.12 ( $\nu_{\text{C=O}}$ )

No espectro de IV identificaram-se duas bandas características correspondentes aos três grupos carbonilo (C=O) do composto, nomeadamente a 1634,12 e 1702.07  $\text{cm}^{-1}$ . A 3327.33  $\text{cm}^{-1}$  surge uma banda de *stretching* do N-H do grupo amida.

**Ponto de fusão (Pf)**

Pf=196°-198°C



## 2. CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TIROSINASE EM LINHAS CELULARES DE MELANOMA

Os pró-fármacos (PFs) estudados neste trabalho têm, na sua estrutura o substrato da enzima tirosinase, o aminoácido N-acetil-L-tirosina e deste modo, podem ser metabolizados enzimaticamente em células que possuam a enzima tirosinase activa, libertando a parte activa do fármaco propriamente dito, neste caso, o agente alquilante, “in loco”, garantindo desta forma uma maior especificidade para as células alvo. Tal como referido na secção 3.2.1 do Capítulo 1, a tirosinase encontra-se nos melanócitos, e está aberrantemente activa em células de melanoma maligno.

Assim, numa primeira fase deste trabalho, foi determinada a actividade da enzima tirosinase nas linhas celulares de melanoma, em que se pretendia avaliar a citotoxicidade dos PFs, nomeadamente, SK-MEL-30, MNT-1 e M8 (Figura 13).

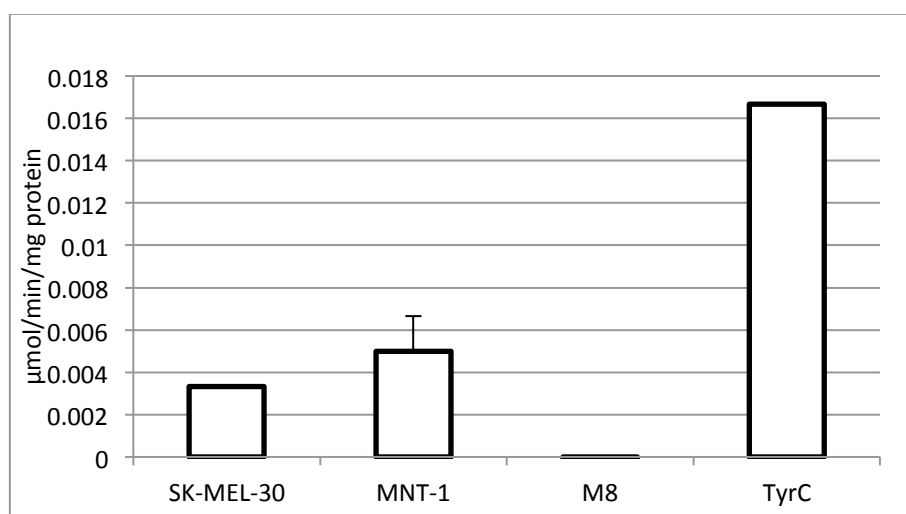


Figura 13 - Representação gráfica da actividade específica (U/mg) da enzima tirosinase de cada linha celular estudada, nomeadamente SK-MEL-30, MNT-1 e M8. Como controlo positivo da reacção enzimática usou-se a tirosinase de Cogumelo (TyrC). N=2.

De acordo com os resultados obtidos para a actividade da enzima tirosinase apresentados na Figura 13 a linha celular MNT-1 apresentou uma actividade enzimática de 0.002 U/mg superior (0.005 U/mg) do que a linha

celular de melanoma SK-MEL-30 (0.003 U/mg). A linha celular de melanoma M8 não apresentou actividade enzimática (0 U/mg).

Assim, as linhas celulares MNT-1 e SK-MEL-30 foram então utilizadas nos estudos posteriores de citotoxicidade dos PFs, tendo-se incluído também nestes estudos a linha celular de melanoma M8, neste caso como controlo da especificidade dos pró-fármacos.

Como controlo positivo na determinação da actividade enzimática usou-se a tirosinase de cogumelo comercial, uma vez que a tirosinase humana não é comercializada. Estudos demonstraram que tirosinase de cogumelo (E.C. 1.14.18.1) é um bom modelo para estudos da tirosinase humana pois ambas possuem dois átomos de cobre no seu centro activo (98).

No final do trabalho será interessante estabelecer uma correlação entre o nível de actividade da tirosinase de cada linha celular e o efeito citotóxico dos pró-fármacos, esperando-se que quanto maior o nível de actividade da tirosinase maior o efeito citotóxico do pró-fármaco em estudo.

### **3. AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE CELULAR DOS PRÓ-FÁRMACOS NAS LINHAS CELULARES DE MELANOMA**

Após a conclusão da síntese dos pró-fármacos de triazenos, estudou-se a sua acção anti-tumoral em diferentes linhas celulares de melanoma, através de ensaios de citotoxicidade.

Numa primeira fase analisaram-se os três PF sintetizados (A, B e C, descritos na secção 3 do Capítulo 2), tendo-se escolhido o mais eficiente relativamente em termos de toxicidade para estudos mais aprofundados, nomeadamente, para comparar a sua toxicidade nas diferentes linhas. Adicionalmente, ainda foi efectuada uma comparação de citotoxicidade entre o PF em estudo com o efeito do temozolomide, quimicamente activado num triazeno alquilante (MMT).

#### **3.1. Estudo da citotoxicidade dos PFs com base no método de MTS**

Numa fase inicial, a citotoxicidade de cada pró-fármaco foi determinada pelo método de MTS, que se baseia no estudo da actividade mitocondrial das células como descrito na secção 5.1 do Capítulo 2, tendo-se obtido os resultados que a seguir se descrevem para cada composto.

##### **Citotoxicidade do PF A**

Com o PF A dissolvido em DMSO efectuaram-se ensaios usando duas linhas celulares de melanoma, nomeadamente SK-MEL-30 e MNT-1. Testaram-se concentrações crescentes de PF A até à concentração máxima de 100  $\mu$ M. Em todos os poços, a percentagem de 0.05 % de DMSO foi mantida, excepto no primeiro (controlo sem solvente).

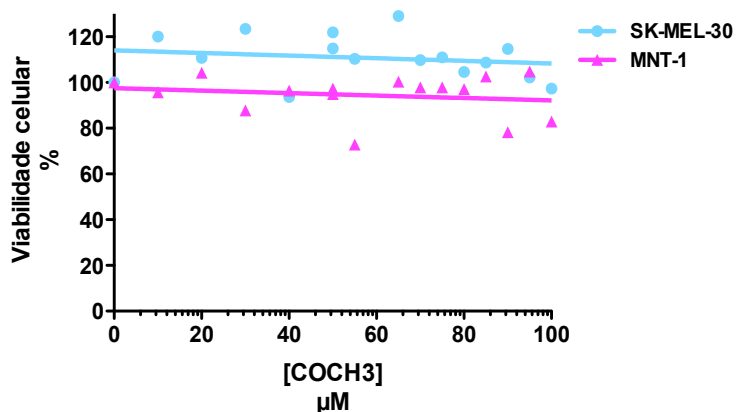


Figura 14 - Estudo da citotoxicidade do pró-fármaco A ( $X=COCH_3$ ), dissolvido em DMSO nas linhas celulares, SK-MEL-30 e MNT-1, pelo método de MTS. N=1.

De acordo com os resultados obtidos (Figura 14) não se verificaram alterações relevantes na actividade mitocondrial das células de melanoma, com a adição de concentrações crescentes deste PF sugerindo que as linhas celulares de melanoma testadas se encontravam metabolicamente activas na presença do composto.

Uma análise microscópica das placas onde decorreu o ensaio revelou que, de facto, as células sujeitas a qualquer concentração de PF A, apresentavam um aspecto saudável, à semelhança das células do poço controlo (sem adição de PF).

### Citotoxicidade do PF B

Com o PF B dissolvido em DMSO efectuaram-se ensaios usando três linhas celulares de melanoma, nomeadamente MNT-1, SK-MEL-30 e M8. Tal como para o PF A, testaram-se concentrações crescentes de PF B até à concentração máxima de 100  $\mu$ M. Em todos os poços, a percentagem de 0.15 % de DMSO foi mantida, excepto no primeiro (controlo sem DMSO).

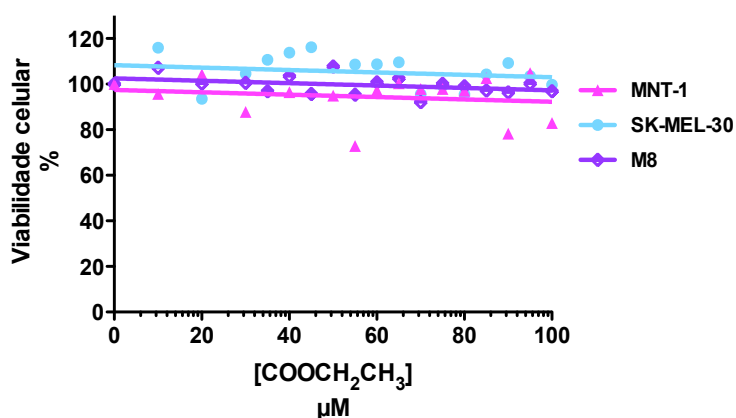


Figura 15 - Estudo da citotoxicidade do pró-fármaco B (X=COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), dissolvido em DMSO nas linhas celulares MNT-1, SK-MEL-30 e M8, pelo método de MTS. N=1.

Neste ensaio de MTS constatou-se que as linhas celulares de melanoma testadas não foram susceptíveis ao PF B, isto porque não se verificou um decréscimo relevante da sua actividade mitocondrial (Figura 15) na presença de qualquer das concentrações.

Contudo, uma observação microscópica da placa, onde se realizou o ensaio de MTS, revelou que nos poços de maior concentração (entre 50 μM e 100 μM), as células tinham uma aparência pouco saudável (muito provavelmente estavam inviáveis) quando comparadas com o poço controlo (sem adição de pró-fármaco) ou com menor concentração de PF B, sugerindo a necessidade de se utilizar outro método para a avaliação da citotoxicidade destes compostos, como será discutido posteriormente na secção 3.2 deste capítulo.

### Citotoxicidade do PF C

Com o PF C dissolvido em DMSO efectuaram-se ensaios usando apenas a linha celular de melanoma MNT-1. À semelhança dos ensaios de MTS para os PFs A e B, testaram-se concentrações crescentes de PF C até à concentração máxima de 100 μM. Em todos os poços, a percentagem de 0.05 % de DMSO foi mantida, excepto no primeiro (controlo sem DMSO).

Neste ensaio observou-se que a linha celular MNT-1 apresentou alguma susceptibilidade ao PF C. De facto, como ilustrado na Figura 16, houve um decréscimo da actividade mitocondrial destas células proporcional à concentração de PF C, verificando-se uma diminuição de cerca de 15% de viabilidade no poço de maior concentração (100  $\mu\text{M}$ ) relativamente ao poço controlo.

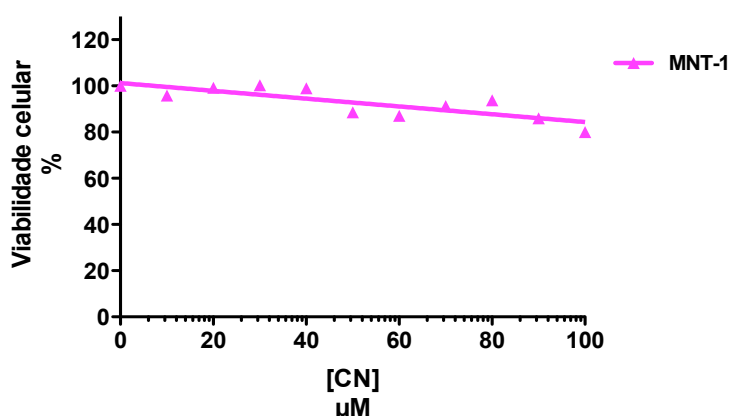


Figura 16 - Estudo da citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método de MTS. N=1.

### 3.2. Estudo da citotoxicidade dos PFs com base na determinação das células apoptóticas/necróticas por citometria de fluxo

Para avaliação do efeito citotóxico destes PFs nas células de melanoma, o método anteriormente utilizado demonstrou ter limitações. O ensaio de MTS determina se uma célula está metabolicamente activa, sendo esta considerada uma medida de viabilidade. No entanto, os ensaios de MTS determinam um valor de actividade metabólica sub-estimados, como descrito por Wang e co-autores (2009), num estudo do efeito de fármacos anti-proliferativos (99).

Por outro lado, estes fármacos por serem agentes alquilantes, a sua acção consiste essencialmente, em induzir a apoptose. Como referido anteriormente, pelo método de MTS não se verificou indução de

citotoxicidade celular pelos PFs A e B nas linhas de melanoma testadas. Porém, o exame microscópico sugeria que havia, de facto um efeito sobre as células, daí a pertinência da utilização de outro tipo de método.

Optou-se, então, por determinar a percentagem de células que quando sujeitas aos PFs ficavam apoptóticas/necróticas, com base na utilização dos compostos fluorescentes, Anexina V e 7-AAD, cuja intensidade pode ser determinada por citometria de fluxo (tal como explicado na secção 5.2 do Capítulo 2).

### Citotoxicidade do PF A

Para o ensaio de apoptose escolheram-se como concentrações de PF A, 50 e 100  $\mu\text{M}$  (para além do poço controlo, com 0.05 % de solvente em meio de cultura). Nesse ensaio, a linha celular de melanoma utilizada foi a MNT-1, uma vez que apresentou maior actividade da enzima tirosinase, conforme foi demonstrado na Figura 13, da secção 2 do Capítulo 3.

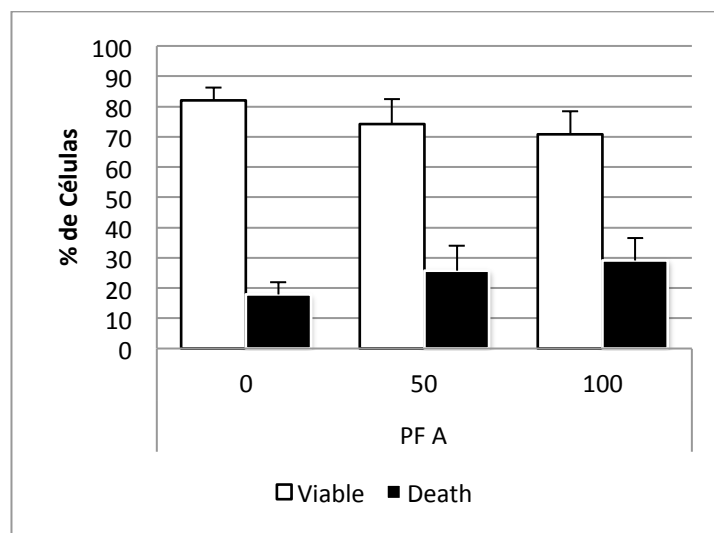
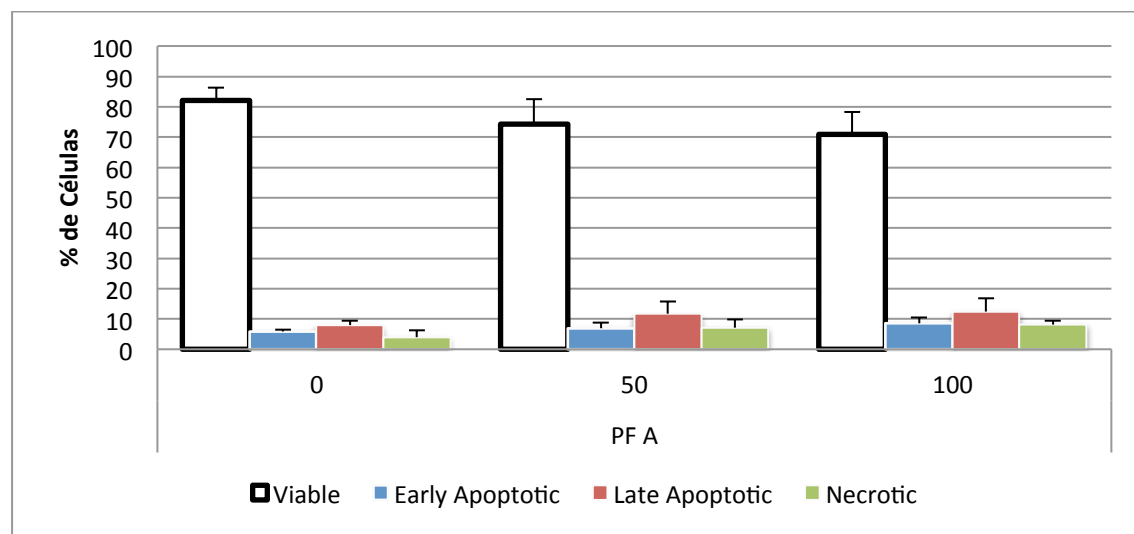


Figura 17 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco A ( $\text{X}=\text{COCH}_3$ ), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.

Legenda: (0) - MNT-1 em meio de cultura sem adição de PF A e com 0.05 % de DMSO; (50) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 50  $\mu\text{M}$  de PF A e com 0.05 % de DMSO; (100) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu\text{M}$  de PF A e com 0.05 % de DMSO. A série de dados nomeada por “death” resulta da soma de percentagens das séries “early apoptotic”, “late apoptotic” e “necrotic”, representadas na Figura 18. N=3.



**Figura 18** - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco A ( $X=COCH_3$ ), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. Legenda: (0) - MNT-1 em meio de cultura sem adição de PF A e com 0.05 % de DMSO; (50) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 50 µM de PF A e com 0.05 % de DMSO; (100) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 100 µM de PF A e com 0.05 % de DMSO. N=3.

A análise da Figura 17, indicou que houve um decréscimo de cerca de 7.87 % e de 11.22 % de células MNT-1 viáveis para as concentrações 50 e 100 µM, de PF A, respectivamente, em relação à percentagem de células vivas no poço sem PF.

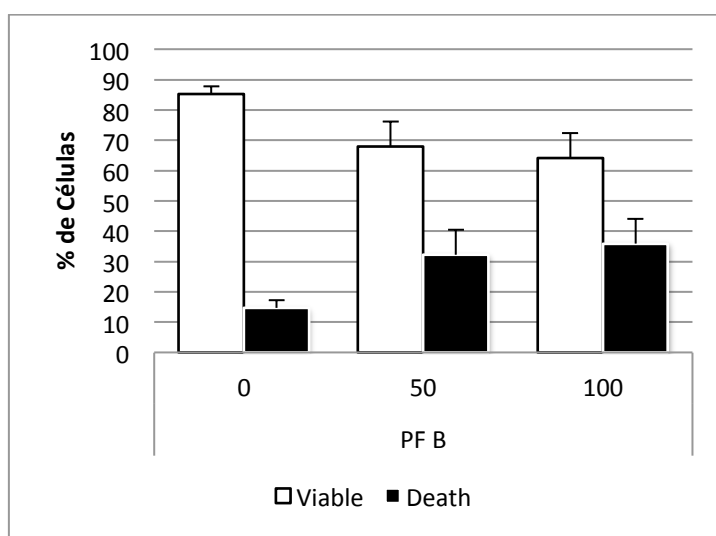
Uma análise mais detalhada dos dados apresentados na Figura 17, mostrou que o aumento das células mortas, nas concentrações de 50 e 100 µM, corresponde principalmente a um aumento de células em apoptose tardia (“late apoptotic”) (Figura 18). Mais precisamente, houve um aumento de cerca de 3.68 % e de 4.47 % de células em apoptose tardia para as concentrações 50 e 100 µM, de PF A, respectivamente, em relação à percentagem de células vivas do poço sem PF.

Pode-se, portanto, concluir que neste caso, apesar de o ensaio de citotoxicidade com base no método MTS sugerir que as células de melanoma não eram sensíveis ao PF A, os ensaios de citometria de fluxo demonstraram que o PF A teve um efeito citotóxico sobre a viabilidade das células MNT-1,

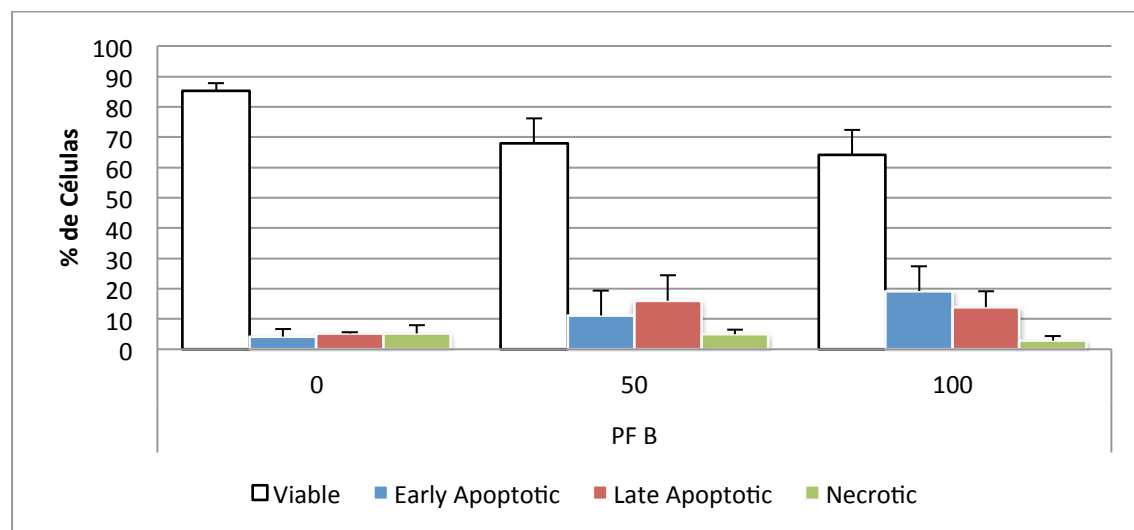
ainda que a diferença de viabilidade entre células não sujeitas e as células sujeitas ao PF, não seja estatisticamente significativa.

### Citotoxicidade do PF B

No ensaio de apoptose escolheu-se a linha celular MNT-1 e as concentrações estudadas de PF foram 50 e 100  $\mu\text{M}$  (para além do poço controlo com 0.15 % de solvente em meio de cultura) (Figura 19 e 20).



**Figura 19 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco B ( $\text{X}=\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. Legenda: (0) - MNT-1 em meio de cultura sem adição de PF B e com 0.15 % de DMSO; (50) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 50  $\mu\text{M}$  de PF B e com 0.15 % de DMSO; (100) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu\text{M}$  de PF B e com 0.15 % de DMSO. A série de dados nomeada por “death” resulta da soma de percentagens das séries “early apoptotic”, “late apoptotic” e “necrotic”, representadas na Figura 20. N=3.**



**Figura 20** - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco B ( $X=COOCH_2CH_3$ ), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. **Legenda:** (0) - MNT-1 em meio de cultura sem adição de PF B e com 0.15 % de DMSO; (50) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 50  $\mu$ M de PF B e com 0.15 % de DMSO; (100) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu$ M de PF B e com 0.15 % de DMSO. N=3.

A análise da Figura 19, indicou que houve um decréscimo de cerca de 17.46 % e de 21.23 % de células MNT-1 viáveis para as concentrações 50 e 100  $\mu$ M, de PF B, respectivamente, em relação à percentagem de células vivas no poço sem PF.

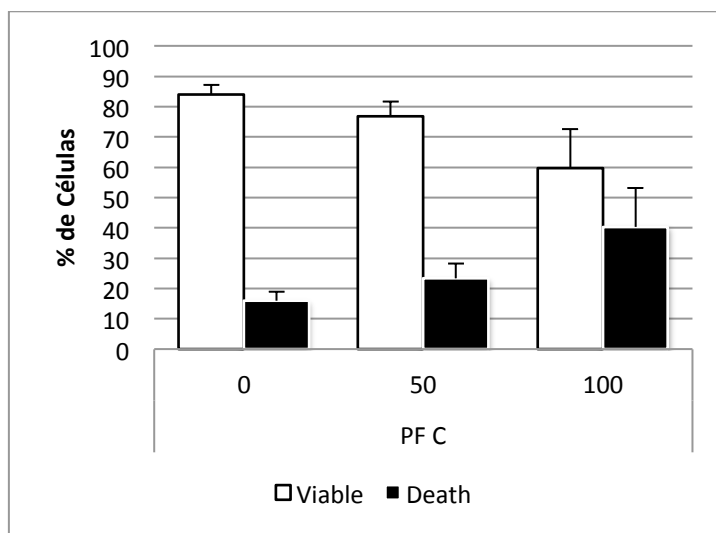
Ao aprofundar os dados apresentados na Figura 19, o aumento das células mortas, no poço com concentração de 50  $\mu$ M de PF, corresponde principalmente ao aumento de cerca de 10.77 % de células em apoptose tardia (“late apoptotic”) (Figura 20). Por sua vez, para a concentração de 100  $\mu$ M, o aumento foi cerca de 15.04 % e corresponde, principalmente, a células em apoptose precoce (“early apoptotic”) (Figura 19).

Embora o método MTS não tenha revelado qualquer efeito tóxico do PF B sobre as linhas de melanoma testadas, este método permite concluir que o PF B tem, de facto, um efeito sobre a viabilidade das células MNT-1, tal como verificado no caso do PF A. No entanto, esta diferença de viabilidade entre as células não sujeitas ao PF e as células com o PF não é estatisticamente significativa.

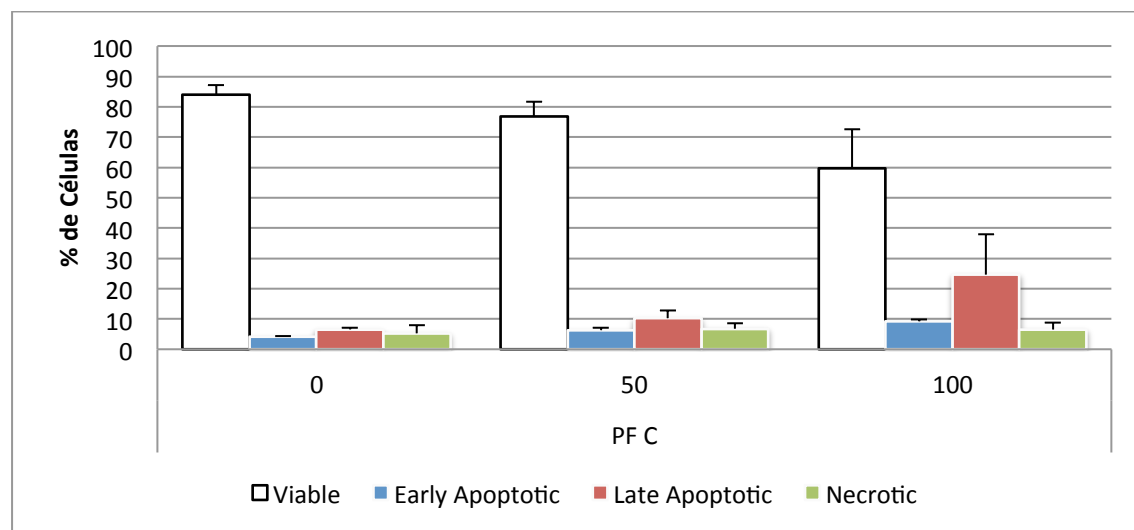
Adicionalmente, foi possível concluir que o efeito observado do PF B foi superior ao do PF A.

### Citotoxicidade do PF C

Para confirmar os resultados obtidos por MTS, procedeu-se a um ensaio de apoptose para avaliar alterações na simetria e permeabilidade membrana plasmática, através da marcação com Anexina e 7-AAD, respectivamente. Nesse estudo a linha celular utilizada foi a MNT-1 e as concentrações estudadas de PF foram 50 e 100  $\mu$ M (para além do poço controlo com 0.05 % de solvente em meio de cultura) (Figuras 21 e 22).



**Figura 21 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.**  
**Legenda:** (0) - MNT-1 em meio de cultura sem adição de PF C e com 0.05 % de DMSO; (50) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 50  $\mu$ M de PF C e com 0.05 % de DMSO; (100) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu$ M de PF C e com 0.05 % de DMSO. A série de dados nomeada por "death" resulta da soma de percentagens das séries "early apoptotic", "late apoptotic" e "necrotic", representadas na Figura 22. N=3.



**Figura 22** - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. Legenda: (0) - MNT-1 em meio de cultura sem adição de PF C e com 0.05 % de DMSO; (50) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 50 µM de PF C e com 0.05 % de DMSO; (100) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 100 µM de PF C e com 0.05 % de DMSO. N=3.

A observação dos resultados presentes na Figura 21, permitiu constatar um decréscimo de cerca de 7.34 % e de 24.36 % de células MNT-1 viáveis para as concentrações 50 e 100 µM, de PF C, respectivamente, em relação à percentagem de células vivas no poço sem PF.

Com a análise detalhada da Figura 21, observou-se que o aumento das células mortas, nas concentrações 50 e 100 µM, corresponde principalmente a células em apoptose tardia (“late apoptotic”) (Figura 22). Mais precisamente, houve um aumento de cerca de 3.65 % e de 18.02 % de células em apoptose tardia para as concentrações 50 e 100 µM, de PF C, respectivamente, relativamente ao poço controlo sem PF.

Neste caso, o método MTS já havia sugerido alguma toxicidade para o PF C, tendo esta sido confirmada com base no método da determinação da apoptose por citometria de fluxo. De facto, observou-se um aumento de células apoptóticas nas concentrações de 50 e 100 µM de PF C, ainda que a diferença de viabilidade entre as células não sujeitas ao PF e as células com o PF não seja estatisticamente significativa.

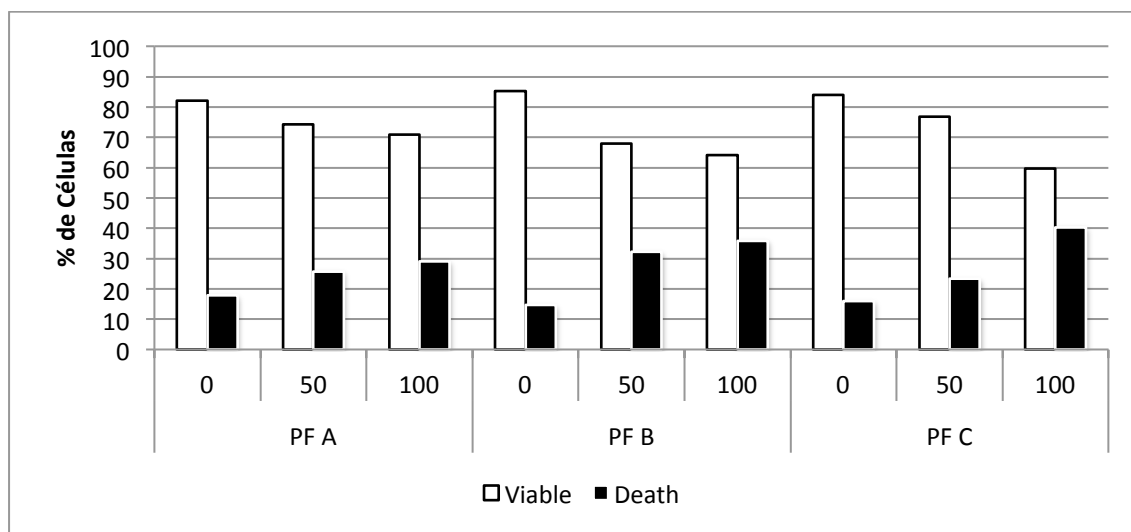


Figura 23 - Estudo comparativo de citotoxicidade dos pró-fármacos A, B e C, dissolvidos em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.

Legenda: (0) - MNT-1 em meio de cultura sem adição de PF; (50) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 50  $\mu$ M de PF; (100) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu$ M de PF. N=3.

Comparando o efeito citotóxico dos pró-fármacos estudados (A, B e C) na linha celular MNT-1, pode dizer-se que o pró-fármaco que teve um efeito superior foi o PF C, conforme ilustrado na Figura 23.

Para que o fármaco atinja o seu local alvo é necessário que ultrapasse várias membranas biológicas por difusão passiva, processo dependente das propriedades físico-químicas do fármaco, isto é, da sua solubilidade em meio aquoso e nos lípidos. Desta forma, *Monteiro* (2009) determinou para os compostos em estudo como medida de lipofilia, o logaritmo do coeficiente de partilha em octanol/água do composto (Log P). A afinidade para o octanol é uma indicação da afinidade do composto para as membranas biológicas enquanto que a afinidade para a água serve de modelo para a afinidade da molécula para a fase aquosa em contacto com a membrana (66).

Valores extremos indicam que o composto interage em demasia com as membranas pelo que ficará localizado na primeira camada lipídica com a qual entra em contacto e não será capaz de atravessar a fase aquosa. À medida de P se aproxima de zero, a molécula irá ser tão solúvel em água que será incapaz de atravessar a fase lipídica e ficará retida na fase aquosa. É desejável valores de Log P próximos de 2, como valor de lipofília em que se observará melhor absorção dos fármacos (66).

Os valores obtidos de Log P para os pró-fármacos usados nestes estudo estão sumariados na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores de Log P dos PF A, B e C (in (66))

PF	Log P <sub>exp</sub>
A	2.33 ± 0.020
B	2.96 ± 0.022
C	2.14 ± 0.095

Dos três compostos, o PF C foi o que apresentou um valor de log P mais próximo de 2, pelo que este possui uma melhor correlação de lipofília/hidrofília. O PF B apresenta um valor de log P superior relativamente aos restantes, o que significa que este composto apresenta um comportamento mais lipofílico. Desta forma, consegue-se explicar porque é que pró-fármacos estruturalmente semelhantes obtiveram resultados citotóxicos diferentes. Uma vez que, o PF C foi o que obteve melhor correlação de lipofília/hidrofília será, por isso, melhor absorvido, e, conseqüentemente, maior quantidade de pró-fármaco será disponibilizado à tirosinase reflectindo-se num efeito anti-tumoral mais efectivo.

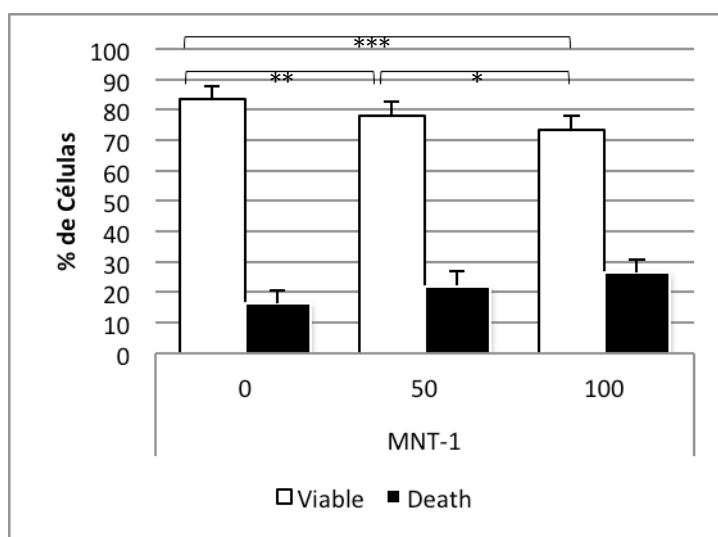
### 3.3. Sensibilidade das linhas celulares de melanoma ao PF C, tendo em conta o nível de expressão da enzima tirosinase.

Da avaliação do padrão de expressão da actividade tirosinásica das diferentes linhas celulares de melanoma utilizadas neste estudo, concluiu-se que a linha celular MNT-1 era a que apresentava maior nível de actividade enzimática. A linha celular SK-MEL-30 apresentou actividade tirosinásica intermédia e a linha celular M8, nenhuma actividade. Deste modo, com as linhas celulares cujos níveis de actividade tirosinásica são variados foi possível avaliar se a acção tóxica destes PFs, especificamente do PF C, é dependente do nível de actividade desta enzima na célula.

Neste sentido, as diferentes linhas celulares de melanoma foram sujeitas ao tratamento com 50 e 100  $\mu$ M de PF C (para além do poço controlo, com 0.05 % de solvente em meio de cultura), tal como descrito anteriormente, e a susceptibilidade da cada linha foi avaliada com base na determinação da percentagem de células apoptóticas/necróticas, por citometria de fluxo.

#### Susceptibilidade da linha celular de melanoma MNT-1

No ensaio representado abaixo, a linha celular utilizada foi a MNT-1, cuja expressão da enzima tirosinase é elevada (Figura 24).



**Figura 24** - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.

**Legenda:** (0) - MNT-1 em meio de cultura sem adição de PF C e com 0.05 % de DMSO; (50) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 50  $\mu$ M de PF C e com 0.05 % de DMSO; (100) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu$ M de PF C e com 0.05 % de DMSO. A série de dados nomeada por “death” resulta da soma de percentagens das séries “early apoptotic”, “late apoptotic” e “necrotic”, representadas em anexo na Figura 38. N=4. Valores estatisticamente significativos: \* significa que  $p < 0.05$ , \*\* significa que  $p < 0.01$  e \*\*\* significa que  $p < 0.0001$ .

Através da análise da Figura 24 e com dados apresentados na tabela abaixo (Tabela 8), observou-se um decréscimo de cerca de 5.5 % e de 9.89 % de células MNT-1 viáveis para as concentrações 50 e 100  $\mu$ M, de PF C, respectivamente, em relação à percentagem de células vivas no poço sem PF.

**Tabela 8** - Valores das percentagens de células viáveis e mortas da linha celular MNT-1, após o tratamento com 50 e 100  $\mu$ M de PF C.

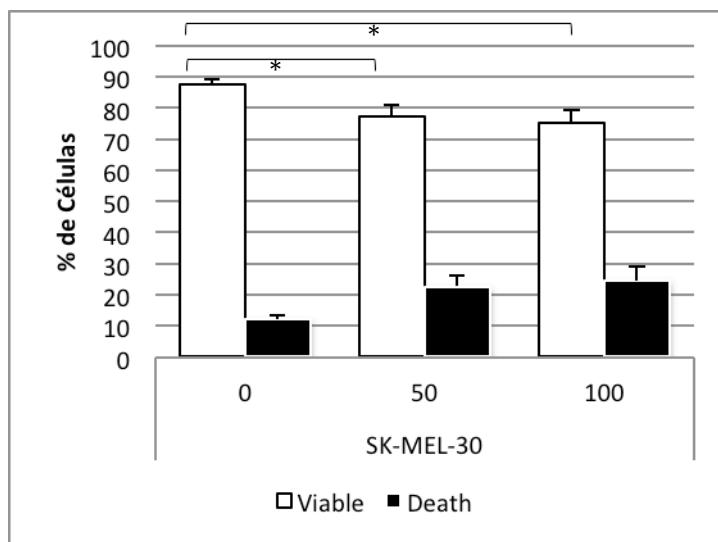
Concentração de PF ( $\mu$ M)	% de Células Viáveis	% de Células Mortas
	e Desvio Padrão	e Desvio Padrão
0	83.478 $\pm$ 4.120	16.523 $\pm$ 4.120
50	77.983 $\pm$ 4.775	22.018 $\pm$ 4.775
100	73.593 $\pm$ 4.374	26.415 $\pm$ 4.377

Deste modo, pode-se concluir que neste caso, com a determinação da apoptose por citometria de fluxo, o PF C teve um ligeiro efeito sobre a viabilidade das células MNT-1, e essa a diferença de viabilidade entre células não sujeitas ao PF e as células com o PF é estatisticamente significativa (conforme representado na Figura 24).

De um modo geral, foram observadas diferenças estatisticamente significativas, na viabilidade entre as células não tratadas e as células tratadas com 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M de PF ( $p < 0.01$  e  $p < 0.001$ , respectivamente). Quanto à diferença observada entre as células sujeitas com 50  $\mu$ M de PF C e as células sujeitas com 100  $\mu$ M foi, também, estatisticamente significativa ( $p < 0.05$ )

### Susceptibilidade da linha celular de melanoma SK-MEL-30

À semelhança do ensaio anterior sujeitou-se a linha celular de melanoma SK-MEL-30, com expressão intermédia da enzima tirosinase, ao tratamento com o PF C (Figura 25).



**Figura 25** - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular SK-MEL-30, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. **Legenda:** (0) - SK-MEL-30 em meio de cultura sem adição de PF C e com 0.05 % de DMSO; (50) - SK-MEL-30 em meio de cultura com concentração de 50 µM de PF C e com 0.05 % de DMSO; (100) - SK-MEL-30 em meio de cultura com concentração de 100 µM de PF C e com 0.05 % de DMSO. A série de dados nomeada por “death” resulta da soma de percentagens das séries “early apoptotic”, “late apoptotic” e “necrotic”, representadas em anexo na Figura 39. N=4. Valores estatisticamente significativos: \* significa que  $p < 0.05$ .

A análise da Figura 25 e da Tabela 9, demonstrou um decréscimo de cerca de 10.41 % e de 12.47 % de células SK-MEL-30 viáveis para as concentrações 50 e 100 µM, de PF C, respectivamente, em relação à percentagem de células vivas no poço sem PF.

**Tabela 9** - Valores das percentagens de células viáveis e mortas da linha celular SK-MEL-30, após o tratamento com 50 e 100 µM de PF C.

Concentração de PF (µM)	% de Células Viáveis	% de Células Mortas
0	87.810 ± 1.529	12.190 ± 1.529
50	77.400 ± 3.882	22.600 ± 3.882
100	75.340 ± 4.354	24.660 ± 4.354

Pode-se concluir, portanto, que neste caso, com a determinação da apoptose por citometria de fluxo, o PF C, tal como na linha MNT-1, teve um ligeiro efeito sobre a viabilidade das células SK-MEL-30, e essa a diferença de viabilidade entre células não sujeitas ao PF e as células com o PF é estatisticamente significativa (conforme representado na Figura 25). Especificamente, as diferenças observadas entre a viabilidade entre as células não sujeitas ao PF e as células sujeitas às concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ , foram igualmente estatisticamente significativas ( $p < 0.01$ ).

Contudo, o efeito do PF C nas células SK-MEL-30 foi percentualmente superior ao observado nas células MNT-1. Este resultado foi contrário ao que se esperava, na medida, em que estas duas linhas celulares possuem padrões de tirosinase diferentes, pelo que era expectável que o efeito citotóxico na linha celular SK-MEL-30 fosse inferior ao observado na linha celular MNT-1, esta observação será discutida posteriormente.

### Susceptibilidade da linha celular de melanoma M8

No ensaio representado em seguida, a linha celular utilizada foi a linha celular de melanoma M8 (Figura 26).

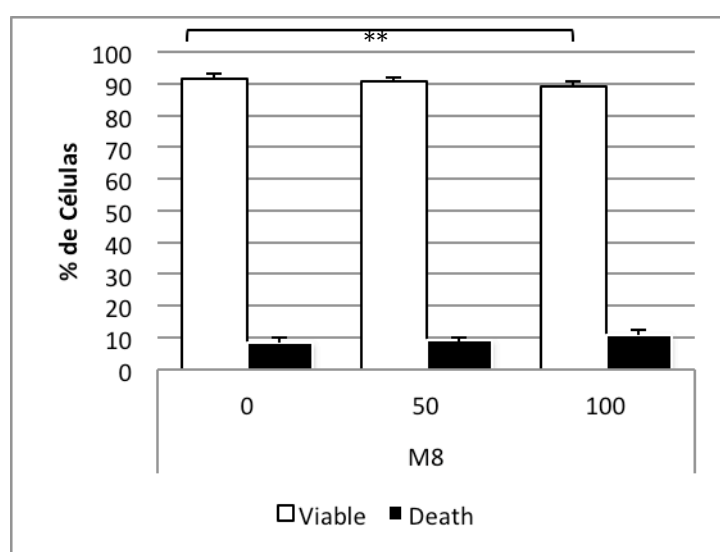


Figura 26 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular M8, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.

**Legenda:** (0) - M8 em meio de cultura sem adição de PF C e com 0.05 % de DMSO; (50) - M8 em meio de cultura com concentração de 50  $\mu\text{M}$  de PF C e com 0.05 % de DMSO; (100) - M8 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu\text{M}$  de PF C e com 0.05 % de DMSO. A série de dados nomeada por “death” resulta da soma de percentagens das séries “early apoptotic”, “late apoptotic” e “necrotic”, representadas em anexo na Figura 40. N=4. Valores estatisticamente significativos: \*\* significa que  $p < 0.01$ .

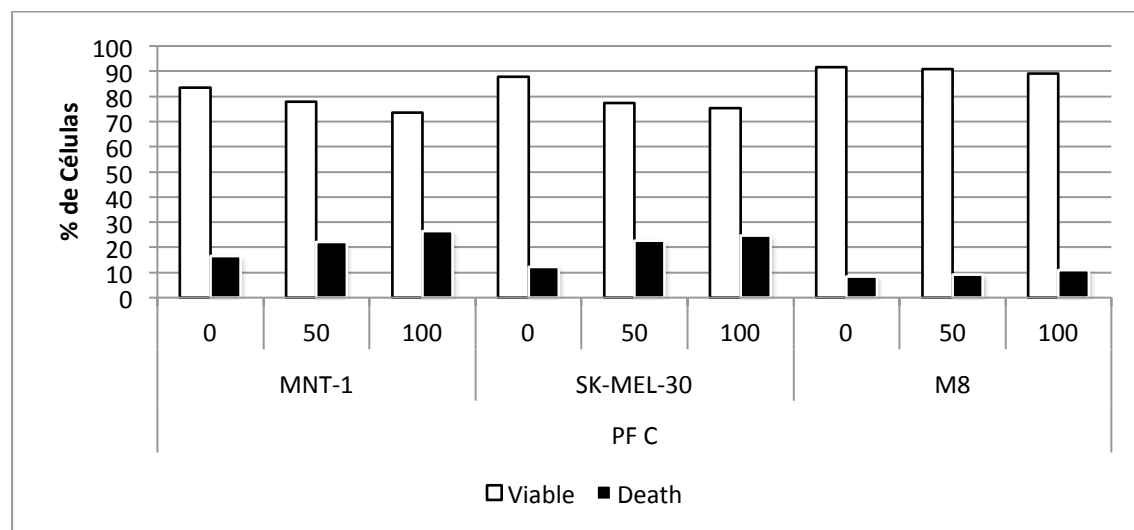
A análise da Figura 26, indicou que não houve um decréscimo relevante de células M8 viáveis nas concentrações 50 e 100  $\mu\text{M}$ , de PF C, respectivamente, em relação à percentagem de células vivas no poço sem PF.

**Tabela 10 - Valores das percentagens de células viáveis e mortas da linha celular M8, após o tratamento com 50 e 100  $\mu\text{M}$  de PF C.**

Concentração de PF ( $\mu\text{M}$ )	% de Células Viáveis	% de Células Mortas
0	91.610 $\pm$ 1.843	8.390 $\pm$ 1.843
50	90.850 $\pm$ 1.152	9.150 $\pm$ 1.152
100	89.105 $\pm$ 1.597	10.895 $\pm$ 1.597

Os resultados obtidos para as células tratadas com o PF C (concentração de 100  $\mu\text{M}$ ) foram estatisticamente significativos relativamente ao poço controlo sem pró-fármaco (Figura 28). A diferença observada entre a viabilidade das células não sujeitas ao PF e as células sujeitas à concentração de 100  $\mu\text{M}$  de PF C, foi estatisticamente significativa ( $p < 0.01$ ).

Assim, pode-se concluir que o pró-fármaco em estudo (PF C) é selectivo, na medida, em que não foi observado qualquer efeito na linha celular de melanoma M8.



**Figura 27 - Estudo comparativo de citotoxicidade do pró-fármaco C, dissolvido em DMSO nas linhas celulares MNT-1, SK-MEL-30, M8, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.**

**Legenda:** (0) - células em meio de cultura sem adição de PF; (50) - células em meio de cultura com concentração de 50  $\mu\text{M}$  de PF C; (100) - células em meio de cultura com concentração de 100  $\mu\text{M}$  de PF C. N=4.

Comparando o efeito tóxico do pró-fármaco estudado (PF C) nas linhas celulares utilizadas, conforme ilustrado na Figura 30, pode-se sugerir que a citotoxicidade do pró-fármaco foi eficaz nas linhas celulares com valor intermédio e alto de actividade tirosinásica. Tal como referido anteriormente, não se verificaram diferenças na viabilidade entre as células não sujeitas ao PF C e as células com PF C, na linha celular de melanoma M8. Este facto sugere que a citotoxicidade deste PF está relacionada com a actividade da tirosinase.

Embora o efeito citotóxico do PF C não aparente ser dependente da quantidade de tirosinase activa, estes resultados sugerem que esta tem que estar presente para que o fármaco seja libertado, e exerça a sua acção como agente alquilante, conduzindo à apoptose. Portanto, estes resultados são interessantes na medida em que sugerem que estamos na presença de PFs promissores relativamente à sua especificidade.

Com os resultados obtidos na determinação da apoptose das células de melanoma resultante do tratamento com o PF C, várias podem ser as explicações para as diferenças observadas no efeito citotóxico entre as células de melanoma SK-MEL-30 e MNT-1, como por exemplo: a influência da proliferação celular e da fase do ciclo celular, em que as células se encontram quando sujeitas ao tratamento com os agentes anti-tumorais. Por outro lado, as origens genéticas das duas linhas celulares, presumivelmente diferentes, podem influenciar o sucesso do tratamento, na medida em que possivelmente já existem mecanismos de resistência intrínsecos a estes pró-fármacos.

Assim, tendo em conta que o tipo de crescimento das linhas celulares de melanoma MNT-1 e SK-MEL-30 era diferente, coloca-se a hipótese de que as taxas de proliferação celular estejam envolvidas na susceptibilidade das linhas celulares ao tratamento com estes fármacos. Durante a manutenção das culturas celulares foi notado que a linha celular SK-MEL-30, relativamente à linha celular MNT-1, apresenta taxas de proliferação ligeiramente superiores, ou seja, estas células de melanoma atingem mais rapidamente estados de confluência.

*Valeriote* e co-autores (1975) afirmam que na sua generalidade, as células em proliferação são mais sensíveis aos agentes anti-tumorais do que as células não proliferativas (100). Além disto, várias têm sido as evidências publicadas que sugerem que alterações no controlo quer do ciclo celular quer da apoptose, têm como consequência o desenvolvimento de resistência ao tratamento com agentes citotóxicos (101; 102). *Wilson* e co-autores (1997) referem que essas alterações nas vias do ciclo celular têm consequências na proliferação celular (103). Como exemplo, a supressão do efeito potenciador de apoptose, provocada pela desregulação de *c-myc*, via *p53* e *bcl-2*, induz a expressão de um sinal de proliferação (104; 105). Portanto, essas alterações da proliferação têm um impacto significativo na sensibilidade das células tumorais à quimioterapia, como demonstrado *in vitro* (106; 100; 107).

Por isto, o facto da linha SK-MEL-30 evidenciar taxas de proliferação superiores às da MNT-1, sugere que a maior susceptibilidade citotóxica desta linha, perante o tratamento com o PF C, poderá estar relacionada com a sua taxa de proliferação. Este facto não corroborou o que vários autores têm proposto sobre a influência da proliferação celular na resistência das células tumorais ao tratamento.

Todavia, a fase do ciclo celular em que as células se encontram, também é crítica para o sucesso do tratamento. Estudos com a cistaplantina, fármaco igualmente pertencente à classe dos agentes alquilantes, referem que as células são mais sensíveis a este fármaco, na fase G1 do ciclo celular e antes de entrar na fase S (síntese de DNA). A entrada na fase S reduz significativamente a susceptibilidade ao tratamento.

Por outro lado, estes resultados experimentais podem resultar da diferente origem genética destas duas linhas celulares de melanoma. Poderemos inferir que, apesar da linha MNT-1 possuir maior actividade tirosinásica, já existem mecanismos de resistência, tal como a diminuição da concentração intracelular do fármaco, pelo aumento de expressão de transportadores de membrana, designados por glicoproteína P (108). No caso do melanoma maligno, as resistências ao tratamento estão frequentemente associadas à enzima O<sub>6</sub>-alquilguanina-DNA-alquiltransferase (OGAT). Como referido na secção 3.1.1 do Capítulo 1, os triazenos induzem a formação de aductos de DNA, sendo a O<sub>6</sub>-alquilguanina a principal lesão citotóxica. Geralmente, como consequência destas alterações, procede-se à sua reparação, mediada pela enzima OGAT. Após esta reparação, as células afectadas apresentam saturação, até uma nova síntese de moléculas da enzima reparadora (63; 64).

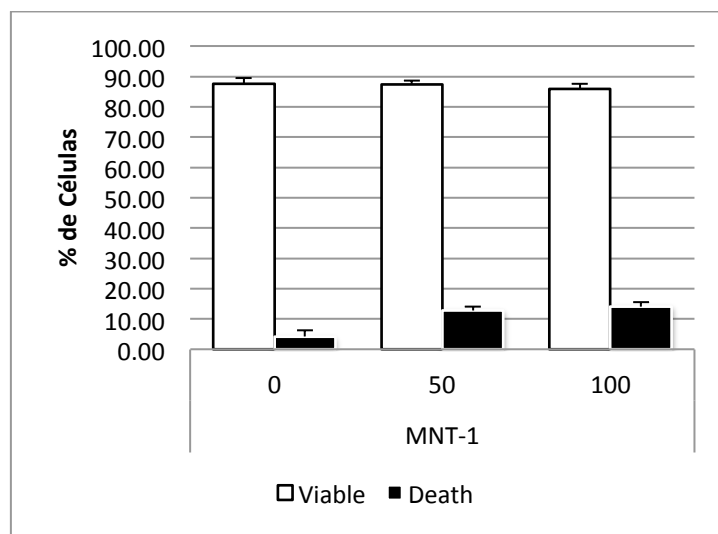
Os níveis elevados de actividade de OGAT são o principal elemento responsável pela resistência a estes fármacos. Apesar de ter sido demonstrado por *Lacal* e co-autores (1996), que os triazenos têm capacidade para inactivar a enzima OGAT, a linha celular de melanoma MNT-1 pode ter

maior expressão que a linha celular SK-MEL-30. Desta forma, conseguimos explicar que o efeito citotóxico observado não depende apenas da actividade tirosinásica mas também, provavelmente, da origem genética das linhas celulares. Por este facto, se a linha MNT-1 apresentar maior expressão de OGAT, maior será a resistência ao tratamento com os triazenos (63; 64).

### **3.4. Sensibilidade das linhas celulares de melanoma ao Temozolomide.**

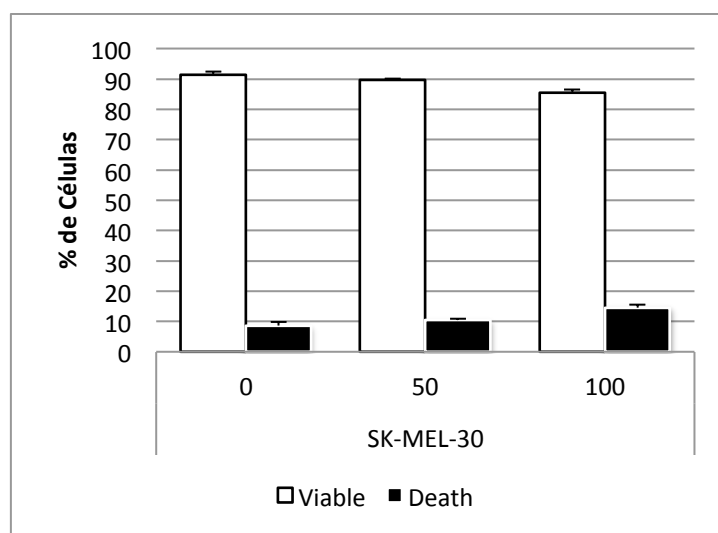
Com os resultados obtidos até então, tornou-se relevante determinar se o efeito do pró-fármaco C, através da aplicação no sistema MDEPT, é mais eficaz e selectivo que o temozolomide (TMZ). Teoricamente, o TMZ irá afectar as linhas celulares de melanoma, independentemente do seu nível de expressão tirosinásica, uma vez que, o seu monometiltriazeno (MMT) é libertado por hidrólise química.

Para esta avaliação do efeito citotóxico do TMZ, seguiu-se a mesma estratégia utilizada para o PF C, nomeadamente a determinação da percentagem de células apoptóticas por citometria de fluxo. Para o ensaio de apoptose escolheram-se como concentrações de TMZ, 50 e 100  $\mu$ M (para além do poço controlo, com 0.1 % de solvente em meio de cultura), tal como efectuado no ensaio para avaliação da citotoxicidade do PF C. Para este ensaio, utilizaram-se as mesmas linhas celulares de melanoma, MNT-1, SK-MEL-30 e M8.



**Figura 28** - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco TMZ, dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. Legenda: (0) - MNT-1 em meio de cultura sem adição de TMZ e com 0.1 % de DMSO; (50) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 50  $\mu$ M de TMZ e com 0.1 % de DMSO; (100) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu$ M de TMZ e com 0.1 % de DMSO. A série de dados nomeada por “death” resulta da soma de percentagens das séries “early apoptotic”, “late apoptotic” e “necrotic”, que não estão representadas. N=2.

A análise da Figura 28, representativa do ensaio de citotoxicidade do TMZ com a linha celular MNT-1, indicou para as mesmas concentrações um decréscimo de cerca de 0.24 % e de 1.55 % de células MNT-1 viáveis para as concentrações de 50 e 100  $\mu$ M, de PF C, respectivamente, em relação à percentagem de células vivas no poço sem PF.



**Figura 29** - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco TMZ, dissolvido em DMSO na linha celular SK-MEL-30, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. Legenda: (0) - SK-MEL-30 em meio de cultura sem adição de TMZ e com 0.1 % de DMSO; (50) - SK-MEL-30 em meio de cultura com concentração de 50  $\mu$ M de TMZ e com 0.1 % de DMSO; (100) - SK-MEL-30 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu$ M de TMZ e com 0.1 % de DMSO.

- SK-MEL-30 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu\text{M}$  de TMZ e com 0.1 % de DMSO. A série de dados nomeada por “death” resulta da soma de percentagens das séries “early apoptotic”, “late apoptotic” e “necrotic”, que não estão representadas. N=2.

Por sua vez, a análise da Figura 29, que ilustra o efeito anti-tumoral na linha SK-MEL-30, indicou que houve um decréscimo de cerca de 1.74 % e de 5.90 % de células SK-MEL-30 viáveis para as concentrações 50 e 100  $\mu\text{M}$ , de PF C, respectivamente, em relação à percentagem de células vivas no poço sem PF.

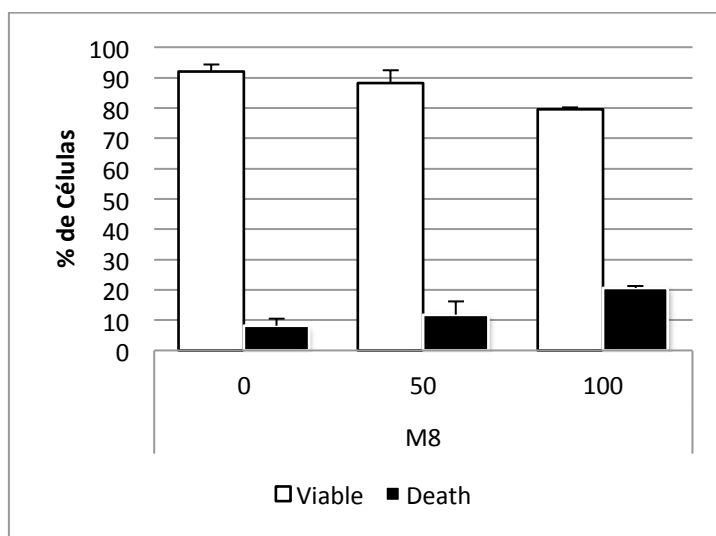


Figura 30 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco TMZ, dissolvido em DMSO na linha celular M8, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.

Legenda: (0) - M8 em meio de cultura sem adição de TMZ e com 0.1 % de DMSO; (50) - M8 em meio de cultura com concentração de 50  $\mu\text{M}$  de TMZ e com 0.1 % de DMSO; (100) - M8 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu\text{M}$  de TMZ e com 0.1 % de DMSO. A série de dados nomeada por “death” resulta da soma de percentagens das séries “early apoptotic”, “late apoptotic” e “necrotic”, que não estão representadas. N=2.

A observação da Figura 30, demonstrou um decréscimo de cerca de 3.74 % e de 12.48 % de células M8 viáveis para as concentrações 50 e 100  $\mu\text{M}$ , de PF C, respectivamente, em relação à percentagem de células vivas no poço sem PF.

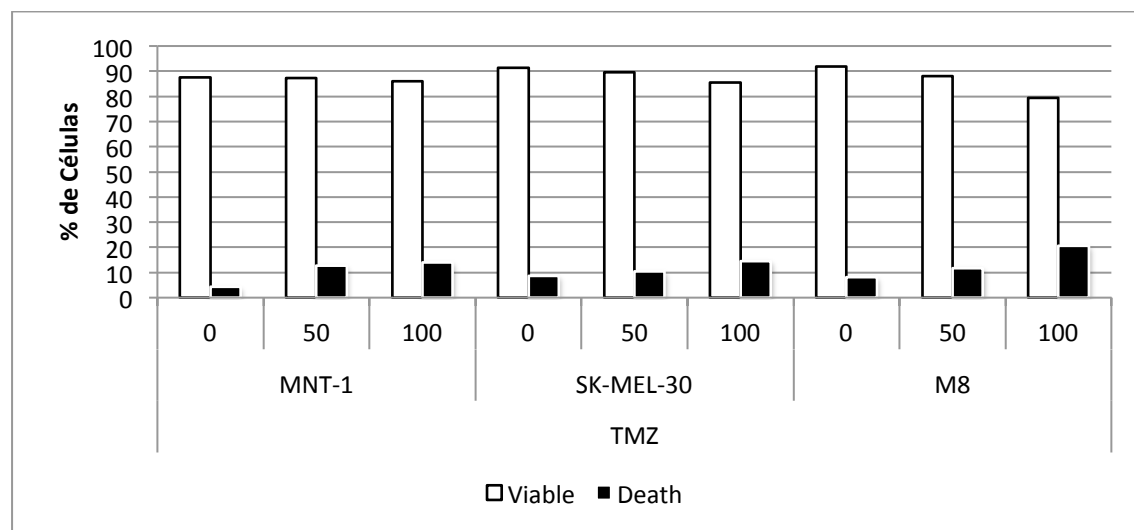


Figura 31 - Estudo comparativo de citotoxicidade do pró-fármaco TMZ, dissolvido em DMSO nas linhas celulares MNT-1, SK-MEL-30, M8, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.

Legenda: (0) - células em meio de cultura sem adição de TMZ; (50) - células em meio de cultura com concentração de 50 µM de TMZ; (100) - células em meio de cultura com concentração de 100 µM de TMZ. N=2.

Na comparação da acção do pró-fármaco TMZ nas diferentes linhas celulares, ilustrada na Figura 31, pode dizer-se que este pró-fármaco apresentou efeito citotóxico na linha celular M8, enquanto que na linha celular MNT-1, o efeito observado não se considera relevante. Relativamente à linha celular SK-MEL-30, também se verificou um efeito citotóxico, embora este seja inferior ao determinado na linha celular M8. A acção citotóxica deste não se correlaciona com a actividade da enzima tirosinase, tal como seria de esperar.

Com base nas Figuras 27 e 31, podemos comparar os resultados obtidos após o tratamento das diferentes linhas celulares com o PF C e o TMZ. Desta forma, é possível afirmar que o pró-fármaco C é notoriamente mais eficaz contra as células de melanoma que têm actividade enzimática, induzindo, nestas células, uma maior perda de viabilidade. Por exemplo, na linha celular MNT-1, 100 µM de PF C conduz a um aumento de 9.89 % de células mortas, enquanto que a mesma concentração de TMZ conduz a 1.55 %, em relação à percentagem de células mortas no poço sem PF.

A linha celular MNT-1 apresentou uma maior resistência ao tratamento. Mais uma vez, a sensibilidade das células de melanoma pode estar associada aos níveis de expressão, presumivelmente diferentes, de OGAT (63). Contudo, o efeito citotóxico observado foi inferior ao obtido pelo PF C. Esta observação, é de grande importância uma vez que o direccionamento do fármaco, através da sua ligação ao aminoácido transportador específico da tirosinase (a tirosina), torna a terapêutica com os triazenos mais eficaz.



#### 4. ESTUDO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DOS PRÓ-FÁRMACOS

Posteriormente aos estudos de citotoxicidade em linhas celulares de melanoma, tornou-se pertinente avaliar a hidrólise dos PFs em lisados de linhas celulares de melanoma.

Os N-acetil-L-tirosina-MMT quando presentes à enzima tirosinase, por hidrólise enzimática, transformam-se nos seus MMTs correspondentes (monometiltriazenos). Todavia, em tampão fosfato, o MMT decompõe-se, por hidrólise química, na respectiva amina aromática.

Por isto, com este ensaio pretendeu-se confirmar se, de facto, há clivagem do pró-fármaco e, conseqüentemente, libertação do fármaco activo (MMT), por acção enzimática. Por outro lado, inferir também se o aminoácido L-tirosina (acoplado ao triazeno) é um bom substrato da tirosinase.

Uma vez realizados os estudos de estabilidade do PF, na presença de extractos proteicos, será possível através destes ensaios verificar a aplicabilidade dos pró-fármacos sintetizados na metodologia MDEPT.

As reacções foram monitorizadas por HPLC, onde se acompanhou o desaparecimento do substrato (o PF) e o aparecimento dos respectivos produtos da reacção (o MMT e a amina).

A identificação dos produtos foi realizada através da comparação dos seus tempos de retenção com os tempos de retenção dos padrões (pró-fármaco, o MMT e a amina), previamente injectados. Os cromatogramas dos padrões e respectivos tempos de retenção, estão representados na secção 3 dos Anexos.

Neste ensaio foram utilizados lisados celulares, obtidos como descrito na secção 2.1 do Capítulo 2, das duas linhas celulares de melanoma, MNT-1 e M8, sendo esta última utilizada como controlo de actividade tirosinásica.

Determinaram-se os valores das constantes de velocidade de pseudo 1ª ordem,  $K_{obs}$ , para a hidrólise do PF C em tampão fosfato, a 37°C frente às

enzimas existentes (como a tirosinase) no lisado da linha celular de melanoma MNT-1. O mesmo procedimento foi efectuado com a linha celular M8 sem actividade tirosinásica.

De seguida, está representado graficamente a relação de Ln (Área do pico obtido de PF C) versus o Tempo de reacção (em horas), obtidos com os ensaios efectuados com o PF C, na presença de dois lisados de diferentes linhas celulares de melanoma (Figuras 32 e 33). A área do pico de PF obtido durante a reacção é proporcional à quantidade de PF, que passa no detector.

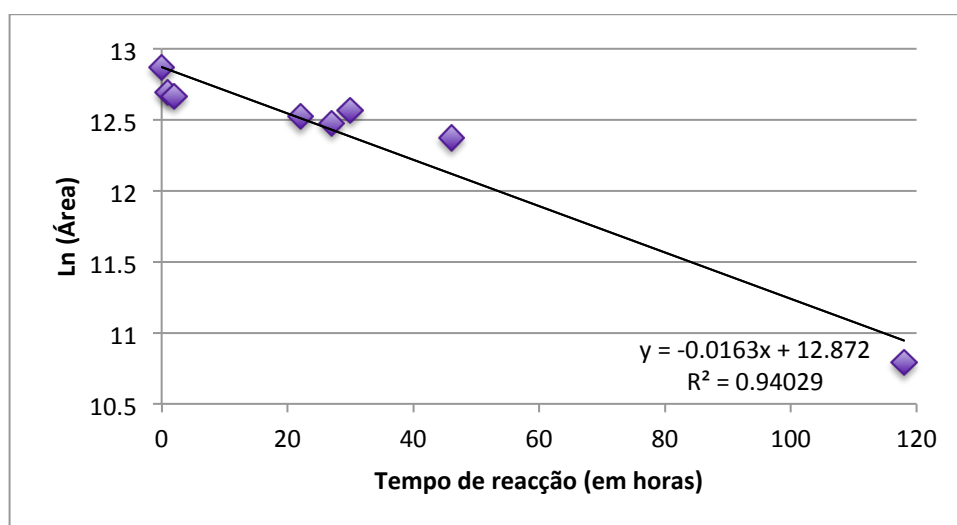


Figura 32 - Representação gráfica do estudo de hidrólise enzimática do PF C, no lisado da linha celular MNT-1, em tampão fosfato pH 7.4, 0.01 M, a 37°C. N=1.

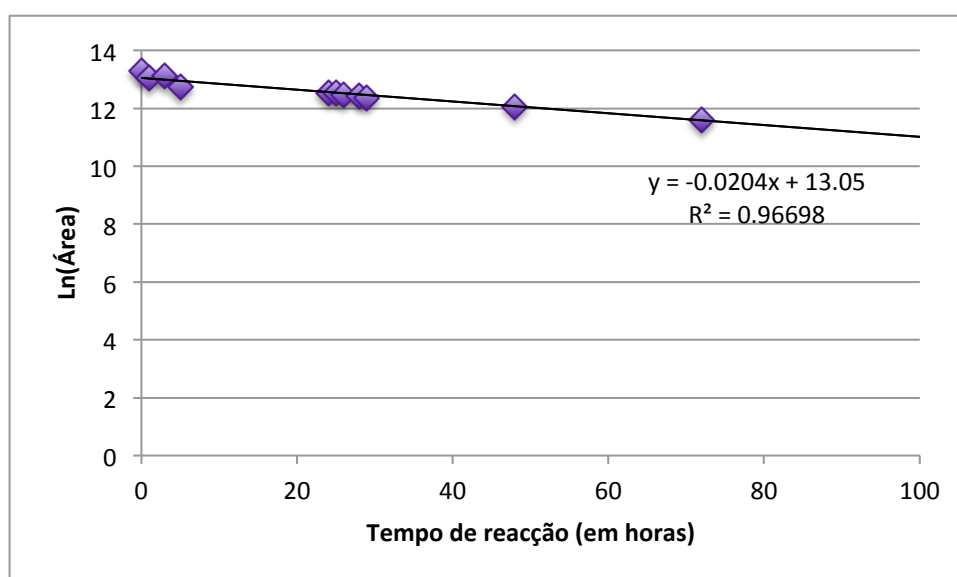


Figura 33 - Representação gráfica do estudo de hidrólise enzimática do PF C, no lisado da linha celular M8, em tampão fosfato pH 7.4, 0.01 M, a 37°C. N=1.

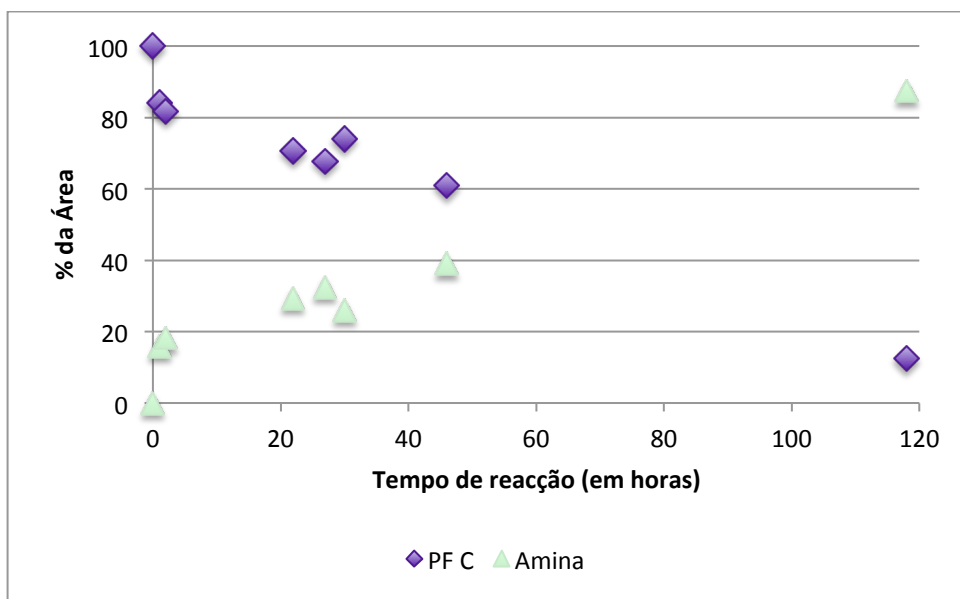


Figura 34 - Representação gráfica da relação existente entre o PF C e a Amina correspondente durante o estudo de hidrólise enzimática, no lisado da linha celular MNT-1, em tampão fosfato pH 7.4, 0,01 M, a 37°C. N=1.

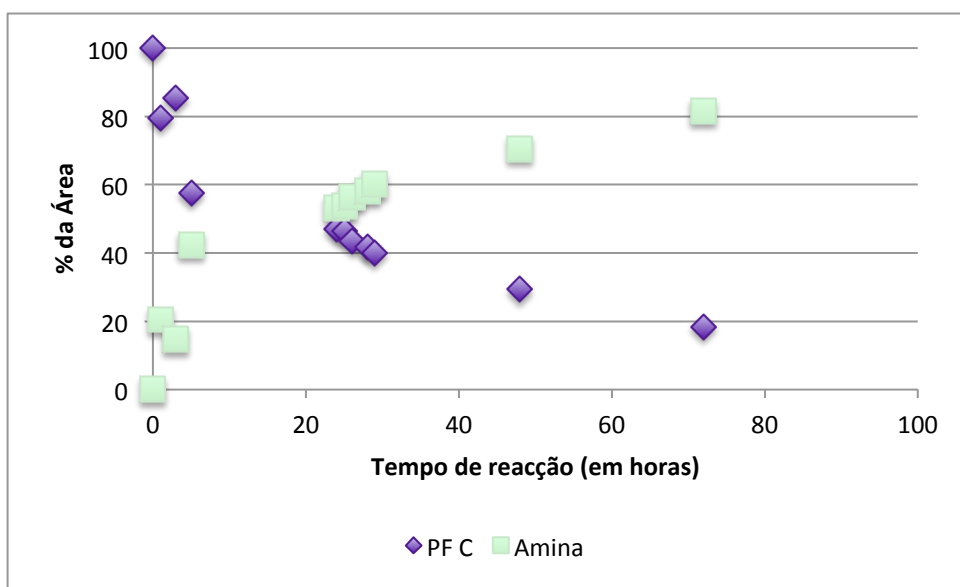


Figura 35 - Representação gráfica da relação existente entre o PF C e a Amina correspondente durante o estudo de hidrólise enzimática, no lisado da linha celular M8, em tampão fosfato pH 7.4, 0,01 M, a 37°C. N=1.

Deste modo, analisando-se os resultados anteriores (Figuras 34 e 35), verificou-se que existe uma relação inversa entre os dois componentes (PF e amina correspondente).

Pela observação das Figuras 32 a 35 e ainda, dos cromatogramas (representados na secção 3 dos Anexos), verificou-se a diminuição da área do pico relativo ao pró-fármaco, ou seja, houve diminuição da sua concentração. Por outro lado, a área do pico da amina aumentou proporcionalmente à sua concentração, à medida que a reacção decorreu.

No caso do MMT, não foi possível visualizar o seu aparecimento por esta técnica, uma vez que, este se decompôs de imediato, na respectiva amina. Apesar de não se conseguir quantificar, teoricamente, seria de esperar que o MMT, numa fase inicial, tendesse a aumentar e diminuindo posteriormente, dando origem à amina correspondente.

Os valores das constantes de velocidade foram determinados a partir dos gráficos de  $\ln(\text{Área do pico})$  em função do tempo ( $t$ ), de acordo com a seguinte equação:  $\ln(\text{Área}) = -k_{\text{obs}} \cdot t$

Os valores de semi-vidas, isto é, o tempo necessário para que a concentração (área) se reduza a metade, foram calculados segundo a equação seguinte:  $t_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{obs}}$

Os resultados obtidos de  $k_{\text{obs}}$  e  $t_{1/2}$  estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 11).

**Tabela 11 - Valores das constantes de velocidade observadas e respectivos valores de tempo de semi-vida do PF C, em tampão fosfato pH 7.4, a 37°C, nos lisados das linhas celulares MNT-1 e M8. N=1.**

Lisado	$k_{\text{obs}}$	$t_{1/2}$
MNT-1	0.0163	43
M8	0.0204	34

**Legenda:**  $k_{\text{obs}}$  em  $\text{M}^{-1}\text{h}^{-1}$ ;  $t_{1/2}$  está representado em horas.

Analisando os valores obtidos, representados na Tabela 11, é possível verificar que os valores de  $t_{1/2}$  obtidos, para os dois lisados das linhas celulares de melanoma, são semelhantes entre si.

A utilização do lisado da linha celular de melanoma M8, foi pertinente para o controlo deste ensaio porque assim, avaliou-se se as constantes de

velocidade e o tempo de semi-vida eram dependentes de uma enzima, possivelmente da tirosinase.

No lisado da linha celular M8, o valor da constante de velocidade obtido neste ensaio, foi igual ao determinado em tampão fosfato por *Monteiro* (2009), com o valor de  $0.0162 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Por isto, o tempo de semi-vida calculado por *Monteiro* (2009) foi, também, de 43 horas (66). Estes valores eram expectáveis, por não existir neste lisado celular qualquer influência da tirosinase, na clivagem do PF, sendo a libertação do seu MMT desencadeada pela sua permanência em tampão, ou seja, pelo pH deste.

Na linha celular MNT-1 era esperado que houvesse uma diminuição do tempo de semi-vida relativamente ao determinado por *Monteiro* (2009), nos ensaios em tampão fosfato, contudo, estes foram superiores ao esperado. O valor obtido deveria ser semelhante ao do ensaio de hidrólise na presença da tirosinase de cogumelo, cujos valores da constante de velocidade e tempo de semi-vida foram de  $0.5724 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e 1,23 horas, respectivamente (66).

Em suma, como os resultados obtidos da constante de velocidade e tempo de semi-vida, para o lisado da linha MNT-1, foram semelhantes aos dos estudos de hidrólise do mesmo composto em tampão fosfato. Conclui-se, que apenas houve hidrólise química e não, como seria de esperar, hidrólise enzimática.

No entanto, é de realçar que em lisados das linhas celulares de melanoma, a quantidade de unidades da tirosinase é muito inferior, relativamente às unidades da tirosinase de cogumelo comercial, utilizadas por *Monteiro* (2009) (66). Por isto, a quantidade do MMT (ou da amina correspondente) resultante da degradação enzimática pela tirosinase, não foi detectável por esta técnica.

Estes resultados foram, portanto, inconclusivos, relativamente à acção da enzima tirosinase na decomposição do PF. Deste modo, mais estudos serão necessários para confirmar a aplicabilidade como pró-

fármacos na metodologia MDEPT e inferir sobre a capacidade da L-tirosina (acoplada ao triazeno) ser um bom substrato.

# **CAPÍTULO 4.**

## **CONCLUSÃO**



## **CAPÍTULO 4. CONCLUSÃO**

Neste trabalho foram sintetizados e caracterizados espectroscopicamente os pró-fármacos, para aplicação na abordagem MDEPT.

O esquema reaccional inicialmente proposto para obtenção dos PFs demonstrou ser adequado à síntese destes compostos. Contudo, a síntese alternativa com o acoplador peptídico TBTU associado ao uso do MW demonstrou ser muito mais rentável, não pela obtenção de maiores quantidades de composto mas sim, pela redução do tempo de síntese.

Os estudos de citotoxicidade em linhas celulares de melanoma, possibilitaram a avaliação do efeito anti-tumoral dos PFs sintetizados, nomeadamente PF A, B e C. Dos três PFs avaliados, concluiu-se que o PF C foi o que obteve melhores resultados nos ensaios de determinação de células apoptóticas/necróticas na linha celular MNT-1, uma vez que, foi determinada uma maior percentagem de células mortas relativamente à percentagem de células viáveis.

Nos ensaios seguintes, aprofundou-se o estudo do efeito anti-tumoral do PF C em diferentes linhas celulares de melanoma, cuja actividade enzimática da tirosinase foi determinada.

Analisando os resultados obtidos, observou-se que houve um efeito significativo nas linhas com padrões de expressão de tirosinase intermédio e alto. Ao contrário do que seria esperado, o efeito observado na linha celular com maior actividade tirosinásica (MNT-1) foi ligeiramente inferior ao observado na linha celular SK-MEL-30, com expressão intermédia da tirosinase. Estes resultados sugerem que o efeito anti-tumoral dos PFs pode ser influenciado por outros factores inerentes à expressão de tirosinase. Tais como, a influência da proliferação celular e da fase do ciclo celular, em que as células se encontram quando sujeitas ao tratamento com os agentes anti-tumorais. Por outro lado, as origens genéticas das duas linhas celulares,

presumivelmente diferentes, podem ter influenciado o sucesso do tratamento, pela existência de mecanismos de resistência.

Como era expectável na linha celular de melanoma sem actividade (M8), não se observaram diferenças na viabilidade entre as células não sujeitas ao PF e as células com o PF.

Os ensaios de citotoxicidade com o TMZ, permitiram-nos inferir sobre a especificidade do PF C, na medida que estes dois compostos possuem o mesmo agente citotóxico, variando apenas no seu mecanismo de activação. O TMZ é activado pelo pH, enquanto que, os PFs em estudo necessitam de activação enzimática.

Analisando os resultados com os dois agentes, podemos concluir que o efeito do PF C foi específico da tirosinase, embora este não tenha sido proporcional. Como seria de esperar, o TMZ teve um efeito inespecífico, não dependente de tirosinase, pelo que afectou relevantemente a viabilidade da linha celular de melanoma M8. A linha celular MNT-1 apresentou uma maior resistência ao tratamento. Contudo, o efeito citotóxico observado nesta linha foi inferior ao obtido pelo PF C. Esta observação, é de grande importância, uma vez que o direccionamento do fármaco, através da sua ligação ao aminoácido transportador específico da tirosinase (a tirosina), torna a terapêutica com os triazenos mais eficaz.

Para terminar este estudo, foram realizados ensaios de hidrólise enzimática do PF em lisados de linhas celulares de melanoma. No entanto, mais ensaios serão necessários para esclarecer se, de facto, houve influência enzimática, nomeadamente da tirosinase, na activação destes pró-fármacos.

Como conclusão geral, os resultados obtidos sugerem-nos que estes PFs constituem potenciais agentes na terapêutica do melanoma.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Chu, D. H.** Overview of Biology, Development, and Structure of Skin. [autor do livro] W. P. Coleman. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 7ª Edição. New York : Blackwell Publishing Inc, 2008, pp. 57-72.
2. **Costin, G. E. e Hearing, V. J.** Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 2007, Vol. 21, 4, pp. 976-994.
3. **CEDERJ.** Sistema tegumentar: pele e anexos. *Sistema tegumentar: pele e anexos*. [Online] 2011. <http://d.yimg.com/kq/groups/18803735/1895055385/name/Corpo>.
4. Dermatopatologia. *Dermatopatologia*. [Online] 2009. <http://www.dermatopatologia.com/pele/histologia.asp>.
5. Medipédia. [Online] 2008. <http://www.medipedia.pt/home/home.php?module=artigoEnc&id=450>.
6. **Sulaimon, S. S. e Kitchell, B. E.** The Biology of Melanocytes. *Veterinary Dermatology*. 2003, Vol. 14, pp. 57-65.
7. **Steingrímsson, E.** Melanocytes and The Microphthalmia Transcription Factor Network. *Annu Rev Genet.* 2004, Vol. 38, pp. 365-411.
8. **Hearing, V. J. e Jiménez, M.** Analysis of mammalian pigmentation at molecular level. *Pigment Cell Res.* 1989, Vol. 2, 2, pp. 75-85.
9. **Naeyaert, J. M., et al.** Pigment content of cultured human melanocytes does not correlate with tyrosinase message level. *Br J Dermatol.* 1991, Vol. 125, 4, pp. 297-303.
10. **Junqueira, L. C. e Carneiro, J.** Pele e Anexos. *Histologia Básica*. 10ª Edição. Rio de Janeiro : Editora Guanabara Koogan, 1995, pp. 359-369.
11. **Goding, C. R.** Melanocytes: The new Black. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007, Vol. 39, 2, pp. 275-279.

12. **Kadekaro, A. L., et al.** Cutaneous photobiology. The melanocyte vs. the sun: who will win the final round? *Pigment Cell Res.* 2003, Vol. 16, 5, pp. 434-447.
13. **Pathak, M. A., Jimbow, K. e Fitzpatrick, T.** Photobiology of pigment cells. [autor do livro] M. Seiji. *Phenotypic Expression in Pigment Cells.* Tokyo : University of Tokyo Press, 1980, pp. 655-670.
14. **Poh Agin, P., Sayre, R. M. e Chedekel, M. R.** Photodegradation of phaeomelanin: an in vitro model. *Photochem Photobiol.* 1980, Vol. 31, 4, pp. 359-362.
15. **Chedekel, M. R.** Photochemistry and photobiology of epidermal melanins. *Photochem Photobiol.* 1982, Vol. 35, 6, pp. 881-885.
16. **Sarna, T., Menon, I. A. e Sealy, R. C.** Photosensitization of melanins: a comparative study. *Photochem Photobiol.* 1985, Vol. 42, 5, pp. 529-532.
17. **Cesarini, J. P.** Photo-induced events in the human melanocytic system: photoaggression and photoprotection. *Pigment Cell Res.* 1988, Vol. 1, 4, pp. 223-233.
18. **Nishioka, K.** Particulate tyrosinase of human malignant melanoma. Solubilization, purification following trypsin treatment, and characterization. *Eur J Biochem.* 1978, Vol. 85, 1, pp. 137-146.
19. **Keilin, D. e Mann, T.** Polyphenol Oxidase. Purification, Nature and Properties. *Proc R Soc Lond B.* 1938, Vol. 125, 839, pp. 187-204.
20. **Ferrini, U., Mileo, A. M. e Hearing, V. J.** Microheterogeneity of melanosome-bound tyrosinase from the Harding-Passey murine melanoma. 1987, Vol. 19, 3, pp. 227-234.
21. **Seabra, M. C., Mules, E. H. e Hume, A. N.** Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trens Mol Med.* 2002, Vol. 8, 1, pp. 23-30.
22. **Petit, L. e Piérard, G. E.** Skin-lightening products revisited. *Int J Cosmet Sci.* 2003, Vol. 25, 4, pp. 169-181.
23. **Ferguson, C. A. e Kidson, S. H.** The regulation of tyrosinase gene transcription. 1997, Vol. 10, 3, pp. 127-138.

24. **Barral, D. C. e Seabra, M. C.** The melanosome as a model to study organelle motility in mammals. *Pigment Cell Res.* 2004, Vol. 17, 2, pp. 111-118.
25. **Phuong Uyen, L. D., Nguyen, D. H. e Kim, E.** Mechanism of skin pigmentation. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2008, Vol. 13, 4, pp. 383-395.
26. **Park, H. Y., et al.** Disorders of Melanocytes. [autor do livro] K. Wolff, et al. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.* New York : Mc Graw Hill Medical, 2008, pp. 591-608.
27. **Radović-Kovacević, V., et al.** Survival analysis in patients with cutaneous malignant melanoma. *Srp Arh Celok Lek.* 1997, Vol. 125, 5-6, pp. 132-137.
28. **Miller, A. J. e Mihim, M. C.** Melanoma. *N Engl J Med.* 2006, Vol. 355, 1, pp. 51-65.
29. **Wolchok, J. D. e Saenger, Y. M.** Current Topics in Melanoma. *Curr Opin Oncol.* 2007, Vol. 19, 2, pp. 116-120.
30. **Haass, N. K., Smalley, K. S. e Herlyn, M.** The role of altered cell-cell communication in melanoma progression. *J Mol Histol.* 2004, Vol. 35, 3, pp. 309-318.
31. **Chin, L.** The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer.* 2003, Vol. 3, 8, pp. 559-570.
32. **Bandarchi, B.** From Melanocyte to Metastatic Malignant Melanoma. *Dermatology Research and Practice.* 2010, pp. 1-8.
33. **Katsambas, A. e Nicolaidou, E.** Cutaneous malignant melanoma and sun exposure: recent developments in epidemiology. *Arch Dermatol.* 1996, Vol. 132, 4, pp. 444-450.
34. **Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. e Marais, R.** Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature.* 2007, Vol. 445, 7130, pp. 851-857.
35. Associação Portuguesa de Cancro Cutâneo. *Associação Portuguesa de Cancro Cutâneo.* [Online] 2004. <http://www.apcc.online.pt/>.

36. **Marsden, J. R., et al.** Revised UK guidelines for the management of cutaneous melanoma 2010. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2010, Vol. 63, 9, pp. 1401-1419.
37. **Johnson, T. M., et al.** Current therapy of cutaneous melanoma. *Cutis.* 1999, Vol. 63, 5, pp. 293-298.
38. **Balch, C. M., et al.** Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol.* 2009, Vol. 27, 36, pp. 6199-6206.
39. **Haass, N. K., et al.** Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res.* 2005, Vol. 18, 3, pp. 150-159.
40. **Kasper, B., et al.** Novel treatment strategies for malignant melanoma: A new beginning? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2007, Vol. 62, 1, pp. 16-22.
41. **Mouawad, R., et al.** Treatment for metastatic malignant melanoma: Old drugs and new strategies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010, Vol. 74, 1, pp. 27-39.
42. **Takimoto, C. H. e Calvo, E.** Principles of Oncologic Pharmacotherapy. [autor do livro] R. Pazdur, et al. *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach.* 2008, pp. 23-42.
43. **Missailidis, S.** *Anticancer Therapeutics.* Weinheim : Wiley-Blackwell, 2008.
44. **Soengas, M. S. e Lowe, S. W.** Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene.* 2003, Vol. 22, 20, pp. 3138-3151.
45. **Matsumura, Y. e Ananthaswamy, H. N.** Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Front Biosci.* 2002, Vol. 7, pp. 765-783.
46. **O'Day, S. J., Kim, C. J. e Reintgen, D. S.** Metastatic melanoma: chemotherapy to biochemotherapy. *Cancer Control.* 2002, Vol. 9, 1, pp. 31-38.
47. **Atkins, M. B.** The treatment of metastatic melanoma with chemotherapy and biologics. *Curr Opin Oncol.* 1997, Vol. 9, 2, pp. 205-213.
48. **Bajetta, E., et al.** Metastatic melanoma: chemotherapy. *Semin Oncol.* 2002, Vol. 29, 5, pp. 427-445.

49. **Gogas, H. J., Kirkwood, J. M. e Sondak, V. K.** Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change? *Cancer*. 2007, Vol. 109, 3, pp. 455-464.
50. **Buzaid, A., Bedikian, A. e Houghton, A.** Systemic chemotherapy and biochemotherapy. [autor do livro] C. Balch, et al. *Cutaneous melanoma*. s.l. : St. Louis: Quality Medical Publishing, Inc, 1998, pp. 405-418.
51. **Eggermont, A. M. e Robert, C.** New drugs in melanoma: It's a whole new world. *Eur J Cancer*. 2011, Vol. 47, 14, pp. 2150-2157.
52. **Thurston, D. E.** *Chemistry and Pharmacology of Anticancer Drugs*. New York : CRC Press - Taylor & Francis Group, 2007.
53. **Rocha, M. J.** *Desenvolvimento de Pró-fármacos de triazenos anti-tumorais usando aminoácidos como transportadores*. Lisboa : Tese de Doutoramento, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2002.
54. **Skibba, J. L., et al.** N-demethylation the antineoplastic agent 4(5)-(3,3-dimethyl-1-triazeno)imidazole-5(4)-carboxamide by rats and man. *Cancer Res*. 1970, Vol. 30, 1, pp. 147-150.
55. **Perry, M. J., et al.** Dopamine- and tyramine-based derivatives of triazenes: activation by tyrosinase and implications for prodrug design. *Eur J Med Chem*. 2009, Vol. 44, 8, pp. 3228-3234.
56. **Connors, T. A., et al.** Tumour inhibitory triazenes: structural requirements for an active metabolite. *Biochem Pharmacol*. 1976, Vol. 25, 3, pp. 241-246.
57. **Julliard, M. e Vernin, G.** Biological properties of antitumor triazenes. *Ind Eng Chem Prod Res Dev*. 1981, Vol. 20, 2, pp. 287-296.
58. **Rutty, C. J., et al.** The species dependent of pharmacokinetics of DTIC. *Brit J Cancer* 48 (1) 140 - 140. 1983, Vol. 48, 1, pp. 140-140.
59. **Middleton, M. R., et al.** Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J Clin Oncol*. 2000, Vol. 18, 1, pp. 158-166.

60. **Agarwala, S. S., et al.** Temozolomide for the treatment of brain metastases associated with metastatic melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol.* 2004, Vol. 22, 11, pp. 2101-2107.
61. **Wainstein, A. J. A. e Belfort, F. A.** Conduta para melanoma cutâneo. *Rev Col Bras Cir.* 2004, Vol. 31, 3, pp. 204-214.
62. **Bedikian, A. Y., et al.** Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) plus dacarbazine in patients with advanced melanoma: the Oblimersen Melanoma Study Group. *J Clin Oncol.* 2006, Vol. 24, 29, pp. 4738-4745.
63. **Lacal, P. M., et al.** In vitro inactivation of human O6-alkylguanine DNA alkyltransferase by antitumor triazene compounds. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996, Vol. 279, 1, pp. 416-422.
64. **Dolan, M. E.** Inhibition of DNA repair as a means of increasing the antitumor activity of DNA reactive agents. *Adv Drug Deliv Rev.* 1997, Vol. 26, 2-3, pp. 105-118.
65. **Denny, W. A.** Prodrug strategies in cancer therapy. *Eur J Med Chem.* 2001, Vol. 36, 7-8, pp. 577-595.
66. **Monteiro, A. S.** *Pró-fármacos de triazenos anti-tumorais para estudos ADEPT e MDEPT.* Lisboa : Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, 2009.
67. **Blau, L., Menegon, R. F. e Chung, M. C.** Pró-fármaco ativado por enzima, uma estratégia promissora na quimioterapia. *Quim Nova.* 2006, Vol. 29, 6, pp. 1307-1317.
68. **Tsalić, M., et al.** Severe toxicity related to the 5-fluorouracil/leucovorin combination (the Mayo Clinic regimen): a prospective study in colorectal cancer patients. *Am J Clin Oncol.* 2003, Vol. 26, 1, pp. 103-106.
69. **Extermann, M., et al.** Predictors of tolerance to chemotherapy in older cancer patients: a prospective pilot study. *Eur J Cancer.* 2002, Vol. 38, 11, pp. 1466-1473.
70. **Ma, B., et al.** Acute toxicity of adjuvant doxorubicin and cyclophosphamide for early breast cancer -- a retrospective review of

- Chinese patients and comparison with an historic Western series. *Radiother Oncol.* 2002, Vol. 62, 2, pp. 185-189.
71. **Edmonson, J. H., et al.** Chemotherapy, irradiation, and surgery for function-preserving therapy of primary extremity soft tissue sarcomas: initial treatment with ifosfamide, mitomycin, doxorubicin, and cisplatin plus granulocyte macrophage-colony-stimulating factor. *Cancer.* 2002, Vol. 94, 3, pp. 786-792.
72. **Frei, E., et al.** Preclinical studies and clinical correlation of the effect of alkylating dose. *Cancer Res.* 1988, Vol. 48, 22, pp. 6417-6423.
73. **Chung, M. C. e Ferreira, E. I.** O processo de latenciação no planejamento de fármacos. 1999, Vol. 22, 1, pp. 75-84.
74. **Nakanishi, T.** Drug transporters as targets for cancer chemotherapy. *Cancer Genomics Proteomics.* 2007, Vol. 4, 3, pp. 241-254.
75. **Patrick, G. L.** *An introduction to Medicinal Chemistry.* New York : New York: Oxford University Press Inc, 1995.
76. **Weyel, D., et al.** Secreted human beta-glucuronidase: a novel tool for gene-directed enzyme prodrug therapy. *Gene Ther.* 2000, Vol. 7, 3, pp. 224-231.
77. **Hamstra, D. A. e Rehemtulla, A.** Toward an enzyme/prodrug strategy for cancer gene therapy: endogenous activation of carboxypeptidase A mutants by the PACE/Furin family of propeptidases. *Hum Gene Ther.* 1999, Vol. 10, 2, pp. 235-248.
78. **Xu, G. e McLeod, H. L.** Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. *Clin Cancer Res.* 2001, Vol. 7, 11, pp. 3314-3324.
79. **Pawelek, J., et al.** New regulators of melanin biosynthesis and the autodestruction of melanoma cells. *Nature.* 1980, Vol. 286, 5773, pp. 617-619.
80. **Land, E. J., Ramsden, C. A. e Riley, P. A.** Quinone chemistry and melanogenesis. *Methods Enzymol.* 2004, Vol. 378, pp. 88-109.
81. **Riley, P. A.** Melanogenesis and Melanoma. *Pigment Cell Res.* 2003, Vol. 16, 5, pp. 548-552.

82. **Chen, Y. M. e Chavin, W.** Tyrosinase activity in a highly pigmented human melanoma and in negro skin. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1974, Vol. 145, 2, pp. 695-698.
83. **Jungheim, L. N. e Shepherd, T. A.** Design of Antitumor Prodrugs: Substrates for Antibody Targeted Enzymes. *Chem Rev.* 1994, Vol. 94, 6, pp. 1553-1566.
84. **Jawaid, S., et al.** Tyrosinase activated melanoma prodrugs. *Anticancer Agents Med Chem.* 2009, Vol. 9, 7, pp. 717-727.
85. **Niculescu-Duvaz, I., et al.** Gene-directed enzyme prodrug therapy. *Bioconjug Chem.* 1998, Vol. 9, 1, pp. 4-22.
86. **Springer, C. J., et al.** Comparison of half-lives and cytotoxicity of N-chloroethyl-4-amino and N-mesyloxyethyl-benzoyl compounds, products of prodrugs in antibody-directed enzyme prodrug therapy (ADEPT). *Anticancer Drug Des.* 1991, Vol. 6, 5, pp. 467-479.
87. **Rainov, N. G., et al.** New prodrug activation gene therapy for cancer using cytochrome P450 4B1 and 2-aminoanthracene/4-ipomeanol. *Hum Gene Ther.* 1998, Vol. 9, 9, pp. 1261-1273.
88. **Jordan, A. M., et al.** Melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT): development of a targeted treatment for malignant melanoma. *Bioorg Med Chem.* 1999, Vol. 7, 9, pp. 1775-1780.
89. **Knaggs, S., et al.** New prodrugs derived from 6-aminodopamine and 4-aminophenol as candidates for melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT). *Org Biomol Chem.* 2005, Vol. 3, 21, pp. 4002-4010.
90. **Jordan, A. M., et al.** Melanocyte-Directed enzyme prodrug therapy (MDEPT): development of second generation prodrugs for targeted treatment of malignant melanoma. *Bioorg Med Chem.* 2001, Vol. 9, 6, pp. 1549-1558.
91. Ultraviolet Filter Combinations: UV - 2A. *Nikon Microscopyu.* [Online] 2010.  
<http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/filtercubes/ultraviolet/uv2a/uv2aindex.html>.

92. **Lowry, O. H., et al.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, Vol. 193, 1, pp. 265-275.
93. **Kang, S. e Choi, J.** Purification and Characterization of Human Tyrosinase. *Korean Biochem J.* 1993, Vol. 26, 7, pp. 632-637.
94. **Santagada, V., et al.** Microwave-enhanced solution coupling of the alpha,alpha-dialkyl amino acid. *Tetrahedron Letters.* 2001, Vol. 42, 31, pp. 5171-5173.
95. **Silva, T. L., et al.** Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia.* 2001, pp. 32-40.
96. **Marder, O. e Albericio, F.** Industrial application of coupling reagents in peptides. *Chimica Oggi.* 2003, pp. 6-11.
97. **Balalaie, S., Mahdidoust, M. and Eshaghi-najafabadi, R.** 2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium Tetrafluoroborate as an Efficient Coupling Reagent for the Amidation and Hydrazation of Carboxylic acids at Room Temperature. *J Iran Chem Soc.* 2007, Vol. 4, 3, pp. 364-369.
98. **Seo, S. Y., Sharma, V. K. e Sharma, N.** Mushroom tyrosinase: recent prospects. *J Agric Food Chem.* 2003, Vol. 51, 10, pp. 1837-2853.
99. **Wang, P., Henning, S. M. e Heber, D.** Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols. *PLoS ONE.* 2009, Vol. 5, 4, p. e10202.
100. **Valeriote, F. e van Putten, L.** Proliferation-dependent cytotoxicity of anticancer agents: a review. *Cancer Res.* 1975, Vol. 35, 10, pp. 2619-2630.
101. **Lowe, S. W., et al.** p53 status and the efficacy of cancer therapy in vivo. *Science.* 1994, Vol. 266, 5186, pp. 807-810.
102. **O'Connor, P. M., et al.** Role of the p53 tumor suppressor gene in cell cycle arrest and radiosensitivity of Burkitt's lymphoma cell lines. *Cancer Res.* 1993, Vol. 53, 20, pp. 4776-4780.
103. **Wilson, W. H., et al.** Relationship of p53, bcl-2, and tumor proliferation to clinical drug resistance in non-Hodgkin's lymphomas. *Blood.* 1997, Vol. 89, 2, pp. 601-609.

104. **Vaux, D. L., Cory, S. e Adams, J. M.** Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 1988, Vol. 335, 6189, pp. 440-442.
105. **Green, D.R., Bissonnette, R. P. e Cotter, T. G.** Apoptosis and cancer. *Important Adv Oncol*. 1994, Vol. 8, 1, pp. 37-52.
106. **Hug, V., et al.** Use of growth-stimulatory hormones to improve the in vitro therapeutic index of doxorubicin for human breast tumors. *Cancer Res*. 1986, Vol. 46, 1, pp. 147-152.
107. **Lee, W. P.** The role of reduced growth rate in the development of drug resistance of HOB1 lymphoma cells to vincristine. *Cancer Lett*. 1993, Vol. 73, 2-3, pp. 105-111.
108. **Endicott, J. A. e Ling, V.** The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Annu Rev Biochem*. 1989, Vol. 58, pp. 137-171.
109. **Clarke, D. A., et al.** Triazenes as inhibitors of mouse sarcoma 180. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1955, Vol. 90, 2, pp. 484-489.
110. **Dell'Angelica, E. C.** Melanosome biogenesis: shedding light on the origin of an obscure organelle. *Trends Cell Biol*. 2003, Vol. 13, 10, pp. 503-506.
111. **Hearing, V. J. e Jiménez, M.** Mammalian tyrosinase--the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem*. 1987, Vol. 19, 12, pp. 1141-1147.
112. **Jordan, A. M., et al.** Synthesis and analysis of urea and carbamate prodrugs as candidates for melanocyte-directed enzyme prodrug therapy (MDEPT). *Bioorg Med Chem*. 2002, Vol. 10, 8, pp. 2625-2633.
113. **Pankovich, J. M. e Jimbow, K.** Tyrosine transport in a human melanoma cell line as a basis for selective transport of cytotoxic analogues. *Biochem J*. 1991, Vol. 280, 3, pp. 721-725.
114. **Carey, T. E., et al.** Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976, Vol. 73, 9, pp. 3278-3282.

115. **Chen, K. G., et al.** Influence of melanosome dynamics on melanoma drug sensitivity. *J Natl Cancer Inst.* 2009, Vol. 101, 18, pp. 1259-1271.



**ANEXOS**



## ANEXOS

### 1. GRÁFICOS DA PERCENTAGEM DE CÉLULAS APOPTÓTICAS/NECRÓTICAS DO ESTUDO DA SENSIBILIDADE DAS LINHAS CELULARES DE MELANOMA AO PF C

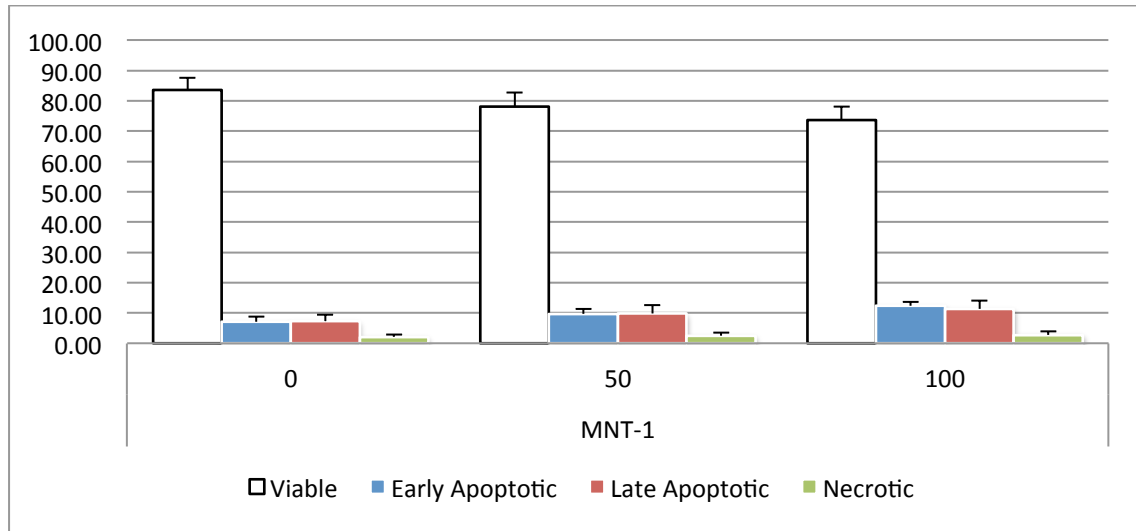


Figura 36 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular MNT-1, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose. Legenda: (0) - MNT-1 em meio de cultura sem adição de PF C e com 0.05 % de DMSO; (50) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 50 µM de PF C e com 0.05 % de DMSO; (100) - MNT-1 em meio de cultura com concentração de 100 µM de PF C e com 0.05 % de DMSO. N=4.

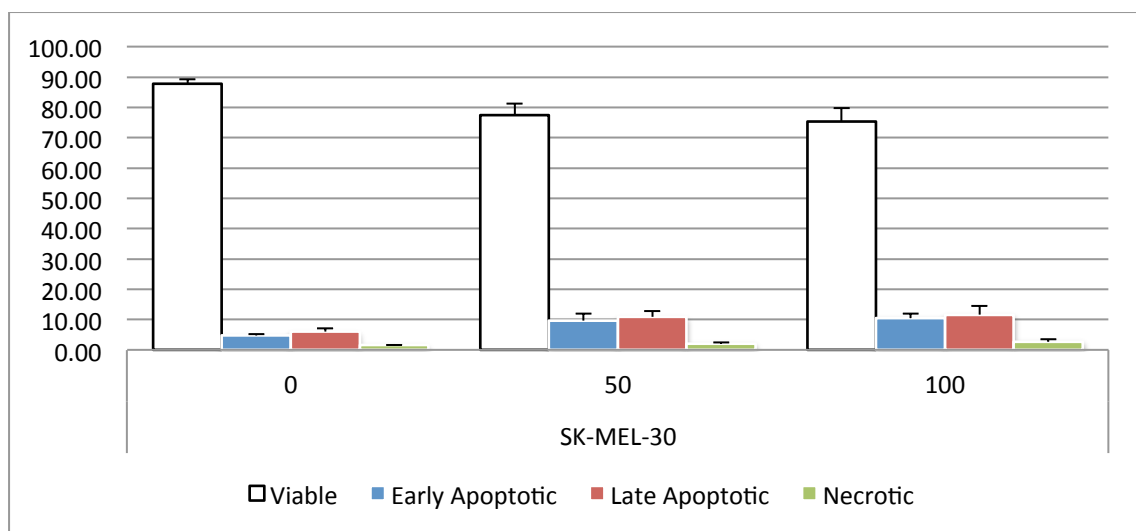
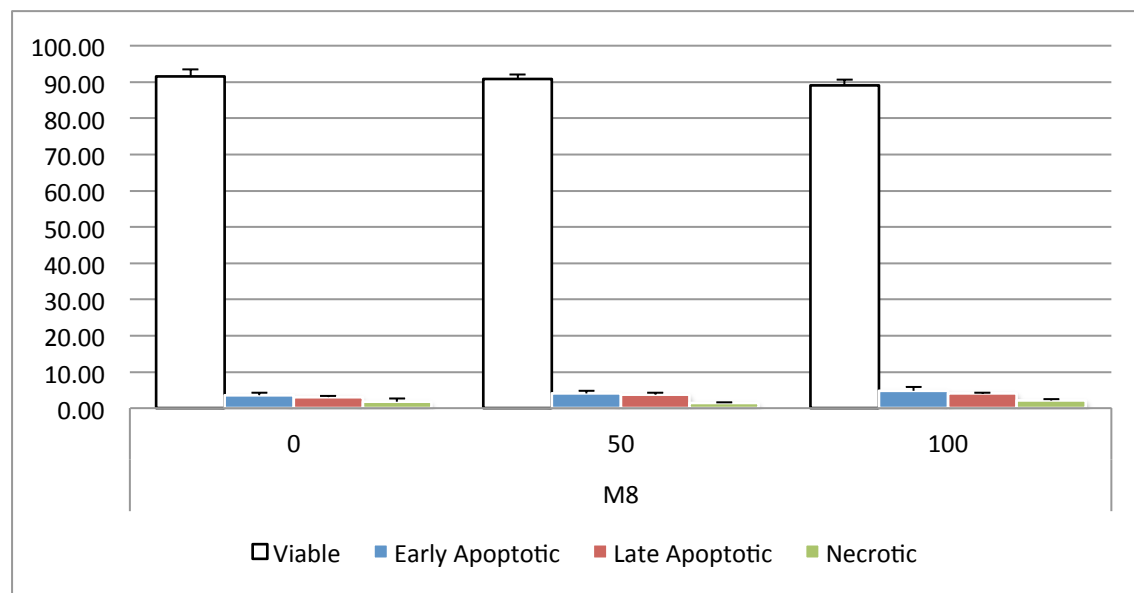


Figura 37 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular SK-MEL-30, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.

**Legenda: (0) - SK-MEL-30 em meio de cultura sem adição de PF C e com 0.05 % de DMSO; (50) - SK-MEL-30 em meio de cultura com concentração de 50  $\mu$ M de PF C e com 0.05 % de DMSO; (100) - SK-MEL-30 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu$ M de PF C e com 0.05 % de DMSO. N=4.**



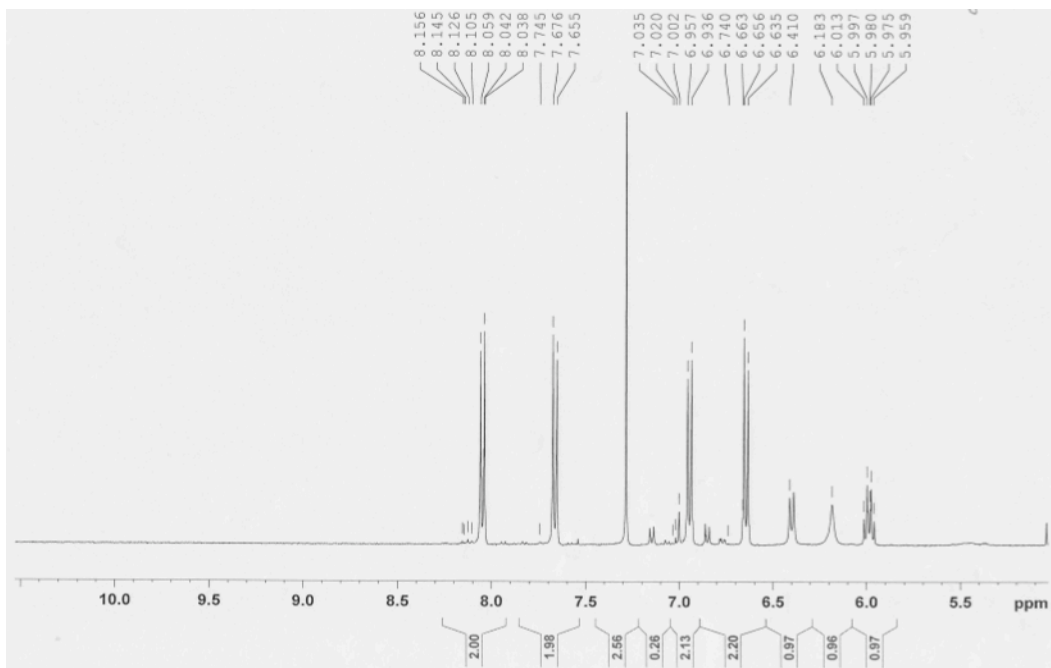
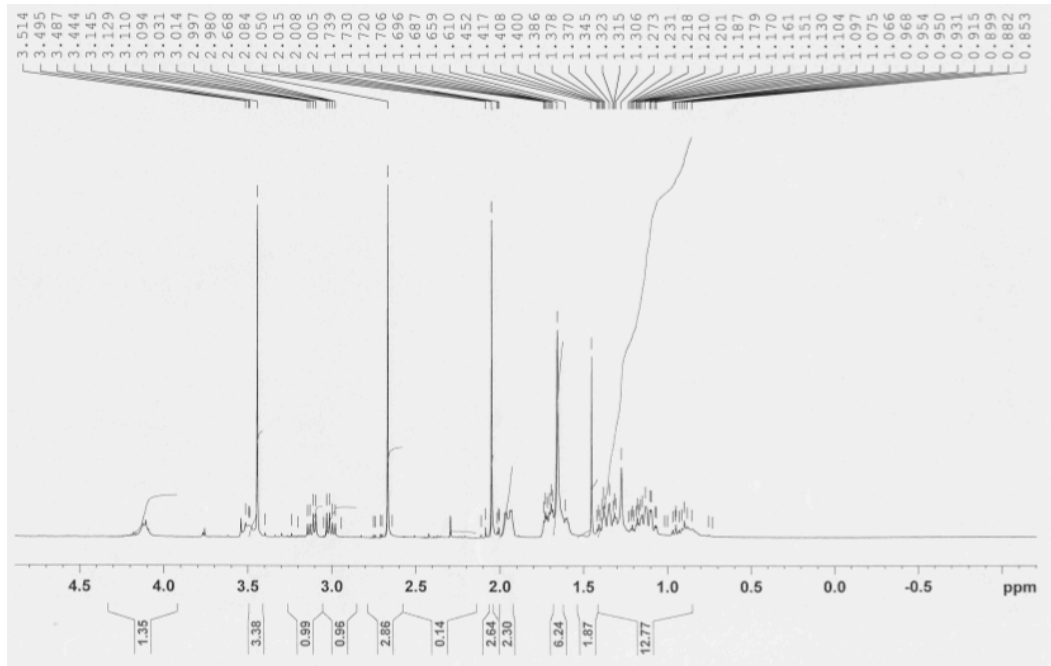
**Figura 38 - Estudo de citotoxicidade do pró-fármaco C (X=CN), dissolvido em DMSO na linha celular M8, pelo método da determinação da percentagem de células em apoptose.**

**Legenda: (0) - M8 em meio de cultura sem adição de PF C e com 0.05 % de DMSO; (50) - M8 em meio de cultura com concentração de 50  $\mu$ M de PF C e com 0.05 % de DMSO; (100) - M8 em meio de cultura com concentração de 100  $\mu$ M de PF C e com 0.05 % de DMSO. N=4.**

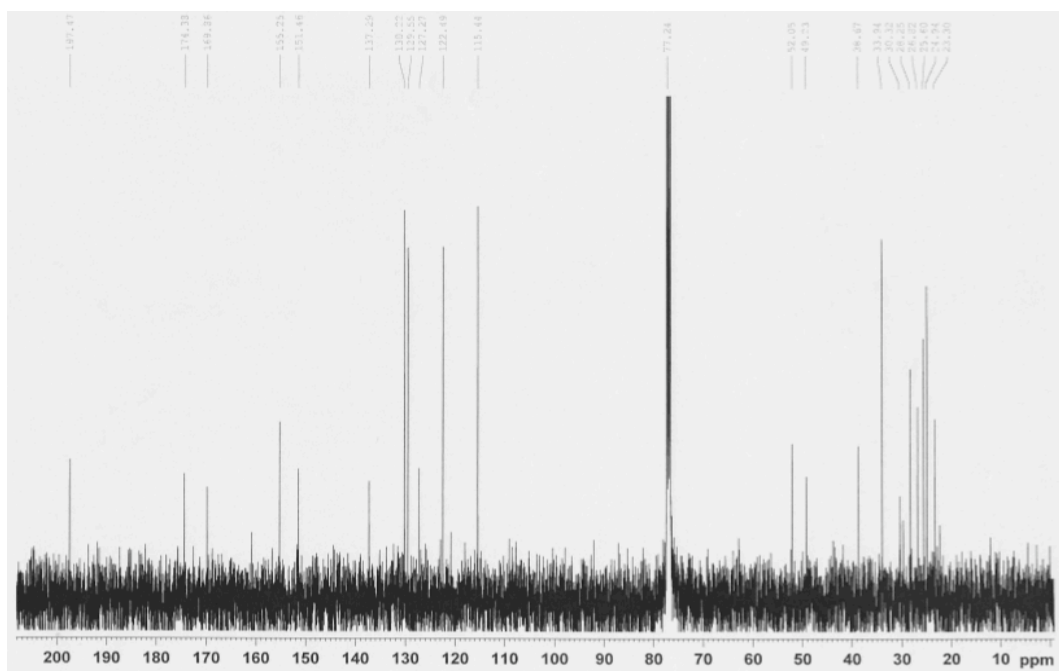
## 2. ESPECTROS DE $^1\text{H}$ -RMN, $^{13}\text{C}$ -RMN E IV

### 2.1. Pró-fármaco A com o substituinte $\text{COCH}_3$

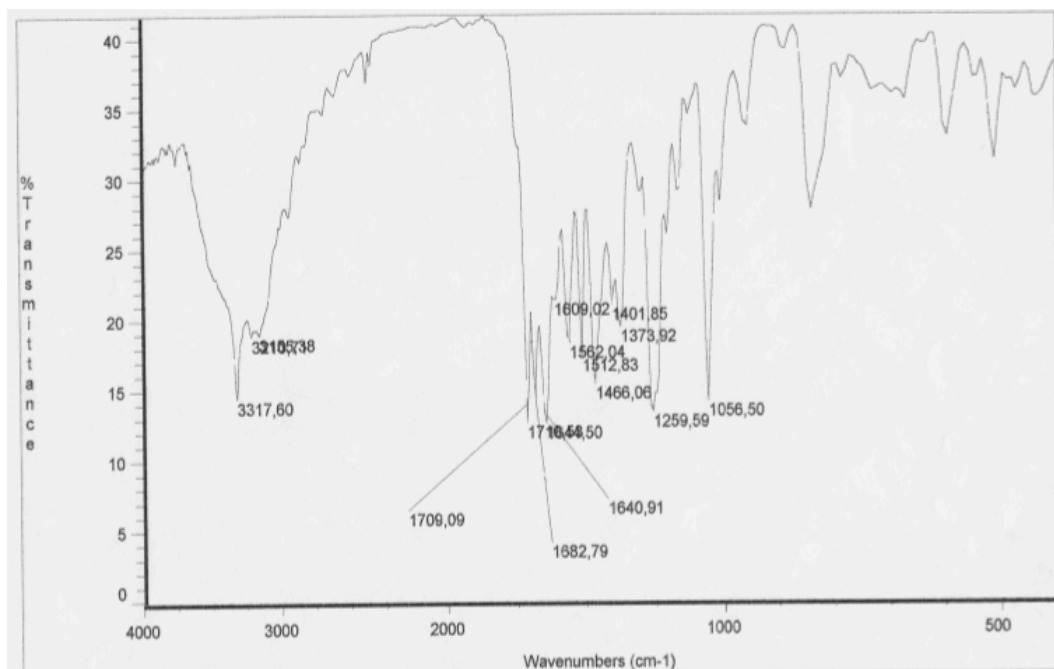
#### $^1\text{H}$ -RMN



### $^{13}\text{C}$ -RMN

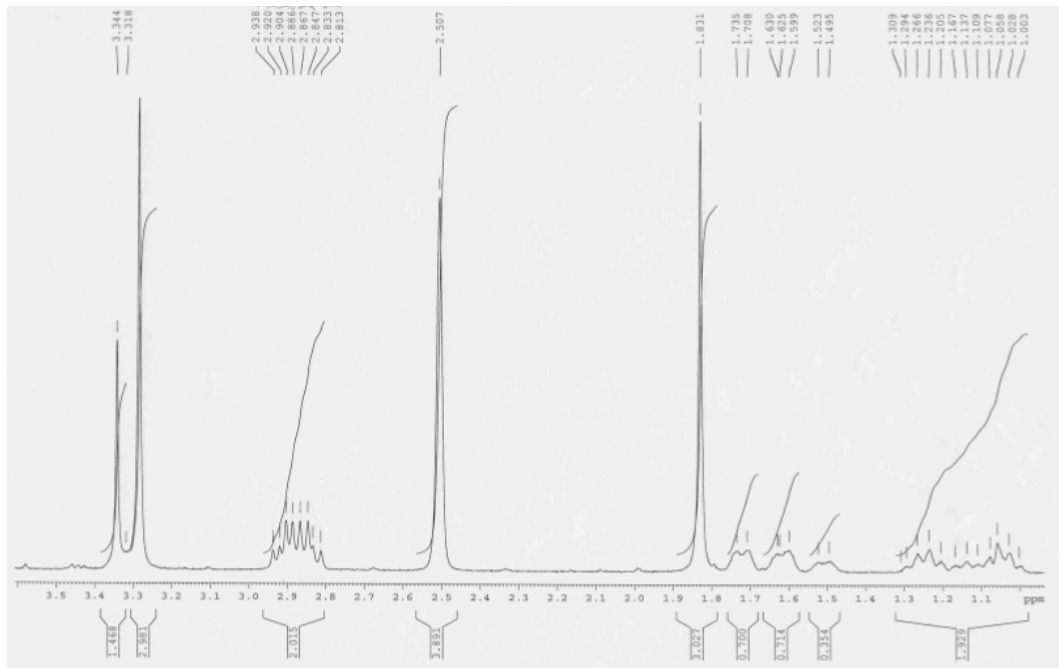
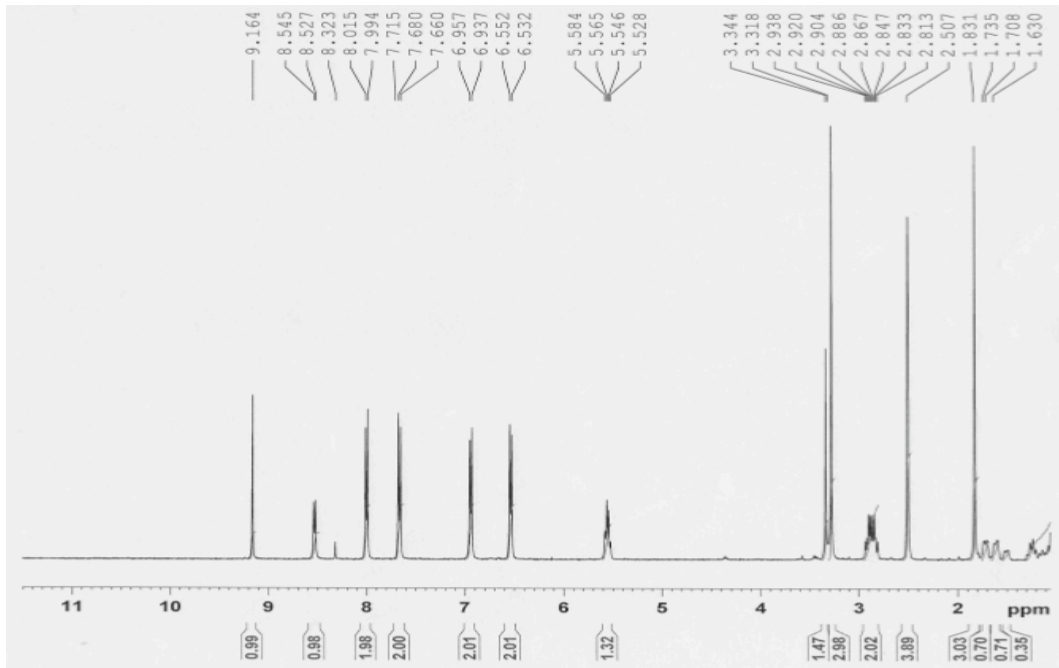


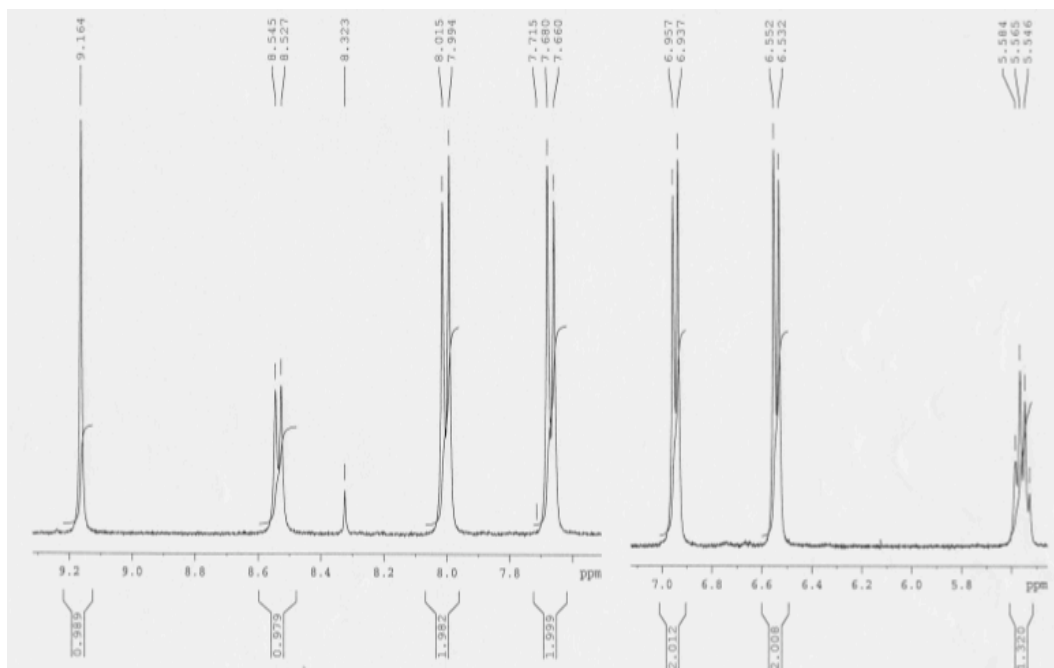
### IV



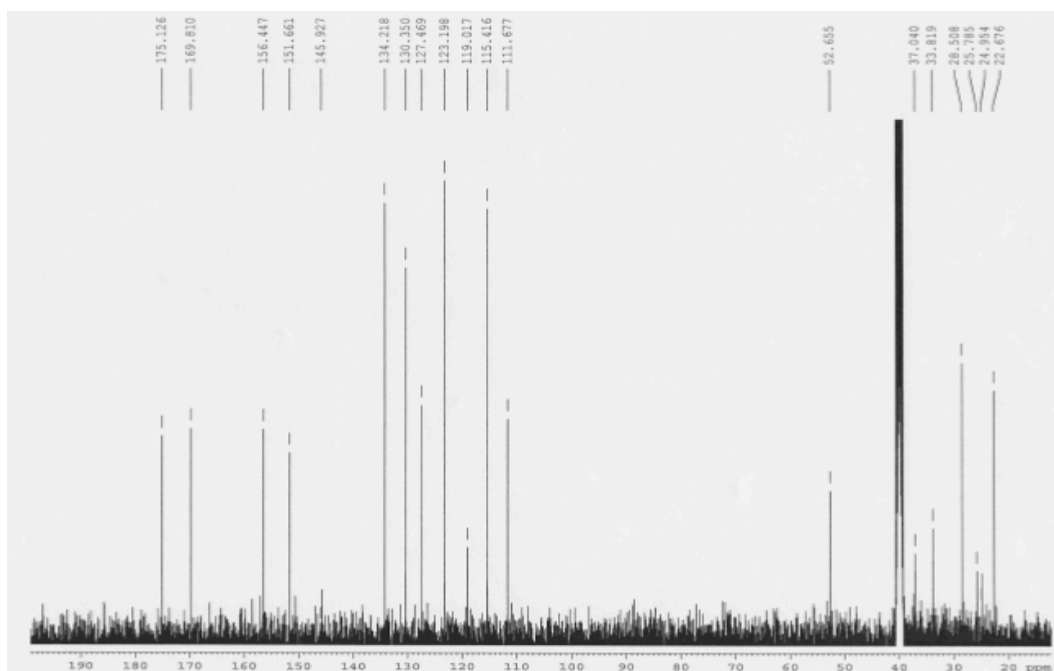
## 2.2. Pró-fármaco C com o substituinte CN

$^1\text{H-RMN}$

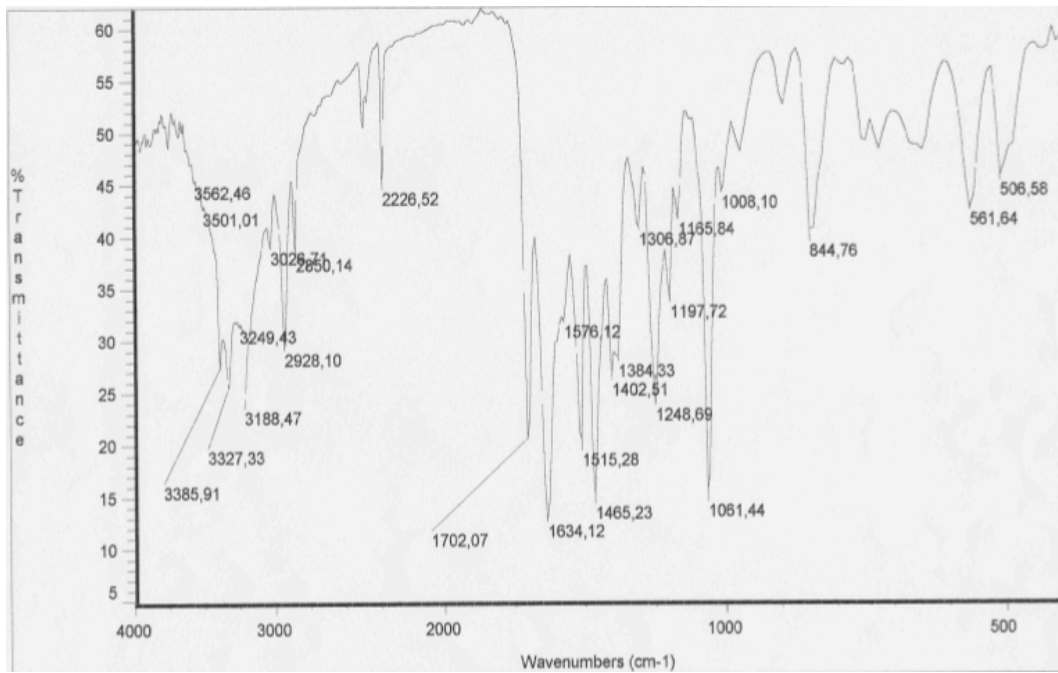




### <sup>13</sup>C-RMN



#### IV



### 3. CROMATOGRAMAS DE HPLC

#### 3.1. Padrões de Pró-fármaco C, MMT-CN e Amina

##### Amina



O tempo de retenção do padrão da amina foi de 2.32 minutos

##### MMT-CN



O tempo de retenção do padrão do MMT do PF em estudo foi de 8.25 minutos

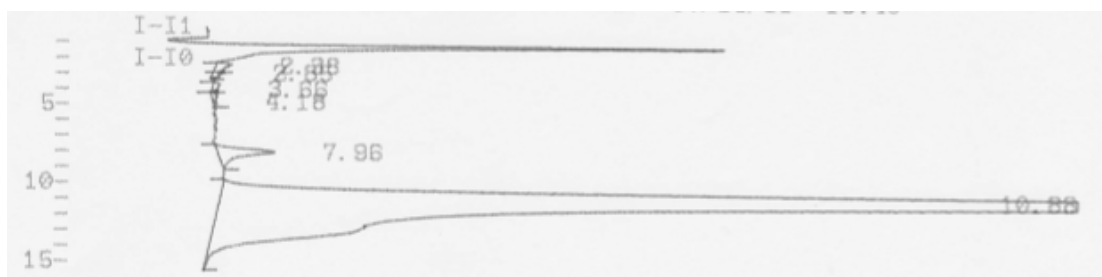
### PF-CN



O tempo de retenção do padrão do PF em estudo foi de 11.88 minutos

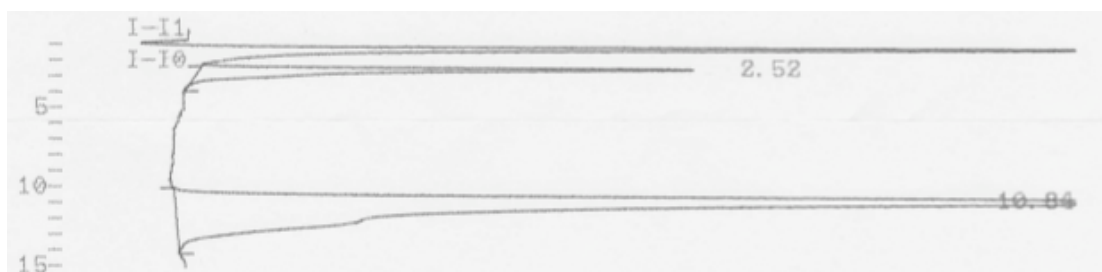
### 3.2. Pró-fármaco C no lisado da linha celular MNT-1

#### Tempo 0h



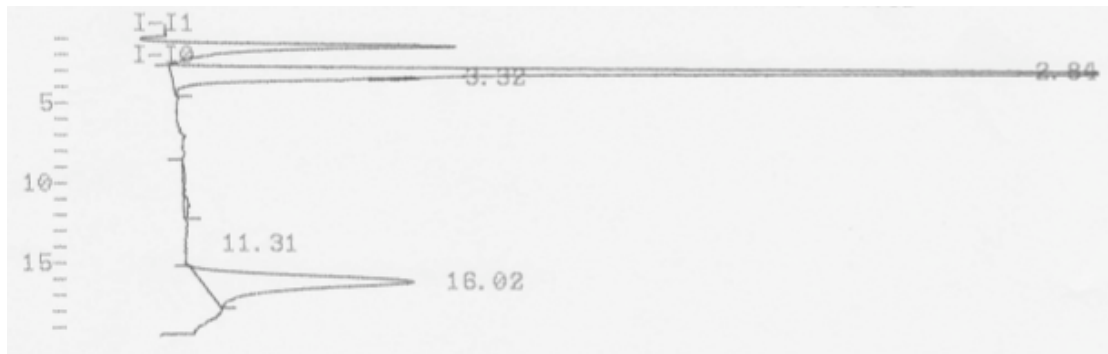
Observação de dois picos: o pico correspondente ao MMT, com tempo de retenção de 7.96 minutos e o pico do PF, com tempo de retenção de 10.88 minutos.

#### Tempo 27h



Observação de dois picos: o pico correspondente à amina, com tempo de retenção de 2.52 minutos e o pico do PF, com tempo de retenção de 10.84 minutos.

### Tempo 118h



Observação de dois picos: o pico correspondente à amina, com tempo de retenção de 2.84 minutos e o pico do PF, com tempo de retenção de 16.02 minutos.

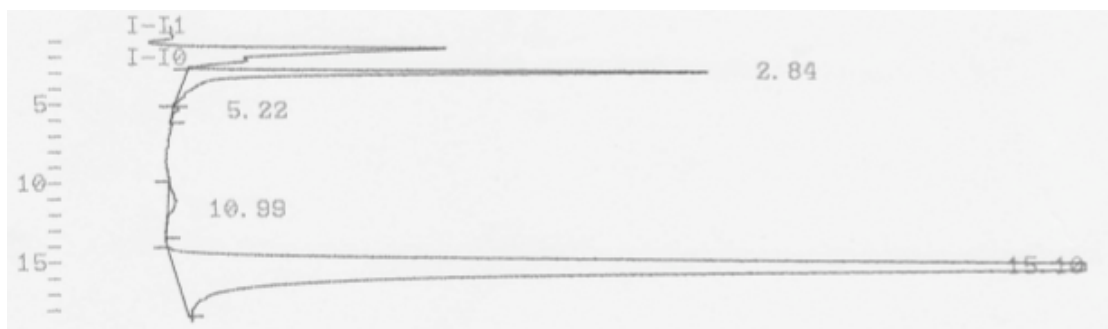
### 3.3. Pró-fármaco C no lisado da linha celular de M8

#### Tempo 0h



Observação de dois picos: o pico correspondente ao MMT, com tempo de retenção de 10.36 minutos e o pico do PF, com tempo de retenção de 14.08 minutos.

#### Tempo 24h



Observação de dois picos: o pico correspondente à amina, com tempo de retenção de 2.84 minutos e o pico do PF, com tempo de retenção de 15.10 minutos.

#### Tempo 101h



Observação de dois picos: o pico correspondente à amina, com tempo de retenção de 2.94 minutos e o pico do PF, com tempo de retenção de 14.24 minutos.