



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Complexos Polinucleares de Poliaminas com Platina(II) e Paládio(II) como Promissores Agentes Anticancerígenos Face ao Cancro da Próstata

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Maria Paula Marques (Universidade de Coimbra).

Carina Saraiva de Matos

2012

A meus Pais
Em memória da minha bisavó Teresa

Agradecimentos

Quero expressar os meus sinceros agradecimentos às pessoas que de uma forma ou de outra, estiveram envolvidas na realização desta tese de Mestrado.

À Doutora Maria Paula Marques, pela orientação científica, amizade, simpatia e oportunidades criadas, o meu muito obrigado.

À Doutora Carmen Jerónimo (IPO-Porto- grupo de epigenética do cancro) pela gentil cedência das células PNT2 e LNCaP.

À Doutora Ana Bela Sarmiento (FMUC) pela gentil cedência das células PC-3.

À Ana Lúcia, minha “mentora” pela partilha de conhecimentos, por me ter acompanhado desde o início e me ter ensinado a dar os primeiros passos. Pela sua amizade, paciência e pela ótima companhia. Obrigado!

À Patrícia João, agradeço o teu apoio, companhia, amizade e sábios conselhos!

Ao Rui Lopes, o meu obrigado por tudo. Pela amizade, pela prontidão em me ajudar e por me ensinar a questionar mais e a saber sempre mais!

A toda a equipa da Unidade Química -Física Molecular, obrigada por toda a simpatia e por terem feito com que me sentisse em casa.

Às minhas “bioamiguinhas”: Cátia, Jacinta e Inês. Obrigada pela companhia ao longo destes anos. Levo-vos comigo para onde quer que vá!

Não podia deixar de agradecer às minhas meninas da casa amarela. Cresci com vocês. Passe o tempo que passar, a nossa amizade não irá desvanecer.

Às minhas princesas! Obrigada por tornarem este mestrado mais fácil, simplesmente com a vossa companhia. Agradeço a vossa amizade e carinho.

Aos meus pais, por mais palavras que possa aqui escrever, sei que nunca vou conseguir agradecer o suficiente. Obrigada por fazerem de mim a pessoa que sou hoje.

Agradeço todas as palavras de apoio e de carinho e todo o amor que me dedicam. Espero que ainda se possam orgulhar muito de mim, pois eu com certeza me orgulho de vocês.

A todos os meus familiares, que de certa forma me influenciaram em muitos aspectos do que sou hoje, o meu obrigado. Agradeço-vos por incutirem em mim um espírito de querer saber mais e de fazer melhor, especialmente a minha avó Liberta que sempre me apoiou, deu carinho e sempre se preocupou.

Resumo

O cancro da próstata é o segundo cancro mais frequente e a sexta causa de morte provocada por cancro em homens, a nível mundial. Quando a terapia hormonal deixa de surtir efeito relativamente ao crescimento do tumor, este torna-se refratário a hormonas (HRPC) e devem ser administrados agentes quimioterapêuticos. Apesar de o Docetaxel representar o tratamento usualmente utilizado para pacientes com HRPC, este fármaco apresenta algumas desvantagens como o desenvolvimento de resistência. Quando tal ocorre, o prognóstico torna-se muito reservado, não existindo atualmente estratégias alternativas. Apesar da ideia generalizada de que os agentes de platina possuem uma atividade modesta face ao cancro da próstata, estes têm sido recentemente objeto de um crescente interesse, particularmente em regimes terapêuticos de combinação.

A cisplatina (*cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂) e outros agentes de Pt(II) são usados no tratamento de uma grande variedade de tumores, mas apresentam diversos efeitos secundários indesejáveis, como o desenvolvimento de resistência. Assim, surge a necessidade de proceder ao desenvolvimento de fármacos com um perfil citotóxico otimizado e uma menor toxicidade.

Vários complexos poliamínicos multinucleares, diferindo no número e natureza dos centros metálicos (Pt(II) ou Pd(II)), assim como no tipo de ligando amínico linear foram investigados neste estudo, face a linhas celulares humanas de cancro de próstata (PC-3, LNCaP e PNT2).

A capacidade de reduzir a viabilidade celular foi testada pelo método do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), correspondendo esta etapa a um varrimento inicial dos vários complexos sintetizados e caracterizados no laboratório da QFM-UC (Unidade “Química-Física Molecular” – Universidade de Coimbra), de modo a escolher apenas os que apresentassem uma atividade promissora. Através deste estudo foi possível concluir que diferenças a nível do centro metálico e ligando alteram consideravelmente a atividade citotóxica deste tipo de compostos.

Para o complexo selecionado (Pd₂-Spm, Spm=espermina, H₂N(CH₃)₃NH(CH₃)₄NH₂)₂) procedeu-se a um estudo *in vitro* da sua capacidade antiproliferativa, recorrendo ao método da SRB (Sulforrodamina B). Verificou-se que este quelato possui uma atividade antiproliferativa promissora face às linhas celulares testadas, sendo mais eficaz do que a cisplatina. O estudo da reversibilidade do efeito deste composto permitiu inferir que o Pd₂-Spm deverá ter alvos biológicos para além do DNA, atuando de alguma forma a nível do ciclo celular. Assim, foi efetuado um estudo do efeito combinado de Pd₂-Spm com cisplatina, verificando-se que ambos atuam de forma sinérgica.

Abstract

Prostate cancer is the second most common cancer worldwide and the sixth cause of cancer-related death in men. When hormone therapy fails to control tumour growth, hormone refractory prostate cancer (HRPC) occurs and chemotherapy drugs must be administered. Docetaxel represents the actual standard care for patients with HRPC, although this drug has some drawbacks such as acquired resistance and poor prognosis. Despite the former belief that platinum drugs have a modest activity against prostate cancer, these agents have more recently been the object of a growing interest, in particular in combination therapeutic regimens. Cisplatin (*cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂) and its Pt(II) analogues are commonly used against a variety of cancers. However, they induce several deleterious side-effects and acquired resistance, which often limits their clinical application. In order to overcome these injurious side-effects, new strategies are needed, such as the development of new drugs with an optimised cytotoxic profile and a lower toxicity.

Polyamine multinuclear complexes, differing in the number and nature of the metal centres (Pt (II) or Pd (II)) as well in the type of linear amine ligand were investigated in this study, towards human prostate cancer cell lines (PC-3, LNCaP and PNT2).

The ability to reduce cell viability was tested by the MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) method, as an initial screening of the different complexes synthesised and characterised at QFM-UC (“Química-Física Molecular” research Unit – University of Coimbra). This study allowed to conclude that the differences in both the metal centre and the ligands considerably alter the cytotoxic activity of the compounds.

The *in vitro* antiproliferative capacity of the selected compound (Pd₂-Spm) was assessed through the SRB (Sulforhodamine B) assay. In the light of the gathered results it may be concluded that this compound displays a promising growth-inhibitory activity towards the tested cell lines, being more effective than cisplatin. The study of the reversibility of the drug effect evidenced that Pd₂-Spm should target not only DNA, acting in some way at the cell cycle level. Therefore, a study on the combination of Pd₂-Spm with cisplatin was performed, a synergistic effect having been detected.

Índice

Introdução

1.1. Cancro

1.1.1. Principais Tipos Histológicos Tumorais

1.2. Poliaminas

1.2.1. Metabolismo de Poliaminas

1.2.2. Poliaminas e Ciclo Celular

1.2.3. Poliaminas e Cancro

1.3 Cancro da Próstata

1.3.1. Diagnóstico e Estadiamento do Tumor

1.3.2 Cancro da Próstata Refratário a Hormonas

1.3.3. Poliaminas e cancro da próstata

1.3.4 Estratégias Terapêuticas Contra o Cancro da Próstata

1.3.4. A-Taxanos

1.3.4. B.- Cisplatina

1.3.4.B.1.- Química e Mecanismo de Acção

1.3.4.B.2 Mecanismos de Reparação dos Adutos Cisplatina-DNA

1.3.4.B.3 Mecanismos de Resistência à Cisplatina

1.3.4.B.4. Desenvolvimento de Análogos

1.3.4.B.4.1.- Análogos de Segunda Geração

1.3.4.B.4.2.- Análogos de Terceira Geração

1.3.4.B.5- Desenvolvimento de Complexos Polinucleares de Platina

1.3.3.B.6 Agentes de Platina no Cancro da Próstata

1.3.4.C. Complexos Antitumorais de Paládio(II)

1.3.4.D.- Complexos de Pt(II) e Pd(II) com Ligandos de Poliaminas

1.4. Objetivos

Materias e Métodos

2.1. Reagentes, Materiais e Equipamento

2.2. Modelos Biológicos

2.3. Métodos

2.3.1. Ensaio Biológicos

2.3.1.1. Cultura Celular

2.3.1.2. Curvas de Crescimento

2.3.1.3.- Avaliação de Atividade

2.3.1.3.1. – Preparação dos Compostos

2.3.1.2. Ensaio de Citotoxicidade

2.3.1.2.1 A. Determinação da Viabilidade Celular pelo Método do MTT

2.3.2.2.1.B. Determinação da Proliferação Celular pelo Método da SRB

2.4. Análise Estatística

Resultados e Discussão

3.1. Determinação das Condições Experimentais Adequadas à Realização dos Ensaio de Citotoxicidade

3.1.1 Avaliação de Atividade Citotóxica

3.1.2. Seleção dos Compostos

3.2. Ensaio com o Pd₂-Spm

3.3 Ensaio com a Cisplatina

3.4. Comparação do Efeito da Cisplatina e do Complexo Pd₂-Spm

3.5. Ensaio com Combinações (Pd₂-Spm + Cisplatina)

Conclusões

4. Conclusões

Referências

5. Referências

Anexos

Lista de símbolos e abreviaturas

1.Introdução

1.1 Cancro

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo. Nos países desenvolvidos a mortalidade devido a esta doença apresenta valores mais expressivos [1], o que se explica parcialmente devido aos hábitos sedentários que se instalaram na sociedade atual e à adoção de outros comportamentos que favorecem o aparecimento de neoplasias, como é o caso do consumo de tabaco e dietas prejudiciais. O desenvolvimento de células tumorais pode iniciar-se virtualmente em qualquer parte do corpo e em 2008 foi responsável por 13% do número total de mortes em todo o mundo (cerca de 7.6 milhões).

Factores genéticos e ambientais podem ser mutuamente responsáveis pelo desenvolvimento desta doença. A predisposição genética, em particular, pode resultar de mutações herdadas nos genes que estão diretamente envolvidos no crescimento e proliferação celulares [2].

Apesar do emergente desenvolvimento tecnológico e teórico em áreas como a biologia celular e molecular, genética e bioinformática, que têm levado a um aumento do conhecimento acerca da neoplasia, ainda não existe uma “bala mágica” para o tratamento do cancro. O aumento do conhecimento nestas áreas é contrabalançado com a frustração decorrente da tentativa de estabelecer uma terapia verdadeiramente efetiva para as neoplasias malignas mais comuns, das quais se destacam o cancro do pulmão, da mama, do trato gastrointestinal e da próstata. A nível mundial, os tipos mais frequentes de cancro (de acordo com o número de mortes globais) são os da mama, pulmão, próstata, colo do útero e colorectal (Figura 1.1) [1,2]. Avaliando a discriminação por sexo, as estatísticas mundiais apontam o cancro do pulmão como sendo o mais frequente nos homens e também o mais letal, tendo sido responsável por 951.000 mortes em 2008. O segundo tipo de cancro mais frequente nos homens é o cancro da próstata, que no entanto não corresponde ao segundo mais mortal. Tal posição é ocupada pelo cancro de fígado, que vitimou cerca de 478.300 indivíduos em 2008. O cancro da próstata ocupa a sexta posição, com 258.400 mortes estimadas a nível mundial nesse mesmo ano (Figura 1.1) [1].

No que diz respeito ao sexo feminino, as estatísticas de 2008 apontam o cancro da mama, (com cerca de 1.383.500 novos casos diagnosticados) e o do colón e recto (cerca de 570.000 novos casos diagnosticados) como os mais frequentes. O cancro da mama é que mais mortes provoca nas mulheres (aproximadamente 458.400), seguido do cancro do pulmão, este último com um total de 427.400 mortes) (Figura 1.1) [1].

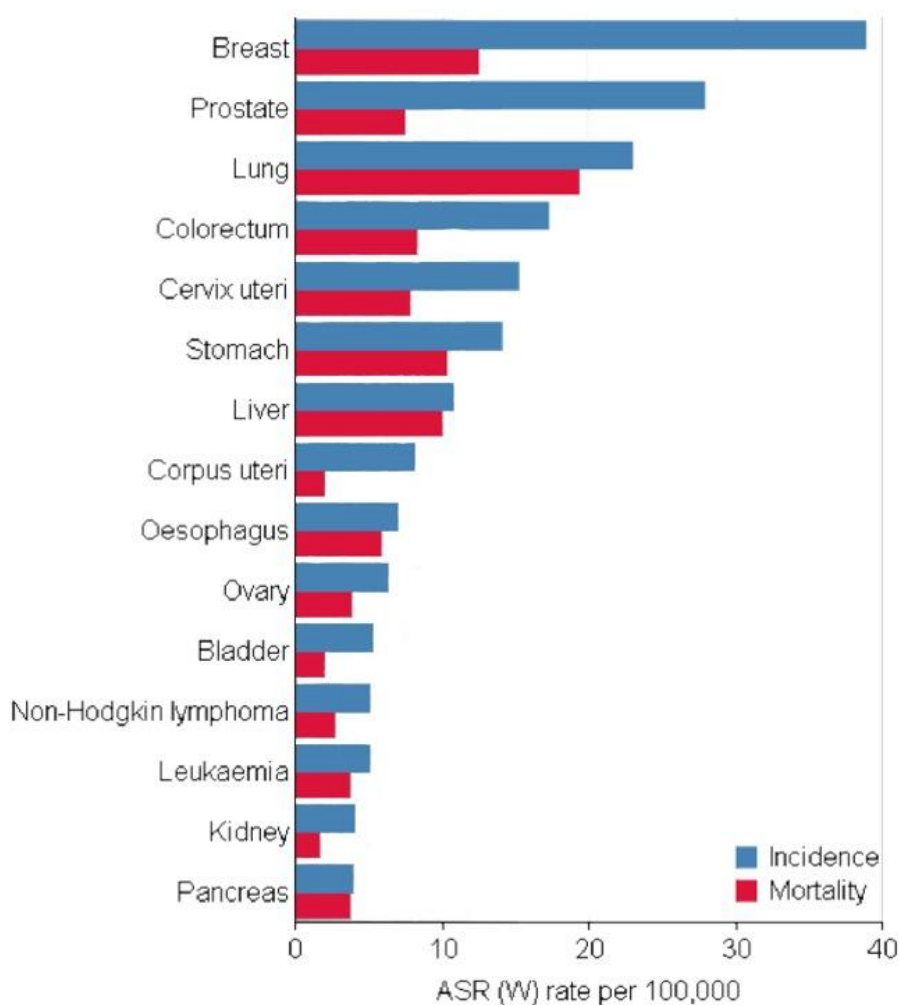


Figura 1.1. Representação da incidência (azul) e da mortalidade (vermelho) dos 15 tipos de cancro mais frequentes a nível mundial no ano de 2008. Note-se que os vários tipos de cancro apresentados estão organizados por ordem decrescente de incidência. (Adaptado de [1])

O tecido cancerígeno pode ser definido como um tecido complexo, constituído por grupos de células distintas que se dividem incontrolavelmente não respeitando os limites normais, e que possuem a capacidade de invadir tecidos adjacentes podendo formar metástases, processo pelo qual as células cancerígenas migram para outros locais do corpo. À medida que as células normais evoluem para um estado neoplásico, elas adquirem uma sucessão de capacidades que lhes permitem tornar-se tumorogénicas, e por último malignas [3]. Esta definição é claramente uma versão simplista da realidade, pois o cancro é uma doença extremamente complexa que envolve diversas vias metabólicas [4].

Durante muitos anos, os investigadores na área da oncologia consideraram como válido um modelo estocástico para o desenvolvimento do cancro (Figura 1.2). Este modelo defende que o desenvolvimento tumoral é fenotípico e resulta de uma série de alterações que ocorreram ao longo do tempo. Surge um primeiro passo desencadeado por um agente iniciador de tumor e segue-se depois um período de promoção tumoral. O passo inicial é

bastante rápido, afetando o material genético da célula. Se a célula não for capaz de reparar o dano causado, fatores de promoção irão ser responsáveis por uma possível progressão maligna. O período de promoção é mais lento, podendo durar vários anos e até nem se manifestar durante a vida do indivíduo [4].

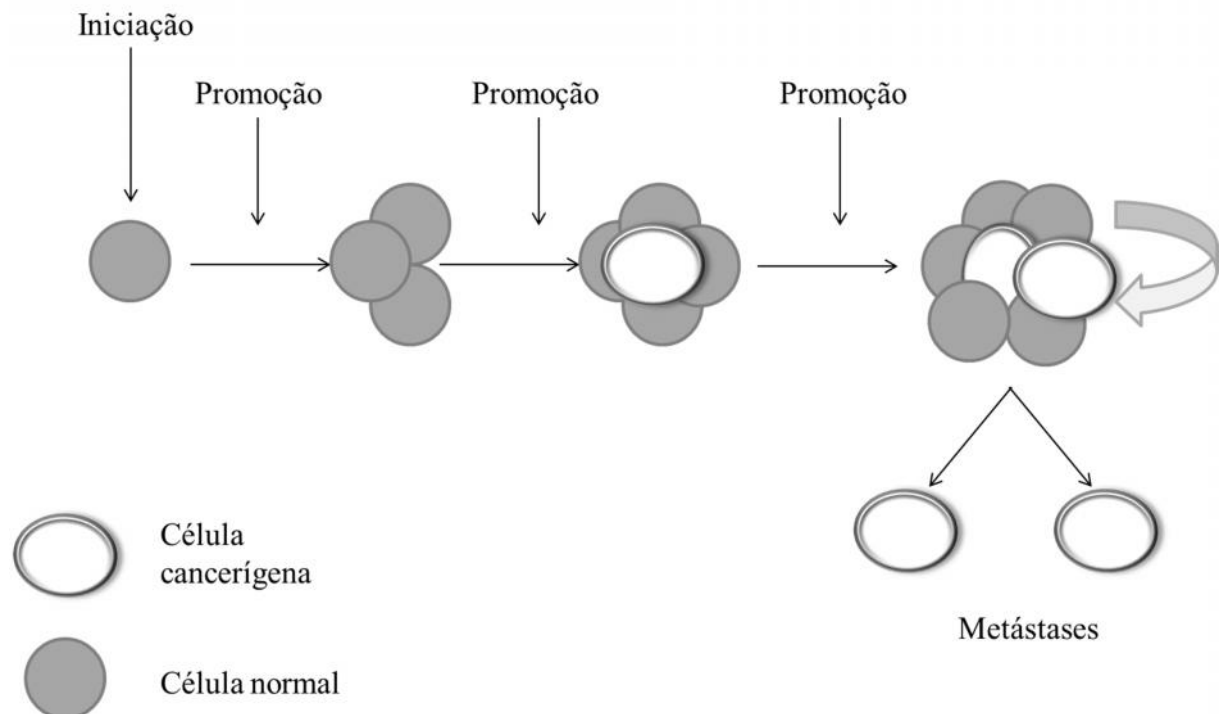


Figura 1.2. Modelo estocástico da carcinogênese. A formação do cancro é o resultado fenotípico de uma série de alterações que poderão ter levado um grande período de tempo a desenvolver. Adaptado de [4]

Ao longo dos últimos anos, os investigadores recolheram um grande número de informações que revelam que o cancro é uma doença complexa e que envolve alterações dinâmicas do genoma [4]. Quando as células sofrem modificações a nível genético, começando a ignorar os sinais de crescimento, ocorre a uma quebra na homeostase celular. Estas alterações observadas em tumores são devidas a transformações diversas, sendo as mais comuns mutações e/ou expressão anormal de oncogenes, genes supressores de tumor e outras alterações cromossómicas [4,5].

O cancro não pode ser encarado como um simples aglomerado homogéneo de células, já que forma um tecido bastante complexo composto por diferentes tipos celulares, em que as células que rodeiam o tumor possuem um papel ativo no seu comportamento.

Na tentativa de entender melhor a biologia do cancro e os mecanismos celulares que levam à proliferação tumoral, Weinberg e colaboradores publicaram em 2000 um artigo de revisão intitulado “*Hallmark of Cancer*” (Figura 1.3), em que considera que a complexidade do cancro pode ser reduzida a um pequeno número de princípios subjacentes.

Este estudo argumenta que existem seis características ou biomarcadores (“*hallmarks*”) que determinam a transformação de células normais em células cancerígenas. Estas marcas serão: a manutenção da sinalização proliferativa, a fuga aos supressores de crescimento, a ativação de invasão e metástase, a permissão de imortalidade replicativa, a indução de angiogénese e a resistência à morte celular [3]

Recentemente, o mesmo investigador apresentou mais duas características emergentes: a reprogramação do metabolismo energético e a fuga à destruição pelo sistema imunitário. A primeira envolve a capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular de modo a obter as condições ideais para suportar a proliferação neoplásica, e a segunda permite às células tumorais evitar o sistema imunitário, em especial os linfócitos B e T, os macrófagos e as células “*natural killer*”[6].

Apesar de durante várias décadas se ter aceite o modelo estocástico como o mais acertado para descrever o cancro, a sua total veracidade é atualmente questionada. Por exemplo, se a maioria das células presentes no corpo humano possui um número finito de

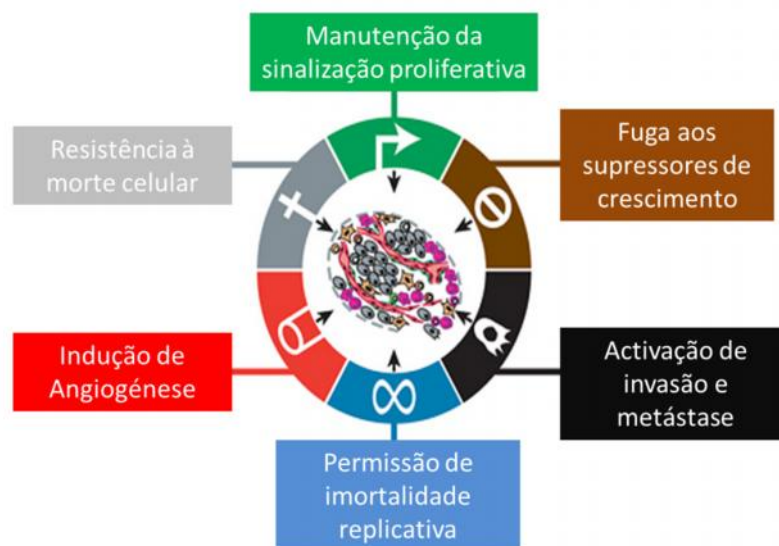


Figura 1.3. Representação das seis características adquiridas durante o processo de desenvolvimento tumoral. Estes ‘*hallmarks*’ (biomarcadores) constituem um princípio organizador para a racionalização da complexidade das doenças neoplásicas. (Adaptado de [3]).

divisões como é que uma célula poderá viver o suficiente para adquirir o número de mutações necessárias para se tornar tumorogénica [4]. Na tentativa de dar resposta a esta questão surgiu uma nova teoria, postulada por Reya e colaboradores [7], que defende que o cancro é na

verdade uma doença de células estaminais. Assim, a transformação maligna ocorre numa célula estaminal adulta, dando origem a uma célula estaminal cancerígena. Este modelo esclareceria a questão levantada pelo modelo estocástico, uma vez que as células estaminais podem viver o suficiente para acumular as alterações necessárias a uma progressão neoplásica.

A identificação da célula-de-origem no cancro é outro tópico de extrema importância na investigação em oncologia. Tanto as leucemias como os tumores sólidos demonstram uma considerável heterogeneidade histológica e funcional. É atualmente aceite que as lesões genéticas possuem um papel preponderante na determinação do fenótipo tumoral, mas existe já um acumular de evidências que apontam no sentido de que diferentes subtipos tumorais num mesmo órgão podem derivar a partir de diferentes “ células-de-origem”. A identificação desta população de células-alvo é crucial, podendo levar ao desenvolvimento de técnicas que permitam uma deteção mais precoce da patologia, uma previsão do comportamento do tumor e por fim, atuar a nível da prevenção do desenvolvimento de cancro em indivíduos pertencentes a grupos de risco [5].

Os tumores demonstram uma grande heterogeneidade na sua morfologia, índice proliferativo, lesões genéticas e resposta à terapia [8]. Esta heterogeneidade fenotípica e funcional verifica-se a nível intertumoral (tumores distintos que surgem no mesmo órgão), levando a uma classificação de subtipos tumorais. Estes subtipos são tipicamente caracterizados pelo seu perfil molecular em conjunto com a sua morfologia e expressão de diferentes marcadores (como hormonas e recetores de fatores de transcrição). Esta variação é ainda verificada a nível intratumoral (em tumores individuais), onde as células tumorais possuem uma variedade de propriedades funcionais e poderão expressar diferentes marcadores.

Os mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela heterogeneidade tumoral permanecem até à data uma questão central no campo da oncobiologia [8]. É atualmente aceite que as lesões genéticas desempenham um papel fulcral na determinação do fenótipo tumoral. Existem duas hipóteses mecanísticas que tentam explicar a heterogeneidade presente nos tumores: a primeira defende que ocorrem diferentes mutações genéticas ou epigenéticas na mesma célula-alvo, resultando em diferentes fenótipos tumorais; e a segunda afirma que diferentes subtipos tumorais surgem a partir de células distintas, que irão agir dentro do tecido como célula-de-origem [8].

Estes mecanismos não são mutuamente exclusivos, podendo atuar em conjunto determinando a histologia e o comportamento do tumor. Existem ainda mecanismos extrínsecos que poderão estar envolvidos na heterogeneidade tumoral, pois as interações

observadas nas células cancerígenas e o microambiente do estroma são cruciais para o crescimento maligno [8].

1.1.2. Principais Tipos Histológicos Tumorais

Existe uma grande diversidade histológica de tumores, baseada na função e localização da célula de origem. Os tumores podem apresentar-se como sarcomas (músculo, cartilagem, tecido adiposo e outros tecidos conectivos ou de suporte), carcinomas (células epiteliais), específicos do sistema nervoso central, leucemias, linfomas e mielomas (células hematopoiéticas). O tipo mais frequente de tumor é o carcinoma, muito possivelmente devido à elevada capacidade proliferativa dos tecidos epiteliais e à exposição mais facilitada destes a agentes iniciadores de tumores [9]

1.2 Poliaminas

As poliaminas biogénicas (PAs, putrescina, espermidina e espermina) (Figura 1.4) são aminas alifáticas ubíquas e não compartimentalizadas, de baixo peso molecular, que desempenham um papel essencial a nível do crescimento, diferenciação e sobrevivência celulares [10]. Estas moléculas provêm da ornitina por ação de uma descarboxilação inicial, levada a cabo pela enzima ornitina descarboxilase (ODC) [11].

Em condições fisiológicas, estas aminas lineares encontram-se totalmente protonadas e comportam-se como policatiões fisiológicos, interagindo com ácidos nucleicos, o ATP, determinadas proteínas e fosfolípidos [12,13].

Estas moléculas intervêm ainda na reparação da matriz celular, em processos de adesão e em determinados

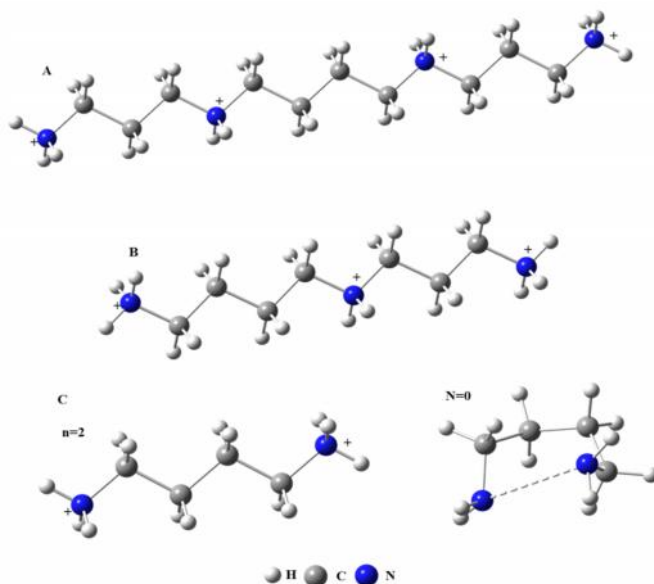


Figura 1.4. Representação esquemática das geometrias mais estáveis para as poliaminas biogénicas: espécies totalmente protonadas da espermina (A) e da espermidina (B). Formas neutra ($n=0$) e cationica ($n=2$) da putrescina (C). (Estruturas otimizadas por métodos de cálculo de mecânica quântica – DFT/B3LYP 6-31G**)

mecanismos de sinalização. A manutenção da homeostase destas poliaminas biogénicas é muito importante, tendo sido já demonstrado que a depleção do seu nível intracelular leva a uma inibição da proliferação e migração celular, e até a um deficiente desenvolvimento embrionário e, de modo inverso, a sua acumulação excessiva induz a apoptose e a transformação celulares [14].

Apesar da síntese *de novo* ser a principal via de produção de poliaminas, o seu transporte através da membrana celular também contribui para a respetiva homeostase.

Devido ao importante papel desempenhado pelas poliaminas a nível do crescimento, sobrevivência e proliferação celulares, estas moléculas são alvo de intenso estudo em diversos campos, em especial na área da biologia do cancro [11,14,15].

1.2.1- Metabolismo de Poliaminas

A regulação dos níveis intracelulares de poliaminas é conseguida através da combinação dos respectivos processos de síntese, catabolismo e transporte (Figura 1.5).

As poliaminas podem ser obtidas quer de modo exógeno através da dieta e síntese microbiana, ou de modo endógeno através da síntese *de novo* e de reações de interconversão (por exemplo, a espermidina pode ser obtida através da espermina por ação da N¹-acetil-espermina [16].

A biossíntese de poliaminas é altamente regulada pela ação de duas enzimas: a Ornitina descarboxilase (ODC) e a S-adenosilmetionina descarboxilase (SAM dc) [17].

Nas células eucarióticas as três poliaminas são sintetizadas a partir da L-arginina e L-metionina, numa série de reações enzimáticas (Figura 1.4): a putrescina é formada a partir da descarboxilação da ornitina pela ODC, e esta combina-se com a S-adenosil-metionina descarboxilada (dc SAM), formada através da ação da SAM dc , para formar a espermidina, *via* espermidina sintase, e a espermina, através de uma segunda reação envolvendo a espermina sintase [17].

Apesar das reações catalizadas pelas aminopropil-transferases serem irreversíveis, a espermina e a espermidina podem ser recicladas respetivamente a espermidina e putrescina [11]. A espermidina/espermina-N¹-acetiltransferase citosólica (SSAT) acetila a espermina e a espermidina, e estas movem-se de seguida para o peroxissoma onde são oxidadas pela poliamina oxidase (PAO) [15]. Os intermediários do catabolismo das poliaminas, N¹-acetilespermidina e N¹-acetilespermina, raramente são encontrados em células normais em grande parte devido ao facto destas serem as principais poliaminas excretadas pelas células.

No entanto, as acetilpoliaminas são encontradas em grande concentração nas células cancerígenas, demonstrando uma clara relação entre o metabolismo das poliaminas e a carcinogénese [17].

De modo a controlar os níveis de poliaminas, existe uma pequena proteína regulatória envolvida no processo, a antizima (AZ). Esta proteína atua de modo a inibir a ação da ODC, induzindo a sua degradação e atuando ainda a nível do transporte de poliaminas, inibindo a sua internalização e aumentando a sua excreção [12].

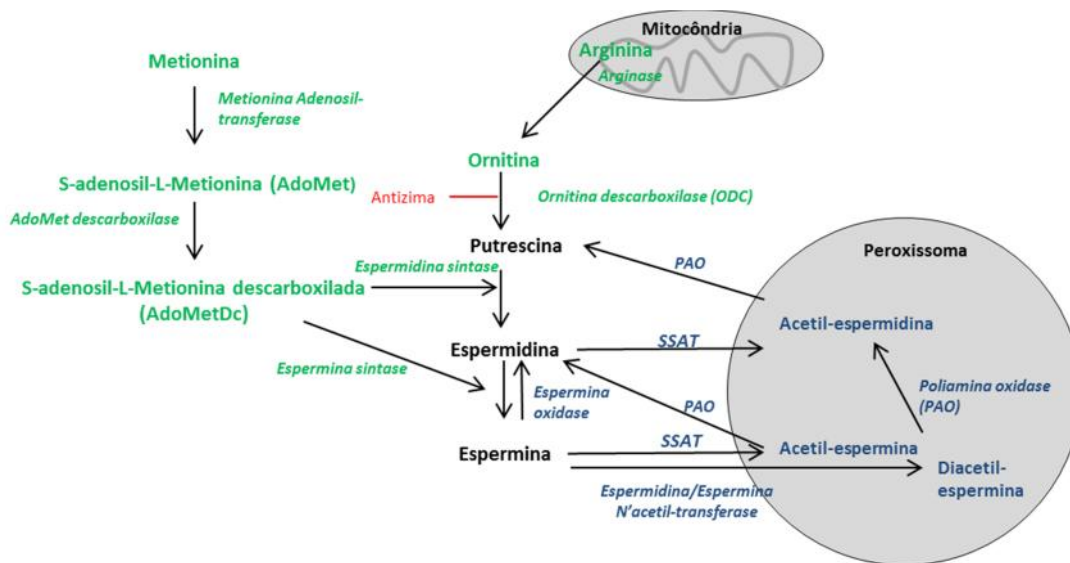


Figura1.5. Metabolismo de poliaminas.

(A verde encontra-se representado o metabolismo, a azul o catabolismo. Adaptado de [15])

1.2.2. Poliaminas e Ciclo Celular

O ciclo celular é geralmente dividido em quatro fases: A fase G1, que corresponde à primeira etapa de crescimento e em que são sintetizadas proteínas, enzimas e RNA; a fase S, durante a qual ocorre a replicação de DNA; a fase G2, em que se dá o segundo crescimento celular, observando-se a síntese de proteínas necessárias à divisão celular; e por fim a fase M, que corresponde à etapa mitótica [18].

As ciclinas dependentes de cinases são proteínas cinases heterodiméricas compostas por duas sub-unidades catalíticas, conhecidas como Cdks, e por uma subunidade regulatória, a ciclina [19]. É sabido que é necessária a correta ativação das Cdks e ciclinas para que possa ocorrer a progressão contínua do ciclo celular [17]. A concentração de poliaminas intracelulares também sofre alterações durante o ciclo, verificando-se alterações no nível de enzimas envolvidas no metabolismo destas aminas, tal como a ODC e a SSAT [17]. A ODC

atinge um pico na fase G1, seguindo-se um aumento de concentração de poliaminas, ocorrendo posteriormente um novo aumento durante a fase G2 imediatamente antes da mitose. A SSAT por sua vez, atinge o seu pico de concentração na fase M.

As ciclinas/Cdks e as poliaminas sofrem mudanças no decorrer do ciclo celular. No entanto, a relação entre estas moléculas regulatórias ainda não está totalmente elucidada, acreditando-se que as PAs poderão regular a degradação das ciclinas [18].

1.2.3. Poliaminas e Cancro

A biossíntese de poliaminas encontra-se muito ativa em células em crescimento, inclusivamente nas células tumorais. Deste modo, a concentração de poliaminas assim como a expressão de genes e atividade de enzimas envolvidas na sua síntese (especialmente a ODC) estão presentes em maior quantidade em células cancerígenas do que nos tecidos normais [20].

A relação entre elevados níveis de poliaminas e o cancro foi verificada pela primeira vez por Russel e Snyder, no final dos anos 60. Estes investigadores verificaram que num fígado regenerado de rato e numa variedade de tumores humanos, se encontram elevados níveis da enzima ODC [21]. Vários estudos têm sido elaborados de modo a perceber o papel exato da ODC no processo de desenvolvimento tumoral. Num estudo conduzido por Hibshoosh e colaboradores [22], os autores verificaram que a indução forçada da ODC em células normais não desencadeou o processo tumorogénico. No entanto, outros autores [23] reportaram resultados opostos, fazendo uso das mesmas células mas utilizando um sistema de transfeção distinto.

Devido a esta incerteza sobre o facto de as poliaminas por si só poderem desencadear o crescimento de tumores, mais estudos são necessários de modo a elucidar se estas moléculas possuem a capacidade de regular alguns aspetos da expressão genética e tradução de proteínas, desencadeando a proliferação exacerbada verificada nas células tumorais [10]. Apesar do papel exato desempenhado pelas poliaminas no cancro continuar ainda alvo de debate, existem diversas hipóteses que tentam explicar a sua função no processo da carcinogénese. Uma das hipóteses defende que são necessários elevados níveis de poliaminas para que as células cancerígenas mantenham a sua capacidade proliferativa, devido à interação que ocorre entre estas moléculas e os oncogenes [15].

Atendendo ao papel desempenhado pelas poliaminas no crescimento celular, a biossíntese destas moléculas é um alvo bastante atrativo em terapia antineoplásica [14,15,24,25].

Diversos compostos que atuam a nível da biossíntese de poliaminas têm sido alvo de estudo nos últimos anos, a três níveis: inibidores da via biossintética das PAs, análogos de poliaminas (antimetabolitos ou miméticos) e compostos conjugados com poliaminas.

No que diz respeito à inibição da biossíntese das poliaminas, existem diversos compostos em estudo. O *N*-difluoro-metilornitina (DFMO) é um inibidor específico da ODC que não demonstrou efeito antiproliferativo durante ensaios clínicos, pois verifica-se uma amplificação do gene da ODC e o “*pool*” de poliaminas é repostado pelas células, aumentando o transporte destas moléculas para o interior da célula. No entanto, neste momento está a ser estudado como possível agente quimiopreventivo [26].

Outro composto utilizado de modo a interferir com o metabolismo das poliaminas é o metilglioxalbis(guanil-hidrazona) (MGBG), que é um inibidor competitivo da SAMdc sendo um análogo estrutural da espermidina. Este agente faz uso do sistema de transporte das poliaminas para entrar nas células [13]. No entanto, devido à sua elevada toxicidade, nomeadamente ao nível da mitocôndria [12,24], não é possível o seu uso clínico. Porém, existem estudos que indicam que a sua toxicidade pode ser reduzida sem perda do respetivo efeito citotóxico.

Outra abordagem utilizada para controlar os níveis intracelulares de poliaminas diz respeito à utilização de análogos (*ex.* PAs alquiladas), desenhados para regular o metabolismo de PAs através de mecanismos utilizados naturalmente pelas próprias amins [17]. No entanto, estes análogos não substituem a função das poliaminas, esperando-se com isto uma diminuição da sua “*pool*” intracelular com a consequente inibição do crescimento, levando à morte celular. Um dos primeiros efeitos detetados após utilização de análogos de poliaminas foi a indução da expressão da SSAT, enzima envolvida no catabolismo de PAs. Esta descoberta foi um bônus inesperado, pois aumenta a capacidade das células para eliminar o conteúdo intracelular de poliaminas, conduzindo à ativação de caspases e culminando com a morte da célula por apoptose. A primeira geração destes compostos teve início com o trabalho de Porter, Bergeron e colaboradores, que nos anos 80 desenvolveram análogos alquilados simétricos, tais como bis(etil)poliaminas (análogos alquilados de espermina ou espermidina [15,17]). Alguns destes análogos demonstraram ser eficazes em algumas linhas celulares, sendo o mais eficaz o BENSpm (N^1,N^{11} -bis(etil)noespermina), que se encontra em ensaios clínicos de fases I e II (tendo demonstrado pouca eficácia clínica neste último) [27]. Uma década após o desenvolvimento deste tipo de análogos, foram estudados compostos de

segunda geração, substituídos assimetricamente, como a CHENSpm (N¹-(cicloheptilmetil)-N¹¹-etil-4,8-diazaundecano), que mostraram ser mais eficazes e menos tóxicos em comparação com os compostos de primeira geração. Mais recentemente foram desenhados agentes de terceira geração, que incluem análogos de oligoaminas cíclicas com restrições conformacionais [28]

Com a introdução de análogos de PAs novos e mais eficazes, ficou claro que eles podem ser divididos em dois grupos: os antimetabolitos e os análogos miméticos [28]. Os primeiros atuam sendo transportados para o interior da célula, diminuindo a biossíntese, e aumentando o catabolismo e exportação das poliaminas, levando a uma diminuição bastante significativa da concentração intracelular destas moléculas. Por outro lado, os miméticos atuam entrando na célula pelos canais normais de transporte de PAs retirando-as dos seus locais normais de ligação. Apesar de este tipo de análogos não diminuir de forma significativa o conteúdo intracelular total de poliaminas, causa toxicidade e leva à morte celular por perda de função intracelular.

1.3. Cancro da Próstata

A próstata é um epitélio glandular incorporado num estroma fibro-muscular (Figura 1.6). O epitélio prostático possui um crescimento dependente de hormonas, sendo constituído por três tipos distintos de células, facilmente distinguíveis num epitélio de duas camadas: a célula basal, secretora luminal e neuroendócrina [29,30]; e o componente do estroma, que consiste em tecido muscular liso, fibroblastos, células vasculares endoteliais, células nervosas, células inflamatórias, uma matriz insolúvel e fatores solúveis [31].

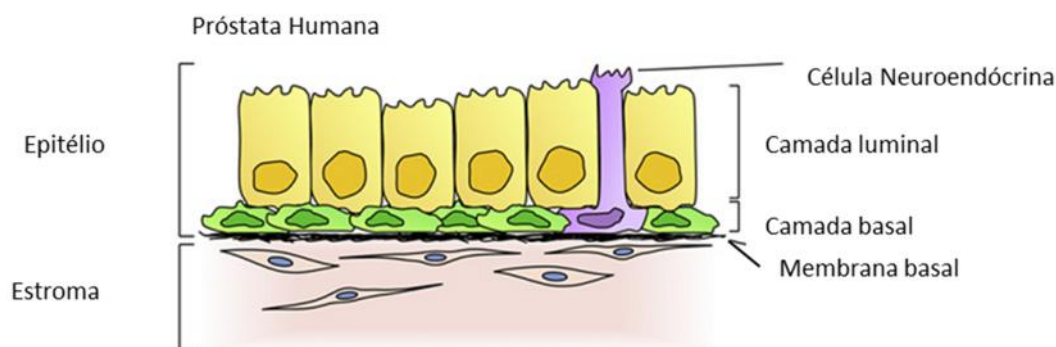


Figura 1.6. Representação esquemática do epitélio da próstata humana. Este consiste numa camada de células basais relativamente indiferenciadas e numa camada luminal de células secretoras. (Adaptado de [30]).

Tal como anteriormente referido, o cancro da próstata é o segundo tipo de cancro mais frequentemente e a sexta causa de morte por cancro em indivíduos do sexo masculino [1]. A sua incidência e mortalidade variam bastante consoante a localização geográfica: Os países desenvolvidos apresentam os valores mais expressivos, o que se deverá ao facto de serem mais frequentes os exames clínicos mediante o teste de PSA (antigénio específico da próstata), o que permite detetar tumores em estadios pouco avançados e com um bom prognóstico, na sua maioria clinicamente insignificantes. No que diz respeito à mortalidade, verifica-se que os descendentes africanos que habitam a região do Caribe apresentam a maior taxa de mortalidade devido a cancro da próstata. Por outro lado, os povos asiáticos apresentam valores pouco expressivos, o que reflete uma possível diferença na suscetibilidade genética [1].

As causas do cancro da próstata ainda não são bem conhecidas, embora alguns agentes possivelmente envolvidos sejam fatores socioeconómicos, hormonais e nutricionais (dieta) [32].

Quanto à sua apresentação, cerca de 95% dos tumores são adenocarcinomas tendo a sua maioria origem na zona periférica da glândula, principalmente com uma localização posterior. O tumor pode disseminar-se localmente invadindo tecidos próximos, ou formar metástases distantes, principalmente no osso devido às capacidades osteomiméticas que as células cancerígenas possuem [31,32].

1.3.1- Diagnóstico e Estadiamento do Tumor

Os principais sintomas associados ao cancro da próstata incluem problemas urinários, dificuldade na ereção e dor frequente na zona inferior das costas, nas ancas ou na zona superior das coxas. Na maioria dos casos, porém, estes sintomas podem ser apenas devidos a uma hiperplasia benigna da próstata. Para confirmar o diagnóstico existem atualmente três procedimentos amplamente utilizados: O exame rectal, a ultrassonografia transretal e o teste da PSA. No entanto, apenas uma biópsia da próstata poderá dar um resultado conclusivo [33].

A PSA é uma protease serínica semelhante à caliceína, produzida exclusivamente pelas células epiteliais de todos os tecidos prostáticos, benignos ou malignos [34]. O teste da PSA constitui uma ferramenta de extrema importância no diagnóstico do cancro da próstata e assegura resultados mais viáveis do que o exame rectal ou a ultrassonografia, pois níveis elevados desta proteína indicam um crescimento anormal do tecido prostático; podendo assim estar associados à hiperplasia benigna da próstata, uma vez que esta proteína é específica do órgão e não do tumor [32], ou a um processo neoplásico.

A escala de Gleason é o sistema mais utilizado para a classificação de adenocarcinomas da próstata. Os tumores podem estar estratificados em cinco graus (T1-5) tendo por base a análise do padrão e arquitectura da próstata assim como o grau de diferenciação das células. Este sistema de classificação vai desde células mais diferenciadas até células menos diferenciadas. Quanto menos diferenciadas se encontram as células, mais alto o grau de Gleason e pior o prognóstico do paciente [34].

1.3.2- Cancro da Próstata Refratário a Hormonas

O crescimento inicial do cancro da próstata é dependente de androgénios, logo a terapia de primeira linha utilizada baseia-se na privação hormonal [35]. As respostas iniciais a

este tipo de abordagem são bastante positivas, verificando-se diminuição dos níveis de PSA. No entanto, esta resposta dura apenas alguns meses e, passado este tempo o tumor progride para estádios mais avançados da patologia, tornando-se independente de hormonas [36]. Quando tal ocorre, o prognóstico torna-se menos favorável, pelo que o tratamento de pacientes com este tipo de cancro refratário a hormonas (HRPC, *Hormone Refractory Prostate Cancer*) é ainda um desafio clínico [36].

Os fatores envolvidos no desenvolvimento do HRPC não estão ainda totalmente elucidados, existindo vários mecanismos propostos envolvidos no processo: a amplificação do gene recetor de androgénios (AR, *Androgen Receptor*) [37], o aumento da expressão e da estabilidade da proteína AR com uma consequente hipersensibilidade para níveis baixos de androgénios [38], a ativação de AR mutados por diferentes ligandos [39], e a ativação do AR por fatores de crescimento e citocinas [40]. Existe ainda um grande número de evidências que aponta a diferenciação neuroendócrina como um importante parâmetro associado à progressão para HRPC.

As células neuroendócrinas possuem propriedades de células endócrinas e de neurónios, atuando de modo secretor e autócrino/parácrino. Este tipo celular encontra-se amplamente distribuído nos ductos prostáticos no epitélio normal de próstata, sendo que a sua presença é geralmente detetada através dos níveis de cromogranina A (CgA) [41].

Estas células com uma diferenciação neuroendócrina encontram-se em maior abundância após a privação de androgénios. Estudos recentes demonstraram que todas as células com estas características presentes em tecidos prostáticos malignos não possuem recetores de androgénios [42].

1.3.3.- Poliaminas e Cancro da Próstata

A glândula prostática encontra-se entre os tecidos do corpo humano com um maior conteúdo de poliaminas e os carcinomas da próstata possuem (como esperado) um nível ainda superior [43]. Na próstata humana, a poliamina encontrada em maior quantidade é a espermina.

Estudos anteriores [44] provaram que as poliaminas neste tecido são reguladas por androgénios. A atividade de várias enzimas biossintéticas envolvidas na via das PAs (ODC, SAMdc e espermina sintase) são induzidas por androgénios de uma forma coordenada e a

expressão destas enzimas é localizada primariamente nas células epiteliais da glândula prostática.

Aparentemente, as funções da ODC e das PAs na próstata estão relacionadas com a proliferação e a atividade secretora deste tecido. Uma vez que se verifica uma relação clara entre a concentração intracelular de poliaminas e o crescimento e diferenciação da próstata, a monitorização do nível de PAs, assim como das enzimas envolvidas no seu metabolismo, deverá ser bastante útil no diagnóstico e prognóstico deste tipo de cancro [45].

Diversas abordagens foram já seguidas de modo a utilizar o metabolismo das poliaminas como uma estratégia para o tratamento do cancro da próstata, incluindo o recurso a inibidores da sua síntese, atuando sobre as enzimas ODC (*ex.* DFMO), SAMdc ou PAO [43]. Estas abordagens revelaram-se pouco eficazes, possivelmente devido ao facto de o “pool” de poliaminas ser facilmente repostado através de uma intensificação dos mecanismos de transporte de poliaminas já existentes na circulação para o interior da célula [17,45,46].

Outra via possível é a proteína AZ (Antizima, responsável pela degradação da ODC), mediante o seu inibidor específico AZI (*Antizime Inhibitor*), que leva igualmente ao aumento da produção de poliaminas na célula e logo a um incremento da proliferação celular [47]. Elevados níveis de AZI são encontrados em diversos tumores, particularmente no cancro da próstata [47]. De facto, têm sido levados a cabo diversos estudos com vista a controlar a atividade desta proteína. Olsen e colaboradores [47] procederam ao desenho de um knockdown para a AZI, tendo verificado um crescimento tumoral *in vivo* consideravelmente reduzido. Foi ainda observada uma relação nítida entre [PAs] e o microambiente tumoral, sendo que este pode influenciar o crescimento do tumor através de um equilíbrio entre angiogénese e stress hipóxico, influenciando as condições de hipoxia directamente os níveis de poliaminas [47]. O targeting da AZI poderá assim ser uma estratégia terapêutica mais eficaz do que o uso de inibidores de enzimas essenciais à biossíntese de PAs (como o DFMO) pois aquela proteína atua não só na via das poliaminas mas também na regulação do ciclo celular.

1.3.4- Estratégias Terapêuticas Contra o Cancro da Próstata

O esquema quimioterapêutico de primeira linha face ao cancro da próstata baseia-se na privação hormonal, devido à necessidade de hormonas que estas células apresentam para

poderem proliferar. Existem várias opções terapêuticas que permitem a redução dos níveis de androgénios [48] (Figura 1.7).

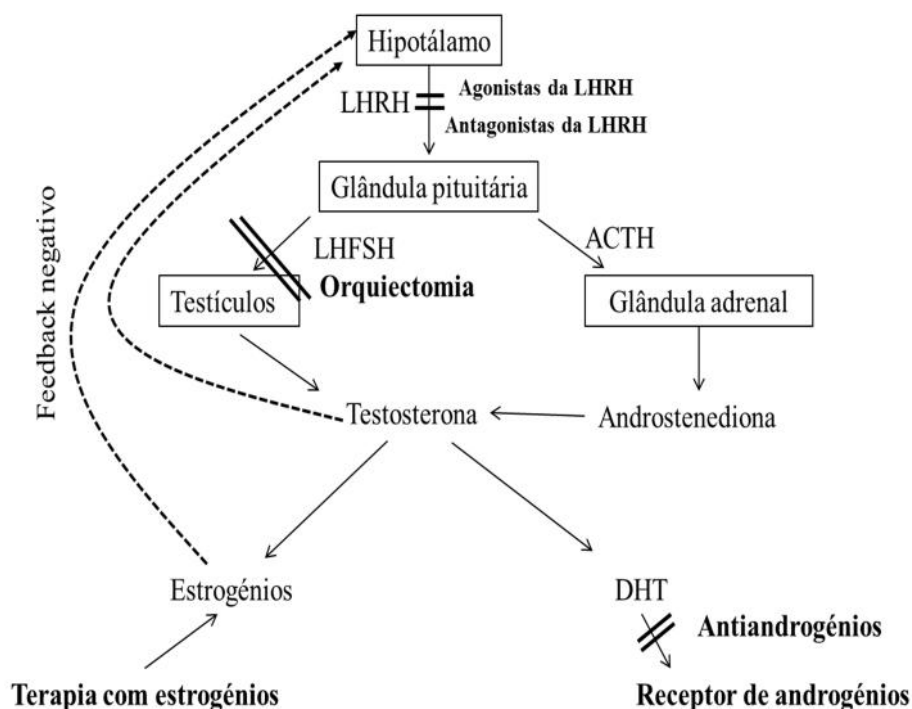


Figura 1.7. Esquema representativo do sistema hipotalâmico-pituitário-gonadal evidenciando os locais de ação das várias terapias hormonais para o cancro da próstata. LHRH: *luteinising hormone-releasing hormone*, LH: *luteinising hormone*, FSH: *folicle-stimulating hormone*, ACTH: *adenocorticotrophic hormone*, DHT: *dihydrotestosterone*. (Adaptado de [48]).

A castração cirúrgica (orquiectomia) remove a fonte testicular de androgénios e atinge rapidamente um estado hipogonadal. Para além desta estratégia pode ainda optar-se por uma castração química, sendo ambas as abordagens traumatizantes para os pacientes e causadoras de graves efeitos secundários [48]. Apesar da resposta inicial positiva, os pacientes progridem para estadios mais avançados da doença entre os 12 e os 24 meses após a intervenção, e quando tal ocorre a terapia hormonal deixa de ter efeito continuando a proliferação do cancro, que se tornou independente de hormonas (HRPC) [49]. Nestas condições, a quimioterapia citotóxica é a única opção que tem levado a um aumento da sobrevivência de pacientes com HRPC [50].

A prednisona (um corticosteróide sintético), a mitoxantrona e o etoposide (inibidores da topoisomerase II), a doxorubicina (antibiótico), o docetaxel (taxano) e o calcitriol (precursor da vitamina D) representam os principais fármacos atualmente utilizados em quimioterapia contra o cancro da próstata [51].

Nos últimos oito anos, os taxanos emergiram entre a classe de antineoplásicos mais eficazes face ao HRPC [52]. Apesar do docetaxel ser o fármaco mais amplamente utilizado no

tratamento do HRPC, a sua atividade é modesta e eventualmente, os pacientes desenvolvem resistência à terapia. Quando tal ocorre, o prognóstico torna-se muito reservado e as opções terapêuticas bastante limitadas [53]. É, assim, essencial encontrar novas estratégias para o combate ao cancro da próstata.

A cisplatina e seus análogos (Figura 1.13) foram, durante muito tempo, considerados ineficazes no tratamento desta patologia, mas estudos mais recentes fizeram ressurgir o interesse na sua utilização [54]. Sendo este composto um dos fármacos mais eficazes no face a uma grande variedade de tumores, o seu uso no cancro da próstata é bastante apelativo.

Vários ensaios clínicos foram já levados a cabo, em que se fez uso de cisplatina ou complexos semelhantes em combinação com diversos compostos com mecanismos de ação distintos, como é o caso da doxorubicina, o docetaxel, o etoposido, a vitamina D, a estramustina ou a prednisona (Tabela 1.1). Os resultados obtidos foram bastante promissores, verificando-se um aumento na sobrevivência dos pacientes e a diminuição dos níveis de PSA com valores bastante expressivos.

1.3.4. A-Taxanos

Os taxanos são uma classe de fármacos antitumorais amplamente usada na clínica, que exerce a sua ação a nível dos microtúbulos do citoesqueleto celular. O paclitaxel e o docetaxel pertencem a este grupo de fármacos (Figura 1.8). A atividade antitumoral deste tipo de compostos deve-se ao facto de se comportarem como agentes antimitóticos, ou seja, possuírem a capacidade de interferir com o processo de associação e dissociação de microtúbulos [55]. O docetaxel é um taxano semi-sintético de segunda geração derivado de um composto encontrado no teixo (*Taxus baccata*).

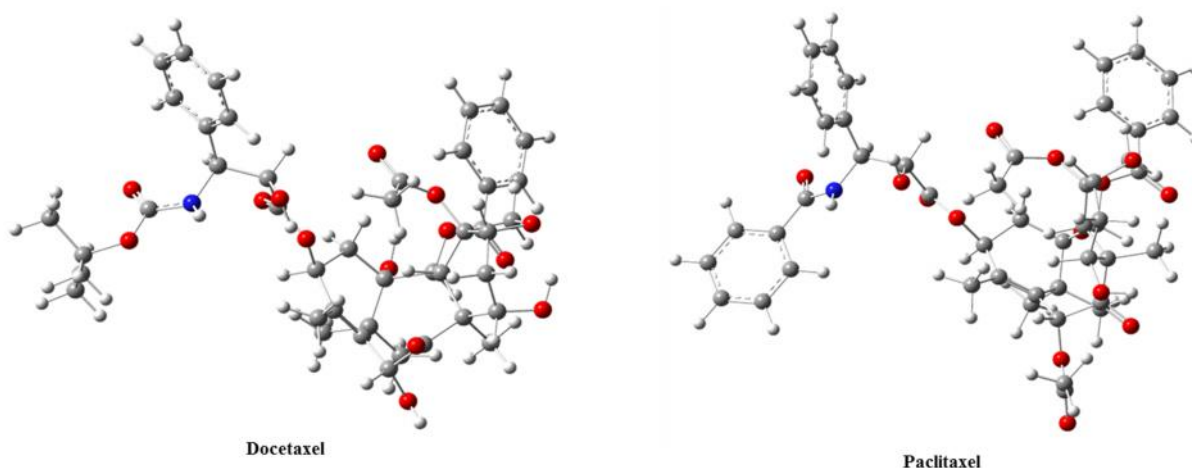


Figura 1.8 Representação estrutural dos taxanos Docetaxel e Paclitaxel. (As estruturas representadas correspondem a geometrias otimizadas, calculadas através de métodos de mecânica quântica).

Acredita-se que o docetaxel possui dois mecanismos distintos de ação antineoplásica: a inibição da despolarização dos microtúbulos e a atenuação dos efeitos da proteína anti-apoptótica bcl e do gene bcl-xL.

A estabilização de microtúbulos induzida pelos taxanos pára o ciclo celular na fase G2/M e induz a fosforilação da proteína bcl-2, provocando deste modo uma cascata de acontecimentos que culminam com a morte celular por apoptose [56]

1.3.4. B.- Cisplatina

A descoberta acidental da atividade antitumoral da cisplatina em 1969, por Rosenberg e colaboradores [57], marcou o início de décadas de investigação em complexos metálicos na terapia contra o cancro. Após a sua descoberta, milhares de complexos de platina (Pt(II) mas também Pt(IV)) têm vindo a ser sintetizados e avaliados relativamente à sua capacidade de atuação como agentes antineoplásicos. Apesar da sua estrutura simples, este fármaco é um dos anticancerígenos mais potentes conhecidos até hoje, tendo sido usado como agente único ou em regimes de combinação para tratar uma variedade de tumores sólidos (testículos, ovários, bexiga, cabeça e pescoço) [58].

Apesar da conhecida resistência celular adquirida quando da utilização deste agente, a cisplatina tem sido usada há quase meio século e virtualmente nenhuma modificação nos seus grupos substituintes melhorou substancialmente a sua ação como agente antineoplásico. Nenhum análogo mostrou, até à data, ser verdadeiramente mais eficaz no tratamento de tumores sólidos [58].

1.3.4.B.1.- Química e Mecanismo de Ação

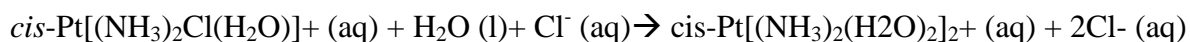
A cisplatina (abreviada como cDDP, Figura 1.9) é um complexo inorgânico no qual o íon metálico de Pt(II) está covalentemente ligado a dois íons cloreto e a dois grupos amônia em posição *cis*. É uma molécula neutra, com geometria planar-quadrada e moderadamente solúvel em água. O mecanismo bioquímico de atuação da cDDP é comum a muitos outros agentes de Pt(II) e o seu alvo biológico mais importante, correlacionado com a atividade antineoplásica que desempenha, é o DNA [59]. O complexo liga-se covalentemente aos átomos de nitrogênio das bases da dupla hélice (preferencialmente aos N7 da guanina), destruindo a sua estrutura terciária e inibindo a ação da maquinaria celular durante os processos de replicação e transcrição. Cerca de 50% das moléculas de cDDP administradas intravenosamente a um paciente, no entanto, são desativadas por reação com a glutatona, a albumina ou outras proteínas membranares e do plasma que contenham grupos tiol ou átomos de enxofre. De fato, verifica-se que apenas 1% da dose inicial de cisplatina irá interacionar com o DNA genômico exercendo efeito anticancerígeno [60]. Ainda assim o pequeno número de moléculas que atinge o DNA pode desencadear a morte celular, devido à deformação provocada na dupla hélice (rearranjo conformacional de B para A ou mesmo Z).

No plasma, o complexo existe sob a forma de *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl₂] devido à elevada concentração de íons cloreto (*ca.* 100mM, [61,62]). A sua passagem para o meio intracelular ocorre maioritariamente por difusão passiva, embora estudos recentes tenham demonstrado a existência de mecanismos de transporte ativo efetuado pelas proteínas transportadoras de cobre Ctr1 [63,64]. O mecanismo de ação da cDDP compreende vários passos: entrada na célula, ativação por aquação, pré-associação ao DNA, formação de adutos monofuncionais seguida da formação de adutos bifuncionais (Figura 1.10). No interior da célula, o fármaco é ativado por hidrólise dos íons cloreto, devido ao gradiente de concentração extra- (*ca.* 100mM) vs intracelular (3 e os 55 mM [61]), ocorrendo a sua substituição por uma ou duas moléculas de água (aquação) originando espécies *mono-* ou *diaqua*, respetivamente [65] [66]. Deste modo, a ativação da cDDP depende maioritariamente do gradiente transmembranar dos íons cloreto, embora



Figura 1.9. Isómeros *cis* (A) e *trans* (B) dos complexos quadrangulares planos de Pt(II).

parâmetros físicos como variações de pH afetem largamente este processo [61,67]. A ativação pode então ser descrita como um mecanismo em duas etapas:



A cisplatina ativada liga-se ao DNA, já que as espécies aqua são pouco estáveis, originando um monoaduto (ou aduto monofuncional) no qual o íon Pt(II) se encontra ainda coordenado a um cloreto. Este monoaduto reage rapidamente com uma base adjacente (*ex.* guanina) originando di-adutos (ou adutos bifuncionais, também designados por ‘*crosslinks*’) (Figura 1.10). Estudos quantitativos mostraram que estes podem ser de vários tipos:

- 65% de adutos 1,2-GG intracadeia (GG = duas guaninas adjacentes)
- 25% de adutos 1,2-AG intracadeia
- 7% de adutos 1,3-GG intracadeia, nos quais as duas guaninas podem estar separadas por qualquer nucleotídeo (GNG)
- Cerca de 3% de várias espécies: adutos 1,2-GG intercadeia, proteína-cDDP-DNA e monoadutos [68,69].

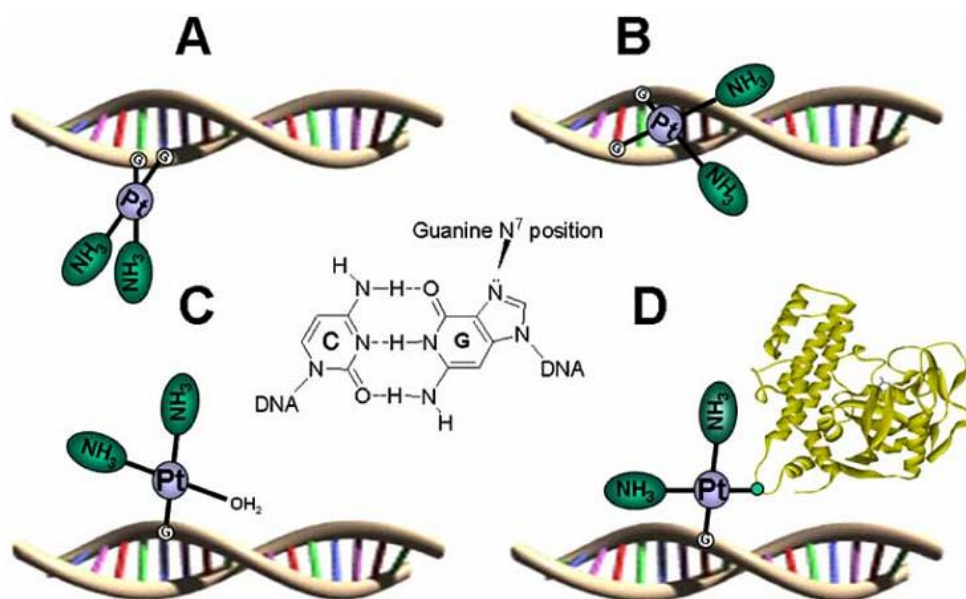


Figura 1.10 - Principais tipos de adutos formados após a ligação da cDDp ao DNA. (A) - Aduto 1,2 intracadeia; (B) Aduto intercadeia; (C) Aduto monofuncional; (D) ligação DNA-cDDP-proteína. O principal local de interação da cDDP com o DNA (N₇ da guanina, estabilizado por uma “ponte” de hidrogénio) encontra-se representada no painel central. (Adaptado de [89])

Ainda assim, o mecanismo específico de atuação da cisplatina não é totalmente conhecido [70-72], tal como não é consensual qual a forma iónica preponderante que estabelece a coordenação inicial ao DNA (isto é, a espécie $cis\text{-Pt}[(\text{NH}_3)_2\text{Cl}(\text{H}_2\text{O})]^+$ ou a forma $cis\text{-Pt}[(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^+$) [73]: alguns estudos cinéticos [74,75] revelaram que a formação de adutos bifuncionais a partir de monoadutos contendo um ião cloreto coordenado à platina tem um tempo de meia vida de 2 a 5 horas. Por outro lado a formação de adutos bifuncionais a partir de *aqua*-monoadutos ocorre cerca de uma ordem de magnitude mais rápido. Isto sugere que os *cloro*-monoadutos originam adutos bi-funcionais somente após a ocorrência do processo de aquação. Dito de outro modo, o ataque nucleófilo directo da base do DNA ao complexo monofuncional sem que ocorra a substituição do cloreto por uma molécula de água nunca foi verificado [76].

A cinética da reação de substituição de ligandos em complexos de Pt(II) parece assim ter uma grande influência na capacidade destes em atuarem como fármacos antineoplásicos [77]: complexos com grupos abandonantes fortemente coordenados ao metal não apresentam atividade antitumoral. Por outro lado, grupos abandonantes muito lábeis não proporcionam uma atividade antineoplásica muito elevada [78,79]. Isto é, a inatividade dos complexos de Pt(II) pode ser causada por uma reatividade cinética extrema, ou muito baixa ou muito

elevada, sendo este último caso uma consequência de reações rápidas com componentes intracelulares designados de forma generalista por platinófilos.

Pelo fato da platina pertencer ao grupo dos metais “macios”, a sua coordenação ocorre preferencialmente com o átomo de azoto em vez de com o oxigênio. De facto, o local preferencial de coordenação ao DNA é o N₇ das bases purínicas [80-85]. Tem sido sugerido que o di-catião *aquo*, *cis*-[Pt(NH₃)₂(OH₂)₂]²⁺, é capaz de difundir ao longo da dupla hélice negativamente carregada para os locais de coordenação d(GpG) [86]. A Figura 1.11 apresenta todos os potenciais locais de interação deste complexo com o DNA.

Na dupla hélice do DNA apenas os átomos de azoto não envolvidos no estabelecimento de pontes de hidrogênio entre as bases de Watson e Crick estão disponíveis para a coordenação à platina. Estes são o N₃ e o N₇ do anel das purinas, embora a ligação ao N₃ não seja possível por impedimento estérico, restando apenas o N₇. Quer o N₇ da guanina, quer o da adenina podem ser platinados; contudo, o N₇ da guanina apresenta uma preferência cinética maior pela coordenação à Pt [81,87]. Esta tendência resulta da maior basicidade do N₇ da guanina e da possível interação por pontes de H entre os prótons aminicos da cisplatina e o O₆ da guanina.

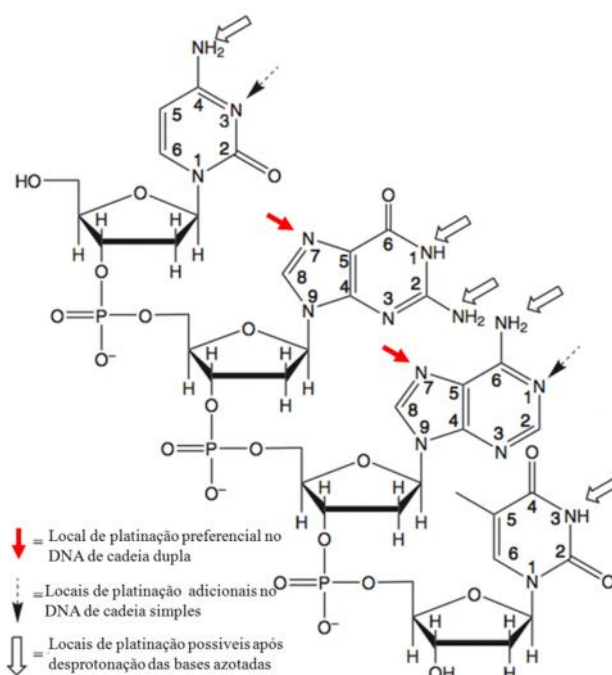


Figura 1.11. Locais de platinação possíveis no DNA. (Adaptado de [85]).

A transplatina é o isómero geométrico da cisplatina (Figura 1.9 B), que não é capaz de formar adutos 1,2-GG intracadeia devido à disposição *trans* dos ligandos em torno do metal. Verifica-se ainda que a quantidade de adutos monofuncionais e de “*crosslinks*” proteína-Pt-DNA é muito maior para a transplatina do que para a cDDP [88].

A estrutura do DNA platinado é distorcida significativamente e perde estabilidade [89], da qual resulta um decréscimo na temperatura de “*melting*” e na desnaturação local [90]. Resultados obtidos para várias linhas celulares sugerem que o DNA platinado leva à paragem do ciclo celular na fase G2 da mitose, de forma a permitir a atuação da maquinaria de reparação. No caso de reparação inadequada a célula promove a paragem do processo mitótico, normalmente por ativação de mecanismos apoptóticos [91,92].

A distorção da estrutura terciária do DNA pela cisplatina depende obviamente do tipo de aduto que é formado. Os aspetos estruturais do DNA platinado têm sido extensivamente estudados por RMN e cristalografia de raios-X e até à data apenas os adutos 1,2-GG intra e intercadeia foram detectados [71,93]. O DNA nativo, na sua forma B efetua uma volta completa (360°) em torno do seu eixo em 10 pares de bases (*ca.* 34Å). Isto tem como resultado o facto de bases azotadas flanqueadas pelos mesmos grupos vizinhos terem ambientes químicos diferentes. Por exemplo, na sequência 5'-AGGA-3' as duas guaninas possuem ambientes químicos distintos ainda que tenham as duas bases vizinhas semelhantes – como consequência, o aduto AG é específico na direção 5'-AG-3'. Nenhuma exceção a esta direccionalidade foi encontrada até agora: não há adutos 5'-GA-3'. Além disso, não se conhecem adutos mono- ou bifuncionais envolvendo somente a adenina [94].

A formação de adutos 5'-GG intracadeia provoca a disrupção da dupla hélice por desemparelhamento dos dois pares de guaninas adjacentes. O DNA é localmente desenrolado no sitio da lesão, levando à exposição de um centro (ou “*pocket*”) hidrofóbico em direção à “*minor groove*” do DNA. O sítio da lesão torna-se achatado e alargado (Figura 1.12) o que origina um ‘*kink*’ na dupla hélice (de ~50° na estrutura de cristal e ~70-80° nas estruturas determinadas por RMN em solução).

1.3.4.B.2- Mecanismos de Reparação dos Adutos Cisplatina-DNA

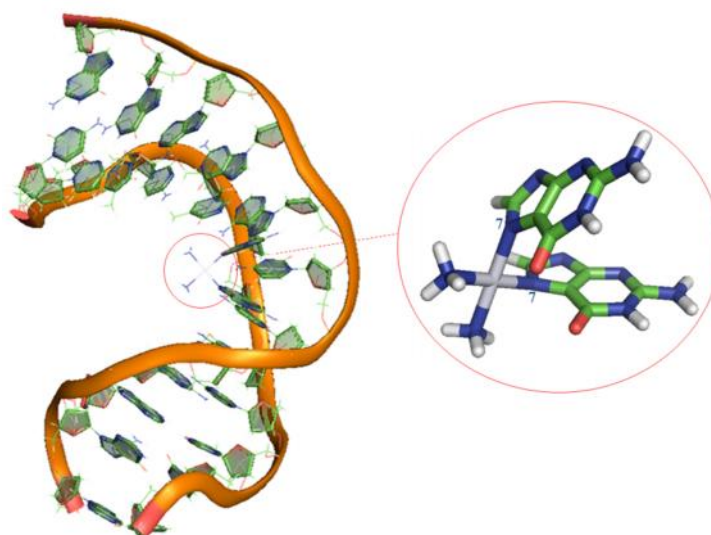


Figura 1.12. Estrutura de um aducto 1,2-GG intracadeia obtida por espectroscopia de RMN. A cadeia usada é um dodecamero de dupla hélice (esquerda). O local de coordenação da cDDP encontra-se ampliado (à direita). Nesta estrutura é claramente visível a torção ('kink') provocada no local de coordenação da cDDP. Entrada no PDB:1A84

Os adutos ciplatina-DNA podem ser reparados por diversos mecanismos, envolvendo diferentes proteínas. O principal modo de reparação ocorre por reparação por excisão de bases (NER, *Nuclear Excision Repair*). O NER é um complexo multiproteico dependente de ATP que reconhece a deformação causada pela ligação 1,2-intracadeia da cDDP ao DNA e que, como consequência, excisa a parte do DNA que inclui o “*kink*” de 27-29 pares de oligonucleótidos [62]. A sobre expressão do NER foi correlacionada com um dos mecanismos de resistência adquirida à cisplatina.

Outro processo envolvido na reparação dos adutos de cisplatina diz respeito ao “*Mismatch-repair*” (MMR). Este é um sistema de reparação pós-replicação que corrige as bases sem par, ou que se encontram emparelhadas de modo incorreto. Este sistema envolve pelo menos cinco proteínas (MLH1, *mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)*; MSH2, *mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)*; MSH3, *mutS homolog 3 (E. coli)*, MSH6, *mutS homolog 6 (E. coli)*. e PMS2, *postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)*) e depende de ATP. A relação entre o reconhecimento do dano causado pelas proteínas constituintes do MMR e a citotoxicidade provocada pela cDDP não é ainda totalmente conhecida, sendo no entanto sugerido que as proteínas tentam inserir a base correta na cadeia que não possui qualquer dano e não no aduto intracadeia entre duas guaninas adjacentes induzindo este ciclo de reparação mecanismos de morte celular [62,95].

Um outro mecanismo envolvido na reparação do dano causado pelo fármaco envolve proteínas cinase, que podem interagir (como descrito anteriormente) com as lesões causadas no DNA pela cDDP [62].

1.3.4.B.3 Mecanismos de Resistência à Cisplatina

A resistência celular a fármacos apresenta-se como um entrave fundamental ao desenvolvimento de novas estratégias quimioterapêuticas contra o cancro, e a cDDP não é exceção – algumas células tumorais são intrinsecamente resistentes a este composto [96], enquanto outras adquirem resistência devido ao seu uso repetido (resistência adquirida) [97]. Os mecanismos moleculares de resistência não são totalmente compreendidos, sabendo-se que podem estar associados a uma ou mais das seguintes características: (1) redução da acumulação intracelular, (2) aumento dos processos de desativação no interior da célula, antes da cDDP se ligar ao DNA; e (3) intensificação dos mecanismos de reparação do DNA. A redução da acumulação intracelular de cDDP pode ocorrer quer por diminuição dos processos

de “*uptake*”, quer por aumento da sua extrusão para o meio extracelular. Contudo, nenhum destes dois mecanismos é compreendido na sua totalidade. É atualmente aceite que os processos de difusão passiva e de difusão facilitada por transportadores de cobre Ctr1 de alta afinidade estão envolvidos no transporte de cDDP para o meio intracelular [98-100]. De facto, foi verificado que a deleção do gene que codifica o transportador Ctr1 resulta numa redução de cerca de 16x no “*uptake*” do cobre e cerca de 8 x na redução do “*uptake*” de cisplatina. Células sem Ctr1 mostraram ser 1.9 vezes mais resistentes à cDDP do que células normais [101]. O mecanismo pelo qual os Ctr1 transportam cobre através da membrana, porém, permanece indeterminado [102,103]. Por outro lado, as células de mamíferos apresentam duas ATPases similares (ATP7A e ATP7B) que medeiam o efluxo de Cu, estando igualmente associados ao efluxo da cDDP [98]. O aumento da expressão destas ATPases foi associado a uma diminuição do número de moléculas de cDDP ligadas ao DNA [98,104].

Por outro lado, o aumento dos processos de desativação por ligação a platinófilos celulares antes da coordenação ao DNA, tais como a glutathiona (GSH, Figura 1.13), a metalotioneína ou a acetilcisteína, é um dos principais mecanismos de resistência aos agentes antitumorais de Pt(II). A eficácia da ação destes

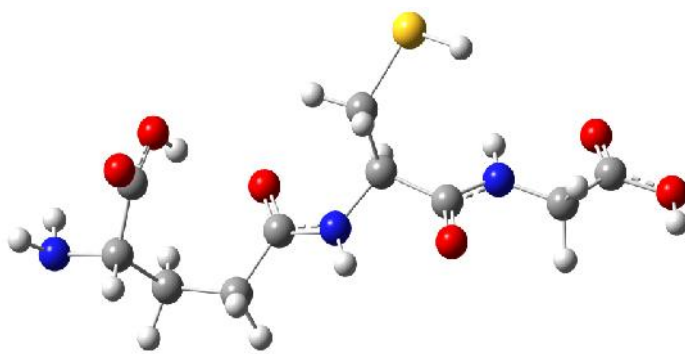


Figura 1.13. Representação estrutural da glutathiona (- glutamylcysteinylglycine ou GSH) reduzida. Esta molécula é um tripeptídeo que apresenta uma ligação peptídica pouco comum, entre o grupo NH de uma cisteína e o grupo COO- do glutamato. A estrutura foi obtida através de cálculos de mecânica quântica realizados para a molécula isolada (no vácuo)

fármacos é altamente limitada pela inativação desencadeada por aquelas moléculas contendo enxofre, que se ligam covalente e irreversivelmente à cisplatina [105]. Biomoléculas contendo grupos tioéter (como o resíduo de metionina, por exemplo) formam igualmente adutos devido à coordenação Pt(II)-S, embora neste caso se tenha postulado que estes adutos possam constituir um reservatório de cDDP para a platinação do DNA. Significa isto que eles podem funcionar como intermediários capazes de se transformar em adutos Pt-DNA [106,107].

A concentração celular de GSH varia entre 1 e 50 mM [108], ao passo que a cDDP é administrada numa concentração cerca de 1000x inferior. Desta forma, o processo de inativação pela GSH parece ser absolutamente garantido. Ainda assim, é inquestionável o fato da cisplatina conseguir atingir e danificar o DNA nuclear [109,110]. Vários estudos indicam que linhas tumorais resistentes à ação da cisplatina apresentam níveis elevados de GSH capaz

de fazer diminuir a quantidade de fármaco disponível para coordenar ao DNA através da formação de conjugados estáveis cDDP-GSH, segundo um processo no qual parece estar maioritariamente envolvida a forma reduzida da glutatona. Por outro lado, um estudo no qual bactérias *E. Coli* foram incubadas com cisplatina e usadas para identificar 31 proteínas nas quais a cDDP estava coordenada mostrou que essas proteínas incluíam enzimas, proteínas do DNA e RNA ribossomal em que o ião Pt(II) se encontrava coordenado a grupos hidroxilato e carboxilato, contrariamente ao que é esperado de acordo com a teoria de Pearson [111-113] que assume a cisteína e a metionina como locais de ligação prioritários da cDDP em proteínas. Além disso, análises de fragmentos proteicos revelaram uma coordenação do catião $[Pt(NH_3)_2]^{2+}$ enquanto o complexo proteína-Pt-GSH nunca foi observado. Outro resultado contraditório revelou que o “*uptake*” de cisplatina em diferentes linhas celulares tumorais aumenta quando da administração combinada de GSH exógena [114]. Este efeito foi explicado admitindo que os níveis anormalmente elevados de glutatona poderão de algum modo alterar a permeabilidade membranar, favorecendo a entrada do fármaco na célula.

1.3.4.B.4. Desenvolvimento de Análogos

Desde a introdução da cisplatina no mercado, milhares de complexos mononucleares de platina têm vindo a ser sintetizados e avaliados de acordo com a sua atividade anticancerígena [115,116], em vista à obtenção de complexos com uma atividade antitumoral similar ou otimizada mas com uma toxicidade inferior à da cDDP [115].

Estes estudos baseiam-se nas relações estrutura-atividade (SAR, *Structure Activity Relationship*) [117] previamente estabelecidas para este tipo de complexos. A cDDP é considerada o composto de primeira geração (“*lead*”) e os seus análogos podem ser divididos em compostos de segunda e terceira geração (Figura 1.12) [118,119]. Entre todos eles, apenas 33 complexos de platina entraram em ensaios clínicos, dos quais apenas dois (a carboplatina e a oxaliplatina) receberam aprovação global.

1.3.4.B 4.1.- Análogos de Segunda Geração:

Os análogos da cisplatina de segunda geração apresentam grupos abandonantes carboxilato [120]. Um destes compostos é a carboplatina (ou paraplantina, abreviada como

CBDCA, Figura 1.14 B) que recebeu aprovação global pela FDA em 1988 no tratamento contra o cancro [121]. A modificação da cisplatina de forma a conter grupos abandonantes menos lábeis altera quer a sua farmacocinética quer o seu perfil toxicológico. Desta forma a substituição dos iões Cl^- por um ligando de ciclobutano-carboxilato para originar a carboplatina reduziu a toxicidade ao mesmo tempo que manteve uma atividade antitumoral similar à da cisplatina [78,120]. Em doses efetivas a carboplatina mostrou provocar uma menor nefro- e neurotoxicidade do que a cDDP [79], sendo os adutos formados por esta essencialmente idênticos aos adutos originados pela primeira, o que fornece uma explicação para a sua similar atividade antitumoral.

Verificou-se ainda que a cDDP e a carboplatina apresentam resistência cruzada [122], sendo que os dois fármacos combinados são ativos apenas contra alguns tipos de tumores. Ensaios clínicos de fase III demonstraram a equivalência da carboplatina e da cisplatina no tratamento do cancro de ovário [123]; relativamente ao cancro testicular, e da cabeça e pescoço, no entanto, a atividade da cDDP parece ser superior [124]. Entretanto, a maior tolerabilidade da carboplatina em relação à cisplatina foi atribuída à sua maior estabilidade acoplada a uma menor reatividade [120]. Como resultado, esta pode ser administrada em doses muito superiores (900 mg/m^2) às da cisplatina ($60\text{-}120 \text{ mg/m}^2$) [115].

Não obstante, o espectro de ação destes dois complexos é muito semelhante. Esta observação instigou o desenvolvimento de outros complexos de Pt de segunda geração na esperança de aumentar a atividade antitumoral da carboplatina. Um desses complexos é a nedaplatina (*cis*-diamina-glicolato-O,O'-platina(II), Figura 1.14 C). Este composto possui o mesmo grupo amina que a carboplatina mas os grupos cloreto abandonantes foram substituídos por um anel glicolato que atua como um ligando bidentado [125]. A sua atividade antitumoral é similar à da cDDP [126] mas apresenta menor nefrotoxicidade [127]. Além disso a sua solubilidade em água é superior à da cDDP [128], sendo o seu perfil farmacocinético similar ao da carboplatina [129].

1.3.4.B.4.2.- Análogos de Terceira Geração

Apesar da carboplatina e da nedaplatina terem sido aprovadas para uso clínico, o seu espectro de atividade é similar ao da cisplatina, não apresentando pois uma vantagem apreciável neste ponto. É atualmente sabido que a cinética das reações de troca metal-ligando de um complexo de platina deve ser similar ao tempo de divisão celular [130]. Esta

descoberta, associada à necessidade de reduzir a toxicidade e alargar o espectro de ação farmacológica, impulsionou o desenvolvimento de novos agentes de platina [131] – compostos de terceira geração, que incluem complexos estruturalmente muito variados.

A oxaliplatina (trans-diaminociclohexaneoxalatoplatina(II)), também designada por Eloxantina, Figura 1.14 D) apresenta um ligando DACH rígido [132,133] e é ativa contra vários tipos de tumores refratários à cisplatina/carboplatina e mostrou ser especialmente eficaz contra o cancro colorectal [132]. Este é o terceiro fármaco atualmente aprovado para uso clínico a nível mundial.

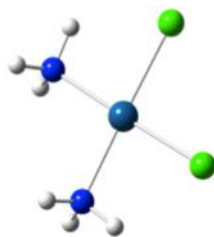
Têm ainda vindo a ser sintetizados complexos de platina com impedimentos estéreo, com o objetivo de bloquear a destoxificação pela GSH ou outros tióis celulares mantendo a capacidade para gerar lesões citotóxicas no DNA [134]. A picoplatina (*cis*-aminadicloro(2-metilpiridina)platina(II), Figura 1.14 E) é um agente de Pt(II) desenvolvido com o objetivo de ultrapassar a resistência à cisplatina [135]. Este composto contém um ligando volumoso de metilpiridina orientado num ângulo de 102.7° em relação ao plano Pt-N₂Cl₂, responsável pela cinética mais lenta das reações substituição dos ligandos no centro planar quadrado, aumentando simultaneamente a hidrofiliidade da molécula [130,136]. Isto é importante para nucleófilos biológicos capazes de coordenar à platina sem hidrólise prévia do ião cloreto.

A reação de hidrólise da picoplatina é cerca de duas vezes mais lenta do que a da cisplatina, e aquele complexo apresenta baixa reatividade face à tioureia e à metionina [137], tendo uma toxicidade *in vitro* intermédia entre a da cisplatina e a da carboplatina. Verificou-se que o seu IC₅₀ (*Inhibition concentration* 50, concentração de fármaco que induz uma inibição do crescimento ou viabilidade celular de 50%) em células tumorais de ovário é cerca de 8.1 µM mais elevada do que o valor médio obtido para a cisplatina (2.6 µM) mas muito inferior ao correspondente à carboplatina (20.3 µM) [122,138].

A satraplatina (*bis*-acetato-aminodicloro-ciclohexilaminoplatina(IV)) (Figura 1.14 F) é um outro complexo de terceira geração, o primeiro sintetizado de Pt(IV), que se encontra atualmente em ensaios clínicos, tendo-se mostrado bastante eficaz no tratamento de pacientes com HRPC em ensaios de fase I e II [139]. Este composto é oralmente ativo, o que é de grande importância pois aumenta significativamente a adesão dos pacientes à terapia e facilita a administração em doentes em ambulatório. A sua atividade antitumoral é similar à da cisplatina e da carboplatina (administradas intravenosamente) [122,140]. Após a administração oral a satraplatina é rapidamente absorvida, tendo-se identificado até à data pelo menos seis metabolitos: o mais abundante é designado por JM118 e é dezasseis vezes

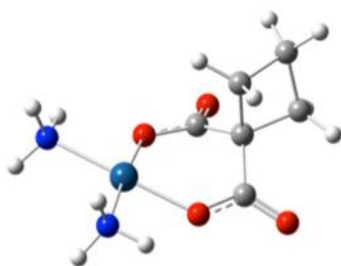
mais potente do que a satraplatina nativa [141], formando ligações intra- e intercadeia com o DNA [101,141].

Complexos de primeira geração

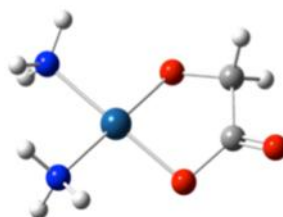


A. Cisplatina

Análogos de segunda geração

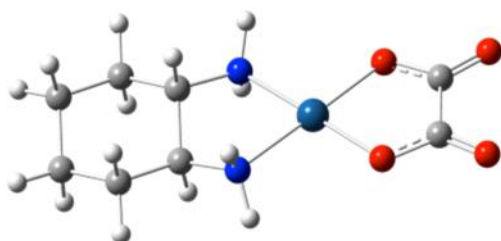


B. Carboplatina

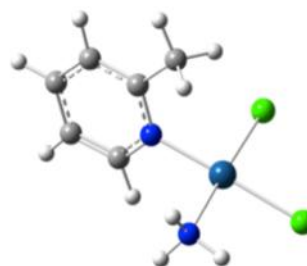


C. Nedaplatina

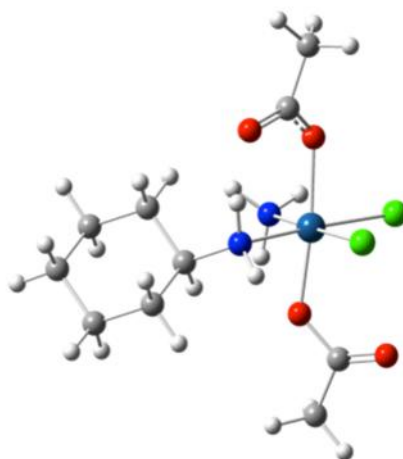
Análogos de terceira geração



D. Oxaliplatina



E. Picoplatina



F. Satraplatina



Figura 1.14. Representação estrutural de vários agentes antitumorais de platina. Note-se que os agentes de segunda geração têm todos grupos abandonantes carboxilato. No caso da carboplatina (B) e nedaplatina (C) aqui representadas, estes grupos possuem um anel de ciclobutano e um grupo glicolato, respectivamente. (As representações correspondem a estruturas otimizadas calculadas para a molécula isolada usando o método DFT/mPW1PW91 com as funções de base LANL2DZ para o átomo de Pt e 6-31G** para os restantes átomos).

1.3.4.B.5- Desenvolvimento de Complexos Polinucleares de Platina

O desenvolvimento racional de análogos da cisplatina de segunda e terceira geração permitiu reduzir largamente os efeitos secundários que advêm da terapia antitumoral com este tipo de compostos contendo platina. O respetivo espectro de ação farmacológica, no entanto, não tem sido alargado com êxito. Por tal motivo tem sido dada especial atenção a agentes antitumorais que violam as relações clássicas de estrutura-atividade estabelecidas inicialmente para estes compostos [142]. Os quelatos di- e trinucleares de Pt(II) enquadram-se neste grupo [143-145]. Ao contrário da cisplatina, complexo mononuclear que forma adutos intracadeia Pt(GG) e Pt(AG), os complexos multicentrados são capazes de interagir com o DNA a longa distância e formar adutos intra- e intercadeia, indutores de dano mais severo e menos facilmente reparável. Por este motivo é esperado que o espectro de ação destes sistemas seja bastante distinto do da cisplatina e dos seus análogos diretos [146]. De facto existe um elevado número de complexos multinucleares altamente ativos como antineoplásicos, na sua maioria sintetizados por Farrel e colaboradores [142,147-149].

Dentro deste grupo, os complexos dinucleares consistem em duas unidades monofuncionais de Pt(NH₃)₂Cl ligadas por uma diamina alquílica linear flexível (ligando “ponte”) [148]. Entre eles destaca-se o BBR3005 [147]. Mais recentemente, Reedjik e colaboradores desenvolveram uma nova classe de complexos dinucleares contendo ligandos “ponte” de azina [150] cuja citotoxicidade tem sido avaliada em várias linhas tumorais leucémicas.

Os complexos trinucleares de Pt(II) apresentam três centros de platina e um exemplo notável deste tipo de compostos é o BBR3464 que entrou em ensaios clínicos em 1997 [151]. Esta molécula é um tetracatião, no qual apenas os dois centros de platina terminais estabelecem ligações covalentes com o DNA originando adutos GG intercadeia de longa distância. O ião de platina central está envolvido apenas em interações não covalentes (normalmente de natureza eletrostática) com o DNA [145]. Ao contrário da cisplatina, para a qual o aduto mais distante conhecido é o 1,3-GG, o BBR3464 pode estabelecer contactos com o DNA com seis nucleótidos de separação, o que lhe confere a capacidade de induzir alterações pouco usuais na estrutura conformacional da dupla hélice, estabilizando-a na conformação Z. Este complexo, por exemplo, viola todas as regras de estrutura-atividade clássicas, tendo em conta que possui elevada carga positiva e apenas um grupo abandonante por cada centro metálico e em posição *trans*. O perfil pré-clínico do BBR3464 mostrou ter uma atividade citotóxica excepcional, com doses terapêuticas de cerca de um décimo das da

cisplatina e um largo espectro de atuação contra tumores sólidos (pequenas células, pulmão, gástrico, ovário, pâncreas) [152,153]. Verificou-se que os adutos do BBR3464 inibem a ligação da p53 à sequência de DNA com uma eficácia semelhante à exibida pelos cisplatina-DNA. Mas nenhum aduto de BBR3464 aumenta a afinidade de ligação da p53 ativa ao DNA sem sequência consenso: esta é uma diferença fulcral em relação à cDDP, para a qual o 1,2-cross-link intracadeia mais estável aumenta a afinidade de ligação da p53 ao DNA sem sequência consenso [154]. Regra geral, células com a p53 mutada são mais resistentes à cisplatina enquanto o BBR3464 mantém a atividade em diversos tumores que possuem resistência intrínseca ou adquirida à cisplatina [155]. Contudo, após os ensaios clínicos iniciais de fase II o desenvolvimento do BBR3464 foi parado devida à elevada toxicidade encontrada mediante a ligação irreversível a proteínas do plasma [104].

Recentemente têm sido adotadas novas estratégias no desenvolvimento de novos compostos baseados em platina, tendo em conta diversos aspetos:

a) Libertação lenta (controlada temporalmente) e específica (controlada espacialmente) do fármaco. Isto pode ser alcançado mantendo o complexo inerte após a sua administração imediata e promovendo a sua libertação gradual num local específico (alvo) [130]. Tal pode conseguir-se através da incorporação química dos complexos numa matriz polimérica durante um curto período de tempo – devido ao efeito EPR, (“*Enhanced permeability and retention effect*”) nas células tumorais, somente estas irão absorver o polímero, após o que pode ocorrer a libertação do fármaco no interior da célula [156]. Uma outra estratégia desenvolvida por Lippard e colaboradores [157,158] consiste no uso de nanotubos de carbono capazes de transportar grandes quantidades de complexo (mais de 70 moléculas). Estes nanotubos podem ser vetorizados, por exemplo mediante revestimento externo com anticorpos específicos para células tumorais, e penetrar a membrana por endocitose. Reações fotoquímicas [159], ativação redox ou variações do pH [160] são outras metodologias que podem ser empregues para promover a libertação controlada destes fármacos ao nível do seu alvo.

b) Complexos de platina contendo um outro agente farmacológico, por combinação, na mesma molécula, de um complexo análogo da cisplatina e um agente capaz de atuar como intercalador ao nível da dupla hélice. Tal conjugação leva, em certos casos, a um promissor efeito sinérgico. Um exemplo de um intercalador capaz de ser associado quimicamente à cDDP é a 1,10-fenantrolina-5,6-diona, que demonstrou citotoxicidade contra diversas linhas tumorais e apresenta simultaneamente atividade antimicrobiana [130]. Uma outra vantagem deste tipo de complexos é o seu carácter fluorescente, que permite seguir o respetivo trajeto intracelular por microscopia de fluorescência.

1.3.3.B.6 Agentes de Platina no Cancro da Próstata

Como já foi referido, os compostos de platina foram considerados durante muito tempo como pouco eficazes no tratamento do cancro da próstata. De facto, verifica-se que em regimes de monoterapia, a cisplatina, carboplatina e, mais recentemente a satraplatina, falham na terapia desta patologia [161-164]. No entanto, em regimes de terapia combinada verifica-se que eles podem ser uma mais-valia, diminuindo os níveis da PSA, e aumentando o tempo de progressão da doença e a sobrevivência dos pacientes (Tabela 1.1) [165].

Num ensaio clínico de fase II, Papandrea *et al* [166] levaram a cabo a combinação de cDDP com doxorrubicina e etoposido no tratamento de pacientes com HRPC. No entanto, este regime apresentou efeitos tóxicos severos, o que impossibilita o seu uso na clínica. Outro estudo elaborado por Culine e colaboradores [167] seguiu uma abordagem um pouco diferente, combinando a cisplatina com o docetaxel, tendo no entanto obtido resultados desapontantes, com uma eficácia muito reduzida acoplada a uma toxicidade elevada. Um outro ensaio clínico relativo à combinação de cisplatina com prednisona [168], porém, apresentou resultados mais promissores, tendo a PSA diminuído em 50% em cerca de 20% dos pacientes, para um tempo de progressão da doença de 5.6 meses e uma sobrevivência média de 13.8 meses.

Enquanto os estudos de terapia combinada com cisplatina produziram resultados clínicos pouco eficazes, ensaios equivalentes usando carboplatina conduziram a uma melhor eficácia, tendo-se verificado uma diminuição dos níveis da PSA e um aumento da sobrevivência dos pacientes. Deste modo, regimes de combinação com este agente de platina poderão ser uma estratégia válida no tratamento deste tipo de tumor. Os melhores resultados foram obtidos com a combinação carboplatina, docetaxel e estramustina-fosfato [169-172].

A oxaliplatina foi igualmente testada em diferentes regimes de combinação no tratamento do cancro da próstata. Um destes esquemas terapêuticos utiliza este agente alquilante em conjunto com 5-fluoracil (um antimetabolito) [173], obtendo uma sobrevivência total de 11.4 meses. A capecitabina (pró-fármaco que é convertido em 5-fluoracil no tumor) também foi usada em combinação com a oxaliplatina [174], mas os resultados não foram tão promissores, ficando a sobrevivência média dos pacientes nos 6 meses.

A combinação de docetaxel com oxaliplatina, por seu lado, conduziu a melhores resultados (em ensaios clínicos de fase III), com elevados níveis de resposta da PSA, um tempo de progressão da doença de 6.3 meses e uma sobrevivência média dos pacientes de 20.1 meses [175].

A picoplatina em combinação com taxanos e com prednisona originou, num ensaio clínico de fase II [176], dados encorajadores com um o tempo de progressão da doença igual a 7.4 meses e uma sobrevivência média dos pacientes de 21.4 meses.

A combinação de satraplatina com prednisona – ensaio SPARC – constituiu um dos maiores ensaios clínicos elaborados até à data neste campo, envolvendo 950 pacientes com HRPC. Os resultados provaram que este regime pode trazer um enorme benefício clínico, com uma redução em 33 % do risco de progressão da doença, 36% de atraso no tempo de progressão da dor, e o dobro da resposta da PSA [177]. No entanto, este regime de combinação não aumentou a sobrevida dos pacientes.

Tabela 1.1. Principais regimes terapêuticos contendo agentes de platina utilizados na última década face ao cancro da próstata.

Esquema Terapêutico	Número de Pacientes	Fase do Ensaio	% Resposta da PSA (50%)	Tempo de Progressão (meses)	Sobrevivência Média	Dose	Ref
Cisplatina							
+Doxorubicina e Etoposido	38	II	18	5.8	10.5	Cisplatina: 25 mg/m ² per day (days 2-4); Doxorubicina: 50 mg/m ² ; Etoposido: 120 mg/m ² por dia cada 4 semanas	[124]
+ Docetaxel	41	--	48	8	12	Cisplatina: 75 mg/m ² ; Docetaxel: 75 mg/m ² cada 3 semanas	[167]
+ Prednisona	25	II	20	5.6	13.8	Cisplatina: 75 mg/m ² cada 3 semanas; Prednisona: 10 mg bid ^b	[168]
Carboplatina							
Administração	27	II	26.9	--	19	Carboplatin: 150 mg/por semana por 3 semanas	[178]
+ Docetaxel	34	II	18	3	12.4	Carboplatina: AUC ^c 4; Docetaxel: 60 mg/m ² a cada 21 dias	[171]
+ Paclitaxel	25	--	48	3	10.5	Carboplatin: AUC 4-6 (dia 1); Paclitaxel: 60-80 mg/m ² (dias 1, 8 e 15), num ciclo de 28 dias	[168]
+ Etoposido	40	--	23	2.1	19	Carboplatina: AUC 5 (dia 1); Etoposide: 80 mg/m ² por dia (dias 1-3) cada 3 semanas	[179]
+ Paclitaxel e Estramustina P	56	II	67	5.3	19.9	Carboplatina AUC 6; Paclitaxel: 60-100 mg/m ² por semana; Estramustina P: 10 mg/Kg cada 4 semanas	[180]
+ Paclitaxel e Estramustina	32	II	100	--	24	Carboplatina: AUC 6 a cada 4 semanas; Paclitaxel: 100 mg/m ² por semana; Estramustina: 10 mg/Kg por dia	[170]
+ Calcitriol e Dexametasona	34	II	35.4	4.5	24.4	Carboplatina: AUC 2 a cada 4 semanas (ciclo de 6 semanas); Dexametasona: 1 mg por dia; Calcitriol: 0.5 µg (semana 5)	[181]
Oxaliplatina							
Administração	54	II	--	2.6	9.4	Oxaliplatina: 130 mg/m ² , infusão de 2 horas a cada 3 semanas	[173]
+ 5-fluoruracil				3.4	11.4	Oxaliplatina: 130 mg/m ² , 2 horas iv; 5-fluoruracil: 1000 mg/m ² por dia-iv (dias 1-4) a cada 3 semanas	[174]
+ Capecitabina	14	II	57	3.6	6	Oxaliplatina: 100 mg/m ² (dia 1); Capecitabina: 1000 mg/m ² /bid ^c (dias 1-14) a cada 21 dias	[175]
+ Docetaxel	33	III	64	6.3	20.1	Oxaliplatina: 110 mg/m ² ; Docetaxel: 60 mg/m ² a cada 21 dias	[182]
Picoplatina							
+ Docetaxel e Prednisona		II	78	7.4	21.4	Picoplatina: 120 mg/m ² ; Docetaxel: 75 mg/m ² ; Prednisona: 5 mg bid a cada 3 semanas	[181]
Satraplatina							
Administração só	39	II	--	7.7	16.7	Satraplatina: 120 mg/m ² /day, for 5 days every 3 weeks	[139]
+ Docetaxel	--	I	50	--	--	Satraplatina: 50 mg/m ² /day PO ^d (days 1-5); Docetaxel: 75 mg/m ² dia 1	[183]
+ Prednisona	380	III	33.3	5.2	14.9	Satraplatina: 100 mg/m ² , por 5 dias; Prednisona: 10 mg por dia a cada 3 semanas	[139]
+Prednisona (SPARC)	950	III	25.4	2.8	15.3	Satraplatina: 80 mg/m ² por dia (dias 1-5); Prednisona: 5 mg/bid PO a cada 35 dias	[177]

^aAUC - area under the curve (área sob a curva); ^biv - intravenoso; ^cbid – administrado duas vezes por dia; ^d PO – administrado oralmente

1.3.4.C. Complexos Antitumorais de Paládio(II)

A notável semelhança na química de coordenação entre os compostos de Pt(II) e Pd(II) tem vindo a advogar estudos sobre a potencialidade dos complexos de paládio como bons agentes antitumorais [184]. Um fator chave que talvez permita explicar o facto deste tipo de compostos ter sido menos estudado inicialmente com esta finalidade é a sua elevada labilidade, nomeadamente a diferença na cinética das respetivas reações de troca de ligandos: a hidrólise dos grupos abandonantes no caso dos complexos de Pd(II) é cerca de dez vezes mais rápida do que nos análogos de Pt(II) [185]. Assim, muitos complexos de Pd(II) dissociam-se rapidamente em solução aquosa, originando espécies altamente reativas incapazes de alcançar o DNA devido à sua rápida associação com outros ligandos [186]. Existe ainda a possibilidade da ocorrência de conversão para a forma *trans*, que é inativa. Esta elevada reatividade requer um cuidado adicional na síntese racional de qualquer fármaco contendo este ião: deve ser estabilizado por um ligando de azoto fortemente coordenado e um grupo de saída adequado, que o estabilize o tempo suficiente para exercer a sua atividade antitumoral *in vivo*.

1.3.4.D.- Complexos de Pt(II) e Pd(II) com Ligandos de Poliaminas

Nas últimas duas décadas têm sido desenvolvidos diversos estudos sobre as propriedades citotóxicas de complexos de Pt(II) e Pd(II) contendo ligandos “ponte” de poliaminas, com o objetivo de desenvolver novos fármacos com uma atividade antitumoral melhorada e uma especificidade superior aos análogos de cisplatina atualmente utilizados na clínica. Alguns destes agentes mostraram ser ativos em alguns tumores que possuem uma resistência intrínseca à cDDP, possivelmente devido ao facto de apresentarem uma diferente interação com o DNA, formando ligações covalentes mas também possivelmente interações electroestáticas com a dupla hélice [144]. Os adutos formados por este tipo de complexos são assim de longo alcance, intra- e intercadeia, devido à considerável flexibilidade e tamanho dos seus ligandos poliamínicos, bem como à presença de mais do que um centro metálico, o que origina danos mais extensos a nível do DNA, e portanto mais difíceis de reparar.

As propriedades citotóxicas dos complexos metálicos com ligandos poliamínicos são determinadas pelas suas características estruturais (tipo de poliamina, número e natureza do ião metálico) e podem ser direcionadas de modo a servir aplicações específicas ou alvos biológicos concretos (*ex.* tipo de cancro). O facto de que a simples alteração do metal

coordenante pode levar a um aumento bastante significativo da atividade antineoplásica, por exemplo, é de extrema importância [187].

Diversos estudos têm sido levados a cabo nos últimos vinte anos de modo a avaliar a atividade citotóxica deste tipo de complexos, nomeadamente no Grupo QFM-UC. Num destes trabalhos [188] foi determinado o efeito citotóxico de diferentes quelatos polinucleares de Pt(II) com a poliamina biogénica espermidina como ligando, face a uma linha celular de adenocarcinoma cervical humano. Os resultados obtidos demonstraram uma boa eficácia antiproliferativa e citotóxica contra esta linha, realçando a importância das preferências estruturais e conformacionais destes compostos, nomeadamente: a natureza do ligando poliamínico, as características e orientação do(s) grupo(s) abandonante(s), o número e esfera de coordenação dos centros metálicos assim como a distância entre eles. Além do efeito a nível do DNA, verifica-se que estes compostos podem ainda atuar ao nível da via das poliaminas. A atividade de outros complexos de Pt(II) possuindo como ligandos poliaminas biogénicas foi também avaliada pelos mesmos autores face a diferentes linhas cancerígenas [189], verificando-se que estes compostos possuem uma atividade citotóxica distinta dependendo da natureza do ligando, do centro metálico e do ambiente químico.

A atividade de dois compostos diferindo apenas na natureza do centro metálico – Pt(II) ou Pd(II) – foi também avaliada [187], tendo o complexo de paládio demonstrado uma maior atividade citotóxica (face a uma linha celular de sarcoma epitelial de língua) do que o seu análogo de platina. Uma vez que os compostos de Pd(II) possuem uma maior solubilidade em água e sendo cineticamente mais lábeis do que os homólogos de Pt(II), a hidrólise intracelular dos respetivos grupos abandonantes (cloretos) é mais rápida, o que acarreta uma atividade antitumoral mais pronunciada. Num estudo elaborado por Tummala *et al.* [190] foi avaliado o efeito na expressão de genes envolvidos na via das poliaminas para complexos contendo dois centros de Pt(II) ou Pd(II) coordenados a uma molécula de espermina. Verificou-se a indução de uma “*down-regulation*” bastante significativa da SMO (*Spermine Oxidase*), arginase 2 e NRF-2 (*Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2*), sem qualquer variação na SSAT. Estes resultados demonstram uma diferença mecanística relativamente à cisplatina (como agente único ou em combinação com uma poliamina modificada (DENSpm, N¹,N¹¹-Dietilnoespermina), que induziu uma “*up-regulation*” bastante significativa da SSAT e da SMO.

A atividade biológica de um complexo dinuclear de Pd(II) com espermina como ligando foi avaliada contra duas linhas de cancro de mama por Fiuza *et al* [191]. Os autores compararam a atividade destes complexos com a da cisplatina e verificaram que existem diferenças na eficácia destes compostos, dependentes das características da linha tumoral. Isto

é, face a células de cancro de mama independentes de estrogénio (MDA-MB-231) o composto mais eficaz foi o Pd(II)-Spm, enquanto que na linha celular MCF-7, que contém recetores de estrogénio, a cisplatina demonstrou possuir uma eficácia superior. Neste estudo foi ainda investigado o modo de ação do complexo, verificando-se que este leva à fosforilação da H2AX, o que é prova de uma ação ao nível do DNA. Foi ainda possível verificar que este complexo tem efeito no citoesqueleto, com um impacto bastante pronunciado na morfologia da célula. O complexo foi ainda administrado em conjunto com a cisplatina, tendo resultado uma atividade sinérgica, que é explicada devido aos distintos mecanismos de ação.

Assim, estes complexos polinucleares de poliaminas, em especial os de Pd(II), constituem um grupo bastante promissor para o tratamento de neoplasias.

1.4. Objetivos

O objetivo deste trabalho é proceder ao estudo da atividade antiproliferativa e citotóxica de diversos complexos poliamínicos contendo platina e paládio face a diferentes linhas celulares de cancro da próstata. Foi ainda verificado o efeito sinérgico de combinações (cDDP + Pd₂-Spm).

Este trabalho deu origem a um artigo de revisão, já submetido a *Current Medicinal Chemistry*

2.Materiais e Métodos

2.1. Reagentes, Materiais e Equipamento

Os diversos compostos, reagentes e equipamento utilizado na realização deste trabalho experimental, bem como os laboratórios fornecedores encontram-se descritos na tabela seguinte (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Listagem dos reagentes, materiais e equipamento utilizados na realização deste trabalho

<i>Produto</i>	<i>Fornecedor/Marca</i>
Químicos	
Cisplatina	Sigma-Aldrich (Sintra-Portugal)
Docetaxel	
Ácido Acético glacial (CH ₃ COOH 99,7 %)	
Ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA)	
Bicarbonato de sódio (NaHCO ₃)	
Brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT, 97.5 %)	
Dimetil-sulfóxido (DMSO, 99.9%)	
RPMI 1640 meio de cultura (RPMI- <i>Roswell Park Memorial Institute</i>)	
Metanol (≥ 99%)	
Solução de Azul de Tripiano (0,4 %)	
Solução tampão de fosfato de sódio pH 7.4 (PBS)	
Sulforrodamina B (SRB)	
Tripsina	
Antibiótico penicilina-estreptomicina (10 unidades/ml Pen e 10 µg/ml Estrep)	
Soro Fetal Bovino (FBS)	Invitrogen
Hemocitómetro	Boeco
Material	
Placas de 6 multipoços	Orange Scientific
Placas de 24 multipoços	
Frascos de cultura	
Placas de 48 multipoços	Costar
Pipetas automáticas	Eppendorf
Equipamento	
Agitador Vortex	IKA
Aparelho de purificação de água mili-Q	TKA
Autoclave	Omega
Balança analítica	Mettler Toledo
Banho termostático analógico, sem agitação	Clifton
Câmara de fluxo laminar	BioWizard
Centrifugadora	MPW
Incubadora	Sanyo
Medidor de pH	Crison
Microscópio óptico invertido com câmara fotográfica acoplada	Olympus
Leitor de placas multipoços	BioTeck

2.2. Modelos Biológicos

O trabalho experimental foi realizado em três linhas celulares humanas de próstata: PC-3, linha celular cancerígena não responsiva a androgénios, LNCaP, linha celular cancerígena responsiva a androgénios, e PNT2, linha celular de epitélio da próstata normal, imortalizada com SV-40 (*Simian virus 40*) (Figura 2.1). Todas as linhas apresentam uma morfologia epitelial, crescendo em monocamada. As células PC-3 foram gentilmente cedidas pela Doutora Anabela Sarmento (Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra) e as PNT2 bem como as LNCaP pelo Instituto Português de Oncologia do Porto (grupo de epigenética do cancro, Professora Doutora Carmen Jerónimo).



Figura 2.1- Linhas celulares humanas utilizadas neste trabalho experimental (LNCaP, PC3 PNT2). Ampliação total de 100x.

2.3. Métodos

2.3.1. Ensaio Biológicos

2.3.1.1. Cultura Celular

As culturas celulares foram mantidas numa atmosfera com 85% de humidade relativa, contendo 5% de CO₂ a uma temperatura de 37°C. Todas as linhas celulares foram cultivadas em monocamada, em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 1,5 g de NaHCO₃, FBS a 10 % e 1% de penicilina-estreptomicina. O FBS foi previamente inativado, de modo a diminuir a citotoxicidade devida às imunoglobulinas presentes, sendo para tal colocado num banho a 56°C durante 30 minutos, e de seguida deixado no frio, a 4°C, *overnight*.

Para a manutenção das culturas, as células foram subcultivadas em frascos de 75 cm² de acordo com as suas características de crescimento, sendo sempre assegurado que as células

se encontravam na fase exponencial de crescimento. No processo da subcultura as células eram lavadas com 5 mL de PBS e seguidamente sujeitas a dissociação com 2,5 mL de uma solução de Tripsina 0,05%-EDTA. De seguidas as células eram colocadas na incubadora a 37°C de modo a que enzima exercesse a sua atividade proteolítica sob as proteínas intercelulares. Seguidamente as células eram ressuspensas em meio de cultura e subcultivadas nas densidades pretendidas.

2.3.1.2. *Curvas de Crescimento*

Para determinar a fase exponencial de crescimento das células em cultura procedeu-se à elaboração de uma curva de crescimento. Inicialmente foram preparadas culturas em placas de 6 poços com densidades celulares iniciais de $1,5 \times 10^4$ células/cm² nas células PC-3 e de $2,0 \times 10^4$ células/cm² nas células PNT2.

A contagem do número de células foi efetuada recorrendo ao método do azul de Tripiano, a cada 24 horas após a preparação das culturas, por um período total de 7 dias. Todos os ensaios foram feitos em duplicado.

2.3.1.3. *Avaliação de Atividade Citotóxica*

2.3.1.3.1. *Preparação dos Compostos*

A síntese dos complexos utilizados neste trabalho experimental (Tabela 2.2), foi levada a cabo no grupo de investigação QFM-UC (“Química-Física Molecular” da Universidade de Coimbra), de acordo com métodos otimizados e publicados [188,192].

Os compostos a testar foram dissolvidos em PBS e foram preparadas soluções *stock* com concentrações compreendidas entre os 200 µM e 1 mM. Devido à dificuldade em solubilizar alguns dos complexos, foi adicionado DMSO, sempre numa quantidade inferior a 10%.

A lista dos compostos encontra-se na tabela 2.2.

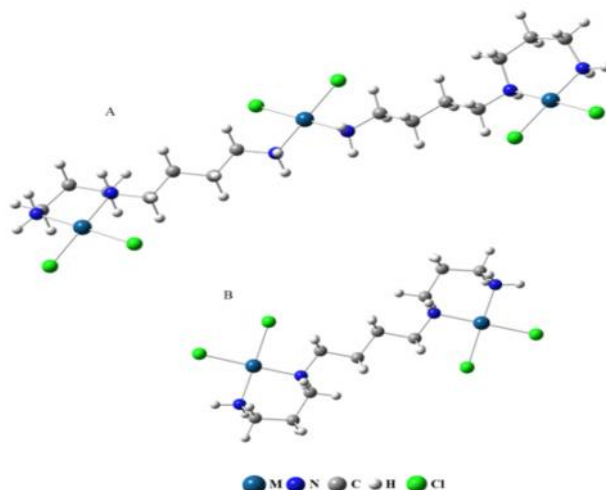


Figura 2.2. Estrutura de alguns complexos utilizados neste trabalho experimental. M=(Pd(II) ou Pt(II))

Tabela 2.2.- Lista dos complexos testados na realização deste trabalho experimental.

Composto	Designação	Fornecedor/Origem
(1,3-diaminopropano)dicloropaládio	Pd(Dap)	Unidade QFM
(1,3-diaminopropano)dicloroplatina	Pt(Dap)	Unidade QFM
[(PdCl ₂) ₃ -μ-(espermidina) ₂]	Pd ₃ -Spd	Unidade QFM
[(PtCl ₂) ₃ -μ-(espermidina) ₂]	Pt ₃ -Spd	Unidade QFM
[(PdCl ₂) ₂ -μ-(espermina) ₂]	Pd ₂ -Spm	Unidade QFM
[(PtCl ₂) ₂ -μ-(espermina) ₂]	Pt ₂ -Spm	Unidade QFM
Carboplatina		Sigma-Aldrich
Cisplatina	CDDP	Sigma-Aldrich

2.3.1.2. Ensaios de Citotoxicidade

Para efetuar os ensaios de citotoxicidade foi utilizada uma densidade celular de $2,0 \times 10^4$ células/cm², na linha PNT2 e de $1,5 \times 10^4$ células/cm² na linha PC-3. As células foram cultivadas em placas de 48 poços (0,95 cm² de área), por adição de 500 μL de suspensão celular (Figura 2.3).

Após 24 horas do plaqueamento, foram adicionados os compostos a testar com diferentes concentrações, que variaram entre os 2 e os 50 μM. Aos poços controlo não foi adicionado qualquer composto.

A viabilidade celular foi verificada às 24, 48 e 72 horas após a adição do composto a testar recorrendo a dois métodos distintos: método de redução do MTT e método colorimétrico da SRB, que irão ser descritos nas secções seguintes.

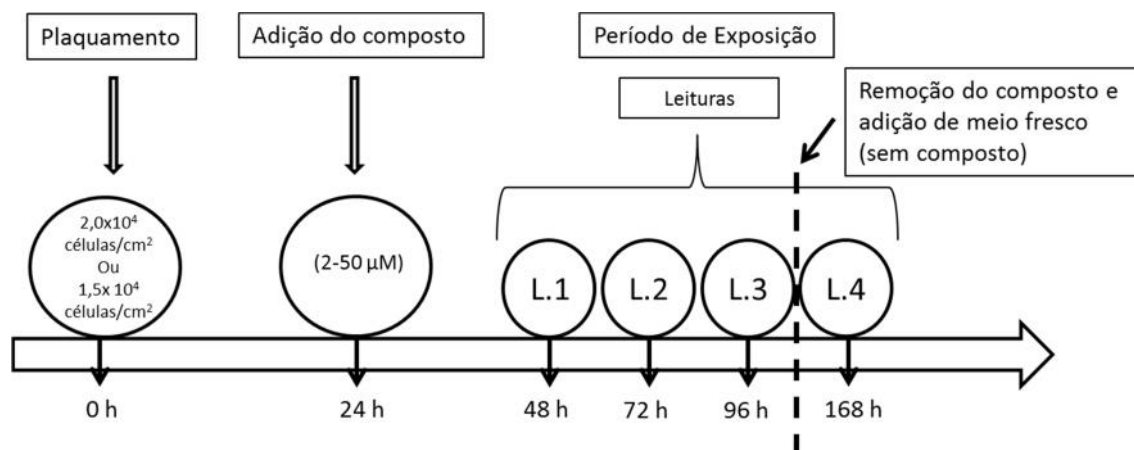


Figura 2.3. Representação do esquema de adição dos compostos nos ensaios *in vitro* para a determinação da atividade antiproliferativa e citotóxica.

Para averiguar a reversibilidade do efeito dos compostos testados, o meio de cultura foi removido ao fim de 72 horas de incubação com o composto e após lavagem com PBS, adicionou-se meio novo, sem o complexo. A viabilidade celular foi determinada 72 horas após a remoção do composto.

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados obtidos comparados com culturas controle (i.e., não expostas ao composto em estudo), iniciadas e processadas em paralelo.

2.3.1.2.1 – A. Determinação da Viabilidade Celular pelo Método do MTT

O método da redução do MTT baseia-se na capacidade que as células viáveis possuem de reduzir o sal tetrazólico, MTT, por ação de desidrogenases mitocondriais (Figura 2.4). O MTT é um composto tetrazólico (contém um anel heterocíclico de 4 átomos de azoto e 1 átomo de carbono) de cor amarela que é reduzido a *formazan*, de cor púrpura, insolúvel em meio aquoso cuja absorvância pode ser quantificada entre os 500 e os 600 nm.

De modo a dissolver os cristais formados, adiciona-se DMSO e obtém-se uma solução de cor púrpura que absorve significativamente a um comprimento de onda de 570 nm, permitindo quantificar os cristais obtidos e correlacionar com o número de células viáveis. Os compostos citotóxicos possuem a capacidade de danificar e destruir a célula, não sendo possível assim que a célula reduza o MTT a *formazan* [193].

Para a determinação da viabilidade celular pelo método do MTT nas diferentes culturas celulares em estudo, terminado o período de exposição aos compostos removeu-se o meio e cultura das respetivas culturas e adicionou-se uma solução de MTT 0,5 mg/ml em PBS, a cada um dos poços. As placas foram envolvidas em papel de alumínio e incubadas a

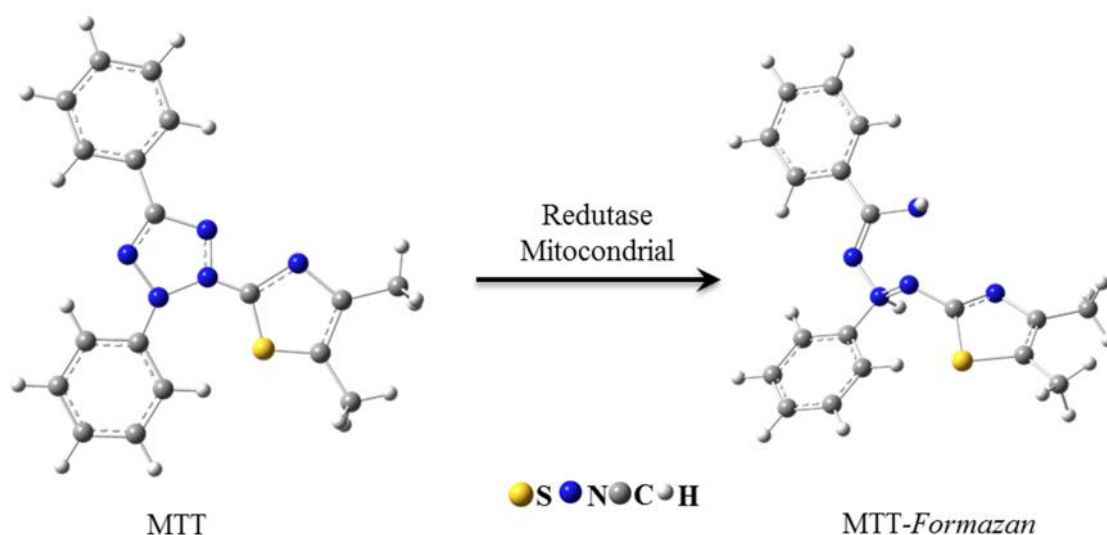


Figura 2.4. Reação de redução do MTT a *formazan* por ação de redutases celulares em células vivas

37°C durante 3 horas. Decorrido este tempo, aspirou-se a solução de MTT de cada poço e adicionou-se DMSO de modo a dissolver os cristais de *formazan* formados. Posteriormente procedeu-se à leitura dos valores de A_{570} num espectofetómetro com leitor de placas multipoços. A viabilidade celular foi determinada recorrendo à seguinte equação (2.1):

$$\% \text{ viabilidade celular} = \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controlo}} - A_{\text{branco}}} \times 100 \quad (2.1)$$

sendo que:

a_{amostra} = absorvância das soluções expostas ao composto em estudo, à qual foi subtraída a absorvância do Branco (DMSO)

a_{controlo} = absorvância dos controlos, à qual foi subtraído a absorvância do Branco.

2.3.2.2.1.B. Determinação da Proliferação Celular pelo Método da SRB

O método colorimétrico da Sulforrodamina B (SRB) é utilizado para determinar a densidade celular, baseando-se na medida do conteúdo proteico celular [194]. Este método baseia-se na capacidade que a proteína SRB possui de se ligar electrostaticamente e de forma dependente do pH aos resíduos de aminoácidos básicos de proteínas das células previamente fixadas em ácido acético [195]. A SRB é uma aminoxantina cor-de-rosa brilhante com dois grupos sulfónicos capazes de se ligarem a resíduos de aminoácidos básicos, em condições levemente acídicas, e capazes de se dissociarem dos mesmos em condições básicas. Uma vez que esta ligação é estequiométrica, a quantidade deste corante extraído das células coradas é proporcional à massa celular (i.e., linear com a densidade celular) sendo por isso utilizado por vezes na determinação da densidade celular. Trata-se de um método linear, válido para uma

gama alargada de densidades celulares e muito sensível. O método permite não só a análise de um grande número de amostras em poucos dias como também requer equipamento simples e reagentes pouco dispendiosos, sendo assim um teste de *screening in vitro* eficiente com uma elevada relação eficácia/custo.

Para o método colorimétrico da SRB, as células foram expostas ao complexo e, a cada 24 horas, foi determinado o valor da proliferação celular, durante um período total de 4 dias. As medições da proliferação celular foram efectuadas

às 24, 48 e 72 horas e verificou-se o efeito da reversibilidade de composto, às 144 horas, após lavagem com PBS e água Mili-Q. As células foram fixas com 1% de ácido acético em metanol e congelaram-se durante a noite. Posteriormente, as células foram descongeladas e as placas deixadas à temperatura ambiente para secarem. Uma vez secas, adicionaram-se 250 µL de SRB 0.5% (m/v) em 1 % de ácido acético e incubou-se a 37°C por uma hora, de modo a permitir que a SRB se ligasse às proteínas celulares. As placas foram cuidadosamente lavadas com ácido acético ate a coloração desaparecer, de modo a remover a SRB não ligada às proteínas. Dissolveu-se a SRB ligada às proteínas em 500 µL de 10 mM Tris (pH 10). A leitura da absorvância foi feita a 540 nm (A_{540}) num espectrofotómetro com leitor de placas multipoços.

A % de proliferação ou crescimento celular, traduzida pela % de retenção de SRB foi calculada pela seguinte equação (2.2):

$$\% \text{ de crescimento celular} = \frac{\lambda_{amostra} - \lambda_{dia 0}}{\lambda_{controlo negativo} - \lambda_{dia 0}} \times 100 \quad (2.2)$$

sendo que,

$\lambda_{amostra}$ = absorvância das soluções expostas ao composto testado, à qual foi subtraída a absorvância do branco (Tris 10 mM);

$\lambda_{dia 0}$ = absorvância do controlo (t=0 horas, correspondendo à densidade celular na ausência dos compostos), à qual foi subtraída a absorvância do Branco;

$\lambda_{controlo negativo}$ = absorvância dos controlos, à qual foi subtraída a absorvância do branco.

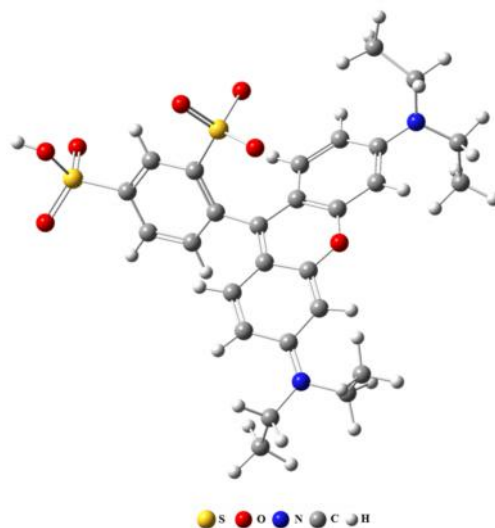


Figura 2.5 Estrutura química da Sulforrodamina B (SRB)

A % de inibição do crescimento celular foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do crescimento celular} = 100 - \% \text{ de crescimento celular} \quad (2.3)$$

Para a determinação da concentração que inibe 50 % do crescimento celular, (IC₅₀) em relação a culturas celulares controlo, foram traçados gráficos de dose-resposta da % de inibição do crescimento celular em função da concentração do composto

2.4. Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando o programa *GraphPad PRISM 5.00*. Os resultados apresentados são a média \pm desvio padrão. Os valores de IC₅₀ foram obtidos, através da função “Nonlinear regression (curve fit) – Dose-response – inhibition”.

Na análise dos dados obtidos o tratamento estatístico foi levado a cabo aplicando o método One-Way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas *Dunnet's* (vs culturas controlo)

Para proceder à comparação dos compostos entre as 72 e as 144 horas, recorreu-se ao método One-Way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Tukey.

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação das Condições Experimentais Adequadas à Realização dos Ensaios de Citotoxicidade

A escolha das condições apropriadas para a realização de um ensaio experimental é um passo de extrema importância. Existem diversos factores que poderão influenciar a escolha dos métodos adoptados, nomeadamente: i) a facilidade técnica; ii) a disponibilidade e sensibilidade dos reagentes utilizados; iii) o equipamento disponível; iv) a escolha das linhas celulares; v) os métodos utilizados para avaliar a citotoxicidade; vi) o veículo de adição do composto em estudo; vii) a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

No que diz respeito às linhas celulares, foram escolhidas: uma linha celular cancerígena de próstata independente de androgénios (PC-3) com grande capacidade metastática; uma linha celular cancerígena de próstata responsiva a androgénios (LNCaP), com um carácter invasivo inferior às células PC-3; e a linha PNT2, de epitélio normal da próstata imortalizada com o SV 40.

Ao efetuar os testes para determinar qual o método mais apropriado para avaliar a citotoxicidade dos compostos, verificou-se que as células LNCaP possuíam uma fraca adesão, sendo facilmente destacadas apenas pelos processos de lavagem com PBS. A utilização do método do MTT nestas células foi assim impossibilitada, pois os cristais *formazan* formados destacavam-se facilmente, impossibilitando a leitura dos valores de absorvância. Por este motivo, e não dispondo de material apropriado para contornar este problema, (como um rotor de microplacas) os ensaios com a linha celular LNCaP foram abandonados.

A escolha do número de células viáveis por unidade de superfície é particularmente importante na elaboração de ensaios de citotoxicidade. É importante assegurar que no decorrer das experiências as células se encontram em fase exponencial de crescimento. Para a escolha das densidades celulares a usar nos ensaios de citotoxicidade foi elaborada uma curva de crescimento (Figuras 3.1 e 3.2), utilizando o método de exclusão do Azul de Tripano, como descrito na secção Materiais e Métodos (2.2.1.2).

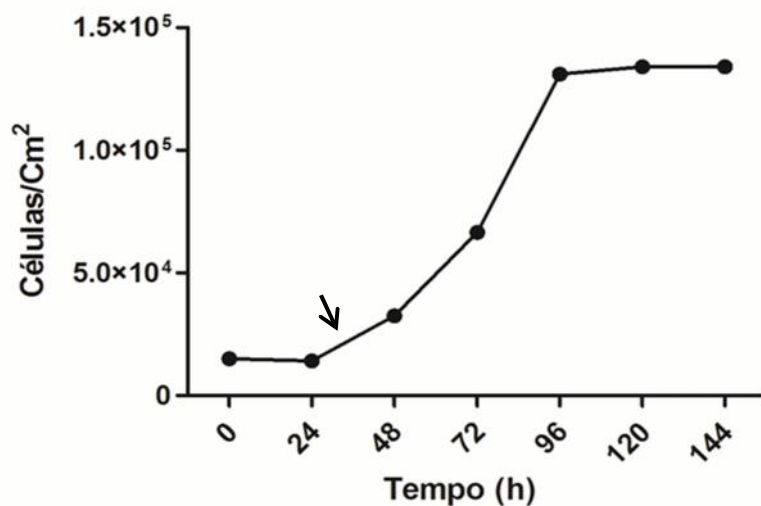


Figura 3.1- Curva de crescimento das células PC-3. (Método de exclusão do azul de Tripano), representando o número de células viáveis em função do tempo de incubação, num total de 6 dias (144 horas), como descrito na secção (2.2.1.2). Para cada dia, os valores de densidade celular obtidos são a média dos valores medidos para duas culturas diferentes, iniciadas e processadas em paralelo (duplicados).

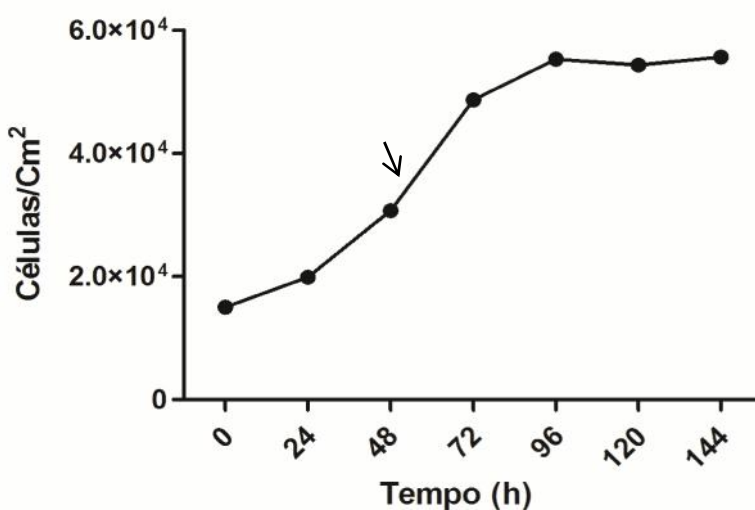


Figura 3.2- Curva de crescimento das células PNT2. (Método de exclusão do azul de Tripano), representando o número de células viáveis em função do tempo de incubação, num total de 6 dias (144 horas), como descrito na secção (2.2.1.2). Para cada dia, os valores de densidade celular obtidos são a média dos valores medidos para duas culturas diferentes, iniciadas e processadas em paralelo (duplicados).

Através dos gráficos representados nas Figuras 3.1 e 3.2, foi possível determinar os tempos de duplicação para as linhas PC-3 e PNT2 nas condições experimentais utilizadas: 32 horas para as PC-3 e 49 horas para as PNT2.

3.1.1 Avaliação de Atividade Citotóxica

A citotoxicidade é um parâmetro avaliado rotineiramente durante o processo de desenvolvimento de novos compostos com propriedades antineoplásicas, e é frequentemente avaliada através da utilização de ensaios de viabilidade celular como o método de redução do MTT.

Num varrimento inicial, os compostos utilizados foram testados em concentrações compreendidas entre os 5 e os 50 μM , na linha celular PC 3, com tempos de incubação de 48 e 72 horas (Figura 3.3). Apenas os compostos que apresentaram a capacidade de reduzir a viabilidade celular em 50% foram selecionados para um estudo aprofundado.

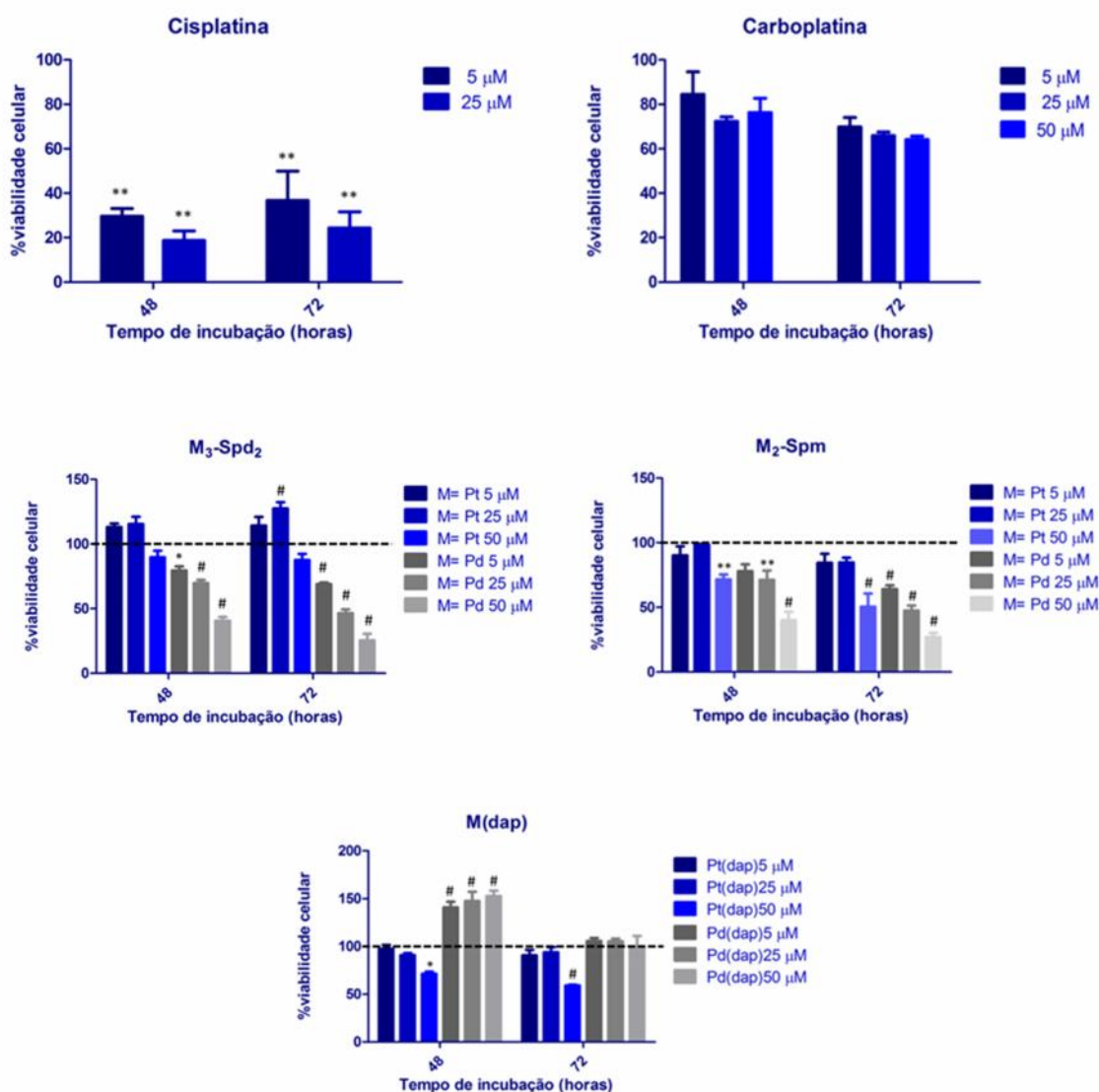


Figura 3.3. Efeito de diferentes concentrações (5, 25 e 50 μM) dos complexos utilizados neste estudo na viabilidade celular das células PC-3, determinada pelo método do MTT.

Os resultados apresentam-se como percentagem do valor obtido em relação ao controlo. Todas as culturas foram preparadas com uma densidade inicial de $1,5 \times 10^4$ células/cm². Para cada condição os valores apresentados correspondem à média±SD dos valores obtidos para duas experiências diferentes, iniciadas e processadas em paralelo, realizadas em triplicado (n=6). *p<0,05, ** p<0,01, #p<0,001 vs. culturas controlo.

3.1.2. Seleção dos Compostos

Curiosamente verificou-se um aumento considerável da viabilidade celular às 72 horas para as células tratadas com Pt₃-Spd₂, o que não se verificou com o análogo de Pd(II). Este aumento demonstra que a alteração do centro metálico neste tipo de quelatos polinucleares é de extrema importância na determinação da sua atividade citotóxica. Por outro lado, estes complexos foram dissolvidos em 10% de DMSO, o que é bastante contraproducente, pois a platina e o paládio, sendo elementos macios tem grande afinidade pelo enxofre [196]. Uma hipótese que poderá explicar o sucedido neste estudo será a deslocação da platina para o enxofre presente no DMSO, deixando o ligando (espermidina) parcialmente livre que sendo uma poliamina biogénica essencial ao crescimento e proliferação celular, poderá ter induzido um crescimento celular inesperado.

De todos os compostos estudados, os mais promissores aparentam ser os complexos polinucleares Pd₂-Spm e Pd₃-Spd. No entanto, pelo que foi discutido no parágrafo anterior, apenas se selecionou o composto Pd₂-Spm para estudos mais aprofundados.

3.2. Ensaios com o Pd₂-Spm

Uma vez que a principal abordagem na pesquisa de potenciais agentes anticancerígenos ao longo das últimas décadas tem sido baseada nos seus efeitos citotóxicos seletivos em linhas celulares cancerígenas de mamíferos, diversos métodos para determinar a citotoxicidade dos compostos tem sido descritos e comparados. O método da SRB [194] foi utilizado nesta fase do estudo para avaliar os efeitos antiproliferativo e citotóxico induzidos pelos complexos Pd₂-Spm. Nesta fase, o efeito do Pd₂-Spm foi avaliado na linha PC-3 (cancerígena) e PNT2 (não-cancerígena). No desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos procura-se que o princípio activo se manifeste no local da lesão e não em células e tecidos saudáveis, de modo a minimizar os efeitos secundários inerentes a uma administração sistémica. Por esta razão é importante neste tipo de trabalho comparar a atividade dos compostos em linhas tumorais com diferentes características e em células não-neoplásicas. Uma vez que a sensibilidade dos compostos é diferente face a cada linha celular, utilizaram-se, neste trabalho duas linhas celulares de cancro da próstata: LNCaP, sensível a androgénios, PC-3, insensível às mesmas hormonas. Devido à dificuldade em manipular a linha LNCaP não foi possível apresentar os resultados obtidos, pois careciam de robustez. Em estudos futuros, porém será importante proceder ao teste destes complexos nessa ou noutra linha tumoral que possua características diferentes da linha PC-3. Foi analisado ainda o efeito

destes compostos numa linha saudável de próstata, PNT2, de modo a verificar se os compostos são tóxicos para as células saudáveis. Os resultados obtidos estão representados na Figura 3.4.

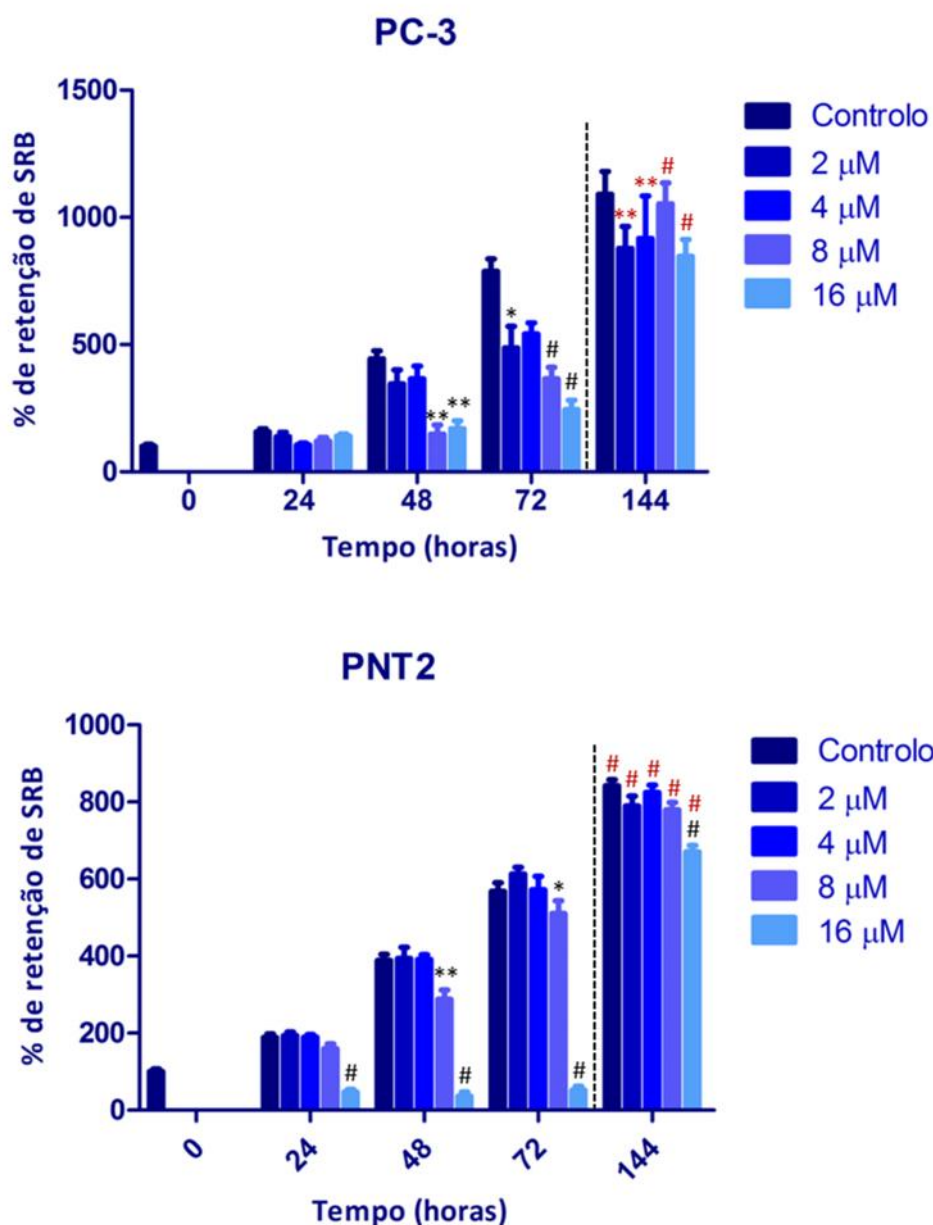


Figura 3.4. Efeito antiproliferativo do composto Pd₂-Spm em células malignas de próstata (PC-3 e em células de epitélio normal de próstata (PNT2).

Os ensaios foram realizados em triplicado pelo método colorimétrico da SRB. Os resultados encontram-se expressos em percentagem de retenção de SRB±SD, em relação a culturas controlo às 0 horas, consideradas 100%. As culturas foram plaqueadas a uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células/cm² nas células PC3 e de $2,0 \times 10^4$ células/cm² nas células PNT2. As diferentes culturas referentes a cada tempo foram processadas em paralelo. A linha a tracejado refere-se aos ensaios de reversibilidade: 72 horas após a adição do composto o meio foi removido e após lavagem com PBS foi adicionado meio fresco (sem composto). Para cada condição os valores apresentados são a média ± SD dos valores obtidos para 3 culturas diferentes (triplicados) iniciadas e processadas em paralelo (n=9): *p < 0,05, **p < 0,001, # p < 0,001 vs culturas controlo. *p < 0,05, **p < 0,01, # p < 0,001.

Ao proceder à análise da Figura 3.4, referente ao efeito do composto Pd₂-Spm na linha celular PC-3, verifica-se que às 24 horas não se observam diferenças estatisticamente significativas para nenhuma das concentrações testadas, em relação à cultura controlo. No entanto, às 48 horas é observável uma redução significativa da viabilidade celular para as concentrações de 8 e 16 µM (p <0,01). Às 72 horas de incubação esta redução é ainda mais nítida para as mesmas concentrações, verificando-se ainda uma diminuição estatisticamente significativa para a concentração mais baixa (2 µM) (p <.0,001). Ao que parece este composto tem o seu efeito máximo às 72 horas, na concentração mais elevada (16 µM). Os valores de IC₅₀, calculados para cada tempo de incubação encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1- Valores de IC₅₀ (µM) obtidos através do método SRB para o composto Pd₂-Spm face à linha celular PC-3, após 24, 48 e 72 horas de incubação.

IC ₅₀ (µM)			
Tempo ^a (horas)	24	48	72
Composto			
Pd ₂ -Spm	3,201±1,29	4,714±1,27	4,429±1,3

^aTempo decorrido entre a adição do composto a testar à cultura celular e a contagem pelo método da SRB. (Os valores apresentados referem-se à média ±SD dos valores obtidos para 3 ensaios independentes).

Com vista a melhor compreender o modo de ação do complexo Pd₂-Spm procedeu-se ao estudo da reversibilidade do seu efeito citotóxico. Para tal, e como descrito em Materiais e Métodos, foi removido o meio que continha o composto e substituído por meio fresco (sem complexo). A viabilidade celular foi então determinada 72 horas após esta remoção (correspondendo às 144 horas nos gráficos da Figura 3.4).

Segundo Houghton *et al.*, se um dado agente apresenta efeito citostático, (inibidor do crescimento celular) as células voltam a crescer e entram em mitose quando o meio contendo o composto em estudo é retirado e adicionado meio fresco (sem composto). No entanto, caso se verifique a morte acentuada das células durante a exposição inicial não se observará um aumento no número de células ao remover o agente, sendo este considerado de citotóxico [194].

Verificou-se no presente trabalho que na linha celular PC-3 a reversibilidade do efeito do complexo obtida é estatisticamente significativa, o que indica que este composto exerce a sua ação de um modo citostático, ou seja, a sua ação dever-se-á a uma paragem no ciclo celular mais do que a um dano a nível do DNA. No entanto, estudos prévios [191] demonstraram que o Pd₂-Spm danifica DNA afetando também o citoesqueleto celular. À luz

dos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que devem estar envolvidos outros mecanismos na atividade deste quelato dinuclear.

Analisando os dados da Figura 3.4, relativos às células PNT2 verifica-se um decréscimo acentuado na proliferação celular logo às 24 horas após a adição do composto, para a concentração de 16 μM . O valor da percentagem de retenção de SRB é inferior ao do controlo às 0 horas, indicando que poderá ter ocorrido morte celular (em vez de simplesmente inibição do crescimento celular). Às 48 horas, para a concentração de 8 μM , o composto também apresenta uma redução significativa na proliferação celular, embora em menor extensão ($p < 0,01$). No entanto, para este tempo de incubação na concentração mais elevada continua a verificar-se que os valores da percentagem de retenção de SRB são bastante reduzidos, também inferiores aos valores no dia 0. Quando analisamos os dados referentes às 72 horas, parece haver uma recuperação das células pois para a concentração de 8 μM , (que às 48 horas apresentava um efeito antiproliferativo), não se verificam diferenças significativas ao nível da proliferação celular.

Ao analisar os resultados obtidos para as 144 horas, período correspondente às 72 horas após a remoção do composto, verifica-se que ocorre um aumento da proliferação celular para todas as dosagens testadas ($p < 0,001$), reforçando a ideia de que estes compostos deverão exercer a sua ação a nível do ciclo celular.

Em suma, pela análise dos resultados obtidos nas duas linhas celulares de próstata (neoplásica e sã) podemos concluir que o complexo polinuclear $\text{Pd}_2\text{-Spm}$ tem um efeito antiproliferativo em ambas as linhas. No que diz respeito à linha PC-3 apenas se verifica um efeito significativo às 48 horas para as concentrações de 8 e 16 μM , sendo que o efeito máximo se obtém às 72 horas, para as mesmas concentrações. A reversibilidade do efeito do complexo ocorre para todas as concentrações utilizadas. Quanto à linha PNT2, verifica-se que a concentração de 16 μM diminui drasticamente a proliferação celular logo às 24 horas, mantendo-se esta situação até às 72 horas. Após a remoção do composto as células recuperam, indicando uma possível ação citostática.

Sendo a linha celular PNT2 uma linha celular não cancerígena, estes resultados não são satisfatórios para a concentração de 16 μM , pois se por um lado é a concentração mais eficaz na linha PC3, o seu efeito é extremamente nocivo para as células saudáveis, o que tornaria uma possível terapêutica recorrendo ao uso deste composto muito limitado por possíveis efeitos secundários graves.

3.3 Ensaios com a Cisplatina

Para que um agente anticancerígeno seja aceite como um novo fármaco, ele tem que obrigatoriamente apresentar vantagens sobre as que se encontram atualmente em uso clínico, como a cisplatina.

Tendo isto em mente, a ação do composto Pd₂-Spm foi comparada à da cisplatina. Os resultados obtidos em relação à atividade da cisplatina em ambas as linhas celulares encontram-se representados no gráfico da Figura 3.5.

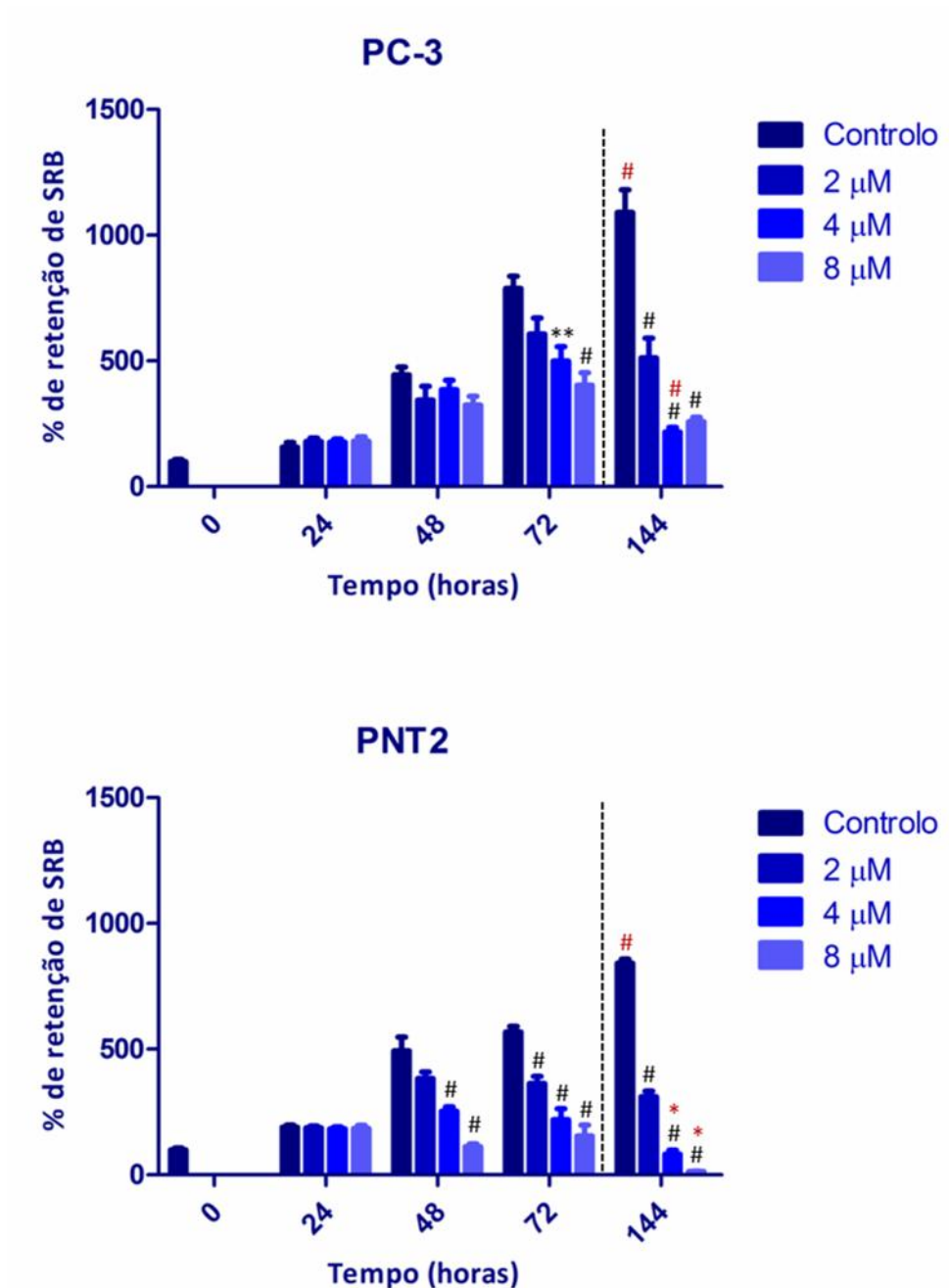


Figura 3.5. Efeito antiproliferativo da cisplatina em células malignas de próstata (PC-3) e em células de epitélio normal de próstata (PNT2). Os ensaios foram realizados em triplicado pelo método colorimétrico da SRB. Os resultados encontram-se expressos em percentagem de retenção de SRB \pm SD, em relação a culturas controlo às 0 horas, consideradas 100%. As culturas foram plaqueadas a uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células/cm² nas células PC3 e de $2,0 \times 10^4$ células/cm² nas células PNT2. As diferentes culturas referentes a cada tempo foram processadas em paralelo. 72 horas após a adição do composto o meio foi removido e após lavagem com PBS foi adicionado meio fresco(sem composto). Para cada condição os valores apresentados são a média \pm SD dos valores obtidos para 3 culturas diferentes (triplicados) iniciadas e processadas em paralelo (n=9).*p <0,05, **p <0,001, # p <0,001 vs culturas controlo.*p <0,05, **p <0,001, # p <0,001.

Ao analisar o gráfico da Figura 3.5, referente às células tumorais PC-3, verifica-se que a cisplatina tem uma ação significativa apenas após 72 horas de administração, para as concentrações de 4 e 8 μM ($p < 0,01$ e $p < 0,001$, respetivamente).

Conclui-se ainda que o seu efeito não é revertido, ou seja, mesmo na ausência do fármaco as células continuam a morrer. O valor de IC_{50} foi calculado para as 72 horas ($6 \pm 1,03 \mu\text{M}$), pois para tempos de incubação inferiores não se verificou convergência dos dados. Este facto não é surpreendente já que existe uma variedade de tumores que possui uma resistência intrínseca à cisplatina e o cancro da próstata refratário a hormonas é um deles. De facto, este tumor é considerado resistente principalmente ao desenvolvimento da resistência adquirida. Estas questões podem ser contornadas recorrendo ao uso de estratégias terapêuticas específicas, nomeadamente ao aumento da dosagem de fármaco. No entanto isto iria provocar efeitos secundários graves.

Devido ao facto da cisplatina ser o composto de platina(II) mais potente que se conhece, o seu uso neste tipo de cancro é bastante atrativo e é necessário desenvolver novas estratégias que permitam a sua utilização, como a vectorização de vias moleculares críticas dos tumores [197].

Através dos resultados relativos à linha não cancerígena (Figura 3.5) verifica-se que a cisplatina exerce a sua ação máxima às 48 horas, ou seja num período mais curto quando comparado com as células PC-3. Às 72 horas de incubação todas as concentrações testadas apresentam um efeito significativo na redução da proliferação celular. Às 144 horas, 72 horas após a remoção do fármaco a percentagem de retenção de SRB diminui para todas as concentrações, sendo esta diminuição estatisticamente significativa apenas nas dosagens de 4 e de 8 μM ($p < 0,05$).

Estes resultados evidenciam um claro efeito citotóxico da cisplatina neste tipo de células humanas de próstata.

3.4. Comparação dos Efeitos da Cisplatina e do Complexo Pd₂-Spm

Linha celular PC-3 (cancerígena)

Após a análise dos resultados obtidos para os ensaios de proliferação celular, verifica-se que o complexo Pd₂-Spm apresenta um efeito antiproliferativo mais notório face a esta linha do que a cisplatina, para valores dentro da mesma gama de concentração. Às 48 horas o complexo dinuclear demonstra eficácia em reduzir a proliferação celular, ao passo que a

cisplatina apenas apresenta valores de redução significativos para as 72 horas após a sua administração.

Relativamente ao efeito às 144 horas, período em que as células foram sujeitas à ausência de composto por 72 horas, nota-se que as células conseguem reverter a ação do Pd₂-Spm para todas as concentrações testadas, ao contrário do que acontece com a cisplatina, a qual apresenta um efeito. Isto indica uma maior toxicidade da cDDP e uma possível diferença a nível do mecanismo de ação de ambos os compostos.

Linha celular PNT2 (não-cancerígena)

No que diz respeito à linha celular de epitélio normal de próstata, pode verificar-se que o Pd₂-Spm apresenta um efeito drástico logo às 24 horas após administração para a concentração de 16 μM, que se mantém durante os restantes períodos de incubação. No entanto, para uma dose de 8 μM a redução da proliferação celular ocorre apenas após 48 e 72 horas (embora com menos significado estatístico).

De um modo geral, com exceção da concentração mais elevada, o Pd₂-Spm tem um efeito antiproliferativo inferior ao da cisplatina. Além disso o seu efeito é reversível, contrariamente ao observado para a cisplatina.

Ao analisar o efeito dos compostos às 144 horas foi possível inferir o possível mecanismo de ação destes agentes. O que se pode concluir foi que o Pd₂-Spm, por permitir uma recuperação das células após a sua remoção atua como agente citostático, ao passo que a cisplatina atua como citotóxico.

3.5. Ensaios com Combinações (Pd₂-Spm + Cisplatina)

Uma vez que estes dois complexos parecem atuar por mecanismos de ação distintos, procedeu-se ao estudo da sua combinação. Para tal, foram administradas quantidades equimolares de cDDP e de Pd₂-Spm (2 e 4 μM de cada). (Figura 3.6)

A interação entre os compostos foi investigada usando o método descrito por Berenbaum [198] para verificar a existência ou não de sinergia, recorrendo-se à seguinte equação (3.1):

$$\frac{a}{A} + \frac{b}{B} = I \quad (3.1)$$

A e B - valores calculados de IC_{50} para o Pd₂-Spm e a cDDP respectivamente;

a- IC_{50} calculado para a respetiva administração de (Pd₂-Spm + cDDP);

b- Concentração de cDDP usada em combinação com o Pd₂-Spm.

Assim, quando

$I < 1$ - Existe sinergia entre os compostos; $I = 1$ -Existe apenas um efeito aditivo; $I > 1$ - Existe interação antagónica entre os compostos.

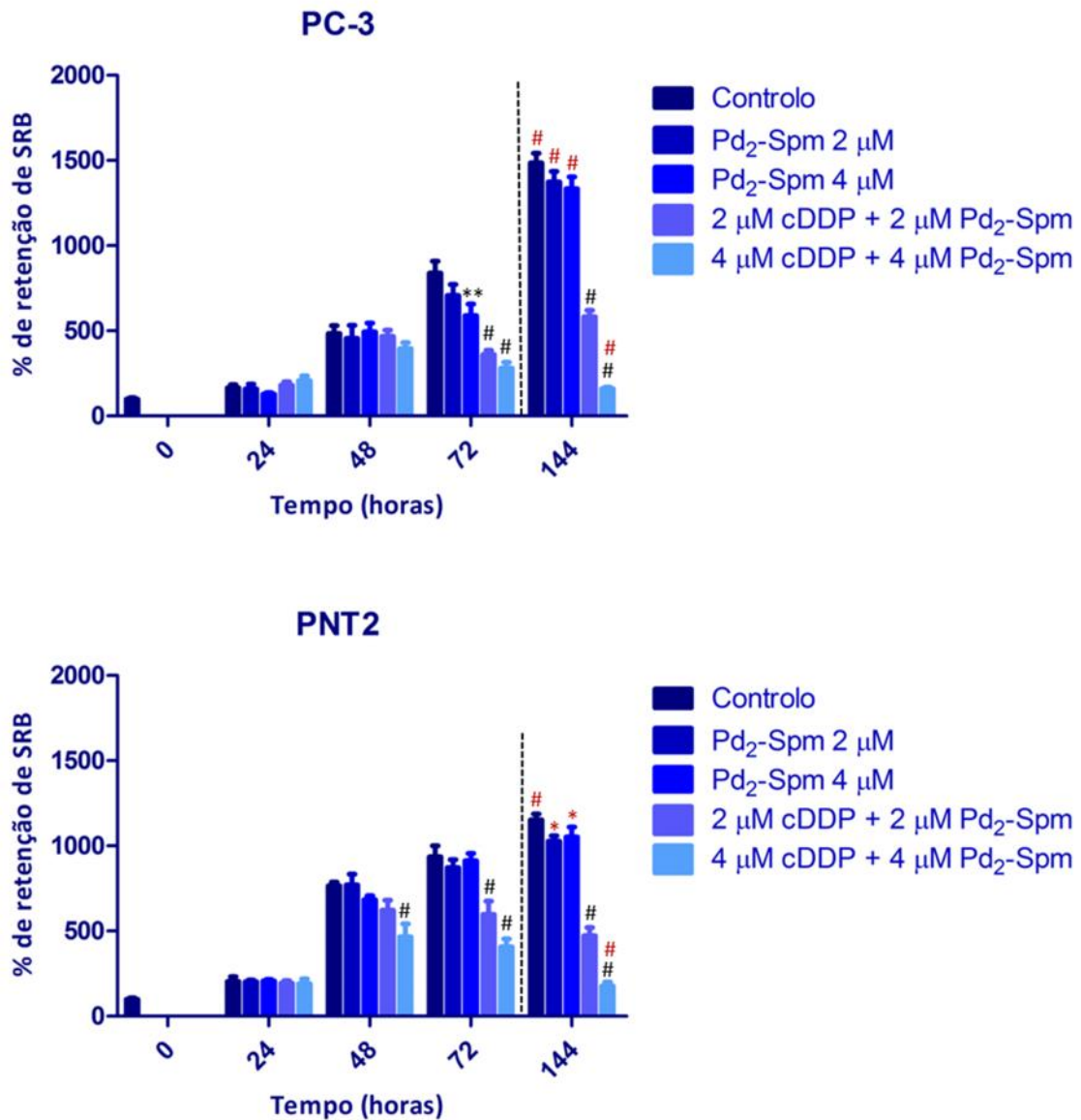


Figura 3.6.- Comparação do efeito antiproliferativo do Pd₂-Spm vs combinações (cDDP/Pd₂-Spm) em células malignas de próstata (PC-3) e em células de epitélio normal de próstata (PNT2). Os ensaios foram realizados em triplicado pelo método colorimétrico da SRB. Os resultados encontram-se expressos em percentagem de retenção de SRB±SD, em relação a culturas controlo às 0 horas, consideradas 100%. As culturas foram plaqueadas a uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células/cm² nas células PC3 e de $2,0 \times 10^4$ células/cm² nas células PNT2. As diferentes culturas referentes a cada tempo foram processadas em paralelo. 72 horas após a adição do composto o meio foi removido e após lavagem com PBS foi adicionado meio fresco(sem composto). Para cada condição os valores apresentados são a média ± SD dos valores obtidos para 2 culturas diferentes (triplicados) iniciadas e processadas em paralelo (n=6). *p < 0,05, **p < 0,001, # p < 0,001 vs culturas controlo. A comparação entre as 72 e 144 horas foi feita com recurso ao mesmo programa e mesmo teste estatístico: *p < 0,05, **p < 0,001, # p < 0,001.

Pela análise dos resultados obtidos relativos à linha celular PC-3, para as concentrações testadas, apenas se verificaram diferenças após 72 horas de incubação, sendo mais significativas ($p < 0,001$) com a administração conjunta de cDDP e Pd₂-Spm. Tal demonstra que ao atuarem em conjunto estes compostos possuem uma maior eficácia para este tempo de incubação. Ao avaliar os resultados do ensaio de reversibilidade conclui-se que correspondentes às 72 horas após a remoção dos compostos pode ser verificado que as células continuam a perder capacidade proliferativa, apresentando valores de percentagem de retenção de SRB inferiores ao controlo ($p < 0,001$), para a administração do composto Pd₂-Spm em conjunto com a cDDP. Ao comparar as 72 com as 144 horas pode verificar-se que apenas o regime de combinação da concentração mais elevada (4 µM) apresenta uma diferença significativa, sendo a ação irreversível.

Quanto ao efeito na linha celular PNT2 verifica-se que às 48 horas, na concentração mais elevado do regime de combinação há uma redução significativa de densidade celular ($p < 0,001$) em relação ao controlo. Este efeito é verificado para ambas as concentrações desse mesmo regime de combinação às 72 horas, mantendo-se mesmo após a remoção do composto (144 horas). Ao analisar os dados às 144 horas em comparação com as 72 horas pode notar-se que só há irreversibilidade para a concentração mais elevada do regime de combinação, ou seja, enquanto em regime de administração isolada o Pd₂-Spm reverte o seu efeito, quando administrado em combinação com a cDDP este efeito não é revertido.

Os valores de IC₅₀ para a administração conjunta foram calculados para a linha PC-3 de acordo com o descrito na secção Materiais e Métodos e encontram-se na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Valores de IC₅₀ (µM) obtidos através do método da SRB para a administração do composto Pd₂-Spm em conjugação com a cDDP face à linha celular PC-3, após 24, 48 e 72 horas de incubação.

IC₅₀(µM)			
Tempo^a(horas)	24	48	72
Composto			
Pd₂-Spm + cDDP	n.c.*	6,48±1,07	0,93±0,3

^aTempo decorrido entre a adição do composto à cultura celular e a determinação da sua proliferação pelo método da SRB. Os valores apresentados referem-se à média ±SD dos valores obtidos para 2 ensaios independentes.
*n.c.- não se verificou convergência dos dados, impossibilitando o cálculo do IC₅₀.

De acordo com equação foi calculado o tipo de interação apresentado por estes compostos verificando-se que:

- Para a concentração de 2 μM , obtém-se um valor de $I = 0,7$, logo verifica-se um efeito sinérgico.
- Para a concentração de 4 μM , os compostos apresentam um valor de $I = 0,9$, logo verifica-se igualmente um efeito sinérgico.

Podemos concluir com este ensaio que o regime de combinação é mais eficaz do que a administração do composto Pd₂-Spm isolado, podendo ser utilizado para diminuir concentrações mais elevadas do agente único (e logo a sua possível toxicidade).

4. Conclusões

O presente estudo demonstrou que a estrutura dos quelatos polinucleares de Pt(II) ou Pd(II) com ligando poliamínicos aqui testados tem um papel extremamente importante na determinação das suas propriedades biológicas. De facto, ao modificar as características destes complexos (*ex.* natureza do ligando e centro metálico) verifica-se uma alteração significativa da sua atividade citotóxica face a células humanas de cancro de próstata.

Ao efectuar o varrimento do efeito antiproliferativo e de diminuição da viabilidade celular destes compostos foi verificado que o complexo dinuclear Pd₂-Spm reunia as melhores condições para ser estudado de forma mais aprofundada. Os resultados obtidos demonstraram que este composto possui uma atividade superior à da cisplatina relativamente à linha celular cancerígena humana PC-3 (na mesma gama de concentrações e condições de incubação). Quanto às células não cancerígenas PNT2 verifica-se que a concentração mais elevada de Pd₂-Spm apresenta um efeito drástico logo às 24 horas de incubação para uma dose de 16 µM. No entanto, para as restantes concentrações (2, 4 e 8 µM), este composto é menos tóxico para as células sãs do que a cisplatina.

Apesar de se ter demonstrado, em estudos anteriores levados a cabo na QFM-UC, que o Pd₂-Spm tem como alvo o DNA, o estudo do efeito de reversibilidade feito ao longo deste trabalho sugere que este complexo exercerá um efeito preferencialmente citostático, pois ao ser removido do meio de cultura as células conseguem recuperar e voltam a proliferar. Além disso o DNA poderá não ser o seu único alvo, ocorrendo também um efeito sobre o ciclo celular.

Estes resultados conduziram a um estudo do efeito combinado do Pd₂-Spm com cisplatina, tendo-se verificado que estes compostos apresentam um efeito sinérgico face à linha celular PC-3.

Em suma, pode concluir-se que o complexo dinuclear de espermina com Pd(II) Pd₂-Spm exerceu uma atividade antiproliferativa e citotóxica promissora, e que este tipo de compostos deve continuar a ser investigado de modo a desenvolver novos e mais eficazes fármacos anticancerígenos, particularmente contra o cancro refractário de próstata.

Sumário das Conclusões Obtidas com os Resultados deste Trabalho Experimental

Ao analisar todos os resultados obtidos nos ensaios de proliferação celular podemos concluir que o composto Pd₂-Spm:

- É mais eficaz na linha celular PC-3 do que a cDDP.
- É, regra geral, menos tóxico para a linha saudável do que a cDDP.
- Quando administrado em conjunto com a cDDP os compostos demonstram um efeito sinérgico, permitindo reduzir a dosagem sem perder a capacidade antiproliferativa.

Apresenta um efeito antiroliferativo promissor face a este tipo de cancro da próstata.

5. Anexos

Símbolos e abreviaturas

Å	Ångström
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i> , Hormona adenocorticotrópica
AR	<i>Androgen Receptor</i> , Receptor de androgénios
ATP	Adenosina trifosfato
AZ	Antizima
AZI	Inibidor da antizima
Bcl-x	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i> , proteína antiapoptótica
BENSpm	N ¹ ,N ¹¹ -bis(etil)noespermina
CBDCA	Carboplatina
CHENSpm	N ¹ -(cicloheptilmetil)-N ¹¹ -etil-4,8-diazaundecano
cDDP	Cisplatina
Cdks	Ciclinas dependentes de cinases
CgA	Cromogranina A
DENSpm	N ¹ ,N ¹¹ -Dietilnoespermina
SAMdc	S-adenosilmetionina descarboxilada
DFMO	DL- -difluoro-metilornitina
DHT	Dihidrotestosterona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EPR	<i>Enhanced permeability and retention effect</i>
ER	<i>Estrogen Receptors</i> , Receptores de estrogénios
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> , Soro Fetal Bovino

FSH	<i>Folicule stimulating hormone</i> , Hormona estimuladora de folículos
GSH	Glutationa (forma reduzida)
HRPC	Cancro da próstata refractário a hormonas
IC₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular, em relação às culturas controlo
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> , Hormona luteinizante
LHRH	<i>Luteinizing-hormone-releasing hormone</i> , Hormona libertadora da hormona luteinizante
MGBG-	Metilglioxal- <i>bis</i> (guanil-hidrazona)
μM	Micromolar (1×10^{-6} mol.dm ⁻³)
MLH1	<i>mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSH2	<i>mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli)</i>
MSH3	<i>mutS homolog 3 (E. coli)</i>
MSH6	<i>mutS homolog 6 (E. coli)</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NER	<i>Nucleotide excision repair</i> , Excisão por remoção de nucleótidos
NRF-2	<i>Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
ODC	Ornitina descarboxilase
PAO	Poliamina oxidase
PAs-	Poliaminas
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Solução tampão de fosfato de sódio pH 7.4
Pd(Dap)	(1,3-diaminopropano)dicloropaládio
Pd₃-Spd	[(PdCl ₂) ₃ -μ-(espermidina) ₂]
Pd₂-Spm	[(PdCl ₂) ₂ -μ-(espermina) ₂]
PMS2	<i>postmeiotic segregation increased 2 (S. cerevisiae)</i>
PSA	Antigénio específico da próstata

Pt(Dap)	(1,3-diaminopropano)dicloroplatina
Pt₃-Spd	[(PtCl ₂) ₃ -μ-(espermidina) ₂]
Pt₂-Spm	[(PtCl ₂) ₂ -μ-(espermina) ₂]
RNA	Ácido ribonucleico
SAMDC	S-adenosilmetionina descarboxilase
SAR	<i>Structure Activity Relationship</i> , Relação estrutura actividade
SMO	Oxidase da espermina
SPARC	Satraplatina e Prednisona face ao Cancro Refractário
SRB	Sulforrodamina B
SSAT	Espermidina/Espermina N ¹ -acetiltransferase
SV40	<i>Simian virus 40</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

6. Referências

1. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA. Cancer J. Clin., 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. Henry C. Pitot, D.D.L., *Fundamentals of Oncology*. 4th ed2002: Marcel Dekker.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The Hallmarks of Cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
4. Argyle, D.J. and T. Blacking, *From viruses to cancer stem cells: dissecting the pathways to malignancy*. Vet. J., 2008. **177**: p. 311-23.
5. Shipitsin, M. and K. Polyak, *The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance*. Lab. Invest., 2008. **88**: p. 459-63.
6. Hanahan, D. and R.a. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**: p. 646-74.
7. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-111.
8. Visvader, J.E., *Cells of origin in cancer*. Nature, 2011. **469**: p. 314-22.
9. ; Available from: <http://www.src-crs.ca>.
10. Paz, E.A. and J. Garcia-huidobro, *Polyamines in cancer*. Adv. Clin. Chem., 2011. **54**: p. 45-70.
11. Moinard, C., L. Cynober, and J.-P. de Bandt, *Polyamines: metabolism and implications in human diseases*. Clin. Nutr., 2005. **24**: p. 184-97.
12. Igarashi, K. and K. Kashiwagi, *Modulation of cellular function by polyamines*. Int. J Biochem. Cell B., 2010. **42**: p. 39-51.
13. Agostinelli, E., et al., *Polyamines: fundamental characters in chemistry and biology*. Amino Acids, 2010. **38**: p. 393-403.
14. De Bandt, J.-P., C. Moinard, and L. Cynober, *Métabolisme et fonctions des polyamines*. Immuno-analyse & Biologie Spécialisée, 2006. **21**: p. 333-341.
15. Minois, N., D. Carmona-Gutierrez, and F. Madeo, *Polyamines in aging and disease*. Aging (Milano). 2011. **3**: p. 716-32.
16. Larqué, E., M. Sabater-Molina, and S. Zamora, *Biological significance of dietary polyamines*. Nutrition, 2007. **23**: p. 87-95.
17. Wallace, H.M., A.V. Fraser, and A. Hughes, *A perspective of polyamine metabolism*. Society, 2003. **14**: p. 1-14.
18. Thomas, T. and T.J. Thomas, *Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications*. Cell. Mol. Life Sci. , 2001. **58**: p. 244-58.
19. Malumbres, M. and M. Barbacid, *Cell cycle kinases in cancer*. Curr. Opin. Genet. Dev., 2007. **17**: p. 60-5.
20. Soda, K., *The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread*. Journal of experimental & clinical cancer research : CR, 2011. **30**: p. 95.
21. Russell, D. and S.H. Snyder, *Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors*. Proc Nat Acad Sci, 1968. **60**(4): p. 1420-1427.
22. Hibshoosh, H., M. Johnson, and I.B. Weinstein, *Effects of overexpression of ornithine decarboxylase (ODC) on growth control and oncogene-induced cell transformation*. Oncogene, 1991. **6**(5): p. 739-43.
23. Brien, T.G., et al., *Ornithine decarboxylase overexpression is a sufficient condition for tumor promotion in mouse skin*. Cancer Res., 1997. **57**(13): p. 2630-7.
24. Chen, Y., et al., *Therapy of murine squamous cell carcinomas with 2-difluoromethylornithine*. J. Carcinog., 2004. **3**: p. 10.
25. Gugliucci, A., *Polyamines as clinical laboratory tools*. Clin. Chim. Acta, 2004. **344**: p. 23-35.
26. Bachrach, U., *Polyamines and cancer: minireview article*. Amino Acids, 2004. **26**: p. 307-9.
27. Streiff, R.R. and J.F. Bender, *Phase I study of N1-N11-diethylnorspermine (DENSPM) administered TID for 6 days in patients with advanced malignancies*. Invest. New Drugs, 2001. **19**: p. 29-39.
28. Wallace, H.M. and K. Niiranen, *Polyamine analogues – an update*. Amino Acids, 2007. **33**(2): p. 261-265.
29. Long, R.M., et al., *Prostate epithelial cell differentiation and its relevance to the understanding of prostate cancer therapies*. Clin. Sci., 2005. **108**: p. 1-11.
30. Oldridge, E.E., et al., *Prostate cancer stem cells: Are they androgen-responsive?* Mol. Cell. Endocrinol., 2011.

31. Jossion, S., et al., *Tumor-stroma co-evolution in prostate cancer progression and metastasis*. Semin. Cell Dev. Biol., 2010. **21**: p. 26-32.
32. Bracarda, S., et al., *Cancer of the prostate*. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 2005. **56**: p. 379-96.
33. Nash, a.F. and I. Melezinek, *The role of prostate specific antigen measurement in the detection and management of prostate cancer*. Endocr-relat Cancer, 2000. **7**: p. 37-51.
34. Mostofi, F.K., C.J. Davis, and I.a. Sesterhenn, *Pathology of carcinoma of the prostate*. Cancer, 1992. **70**: p. 235-253.
35. Kim, S.J. and S.I. Kim, *Current treatment strategies for castration-resistant prostate cancer*. Korean J Urol, 2011. **52**: p. 157-65.
36. Sartor, O., *Progression of metastatic castrate-resistant prostate cancer: impact of therapeutic intervention in the post-docetaxel space*. J Hematol Oncol, 2011. **4**: p. 18.
37. Haapala, K., et al., *Androgen receptor amplification is associated with increased cell proliferation in prostate cancer*. Hum. Pathol., 2007. **38**: p. 474-8.
38. Gregory, C.W., et al., *Androgen Receptor Stabilization in Recurrent Prostate Cancer Is Associated with Hypersensitivity to Low Androgen* *Androgen Receptor Stabilization in Recurrent Prostate Cancer Is Associated with Hypersensitivity to Low Androgen 1*. Cancer Res., 2001: p. 2892-2898.
39. Taplin, M.-e., et al., *Selection for Androgen Receptor Mutations in Prostate Cancers Treated with Androgen Antagonist Advances in Brief*. Cancer, 1999: p. 2511-2515.
40. Chung, T.D.K., et al., *Characterization of the Role of IL-6 in the Progression of Prostate Cancer*. 1999. **207**: p. 199-207.
41. Vashchenko, N. and P.-A. Abrahamsson, *Neuroendocrine differentiation in prostate cancer: implications for new treatment modalities*. Eur. Urol., 2005. **47**: p. 147-55.
42. Hirano, D., et al., *Neuroendocrine differentiation in hormone refractory prostate cancer following androgen deprivation therapy*. Eur. Urol., 2004. **45**: p. 586-92; discussion 592.
43. Devens, B. and M. Brawer, *Polyamine depletion therapy in prostate cancer*. Prostate Cancer P D, 2000. **1202**: p. 275-279.
44. Fjösne, H.E., H. Strand, and A. Sunde, *Dose-dependent induction of ornithine decarboxylase and s-adenosyl-methionine decarboxylase activity by testosterone in the accessory sex organs of male rats*. The Prostate, 1992. **21**(3): p. 239-245.
45. Schipper, R.G., et al., *Polyamines and prostatic cancer*. Biochem. Soc. Trans., 2003. **31**: p. 375-80.
46. Palmer, A.J. and H.M. Wallace, *The polyamine transport system as a target for anticancer drug development*. Amino Acids, 2010. **38**: p. 415-22.
47. Olsen, R.R., I. Chung, and B.R. Zetter, *Knockdown of antizyme inhibitor decreases prostate tumor growth in vivo*. Amino Acids, 2011.
48. Anderson, J., *Treatment of Prostate Cancer?The Role of Primary Hormonal Therapy*. EAU Update Series, 2003. **1**: p. 32-39.
49. Dutt, S.S. and A.C. Gao, *Molecular mechanisms of castration-resistant prostate cancer progression*. CORD Conference Proceedings, 2009. **5**(9): p. 1403-1413.
50. Beltran, H., et al., *New therapies for castration-resistant prostate cancer: efficacy and safety*. Eur. Urol., 2011. **60**: p. 279-90.
51. Goodin, S., K.V. Rao, and R.S. DiPaola, *State-of-the-Art Treatment of Metastatic Hormone-Refractory Prostate Cancer*. Oncologist, 2002. **7**(4): p. 360-370.
52. Dreicer, R., *Chemotherapy for advanced prostate cancer: Docetaxel and beyond*. Hemato.l Onco.l Clin. North. Am., 2006. **20**(4): p. 935-+.
53. Rosenberg, J.E., et al., *Activity of Second-Line Chemotherapy in*. Cancer, 2007: p. 556-563.
54. Oh, W.K., M.-H. Tay, and J. Huang, *Is there a role for platinum chemotherapy in the treatment of patients with hormone-refractory prostate cancer?* Cancer, 2007. **109**: p. 477-86.
55. Matesanz, R., et al., *Modulation of microtubule interprotofilament interactions by modified taxanes*. Biophys. J., 2011. **101**: p. 2970-80.
56. PIENTA, K., *Preclinical mechanisms of action of docetaxel and docetaxel combinations in prostate cancer*. Semin. Oncol., 2001. **28**: p. 3-7.
57. Rosenberg, B., et al., *Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents*. Nature, 1969. **222**(5191): p. 385-6.
58. Yang, D. and A.H.J. Wang, *Structural studies of interactions between anticancer platinum drugs and DNA*. Prog. Biophys. Mol. Biol., 1996. **66**(1): p. 81-111.

59. Lippard, S., *New chemistry of an old molecule: cis-[Pt(NH₃)₂Cl₂]*. *Science*, 1982. **218**(4577): p. 1075-1082.
60. Perez, R.P., *Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance*. *Eur. J. Cancer*, 1998. **34**(10): p. 1535-1542.
61. Jennerwein, M. and P.A. Andrews, *Effect of intracellular chloride on the cellular pharmacodynamics of cis-diamminedichloroplatinum(II)*. *Drug Metab. Dispos.*, 1995. **23**(2): p. 178-184.
62. Cepeda, V., et al., *Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity*. *Anti Canc Agents Med Chem.*, 2007. **7**(1): p. 3-18.
63. Blair, B.G., et al., *Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of cisplatin and carboplatin*. *Clin. Cancer Res.*, 2009. **15**(13): p. 4312-4321.
64. Burger, H., et al., *Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance*. *Drug Resist Updat*, 2011. **14**(1): p. 22-34.
65. Rochon, F. and A. Morneau, *¹⁹⁵Pt and ¹H NMR studies of platinum (II) complexes with ethylenediamine derivatives*. *Magn. Res. Chem.*, 1991. **29**(2): p. 120-126.
66. Zeizinger, M., et al., *A Systematic ab Initio Study of the Hydration of Selected Palladium Square-Planar Complexes. A Comparison with Platinum Analogues*. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2001. **105**(34): p. 8086-8092.
67. Yachnin, J.R., et al., *The kinetics and cytotoxicity of cisplatin and its monohydrated complex*. *Cancer Lett.*, 1998. **132**(1): p. 175-180.
68. Eastman, A., *Characterization of the adducts produced in DNA by cis-Diamminedichloroplatinum(II) and cis-Dichloro(ethylenediamine)Platinum(II)*. *Biochemistry (Mosc)*. 1983. **22**(16): p. 3927-3933.
69. Kartalou, M. and J.M. Essigmann, *Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 2001. **478**(1-2): p. 1-21.
70. Ohndorf, U.-M., et al., *Basis for recognition of cisplatin-modified DNA by high-mobility-group proteins*. *Nature*, 1999. **399**(6737): p. 708-712.
71. Gelasco, A. and S.J. Lippard, *NMR solution structure of a DNA dodecamer duplex containing a cis-diammineplatinum(II) d(GpG) intrastrand cross-link, the major adduct of the anticancer drug cisplatin*. *Biochemistry (Mosc)*. 1998. **37**(26): p. 9230-9.
72. He, Q., U.-M. Ohndorf, and S.J. Lippard, *Intercalating Residues Determine the Mode of HMG1 Domains A and B Binding to Cisplatin-Modified DNA†*. *Biochemistry (Mosc)*. 2000. **39**(47): p. 14426-14435.
73. Legendre, F., et al., *A Complete Kinetic Study of GG versus AG Platination Suggests That the Doubly Aquated Derivatives of Cisplatin Are the Actual DNA Binding Species*. *Chem. Eur. J.*, 2000. **6**(11): p. 2002-2010.
74. Bose, R.N., R.D. Cornelius, and R.E. Viola, *Multinuclear NMR studies and the kinetics of formation of platinum (II)-adenine nucleotide complexes*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1986. **108**(15): p. 4403-4408.
75. Arpalahti..., J., *Coordination of aquated cis-platinum (II) diamines to purine nucleosides. Kinetics of complex formation*. *Inorg. Chem.*, 1990.
76. Davies, M.S., S.J. Berners-Price, and T.W. Hambley, *Slowing of cisplatin aquation in the presence of DNA but not in the presence of phosphate: improved understanding of sequence selectivity and the roles of monoaquated and diaquated species in the binding of cisplatin to DNA*. *Inorg. Chem.*, 2000. **39**(25): p. 5603-5613.
77. Reedijk, J., *Metal-Ligand Exchange Kinetics in Platinum and Ruthenium Complexes significance for effectiveness as anticancer drugs*. *Platinum Metals Rev.*, 2008. **52**(1): p. 2-11.
78. Harrap, K.R., *Preclinical studies identifying carboplatin as a viable cisplatin alternative*. *Cancer Treat. Rev.*, 1985. **12**, **Supplement A**(0): p. 21-33.
79. Calvert, A.H., et al., *Carboplatin Dosage-Prospective evaluation of a simple formula based on renal-function*. *J. Clin. Oncol.*, 1989. **7**(11): p. 1748-1756.
80. Ishida, S., et al., *Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2002. **99**(22): p. 14298-14302.
81. Blommaert, F.A., et al., *Formation of DNA-Adducts by the Anticancer Drug Carboplatin-Different Nucleotide-Sequence Preferences in-vitro and in cells*. *Biochemistry (Mosc)*. 1995. **34**(26): p. 8474-8480.

82. Rahn, R.O., *Chromatographic Analysis of the Adducts Formed in DNA Complexed With cis-Diamminedichloroplatinum (II)*. J. Inorg. Biochem., 1984. **21**(4): p. 311-321.
83. Andrews, P.A. and S.B. Howell, *Cellular Pharmacology of Cisplatin - Perspectives on Mechanisms of Acquired-Resistance*. Cancer Cells-a Monthly Review, 1990. **2**(2): p. 35-43.
84. Mansy, S., A.J. Thomson, and Rosenber.B, *Binding of cis and trans-Dichlorodiammineplatinum (II) to Nucleosides. 1. Location of Binding-Sites*. J. Am. Chem. Soc., 1973. **95**(5): p. 1633-1640.
85. Nick Hadjiliadis, E.S., *Metal Complex-DNA Interactions*. 1st edition ed2009: Wiley-Blackwell.
86. Dunham, S.U., C.J. Turner, and S.J. Lippard, *Solution structure of a DNA duplex containing a nitroxide spin-labeled platinum d(GpG) intrastrand cross-link refined with NMR-derived long-range electron-proton distance restraints*. J. Am. Chem. Soc., 1998. **120**(22): p. 5395-5406.
87. Reedijk, J., *The Relevance of Hydrogen-Bonding in the Mechanism of Action of Platinum Antitumor Compounds*. Inorg. Chim. Acta., 1992. **198**: p. 873-881.
88. Brabec, V. and M. Leng, *DNA interstrand cross-links of trans-diamminedichloroplatinum(II) are preferentially formed between guanine and complementary cytosine residues*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1993. **90**(11): p. 5345-9.
89. Hermann, D., C. Houssier, and W. Guschlbauer, *Dissociation of Double-Stranded Poly(I).Poly(C) by cis-Diammine-dichloro-Pt(II)*. Biochim. Biophys. Acta, 1979. **564**(3): p. 456-472.
90. Scovell, W.M. and V.J. Capponi, *Cis-diamminedichloroplatinum(II) modified DNA stimulates far greater levels of S1 nuclease sensitive regions than does the modification produced by the trans- isomer*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1982. **107**(3): p. 1138-1143.
91. Hambley, T.W., *Platinum binding to DNA: structural controls and consequences*. Journal of the Chemical Society-Dalton Transactions, 2001(19): p. 2711-2718.
92. Sorenson, C.M. and A. Eastman, *Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity- role of G2 arrest and DNA double-strand breaks*. Cancer Res., 1988. **48**(16): p. 4484-4488.
93. Coste, F., et al., *Crystal structure of a double-stranded DNA containing a cisplatin interstrand cross-link at 1.63 Å resolution: hydration at the platinated site*. Nucleic Acids Res., 1999. **27**(8): p. 1837-46.
94. Fichtinger-Schepman, A.M.J., et al., *Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II) with DNA: formation, identification, and quantitation*. Biochemistry (Mosc). 1985. **24**(3): p. 707-713.
95. Köberle, B., et al., *Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer, 2010. **1806**(2): p. 172-182.
96. Ohmichi, M., et al., *Mechanisms of platinum drug resistance*. Trends Pharmacol. Sci., 2005. **26**(3): p. 113-116.
97. Fram, R.J., *Cisplatin and platinum analogues: recent advances*. Curr. Opin. Oncol., 1992. **4**(6): p. 1073-9.
98. Safaei, R., *Role of copper transporters in the uptake and efflux of platinum containing drugs*. Cancer Lett., 2006. **234**(1): p. 34-39.
99. Gately, D.P. and S.B. Howell, *Cellular Acooumulation of the Anticancer Agent Cisplatin - A Review*. Br. J. Cancer, 1993. **67**(6): p. 1171-1176.
100. Kartalou, M. and J.M. Essigmann, *Mechanisms of resistance to cisplatin*. Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 2001. **478**(1-2): p. 23-43.
101. Boulikas, T. and M. Vougiouka, *Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (review)*. Oncol. Rep., 2003. **10**(6): p. 1663-1682.
102. Klomp, A.E.M., et al., *Biochemical characterization and subcellular localization of human copper transporter 1 (hCTR1)*. Biochem. J., 2002. **364**: p. 497-505.
103. Lee, J., J.R. Prohaska, and D.J. Thiele, *Essential role for mammalian copper transporter Ctr1 in copper homeostasis and embryonic development*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2001. **98**(12): p. 6842-7.
104. Kelland, L., *The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy*. Nature Reviews Cancer, 2007. **7**(8): p. 573-584.

105. Oehlsen, M.E., Y. Qu, and N. Farrell, *Reaction of polynuclear platinum antitumor compounds with reduced glutathione studied by multinuclear (¹H, ¹H-¹⁵N gradient heteronuclear single-quantum coherence, and ¹⁹⁵Pt) NMR spectroscopy*. *Inorg. Chem.*, 2003. **42**(18): p. 5498-506.
106. Barnham, K.J., et al., *L-Methionine increases the rate of reaction of 5[prime or minute]-guanosine monophosphate with the anticancer drug cisplatin: mixed-ligand adducts and reversible methionine binding*. *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*, 1995(22): p. 3721-3726.
107. van Boom, S., et al., *Platinum-thioether bonds can be reverted by guanine-N7 bonds in Pt(dien)(2+) model adducts*. *Inorg. Chem.*, 1999. **38**(7): p. 1450-1455.
108. Jones, D.P., et al., *Redox state of glutathione in human plasma*. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000. **28**(4): p. 625-35.
109. McGregor, T.D., et al., *A comparison of DNA binding profiles of dinuclear platinum compounds with polyamine linkers and the trinuclear platinum phase II clinical agent BBR3464*. *J Biol Inorg Chem*, 2002. **7**(4-5): p. 397-404.
110. Rabik, C.A. and M.E. Dolan, *Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents*. *Cancer Treat. Rev.*, 2007. **33**(1): p. 9-23.
111. Kasherman, Y., *Is Glutathione the Major Cellular Target of Cisplatin? A Study of the Interactions of Cisplatin with Cancer Cell Extracts*. *J. Med. Chem.*, 2009. **52**(14): p. 4319.
112. Will, J., W. Sheldrick, and D. Wolters, *Characterisation of cisplatin coordination sites in cellular & Escherichia coli & DNA-binding proteins by combined biphasic liquid chromatography and ESI tandem mass spectrometry*. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2008. **13**(3): p. 421-434.
113. Ayers, P.W., R.G. Parr, and R.G. Pearson, *Elucidating the hard/soft acid/base principle: A perspective based on half-reactions*. *The Journal of Chemical Physics*, 2006. **124**(19): p. 194107.
114. Zunino, F., et al., *Protective effect of reduced glutathione against cisplatin-induced renal and systemic toxicity and its influence on the therapeutic activity of the antitumor drug*. *Chem. Biol. Interact.*, 1989. **70**(1-2): p. 89-101.
115. Abu-Surrah, A.S., *Development and current status of unconventional platinum anticancer complexes*. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2007. **7**(2): p. 203-11.
116. Galanski, M., et al., *Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes*. *Curr. Pharm. Des.*, 2003. **9**(25): p. 2078-2089.
117. Mangrum, J.B. and N.P. Farrell, *Excursions in polynuclear platinum DNA binding*. *Chem. Commun.*, 2010. **46**(36): p. 6640-50.
118. Metzler-Nolte, N., *Book Review: Cisplatin. Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. By Bernhard Lippert*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2001.
119. Science & Technology Books, E., *Advances in Inorganic Chemistry, Volume 8 - Page 281*. Book, 1966.
120. Jakupec, M., M. Galanski, and B. Keppler, *Tumour-inhibiting platinum complexes—state of the art and future perspectives Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. 2003. **146**: p. 1-53.
121. Kelland, L.R., *Overcoming Resistance to Platinum Therapy in Patients with Advanced Cancer*. *American Journal of Cancer*, 2002. **1**(4): p. 247-255.
122. Barefoot, R.R., *Speciation of platinum compounds: a review of recent applications in studies of platinum anticancer drugs*. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2001. **751**(2): p. 205-211.
123. Alberts, D.S., et al., *Improved therapeutic index of carboplatin plus cyclophosphamide versus cisplatin plus cyclophosphamide: final report by the Southwest Oncology Group of a phase III randomized trial in stages III and IV ovarian cancer*. *J. Clin. Oncol.*, 1992. **10**(5): p. 706-17.
124. Bajorin, D.F., et al., *Randomized trial of etoposide and cisplatin versus etoposide and carboplatin in patients with good-risk germ cell tumors: a multiinstitutional study*. *J. Clin. Oncol.*, 1993. **11**(4): p. 598-606.
125. Monk, B.J., et al., *In vitro phase II comparison of the cytotoxicity of a novel platinum analog, nedaplatin (254-S), with that of cisplatin and carboplatin against fresh, human cervical cancers*. *Gynecol. Oncol.*, 1998. **71**(2): p. 308-312.

126. Kobayashi, H., et al., *Antitumor activities of new platinum compounds, dwa214R, Nk 121 and 254-S against human leukemia-Cells sensitive or resistant to cisplatin*. Invest. New Drugs, 1991. **9**(4): p. 313-319.
127. Kameyama, Y., et al., *Nephrotoxicity of new platinum compound, 254-S, Evaluated with rat-kidney cortical slices*. Toxicol. Lett., 1990. **52**(1): p. 15-24.
128. Tsuda, H., et al., *Phase I-II study of irinotecan (CPT-11) plus nedaplatin (254-S) with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor support in patients with advanced or recurrent cervical cancer*. Br. J. Cancer, 2004. **91**(6): p. 1032-1037.
129. Sasaki, Y., et al., *Pharmacokinetics of (glycolato-0,0')-Diammine Platinum(II), a new platinum derivative, in comparison with cisplatin and carboplatin*. Cancer Chemother. Pharmacol., 1989. **23**(4): p. 243-246.
130. Reedijk, J., *Platinum Anticancer Coordination Compounds: Study of DNA Binding Inspires New Drug Design (Eur. J. Inorg. Chem. 10/2009)*. Eur. J. Inorg. Chem., 2009.
131. Wong, E. and C.M. Giandomenico, *Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs*. Chem. Rev., 1999. **99**(9): p. 2451-2466.
132. Carrato, A., J. Gallego, and E. Diaz-Rubio, *Oxaliplatin: results in colorectal carcinoma*. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 2002. **44**(1): p. 29-44.
133. Misset, J.L., et al., *Oxaliplatin clinical activity: a review*. Crit. Rev. Oncol. Hematol., 2000. **35**(2): p. 75-93.
134. Ho, Y.-P., S.C.F. Au-Yeung, and K.K.W. To, *Platinum-based anticancer agents: Innovative design strategies and biological perspectives*. Med. Res. Rev., 2003. **23**(5): p. 633-655.
135. Kawamura-Akiyama, Y., et al., *Non-cross resistance of ZD0473 in acquired cisplatin-resistant lung cancer cell lines*. Lung Cancer, 2002. **38**(1): p. 43-50.
136. Cossa, G., et al., *Strategies to improve the efficacy of platinum compounds*. Curr. Med. Chem., 2009. **16**(19): p. 2355-2365.
137. Holford, J., et al., *Chemical, biochemical and pharmacological activity of the novel sterically hindered platinum co-ordination complex, cis- amminedichloro(2-methylpyridine) platinum(II) (AMD473)*. Anticancer. Drug Des., 1998. **13**(1): p. 1-18.
138. Holford, J., et al., *In vitro circumvention of cisplatin resistance by the novel sterically hindered platinum complex AMD473*. Br. J. Cancer, 1998. **77**(3): p. 366-373.
139. Sternberg, C.N., et al., *Phase III trial of satraplatin, an oral platinum plus prednisone vs. prednisone alone in patients with hormone-refractory prostate cancer*. Oncology, 2005. **68**: p. 2-9.
140. Kelland, L.R., *New platinum antitumor complexes* Crit. Rev. Oncol. Hematol., 1993. **15**(3): p. 191-219.
141. Samimi, G., et al., *Novel mechanisms of platinum drug resistance identified in cells selected for resistance to JM118 the active metabolite of satraplatin*. Cancer Chemother. Pharmacol., 2007. **59**(3): p. 301-312.
142. Daghiri, H., F. Huq, and P. Beale, *Studies on activities, cell up take and DNA binding of four multinuclear complexes of the form: {trans-PtCl(NH3)(2)}(2)mu-{trans-Pd(NH3)(2)-(H2N(CH2)(n)NH2)(2)} Cl-4 where n=4-7*. J. Inorg. Biochem., 2004. **98**(11): p. 1722-1733.
143. Farrell, N., *Polynuclear charged platinum compounds as a new class of anticancer agents - Toward a new paradigm*. Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy, 2000. **7**: p. 321-338.
144. Perego, P., et al., *A novel trinuclear platinum complex overcomes cisplatin resistance in an osteosarcoma cell system*. Mol. Pharmacol., 1999. **55**(3): p. 528-534.
145. Perego, P., et al., *The cellular basis of the efficacy of the trinuclear platinum complex BBR 3464 against cisplatin-resistant cells*. J. Inorg. Biochem., 1999. **77**(1-2): p. 59-64.
146. Kasparkova, J., et al., *Effect of the geometry of the central coordination sphere in antitumor trinuclear platinum complexes on DNA binding*. J. Inorg. Biochem., 2004. **98**(10): p. 1560-1569.
147. Farrell, N., *Nonclassical Platinum antitumor agents- Perspectives for design and development of new drugs complementary to cisplatin*. Cancer Invest., 1993. **11**(5): p. 578-589.
148. Farrell, N., et al., *Effects of geometric isomerism and ligand substitution in bifunctional dinuclear platinum complexes on binding- properties and conformational-changes in DNA* Biochemistry (Mosc). 1995. **34**(47): p. 15480-15486.
149. Wu, P.K., et al., *Chemical-reactivity and DNA-sequence specificity of formally monofunctional and bifunctional bis(Platinum) Complexes*. J. Inorg. Biochem., 1994. **54**(3): p. 207-220.

150. Kalayda, G.V., et al., *Structure-toxicity relationships for different types of dinuclear platinum*. J. Inorg. Biochem., 2006. **100**(8): p. 1332-1338.
151. Jansen, B.A.J., et al., *A tetranuclear platinum compound designed to overcome cisplatin resistance*. European Journal of Inorganic Chemistry, 1999(9): p. 1429-1433.
152. Di Blasi, P., et al., *Cytotoxicity, cellular uptake and DNA binding of the novel trinuclear platinum complex BBR 3464 in sensitive and cisplatin resistant murine leukemia cells*. Anticancer Res., 1998. **18**(4C): p. 3113-3117.
153. Wheate, N.J. and J.G. Collins, *Multi-nuclear platinum complexes as anti-cancer drugs*. Coordination Chemistry Reviews, 2003. **241**(1-2): p. 133-145.
154. Zehnulova, J., et al., *Conformation, Recognition by High Mobility Group Domain Proteins, and Nucleotide Excision Repair of DNA Intrastrand Cross-links of Novel Antitumor Trinuclear Platinum Complex BBR3464*. J. Biol. Chem., 2001. **276**(25): p. 22191-22199.
155. Pratesi, G., et al., *A novel charged trinuclear platinum complex effective against cisplatin-resistant tumours: hypersensitivity of p53-mutant human tumour xenografts*. Br. J. Cancer, 1999. **80**(12): p. 1912-1919.
156. Nowotnik, D.P. and E. Cvitkovic, *ProLindac (AP5346): a review of the development of an HPMA DACH platinum Polymer Therapeutic*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2009. **61**(13): p. 1214-9.
157. Feazell, R.P., et al., *Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum (IV) anticancer drug design*. J. Am. Chem. Soc., 2007. **129**(27): p. 8438-8439.
158. Bhirde, A.A., et al., *Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube-based drug delivery*. ACS Nano, 2009. **3**(2): p. 307-16.
159. Kratochwil, N., et al., *Nucleotide platination induced by visible light*. Angew Chem Int Edit, 1999. **38**(10): p. 1460-1463.
160. Bloemink, M., et al., *Calcium ions do accelerate the DNA binding of new antitumor-active platinum aminophosphonate complexes*. European Journal of Inorganic Chemistry, 1999(10): p. 1655-1657.
161. Oh, W.K., M.H. Tay, and J.T. Huang, *Is there a role for platinum chemotherapy in the treatment of patients with hormone-refractory prostate cancer?* Cancer, 2007. **109**(3): p. 477-486.
162. Galsky, M.D., et al., *Retrospective Analysis of Satraplatin in Patients with Metastatic Urothelial Cancer Refractory to Standard Platinum-Based Chemotherapy*. Clinical Genitourinary Cancer, 2011. **9**(1): p. 27-30.
163. Latif, T., et al., *Phase II study of oral bis (aceto) ammine dichloro (cyclohexamine) platinum (IV) (JM-216 , BMS-182751) given daily x 5 in hormone refractory prostate cancer (HRPC)*. Cancer Treat. Rep., 2005: p. 79-84.
164. Yagoda, A., *Phase II trials with cis-dichlorodiammineplatinum(II) in the treatment of urothelial cancer*. Cancer Treat. Rep. **63**: p. 1565-72.
165. Matos, C.S., et al., *New Strategies Against Prostate Cancer – Pt(II)-Based Chemotherapy*. Curr. Med. Chem, 2012 (Unpublished).
166. Papandreou, C.N., *Optimal chemotherapy for prostate cancer*. Ann. Oncol., 2004. **15**: p. 8-8.
167. Culine, S., et al., *Docetaxel and cisplatin in patients with metastatic androgen independent prostate cancer and circulating neuroendocrine markers*. J. Urol., 2007. **178**: p. 844-8; discussion 848.
168. Buonerba, C., et al., *Phase II trial of cisplatin plus prednisone in docetaxel-refractory castration-resistant prostate cancer patients*. Cancer Chemother. Pharmacol., 2011. **67**: p. 1455-61.
169. Jeske, S., et al., *Carboplatin plus paclitaxel therapy after docetaxel in men with metastatic castrate resistant prostate cancer*. Urologic oncology, 2010.
170. Regan, M.M., et al., *Efficacy of carboplatin-taxane combinations in the management of castration-resistant prostate cancer: a pooled analysis of seven prospective clinical trials*. Ann. Oncol., 2010. **21**(2): p. 312-318.
171. Urakami, S., et al., *Combination chemotherapy with paclitaxel, estramustine and carboplatin for hormone refractory prostate cancer*. J. Urol., 2002. **168**(6): p. 2444-2450.
172. Ross, R.W., et al., *A phase 2 study of carboplatin plus docetaxel in men with metastatic hormone-refractory prostate cancer who are refractory to docetaxel*. Cancer, 2008. **112**: p. 521-6.

173. Droz, J.P., *Phase II study of oxaliplatin versus oxaliplatin combined with infusional 5-fluorouracil in hormone refractory metastatic prostate cancer patients*. *Ann. Oncol.*, 2003. **14**: p. 1291-1298.
174. Blesa, J.M.G., et al., *Phase II Trial of Oxaliplatin and Capecitabine After Progression to First-Line Chemotherapy in Androgen-Independent Prostate Cancer Patients*. *Am. J. Clin. Oncol.*, 2011. **34**(2): p. 155-159 10.1097/COC.0b013e3181d6b453.
175. Chatta, G.S.F., T.M.; Appleman, L.J.; Friedland, D.M.; Jacobs, S.A.; Evans, T.L.; Earle, M.F.; Strausser, H.M.; Gooding, W.E.; Lenzner, D. In, *Oxaliplatin and docetaxel in castration-resistant prostate cancer (CRPC) patients treated with up to two prior chemotherapeutic regimens: Updated results of a phase II trial*. *J. Clin. Oncol.*, 2008. **26**.
176. De Jager, R.L.R., L.; Lopatkin, N.; Karlov, P.; Breitz, H.; Earhart, , R. *Results of a phase II study of picoplatin with docetaxel and prednisone in first-line treatment of castration-resistant prostate cancer (CRPC)*. *J. Clin. Oncol.*, 2009. **27**.
177. Sternberg, C.N., et al., *Multinational, double-blind, phase III study of prednisone and either satraplatin or placebo in patients with castrate-refractory prostate cancer progressing after prior chemotherapy: the SPARC trial*. *J. Clin. Urol.*, 2009. **27**: p. 5431-8.
178. Castagneto B, F.V., Perachino M, *Weekly administration of standardized low-disk carboplatin (CBDCA) in the treatment of advanced hormone-refractory prostate cancer (HRPC): a phase II study.*, in *Proceedings ASCO Prostate Symposium2006*.
179. Loriot, Y., et al., *Combining carboplatin and etoposide in docetaxel-pretreated patients with castration-resistant prostate cancer: a prospective study evaluating also neuroendocrine features*. *Ann. Oncol.*, 2009. **20**(4): p. 703-708.
180. Kelly, W.K., et al., *Paclitaxel, Estramustine Phosphate, and Carboplatin in Patients With Advanced Prostate Cancer*. *J. Clin. Oncol.*, 2001. **19**(1): p. 44-53.
181. Flaig, T.W., et al., *A phase II trial of dexamethasone, vitamin D, and carboplatin in patients with hormone-refractory prostate cancer*. *Cancer*, 2006. **107**(2): p. 266-274.
182. Kelland, L., *Broadening the clinical use of platinum drugbased chemotherapy with new analogues*. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2007. **16**(7): p. 1009-1021.
183. Cetnar, J., et al., *A phase I/1b study of satraplatin (JM-216) in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumors and metastatic castrate-resistant prostate cancer*. *Urol Oncol*, 2011.
184. Eastman, A. and N. Schulte, *Enhanced DNA-repair as a mechanism of resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II)*. *Biochemistry (Mosc)*. 1988. **27**(13): p. 4730-4734.
185. Butour, J.L., et al., *Palladium(II) compounds with potential antitumour properties and their platinum analogues: A comparative study of the reaction of some orotic acid derivatives with DNA in vitro*. *Chem. Biol. Interact.*, 1997. **104**(2-3): p. 165-178.
186. Abu-Surrah, A.S. and M. Kettunen, *Platinum group antitumor chemistry: Design and development of new anticancer drugs complementary to cisplatin*. *Curr. Med. Chem.*, 2006. **13**(11): p. 1337-1357.
187. Fiuza, S.M., et al., *Pt(II) vs Pd(II) Polyamine Complexes as New Anticancer Drugs: A Structure- Activity Study*. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2006. **3**(3): p. 149-151.
188. Marques, M.P.M., et al., *Cytotoxic effects of metal complexes of biogenic polyamines. I. Platinum(II) spermidine compounds: prediction of their antitumour activity*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2002. **1589**: p. 63-70.
189. Teixeira, L.J., et al., *Cytotoxic Activity of Metal Complexes of Biogenic Polyamines: Polynuclear Platinum(II) Chelates*. *J. Med. Chem.*, 2004. **47**(11): p. 2917-2925.
190. Tummala, R., et al., *Characterization of Pt-, Pd-spermine complexes for their effect on polyamine pathway and cisplatin resistance in A2780 ovarian carcinoma cells*. *Oncol. Rep.*, 2010. **24**: p. 15-24.
191. Fiuza, S.M., et al., *Biologic Activity of a Dinuclear Pd(II)-Spermine Complex Toward Human Breast Cancer*. *Chemical Biology & Drug Design*, 2011. **77**(6): p. 477-488.
192. Navarro-Ranninger, C., et al., *Palladium(II) salt and complexes of spermidine with a six-member chelate ring. Synthesis, characterization, and initial DNA-binding and antitumor studies*. *J. Inorg. Biochem.*, 1992. **46**(4): p. 267-279.
193. Ulukaya, E., et al., *The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested*. *Toxicol. In Vitro*, 2008. **22**(1): p. 232-239.

194. Houghton, P., et al., *The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity*. *Methods*, 2007. **42**(4): p. 377-387.
195. Voigt, W., *Sulforhodamine B Assay and Chemosensitivity*, 2005. p. 39-48.
196. Lippard, S.J., *Chemistry and molecular biology of platinum anticancer drugs*. *Pure & App. Chem.*, 1987. **59**: p. 731-742.
197. Dhar, S., et al., *Targeted delivery of cisplatin to prostate cancer cells by aptamer functionalized Pt(IV) prodrug-PLGA-PEG nanoparticles*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2008. **105**(45): p. 17356-17361.
198. Greco, W.R., H.S. Park, and Y.M. Rustum, *Application of a New Approach for the Quantitation of Drug Synergism to the Combination of cis-Diamminedichloroplatinum and 1-d-Arabinofuranosylcytosine*. *Cancer Res.*, 1990. **50**(17): p. 5318-5327.