

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal



**RESISTÊNCIA A COMPOSTOS ANTI-TUMOR E SEUS
ALVOS BIOLÓGICOS:**

**ABORDAGENS PÓS-GENÓMICAS EM
*Saccharomyces cerevisiae***

João Ernesto Carvalho Leite

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Ciências

Departamento de Biologia Vegetal



**RESISTÊNCIA A COMPOSTOS ANTI-TUMOR E SEUS
ALVOS BIOLÓGICOS:**

**ABORDAGENS PÓS-GENÓMICAS EM
*Saccharomyces cerevisiae***

João Ernesto Carvalho Leite

Dissertação orientada por: Professora Doutora Marta Martins
Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias
Professor Doutor Rui Malhó
Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2010

“Although nature commences with reason and ends in experience it is necessary for us to do the opposite, that is to commence with experience and from this to proceed to investigate the reason.”

Leonardo da Vinci

Resumo

O presente estudo visou clarificar os mecanismos de acção e alvos biológicos de três novos compostos com potencial anti-tumor (identificados por I.2, I.4 e I.6) utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como sistema modelo. A doxorrubicina, composto amplamente utilizado na terapêutica oncológica, foi também inserido neste estudo e utilizado como referência.

Inicialmente, determinou-se a concentração mínima inibitória para cada um dos compostos. Foi também caracterizado o crescimento e efectuada a determinação do número de células viáveis de levedura durante a exposição a estes compostos. Efectuou-se também uma análise proteómica de forma a comparar os proteomas da levedura na presença destes compostos. Desta análise identificaram-se 17 proteínas com expressão alterada. Destas 17, 14 apresentaram níveis de expressão iguais ou superiores a 1,5 vezes o nível de expressão para a mesma proteína, obtida para a cultura controlo (levedura na ausência de composto).

Após a análise e tratamento dos dados verificou-se que a maioria das proteínas identificadas se encontra envolvida (directa ou indirectamente) no metabolismo energético ou no metabolismo de hidratos de carbono.

Adicionalmente, verificou-se ainda que as proteínas Cpr1p, Fba1p, Gpm1p, Pab1p, Pkg1p, Tdh3p e Thi4p foram as que apresentaram uma maior variação nos seus níveis de expressão, variação essa que foi detectada essencialmente quando a levedura foi cultivada na presença do composto I.6. De todas as proteínas identificadas, a proteína Gmp1p foi a única que revelou uma repressão na sua expressão em todos os ensaios. Foi também no ensaio relativo ao composto I.6 que foi detectado um aumento de expressão da proteína Pab1p. Esta proteína encontra-se associada à formação de grânulos de stress em levedura.

Este estudo permitiu assim identificar potenciais alvos biológicos destes compostos. Devido ao seu potencial anti-tumor, estes compostos poderão ser considerados potenciais candidatos para inserção futura na terapêutica oncológica, podendo constituir uma importante alternativa na área clínica.

Palavras-Chave

Saccharomyces cerevisiae; compostos anti-tumor; concentração mínima inibitória; caracterização de crescimento; proteómica, proteínas; alvos biológicos

Abstract

The goal of this study was to clarify the mechanism of action and potential biological targets of three new compounds (identified as I.2, I.4 e I.6) with predicted anti-tumor activity. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used as the model system. Doxorubicin, a compound largely used in the cancer therapy was used as a reference.

The minimum inhibitory concentration was determined for each compound. Growth was characterized and the number of yeast viable cells grown in the presence of these compounds determined. A proteomic analysis was conducted to compare the yeast proteomes in the presence of the compounds. It was possible to identify 17 proteins with altered expression. From these, 14 showed an increase of 1,5 times equal or higher the expression levels of these proteins when compared with the control (yeast in the absence of compound).

After the data analysis and processing it was possible to demonstrate that the majority of the proteins are (directly or indirectly) involved in the energetic metabolism and in the carbohydrates metabolism.

Additionally, it was possible to demonstrate that the proteins Cpr1p, Fba1p, Gpm1p, Pab1p, Pkg1p, Tdh3p and Thi4p showed the highest expression variation. This difference was more evident when the yeast was cultured in the presence of compound I.6. From all the proteins, Gmp1p was the only that showed a repression of the expression in all the assays. It was also on the assay with this compound that was detected an increase in the expression of the protein Pab1p. This protein is related with the formation of stress granules.

With this study it was possible to identify potential biological targets of these compounds. Due to their predicted anti-tumor activity, these compounds can be considered potential candidates in the therapy of cancer. Additionally, they can be considered as a therapeutic alternative in the clinical setting.

Keywords

Saccharomyces cerevisiae; compounds with anti-tumor activity; minimum inhibitory concentration; characterization of growth; proteomics; proteins; biological targets

Agradecimentos

Embora uma dissertação seja, na sua essência, um trabalho individual, existem contributos que merecem ser destacados, quer pela influência directa no processo científico quer por qualquer outro motivo que tenha servido para me ajudar a concretizar este objectivo.

Assim, agradeço à Professora Doutora Marta Martins, orientadora externa da dissertação, por se ter lembrado de mim para fazer parte deste projecto, por me orientar à luz dos seus doutos conselhos, pela sua motivação, pela sua confiança e sobretudo pela sua amizade.

Ao Professor Doutor Rui Malhó, orientador interno da dissertação, agradeço a simpatia e a pronta disponibilidade demonstrada sempre que solicitado.

À Professora Doutora Alexandra Fernandes agradeço o apoio prestado ao longo de todo o trabalho, a atenção com que foi seguindo o meu progresso, a liberdade de acção que me concedeu e que me fez crescer, a energia contagiante que põe em cada nova ideia que vai surgindo.

Ao GRANDE Mestre Luís Raposo um muito obrigado por tudo (acho que não é preciso enumerar)!

À Ana agradeço o auxílio constante em todo o processo de investigação, os seus pré-inóculos maravilhosamente executados (normalmente ao domingo à tarde naqueles 5-7 minutos que compreendem o período oficioso de lusco-fusco), a sua disponibilidade para as bifanas e para os *Burger Ranch's*.

Às restantes colegas de laboratório, Kelly, Leonor, Helena e Vanda, um obrigado.

À D. Adriana, à D. Inês e à D. Isabel um muito obrigado pela disponibilidade, pela simpatia e especialmente pela amizade construída ao longo deste ano.

Aos meus pais e à minha irmã, obrigado por serem como são!

À Paula agradeço tudo!!!

A todos o meu muito obrigado!

Abreviaturas

μ_c	Taxa específica de crescimento
2-DE	Electroforese bi-dimensional
ADN	Ácido desoxirribonucleico (do inglês: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
ARN	<i>Ribonucleic Acid</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CHAPS	<i>3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1 propanesulfonate</i>
CMI	Concentração mínima inibitória
dH ₂ O	Água destilada estéril
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidade óptica
DOC	Desoxicolato de sódio
DTT	Ditiotreitol
Dx	Doxorrubicina
<i>g</i>	Tempo de duplicação
IEF	Focagem isoeléctrica
FTIRC	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
<i>M</i>	Biomassa máxima
MALDI-MS	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization - mass spectrometry</i>
mARN	Ácido ribonucleico <i>mensageiro</i> (do inglês: <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MMB	Meio mínimo basal
OMS	Organização Mundial de Saúde
PMF	<i>Peptide mass fingerprinting</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulfonyl fluoride</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
TCA	Ácido tricloroacético
UFC	Unidades formadoras de colónias
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>Yeast peptone dextrose</i>

Índice

Resumo	i
Palavras-Chave	i
Abstract	ii
Keywords	ii
Agradecimentos	iii
Abreviaturas	iv
Índice	v
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	viii
1. Introdução teórica.....	1
1.1. Cancro – Conceitos gerais.....	1
1.2. Compostos anti-tumor.....	1
1.2.1. Doxorrubicina (Dx)	2
1.2.2. Novos compostos com actividade anti-tumoral	2
1.3. A levedura como modelo biológico.....	3
1.4. Proteómica	4
1.5. Objectivos da dissertação.....	5
2. Metodologia	7
2.1. Microrganismo – Manutenção e condições de crescimento	7
2.2. Condições gerais de crescimento	7
2.3. Preparação do pré-inóculo	7
2.4. Compostos em estudo	8
2.5. Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI).....	9
2.6. Caracterização de crescimento.....	10
2.6.1. Efeito de diferentes concentrações de dimetil sulfóxido (DMSO) no crescimento de <i>S. cerevisiae</i>	10
2.6.2. Crescimento na presença dos compostos com actividade anti-tumor	10
2.7. Cálculo da taxa específica de crescimento (μ_c), tempo de duplicação (g) e biomassa máxima (M).....	11
2.7.1. Cálculo da taxa específica de crescimento (μ_c).....	11
2.7.2. Tempo de duplicação (g).....	11
2.7.3. Biomassa máxima (M).....	11
2.8. Viabilidade celular.....	11
2.9. Proteómica	12
2.9.1. Recolha celular, lise e obtenção da fracção proteica	12
2.9.2. Precipitação e concentração do extracto proteico.....	12

2.9.3.	Quantificação da proteína presente no extracto.....	13
2.10.	Preparação para electroforese bi-dimensional (2-DE)	14
2.11.	1ª Dimensão – IEF.....	14
2.12.	2ª Dimensão – SDS-PAGE	15
2.13.	Aquisição de imagens.....	16
2.14.	Análise das imagens.....	16
2.15.	Identificação de proteínas	16
3.	Análise e discussão de resultados.....	17
3.1.	Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	17
3.2.	Estudo prévio – Comportamento de <i>S. cerevisiae</i> na presença de diferentes concentrações de dimetil sulfóxido (DMSO)	18
3.3.	Caracterização de crescimento e viabilidade celular	19
3.4.	Efeitos dos compostos em estudo no proteoma da levedura	24
3.4.1.	Análise dos efeitos do composto Dx no proteoma da levedura <i>S. cerevisiae</i>	29
3.4.2.	Análise dos efeitos do composto I.2 no proteoma da levedura <i>S. cerevisiae</i>	30
3.4.3.	Análise dos efeitos do composto I.4 no proteoma da levedura <i>S. cerevisiae</i>	31
3.4.4.	Análise dos efeitos do composto I.6 no proteoma da levedura <i>S. Cerevisiae</i>	31
4.	Conclusão e perspectivas futuras	34
5.	Referências bibliográficas.....	37

Índice de Figuras

Figura 1. Imagem de <i>S. cerevisiae</i> BY4741 em gemulação. (Captada através de microscópio óptico Olympus BX51, Tóquio, Japão).....	7
Figura 2. Curva de crescimento na presença de diferentes concentrações de DMSO (controlo (◆), 0,03% (■), 0,07% (▲), 0,3% (×), 0,7% (*), 1% (●), 3% (+)). Os valores indicados no gráfico são representativos de, pelo menos, três ensaios independentes.....	18
Figura 3. Curva de crescimento (▲) e curva de viabilidade celular (■) no ensaio controlo. No gráfico estão representados os valores de <i>M</i> (5,030), de UFC/mL máximo (28345000) e de UFC/mL final (27490000). Os valores indicados no gráfico são representativos de, pelo menos, três ensaios independentes.....	19
Figura 4. Curva de crescimento (▲) e curva de viabilidade celular (■) na presença do composto Dx a uma concentração de 0,0138 µM. No gráfico estão representados os valores de <i>M</i> (0,640), de UFC/mL máximo (1870000) e de UFC/mL final (760000). Os valores indicados no gráfico são representativos de, pelo menos, três crescimentos independentes.....	20
Figura 5. Curva de crescimento (▲) e curva de viabilidade celular (■) na presença do composto I.2 a uma concentração de 0,00875 µM. No gráfico estão representados os valores de <i>M</i> (0,535), de UFC/mL máximo (2040000) e de UFC/mL final (812500). Os valores indicados no gráfico são representativos de, pelo menos, três ensaios independentes.....	21
Figura 6. Curva de crescimento (▲) e curva de viabilidade celular (■) na presença do composto I.4 a uma concentração de 1 µM. No gráfico estão representados os valores de <i>M</i> (0,426), de UFC/mL máximo (1765000) e de UFC/mL final (1257500). Os valores indicados no gráfico são representativos de, pelo menos, três ensaios independentes.....	22
Figura 7. Curva de crescimento (▲) e curva de viabilidade celular (■) na presença do composto I.6 a uma concentração de 0,4575 µM. No gráfico estão representados os valores de <i>M</i> (3,130), de UFC/mL máximo (12675000) e de UFC/mL final (12675000). Os valores indicados no gráfico são representativos de, pelo menos, três crescimentos independentes.....	23
Figura 8. Conjunto dos géis 2-DE representativos do proteoma de <i>S. cerevisiae</i> quando exposta a cada um dos compostos: (A) Controlo; (B) Dx; (C) I.2; (D) I.4; (E) I.6. É possível verificar algumas diferenças nos géis resultantes da exposição aos diferentes compostos. Essas diferenças ocorrem sobretudo nos pontos correspondentes a isoformas proteicas de baixo peso molecular, verificando-se também diferenças de expressão em alguns dos pontos que apresentam maior expressão no gel A.....	24
Figura 9. Mapa de proteínas baseado na 2-DE da condição controlo. As proteínas indicadas foram identificadas através de PMF por MALDI-FTIRC-MS.....	25

Índice de Tabelas

Tabela 1. Compostos em estudo. Os compostos I.2, I.4 e I.6 foram sintetizados no Instituto Superior Técnico (IST). O composto Doxorubicina foi obtido comercialmente de TRC - Toronto Research Chemicals (Canadá).....	8
Tabela 2. Concentração dos compostos no 3º poço da microplaca para determinação da CMI.	9
Tabela 3. Concentrações utilizadas para caracterização do crescimento de <i>S. cerevisiae</i> em presença dos compostos em estudo.....	10
Tabela 4. Tabela representativa do ensaio de quantificação de proteínas pelo método de Lowry modificado.....	13
Tabela 5. Programa utilizado na focagem isoelétrica.....	15
Tabela 6. CMI para cada um dos compostos em estudo.	17
Tabela 7. Concentrações dos compostos utilizadas para a caracterização de crescimento e ensaios de viabilidade.	18
Tabela 8. Valores de μ_c , g e M relativos ao crescimento da levedura na presença de diferentes concentrações de DMSO.....	19
Tabela 9. Valores de μ_c , g , M , UFC/mL (<i>máx</i>) e UFC/mL (<i>24h</i>) relativos ao crescimento na presença dos compostos em estudo.....	23
Tabela 10. Proteínas identificadas por PMF/MALDI-FTIRC-MS. Estão incluídas todas as proteínas identificadas e indicados os valores de pI/Mw (experimental e teórico), o <i>score</i> de MASCOT e o erro (ppm).	26
Tabela 11. Variação da expressão das proteínas identificadas em células de <i>S. cerevisiae</i> expostas aos compostos em estudo. A descrição das proteínas foi obtida da base de dados SGD (<i>Saccharomyces Genome Database</i>) em: http://www.yeastgenome.org	27
Tabela 12. Agrupamento por função biológica das proteínas identificadas. Este agrupamento foi realizado recorrendo ao <i>software SGD Gene Ontology Slim Mapper</i> disponível na base de dados SGD em www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl	27
Tabela 13. Agrupamento por processo biológico das proteínas identificadas. Este agrupamento foi realizado com base no <i>software SGD Gene Ontology Slim Mapper</i> disponível na base de dados SGD em www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl	28
Tabela 14. Agrupamento por localização sub-celular das proteínas identificadas. Este agrupamento foi realizado recorrendo ao programa <i>SGD Gene Ontology Slim Mapper</i> disponível na base de dados SGD em www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl	29

1. Introdução teórica

1.1. Cancro - Conceitos gerais

O crescimento celular é um processo altamente regulado. O início da divisão celular ocorre quando um determinado estímulo surge a partir de factores de crescimento que interactivam com receptores específicos presentes na superfície da célula. Depois da ligação entre os factores de crescimento e os respectivos receptores, a informação é transportada desde a superfície celular até ao núcleo através de uma cascata de reacções bioquímicas denominada transdução de sinal. Uma vez chegado o sinal ao núcleo, os factores de transcrição ligam-se ao ácido desoxirribonucleico (ADN) e inicia-se a produção de proteínas envolvidas no crescimento e divisão celular. O ADN contém a informação genética que codifica para proteínas envolvidas em todas as vias do metabolismo celular. Se um gene se encontra mutado, a proteína para a qual esse gene codifica poderá também ser afectada. Assim, algumas das mutações no ADN podem resultar numa expressão alterada da quantidade de proteína, onde mais ou menos proteína é produzida; ou em formas alteradas desta, sendo que a proteína resultante pode não desempenhar a sua função original. Mutações nos genes que codificam para proteínas que regulam o crescimento celular, tais como: oncogenes, genes supressores de tumores e genes de reparação de ADN, podem resultar em alterações no normal crescimento celular e desta forma conduzir ao aparecimento de tumores [1].

O termo *cancro* neste contexto é de um modo geral utilizado para definir tumores malignos. A sua identificação é possível quando se verifica um crescimento anormal de células, crescimento esse causado por alterações na expressão de múltiplos genes, levando a uma desregulação dos ciclos normais de crescimento celular e diferenciação. Esta desregulação resulta num desequilíbrio entre replicação e morte celular, favorecendo deste modo a proliferação das células tumorais. As características que diferenciam um tumor maligno de um tumor benigno são normalmente a sua capacidade de invadir localmente, de se “deslocar” até aos nódulos linfáticos e de formar metástases em órgãos distantes do tumor inicial [2].

1.2. Compostos anti-tumor

Nos últimos anos, o número de pessoas às quais foi diagnosticada alguma forma de cancro tem aumentado significativamente, sendo que nos dias de hoje e segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), esta é a maior causa de morte em todo o mundo [3]. Este aumento do número de casos de cancro e a relativa baixa taxa de sucesso dos tratamentos com os fármacos existentes no mercado tem conduzido a uma incessante procura de novos compostos que apresentem uma maior eficácia dos que actualmente se encontram disponíveis. No entanto, um dos principais objectivos da investigação na área dos compostos anti-tumor reside na descoberta de novos

compostos que, ao contrário dos existentes, actuem selectivamente sobre as células tumorais, não afectando as células saudáveis, eliminando-as ou inibindo o seu crescimento. Estabelecer as diferenças moleculares que existem entre células saudáveis e células tumorais é portanto um dos parâmetros mais importantes para alcançar este objectivo [4].

1.2.1. Doxorubicina (Dx)

A Doxorubicina (Dx) é um composto que foi inicialmente isolado a partir da bactéria *Streptomyces peucetius var. caesius* [5] e que tem sido amplamente utilizado na terapêutica oncológica. Este composto anti-tumoral é considerado altamente eficaz no combate a um grande número de tumores, incluindo o cancro da mama e o linfoma de Hodgkins [5, 6]. Apesar da intensa utilização na prática clínica, os mecanismos responsáveis pelos seus efeitos anti-proliferativos e citotóxicos ainda não se encontram totalmente esclarecidos [7, 8]. Existem, no entanto, alguns mecanismos propostos que incluem como mecanismos de acção: a intercalação nas moléculas de ADN [9, 10]; a danificação das moléculas de ADN através da inibição da topoisomerase II [9, 11]; a ligação ao ADN e sua alquilação [12]; a ligação cruzada (*cross-linking*) ao ADN [13, 14]; a interferência no desenrolamento e separação das cadeias de ADN e na actividade da helicase [15]; a formação de radicais livres [16], com os consequentes danos no ADN e/ou peroxidação lipídica com efeitos directos na membrana celular [17, 18]. Apesar de muito utilizada, a Dx apresenta uma elevada cardiotoxicidade pelo que existem algumas limitações, quer em relação aos doentes aos quais este composto se pode administrar [19, 20] quer em relação às dosagens terapêuticas utilizadas [6]. Nos pacientes aos quais a Dx é administrada existe a necessidade de um acompanhamento constante do seu estado cardíaco através de electrocardiograma (ECG) [21].

1.2.2. Novos compostos com actividade anti-tumoral

A necessidade de desenvolvimento de novos compostos anti-tumorais é evidente e de grande importância para o futuro. Hoje em dia, a quimioterapia depende de um grupo relativamente pequeno de compostos que, na sua maioria, está em uso há mais de duas décadas. Com o vasto conhecimento que tem vindo a ser acumulado nas áreas da química e da biologia celular e molecular nos últimos anos, o desenvolvimento de novos compostos com potencial anti-tumor tornou-se um objectivo palpável [22].

A descoberta da actividade anti-tumor da cisplatina representa um dos mais significativos acontecimentos na quimioterapia do cancro no século XX [23]. A cisplatina, e a droga de segunda geração carboplatina, são altamente eficazes no tratamento de uma variedade de tumores. Contudo, o tratamento é limitado por efeitos secundários graves como são os casos da nefrotoxicidade [24] e da neurotoxicidade [25].

Estas limitações estimularam uma procura intensiva por outros compostos de complexos metálicos com actividade anti-tumor. Os complexos metálicos podem sofrer reacções redox e

substituição de ligandos, o que lhes permite participar numa variedade de reacções biológicas e interagir com diferentes substratos celulares [26-29]. Deste modo, complexos de metais essenciais como o cobre (I.6) ou o zinco (I.2 e I.4) [30] representam um grande desafio.

O cobre está presente em todos os organismos vivos e é um elemento essencial para a química redox, crescimento e desenvolvimento celular, desempenhando um papel fundamental na função de várias enzimas e proteínas envolvidas no metabolismo energético, na respiração e na síntese de ADN. Por outro lado, um excesso de cobre parece ser um co-factor para a angiogénese tendo sido encontrados elevados níveis de cobre num grande número de cancros humanos [31]. A utilização de agentes quelantes de cobre pode levar a uma redução do excesso de cobre prevenindo assim a angiogénese [32]. Os agentes quelantes de cobre podem ser combinados com sais de cobre, originando misturas denominadas de compostos orgânicos de cobre, capazes de remover o excesso de cobre e, ao mesmo tempo, promover a inibição do proteossoma seguida de apoptose [31, 33]. Pequenos complexos de cobre podem também ser utilizados directamente como compostos metálicos anti-tumorais [34], à luz do que acontece com a cisplatina, adoptando provavelmente diferentes mecanismos citotóxicos [32].

Tal como o cobre, o zinco é vital para o crescimento e desenvolvimento das células desempenhando um papel importante no metabolismo celular funcionando como protector celular e suprimindo as vias apoptóticas [35]. Devido a este papel essencial nas células, grupos de investigadores estão a sintetizar novos complexos de zinco de forma a estudar as suas propriedades farmacológicas e a testar as suas reais capacidades como agentes anti-tumorais [30].

No entanto, e apesar de descobertas prometedoras, todos os anos, centenas de compostos com potencial terapêutico não chegam ao fim do seu desenvolvimento por não se conhecerem completamente os seus mecanismos de acção. O facto de existirem fármacos com mecanismos de acção conhecidos que afectam organismos modelo como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* através dos seus alvos terapêuticos reflecte a importância deste sistema para a identificação dos alvos biológicos de novos compostos [4].

1.3. A levedura como modelo biológico

Os estudos de Louis Pasteur, sobre a natureza da fermentação e de Eduard Buchner, sobre o metabolismo celular, foram pioneiros no que diz respeito à investigação científica envolvendo a levedura *S. cerevisiae*. Este pequeno organismo eucariota unicelular, utilizado como ferramenta biotecnológica desde há muitos séculos, revelou-se assim um valioso modelo no âmbito da biologia celular. Durante o último século, tem sido intensivamente estudado com o objectivo de melhor compreender a sua biologia ao nível celular e molecular. Desta forma, e com o aumento do nosso conhecimento, a levedura depressa se tornou no sistema modelo ideal para efectuar estudos bioquímicos e de biologia celular com posterior aplicabilidade em eucariotas superiores, como mamíferos e plantas [36-38]. De entre todos os organismos modelo eucariotas, a levedura *S.*

cerevisiae combina as vantagens de ser um organismo unicelular que, ao contrário de outros modelos mais complexos, pode ser cultivada em meios de crescimento previamente definidos dando ao investigador um total controlo dos parâmetros. Outras das vantagens são o seu rápido crescimento e fácil manipulação [39]. São estas propriedades, juntamente com a possibilidade de aplicação de técnicas de genética clássica e de novas abordagens genómicas, que fazem com que este microrganismo esteja na linha da frente dos avanços técnicos nesta área de investigação [39, 40]. Devido à sua reconhecida importância, a levedura *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariota a ter o seu genoma sequenciado, fruto de uma acção concertada de laboratórios de todo o mundo [38]. O genoma completo de *S. cerevisiae* é conhecido desde 1996 sendo constituído por cerca de 13 milhões de pares de bases contendo 6,275 genes, dos quais mais de 60% têm uma função conhecida [41, 42]. Extraordinariamente, análises genómicas comparativas demonstraram que aproximadamente 40% dos seus genes partilham sequências de aminoácidos com, pelo menos, uma proteína humana conhecida ou predictível [43]. Além disso, cerca de 50% dos genes humanos com um reconhecido envolvimento em doenças possuem ortólogos em *S. cerevisiae* [4]. Devido a esta notável homologia entre os genes de *S. cerevisiae* e o genoma humano, e devido às vias bioquímicas fundamentais altamente conservadas, os estudos em levedura têm sido essenciais para a evolução no conhecimento de processos celulares fundamentais, tais como a tradução e degradação do mRNA [44, 45]; os sistemas de reparação do ADN [46]; e o próprio ciclo celular [47].

1.4. Proteómica

O termo “proteoma” deriva da fusão das palavras proteína e genoma, tendo sido utilizado pela primeira vez por Mark Wilkins em 1994 [48]. O proteoma representa assim a totalidade das proteínas codificadas pelo genoma de um organismo. O genoma de um organismo é considerado estático na medida em que permanece inalterável em todas as células ao longo do tempo [49]. Em oposição, o proteoma é considerado dinâmico, isto é, difere de tipo de célula para tipo de célula ao longo dos diferentes estados de actividade ou dos diferentes estádios de desenvolvimento [49]. Uma alteração no proteoma de uma célula ou organismo não é mais do que um reflexo da actividade diferenciada de um determinado gene [49]. Tirando partido da informação resultante da execução de vários projectos de sequenciação de genomas, a proteómica surge assim com a necessidade acrescida de compreender e clarificar as funções das proteínas expressas pelo genoma. Podendo desta forma ser definida como o estudo das propriedades das proteínas englobando os seus níveis de expressão, as modificações pós-traducionais e as interacções com outras moléculas, permitindo uma visão global dos processos celulares ao nível da expressão proteica. A actividade mais frequentemente associada à proteómica é o fraccionamento e visualização de um grande número de proteínas celulares em géis de poliacrilamida bi-dimensionais (2-D). Este tipo de trabalhos decorreu durante mais de 20 anos de modo a ser possível construir bases de dados de proteínas relativas a determinados tipos de células ou tecidos

[50, 51]. Embora este aspecto continue a ser um componente importante da proteómica, o desenvolvimento de novas tecnologias abriu novos horizontes.

A proteómica pode ser dividida em duas áreas de investigação: o mapeamento de proteínas de expressão, e o mapeamento da interacção das proteínas. O mapeamento das proteínas de expressão envolve o estudo das alterações quantitativas das proteínas de uma determinada célula, tecido ou organismo, utilizando em conjunto, electroforese bi-dimensional (2-DE), métodos bioinformáticos e análise por espectrometria de massa. O uso concertado destas técnicas permite assim identificar as proteínas contidas no gel 2-D tornando possível a criação das bases de dados referidas anteriormente. No caso do mapeamento da interacção das proteínas o objectivo centra-se em identificar os alvos de interacção para cada uma das proteínas existente na célula, tecido ou organismo. Pensa-se que a maioria das proteínas presentes na célula interage fisicamente com outras proteínas envolvidas nos diversos processos celulares. Deste modo, conhecendo as proteínas com as quais uma proteína desconhecida interage, é possível inferir qual o seu hipotético papel no processo celular [52].

De um modo geral, podemos afirmar que a proteómica consiste numa descrição quantitativa e interactiva do conjunto de proteínas expressas bem como das suas alterações, sob a influência de alterações biológicas, tais como a exposição a diversos compostos/fármacos, entre outras [53].

Ao longo dos últimos 5 anos a proteómica tem sido a base de muitos estudos que visam um melhor entendimento dos mecanismos de acção de vários compostos. Desde herbicidas [54-57], passando por compostos de interesse industrial ou ambiental [58-60], até compostos com actividade anti-tumoral [8, 61, 62], todos têm sido alvo de um estudo aprofundado, tendo a proteómica como técnica central e em grande parte deles, a levedura *S. cerevisiae* como organismo modelo [54-58].

1.5 Objectivos da dissertação

Este estudo teve como objectivo principal clarificar os mecanismos de acção e potenciais alvos biológicos de três novos compostos com potencial anti-tumor (identificados por I.2, I.4 e I.6) utilizando a levedura *S. cerevisiae* como sistema modelo. Para tal, a levedura *S. cerevisiae* BY4741 (MATa, his31, leu20, met50, ura30) foi cultivada na presença destes compostos e os mecanismos biológicos que se encontravam activados/reprimidos posteriormente analisados. Foi também efectuada a comparação com os mecanismos envolvidos na resposta celular a um composto comumente utilizado em terapêutica anti-tumor - a Doxorrubicina.

De forma a atingir o objectivo proposto, inicialmente foi efectuada uma análise fenotípica que englobou duas partes distintas: i) determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de cada um dos compostos em estudo, de forma a determinar qual a concentração de composto a ser posteriormente utilizada nos estudos subsequentes; ii) caracterização do crescimento e viabilidade celular da levedura na presença destes compostos, utilizando as concentrações previamente determinadas pelos ensaios de CMI.

Após a caracterização fenotípica foi efectuada uma análise proteómica com o objectivo de identificar quais as proteínas que apresentavam uma expressão alterada (sub- ou sobre-expressão) após exposição às concentrações previamente estipuladas para os compostos em estudo. Assim, esta análise proteómica permitiu a identificação de possíveis alvos biológicos que possam ser considerados e utilizados para estudos terapêuticos futuros e com potencial relevância para aplicação na prática clínica.

2. Metodologia

2.1. *Microrganismo - Manutenção e condições de crescimento*

A levedura *S. cerevisiae*, estirpe BY4741 (MATa, his31, leu20, met150, ura30), foi utilizada como organismo modelo na totalidade do trabalho experimental.

Esta estirpe foi mantida a 4°C em placas de meio *yeast peptone dextrose* (YPD) sólido (30 g/L glucose (Scharlau, Barcelona, Espanha), 5 g/L extracto de levedura (Biokar, Beauvais, França), 10 g/L bactopectona (Oxoid, Hampshire, Reino Unido), 20 g/L agar (Merck, Darmstadt, Alemanha)). O meio foi preparado com água destilada. A cultura foi renovada quinzenalmente por repicagem. Após inoculação, as placas foram incubadas durante 48 horas a 30°C.

O meio mínimo basal (MMB) (20 g/L glucose (Scharlau, Barcelona, Espanha), 1,7 g/L *yeast nitrogen base* (YNB) sem aminoácidos (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 2,65g/L sulfato de amónia (Riedel-de Haën, Hanover, Germany)) foi suplementado com aminoácidos (60 mg L-leucina (Sigma), 20 mg L-histidina (Sigma), 20 mg L-metionina (Sigma)) e 20 mg uracilo (Sigma) de forma a suplementar as auxotrofias da estirpe BY4741 e foi utilizado nos restantes ensaios com *S. cerevisiae* BY4741 (pontos 2.2 a 2.10). O pH final, tanto do meio como da solução de aminoácidos, foi ajustado a 4.

Todos os meios de cultura e restante material foram esterilizados por autoclavagem (20 minutos, 121°C). As soluções de aminoácidos foram esterilizadas por filtração com filtros de 0,2 µm (Whatman, Kent, Reino Unido).

2.2. *Condições gerais de crescimento*

Todos os crescimentos em meio líquido foram efectuados numa incubadora G25 (News Brunswick Scientific Co. Inc., New Jersey, EUA) com agitação orbital (150 rpm) a 30°C. Os crescimentos em meio sólido foram realizados a 30 °C.

2.3. *Preparação do pré-inóculo*

O pré-inóculo utilizado para todos os ensaios de crescimento foi preparado por inoculação de células de *S. cerevisiae* BY4741, obtidas de uma cultura fresca em meio YPD sólido, em 95 mL de meio MMB suplementado com aminoácidos. A incubação decorreu com agitação (150 rpm) e

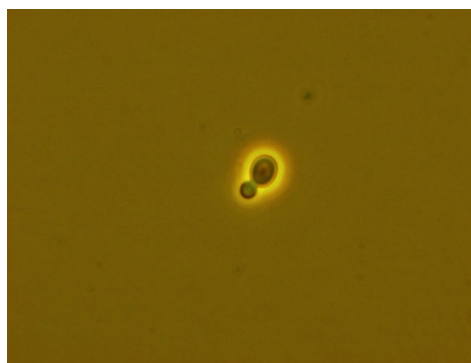


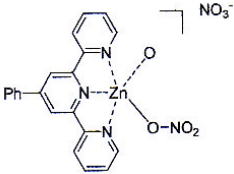
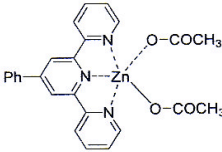
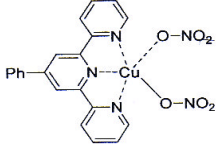
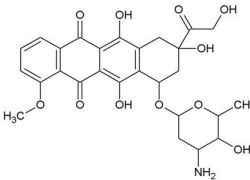
Figura 1. Imagem de *S. cerevisiae* BY4741 em gemulação. (Captada através de microscópio óptico Olympus BX51, Tóquio, Japão)

temperatura (30°C) constantes até se atingir uma densidade óptica (DO) da cultura a 600 nm (DO_{600nm}) de $1 \pm 0,05$.

2.4. Compostos em estudo

Os compostos I.2, I.4 e I.6 foram sintetizados no Instituto Superior Técnico (IST) e as suas estruturas bem como informação adicional encontram-se representadas na Tabela 1. Resumidamente e como observável na Tabela 1, estes compostos são complexos de metais essenciais como o cobre (I.6) ou o zinco (I.2 e I.4) [30]. É importante referir que os compostos I.2 e I.4 já foram sujeitos a publicação [30]. O composto Doxorubicina foi obtido comercialmente (TRC - Toronto Research Chemicals, Canadá) (Tabela 1).

Tabela 1. Compostos em estudo. Os compostos I.2, I.4 e I.6 foram sintetizados no Instituto Superior Técnico (IST). O composto Doxorubicina foi obtido comercialmente de TRC - Toronto Research Chemicals (Canadá).

Composto	Fórmula	Estrutura	Concentração da Solução Stock (μM)	Solvente
I.2	$ZnSO_4 + L^1$		19	DMSO
I.4	$Zn(CH_3COO)_2 + L^1$		78	H ₂ O
I.6	$Cu(NO_3)_2 + L^1$		41	DMSO
Doxorrubicina (Dx)	$C_{27}H_{29}NO_{11}$		46	DMSO

2.5. Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI)

A determinação das CMI para cada um dos compostos em estudo foi feita através do método de microdiluição em meio líquido utilizando para tal diluições seriadas em placas de 96 poços [63]. Resumidamente, aos poços da microplaca (coluna 1) foram adicionados 200 μL de meio MMB suplementado com aminoácidos. Este foi designado controlo de contaminação. Aos poços da microplaca (coluna 2) foram adicionados 150 μL de meio MMB suplementado com aminoácidos. Este foi considerado o controlo de crescimento. Aos restantes poços da microplaca (colunas 3 a 12) foram adicionados 150 μL de meio MMB suplementado com aminoácidos. De seguida, ao terceiro poço da microplaca foi adicionado o volume pretendido do composto (correspondente à máxima concentração pretendida) (Tabela 2) e fez-se o volume deste poço até aos 300 μL com meio MMB. De seguida, foram retirados 150 μL do 3º poço e ressuspensos no poço seguinte (diluição 1:2) e assim sucessivamente até ao último poço (coluna 12). No último poço ressuspenderam-se e desprezaram-se os 150 μL restantes. Posteriormente, todos os poços da microplaca (excepto os da coluna 1) foram inoculados com 50 μL da suspensão de levedura. Desta forma, garantiu-se que 200 μL foi o volume final obtido em todos os poços. Poços relativos ao controlo de crescimento (levedura sem composto), controlo de contaminação (meio MMB suplementado com aminoácidos) e branco (meio MMB suplementado com aminoácidos e composto, sem levedura) foram sempre incluídos em todas as placas e em cada um dos ensaios efectuados. A Dx foi incluída em todos os ensaios dado ser o composto de referência utilizado neste estudo. As placas foram posteriormente incubadas durante 48 horas a 30°C, sem agitação, ao fim das quais se efectuou a “leitura” das CMI por observação directa de cada um dos poços. Assim, foi definido que a CMI de cada composto corresponde à mínima concentração de composto onde não se visualizou nenhum crescimento (ausência de turbidez). Todos os ensaios foram efectuados em triplicado e em três ensaios independentes.

Tabela 2. Concentração dos compostos no 3º poço da microplaca para determinação da CMI.

Composto	Concentração máxima testada (μM)
Dx	0,44
I.2	0,56
I.4	16
I.6	2,44

2.6. Caracterização de crescimento

2.6.1. Efeito de diferentes concentrações de dimetil sulfoxido (DMSO) no crescimento de *S. cerevisiae*

Devido ao facto de alguns dos compostos testados (I.2 e I.6, respectivamente) serem apenas solúveis em DMSO, foi necessário efectuar um estudo prévio no sentido de verificar o comportamento da levedura na presença deste solvente. Para tal, foram realizados crescimentos em meio líquido (suplementado com aminoácidos), com as seguintes concentrações de DMSO: 0,03%, 0,07%, 0,3%, 0,7%, 1% e 3% (v/v).

2.6.2. Crescimento na presença dos compostos com actividade anti-tumor

Após a determinação da CMI para cada composto procedeu-se ao crescimento de *S. cerevisiae* BY4741 em meio líquido MMB suplementado com aminoácidos e na presença das concentrações indicadas na Tabela 3 para cada um dos compostos. Estes crescimentos foram realizados em *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 100 mL de meio MMB suplementado com aminoácidos e com o volume adequado de cada um dos compostos de forma a obter-se a concentração final desejada (Tabela 3). De seguida, os meios colocados nos *Erlenmeyers* foram inoculados com o volume necessário de pré-inóculo, de forma a se obter uma $DO_{600\text{ nm}}$ inicial de $0,1 \pm 0,01$.

O crescimento celular foi acompanhado retirando, em intervalos de tempo adequados, alíquotas da suspensão celular da levedura em crescimento para posterior medição espectrofotométrica (Hitachi U-1500, Tóquio, Japão) da DO da amostra. O acompanhamento do crescimento foi efectuado a 600 nm.

Tabela 3. Concentrações utilizadas para caracterização do crescimento de *S. cerevisiae* em presença dos compostos em estudo.

Composto	Concentração (μM)
Dx	0,0138
I.2	0,00875
I.4	1
I.6	0,4575

2.7. Cálculo da taxa específica de crescimento (μ_c), tempo de duplicação (g) e biomassa máxima (M)

2.7.1. Cálculo da taxa específica de crescimento (μ_c)

A taxa específica de crescimento (μ_c) foi calculada para cada uma das condições testadas, através da análise por regressão não linear (método exponencial) da zona exponencial de crescimento, com base na seguinte equação:

$$\ln Do_t = \ln Do_i + \mu_c \cdot t \quad (2.a)$$

Onde Do_t e Do_i representam a DO da suspensão celular, medida a 600nm, no tempo t (h) e no início da fase exponencial de crescimento respectivamente, e onde μ_c representa a taxa específica de crescimento (h^{-1}).

2.7.2. Tempo de duplicação (g)

O tempo de duplicação celular (g) foi calculado a partir da seguinte equação:

$$g = \ln(2)/\mu_c \quad (2.b)$$

2.7.3. Biomassa máxima (M)

A biomassa máxima (M) foi determinada após análise das curvas de crescimento e representa o valor máximo de DO_{600nm} que foi alcançado na fase estacionária de crescimento.

2.8. Viabilidade celular

Para a determinação da viabilidade celular foram retiradas amostras de 100 μ L das culturas em estudo, nos respectivos intervalos de tempo. As amostras foram posteriormente diluídas serialmente em água destilada até à diluição 10^{-6} . Seguidamente, plaquearam-se 100 μ L de cada uma das diluições (10^{-3} a 10^{-6}) em meio sólido MMB (950 mL meio MMB líquido, 20 g de agar (Merck)) suplementado com aminoácidos. As placas foram posteriormente incubadas a 30°C durante 48h. As unidades formadoras de colónias (UFC) foram contabilizadas e o cálculo da viabilidade celular efectuado utilizando a equação (2):

$$UFC/mL = \frac{UFC}{D \cdot Vi} \quad (2.c)$$

Onde: UFC representa o número de colónias contabilizadas por placa; D representa o factor de diluição; e Vi representa o volume inicial que foi plaqueado de cada uma das amostras.

2.9. Proteómica

2.9.1. Recolha celular, lise e obtenção da fracção proteica

As células de levedura foram crescidas até meio da fase exponencial. A recolha celular foi feita por centrifugação (20 minutos, 5000 rpm) (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemanha) tendo-se desprezado o sobrenadante e preservado o sedimento. Ao sedimento celular recolhido foram adicionados 2 mL de tampão de lise (9 M ureia (Sigma), 4% (p/v) CHAPS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Suécia), 0,5% (v/v) tampão IPG *pharmalyte* pH 3-10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB), 15 mM ditioneitol (DTT)* (Promega Corp., WI, EUA), 43 µL inibidores de proteases* (cOmplete ULTRA Tablets, Roche Applied Science, Mannheim, Alemanha) , 1 mM *phenylmethanesulfonyl fluoride* (PMSF)* (Thermo Scientific, MA, EUA), 0,01% (p/v) azul de bromofenol (Sigma). Depois de colocados os 2 mL de tampão de lise na amostra, adicionou-se igual volume de esferas de vidro com diâmetro 450-600 µm (Sigma) seguindo-se a ruptura celular. A ruptura celular consistiu na alternância entre processos de incubação em gelo (1 minuto) com ciclos de agitação em vórtex (1 minuto) durante um total de 30 minutos.

No final da ruptura celular foi feita uma centrifugação (15 minutos, 10.000 rpm) com o objectivo de separar o extracto de proteínas das esferas de vidro e dos restos celulares. O sobrenadante correspondente à fracção proteica foi recolhido para tubos *Eppendorf* e, quando não utilizado de imediato, foi armazenado a -80°C.

*Adicionado no momento de utilização.

2.9.2. Precipitação e concentração do extracto proteico

Antes da quantificação das proteínas presentes no extracto, este foi sujeito a um processo de precipitação com o objectivo de eliminar possíveis contaminantes quer no processo de quantificação quer na electroforese. Para tal, foi utilizado um método de precipitação com ácido tricloroacético (TCA) e desoxicolato de sódio (DOC). O procedimento utilizado, para 1 mL de extracto, foi o seguinte:

- Adicionaram-se 10 µL de DOC (Merck) a 2% (p/v) em dH₂O. Agitou-se no vórtex e deixou-se repousar durante 30 minutos a 4°C;
- Adicionaram-se 100 µL de uma solução de TCA (Panreac, Barcelona, Espanha) a 100% (p/v) em dH₂O (454 mL dH₂O/kg de TCA). Levou-se ao vórtex e incubou-se a 4°C durante a noite;

- Centrifugaram-se as amostras 15 minutos a 4°C, 15000 rpm. Decantaram-se cuidadosamente os sobrenadantes e secaram-se os sedimentos durante alguns minutos por inversão em papel absorvente;
- Ressuspenderam-se os sedimentos em 115 µL de tampão de rehidratação (8M Ureia, 3% (p/v) CHAPS (GE Healthcare Bio-Sciences AB), 0,5% (v/v) tampão IPG *pharmalyte* pH 3-10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB), 4,1 µL DTT 10% (p/v)* (Promega Corp.), 4,3 µL de inibidores de proteases* (cOmplete ULTRA Tablets, Roche Applied Science), 2 µL PMSF 100 mM* (Thermo Scientific), 0,02% (p/v) azul de bromofenol (Sigma).

Sempre que não foi possível utilizar de imediato o extracto, este foi armazenado a -80°C.

*Adicionado no momento de utilização.

2.9.3. Quantificação da proteína presente no extracto

A quantificação da proteína presente no extracto foi efectuada através do método de Lowry modificado. Para tal, prepararam-se o Reagente A (20 g/L carbonato de sódio (Panreac), 4 g/L hidróxido de sódio (Scharlau), 1,6 g/L tartarato de sódio (Carlo Erba Reagenti, Milão, Itália), 10 g/L SDS (Riedel-de Haën)), o Reagente B (2 g Sulfato de cobre (Sigma) em 50 mL dH₂O), o Reagente C (Reagente B + Reagente A na proporção de 1:100), 0,5 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) (Merck), tris-HCl 20 mM, pH 7,5 (Calbiochem, San Diego, EUA), DOC 1% (p/v) (Merck) e TCA 10% (p/v) (Panreac).

Para o procedimento propriamente dito foram numerados 7 tubos *Eppendorf* e processados de acordo com a seguinte tabela (Tabela 4):

Tabela 4. Tabela representativa do ensaio de quantificação de proteínas pelo método de Lowry modificado.

Tubo	BSA (µg)	Solução stock de BSA 0,5 mg/mL (µL)	Tris-HCl 20mM pH 7,5 (µL)
0	0	0	250
1	2,5	5	245
2	5	10	240
3	10	20	230
4	15	30	220
5	25	50	200
6	35	70	180
Amostra	-----	5 µL amostra	245

De seguida, em todos os tubos foi adicionada dH₂O até perfazer um volume final de 0,5 mL. Adicionaram-se 50 µL de DOC (Merck) a 1% (p/v) e 1 mL de TCA (Panreac) a 10% (v/v), agitando-se de seguida. Incubou-se 10 minutos e de seguida procedeu-se à centrifugação dos tubos durante 5 minutos a 10.000 rpm (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemanha). No final da centrifugação

desprezou-se o sobrenadante e deixou-se secar o sedimento durante 15 minutos em papel absorvente. Adicionou-se 1 mL de reagente C e dissolveu-se o sedimento agitando os tubos no vórtex. Esperou-se 10 minutos e adicionaram-se 100 μ L de reagente de Folin diluído 1:1 em dH₂O. Agitou-se e incubou-se 30 minutos no escuro. No final deste processo registaram-se as absorvâncias a 750 nm. Todas as amostras em estudo, bem como as relativas à recta padrão foram efectuadas em triplicado. Os resultados finais permitiram a determinação da quantidade de proteína presente em cada amostra.

2.10. Preparação para electroforese bi-dimensional (2-DE)

A electroforese bi-dimensional (2-DE) é um método específico e muito utilizado na análise de misturas proteicas complexas extraídas de células, tecidos ou de quaisquer outras amostras biológica. Esta técnica tem como objectivo separar isoformas proteicas de acordo com duas das suas propriedades distintas, em duas etapas também elas distintas [64].

A etapa correspondente à 1ª dimensão, focagem isoelectrica (IEF), consiste em separar as proteínas de acordo com o seu ponto isoelectrico (pI); o passo correspondente à 2ª dimensão, SDS-PAGE, separa as isoformas proteicas consoante o seu peso molecular (Mw). Cada ponto no gel bi-dimensional resultante corresponde, potencialmente, a um tipo de proteína presente na amostra. Deste modo, milhares de isoformas proteicas podem ser separadas e informações tais como pI, Mw e a quantidade relativa de cada isoforma obtidas através da análise por 2-DE [64].

Relativamente à preparação das amostras para 2-DE estas foram processadas utilizando o kit 2-D Clean Up (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., PA, EUA). Este kit permite a precipitação das proteínas enquanto deixa em solução substâncias interferentes, tais como detergentes, sais, lípidos, compostos fenólicos e ácidos nucleicos [65].

O volume correspondente a 300 μ g de proteína foi processado e submetido a purificação segundo o protocolo do fabricante.

Duas horas antes do inicio da focagem isoelectrica, as amostras foram colocadas à temperatura ambiente com o objectivo de rehidratar e permitir a máxima solubilização das proteínas em solução. Após as 2 horas de rehidratação, as amostras foram centrifugadas (15 minutos, 10.000 rpm) (Eppendorf 5804R, Hamburgo, Alemanha) para separar as proteínas não solubilizadas de modo a que estas não interferissem na focagem isoelectrica.

2.11. 1ª Dimensão - IEF

A IEF foi efectuada utilizando o sistema ETTAN™IPGPhor™3IEF (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) utilizando tiras Immobiline Drystrip pH 3-10 NL de 7 cm (GE Healthcare Bio-Sciences AB).

Foram transferidos convenientemente 125 μ L de cada amostra para os sarcófagos (*strip holder*) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). As tiras foram colocadas de modo a que o gel ficasse

voltado para baixo em contacto com a amostra e com total ausência de bolhas de ar. Depois de colocada, a tira foi totalmente coberta com 1 mL de Drystrip Cover Fluid (GE Healthcare Bio-Sciences AB) e a tampa do sarcófago foi colocada. Os sarcófagos foram colocadas no sistema de IEF e a corrida decorreu durante 14 horas e 30 minutos de acordo com o seguinte programa (Tabela 5):

Tabela 5. Programa utilizado na focagem isoelectrica.

Passo	Duração (h)	Voltagem (V)	Temperatura (°C)
1	12	30	20
2	0,5	100	20
3	0,5	500	20
4	0,5	1000	20
5	1	5000	20

Depois de finalizada a corrida, a *tira* foi retirada cuidadosamente do sarcófago e colocada num tubo de 15 mL contendo 10 µL de solução de equilíbrio (1,5 M tris-HCl pH 8,8 (Calbiochem), 360,35 g/L ureia (Scharlau), 354 mL/L glicerol 30% (v/v) (Panreac), 20 g/L *sodium dodecyl sulfate* (SDS) (Riedel-de Haën), 0,01% (p/v) azul de bromofenol (Sigma) e 1% (p/v) de DTT (Promega Corp.).

A tira foi incubada nesta solução durante 15 minutos com agitação horizontal. Passado este período, foi transferida para outro tubo de 15 mL contendo 10 mL da solução de equilíbrio contendo 2,5% de iodoacetamida (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Este tubo foi mantido sob agitação durante 15 minutos. Terminada esta etapa, a tira encontrou-se pronta para ser submetida a electroforese de 2ª dimensão.

2.12. 2ª Dimensão - SDS-PAGE

A electroforese de 2ª dimensão foi efectuada recorrendo a um sistema SDS-PAGE da Biorad (Biorad, CA, EUA) com gel de poliacrilamida a 12% (v/v) (4 mL acrilamida/bis-acrilamida 30 % (Merck), 2,5 mL tampão tris-HCl 1,5 M pH 8,8 (Calbiochem), 3,5 mL dH₂O, 75 µL APS (Biorad), 10 µL tetramethylethylenediamine (TEMED) (Sigma)).

Depois de montado o sistema de SDS-PAGE, o gel de poliacrilamida foi colocado nos respectivos moldes e deixado a polimerizar durante 30 minutos. Após a polimerização, as tiras foram colocadas com o gel direccionado para o vidro maior do sistema com o cuidado de não deixar formar bolhas de ar entre a tira e o gel de poliacrilamida. A montagem foi selada com uma solução de agarose 0,5% (p/v) (Lonza, Basileia, Suíça) em tampão de electroforese (3,79 g/L tris-base (Calbiochem), 18 g/L glicina (Panreac), 1,25g/L SDS (Riedel-de Haën).

Depois de polimerizada a agarose, os géis foram corridos a 30 volts durante 30 minutos, aumentando depois a voltagem para 90 volts até ao final da corrida.

Os géis resultantes foram corados a quente (2 minutos no micro-ondas a 900 watts) com uma solução contendo 3 pastilhas de PhasTGeI™ Blue R (Comassie R350) (GE Healthcare Bio-Sciences AB) em 1 litro de ácido acético (Panreac) a 10% (v/v) em dH₂O. Os géis foram posteriormente descolorados com dH₂O aquecida até ser possível uma boa visualização dos pontos correspondentes às isoformas proteicas.

2.13. Aquisição de imagens

As imagens dos géis foram adquiridas através de um scanner (Epson Perfection 1200U), utilizando o programa de manipulação de imagem GIMP v2.6.7.

2.14. Análise das imagens

Os géis foram analisados no programa Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics Limited, Newcastle, UK) na sua versão de demonstração.

2.15. Identificação de proteínas

Depois de analisados os géis, os pontos de interesse foram excisados, colocados numa placa de 96 poços e armazenados a -80 °C. A identificação das isoformas proteicas foi feita através de *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) / *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance – Mass Spectrometry* (MALDI-FTIRC-MS) no *Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser* (LSMCL) da Universidade Paul Verlaine, em Metz, França, pelo grupo do Doutor Patrick Chaimbault e David da Silva.

3. Análise e discussão de resultados

De modo a compreender o modo de acção de novos compostos com potencial anti-tumoral foi utilizada a levedura *S. cerevisiae*, estirpe selvagem BY4741 (*Mata, his31, leu20, met50, ura30*), para testar a exposição a três novos compostos com potencial anti-tumoral comprovado (I.2, I.4 e I.6) e a um composto conhecido (Doxorrubicina).

3.1. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

A CMI é considerada a técnica “*gold standard*” para a determinação da susceptibilidade de um microrganismo a um dado composto. A CMI é definida como a mínima concentração de um composto que inibe visivelmente o crescimento de um microrganismo após um dado período de incubação [66].

De forma a determinar a CMI dos compostos foi utilizado o método de diluição seriada em microplaca. De acordo com os valores obtidos (Tabela 7) podemos verificar que os compostos I.2 e Dx foram os que apresentaram uma CMI mais baixa, o que nos indicia a sua elevada actividade antimicrobiana. O composto I.6 apresenta um valor de CMI superior quer ao composto I.2 quer à Dx, mas ainda assim inferior ao composto I.4 que apresenta o valor de CMI mais elevado.

Tabela 6. CMI para cada um dos compostos em estudo.

	Dx	I.2	I.4	I.6
CMI (μM)	0,055	0,035	4	0,61

Uma vez determinadas as CMI's foram determinadas as concentrações de composto às quais se verificava um efeito inibitório na μ_c da levedura. Todos os compostos foram utilizados em concentrações a 1/4 MIC, excepto o composto I.6. No caso deste composto quando se efectuaram os crescimentos da levedura na presença do composto a 1/4 da MIC não se verificou qualquer tipo de efeito no crescimento (relativamente ao controlo) que pudéssemos considerar significativo e desta forma foram realizadas novas curvas de crescimento utilizando o composto a 1/2 e finalmente 3/4 da MIC. Quando na presença do composto a 1/2 da MIC o mesmo resultado foi obtido e desta forma foi seleccionado 3/4 da MIC para a progressão dos estudos, dado que a esta concentração (0.4575 μM) o composto apresentou um efeito inibitório do crescimento. No entanto, em todos os ensaios efectuados foram retiradas alíquotas nos vários tempos de crescimento e as mesmas sujeitas a plaqueamento para contagem de CFU de modo a garantir que este efeito inibitório no crescimento não era devido a morte celular. Os resultados dos testes de viabilidade (UFC/mL) encontram-se apresentados nas figuras 2-5.

Tabela 7. Concentrações dos compostos utilizadas para a caracterização de crescimento e ensaios de viabilidade.

	Dx	I.2	I.4	I.6
CMI (μM)	0,0138	0,00875	1	0,4575

3.2. Estudo prévio - Comportamento de *S. cerevisiae* na presença de diferentes concentrações de dimetil sulfóxido (DMSO)

Procedeu-se a um estudo prévio com o intuito de verificar o comportamento da levedura na presença de DMSO, dado ser este o solvente utilizado para a dissolução de todos os compostos em estudo, excepto o composto I.4, que foi possível solubilizar em dH₂O.

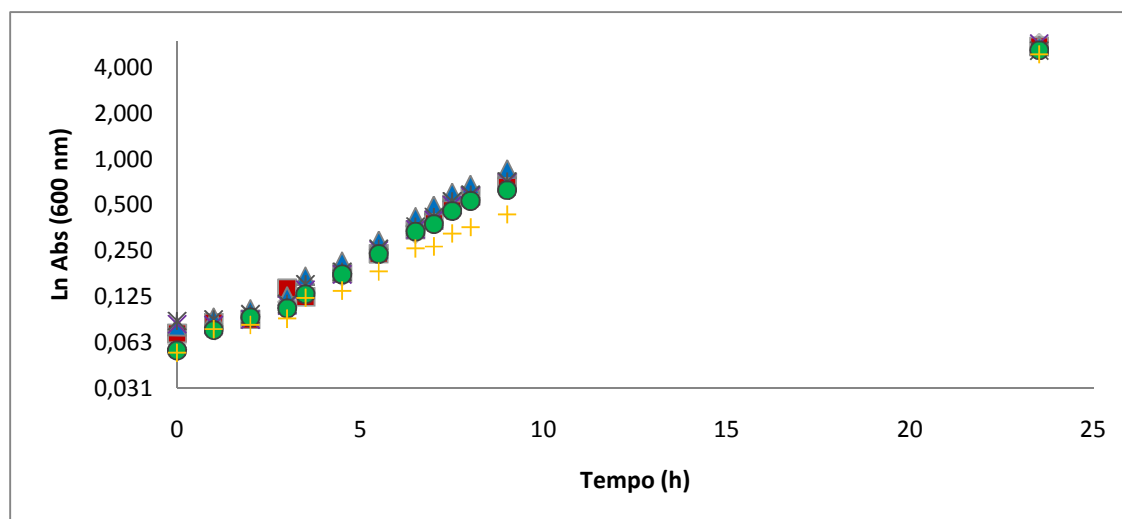


Figura 2. Curva de crescimento na presença de diferentes concentrações de DMSO (controlo (◆), 0,03% (■), 0,07% (▲), 0,3% (×), 0,7% (*), 1% (●), 3% (+)). Os valores indicados no gráfico são representativos de, pelo menos, três ensaios independentes.

Através da análise das curvas de crescimento da levedura na presença de diversas concentrações de DMSO (figura 1) verificou-se que não existiram alterações muito significativas no comportamento da levedura. Este facto foi comprovado através do cálculo dos valores de μ_c e g com base nas equações (2.a) e (2.b), respectivamente, e M , obtido através da análise da curva de crescimento, correspondendo ao valor máximo de absorvância. Na tabela 6 pode-se verificar que não existem grandes diferenças no que diz respeito aos parâmetros em análise até à concentração de 1% (v/v) de DMSO. No entanto, para a concentração de 3% verificou-se uma ligeira alteração dos valores em estudo, em particular uma diminuição da taxa específica de crescimento. Desta forma, houve o cuidado de nas caracterizações de crescimento da levedura em presença dos compostos, não ultrapassar a concentração de 1% (v/v) de DMSO.

Tabela 8. Valores de μ_c , g e M relativos ao crescimento da levedura na presença de diferentes concentrações de DMSO.

	DMSO (%)						
	Controlo (0%)	0,03%	0,07%	0,3%	0,7%	1%	3%
μ_c	0,3202	0,3118	0,3115	0,3118	0,3038	0,2988	0,2467
g	2,165	2,223	2,225	2,223	2,282	2,320	2,810
M	5,830	5,500	5,560	5,760	5,160	5,200	4,880

Após este estudo inicial prosseguiu-se para a caracterização do crescimento da levedura em presença dos três compostos, tendo em vista os objectivos previamente definidos para este estudo.

3.3. Caracterização de crescimento e viabilidade celular

A análise espectrofotométrica foi o método escolhido para caracterizar o crescimento celular da levedura na presença dos vários compostos em estudo. Assim, foi determinada a DO da suspensão celular a um comprimento de onda de 600 nm (DO_{600nm}). Em paralelo, foi também determinada a concentração de células viáveis através da contagem de UFC, de forma a acompanhar a viabilidade das células de levedura em todo este processo. Tendo por base os crescimentos controlo (levedura cultivada na ausência de composto) foi possível comparar e determinar as diferenças entre este e os crescimentos na presença dos compostos. Para tal, procedeu-se à determinação da taxa específica de crescimento (μ_c), do tempo de duplicação (g) e da biomassa máxima (M) para todos os ensaios (Tabela 10). Os valores de μ_c e g foram calculados com base nas equações (2.a) e (2.b), respectivamente. O valor de M foi obtido através da análise da curva de crescimento e corresponde ao valor máximo de absorvância atingido.

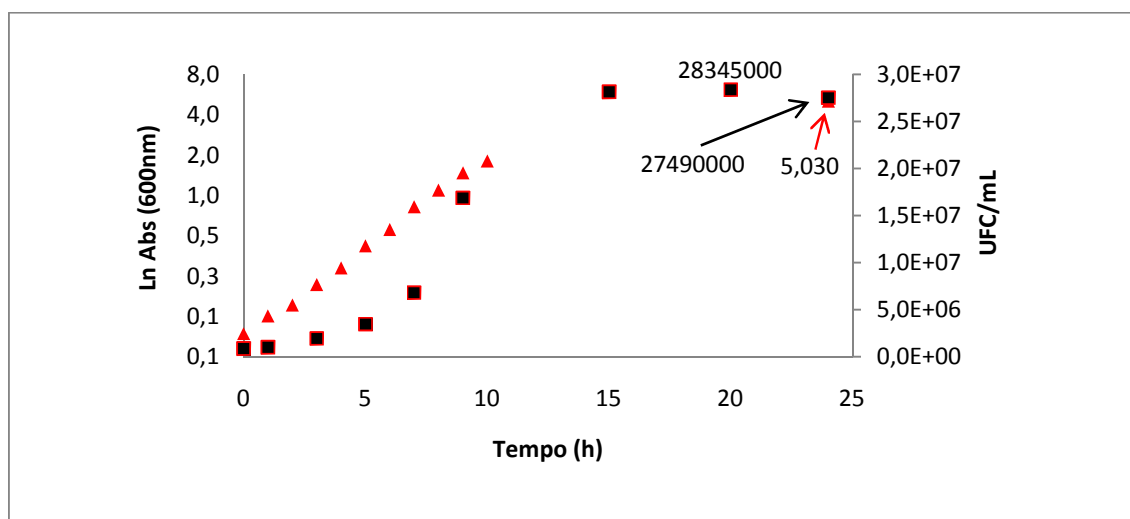


Figura 3. Curva de crescimento (\blacktriangle) e curva de viabilidade celular (\blacksquare) no ensaio controlo. No gráfico estão representados os valores de M (5,030), de UFC/mL máximo (28345000) e de UFC/mL final (27490000). Os valores indicados no gráfico são representativos de, pelo menos, três ensaios independentes.

Na Figura 3 podemos observar a curva de crescimento celular e a curva respeitante à determinação das UFC/mL para a condição controlo (levedura cultivada na ausência de composto). Os parâmetros relativos ao crescimento celular foram calculados tendo sido obtidos os valores de $0,3104 \text{ h}^{-1}$, 2,233 horas e 5,030 para μ_c , g e M , respectivamente. No que diz respeito à determinação das UFC, podemos verificar que ao fim de 24 horas o número de UFC/mL rondava as $2,749 \times 10^7$ tendo atingido o seu valor máximo às 20 horas com $2,834 \times 10^7$ UFC/mL.

Após a caracterização do crescimento e da viabilidade celular no ensaio controlo (levedura sem qualquer composto no meio de cultura) procedeu-se à caracterização do crescimento da levedura na presença do composto utilizado como referência, *i.e.*, a Dx.

Com base nos resultados apresentados na Figura 4 foi possível caracterizar o crescimento e determinar o número de UFC/mL da levedura quando cultivada na presença de Dx (composto utilizado na terapêutica oncológica e presente neste estudo como uma referência). Através da análise da curva de crescimento foi possível determinar os valores de μ_c , g e M para os quais foram obtidos os valores de $0,121 \text{ h}^{-1}$, 5,728 horas e 0,634, respectivamente. Em relação à curva relativa à determinação de UFC, observou-se um valor máximo de $1,87 \times 10^6$ UFC/mL após 7 horas de crescimento e um mínimo correspondente a 24 horas de crescimento com um valor de $7,6 \times 10^5$ UFC/mL.

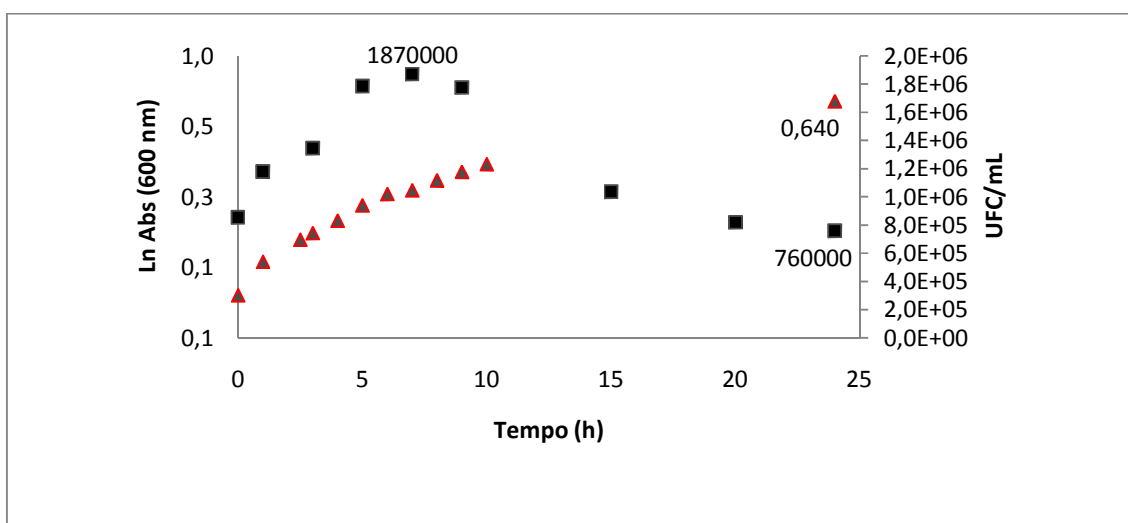


Figura 4. Curva de crescimento (▲) e curva de viabilidade celular (■) na presença do composto Dx a uma concentração de $0,0138 \mu\text{M}$. No gráfico estão representados os valores de M (0,640), de UFC/mL máximo (1870000) e de UFC/mL final (760000). Os valores indicados no gráfico são representativos de, pelo menos, três crescimentos independentes.

Seguidamente efectuou-se a caracterização do crescimento da levedura quando esta se encontra na presença dos três compostos em estudo. Os resultados obtidos vão ser apresentados e discutidos de seguida.

Na Figura 5 encontram-se representadas as curvas de crescimento e a curva resultante da determinação das UFC para a suspensão celular na presença do composto I.2. Após a análise da figura relativa à curva de crescimento foram determinados os valores de μ_c , g e M . Quando comparados com os valores obtidos no crescimento controlo verificou-se uma diminuição de μ_c de $0,3104 \text{ h}^{-1}$ para $0,131 \text{ h}^{-1}$ e o respectivo aumento de g das 2,233 horas para as 5,291 horas. O valor de M foi de 0,535 em comparação com os 5,030 atingidos nos ensaios controlo (levedura crescida na ausência de composto). Ao determinar as UFC verificou-se que o número de células viáveis diminuiu significativamente em relação ao controlo. Na presença de I.2 o valor máximo de UFC/mL foi alcançado às 7 horas de crescimento e foi de $2,040 \times 10^6$ UFC/mL, enquanto que o valor relativo às 24 horas de crescimento foi de $8,125 \times 10^5$ UFC/mL. Através destes valores podemos verificar que existe um efeito repressor do composto I.2, quer no crescimento celular quer no número de células viáveis.

Comparando estes resultados com os previamente discutidos verificou-se que, tanto em relação ao crescimento celular como em relação às UFC, os dados respeitantes ao composto I.2 são muito semelhantes aos obtidos com a Dx o que poderá indicar que este composto poderá apresentar um efeito semelhante no metabolismo da levedura.

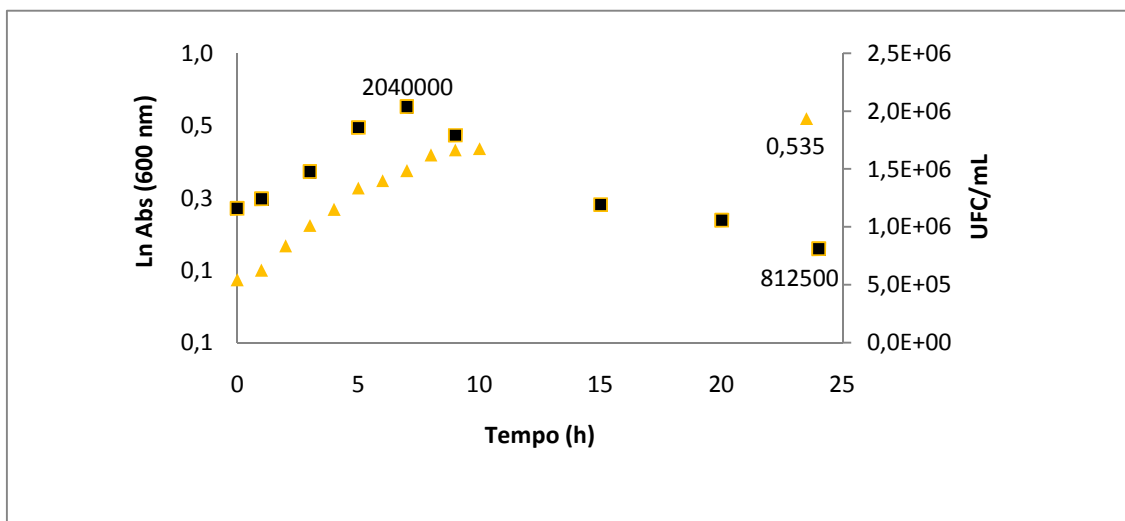


Figura 5. Curva de crescimento (\blacktriangle) e curva de viabilidade celular (\blacksquare) na presença do composto I.2 a uma concentração de $0,00875 \mu\text{M}$. No gráfico estão representados os valores de M (0,535), de UFC/mL máximo (2040000) e de UFC/mL final (812500). Os valores indicados no gráfico são representativos de, pelo menos, três ensaios independentes.

No que diz respeito ao crescimento celular da levedura na presença do composto I.4 (Figura 6) podemos verificar que, comparado com o crescimento controlo, este apresenta parâmetros inferiores. Com valores de μ_c , g e M de $0,1135 \text{ h}^{-1}$, 6,107 horas e 0,426, respectivamente, este composto induziu uma inibição de crescimento ligeiramente superior a I.2. No entanto e após análise da curva resultante da determinação das UFC, verificou-se que embora este composto apresente uma acção inibitória superior ao composto I.2, no que diz respeito ao crescimento celular, os seus números de UFC ao fim de 24 horas são um pouco superiores. Tendo sido

determinado um valor máximo de UFC às 9 horas de crescimento correspondendo a $1,765 \times 10^6$ UFC/mL que foi inferior ao valor máximo de I.2, às 24 horas foi determinado um valor de $1,2575 \times 10^6$ UFC/mL, valor este superior ao valor obtido para o composto I.2, ao fim do mesmo período de tempo. Este facto poderá indicar que o composto I.4 exerce um efeito menos tóxico do que o composto I.2, actuando no entanto de forma mais rápida na célula. Assim explicar-se-ia o facto de possuir números de UFC/mL inferiores a I.2 até às 15 horas e superiores ao fim de 24 horas.

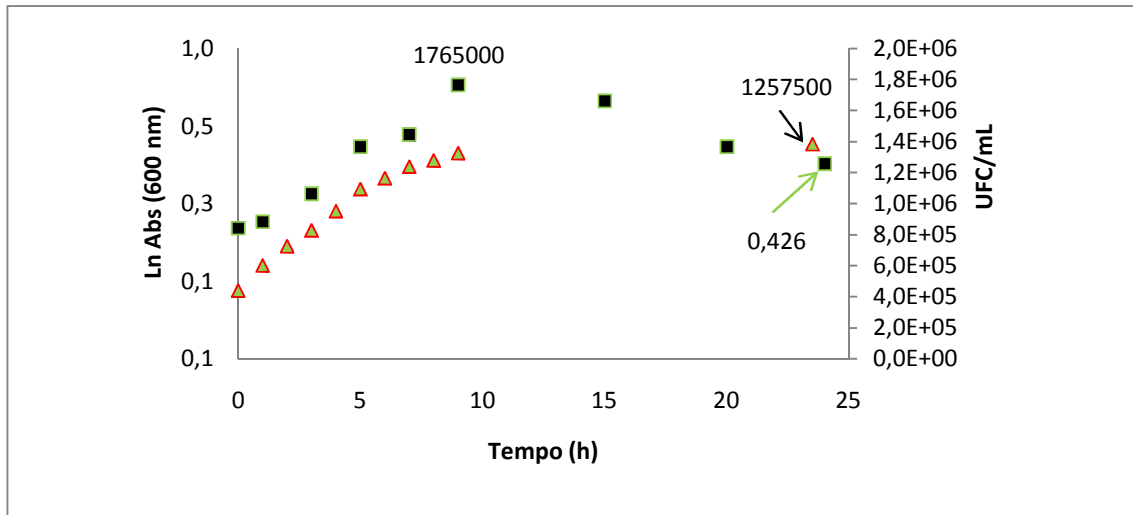


Figura 6. Curva de crescimento (\blacktriangle) e curva de viabilidade celular (\blacksquare) na presença do composto I.4 a uma concentração de $1 \mu\text{M}$. No gráfico estão representados os valores de M (0,426), de UFC/mL máximo (1765000) e de UFC/mL final (1257500). Os valores indicados no gráfico são representativos de, pelo menos, três ensaios independentes.

Em relação à Figura 7, onde se encontram representadas as curvas de crescimento e viabilidade celular na presença do composto I.6, foi possível constatar que estas apresentam um crescimento diferente de I.2 e I.4. Verificou-se que ao fim de 24 h, o valor de M foi muito superior ao valor determinado quer para o composto I.2 quer para o composto I.4 situando-se em 3,130. Quanto aos valores de μ_c e g , os dados obtidos foram de $0,0984 \text{ h}^{-1}$ para μ_c e $7,044 \text{ h}$ para g . Quando analisada a curva referente às UFC constatou-se que o valor máximo de células viáveis foi obtido às 24 horas de crescimento com o valor de $1,2675 \times 10^7$ UFC/mL. Analisando a curva de crescimento da levedura na presença do composto I.6 verificou-se um aumento do crescimento entre as 10 e as 24 h. Este facto pode indicar uma adaptação da levedura ao composto. Este facto poderá ser comprovado analisando a curva referente à determinação de UFC, onde se verificou um aumento, de uma forma quase constante, do número de UFC/mL, desde a 10ª hora de crescimento até à 24ª hora.

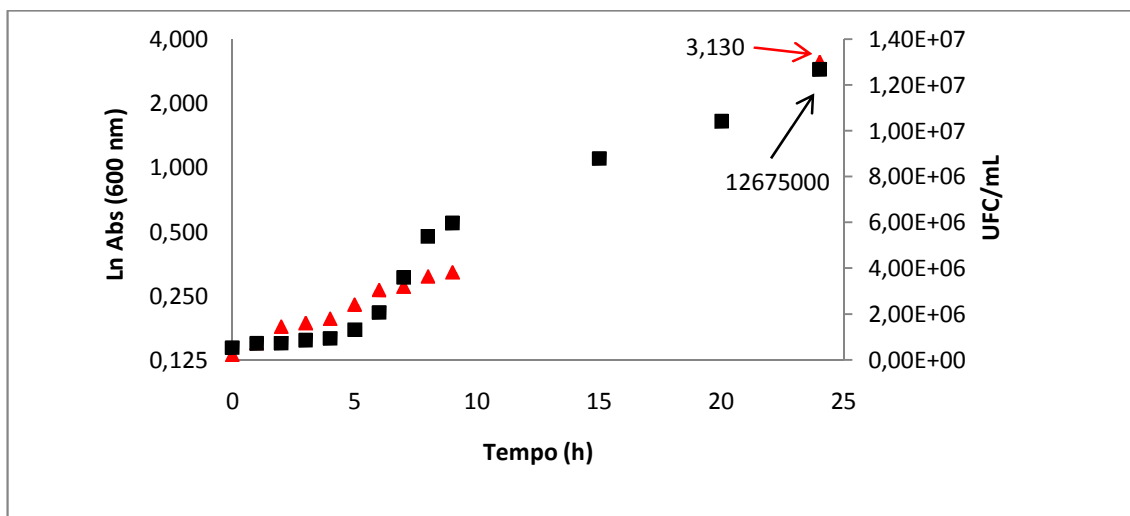


Figura 7. Curva de crescimento (▲) e curva de viabilidade celular (■) na presença do composto I.6 a uma concentração de 0,4575 μ M. No gráfico estão representados os valores de M (3,130), de UFC/mL máximo (12675000) e de UFC/mL final (12675000). Os valores indicados no gráfico são representativos de, pelo menos, três crescimentos independentes.

De um modo geral, e depois de analisadas todas as curvas relativas ao crescimento e viabilidade celular da levedura, os resultados encontram-se sumarizados na Tabela 9. De seguida, prosseguiu-se para a análise do proteoma de *S. cerevisiae* quando esta é cultivada na presença dos compostos em estudo.

Tabela 9. Valores de μ_c , g , M , UFC/mL (máx) e UFC/mL (24h) relativos ao crescimento na presença dos compostos em estudo.

	Controlo	Dx	I.2	I.4	I.6
μ_c	0,3104	0,121	0,131	0,1135	0,0984
g	2,233	5,728	5,291	6,107	7,044
M	5,030	0,634	0,535	0,426	3,130
UFC/mL (máx)	$2,834 \times 10^7$	$1,87 \times 10^6$	$2,040 \times 10^6$	$1,765 \times 10^6$	$1,2675 \times 10^7$
UFC/mL (24h)	$2,749 \times 10^7$	$7,6 \times 10^5$	$8,125 \times 10^5$	$1,2575 \times 10^6$	$1,2675 \times 10^7$

3.4. Efeitos dos compostos em estudo no proteoma da levedura

Com o objectivo de obter informações úteis no que diz respeito ao modo de acção e possíveis alvos biológicos específicos dos compostos em estudo, os proteomas das células de *S. cerevisiae* foram comparados após exposição aos compostos (Figura 8). As células foram recolhidas a meio da fase exponencial de crescimento.

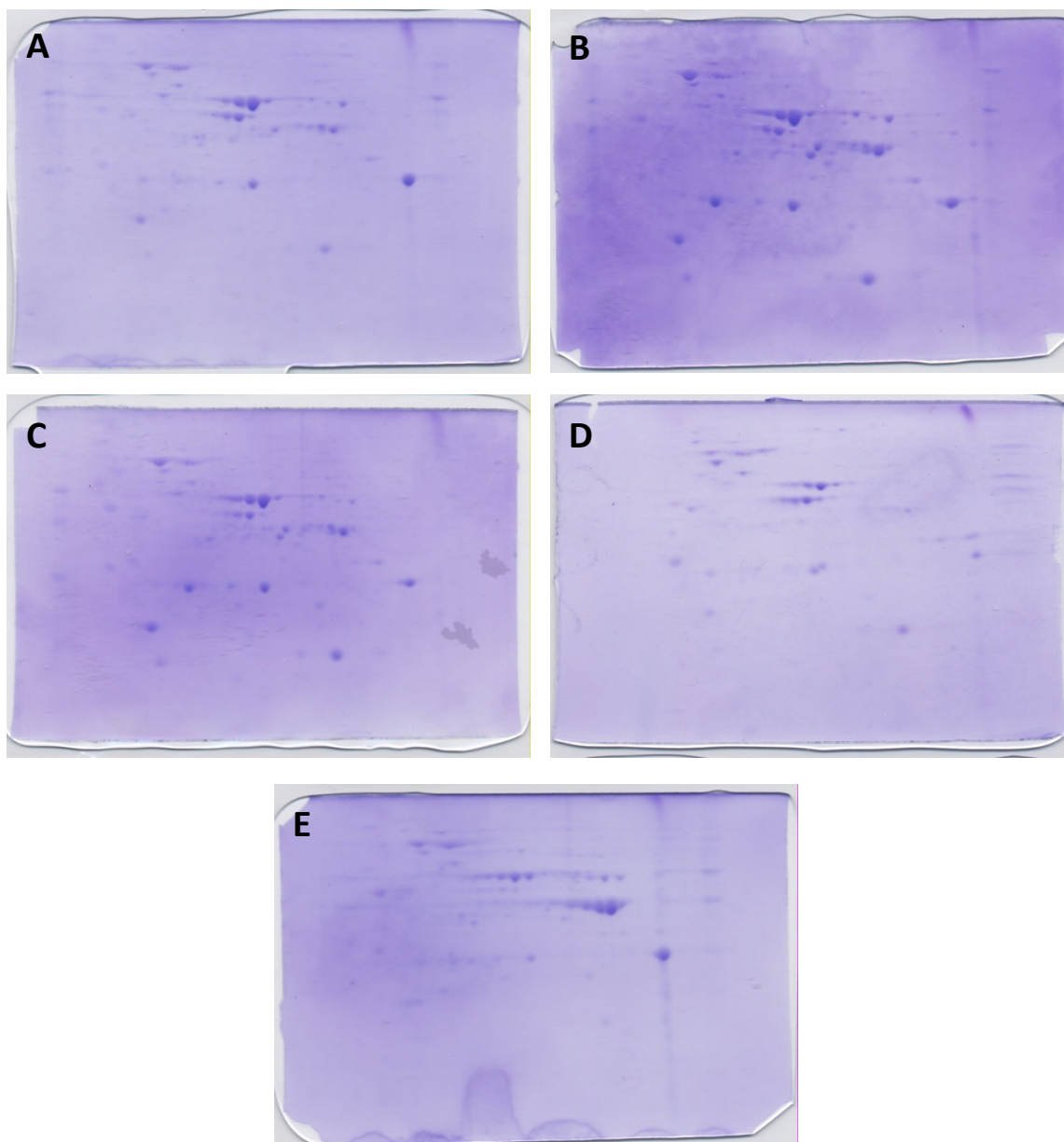


Figura 8. Conjunto dos géis 2-DE representativos do proteoma de *S. cerevisiae* quando exposta a cada um dos compostos: (A) Controlo; (B) Dx; (C) I.2; (D) I.4; (E) I.6. É possível verificar algumas diferenças nos géis resultantes da exposição aos diferentes compostos. Essas diferenças ocorrem sobretudo nos pontos correspondentes a isoformas proteicas de baixo peso molecular, verificando-se também diferenças de expressão em alguns dos pontos que apresentam maior expressão no gel A.

Depois de realizada a 2-DE, foi necessário submeter os géis obtidos a uma análise computacional com o programa da *Nonlinear Dynamics, Progenesis SameSpots* (versão de demonstração). Desta forma foi possível detectar diferenças a nível da expressão proteica entre os proteomas obtidos após exposição da levedura aos compostos em estudo e o proteoma da condição controlo (crescimento da levedura sem adição de qualquer composto). Depois desta análise seleccionou-se um conjunto de pontos que apresentaram variação nos níveis de expressão relativamente à condição controlo (cultura sem composto). As isoformas proteicas identificadas podem ser visualizadas, a título representativo, na Figura 9.

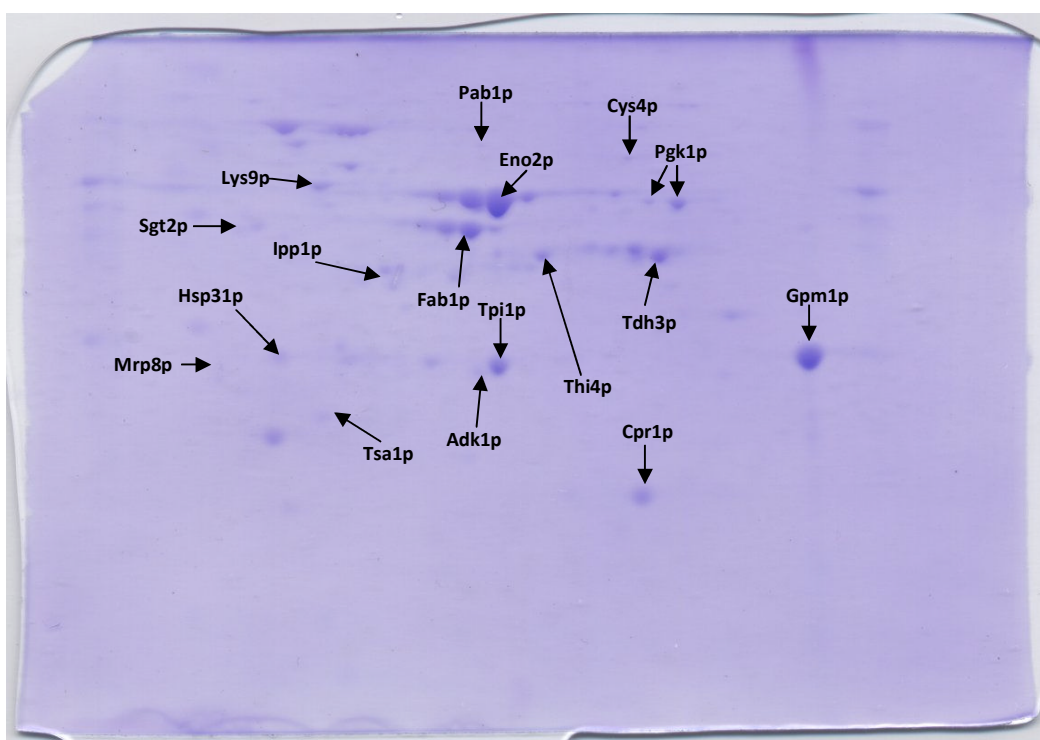


Figura 9. Mapa de proteínas baseado na 2-DE da condição controlo. As proteínas indicadas foram identificadas através de PMF por MALDI-FTIRC-MS.

De seguida, os pontos foram enviados para posterior identificação através de PMF/MALDI-FTIRC-MS. Na Tabela 10 estão indicadas as proteínas identificadas, a sua caracterização (em termos de pI e Mw) e a variação de expressão relativamente à condição controlo para cada um dos compostos.

Tabela 10. Proteínas identificadas por PMF/MALDI-FTIRC-MS. Estão incluídas todas as proteínas identificadas e indicados os valores de *pI/Mw* (experimental e teórico), o *score* de MASCOT e o erro (ppm).

Proteína	<i>pI/Mw</i> (experimental)	<i>pI/Mw</i> (teórico)	Score MASCOT	Erro (ppm)
Cpr1p	7,8/<18	6,9/17,3	94	3
Cys4p	7,6/51	6,25/55,9	129	1
Eno1p	6,5/45	6,16/46,7	60	16
Eno2p	6,5/45	5,67/46,8	157	12
Fba1p	6,3/40	5,51/39,6	153	3
Gpm1p	9/24	8,81/27,6	142	2
Hsp31p	5,2/21	5,03/25,6	87	0
Ipp1p	5,6/32	5,36/32,3	194	2
Lys9p	5,2/50	5,1/48,9	180	2
Mrp8p	4,4/22	4,66/25,0	85	1
Pab1p	6,3/65	5,7/64,3	71	2
Pgk1p	8,1/45	7,11/44,7	199	1
Sgt2p	4,5/40	4,68/37,2	119	1
Tdh3p	8/33	6,96/35,7	-	-
Thi4p	6,3/38	5,98/34,9	76	1
Tpi1p	6,4/21	5,74/26,8	134	2
Tsa1p	5/19	5,03/21,5	87	1

Depois de identificadas as proteínas e cruzando com os dados obtidos pela análise realizada no programa da *Nonlinear Dynamics, Progenesis SameSpots* (versão de demonstração) os resultados revelaram 7 proteínas (CPR1, FBA1, GPM1, PAB1, PGK1, TDH3, THI4) cuja variação de expressão em relação à condição controlo foi superior a duas vezes em, pelo menos, uma das condições testadas, e 7 (CYS4, HSP31, IPP1, LYS9, MRP8, SGT2, TPI1) que apresentaram uma variação entre 1,5 e 2 vezes em, pelo menos, uma das condições (Tabela 11).

De forma a compreender e relacionar as proteínas identificadas, recorreu-se à ferramenta computacional *SGD Gene Ontology Slim Mapper* [67] para agrupar as proteínas de acordo com a sua classificação na nomenclatura GO (*Gene Ontology*) de acordo com a sua função biológica (*Yeast GO-Slim: Function*) (Tabela 12), o processo biológico em que estão envolvidas (*Yeast GO-Slim: Process*) (Tabela 13) e a sua localização sub-celular (*Yeast GO-Slim: Component*) (Tabela 14).

Tabela 11. Variação da expressão das proteínas identificadas em células de *S. cerevisiae* expostas aos compostos em estudo. A descrição das proteínas foi obtida da base de dados SGD (*Saccharomyces Genome Database*) em: <http://www.yeastgenome.org>.

Proteína	Descrição	Variação da expressão			
		I.2	I.4	I.6	Dx
Cpr1p	Prolina Rotamase sensível a Ciclosporina A	1,5	1,2	-2,4	1,3
Cys4p	Cistationina beta-sintetase	-1,1	1	-1,1	-1,5
Eno1p	Enolase I	-1,1	-1,3	-1,1	-1,1
Eno2p	Enolase II	-1,1	-1,3	-1,1	-1,1
Fba1p	Fructose 1,6-bifosfato aldolase	-1,5	-1,6	-4,4	1,3
Gpm1p	Glicerato Fosfomutase	-1,5	-1,9	-11,6	-2,3
Hsp31p	Chaperona putativa e cisteína protease	1,7	1,6	1,2	-1,3
Ipp1p	Pirofosfatase Inorgânica	-1,7	-1,7	1,3	-1,9
Lys9p	<i>Saccharopine</i> desidrogenase	1	-1,8	-1,4	-1,4
Mrp8p	Proteína Ribossomal Mitocôndrial	1,2	1,9	1,5	1,2
Pab1p	Proteína de ligação Poly(A)	-1,1	1,7	3,5	-1,9
Pgk1p	3-FosfoGlicerato cinase	-1,5	-1,1	-1,1	-2,9
Sgt2p	Proteína tetratricopeptídica rica em glutamina	1,1	-1,2	1,2	1,5
Tdh3p	Desidrogenase triose-fosfato	1,1	1,2	2,5	-1,5
Thi4p	Tiazole sintetase	1,3	1,1	1,8	-2,4
Tpi1p	Isomerase triose-fosfato	1,1	-1,1	-1,8	1,1
Tsa1p	Tioredoxina peroxidase	1,2	1,3	1,1	1

Na Tabela 12 estão agrupadas as proteínas que foram identificadas tendo em conta a sua função na célula. Estão ainda descritos dados como a frequência no conjunto de proteínas identificadas e a frequência das proteínas no genoma da levedura.

Tabela 12. Agrupamento por função biológica das proteínas identificadas. Este agrupamento foi realizado recorrendo ao *software SGD Gene Ontology Slim Mapper* disponível na base de dados SGD em www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl

Função	Frequência	Frequência		Proteína(s)
		no	Genoma	
Liase	23.5%	1.3%		Cys4p,Eno1p,Eno2p,Fba1p
Isomerase	17.6%	0.9%		Tpi1p,Cpr1p,Gpm1p
Ligação de Proteínas	17.6%	9.7%		Ipp1p,Hsp31p,Tsa1p
Desconhecida	17.6%	31.6%		Thi4p,Mrp8p,Sgt2p
Oxidoreductase	17.6%	4.3%		Tdh3p,Tsa1p,Lis9p
Hidrolase	11.8%	13.2%		Ipp1p,Hsp31p
Peptidase	5.9%	2.1%		Hsp31p
Ligação ao ARN	5.9%	10.9%		Pab1p
Transferase	5.9%	11.4%		Pgk1p

No que diz respeito aos dados relativos ao agrupamento das proteínas identificadas consoante os processos celulares em que estão envolvidas, podemos verificar, através da análise dos dados presentes na Tabela 13, que existe uma grande preponderância de proteínas envolvidas quer na produção de energia quer no metabolismo de hidratos de carbono.

Tabela 13. Agrupamento por processo biológico das proteínas identificadas. Este agrupamento foi realizado com base no *software SGD Gene Ontology Slim Mapper* disponível na base de dados SGD em www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl

Processo	Frequência	Frequência no Genoma	Proteína(s)
Produção de energia	41.2%	2.9%	Pgk1p,Tpi1p,Tdh3p, Eno1p,Eno2p,Fba1p, Gpm1p
Metabolismo de hidratos de carbono	41.2%	4.3%	Pgk1p,Tpi1p,Tdh3p, Eno1p,Eno2p,Fba1p, Gpm1p
Organização do vacúolo	11.8%	1%	Eno1p,Eno2p
Tradução	11.8%	11%	Pab1p,Tsa1p
Resposta a stress	11.8%	9.2%	Tsa1p,Sgt2p
Ciclo celular	11.8%	8.2%	Cpr1p,Tsa1p
Metabolismo de aminoácidos	11.8%	4.0%	Cys4p,Lys9p
Organização membranas	11.8%	4.4%	Eno1p,Eno2p
Processo biológico desconhecido	11.8%	19.7%	Hsp31p,Mrp8p
<i>Folding</i> de proteínas	5.9%	1.4%	Tsa1p
Organização de cromossomas	5.9%	6.2%	Cpr1p
Metabolismo do ARN	5.9%	18.6%	Pab1p
Resposta a estímulos químicos	5.9%	5.0%	Tsa1p
Transporte	5.9%	16.3%	Sgt2p
Processos de sinalização	5.9%	3.8%	Tsa1p
Metabolismo de vitaminas	5.9%	1%	Thi4p
Organização mitocondrial	5.9%	4.9%	Thi4p
Modificação de proteínas	5.9%	8.7%	Cpr1p
Meiose	5.9%	2.5%	Cpr1p
Homeostasia	5.9%	2.3%	Tsa1p
Metabolismo do ADN	5.9%	6.3%	Tsa1p
Esporulação	5.9%	2%	Cpr1p
Metabolismo heterocíclico	5.9%	3%	Thi4p
Metabolismo de compostos aromáticos	5.9%	1.3%	Thi4p
Outro	5.9%		Ipp1p

De acordo com o resultado do agrupamento das proteínas identificadas por localização sub-celular, pode-se verificar, ao consultar a Tabela 14, que a grande maioria das proteínas identificadas encontra-se localizada no citoplasma ou na mitocôndria.

Tabela 14. Agrupamento por localização sub-celular das proteínas identificadas. Este agrupamento foi realizado recorrendo ao programa *SGD Gene Ontology Slim Mapper* disponível na base de dados SGD em www.yeastgenome.org/cgibin/GO/goSlimMapper.pl

Localização	Frequência	Frequência no Genoma	Proteína(s)
Citoplasma	94.1%	60.0%	Ipp1p, Pgc1p, Tpi1p, Cpr1p, Pab1p, Thi4p, Cys4p, Tdh3p, Eno1p, Eno2p, Fba1p, Mrp8p, Gpm1p, Tsa1p, Lys9p, Sgt2p
Mitocôndria	58.8%	17.7%	Pgc1p, Tpi1p, Cpr1p, Thi4p, Cys4p, Tdh3p, Eno1p, Eno2p, Fba1p, Gpm1p
Fracção Membranar	29.4%	3.2%	Pgc1p, Tpi1p, Tdh3p, Eno1p, Eno2p
Núcleo	11.8%	32.8%	Cpr1p, Pab1p
Vacúolo	11.8%	3.3%	Eno1p, Eno2p
Ribossoma	5.9%	5.6%	Pab1p
Membrana	5.9%	18.4%	Eno2p
Parede celular	5.9%	1.6%	Tdh3p
Cromossoma	5.9%	5.3%	Cpr1p
Outro	5.9%		Hsp31p

3.4.1. Análise dos efeitos do composto Dx no proteoma da levedura *S. cerevisiae*

A exposição da levedura *S. cerevisiae* ao fármaco Dx teve por objectivo servir de referência a este estudo servindo para comparar os proteomas originados após a exposição aos compostos em estudo e cujo mecanismo de acção ainda é completamente desconhecido. Neste ensaio foram detectadas, de entre as proteínas identificadas, oito proteínas (Cys4p, Gpm1p, Ipp1p, Pab1p, Pgc1p, Sgt2p, Tdh3p, Thi4p) com níveis de expressão com variação superior a 1,5 vezes quando comparados com a amostra controlo. De todas as proteínas que mostraram variação igual ou superior a 1,5 vezes na sua expressão apenas uma (Sgt2p) apresentou um aumento da sua expressão em relação ao ensaio controlo. Todas as outras proteínas se apresentaram reprimidas. De entre as proteínas identificadas que apresentaram uma variação de expressão, destacam-se as proteínas Gpm1p, Pgc1p e Thi4p.

A proteína Gpm1p surge mais uma vez neste estudo como uma das proteínas cuja expressão foi reprimida. É a única proteína que surge em todos os ensaios com uma variação negativa igual ou superior a 1,5 vezes em relação ao ensaio controlo.

Neste ensaio a proteína Pgc1p surge como a proteína com o nível de expressão mais afectado. Denominada por 3-fosfoglicerato cinase, catalisa a transferência de grupos fosforil altamente energéticos de 1,3-bisfosfoglicerato para adenosina difosfato (ADP) formando adenosina trifosfato (ATP). Localizada no citoplasma, na mitocôndria e na membrana celular é uma enzima chave na glicólise e na gluconeogénese.

Neste ensaio a proteína Pgk1p surge como a proteína com o nível de expressão mais afectado. Denominada por 3-fosfoglicerato cinase, catalisa a transferência de grupos fosforil altamente energéticos de 1,3-bisfosfoglicerato para ADP formando ATP. Localizada no citoplasma, na mitocôndria e na membrana celular é uma enzima chave na glicólise e na gluconeogénese.

Outra das proteínas cuja expressão foi afectada por acção da exposição à Dx foi a proteína Thi4p. Catalisadora da formação de um intermediário de tiazole durante a biossíntese de tiamina, esta proteína é também necessária para assegurar a estabilidade do genoma mitocondrial em resposta a agentes que podem causar mutações no de ADN [68]. Tendo em linha de conta o conhecimento adquirido sobre o modo de acção da Dx e sabendo que esta actua directamente no ADN por intercalação, quebra de cadeias e inibição da enzima topoisomerase II, causando também alterações na expressão proteica, estas alterações na expressão de Thi4p podem assim ser justificadas.

3.4.2. Análise dos efeitos do composto I.2 no proteoma da levedura *S. cerevisiae*

Após exposição da levedura *S. cerevisiae* ao composto I.2 foram detectadas, de entre todas as proteínas identificadas, seis proteínas (Cpr1p, Fba1p, Gpm1p, Hsp31p, Ipp1p, Pgk1p) com níveis de expressão com variação superior a 1,5 vezes quando comparados com a amostra controlo. Destas, quatro (Fba1p, Gpm1p, Ipp1p, Pgk1p) demonstraram diminuição dos níveis de expressão. Três (Fba1p, Gpm1p, Pgk1p) apresentaram uma diminuição do nível de expressão em 1,5 vezes e uma (Ipp1p) apresentou uma diminuição de 1,7 vezes. As restantes duas proteínas (Cpr1p, Hsp31p) revelaram um aumento dos níveis de expressão em 1,5 e 1,7 vezes, respectivamente. De entre as proteínas identificadas que apresentaram uma variação de expressão, destacam-se as proteínas Ipp1p e Hsp31p.

Ipp1p é uma proteína que exhibe actividade enzimática e é denominada de difosfatase inorgânica. Sabe-se que é uma proteína citoplasmática e actua hidrolizando moléculas de difosfato inorgânico (PPI) resultando dessa hidrólise duas moléculas de fosfato (Pi). Inserida no metabolismo dos fosfatos, é uma proteína essencial para a célula e estudos onde foram utilizados mutantes nos quais esta proteína não é expressa demonstraram que os mesmos são inviáveis. Sabe-se também que a sua repressão, como acontece no caso deste estudo, diminui o *fitness* competitivo da célula [68, 69].

Segundo a SGD, a proteína Hsp31p exhibe actividade de hidrolase, peptidase e possivelmente de chaperona. Com semelhanças com a proteína Hsp31 existente em *Escherichia coli*, o processo biológico e a sua localização sub-celular em *S. cerevisiae* ainda não são conhecidos sabendo-se apenas que a sua expressão aumenta quando as células são sujeitas a alguma condição de stress [68, 69]. Analisando os valores obtidos para a expressão desta proteína em células de *S.*

Cerevisiae cultivadas na presença do composto I.2 é visível que este composto induziu a sobre-expressão desta proteína (ainda que não em níveis considerados muito elevados).

3.4.3. *Análise dos efeitos do composto I.4 no proteoma da levedura S. cerevisiae*

Quando as células de levedura *S. cerevisiae* foram expostas ao composto I.4 foi possível identificar sete proteínas (Fba1p, Gpm1p, Hsp31p, Ipp1p, Lys9p, Mrp8p, Pab1p) cujos níveis de expressão variaram mais do que 1,5 vezes em relação à amostra controlo. Destas, quatro (Fba1p, Gpm1p, Ipp1p, Lys9p) demonstraram uma diminuição dos seus níveis de expressão. Em oposição, as três restantes (Hsp31p, Mrp8p, Pab1p) apresentaram um aumento do seu nível de expressão. De entre as proteínas identificadas que apresentaram uma variação de expressão, destacam-se as proteínas Gpm1p, Lys9p e Mrp8p, com variações de -1,9, -1,8 e +1,9, respectivamente.

A proteína Gpm1p está envolvida no metabolismo energético e no metabolismo de hidratos de carbono. Localizada no citoplasma e na mitocôndria possui actividade de fosfoglicerato mutase, assumindo portanto um papel importante na via glicolítica e na gluconeogénese onde medeia a conversão de 3-fosfoglicerato a 2-fosfoglicerato e *vice-versa* [68, 69]. A redução da sua expressão conduziu a uma taxa de crescimento mais baixa [68], facto que foi possível verificar no ensaio em análise.

Lys9p é uma *saccharopine* desidrogenase e exhibe actividade de oxireductase [69]. Presente no citoplasma, está integrada na via metabólica de biossíntese de lisina. Sabe-se que um aumento de expressão desta proteína leva a um aumento da resistência da levedura a toxinas e que mutantes cujo gene foi deletado apresentam-se como viáveis [68]. No caso do ensaio efectuado, verificou-se um decréscimo da expressão de Lys9p, contudo, não foi possível obter dados que confirmem um efeito desta mesma redução.

Proteína de função desconhecida, a Mrp8p está localizada no citoplasma [68]. Tendo por base a análise da sua sequência pensa-se que seja uma proteína ribossomal mitocondrial [70]. Embora a sua função e os processos biológicos em que está envolvida sejam desconhecidos sabe-se que a sua transcrição é induzida, como acontece neste caso, quando a membrana celular é sujeita a condições de stress [71].

3.4.4. *Análise dos efeitos do composto I.6 no proteoma da levedura S. Cerevisiae*

De acordo com os dados obtidos, a exposição da levedura *S. cerevisiae* ao composto I.6 levou à detecção, de entre todas as proteínas identificadas, de oito proteínas (Cpr1p, Fba1p, Gpm1p, Mrp8p, Pab1p, Tdh3p, Thi4p, Tpi1p) cujos níveis de expressão apresentaram uma variação superior a 1,5 vezes em relação à condição controlo. Destas oito proteínas, quatro (Cpr1p, Fba1p,

Gpm1p, Tpi1p) demonstraram uma diminuição dos níveis de expressão e quatro (Mrp8p, Pab1p, Tdh3p, Thi4p) apresentaram um aumento no nível de expressão. Com variações de expressão, relativamente ao ensaio controlo, de -2,4, -4,4, -11,6, +3,5, +2,5 e -1,8, evidenciam-se as proteínas Cpr1p, Fba1p, Gpm1p, Pab1p, Tdh3p e Tpi1p, respectivamente.

A proteína Cpr1p possui actividade de isomerase e funciona como alvo de ligação do composto ciclosporina A. Nos mutantes onde foi eliminado o gene que codifica para esta proteína, verificou-se um aumento da resistência à ciclosporina A. Presente no citoplasma, no núcleo e nos cromossomas, a proteína Cpr1p está envolvida em vários processos celulares, nomeadamente: regulação do ciclo celular, através da regulação negativa da meiose; organização dos cromossomas; e esporulação [68]. Sabe-se também que a actividade de Cpr1p permite uma localização sub-celular adequada à proteína Zpr1p. Zpr1p é uma proteína essencial que com conformação tridimensional, com um íão de zinco ligado e que permite a ligação ao ADN [72].

No caso da proteína Fba1p, houve uma repressão considerável de -4,4 vezes em relação ao controlo. Esta proteína possui actividade de aldolase e encontra-se envolvida no metabolismo energético e de hidratos de carbono. Localizada no citoplasma e na mitocôndria tem um papel importante na via glicolítica, na gluconeogénese e na fermentação de glucose. Esta proteína catalisa a reacção, dependente de zinco, entre dihidroxiacetona e gliceraldeído-3-fosfato para a formação de frutose-1,6-bisfosfato, e *vice-versa* [69]. A sua repressão, devido ao facto de ser mais uma proteína em que o zinco tem um papel importante, tal como acontece com a proteína Cpr1p, leva a crer que o composto I.6 pode ter um modo de acção preferencial para este tipo de proteínas.

Em relação à proteína Gpm1p (anteriormente referida), é de salientar o facto de neste ensaio se ter observado uma repressão de 11,6 vezes em relação ao ensaio controlo. É a variação mais marcante que foi obtida em qualquer um dos ensaios efectuados.

Uma proteína que apresentou níveis de expressão elevados em relação ao controlo foi a proteína Pab1p. Presente no citoplasma, no ribossoma e no núcleo, é uma proteína de ligação poli(A) que está envolvida no controlo do comprimento da cauda poli(A) e que medeia interações entre a estrutura *cap* 5' e a cauda 3' poli(A) do mARN desempenhando um papel importante nas vias de expressão génica. Em adição, pensa-se que podem actuar como antagonistas à ligação de factores que levam à degradação do mARN, regulando assim a sua "longevidade" [68, 69]. O seu aumento de expressão neste ensaio pode estar relacionado com a formação de grânulos de stress, agregações densas que se formam no citoplasma quando a célula está sob condições de stress e, que são constituídas por proteínas e ARN's [68, 73, 74].

Tdh3p é outra das proteínas que revelou uma expressão aumentada. Com a designação de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e localizada no citoplasma e na membrana celular, é responsável pela catálise da reacção na qual gliceraldeído-3-fosfato dá origem a 1,3-bis-fosfoglicerato e está presente na via glicolítica e na gluconeogénese [68]. Pensa-se que esteja

também envolvida no processo de apoptose e no metabolismo de espécies reactivas de oxigénio [75].

A proteína Tpi1p surgiu neste ensaio com uma repressão da expressão relativamente ao ensaio controlo. Com actividade de isomerase é uma proteína abundante na via glicolítica, está localizada no citoplasma, na mitocôndria e na membrana citoplasmática [68]. Um estudo de 1996 revelou que a ausência desta proteína leva a uma mudança de produto final no catabolismo da glucose [76], passando este de etanol a glicerol. Num estudo posterior foi também demonstrado que o mutante com o gene silenciado que codifica para a proteína Tpi1p é incapaz de crescer com glucose como a única fonte de carbono [77].

4. Conclusão e perspectivas futuras

Os resultados obtidos durante este estudo permitiram identificar algumas das potenciais proteínas que poderão estar envolvidas nos mecanismos subjacentes à resistência da levedura *S. cerevisiae* BY4741 quando exposta a estes novos compostos.

Um dos objectivos principais deste estudo era o de identificar quais os alvos biológicos afectados pela exposição a estes compostos e tentar clarificar o seu modo de acção, tendo como base um composto amplamente utilizado na terapêutica oncológica, a Dx.

Deste modo, foram determinadas as CMI para cada um dos compostos e de seguida efectuou-se a caracterização do crescimento da levedura e a determinação do número de células viáveis através da determinação do número de UFC/mL em cada uma das culturas. Depois de caracterizados os crescimentos celulares procedeu-se à análise e comparação do proteoma da levedura quando esta foi exposta aos compostos. As proteínas que apresentaram diferenças ao nível da expressão foram identificadas com o objectivo de ser possível uma associação entre estas e a(s) possível ou possíveis via(s) metabólica(s) em que estivessem envolvidas, para que assim fosse possível identificar o modo de acção dos respectivos compostos.

A 1ª fase do trabalho, baseou-se no estudo do comportamento da levedura quando na presença de várias concentrações de DMSO e na determinação da CMI relativa aos compostos em estudo. Daqui conclui-se que a cinética de crescimento da levedura não sofreu efeitos perceptíveis até uma concentração de 1% (v/v) de DMSO, apresentando contudo alterações para concentrações superiores como se verifica nos resultados obtidos para uma concentração de 3% (v/v). No que diz respeito à determinação da CMI para cada um dos compostos podemos verificar que o composto I.2 apresentou a CMI mais baixa, 0,035 μM , e para o composto I.4 foi determinada uma CMI de 4 μM , a mais elevada apresentada pelos compostos em estudo. Os compostos I.6 e Dx apresentaram CMI de valores intermédios de 0,61 e 0,055 μM , respectivamente. Através da análise destes valores podemos verificar que I.2 e Dx se apresentam como os compostos com uma maior actividade inibitória. A partir destes valores de CMI foram determinadas as concentrações de cada composto a utilizar nas fases posteriores do trabalho. Essas concentrações foram calculadas tendo em conta o comportamento da levedura quando exposta aos compostos. Foram utilizadas concentrações nas quais foi visível uma alteração no crescimento da levedura reflectida por uma diminuição substancial da taxa de crescimento (μ_c) em relação ao crescimento na condição controlo (sem adição de composto).

Terminada esta fase do estudo, prosseguiu-se para a 2ª fase onde se caracterizou o crescimento e determinou o número de células viáveis de levedura quando esta se encontra exposta aos diferentes compostos. Durante esta fase verificou-se que as células crescidas na presença do composto I.6 foram as que apresentaram a μ_c mais baixa de entre todos os compostos testados. Verificou-se também que o composto I.6 foi o que apresentou uma menor redução do número de células viáveis ao fim de 24 h de exposição. Os dados obtidos através

destes ensaios permitiram clarificar o comportamento da levedura nas condições testadas e a partir daí seleccionar quais os parâmetros a serem utilizados na análise proteómica.

Depois de recolhidas as células e obtido o extracto proteico, foi realizada a análise proteómica para todos os compostos em estudo. No total, e até à data de conclusão deste estudo, foram identificadas 17 proteínas. As proteínas identificadas foram agrupadas por função, localização sub-celular e por processos biológicos onde se encontram envolvidas, através da ferramenta computacional *SGD Gene Ontology Slim Mapper* [67]. Esta análise foi feita com o intuito de verificar se existia um padrão nas proteínas cuja expressão foi afectada de modo a clarificar deste modo o mecanismo de acção de cada composto, uma vez que se tratam de compostos cujos modos de acção ainda não se encontram descritos. Da análise dos resultados foi possível concluir que grande parte das proteínas identificadas está relacionada com o metabolismo energético, com particular destaque para uma proteína que mostrou níveis interessantes de repressão para todos os compostos em estudo, a proteína Gpm1p, uma proteína com um papel importante na glicólise e na gluconeogénese. Para além disso, foi visível através da comparação computacional dos proteomas, que foi com a exposição ao composto I.6 que se obtiveram proteínas com variações mais elevadas, onde proteínas como Fba1p, Gpm1p, Pab1p e Tdh3p apresentaram variações de -4,4, -11,6, +3,5 e +2,5, respectivamente. Um outro dado bastante interessante foi o facto de duas das proteínas que apresentaram uma alteração de expressão significativa no ensaio com composto I.6 estarem de alguma forma relacionadas com o metal zinco (Cpr1p e Fba1p), o que poderá sugerir que este composto pode actuar de forma preferencial sobre este tipo de proteínas. Adicionalmente, também foi possível verificar a sobre-expressão da proteína Pab1p, associada à formação de grânulos de stress no citoplasma quando a levedura se encontra expostas a condições desfavoráveis [73, 74]. Nos outros ensaios com os compostos I.2 e I.4, verificou-se que a expressão foi alterada mais do que 1,9 vezes. No entanto, é necessário ter em conta que ainda se encontram por identificar um número significativo de proteínas que foram enviadas posteriormente para análise. Em relação ao fármaco Dx, que foi utilizado com o objectivo de estabelecer uma analogia entre o mecanismo e a forma de acção dos novos compostos, não se verificaram semelhanças entre as proteínas que apresentaram a sua expressão alterada com os novos compostos e as proteínas com expressão alterada após exposição a Dx não sendo possível, com os dados obtidos, estabelecer ou inferir alguma semelhança entre os modos de acção dos novos compostos e os modos de acção da Dx.

De um modo geral, e tendo em conta os resultados obtidos este estudo apresenta uma análise preliminar destes novos compostos com potencial anti-tumor e do comportamento da levedura *S. cerevisiae* quando exposta à sua presença.

No entanto, estudos adicionais são necessários para que seja possível identificar qual o mecanismo de acção destes compostos bem como a posterior validação dos alvos biológicos destes compostos. Assim, estudos futuros poderão considerar uma análise do fenótipo de um

conjunto de mutantes da levedura *S. cerevisiae* em que todos os genes não essenciais tenham sido individualmente eliminados. Desta forma será possível identificar quais os genes envolvidos na susceptibilidade alterada a estes compostos. Adicionalmente, também seria interessante efectuar a expressão heteróloga na levedura com o objectivo de realizar estudos funcionais detalhados, com particular ênfase na actividade biológica de eventuais bombas de efluxo associadas a este tipo de compostos.

Assim, utilizando em conjunto os resultados obtidos neste estudo e as futuras novas abordagens, espera-se que seja possível clarificar o modo como estes compostos com potencial anti-tumor actuam subsequentemente estabelecer uma abordagem inovadora com aplicabilidade na área da terapêutica oncológica.

5. Referências bibliográficas

1. Longe, J.L., ed. *The Gale Encyclopedia of Cancer : A Guide to Cancer and Its Treatments*. Second Edition ed. Vol. 1. 2005, Thomson Gale: Farmington Hills. 192-198.
2. Ruddon, R.W., ed. *Cancer Biology*. Fourth Edition ed. 2007, Oxford University Press, Inc.: New York. 192-193.
3. WHO. *World Health Organization*. Available from: <http://www.who.int/>.
4. Menacho-Marquez, M. and J.R. Murguia, *Yeast on drugs: Saccharomyces cerevisiae as a tool for anticancer drug research*. Clin Transl Oncol, 2007. **9**(4): p. 221-8.
5. NCI. *National Cancer Institute*. Doxorubicin hydrochloride; Available from: <http://www.cancer.gov/drugdictionary/?CdrID=38860>.
6. Westmoreland, T.J., et al., *Comparative genome-wide screening identifies a conserved doxorubicin repair network that is diploid specific in Saccharomyces cerevisiae*. PLoS One, 2009. **4**(6): p. e5830.
7. Buschini, A., P. Poli, and C. Rossi, *Saccharomyces cerevisiae as an eukaryotic cell model to assess cytotoxicity and genotoxicity of three anticancer anthraquinones*. Mutagenesis, 2003. **18**(1): p. 25-36.
8. Hammer, E., et al., *Proteomic analysis of doxorubicin-induced changes in the proteome of HepG2 cells combining 2-D DIGE and LC-MS/MS approaches*. Proteomics, 2010. **10**(1): p. 99-114.
9. Ferguson, L.R. and B.C. Baguley, *Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzymes*. Mutat Res, 1996. **355**(1-2): p. 91-101.
10. Fornari, F.A., Jr., et al., *Growth arrest and non-apoptotic cell death associated with the suppression of c-myc expression in MCF-7 breast tumor cells following acute exposure to doxorubicin*. Biochem Pharmacol, 1996. **51**(7): p. 931-40.
11. Ramachandran, C., et al., *Doxorubicin-induced DNA breaks, topoisomerase II activity and gene expression in human melanoma cells*. Biochem Pharmacol, 1993. **45**(6): p. 1367-71.
12. Cullinane, C., et al., *Formation of adriamycin--DNA adducts in vitro*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(12): p. 2296-303.
13. Skladanowski, A. and J. Konopa, *Relevance of interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines for their biological activity*. Biochem Pharmacol, 1994. **47**(12): p. 2279-87.
14. Skladanowski, A. and J. Konopa, *Interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines in tumour cells*. Biochem Pharmacol, 1994. **47**(12): p. 2269-78.
15. Tuteja, N., et al., *Inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of human DNA helicase II by chemotherapeutic agents*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **236**(3): p. 636-40.
16. Bachur, N.R., S.L. Gordon, and M.V. Gee, *A general mechanism for microsomal activation of quinone anticancer agents to free radicals*. Cancer Res, 1978. **38**(6): p. 1745-50.
17. Vichi, P., S. Robison, and T.R. Tritton, *Temperature dependence of adriamycin-induced DNA damage in L1210 cells*. Cancer Res, 1989. **49**(20): p. 5575-80.
18. Vichi, P. and T.R. Tritton, *Adriamycin: protection from cell death by removal of extracellular drug*. Cancer Res, 1992. **52**(15): p. 4135-8.
19. Hershman, D.L., et al., *Doxorubicin, cardiac risk factors, and cardiac toxicity in elderly patients with diffuse B-cell non-Hodgkin's lymphoma*. J Clin Oncol, 2008. **26**(19): p. 3159-65.
20. Jr., R.E.L., Osteen, Robert T., Gansler, Ted, ed. *Clinical Oncology: American Cancer Society's*. Third Edition ed. 2001, Blackwell Publishing: Atlanta. 243-244.

21. Merck. *Doxorubicin Drug Information*. Available from: <http://www.merck.com/mmpe/lexicomp/doxorubicin.html>.
22. Schwendener, R.A.; Available from: <http://www.imcr.uzh.ch/static/onkwww/noac2.htm>.
23. Ho, Y.P., S.C. Au-Yeung, and K.K. To, *Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives*. *Med Res Rev*, 2003. **23**(5): p. 633-55.
24. Fillastre, J.P. and G. Raguenez-Viotte, *Cisplatin nephrotoxicity*. *Toxicol Lett*, 1989. **46**(1-3): p. 163-75.
25. von Schlippe, M., C.J. Fowler, and S.J. Harland, *Cisplatin neurotoxicity in the treatment of metastatic germ cell tumour: time course and prognosis*. *Br J Cancer*, 2001. **85**(6): p. 823-6.
26. Aust, S.D., L.A. Morehouse, and C.E. Thomas, *Role of metals in oxygen radical reactions*. *J Free Radic Biol Med*, 1985. **1**(1): p. 3-25.
27. Linder, M.C. and M. Hazegh-Azam, *Copper biochemistry and molecular biology*. *Am J Clin Nutr*, 1996. **63**(5): p. 797S-811S.
28. Halliwell, B. and J.M. Gutteridge, *Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview*. *Methods Enzymol*, 1990. **186**: p. 1-85.
29. Rae, T.D., et al., *Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase*. *Science*, 1999. **284**(5415): p. 805-8.
30. Ma, Z., et al., *Synthesis, characterization, solid-state photo-luminescence and anti-tumor activity of zinc(II) 4'-phenyl-terpyridine compounds*. *J Inorg Biochem*, 2010. **104**(7): p. 704-11.
31. Daniel, K.G., et al., *Copper storage diseases: Menkes, Wilsons, and cancer*. *Front Biosci*, 2004. **9**: p. 2652-62.
32. Tisato, F., et al., *Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies*. *Med Res Rev*, 2010. **30**(4): p. 708-49.
33. Daniel, K.G., et al., *Organic copper complexes as a new class of proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human cancer cells*. *Biochem Pharmacol*, 2004. **67**(6): p. 1139-51.
34. Marzano, C., et al., *Copper complexes as anticancer agents*. *Anticancer Agents Med Chem*, 2009. **9**(2): p. 185-211.
35. Maret, W., *Biometals*. 2001(14): p. 187-190.
36. Pasteur, L., ed. *Studies on fermentation. The diseases of beer, their causes, and the means of preventing them*. 1879, Macmillan: London.
37. Buchner E, B.H., Hahn M., ed. *Die Zymasegärung*. ed. R. Oldenberg. 1987: München.
38. Daum, G., *The yeast Saccharomyces cerevisiae, a eukaryotic model for cell biology*. *Microsc Res Tech*, 2000. **51**(6): p. 493-495.
39. Feldmann, H., *Gene Function and Expression: Four Years of the Post-genomic Era of Yeast*. *Food technol. biotechnol.*, 2000. **38**: p. 237-252.
40. Galao, R.P., et al., *Saccharomyces cerevisiae: a versatile eukaryotic system in virology*. *Microb Cell Fact*, 2007. **6**.
41. Parsons, A.B., et al., *Yeast genomics and proteomics in drug discovery and target validation*. *Prog Cell Cycle Res*, 2003. **5**: p. 159-166.
42. EMBL-EBI. Available from: http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/eukaryotes/Saccharomyces_cerevisiae.html.
43. Foury, F., *Human genetic diseases: a cross-talk between man and yeast*. *Gene*, 1997. **195**.
44. Collier, J. and R. Parker, *Eukaryotic mRNA decapping*. *Annu Rev Biochem*, 2004. **73**: p. 861-90.
45. Schwartz DC Parker, R., ed. *Interaction of mRNA translation and mRNA degradation in Saccharomyces cerevisiae*. Sonenber NHJWBMMB ed. Translation control of gene expression. 2000, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York. 807-825.

46. Tsukuda T, F.A., Nickoloff JA, Osley MA., *Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 2005(438 (7066)): p. 379-383.
47. Hartwell, L.H. and M.B. Kastan, *Cell cycle control and cancer*. Science, 1994. **266**(5192).
48. Wilkins, M.R., et al., *Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it*. Biotechnol Genet Eng Rev, 1996. **13**: p. 19-50.
49. Mishra, N., ed. *Introduction to proteomics : principles and applications*. First Edition ed. 2010, John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey. 3-8.
50. Anderson, N.G. and N.L. Anderson, *Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future*. Electrophoresis, 1996. **17**(3): p. 443-53.
51. O'Farrell, P.H., *High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins*. J Biol Chem, 1975. **250**(10): p. 4007-21.
52. Palzkill, T., ed. *Proteomics*. First Edition ed. 2002, Kluwer Academic Publishers: New York.
53. Vogel, H.G., ed. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays*. Third Edition ed. 2008, Springer-Verlag: New York. 35-36.
54. Teixeira, M.C., et al., *A proteome analysis of the yeast response to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid*. Proteomics, 2005. **5**(7): p. 1889-1901.
55. Teixeira, M.C., et al., *Early transcriptional response of Saccharomyces cerevisiae to stress imposed by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid*. FEMS Yeast Res, 2006. **6**(2): p. 230-248.
56. Santos, P.M., T. Simoes, and I. Sa-Correia, *Insights into yeast adaptive response to the agricultural fungicide mancozeb: a toxicoproteomics approach*. Proteomics, 2009. **9**(3): p. 657-670.
57. Braconi, D., et al., *Proteomics and redox-proteomics of the effects of herbicides on a wild-type wine Saccharomyces cerevisiae strain*. J Proteome Res, 2009. **8**(1): p. 256-67.
58. Hirasawa, T., et al., *Proteomic analysis of responses to osmotic stress in laboratory and sake-brewing strains of Saccharomyces cerevisiae*. Process Biochemistry, 2009. **44**(6): p. 647-653.
59. Rustichelli, C., et al., *Proteomic analysis in the lichen Physcia adscendens exposed to cadmium stress*. Environ Pollut, 2008. **156**(3): p. 1121-7.
60. Pham, T.K. and P.C. Wright, *The proteomic response of Saccharomyces cerevisiae in very high glucose conditions with amino acid supplementation*. J Proteome Res, 2008. **7**(11): p. 4766-74.
61. Muroi, M., et al., *Application of Proteomic Profiling Based on 2D-DIGE for Classification of Compounds According to the Mechanism of Action*. Chemistry & Biology, 2010. **17**(5): p. 460-470.
62. Lee, K.-H., et al., *Proteomic analysis of anti-cancer effects by paclitaxel treatment in cervical cancer cells*. Gynecologic Oncology, 2005. **98**(1): p. 45-53.
63. Lorian, V., *Macroscopic Patterns of Bacteria after Development in Drops of Liquid Medium*. J Bacteriol, 1963. **86**: p. 582-4.
64. GE, *2-D Electrophoresis - Principles and Methods*, G. Healthcare, Editor. 2004.
65. GE. *2-D Clean Up Kit*. Available from: http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/2d_electrophoresis~2delectrophoresis_sample~2delectrophoresis_contaminant_removal~2d_cleanup_kit?OpenDocument&parentid=373775&moduleid=164990.
66. Andrews, J.M., *Determination of minimum inhibitory concentrations*. J Antimicrob Chemother, 2001. **48 Suppl 1**: p. 5-16.
67. SGD. *SGD Gene Ontology Slim Mapper*. Available from: <http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl>.

68. SGD. *Saccharomyces Genome Database*. Available from: <http://www.yeastgenome.org/>.
69. NCBI. *National Center for Biotechnology Information*. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
70. Bruckmann, A., et al., *Proteome analysis of aerobically and anaerobically grown Saccharomyces cerevisiae cells*. *J Proteomics*, 2009. **71**(6): p. 662-9.
71. Boorsma, A., et al., *Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2004. **21**(5): p. 413-27.
72. Ansari, H., G. Greco, and J. Luban, *Cyclophilin A peptidyl-prolyl isomerase activity promotes ZPR1 nuclear export*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(20): p. 6993-7003.
73. Buchan, J.R., D. Muhlrad, and R. Parker, *P bodies promote stress granule assembly in Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 2008. **183**(3): p. 441-55.
74. Grousl, T., et al., *Robust heat shock induces eIF2alpha-phosphorylation-independent assembly of stress granules containing eIF3 and 40S ribosomal subunits in budding yeast, Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 12): p. 2078-88.
75. Almeida, B., et al., *NO-mediated apoptosis in yeast*. *J Cell Sci*, 2007. **120**(Pt 18): p. 3279-88.
76. Compagno, C., F. Boschi, and B.M. Ranzi, *Glycerol production in a triose phosphate isomerase deficient mutant of Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Prog*, 1996. **12**(5): p. 591-5.
77. Compagno, C., et al., *Alterations of the glucose metabolism in a triose phosphate isomerase-negative Saccharomyces cerevisiae mutant*. *Yeast*, 2001. **18**(7): p. 663-70.