



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**MECANISMO REDOX DO  
ANTINEOPLÁSICO RITUXIMAB E DA  
SUA INTERAÇÃO *IN VITRO* COM O  
dsDNA**

Inês Barreira Santarino

---

2012



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**MECANISMO REDOX DO  
ANTINEOPLÁSICO RITUXIMAB E DA  
SUA INTERAÇÃO *IN VITRO* COM O  
dsDNA**

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 Ana Maria Oliveira-Brett (Universidade de Coimbra)

Inês Barreira Santarino

---

2012

*À minha querida avó, Maria Lisete Santarino Fernandes.*

*“Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive.”*

**Ricardo Reis**

# AGRADECIMENTOS

Não posso deixar de expressar os meus sentidos agradecimentos à Professora Doutora Ana Maria Oliveira-Brett pelo carinho com que me acolheu no seu laboratório. A sua orientação e conhecimento científicos, disponibilidade e sobretudo a confiança depositada no meu trabalho, foram pontos chave para me tornar uma melhor cientista.

Agradeço ao Instituto Pedro Nunes a bolsa concedida no âmbito do projeto PTDC/SAU-BEB/104643/2008 financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT) e apoiado pelo programa POPH/FSE.

Ao Doutor Severino Carlos Oliveira preciso, especialmente, de agradecer pelo tempo cedido em acompanhar-me ao longo destes meses de trabalho. A sua preocupação e minuciosidade constantes no trabalho executado, enriqueceram bastante a minha experiência científica. Obrigado Carlos, do fundo do coração, por todos os ensinamentos.

A todos os meus colegas de laboratório no Instituto Pedro Nunes, agradeço a recepção maravilhosa à minha chegada e os momentos de companheirismo.

Aos meus lindos amigos, agradeço por me encherem o coração. Tânia, Joana e Mariana, agradeço-vos por me fazerem acreditar que a distância nunca será um obstáculo à amizade. À Joana Cerveira e Ana Marguerita, agradeço o seu carinho constante. Aos meus amigalhões de sempre, principalmente à Cristina, Salomé, Nuno e Raquel, agradeço por me proporcionarem amizade eterna. Acima de tudo, a todos, agradeço por aceitarem a minha verdade.

Aos meus Professores, agradeço todo este percurso académico e a paixão adquirida pela Bioquímica.

Ao meu núcleo familiar, apesar de pequenino, agradeço por ter estado sempre presente nesta viagem. Agradeço, com o mesmo sentimento, aos meus sogrinhos por me acolherem como se fosse sua filha.

Aos meus pais agradeço, sobretudo, por nunca desacreditarem no meu trabalho. Obrigada pela confiança e por me deixarem seguir o meu sonho.

Aos meus irmãos, deixo um grandioso agradecimento. Porque a vida, pelas voltas que deu, nunca nos separou. Não há palavras para descrever o que sinto por vocês. São o meu orgulho!

Ao meu João. Ao meu lindo João, agradeço ser a menina dos seus olhos. Palavras nunca serão suficientes para descrever o nosso sentimento. Obrigada por me fazeres acreditar que a felicidade existe!

# RESUMO

O Rituximab (RTX) é um anticorpo monoclonal quimérico direcionado especificamente para o receptor CD20 existente à superfície dos linfócitos B, introduzido no mercado para o tratamento de linfomas *non-Hodgkin*. O presente trabalho teve como objetivo investigar o comportamento electroquímico do RTX à superfície do eléctrodo de carbono vítreo (GCE) bem como a sua interação com o ácido desoxirribonucleico (DNA).

Os resultados obtidos usando um filme de RTX para electrólitos de suporte no intervalo  $3 < \text{pH} < 9$ , mostraram o aparecimento de um pico correspondente à oxidação da tirosina para todos os valores de pH e de um pico correspondente à oxidação da metionina, a  $\text{pH} = 3$  e 4.

Sendo uma proteína estruturalmente complexa, foi necessário submeter o RTX a uma desnaturação química de modo a tornar possível uma caracterização mais completa da proteína no GCE. Assim, biossensores electroquímicos de RTX foram incubados a diferentes tempos numa solução fosfato 0,1 M a  $\text{pH} = 7$ , com os agentes redutores ditioneitol (DTT) e tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) e com o desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS). Comparando com o controlo, verificou-se que o SDS e o TCEP expõe um maior número de resíduos de tirosina à superfície do eléctrodo, enquanto que o DTT desestabilizou mais extensamente a cadeia polipeptídica, permitindo a deteção da oxidação da histidina e da tirosina e dos dois primeiros passos de oxidação do triptofano.

Após incubação do biossensor dupla hélice DNA (dsDNA) com o RTX, verificou-se a existência de uma forte interação entre ambos com condensação da estrutura helical do DNA, depurinação, dano oxidativo e interação preferencial do RTX com o resíduo de adenosina. O processo revelou ser reversível e dinamicamente intemporal.

O estudo do comportamento electroquímico dos agentes redutores utilizados para auxiliar na caracterização electroquímica do RTX, foi realizado com o GCE e os seus mecanismos de oxidação propostos. O DTT sofre oxidação no grupo tiol, enquanto que o TCEP sofre oxidação na fosfina central.

# ABSTRACT

Rituximab (RTX) is a chimeric monoclonal antibody that targets the CD20 surface receptor on B-lymphocytes, for the treatment of *non-Hodgkin's* lymphoma. The aim of this work was to investigate the electrochemical behaviour of RTX at the glassy carbon electrode (GCE) surface and its interaction with DNA.

The results using a RTX layer for electrolyte solutions between  $3 < \text{pH} < 9$ , showed an oxidation peak for tyrosine for all pH range and an oxidation peak for methionine at  $\text{pH} = 3$  and  $4$ .

RTX was denatured due to its complex structure with denaturant and reductants. Thus, RTX biosensors were incubated at different time periods in  $\text{pH} = 7.0$   $0.1$  M phosphate buffer, with dithiothreitol (DTT) and tris(2-carboxiethyl)phosphine (TCEP) as reductants and with sodium dodecyl sulphate (SDS) as denaturant. Comparing with the control, in the presence of SDS and TCEP it was possible to expose more tyrosine residues at GCE surface, while DTT was able to destabilize extensively the polypeptidic chain, allowing the detection of histidine and tyrosine oxidation and the first two steps of tryptophan oxidation.

After the incubation of DNA double helix biosensor (dsDNA) with RTX, it was observed a strong interaction between them with DNA condensation, oxidative damage, depurination and a preferential interaction between DNA deoxyadenosine and RTX. The process was shown to be reversible and dynamically timeless.

The study of the electrochemical behaviour of reductant agents used to auxiliate on the RTX electrochemical characterization, was performed on GCE and their oxidation mechanisms were proposed. The DTT oxidation step occurs at the sulfhydryl group while TCEP occurs at the central phosphine.

# ÍNDICE/ TABLE OF CONTENTS

## *CAPÍTULO 1*

INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O Ácido Desoxirribonucleico.....	4
1.1.1. As Unidades Estruturais do DNA.....	4
1.1.2. A Dupla Hélice do DNA.....	5
1.1.3. A Termodinâmica da Dupla Hélice.....	6
1.2. Agentes Anticancerígenos.....	7
1.2.1. Agentes que Integram com o DNA.....	8
1.2.1.1. <i>Agentes Alquilantes</i> .....	8
1.2.1.2. <i>Complexos de Coordenação de Platina</i> .....	9
1.2.1.3. <i>Inibidores da Topoisomerase</i> .....	10
1.2.1.4. <i>Agentes Intercaladores</i> .....	10
1.2.2. Agentes Antimetabólitos.....	11
1.2.3. Agentes Antitubulínicos.....	12
1.2.4. Agentes Hormonais.....	12
1.2.5. Anticorpos Monoclonais.....	13
1.3. O Rituximab.....	14
1.3.1. Estrutura e Propriedades.....	15
1.3.2. O Receptor CD20.....	16
1.3.3. Mecanismo de Ação do Rituximab.....	19
1.3.3.1. <i>Apoptose</i> .....	19
1.3.3.2. <i>Citotoxicidade Dependente de Complemento</i> .....	20
1.3.3.3. <i>Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos</i> .....	21
1.4. Princípios de Electroquímica.....	22
1.4.1. Métodos Voltamétricos.....	24
1.4.1.1. <i>Voltametria Cíclica</i> .....	25
1.4.1.2. <i>Voltametria de Impulso Diferencial</i> .....	28
1.4.1.3. <i>Voltametria de Onda Quadrada</i> .....	29
1.5. Comportamento Electroquímico do DNA.....	30
1.5.1. Electrooxidação do DNA.....	31
1.5.2. Biossensores Electroquímicos de DNA.....	33
1.5.3. Danos Oxidativos no DNA.....	34



1.6. Comportamento Electroquímico dos Aminoácidos.....	36
1.6.1. Mecanismo de Oxidação da Cisteína e da Metionina.....	37
1.6.2. Mecanismo de Oxidação da Tirosina.....	39
1.6.3. Mecanismo de Oxidação do Histidina.....	40
1.6.4. Mecanismo de Oxidação da Triptofano.....	40
1.7. Objetivos do Presente Trabalho.....	42

## ***CAPÍTULO 2***

EXPERIMENTAL.....	44
2.1. Reagentes e Soluções.....	45
2.2. Instrumentação.....	47
2.3. Condições Experimentais.....	48

## ***CAPÍTULO 3***

ESTUDO ELECTROQUÍMICO DOS AGENTES REDUTORES DITIOTREITOL E TRIS(2-CARBOXIETIL)FOSFINA.....	51
3.1. Oxidação Electroquímica do Ditiotreitol.....	52
3.1.1. Electrooxidação.....	53
3.1.1.1. <i>Voltametria Cíclica</i> .....	53
3.1.1.2. <i>Voltametria De Impulso Diferencial</i> .....	56
3.1.1.3. <i>Voltametria de Onda Quadrada</i> .....	58
3.1.1.4. <i>Mecanismo de Oxidação do DTT</i> .....	58
3.2. Oxidação Electroquímica do Tris(2-carboxietil)fosfina.....	69
3.2.1. Electrooxidação.....	60
3.2.1.1. <i>Voltametria Cíclica</i> .....	61
3.2.1.2. <i>Voltametria De Impulso Diferencial</i> .....	63
3.2.1.3. <i>Voltametria de Onda Quadrada</i> .....	64
3.2.1.4. <i>Mecanismo de Oxidação do TCEP</i> .....	65

## ***CAPÍTULO 4***

MECANISMO DE ELECTROXIDAÇÃO DO RITUXIMAB E SUA INTERAÇÃO COM O DNA.....	67
4.1. Comportamento Electroquímico do Rituximab.....	68
4.1.1. Electroidação do RTX Nativo.....	68
4.1.2. Electroidação do RTX Desnaturado.....	70
4.1.2.1. <i>Electroquímica do RTX na presença do SDS</i> .....	70
4.1.2.2. <i>Electroquímica do RTX na presença do DTT</i> .....	72
4.1.2.3. <i>Electroquímica do RTX na presença do TCEP</i> .....	73
4.2. Estudo da Interação RTX-DNA.....	74
4.2.1. Detecção Electroquímica da Interação RTX-dsDNA, em Solução.....	74
4.2.2. Estudo <i>in-situ</i> da Interação RTX-dsDNA com um Biossensor Electroquímico de DNA.....	76

## ***CAPÍTULO 5***

CONCLUSÕES.....	79
-----------------	----

<b><i>REFERÊNCIAS</i></b> .....	82
---------------------------------	----

# ABREVIATURAS/ ABBREVIATIONS

<b>RTX</b>	Rituximab
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico ( <i>DeoxyriboNucleic Acid</i> )
<b>dsDNA</b>	DNA em dupla hélice ( <i>Double Helix</i> )
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>mAb</b>	Anticorpo monoclonal ( <i>monoclonal Antibody</i> )
<b>CV</b>	Voltametria cíclica ( <i>Cyclic Voltammetry</i> )
<b>DPV</b>	Voltametria de impulso diferencial ( <i>Differential Pulse Voltammetry</i> )
<b>SWV</b>	Voltametria de onda quadrada ( <i>Square Wave Voltammetry</i> )
<b>dAdo</b>	DesoxiAdenosina
<b>dGuo</b>	DesoxiGuanosina
<b>ssDNA</b>	DNA em hélice simples ( <i>Single Helix</i> )
<b>8-oxoGua</b>	8-oxoGuanina
<b>2,8-DHA</b>	2,8-DiHidroxiAdenina
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio ( <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>TCEP</b>	Tris(2-carboxietil)fosfina
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>Met</b>	Metionina
<b>Tyr</b>	Tirosina
<b>Trp</b>	Triptofano
<b>His</b>	Histidina

# *CAPÍTULO 1*

---

INTRODUÇÃO

O cancro é uma condição patológica que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, sendo dos processos biológicos mais complexos com o qual os investigadores se debatem diariamente. O processo começa pela breve exposição a um potencial agente cancerígeno afetando inicialmente uma única célula que, ao dividir-se, transmite à descendência a alteração genética adquirida [1]. A proliferação celular leva a que a malignidade seja constante nas gerações seguintes fazendo com que, a certa altura, a sua maquinaria deixe de conseguir controlar o crescimento e divisão, originando instabilidade genética com subsequente bloqueio da diferenciação das células. O crescimento não controlado faz com que haja um desequilíbrio nos programas de regulação da proliferação, originando uma nova massa com múltiplas células distintas (neoplasma) que estabelecem interações heterotípicas entre elas – tumor – podendo levar à morte de células vizinhas saudáveis. Estes tumores podem ser de dois tipos: malignos e benignos, sendo que os primeiros, denominados de *cancro*, invadem e destroem tecidos adjacentes metastizando através de canais linfáticos ou vasos sanguíneos, enquanto que os benignos permanecem localizados [2].

Devido a essa complexidade, várias são as perspectivas para as quais se olham do ponto de vista de prevenção e tratamento. A cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia são dos métodos de tratamento mais usuais, mas esta última provoca mais danos colaterais uma vez que afeta também células normais. Cresce, assim, a necessidade de encontrar novos compostos anticancerígenos mais seletivos com vista a diminuir esses mesmos efeitos adversos.

O Rituximab (RTX) é um fármaco antineoplásico do grupo dos anticorpos monoclonais (mAb) que não atua diretamente na estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA), mas que de alguma maneira influencia a sua síntese. É utilizado maioritariamente no tratamento de linfomas *non-Hodgkin* em conjunto com quimioterapia mas, desde a sua descoberta, o número de patologias onde é aplicado tem aumentado. Sabe-se que se liga ao receptor CD20 existente à superfície dos linfócitos B, mas o mecanismo pelo qual o leva à destruição das células ainda não é totalmente conhecido.

Diversos têm sido os avanços feitos na elucidação dos mecanismos de reação dos diferentes antineoplásicos com a contribuição de diferentes métodos sensíveis e específicos de modo a possibilitar uma melhor aplicação dos mesmos, bem como o desenvolvimento de novos compostos.

As técnicas voltamétricas, tais como a voltametria de onda quadrada (SW) e de impulso diferencial (DP), são alguns destes métodos alternativos que possibilitam uma análise rápida, sensível e altamente seletiva. Além disso, devido à capacidade direta de detecção de processos que ocorrem à superfície do eléctrodo, é possível desenvolver biossensores electroquímicos com moléculas biológicas de modo a estudar os mecanismos de reconhecimento entre as mesmas e analitos de interesse.

Os biossensores electroquímicos de DNA têm sido utilizados com sucesso para estudar a sua interação com agentes antineoplásicos [3], elucidando quanto ao tipo de alterações na sua estrutura. Recentemente, muitos são os investigadores que se têm debruçado na caracterização electroquímica de biossensores com proteínas, macromoléculas com um grau de complexidade superior ao do DNA [4].

O trabalho aqui apresentando pretende demonstrar que é possível caracterizar electroquimicamente uma proteína estruturalmente complexa, o RTX, e tirar ilações dos efeitos que exerce na molécula de DNA em hélice dupla (dsDNA), conjugando e tirando partido de particularidades protocolares de técnicas bio e electroquímicas.

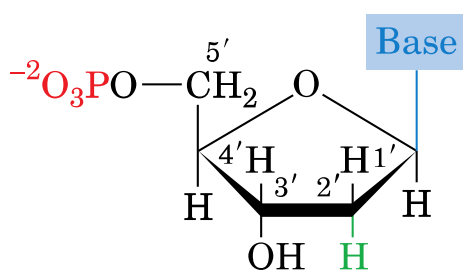
O trabalho foi, assim, dividido em três etapas. A primeira consistiu no estudo do comportamento electroquímico, em meio aquoso, dos agentes redutores ditioneitol (DTT) e tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) e o agente desnaturante dodecil sulfato de sódio (SDS) à superfície do eléctrodo de carbono vítreo (GCE) utilizados posteriormente na desnaturação do RTX. Na segunda etapa já com os agentes redutores e o SDS caracterizados electroquimicamente, o comportamento redox do RTX foi também investigado no seu estado nativo e desnaturado. O DTT, o TCEP e o SDS utilizados para desnaturar o RTX imobilizado sob o eléctrodo, facilitam a transferência electrónica entre os seus grupos electroativos (os aminoácidos) e a superfície do GCE. A terceira e última etapa, consistiu na realização do estudo electroquímico da interação do RTX-dsDNA, a partir de soluções incubadas e por utilização do biossensor electroquímico de dsDNA multicamada.

## 1.1 O ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

Há 3.8 bilhões de anos atrás pensa-se que se terá formado um ancestral constituído por uma molécula de ácido ribonucleico (RNA) autoreplicativa num invólucro de fosfolípidos, que deu origem às células como hoje as conhecemos, incrivelmente complexas. Contudo, nem todas as células têm esse grau de complexidade como se observa nos organismos multicelulares eucariotas. As bactérias (procariontes), por exemplo, são caracterizadas por terem uma maquinaria celular bastante simples, daí serem utilizadas, na maioria das vezes, como modelo experimental em estudos preliminares. Uma característica comum a todos estes organismos vivos, sem exceção, é o facto de se reproduzirem e isso passa por transmitirem o material genético à sua descendência. Esse material genético, o DNA, é o responsável pelas funções vitais subjacentes à vida.

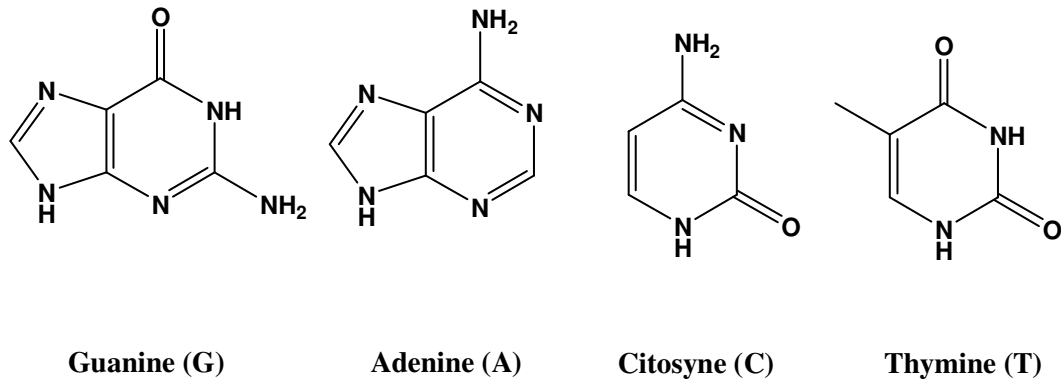
### 1.1.1 AS UNIDADES ESTRUTURAIS DO DNA

O DNA é um biopolímero constituído por diversas unidades básicas designadas de nucleótidos. Cada nucleótido, Esquema 1.1, é formado por uma base azotada (adenina, guanina, citosina ou timina), um grupo fosfato e um açúcar de cinco carbonos (desoxirribose) [5]. A molécula sem o grupo fosfato é denominada de nucleósido.



**Esquema 1.1:** Representação geral de um nucleótido: a vermelho o grupo fosfato, a azul a base azotada e no centro do monómero, a desoxirribose.

As bases azotadas podem ser divididas em dois grupos: **pirimidinas** - citosina e a timina e **purinas** - guanina e adenina, Fig. 1.1. Deste modo, a informação genética dada pela sequência de bases, varia de molécula para molécula.



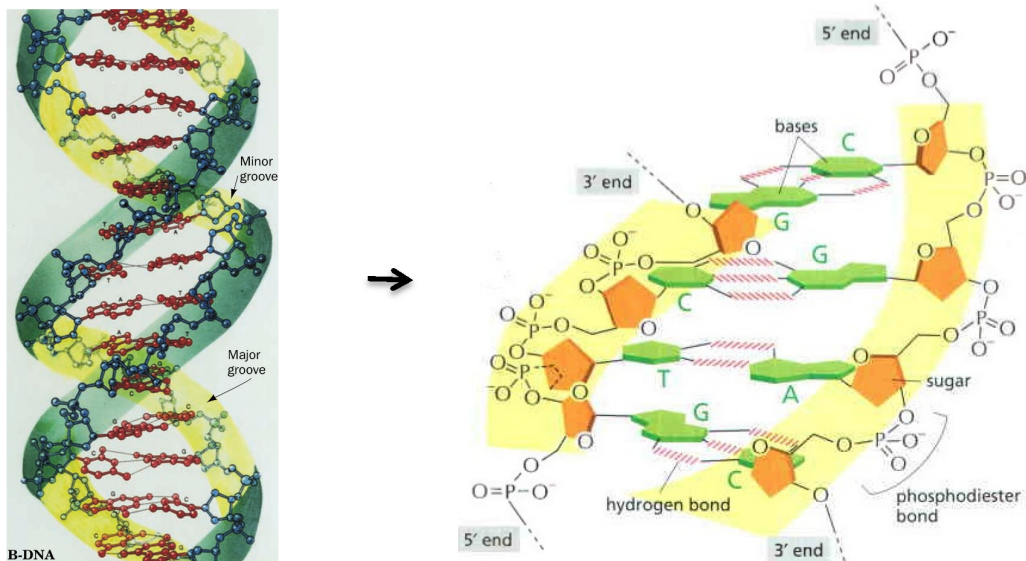
**Figura 1.1:** Estruturas das **Purinas:** Adenina (A) e Guanina (G) e das **Pirimidinas:** Citosina (C) e Timina (T).

A desoxirribose é a molécula central do nucleótido e é assim designada uma vez que não contém o grupo hidroxilo (-OH) ligado ao C<sub>2</sub>' , ao contrário do que acontece com o RNA. Tem a si ligada no carbono C<sub>1</sub>' , por uma ligação glicosídica, uma das cinco bases azotadas referidas anteriormente e no carbono C<sub>5</sub>' um grupo fosfato, por uma ligação fosfodiéster. Uma vez que o grupo fosfato ligado ao carbono C<sub>5</sub>' da ribose se vai ligar ao grupo -OH existente no carbono C<sub>3</sub>' do nucleótido seguinte, a sequência de nucleótidos do DNA lê-se sempre de 5' para 3'.

### 1.1.2 A DUPLA HÉLICE DO DNA

O modelo descrito por Watson e Crick para a estrutura do DNA, teve como base um estudo por Difração de Raios-X realizado por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins, tendo obtido um padrão representativo de uma estrutura helical. Determinaram que as duas cadeias de desoxirribonucleótidos se dispõem ao longo de um eixo, formando uma hélice dupla, Esquema 1.2, com ~ 20 Å. As cadeias são antiparalelas e só são possíveis de serem separadas caso haja desenrolamento das mesmas. Calcularam, de igual modo, a distância entre cada base na cadeia de DNA, ~ 3.4 Å, e que por cada volta que a hélice dá, existem 10 pares de bases correspondendo a ~ 36 Å [6].





**Esquema 1.2:** Estrutura do DNA em dupla hélice e complementaridade de bases [6].

No centro da hélice encontram-se as pirimidinas e as purinas, Esquema 1.2, com os seus anéis aromáticos planares e hidrofóbicos perpendiculares ao eixo. Na periferia, em contacto com a água, encontram-se as cadeias de desoxirribose-fosfato minimizando as repulsões entre os grupos fosfato. Pela segunda regra de Chargaff, foi possível deduzir o modo de emparelhamento das bases azotadas na molécula do DNA sendo que a adenina emparelha com a timina por duas pontes de hidrogénio e a citosina emparelha com a guanina por três pontes de hidrogénio. O emparelhamento entre as duas cadeias cria uma fenda maior e uma fenda menor na hélice, em que a densidade de carga negativa é maior na fenda menor. Esta estrutura recebeu a designação de B-DNA e é a estrutura mais estável para o DNA em condições fisiológicas, sendo assim, a mais frequente nos seres vivos.

### 1.1.3 A TERMODINÂMICA DA DUPLA HÉLICE

Com o modelo acima descrito, pode-se concluir que a dupla hélice responsável pela hereditariedade é composta principalmente por duas regiões: uma hidrofóbica, situando-se no centro da cadeia e que compreende as bases azotadas, e uma hidrofílica, situando-se na periferia e com carga negativa promovida pela existência dos grupos fosfatos. Esta linearidade estrutural faz com que a molécula de DNA tenha uma polaridade específica. Contudo, a barreira de estabilidade tem de ser

tal, de modo a permitir que a molécula se replique e consiga transcrever e traduzir a informação em proteína sendo importante, portanto, entender as suas propriedades químicas. Em condições de pH e temperatura extremos, a molécula altera-se. Embora não haja quebra de ligações covalentes, a hélice desenrola-se e separa-se, destruindo a sua estrutura tridimensional – desnaturação. O  $\Delta G$  desta reação tem de ser elevado e depende da entropia ( $\Delta S$ ) e da entalpia ( $\Delta H$ ), sendo que este último parâmetro tem de ser muito superior, dado a estabilidade da dupla hélice resultante das forças cooperativas. Contudo, o processo não é totalmente cooperativo e, como tal, abrem primeiro as regiões terminais da hélice uma vez que só estão estabilizadas por uma interação hidrofóbica. De seguida, formam-se bolhas no interior da dupla hélice, em regiões ricas em pares A:T, uma vez que estão ligadas por menos pontes de hidrogénio comparativamente ao par G:C. A renaturação, processo de reassociação das bases complementares, apenas será conseguida se a desnaturação for parcial, se a concentração do DNA for suficientemente alta para que as colisões intermoleculares sejam frequentes e se a força iónica da solução for também suficientemente alta de modo a neutralizar as repulsões electrostáticas entre os grupos fosfato.

## **1.2 AGENTES ANTICANCERÍGENOS**

Com a evolução da ciência e da tecnologia a si associada, tem sido possível estudar e avaliar o cancro a diversos níveis mas passadas décadas parece que é uma realidade que tende a não findar. Inclusive, apelidam-na de “doença do século”.

Intensas pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de elucidar as possíveis causas do cancro mas sendo um processo demasiado complexo, torna-se difícil esta abordagem, pelo que os investigadores centram-se em pontos específicos da doença, nomeadamente nos processos que afetam o DNA das células cancerígenas. Deste modo, a maioria dos compostos desenvolvidos para diminuir a incidência da doença baseiam-se em provocar a citotoxicidade da célula, isto é, atuar direta ou indiretamente no DNA celular de diversas maneiras e destruí-la.

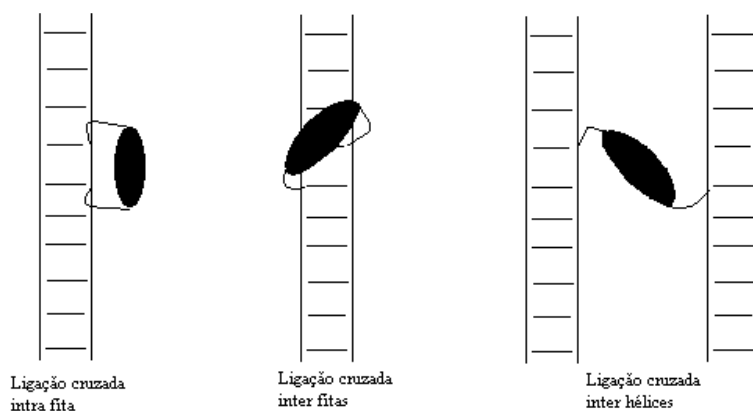
Os fármacos anticancerígenos podem ser classificados consoante o seu mecanismo de ação: agentes que interagem diretamente com a molécula do DNA, antimetabólitos, antitubulínicos, hormonais e os anticorpos monoclonais que pertencem a uma classe terapêutica relativamente nova [7].

## 1.2.1 AGENTES QUE INTERAGEM COM O DNA

Os agentes que interagem com o DNA são os mais utilizados e os mais importantes quando se fala no tratamento por quimioterapia. Dentro deste grupo faz-se a divisão em agentes alquilantes, complexos de coordenação de platina, inibidores da topoisomerase e agentes intercaladores [7-9].

### 1.2.1.1 Agentes Alquilantes

Os agentes alquilantes [7-9] são fármacos com grupos alquilo fortemente electrofílicos que, ao reagirem com os centros nucleofílicos do DNA, formam ligações covalentes cruzadas quebrando, na maioria das vezes, não só a hélice dupla como a hélice simples do DNA. Estas ligações cruzadas podem ser de três tipos: ligações cruzadas inter e intrafilamentares e ligações cruzadas entre duas hélices duplas, Esquema 1.3. As ligações cruzadas interfilamentares são as mais citotóxicas, uma vez que exigem processos de reparação mais complexos, podendo até levar à inibição da síntese de DNA.



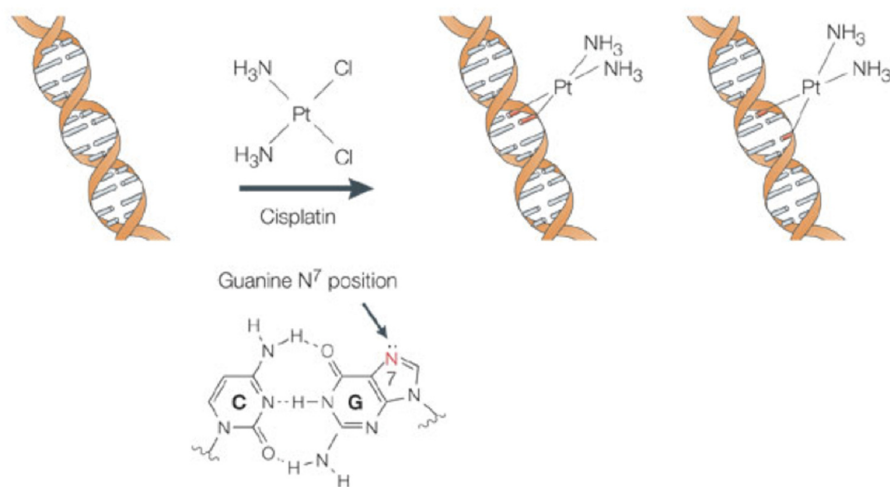
**Esquema 1.3:** Representação das ligações cruzadas que podem ocorrer entre agentes alquilantes e o DNA [9].

O principal local de alquilação na estrutura do DNA é a posição N7 da guanina porém, outras bases podem ser alquiladas mas com menos probabilidade, como a adenina nas posições N1 e N3, a citosina na N3 e a guanina na O6. As mostardas nitrogenadas e derivados dos triazenos como a temozolamida e a

dacarbazina são exemplos de agentes alquilantes sendo que, estes últimos, reagem com o DNA na forma de catião.

### 1.2.1.2 Complexos de Coordenação de Platina

Os compostos de platina [7-10] apesar de não possuírem grupos alquilo, reagem com o DNA da mesma maneira que os agentes alquilantes. Contudo, todos eles têm de ser ativados intracelularmente de modo a formarem espécies intermédias altamente reativas, para posteriormente se ligarem ao átomo N7 da guanina ou da adenina, Esquema 1.4. A fenda maior do DNA é o local preferencial de coordenação com a platina por ser o local mais acessível e mais nucleofílico.

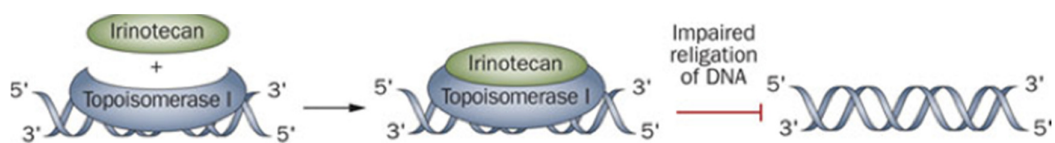


**Esquema 1.4:** Ligação do complexo de platina, cisplatina, à molécula de DNA [11].

A cisplatina é o complexo de platina mais conhecido e a sua coordenação com o DNA leva à formação de adutos que provocam uma distorção significativa na dupla hélice impedindo a sua síntese, com posterior indução de morte celular programada (apoptose). Tem-se falado bastante nos compostos de platina de terceira geração, como o caso da oxaliplatina [8] que, devido ao seu grande volume, ocupam uma maior área da fenda maior da dupla hélice impedindo em maior percentagem o acesso da maquinaria de reparação do DNA. Para além disto, revelou-se menos tóxico em relação à cisplatina, daí o seu maior uso.

### 1.2.1.3 Inibidores da Topoisomerase

A replicação do DNA é um processo complexo e sequencial que está dependente da desestabilização da dupla hélice e a enzima responsável pelo controlo da sua estrutura tridimensional é a topoisomerase. Existem dois tipos de topoisomerases, a I e a II, com o objetivo comum de reduzir o stress torcional da hélice, provocando quebras na mesma e permitindo a passagem dos restantes segmentos do DNA. Quando o processo se completa, as cadeias emparelham e a estrutura torna a enrolar-se.

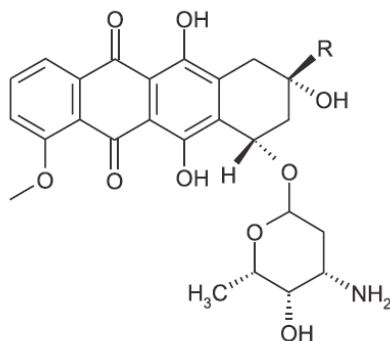


**Figura 1.2:** Acção do inibidor da topoisomerase I, Irinotecan [8].

Na presença dos inibidores destas enzimas [8], como se observa na Fig. 1.2, o inibidor liga-se à topoisomerase tornando-a disfuncional já que impede que se ligue novamente à molécula de DNA. Deste modo, as quebras nas cadeias nunca são reparadas, levando à morte celular. Dos inibidores mais conhecidos, encontra-se o irinotecan que é aplicado no tratamento do cancro colorectal.

### 1.2.1.4 Agentes Intercaladores

Os agentes intercaladores são o grupo de compostos mais importantes que interagem reversivelmente com o dsDNA. São na sua maioria antibióticos naturais, todos eles com características estruturais comuns consistindo em sistemas poliaromáticos planares. São estes anéis que se vão intercalar por interações electrostáticas entre as bases purínicas do DNA, levando ao seu espaçamento e alterando a estrutura do B-DNA, impedindo a transcrição em RNA mensageiro (mRNA).



**Esquema 1.5:** Estrutura geral de uma antraciclina [9].

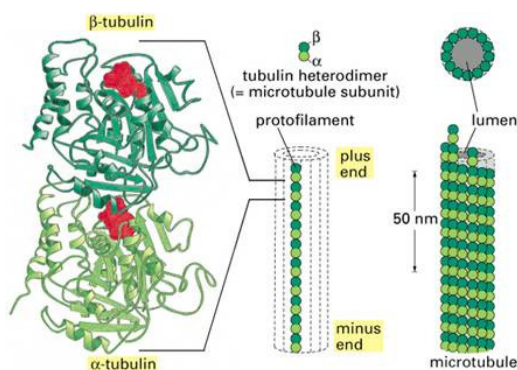
As antraciclina, Esquema 1.5, produzidos pelos microorganismos *Streptomyces* spp., são um grupo de compostos anticancerígenos intercaladores com as bases do DNA e conhecidos pelos seus efeitos desde os anos 60. A daunorrubicina e a doxorubicina são exemplos desse grupo de compostos.

### 1.2.2 AGENTES ANTIMETABÓLITOS

A maioria dos agentes antimetabólitos antineoplásicos bloqueiam a síntese do DNA [7-9]. São, na sua maioria, análogos estruturais das purinas e pirimidinas, com dois modos de ação: inibição de enzimas envolvidas na síntese do DNA e incorporação de quebras na estrutura do DNA e do RNA. A clofarabina é um dos análogos da adenosina que ao ser fosforilada se incorpora na estrutura do DNA, levando à inibição da sua síntese e consequentemente morte celular. Os antifolatos, análogos de ácido fólico, também são antimetabólitos aplicados em quimioterapia por interferirem na síntese de desoxirribonucleótidos de timina. O antifolato mais utilizado é o metotrexato. Uma vez transportado para o interior da célula, inibe a redutase do dihidrofolato responsável pela regeneração dos folatos que por sua vez não permite a síntese dos desoxirribonucleótidos. Os antimetabólitos são, assim, particularmente ativos contra células que se encontram na fase de síntese do ciclo celular.

### 1.2.3 AGENTES ANTITUBULÍNICOS

Os microtúbulos, Fig. 1.3, são estruturas proteicas que constituem o citoesqueleto das células e são os responsáveis pela manutenção da sua forma, pelo transporte intracelular e axonal, pela secreção e pela divisão celular. Os seus constituintes compreendem dímeros de tubulina como unidade básica e proteínas associadas. Contudo, a sua ação só é completada quando a tubulina polimeriza e forma estruturas tubulares.



**Figura 1.3:** Estrutura dos microtúbulos.

Existem várias classes de anticancerígenos conhecidos por interferirem com a função da tubulina [8]. Os alcalóides da vinca, como a vinblastina e a vincristina, que inibem o fuso mitótico por impedimento da sua polimerização, fazem parte desse grupo, parando o processo mitótico em metafase. Pelo contrário, os taxanos ligam-se aos microtúbulos impedindo a sua despolimerização. De uma maneira ou de outra, estas classes de antitubulínicos afetam a instabilidade dinâmica dos microtúbulos que é imprescindível no processo mitótico, uma vez que depende dos ciclos de encurtamento/crescimento dos microtúbulos.

### 1.2.4 AGENTES HORMONAIS

Ao contrário dos restantes agentes mencionados acima, os agentes hormonais não provocam citotoxicidade direta nas células. O objetivo da sua aplicação é modular a proliferação celular através da interação com receptores citoplasmáticos específicos, levando à síntese de novas proteínas responsáveis pelo crescimento e proliferação celular.

Existem fortes evidências que os estrogénios, hormonas esteróides dos ovários, participam no desenvolvimento e progressão do cancro da mama [13]. Esta hormona afeta a taxa de divisão celular das células epiteliais da mama, tornando-as susceptíveis a erros durante a replicação do DNA. Contudo, em células cancerígenas, também é capaz de modificar a expressão dos genes responsáveis pelo ciclo celular e pela indução de apoptose ou mesmo intervir na sinalização destes mecanismos. Moduladores dos receptores dos estrogénios tais como o tamoxifeno e o raloxifeno, demonstraram reduzir o risco do cancro da mama [13]. Por outro lado, é possível aplicar um regime hormonal de baixa concentração de estrogénios com adição posterior de antiestrogénios, privando as células do consumo desta hormona e provocando a morte celular. Assim, é possível acompanhar um tratamento de quimioterapia com um desequilíbrio hormonal.

### 1.2.5 ANTICORPOS MONOCLONAIS

Na última década, os avanços na biologia molecular vieram facilitar o desenvolvimento de técnicas de manipulação e recombinação genética permitindo aplicar a imunoterapia no tratamento do cancro tendo como base o uso de anticorpos monoclonais (mAb) [14].

A maioria dos anticorpos utilizados no diagnóstico do cancro e em terapia, derivam das imunoglobulinas IgG naturalmente circundantes no nosso organismo, consistindo em duas regiões variáveis que se ligam ao antígeno específico (porção Fab) conectadas a uma região constante (porção Fc) que liga uma variedade elevada de moléculas efetoras do sistema imunitário. Esta estrutura compreende dois pares de cadeias polipeptídicas, cada um contendo uma cadeia pesada e uma cadeia leve.

Os mAb são, assim, anticorpos monoespecíficos para um antígeno uma vez que foram produzidos a partir do mesmo clone de células. Podem ser de três tipos:

- **Derivados de ratinhos (*murine*):** isolados de ratinhos e com atividade limitada já que são rapidamente removidos da circulação por serem reconhecidos como agentes estranhos ao organismo, com grande imunogenicidade. Estes anticorpos possuem, geralmente, pouca habilidade de ativar os sistemas efetores responsáveis pela morte das células tumorais;
- **Quiméricos:** constituídos por porções Fab de ratinhos e porções Fc de humanos mediando, assim, mais eficientemente os processos de defesa.



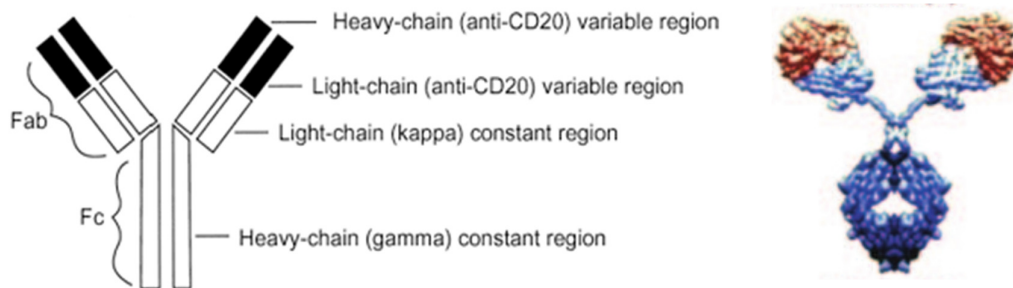
Quanto mais porções humanas tem, mais humanizado se torna. O Rituximab foi o primeiro anticorpo monoclonal quimérico a ser aprovado e direciona para o receptor CD20 à superfície dos linfócitos B.

- **Humanos:** a sua estrutura provém na sua totalidade de humanos, pelo que os mecanismos efetores são ainda mais eficientes comparativamente aos anticorpos monoclonais quiméricos. O alirocumab é um exemplo deste tipo de mAb aplicado a casos de hipercolesterémia.

Na sua maioria, os mAb são aplicados em conjunto com um regime de quimioterapia por serem capazes de sensibilizarem as células tumorais. No futuro, o sucesso da sua aplicação passa por conseguir desvendar mais pormenores da biologia do cancro e entender qual o mecanismo exato que é ativado.

### 1.3 O RITUXIMAB

O Rituximab (MabThera<sup>®</sup>, Rituxan<sup>®</sup>) é um mAb quimérico de rato/humano produzido por engenharia genética, isto é, criado por fusão de domínios variáveis das cadeias leve e pesada de um anticorpo monoclonal de rato contra a proteína CD20, com domínios constantes das cadeias pesada  $\gamma 1$  e leve  $\kappa$  de humanos, Fig. 1.4 [15].



**Figura 1.4:** Diagrama da estrutura do RTX. É constituído por sequências variáveis anti-CD20 de rato (a cheio) e por sequências constantes de humanos (a aberto), baseado na imunoglobulina IgG1.

Este mAb foi o primeiro a ser aprovado pela FDA (*U. S. Food and Drug Administration*) em 1997 e pelas autoridades europeias em 1998 para o tratamento de linfomas *non-Hodgkin* de crescimento lento [16]. No entanto, hoje em dia já é aplicado em inúmeras patologias como doenças autoimunes [17], outros tipos de

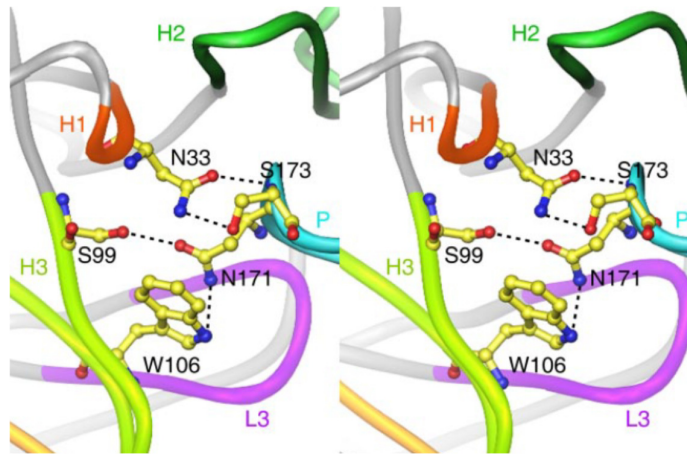
linfomas e diabetes do Tipo 1 [18]. A sua estrutura foi desenhada direcionando-o para o receptor CD20, antígeno existente à superfície de 80% dos linfomas de células B.

### 1.3.1 ESTRUTURA E PROPRIEDADES

Em 1994, Anderson R. Darrell e o seu grupo de investigação [15] conseguiram produzir por técnicas de DNA recombinante um anticorpo quimérico de humano/ratinho (C2B8) para o receptor CD20, após identificarem um anticorpo monoclonal anti-CD20 de ratinho com elevada afinidade (2B8). Verificaram que o primeiro tinha uma especificidade e afinidade equivalentes ao anticorpo de onde tinha derivado (2B8), bem como funções efetoras humanas. Após uma exposição a baixas concentrações do C2B8, observaram uma significativa depleção de células B no organismo, tanto em primatas como em humanos. Com estes dados e pelo facto de este anticorpo ter demonstrado inexistência de efeitos adversos após a sua administração, quatro anos mais tarde, a empresa farmacêutica da Califórnia nos Estados Unidos *IDEC Pharmaceuticals* (conhecida hoje em dia como *Biogen IDEC*) patenteou e comercializou o anticorpo C2B8 com o nome de Rituxan<sup>®</sup> ou Rituximab<sup>®</sup>.

Esta proteína tem uma estrutura 3D complexa idêntica às imunoglobulinas existentes naturalmente no nosso organismo, como se pode verificar pela estrutura ilustrada na Fig. 1.4. Tem um peso molecular de 145 kDa com duas cadeias pesadas de 451 aminoácidos cada e duas cadeias leves de 232 aminoácidos cada (informação retirada de uma patente chinesa gentilmente cedida pelo Doutor Hao Wang [19]). O seu pI estimado tem um valor de ~ 8,7 e a sua carga é positiva (dados calculados pelo programa “Protein Calculator v 3.3”).

Estudos de cristalografia foram realizados para determinar a base molecular da interação entre o RTX e o CD20 [19], Fig. 1.5, tendo em conta que o domínio Fab, Fig. 1.4, do RTX é aquele que interage com o receptor. O CD20 liga-se especificamente a uma bolsa larga do RTX por quatro resíduos <sup>170</sup>ANPS<sup>173</sup> (170 - alanina, 171 - asparagina, 172 - prolina, 173 - serina) que são críticos no reconhecimento, estabelecendo entre si e com o próprio domínio Fab, uma rede de pontes de hidrogénio. Extensivas forças de van der Waals explicam a elevada afinidade do RTX para o CD20, nomeadamente 79 das forças existentes nesses quatro resíduos do peptídeo.



**Figura 1.5:** Imagem da interação entre o RTX (representado com fitas) e o CD20 (representado com ligações e seus átomos), realçando as pontes de hidrogénio (a tracejado) [19].

É de salientar também que dois resíduos de cisteína existentes na molécula de CD20, estabelecem entre si uma ponte dissulfeto o que o faz adotar uma estrutura única cíclica. Com a disrupção desta ligação, a especificidade é perdida.

Especificamente para o trabalho que foi desenvolvido e que será aqui descrito, é importante salientar que o Rituximab é composto por 12 resíduos de metionina, 32 resíduos de cisteína, 26 resíduos de histidina, 28 resíduos de triptofano e 62 resíduos de tirosina.

### 1.3.2 O RECEPTOR CD20

A molécula CD20 é uma proteína não glicosilada com 33-37 kDa (dependendo do estado de fosforilação) codificado por um gene que se localiza no cromossoma 11. A sua expressão à superfície das células depende do tipo de doença e do estado de maturação das células B: não está presente nas células estaminais hematopoiéticas, nas células imaturas (células pro-B) e nas células secretoras de anticorpos [20]. A sua estrutura é caracterizada pela presença de quatro regiões hidrofóbicas transmembranares, um *loop* extracelular com 44 aminoácidos sendo o local de contacto dos ligandos e terminais amínico e carboxílico citoplasmáticos com sequências codificantes de cinases, Fig. 1.6. Pode ocorrer como homotetrâmero ou dímero de dímeros e alguns mAb reagem apenas com uma das formas do receptor. Este receptor membranar é um atrativo na pesquisa de novos anticorpos monoclonais

para o desenvolvimento de imunoterapias, devido ao facto de não ser internalizado nem clivado após interação e também por não ter qualquer ligando natural específico.

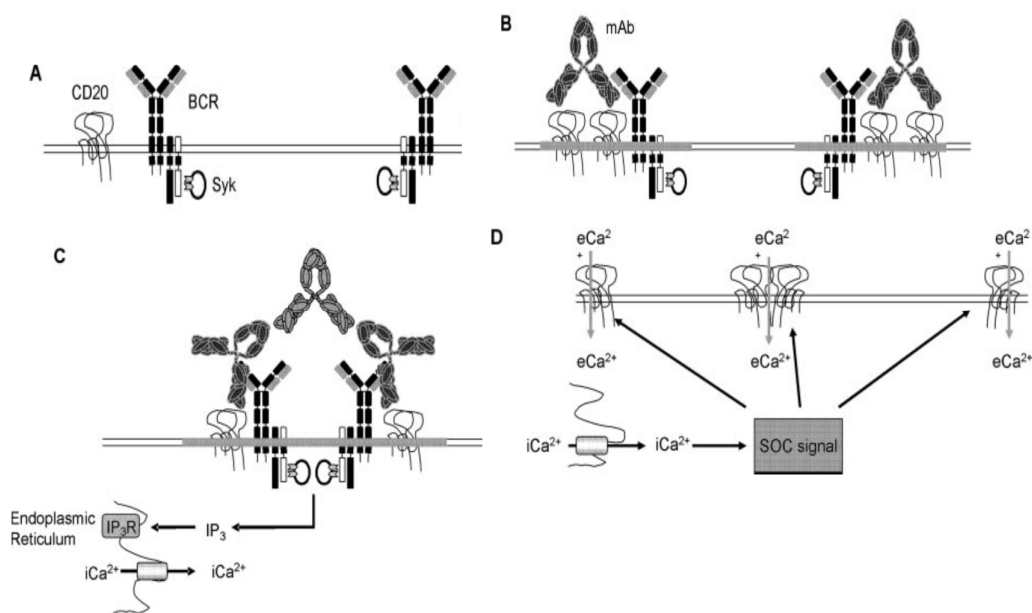


**Figura 1.6:** Estrutura do CD20. Representação da proteína cinase C (laranja), cálcio/calmodulina (verde), cinase II da caseína (amarela). (imagem retirada de: Joan K. Riley and Mark X. Sliwkowski (2000) *Sem. Oncol.* 27).

Já há muito que se tem vindo a especular sobre o mecanismo exato inerente à interação entre o CD20 e compostos utilizados em imunoterapia, como o caso do rituximab. Pensa-se que a sua ação inclui manter os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  [21]. Na realidade, diversos estudos comprovaram que o receptor era responsável pela entrada deste catião: 1) expressando o CD20 em células onde esta proteína é naturalmente ausente (células de ovário de hamster chinês – CHO), verificou-se um grande aumento do influxo de  $\text{Ca}^{2+}$ ; 2) silenciando o gene que codifica o CD20 em células B de humanos e ratinhos, foi observado um abaixamento da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ . Contudo, estas evidências não esclarecem se o CD20 é um canal de  $\text{Ca}^{2+}$  ou um componente de um canal de  $\text{Ca}^{2+}$  ou se apenas regula o influxo deste catião. A certeza que se tem é que existe uma interação entre o CD20 e o receptor das células B (BCR) e que ambos estão envolvidos no mecanismo de sinalização celular por estimulação do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estudos referem que ambos devem ser coordenadamente expressos uma vez que aparecem na superfície das células B aproximadamente na mesma fase de maturação [21]. Contudo, investigadores sugerem que estão fisicamente associados [22] enquanto que outros defendem que essa associação só ocorre após estimulação [23].

Claire A. Walshe *et al* [23], Esquema 1.6, juntaram dados e teorias e com experiências confirmativas, criaram um modelo para o mecanismo de fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  após interação do mAb com o CD20:

- A. Sem estimulação, o BCR e o CD20 não se encontram associados;
- B. Após a ligação do mAb (os autores consideram este modelo para mAbs do Tipo I que provocam sempre a redistribuição dos receptores com *clustering*) à superfície do CD20, ocorre uma associação funcional entre este e o BCR.
- C. Ocorre um *clustering* entre os vários mAbs e entre estes e o BCR, levando a uma ativação de cinases que por mecanismos de transdução de sinal, libertam  $\text{Ca}^{2+}$  de organelo intracelulares;
- D. Este aumento de concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular leva a uma abertura/estimulação de sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  (SOCs), prolongando o seu influxo.



**Esquema 1.6:** Mecanismo do fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  mediado pelo CD20 após ligação do mAb. [23] (com modificação de imagem).

É importante ressaltar que os níveis de expressão do CD20 à superfície das células B vão influenciar o grau do *clustering* dos intervenientes. Isto é, se os níveis de CD20 forem reduzidos, o *clustering* tem de envolver um maior número de ligações.

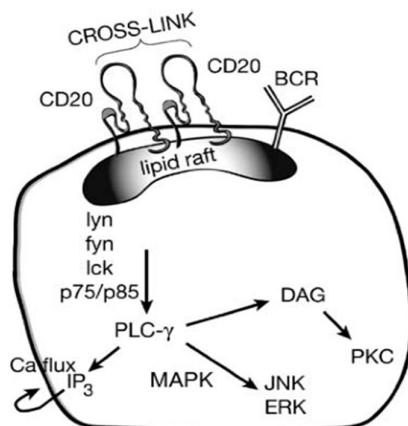
### 1.3.3 MECANISMOS DE AÇÃO DO RITUXIMAB

O CD20 foi o primeiro marcador específico para as células B a ser identificado e, apesar de existirem diversas moléculas derivadas de rato e específicas para este receptor, a sua aplicação clínica foi rejeitada devido à formação de anticorpos contra o mesmo, produzindo uma resposta imune grave. Na preparação do RTX, os investigadores conseguiram eliminar os elementos que produziam este tipo de imunogenicidade. Para além disso, o tempo de vida *in vivo* é apenas de 20 horas, o que limita bastante a sua aplicação. Com o aparecimento dos anticorpos monoclonais quiméricos, esse problema foi ultrapassado: o seu tempo de vida aumentou para dias e isto justifica-se pelo facto de a região Fc do anticorpo ser derivada de humano.

#### 1.3.3.1 Apoptose

Como referido anteriormente, a distribuição do CD20 nas células B é desigual, o que faz com que seja um alvo apelativo para aplicação em terapias uma vez que é específico para certos estádios de desenvolvimento das células B. Quando ocorre ligação do RTX ao CD20, o complexo anticorpo-antígeno é translocado para regiões da membrana constituídas por jangadas lipídicas. Estes subdomínios dinâmicos ricos em colesterol e esfingolípido são caracterizados por terem a si associadas proteínas específicas envolvidas na regulação da transdução de sinais funcionando, assim, como plataformas para o *assembling* de moléculas sinalizadoras. Eva Janas e a sua equipa [24] verificaram que o CD20 tem baixa afinidade para se concentrar nesses domínios, valor esse que aumenta no momento em que o RTX se liga ao receptor. Deste modo, moléculas sinalizadoras concentram-se na membrana ativando mecanismos celulares, como proposto por Mitchell Smith, Fig. 1.7, [25]: o CD20 ativa uma série de cinases (lyn, fyn e p75/p85, sendo a primeira que mantém o balanço da concentração de  $Ca^{2+}$  e as duas últimas controlam o crescimento e a diferenciação celulares), que por sua vez ativam a fosfolipase C (PLC), uma proteína membranar, a: 1) clivar o fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato (PIP3), gerando um fluxo de  $Ca^{2+}$  com consequente ativação da apoptose; 2) clivar o fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), formando o diacilglicerol (DAG) que vai ativar a proteína cinase C (PKC), desregulando vários

eventos celulares como a diferenciação e o crescimento; 3) ativando o mecanismo de sinalização da cinase mitogénica (MAPK) regulado por proteínas responsáveis pela indução da apoptose e do crescimento celular.



**Figura 1.7:** Modelo de cascata de sinalização intracelular proposto por Mitchell R. Smith [25].

O mecanismo por apoptose [25-28] é o mais difícil de ser explicado uma vez que é complicado demonstrá-lo experimentalmente *in vivo*. Enquanto que alguns grupos sugerem a ativação das caspases, proteínas mediadoras da apoptose, como mecanismo central, outros demonstraram que a indução da morte celular pelo RTX é completamente independente dessas proteínas. Outros postulam que a ligação do RTX às células B cancerígenas sensibilizam-nas para o processo apoptótico induzido pela quimioterapia. Estudos continuam a serem desenvolvidos com vista a elucidar melhor este mecanismo.

### 1.3.3.2 Citotoxicidade Dependente de Complemento

O sistema complemento é um mecanismo pertencente à imunidade inata e que atua como primeira defesa do organismo face ao contacto com agentes estranhos. O processo consiste na clivagem das membranas celulares por ação de proteínas existentes na circulação sanguínea como zimogénios (proteínas inativas). A contradição que se observa na depleção das células B por apoptose, aparece também neste mecanismo. Contudo, são processos a não descartar, uma vez que os procedimentos experimentais podem variar de grupo para grupo. Deste modo, alguns investigadores conseguiram verificar que na ausência da proteína C1q, proteína

complemento efetora que se liga à porção Fc do RTX, não ocorreu destruição das células malignas, enquanto que o contrário foi concluído por outros investigadores. Foi também verificado que para humanos com leucemia linfocítica crónica, a infusão com o anticorpo provocou um rápido desaparecimento dos componentes do sistema complemento, levando a pensar a existência de mecanismos de resistência [27].

### ***1.3.3.3 Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpos***

O mecanismo de eliminação das células B por citotoxicidade celular dependente de anticorpos é, dos três mecanismos propostos pela comunidade científica, o mais aceite. Após a ligação do rituximab ao receptor CD20 nas células B, a porção Fc do anticorpo fica livre para reagir com os receptores Fc expressos nas células imunitárias com capacidades citotóxicas como os *natural killers* (células NK), macrófagos e neutrófilos. Esta interação, no caso específico das células NK, vai provocar a libertação de grânulos citolíticos capazes de entrarem nas células B, ativando uma série de eventos até levar à morte celular controlada. Diversos estudos provaram este facto: 1) estudos *in vitro* mostraram que a depleção de células B malignas pelo RTX requer a presença de células funcionais como as células NK [28] e 2) estudos *in vivo* provaram que o efeito antitumoral do RTX requer a interação da sua porção Fc com receptores Fc à superfície das células do sistema imunitário [29].

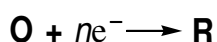
Recentemente, novos dados têm sugerido que a administração do rituximab é capaz de induzir uma resposta antitumoral adaptativa, isto é, que o seu efeito persiste durante longos tempos mesmo depois de o anticorpo já não permanecer no organismo. Isto leva a crer que seja possível induzir um “efeito de vacina” através de uma resposta por parte dos linfócitos T [30], muito provavelmente por apresentação de antígenos resultantes da degradação das células B por parte dos fagócitos profissionais.



## 1.4 PRINCÍPIOS DE ELECTROQUÍMICA

A electroquímica [31, 32] consiste no estudo de fenómenos associados à separação de cargas, isto é, estuda maioritariamente todo o tipo de processos que envolvam a transferência de electrões, podendo ocorrer homogeneamente em solução ou heterogeneamente à superfície do eléctrodo.

Nestes processos existem espécies que cedem electrões, oxidando-se (agentes redutores) e outras que os aceitam, reduzindo-se (espécies oxidantes), segundo a reacção:



O par  $\mathbf{O} | \mathbf{R}$  tem a si associada uma energia redox,  $E_{\text{redox}}$ , que está relacionada com o potencial de eléctrodo para cada reacção electroquímica específica. A equação de Nernst descreve a variação desse potencial, tendo em conta que as reacções de eléctrodo são convencionalmente escritas como reduções:

$$E = E^{\ominus} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\prod a_{\mathbf{O}_i}^{\nu_i}}{\prod a_{\mathbf{R}_i}^{\nu_i}}$$

em que  $\mathbf{O}$  é a espécie oxidada e o  $\mathbf{R}$  a espécie reduzida.

Os electrões no eléctrodo (que é um condutor) têm uma energia máxima que é distribuída à volta do nível Fermi, o nível electrónico ocupado mais elevado,  $E_F$ . Os electrões num eléctrodo de trabalho são sempre transferidos de e para o nível Fermi, podendo ser externamente influenciado pela aplicação de voltagem que adiciona ou retira electrões.

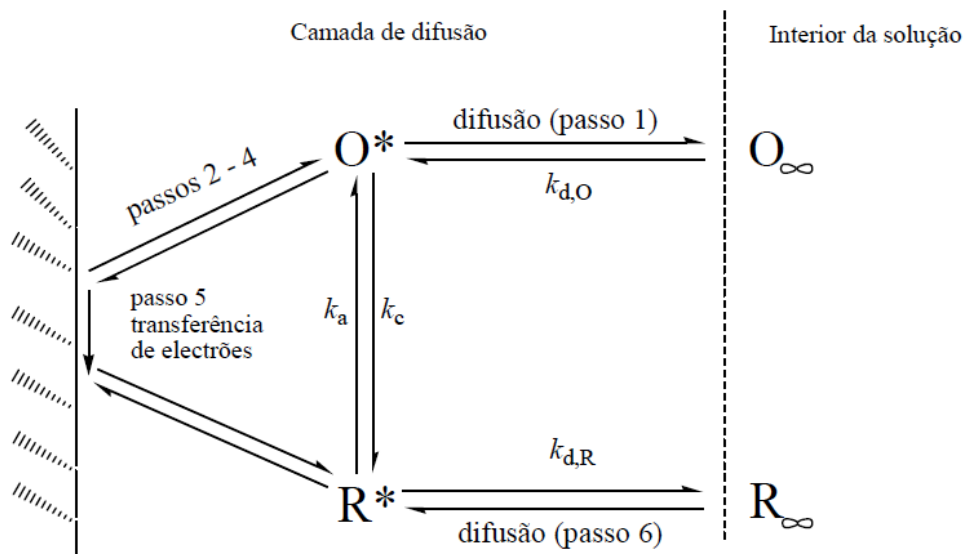
De modo a assegurar a electroneutralidade da reacção, ocorrem sempre duas ou mais meias reacções em direcções opostas: reduções e oxidações. Para a redução, os electrões transferíveis a partir do eléctrodo devem ter um mínimo de energia antes da transferência poder ocorrer, o que corresponde a um potencial suficientemente negativo (em volts). Para a oxidação existe uma energia máxima que o menor nível desocupado do eléctrodo pode ter, a fim de receber electrões a partir das espécies na solução, correspondente a um potencial suficientemente positivo (em volts).

Excepto no caso de reacções redox homogéneas, as reacções de transferência de carga estão separadas no espaço, usualmente ocorrendo em eléctrodos diferentes,

imersos em solução numa célula electroquímica. Estes eléctrodos estão ligados por meios condutores, tanto na solução (através do *electrólito de suporte* – transporte iónico) como externamente (através de fios eléctricos) de tal modo que a carga possa ser transportada. Em todos os processos electroquímicos, o *eléctrodo de trabalho* é o eléctrodo onde ocorre a reacção de transferência de electrões. O potencial deste eléctrodo é controlado através do *eléctrodo de referência* com a ajuda de um potenciostato. O eléctrodo de referência utilizado numa experiência electroquímica deve possuir uma impedância elevada de forma a por ele não passar corrente. A corrente da célula electroquímica flui entre o eléctrodo de trabalho e o *eléctrodo auxiliar* através do *electrólito de suporte*.

Em qualquer processo de electroquímica é necessário considerar o transporte de todas as espécies envolvidas da solução para a superfície do eléctrodo e respetiva reacção. O transporte pode ocorrer de três diferentes maneiras: difusão, convecção e migração. Difusão é o processo de transporte de espécies de acordo com o gradiente de concentração, convecção é a imposição de movimento mecânico em que o transporte é consideravelmente maior e migração é o movimento das espécies carregadas consoante a aplicação de um gradiente eléctrico. Em abordagens electroanalíticas, consegue-se eliminar o transporte por migração das espécies electroativas, isto é, espécies que reagem à superfície do eléctrodo, uma vez que se adiciona sempre um excesso de *electrólito de suporte*. A convecção também é externamente controlada, o que faz com que o transporte das espécies junto do eléctrodo seja apenas por difusão. Deste modo, o mecanismo de transferência de electrão ocorre como ilustrado no Esquema 1.7, podendo-se realçar alguns parâmetros importantes na interpretação desse mesmo mecanismo:

1.  $k_d$ : coeficiente de transferência de massa que descreve o processo de difusão até à superfície do eléctrodo;
2.  $k_a$ : constante de velocidade para a reacção anódica;
3.  $k_c$  - constante de velocidade para a reacção catódica;
4. **A dupla camada**: região interfacial que separa o eléctrodo e o interior da solução e onde se encontram as espécies intervenientes na reacção e moléculas de solvente. Neste modelo, o potencial aplicado e a concentração do *electrólito* influenciam a capacidade da dupla camada, variando a sua espessura.



**Esquema 1.7:** Esquema da transferência de electrão à superfície do eléctrodo: Passo 1 - Difusão; Passo 2 - Rearranjo da atmosfera iónica; Passo 3 - Reorientação das moléculas de solvente; Passo 4 - Transferência do electrão [31].

Em todas as abordagens electroquímicas, considera-se que para reações de oxidação o eléctrodo de trabalho funciona como aceitador de electrões, gerando uma corrente positiva, ou seja, uma corrente anódica,  $I_{pa}$  e para reações de redução, o eléctrodo de trabalho cede electrões, gerando uma corrente negativa, isto é, uma corrente catódica,  $I_{pc}$ .

### 1.4.1 MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS

A voltametria [31, 32] consiste na medição da corrente que flui através do eléctrodo de trabalho em função de um potencial aplicado. A aplicação de um potencial a um eléctrodo origina uma corrente faradaica,  $I_f$ , que está directamente relacionada com a transferência de carga, e uma corrente capacitiva  $I_c$ , que é necessária para organizar as moléculas e os iões presentes na dupla camada do eléctrodo. A corrente total registada é:

$$I_t = I_c + I_f$$

Nas técnicas voltamétricas, tanto a corrente que flui através do eléctrodo, como o potencial que é aplicado, variam com o tempo. O registo da corrente em função do potencial é traduzido por uma curva, designada por voltamograma e a variação do potencial ao longo do tempo designa-se por velocidade de varrimento,  $v$ .

As técnicas de voltametria mais usualmente utilizadas pelos investigadores são:

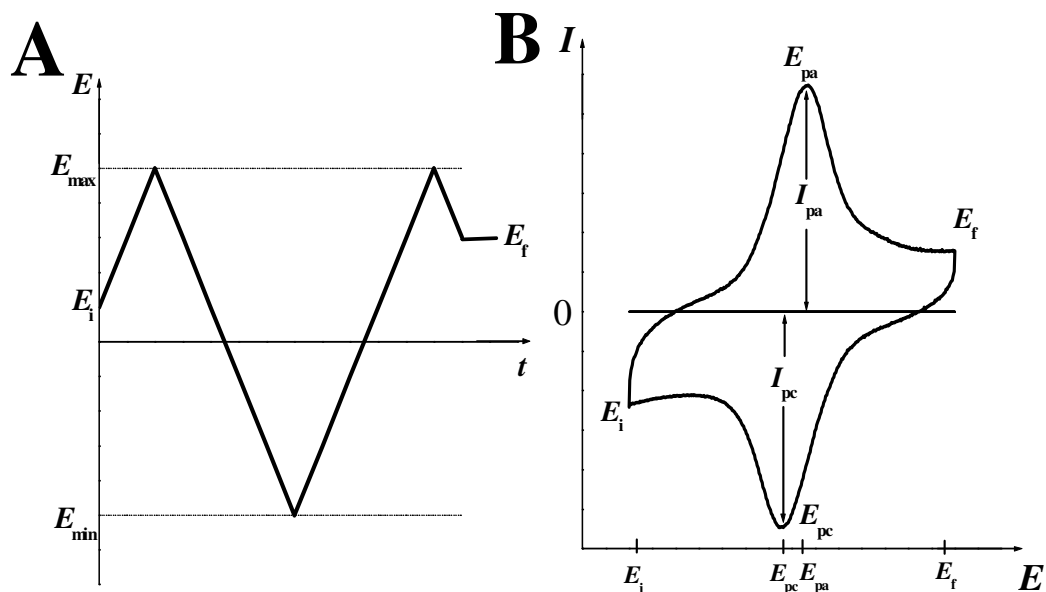
- a) Voltametria de varrimento de potencial - consiste na aplicação ao eléctrodo de trabalho de um potencial contínuo que varia com o tempo. Estas dividem-se em técnicas de varrimento linear e técnicas de varrimento cíclico, sendo esta última uma das técnicas utilizadas neste trabalho.
- b) Voltametria de degrau e impulso - consiste na aplicação ao eléctrodo de trabalho de um degrau de potencial ou de corrente que altera instantaneamente o sistema electroquímico e inclui a voltametria de impulso diferencial (DP) e de onda quadrada (SW).

#### ***1.4.1.1 Voltametria Cíclica***

A voltametria cíclica (CV de “Cyclic Voltammetry”) [31, 32] é uma técnica de varrimento cíclico de potencial que consiste na aplicação de um potencial linear que, após atingir um tempo  $t_1$  a um potencial  $E_{\max}$ , reverte o sentido até um potencial  $E_{\min}$  (daí o nome de “cíclica”), Fig. 1.8 (A). Deste modo, é capaz de gerar rapidamente uma nova espécie durante o varrimento e, em seguida, analisar a espécie gerada no varrimento em sentido contrário.

Os parâmetros importantes desta técnica são descritos abaixo e representados pela Fig. 1.8 (A):

- Potencial inicial,  $E_i$ ;
- Direção do varrimento inicial;
- Velocidade de varrimento,  $v$ ;
- Potencial máximo,  $E_{\max}$ ;
- Potencial mínimo,  $E_{\min}$ ;
- Potencial final,  $E_f$ .



**Figura 1.8:** Voltametria Cíclic. (A) Variação do potencial aplicado com o tempo; (B) Resposta típica para um sistema reversível [31].

A CV é muitas vezes a primeira técnica a ser utilizada em experiências electroquímicas devido à sua capacidade de fornecer rapidamente informação sobre a cinética e a natureza das reações de transferência de electrão. Concretamente, a voltametria cíclica oferece uma rápida localização dos potenciais redox da espécie electroativa e permite uma avaliação imediata do efeito do meio sobre o processo redox.

Uma corrente faradaica devido à reação de eléctrodo é registada na zona de aplicação do potencial onde a mesma ocorre, existindo também uma componente capacitiva uma vez que a carga da dupla camada varia. É de salientar que a corrente capacitiva aumenta com o aumento da velocidade de varrimento, pelo que é necessário subtraí-la.

Na Fig. 1.8 (B) está representado um voltamograma cíclico para um sistema reversível em que o produto da oxidação (ou redução) é posteriormente reduzido (ou oxidado) aquando da inversão do sentido do varrimento de potencial. Ao alcançar o potencial onde a reação de eléctrodo se inicia, a corrente sobe até um valor máximo, *corrente de pico*, até que o consumo das espécies electroativas faz com que a corrente decaia.

Os parâmetros importantes que permitem a caracterização do processo de eléctrodo do sistema em estudo e que estão representados no voltamograma cíclico da Fig. 1.8 (B) são:

- Potencial de pico anódico,  $E_{p,a}$ ;
- Potencial de pico catódico,  $E_{p,c}$ ;
- Intensidade máxima de corrente que resulta da reação de oxidação ou pico de corrente anódica,  $I_{p,a}$ ;
- Intensidade máxima de corrente que resulta da reação de redução ou pico de corrente catódica,  $I_{p,c}$ .

As correntes de pico têm uma relação de proporcionalidade com a velocidade da reação de transferência de carga e com a concentração em solução da espécie que sofre essa reação.

Para que um processo seja reversível por voltametria cíclica, é necessário que obedeça a específicas condições. Caso isso não se verifique, o processo é considerado irreversível ou quasireversível, Tabela 1.1.

**Tabela 1.1:** Condições necessárias para diagnosticar a reversibilidade de um processo de transferência de carga por CV.

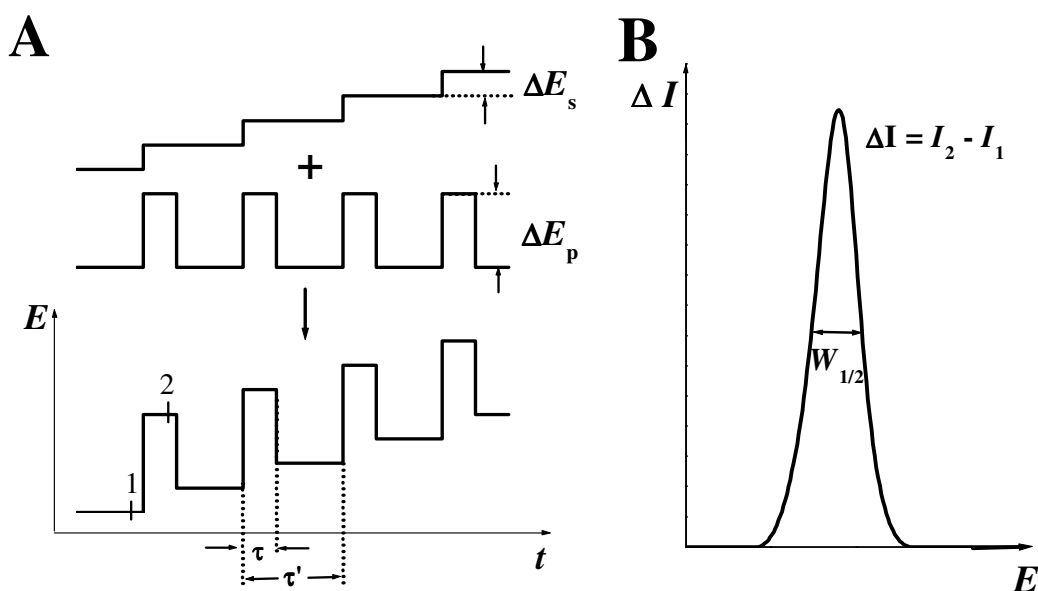
Condições para processos reversíveis	Condições para processos irreversíveis
$E_p$ independente de $v$	$E_p$ dependente de $v$
$ I_{pa} / I_{pc}  = 1$	$ I_{pa} / I_{pc}  \neq 1$
$E_{pa} - E_{pc} = 57 / n \text{ mV}$	$ \partial E_{pa} / \partial \log v  = 29,6 / \alpha n \text{ mV}$
$I_p \propto v^{1/2}$	

A extensão da irreversibilidade aumenta com o aumento da velocidade de varrimento, verificando-se ao mesmo tempo uma diminuição da corrente do pico relativa ao caso reversível e uma separação crescente entre picos anódicos e catódicos. Nestes sistemas, apenas a oxidação ou a redução correspondentes à direção do varrimento inicial aparecem, uma vez que o produto não sofre oxidação/redução não havendo, assim, pico no varrimento inverso.

### 1.4.1.2 Voltametria de Impulso Diferencial

As técnicas de impulso de potencial aplicado ao sistema vieram introduzir à electroquímica a vantagem de diminuir o efeito da corrente capacitiva, já que esta decai exponencialmente em resposta a esses mesmos potenciais, fazendo com que a corrente faradaica decaia mais lentamente. Deste modo, é possível diminuir o efeito da corrente capacitiva na corrente total.

A técnica de voltametria de impulso diferencial (DP de “Differential Pulse Voltammetry”) [31, 32] consiste na aplicação de sucessivos degraus de potencial (impulsos) com a mesma intensidade ao sistema electroquímico, sobre um potencial base que vai aumentando ao longo do tempo (incrementos de  $\Delta E_s$ ), registando-se a corrente imediatamente antes ( $I_1$ ) e após ( $I_2$ ) o pulso, Fig. 1.9 (A). O tempo  $\tau$  durante o qual o impulso de potencial é aplicado, define a largura do impulso. O tempo  $\tau'$  é o intervalo entre duas aplicações sucessivas de impulso e determina, conjuntamente com o valor de  $\Delta E_s$ , a velocidade de varrimento  $v = \tau \Delta E_s$ . Para a voltametria de DP, a velocidade de varrimento varia entre 1 a 10  $\text{mV s}^{-1}$ ,



**Figura 1.9:** Voltametria de DP. (A) Esquema da aplicação dos sucessivos potenciais; (B) Resposta típica do sistema [31].

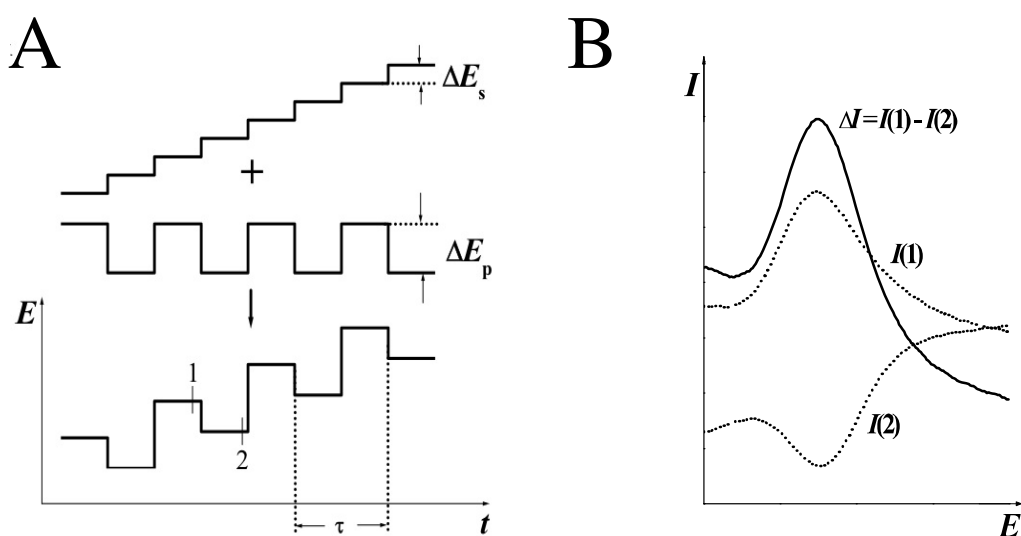
A resposta a esta aplicação de impulsos resulta na formação de um pico, Fig. 1.9 (B), com um potencial específico ao qual a espécie se oxida, sendo possível detetar baixas concentrações do analito. Com o aumento da irreversibilidade, a largura do pico aumenta e a sua altura diminui.

Uma vez que o potencial é uniforme, ou se mede a oxidação ou a redução, ao contrário do que acontece na voltametria cíclica, sendo possível calcular o número de electrões envolvidos na reacção, pela largura a meia altura do pico ( $W_{1/2}$ ) pela equação:

$$W_{1/2} = 90 / n \text{ mV}$$

### 1.4.1.3 Voltametria de Onda Quadrada

A técnica de voltametria de onda quadrada (SW de “Square Wave Voltammetry”) [32, 32] consiste na sobreposição de uma onda quadrada de amplitude de impulso  $\Delta E_p$  a degraus de potencial de amplitude  $\Delta E_s$  e com um período  $\tau$ . A medição da corrente é feita no fim do pulso positivo (direto),  $I_1$  ou  $I_f$ , e imediatamente antes da aplicação do novo pulso (ou seja, no fim do pulso negativo/inverso)  $I_2$  ou  $I_b$ , Fig. 1.10 (A).



**Figura 1.10:** Voltametria de SW. (A) Esquema da aplicação de potenciais; (B) Resposta típica do sistema [31].



A resposta a esta aplicação de impulsos resulta na formação de um pico, Fig. 1.10 (B) bastante idêntico ao obtido para voltametria de DP. Esta corrente total é positiva uma vez que a diferença entre as correntes é positiva (corrente de oxidação – corrente de redução). É possível, assim, obter na mesma experiência as correntes dos dois processos indicando sobre a reversibilidade do processo (caso seja irreversível, não se observa pico na corrente inversa  $I_2$ ). De facto, quando numa experiência electroquímica se quer comprovar a reversibilidade da reação, a técnica executada é por voltametria de SW.

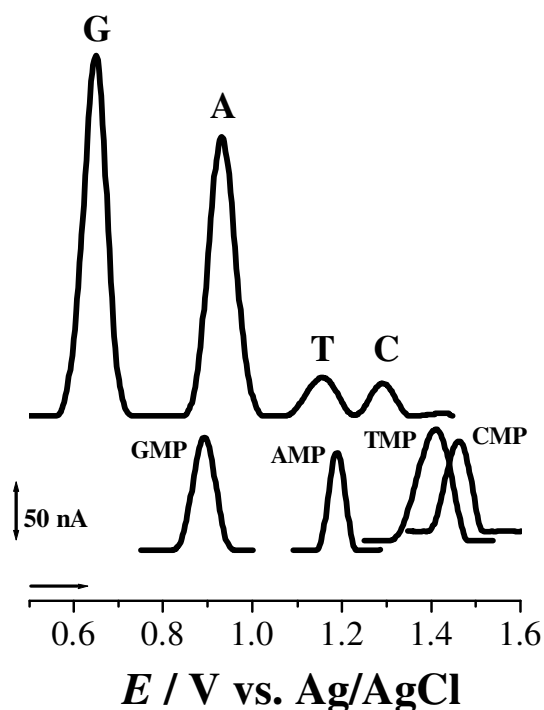
A voltametria de SW apresenta inúmeras vantagens relativamente às restantes: é bastante mais sensível e rápida, permitindo velocidades de varrimento até  $1 \text{ V s}^{-1}$ , fazendo com que o consumo das espécies electroativas seja menor, impedindo o bloqueio da superfície do eléctrodo. Para além disso, como a corrente total resulta da diferença das correntes direta e inversa, não há necessidade de desoxigenar as amostras para estudar reações de redução, em que o oxigénio é um problema devido à sua reação catódica.

## 1.5 COMPORTAMENTO ELECTROQUÍMICO DO DNA

O DNA tem sido alvo de inúmeros estudos aplicados em áreas bastante diversificadas, cada uma com as suas técnicas e vantagens. Conhecer os mecanismos moleculares de interação entre compostos anticancerígenos e o DNA, tem sido um trabalho extensamente desenvolvido uma vez que a maioria dos compostos utilizados contra o cancro, interagem com o DNA. A electroquímica tem-se revelado uma técnica bastante útil neste tipo de estudos, uma vez que tira partido das deteção rápida e sensível das técnicas voltamétricas de DP e SW. Para além disto, permite a criação de espécies reativas à superfície do eléctrodo, detetando danos na molécula de DNA. Contudo, antes de se proceder a este tipo de estudos, é imperativo que se conheça o comportamento do DNA à superfície do eléctrodo.

## 1.5.1 ELECTROXIDAÇÃO DO DNA

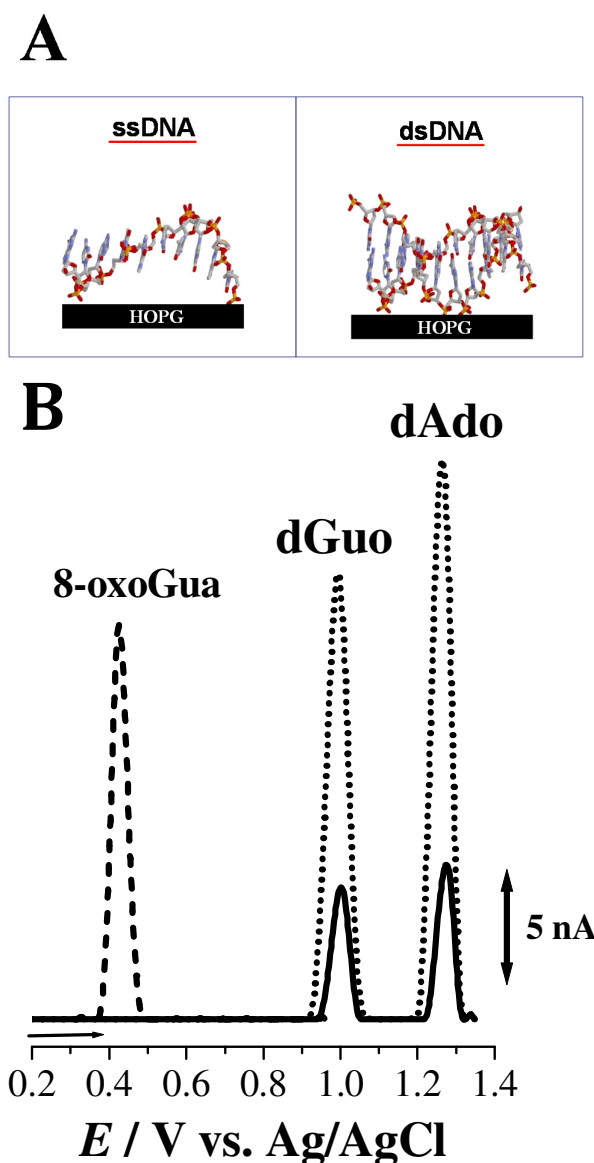
Os eléctrodos de carbono como o carbono vítreo, têm uma escala de potencial bastante larga especialmente para valores de potencial positivos o que permite a detecção de danos no DNA. As bases do DNA são os únicos componentes da molécula que sofrem oxidação nessa janela de potencial [33] e, por isso, os picos obtidos dizem respeito à sua electroxidação, seguindo um processo dependente de pH. Tanto as pirimidinas como as purinas são oxidadas, contudo a detecção das primeiras é dificultada devido ao facto de o seu potencial cair perto do potencial de oxidação do oxigénio. Assim, para uma concentração equimolar de bases isoladas em solução aquosa, a intensidade dos picos da timina e da citosina são bem mais pequenos, Fig. 1.11, [3].



**Figura 1.11:** Voltamogramas de DP com linha de base corrigida obtidos com um eléctrodo de carbono vítreo para soluções em tampão fosfato 0,1 M pH = 7,4 de uma mistura equimolar de guanina (G), adenina (A), timina (T), e citosina (C) de 20  $\mu$ M; guanosina-5-monofosfato (GMP) 20  $\mu$ M; adenosina-5-monofosfato (AMP) 20  $\mu$ M; timidina-5-monofosfato (TMP) 500  $\mu$ M e citidina-5-monofosfato (CMP) 500  $\mu$ M [3].

De salientar que a guanina é a base mais facilmente oxidável, daí o seu potencial de oxidação ser inferior relativamente às restantes. Comparando as bases isoladas com os respetivos nucleótidos GMP, AMP, TMP e CMP, Fig. 1.11, pode verificar-se um

desvio de ~ 200 mV para potenciais mais positivos, muito provavelmente devido ao efeito indutivo causado pela ligação glicosídica entre a desoxirribose e os anéis das bases, dificultando a remoção dos seus electrões. Para além disto, também há uma alteração de corrente devido à presença da desoxirribose e do grupo fosfato que fazem com que a molécula seja maior, dificultando a difusão até à superfície do eléctrodo (menor coeficiente de difusão).



**Figura 1.12:** (A) Representação esquemática para o ssDNA e o dsDNA immobilizados na superfície de um eléctrodo de grafite pirrolítica altamente orientada (HOPG); (B) Voltamograma de DP com linha de base corrigida obtido com um eléctrodo de carbono vítreo para soluções em tampão 0,1 M acetato pH = 4,44 para (---) 5  $\mu$ M 8-oxoG, (•••) ssDNA e (—) dsDNA 60  $\mu$ g/mL [3].

Como descrito anteriormente, a molécula de DNA é complexa e por isso é necessário ter em conta a sua estrutura quando se faz uma análise electroquímica. A electrooxidação do DNA em dupla hélice por voltametria de DP em eléctrodos de carbono vítreo origina, em solução a  $\text{pH} = 4,44$ , dois picos bem separados e definidos relativos à oxidação das bases situadas dentro da cadeia, isto é, respetivamente a guanosina (dGuo) a um potencial inferior (+ 0,84 V) e a adenosina (dAdo) a um potencial superior (+ 1,15 V), Fig. 1.12 (B). Devido ao facto de as correntes das pirimidinas serem bastante reduzidas, a sua oxidação não é detetada. Comparando os dados obtidos para a dsDNA e para o DNA em cadeia simples (ssDNA), verifica-se que há uma diferença na intensidade da corrente dos picos. A dificuldade na transferência dos electrões é maior para o dsDNA uma vez que a sua estrutura é mais rígida e as bases encontram-se no interior da hélice, ao contrário do que acontece para o ssDNA que tem a sua estrutura mais flexível e as bases disponíveis para reagirem com a superfície do eléctrodo, Fig. 1.12 (A). É possível, assim, por voltametria identificar se houve ou não alteração da estrutura do DNA.

### 1.5.2 BIOSSENSORES ELECTROQUÍMICOS DE DNA

Uma vez que em solução é mais difícil de obter sinal e de modo a evitar também falsas interpretações de resultados caso a amostra sofra oxidação nos mesmos potenciais que o DNA, foram desenvolvidos biossensores electroquímicos com DNA. Um biossensor electroquímico de DNA consiste num transdutor electroquímico (eléctrodo), incorporando moléculas de DNA à superfície do eléctrodo como elemento de reconhecimento molecular, com o objetivo de detetar processos específicos de ligação ao DNA. Deste modo, se houver interação entre o DNA e o composto, vai ser possível observar o aparecimento de novos sinais electroquímicos ou alteração dos sinais electroquímicos característicos do DNA. É, assim, necessário um estudo electroquímico prévio da amostra nas mesmas condições em que o biossensor foi construído, para obter uma correta interpretação dos resultados [34].

O factor mais importante na construção de biossensores electroquímicos de DNA é a sua imobilização à superfície do eléctrodo. Sendo o DNA um polianião hidrofílico, o pH usualmente utilizado nas leituras situa-se entre  $4,5 < \text{pH} < 5,5$  uma vez que a estes valores ocorre protonação dos grupos fosfato permitindo, assim, que a imobilização seja mais forte na superfície do eléctrodo de carbono de carácter

hidrofóbico, conduzindo a um melhor sinal electroquímico. Contudo, quanto menor o valor de pH maior o valor dos potenciais aos quais as bases vão sofrer oxidação dificultando, assim, a deteção das pirimidinas. Deste modo, quando se pretende acompanhar processos fisiológicos, o valor de pH que é utilizado é de 7,4 [33]. Existem diferentes procedimentos na construção dos biossensores, dependendo do que queremos analisar e estudar e das interferências do sistema [3]: biossensor electroquímico de dsDNA de camada fina, de multicamada e de camada espessa.

A interação entre o DNA e a superfície do eléctrodo é mais forte e estável quando um potencial é aplicado durante a adsorção, como acontece para o biossensor de dsDNA camada fina, contudo o eléctrodo não fica totalmente coberto com DNA permitindo a difusão de moléculas da solução para a sua superfície podendo originar interações não específicas e respetivos sinais electroquímicos. Já o biossensor de multicamada é completamente coberto pelo dsDNA, impossibilitando a ligação de moléculas com a superfície do eléctrodo, dando origem a apenas um sinal electroquímico correspondente à interação em estudo. A grande vantagem deste último em relação ao biossensor de camada espessa é que o tempo de preparação é muito menor.

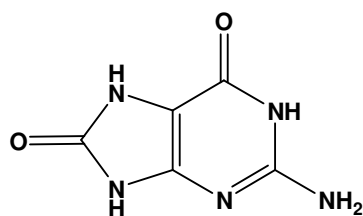
Os biossensores de DNA por deteção electroquímica constituem, assim, uma nova era de instrumentação na deteção de alterações na estrutura do DNA. Permitem a preconcentração de fármacos que se pretendem estudar na superfície do eléctrodo, gerando radicais *in situ* capazes de danificar o DNA imobilizado, por deteção electroquímica. São capazes também de detetar danos pela ação de poluentes, de patogéneos e de agentes carcinogéneos químicos.

### **1.5.3 DANOS OXIDATIVOS NO DNA**

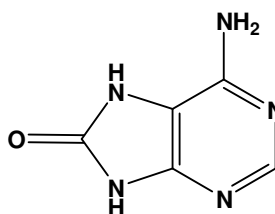
O DNA está constantemente exposto a compostos ou moléculas com as quais estabelece interações específicas ou não específicas, apesar de se situar protegido no núcleo. Estas interações podem ser de três tipos [34]: 1) interações electrostáticas, que são não específicas e que consistem na ligação à zona exterior da cadeia; 2) ligação às fendas da dupla hélice, com interação direta entre o composto e as bases do DNA; 3) intercalação, por inserção dos compostos entre as bases azotadas, desenrolando e separando a dupla hélice do DNA. É possível, ainda, que ocorra depurinação da

cadeia por oxidação do carbono C<sub>1</sub>' do açúcar. Estas interações podem ser reversíveis ou irreversíveis dependendo da molécula em questão. As duas últimas podem ser estabelecidas entre compostos reativos, como é o caso das espécies reativas de oxigénio e de nitrogénio, levando a alterações no modo como a informação genética é lida. Se os mecanismos de reparação do DNA não estiverem funcionais, esses danos oxidativos podem levar à morte programada da célula e à replicação da molécula com erros na sequência, originando instabilidade genética. Esta instabilidade genética pode levar à proliferação celular descontrolada, originando células tumorais com consequente mal formação dos tecidos. É, por isso, importante conhecer o resultado da ação de compostos que exerçam este tipo de danos de modo a tentar impedir alterações na estrutura do DNA, já que os danos oxidativos são a maior fonte de mutações nos organismos vivos.

O produto de oxidação do DNA mais comum é a 8-oxoguanina (8-oxoGua), Esquema 1.8, que resulta da oxidação no carbono C<sub>8</sub>' da guanina. No ciclo replicativo seguinte, a enzima que amplifica a cadeia de DNA, a DNA polimerase, lê a 8-oxoGua como se fosse uma timina, emparelhando-a com a adenina, levando à substituição do par G:C pelo par T:A nos seguintes ciclos, originando mutações pontuais caso os mecanismos de reparação não estejam ativos. A 8-oxoGua é utilizada como um biomarcador de stress oxidativo e de lesões oxidativas no DNA, tendo sido possível observar níveis elevados da mesma em pacientes cancerígenos, com diabetes e até mesmo com doenças neurodegenerativas. A 8-oxoGua é o produto de oxidação do DNA mais detetado por ser mais facilmente oxidável. Apesar da oxidação das restantes bases ser mais difícil devido aos seus elevados potenciais de oxidação, também é possível observar, por vezes, o produto de oxidação da adenina, a 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA), Esquema 1.18.



**8-OxoGua**



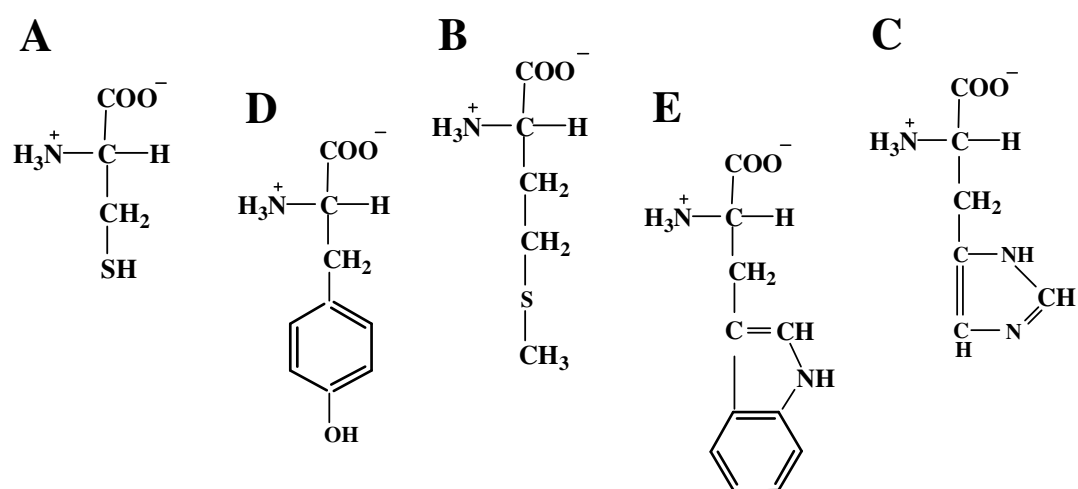
**2,8-OxoAde**

**Esquema 1.8:** Produtos de oxidação das bases Guanina e Adenina, 8-OxoGuanina e 2,8-Dihidroxiadenina (2,8-OxoAdenina), respetivamente.

A 8-oxoGua e a 2,8-DHA ocorrem a um potencial mais baixo que as bases do DNA, sem sobreposição de sinal, permitindo identificar com clareza se houve ou não dano oxidativo, Fig. 1.13 (B). Para além de todas as vantagens que as técnicas electroquímicas providenciam como tem sido referido ao longo desta introdução, é de salientar que existe uma grande melhoria na relação sinal-ruído em relação às técnicas de estado estacionário e em muitos casos, uma maior seletividade. Deste modo, torna-se uma técnica preferencial na deteção de danos oxidativos.

## 1.6 COMPORTAMENTO ELECTROQUÍMICO DOS AMINOÁCIDOS

Numa célula existem centenas de proteínas a desempenhar funções biológicas diferentes, o que é justificado pela sua complexidade estrutural. Comparativamente com o DNA, a análise proteica de uma amostra exige processos metuculosos que consigam alcançar o tamanho das ligações entre os átomos das cadeias polipeptídicas. Métodos como a Difração de Raios X e a Ressonância Magnética Nuclear, vieram permitir o conhecimento da multiplicidade de funções e propriedades físico-químicas das proteínas. Contudo, nem sempre é necessário recorrer a técnicas demasiado dispendiosas e de análise morosa para acompanhar a interação preliminar entre uma proteína e um analito.



**Esquema 1.9:** Estrutura dos cinco aminoácidos electroativos: (A) Cisteína; (B) Metionina; (C) Histidina; (D) Tirosina; (E) Triptofano.

A aplicação das técnicas electroquímicas à análise proteica tem tirado partido do facto de existirem metaloproteínas com centros redox ativos, isto é, com centro metálicos capazes de interagirem com os eléctrodos e realizarem troca de electrões. Contudo, nem todos os processos biológicos envolvem as metaloproteínas e, por isso, é necessário estudar extensivamente a melhor maneira de detetar electroquimicamente as restantes proteínas.

Estudos electroquímicos de análise de proteínas já foram desenvolvidos com eléctrodos de mercúrio e eléctrodos de diamante dopados com boro. Muito recentemente [36-39], foram determinados os mecanismos de oxidação para os aminoácidos electroativos à superfície do eléctrodo de carbono vítreo. Dos aminoácidos conhecidos, apenas cinco deles são oxidáveis à superfície do eléctrodo: metionina, cisteína, histidina, triptofano e tirosina, Esquema 1.9.

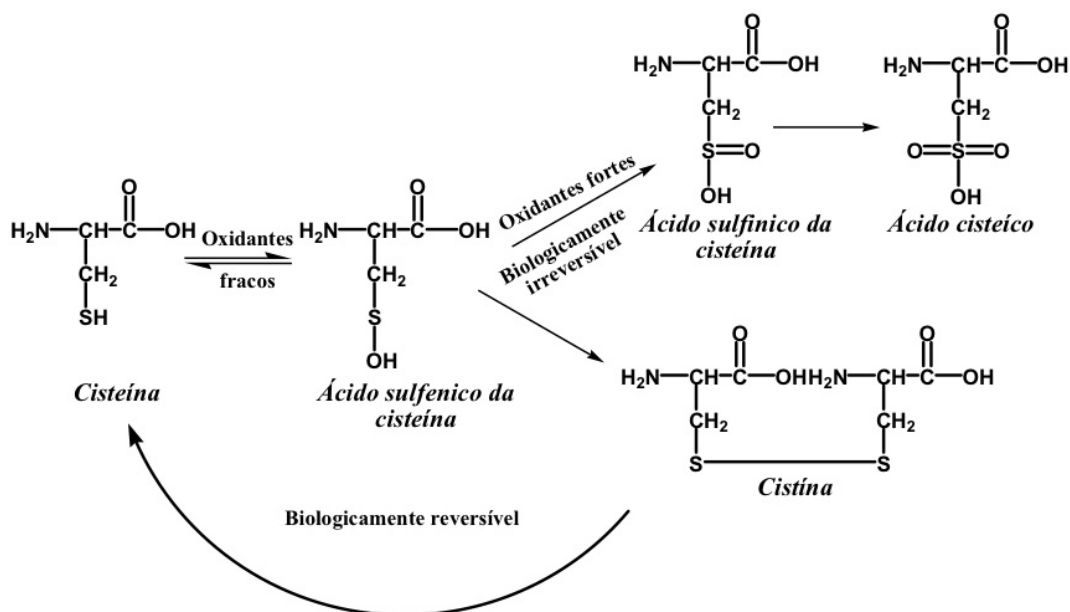
### **1.6.1 MECANISMO DE OXIDAÇÃO DA CISTEÍNA E DA METIONINA**

A cisteína (Cys) é o aminoácido constituinte das proteínas responsável pela sua conformação e pela manutenção das estruturas secundária e terciária, uma vez que tem na sua composição grupos tiol (-SH), Esquema 1.9, que formam ligações dissulfeto inter e intramoleculares. Estas ligações são altamente estáveis e fortes e, por esta razão, numa análise de proteómica ou em técnicas bioquímicas como o Westernblot, é necessário tratar a amostra proteica com agentes que as quebrem de modo a permitir o estudo das suas unidades estruturais. Os agentes redutores são os responsáveis por quebrar essas ligações covalentes. O  $\beta$ -mercaptoetanol tem sido a primeira escolha, mas por formar adutos com os resíduos de cisteína, a toxicidade associada ao seu uso é elevada. Assim, novos agentes redutores têm sido utilizados, como é o caso do ditioneitol (DTT) e da tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP).

A função da metionina (Met) ainda não é totalmente conhecida, embora se pense que seja responsável pelo stress oxidativo ocorrente em pacientes de Alzheimer [35].

Ambos os aminoácidos têm na sua composição um grupo de enxofre (S) com vários estados de oxidação, o que faz com que produzam uma variedade imensa de produtos. A oxidação biológica da cisteína já é conhecida, Esquema 1.10, bem como a sua resposta voltamétrica, em solução [37].

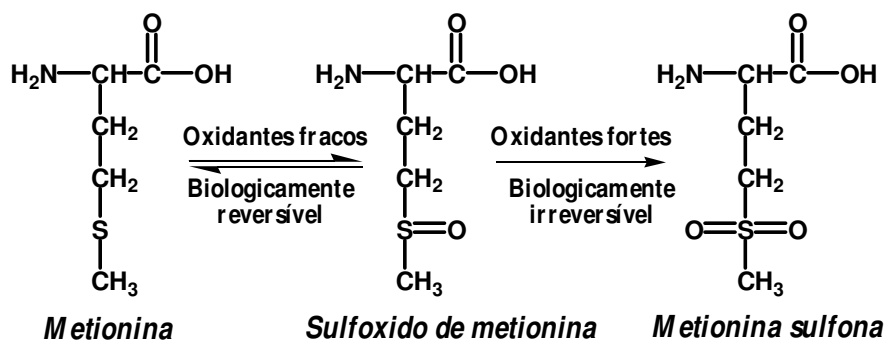




**Esquema 1.10:** Oxidação biológica da cisteína [36].

A cisteína sofre três reações de oxidação consecutivas à superfície do eléctrodo:

1. Oxidação do grupo tiol e formação de um radical que sofre ataque nucleofílico por parte da água, originando um intermediário de reação;
2. Este intermediário é oxidado a ácido cisteico ou,
3. O radical forma uma ponte dissulfeto entre duas moléculas de cisteína. Neste caso, a oxidação ocorre a um potencial bastante superior devido ao facto de a ponte dissulfeto ser uma ligação covalente, tornando mais difícil a retirada de electrões.

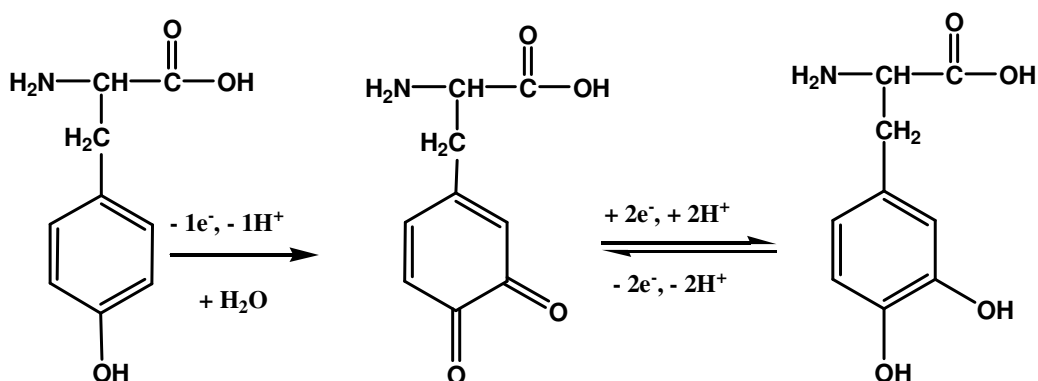


**Esquema 1.11:** Oxidação biológica da metionina [36].

A oxidação biológica da metionina também já é conhecida, Esquema 1.11, e a sua resposta voltamétrica à superfície do eléctrodo de carbono vítreo foi igualmente investigada [36].

## 1.6.2 MECANISMO DE OXIDAÇÃO DA TIROSINA

A tirosina (Tyr) é um aminoácido existente em muitos receptores membranares e que ao sofrer fosforilação no grupo hidroxilo, altera a função dessa proteína. É, assim, responsável pela transdução de sinais no interior das células. Para além disso, é precursor de catecolaminas como a dopamina, responsável pela doença de Parkinson. É constituída por um grupo fenol e a sua oxidação electroquímica é semelhante à oxidação dos derivados de fenol *para*-substituídos [37], Esquema 1.12.



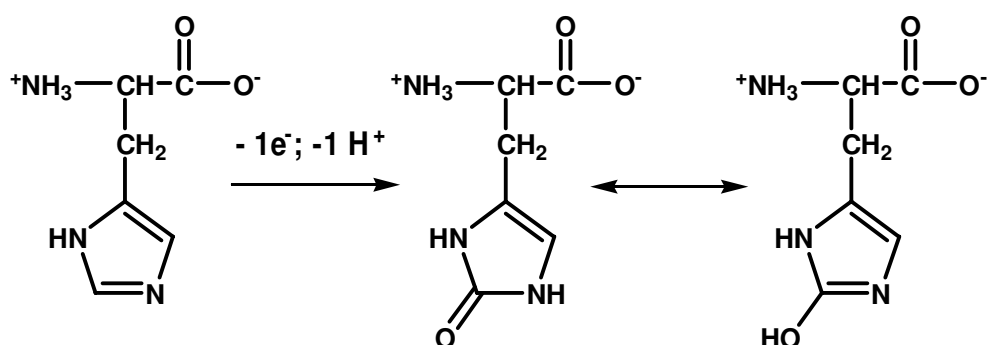
Esquema 1.12: Mecanismo de oxidação da tirosina [37].

O processo de oxidação da tirosina consiste na transferência de um electrão, seguido pela desprotonação do grupo hidroxilo, que leva à produção de um radical fenóxido estabilizado pelo ataque nucleofílico da água, e à formação de um produto de oxidação que, por sua vez, oxida reversivelmente.

### 1.6.3 MECANISMO DE OXIDAÇÃO DA HISTIDINA

A histidina (His) é o aminoácido com mais relevância quando se analisam metaloproteínas, uma vez que na sua estrutura existe um anel imidazol capaz de coordenar os centros metálicos. Do mesmo modo, encontra-se habitualmente envolvida na atividade catalítica das enzimas.

Sobre o mecanismo de oxidação de compostos com anéis imidazóis pouco se sabe, mas muito recentemente [38] foi proposto um mecanismo de reação para a histidina, Esquema 1.13.



Esquema 1.13: Mecanismo de oxidação da histidina [39].

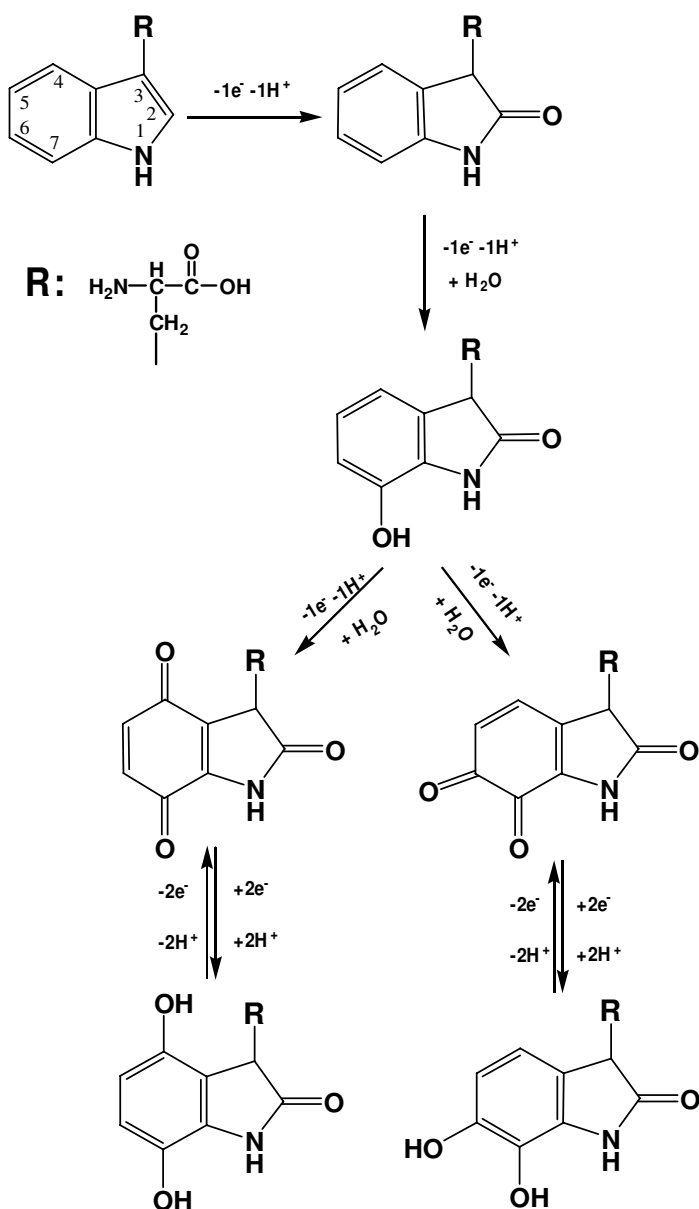
Verificou-se que a oxidação do grupo imidazol só ocorre no intervalo  $6 < \text{pH} < 9$ . A estes valores, o grupo carboxilo da histidina ( $\text{pK}_a = 1,82$ ) está desprotonado, enquanto que o grupo amina ( $\text{pK}_a = 9,17$ ) se encontra protonado e o anel imidazol ( $\text{pK}_a = 6,0$ ) neutro. O mecanismo de oxidação envolve a transferência de um electrão e um protão, com a formação de um radical instável existente em três formas isoméricas e que é estabilizado pelo ataque nucleofílico da água. Verificou-se que o isómero mais estável envolve a posição C2, pelo que o produto formado é a 2-oxohistidina.

### 1.6.4 MECANISMO DE OXIDAÇÃO DO TRIPTOFANO

O triptofano (Trp) é um aminoácido que, tal como a tirosina, é precursor de um neurotransmissor, neste caso da serotonina. Na sua estrutura, tem um anel aromático indólico como grupo R lateral. Um indol é um composto orgânico

aromático heterocíclico com uma estrutura bicíclica consistindo num anel benzênico e pirrólico, como se pode observar pelo Esquema 1.9.

Conhecendo o mecanismo de oxidação de compostos indólicos substituídos, na posição C3, foi possível deduzir o mecanismo de oxidação do triptofano [39], por electroquímica, Esquema 1.14.



Esquema 1.14: Mecanismo de oxidação do triptofano [39].

Deste modo, a primeira etapa de oxidação corresponde à oxidação do C<sub>2</sub> do anel pirrólico com formação da espécie 2-oxi-indol, seguida pela oxidação do anel de benzeno com a formação de um radical. A estabilização deste radical é conseguida por ataque nucleofílico da água, levando à hidroxilação do carbono C<sub>7</sub> do grupo indol do triptofano e à formação de produtos electroativos [39].

O conhecimento dos processos de oxidação e respetivos potenciais destes aminoácidos electroativos, torna-se uma ferramenta importante para quem pretende estudar o comportamento electroquímico de proteínas à superfície de eléctrodos. Na Tabela 1.2, encontram-se os potenciais dos aminoácidos electroativos a pH fisiológico [38]:

**Tabela 1.2** - Potenciais de oxidação dos aminoácidos electroativos, a pH = 7,0.

<b>Potenciais de oxidação pH = 7,0</b>	
<b>Tirosina (Tyr)</b>	0,65 V
<b>Triptofano (Trp)</b>	0,65 V, 1,05 V
<b>Histidina (His)</b>	1,15 V
<b>Cisteína (Cys)</b>	0,5 V, 0,9 V, 1,25 V
<b>Metionina (Met)</b>	1,35 V

## 1.7 OBJETIVOS DO PRESENTE TRABALHO

O rituximab tem sido utilizado em conjunto com outros regimes no tratamento de diversas condições patológicas. A sua grande mais valia advém do facto de ser um mAb, isto é, de ser direccionado única e exclusivamente para um receptor específico, neste caso, para o CD20. Nos primeiros anos de administração, não se verificaram grandes efeitos adversos à sua utilização. Contudo, hoje em dia, após a primeira dose do fármaco, são necessários cuidados acrescidos uma vez que a ocorrência de infeções graves é muito frequente. Deste modo, cresce o interesse em analisar outros possíveis alvos de ação por parte do rituximab.

O grande desafio na execução desta tese centra-se no facto de os estudos na área da electroquímica se encontrarem em expansão e de não existir qualquer estudo de interação que inclua o RTX. A comunidade científica tem-se debruçado nesta área, uma vez que as técnicas electroquímicas proporcionam o conhecimento dos mecanismos de reação das moléculas facilitando, assim, a descoberta de novos alvos de interação. Deste modo, as metas deste trabalho foram:

- 1.** Conhecer o comportamento electroquímico do Rituximab à superfície de um eléctrodo de carbono vítreo por voltametria de DP;
  - 1.1.** Estudo voltamétrico do RTX na sua forma nativa;
  - 1.2.** Estudo voltamétrico do RTX na sua forma reduzida/desnaturada, após adição de agentes redutores e desnaturantes;
    - 1.2.1.** Estudo dos mecanismos de oxidação, em solução aquosa, dos agentes redutores DTT e TCEP por voltametria cíclica, de DP e SW.
- 2.** Verificar a existência de interações entre o RTX e o dsDNA em solução e utilizando biossensores electroquímicos de DNA, por voltametria de DP.

# *CAPÍTULO 2*

---

EXPERIMENTAL

## 2.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Nenhum dos compostos utilizados experimentalmente sofreu qualquer purificação adicional. As soluções mãe de cada um e todas as soluções tampão foram preparadas em água purificada (condutividade  $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$ ) pelo sistema Millipore Milli-Q System, Millipore S.A., Molsheim, França. As concentrações específicas utilizadas durante as medidas voltamétricas, estão referidas ao longo dos capítulos que se seguem e foram obtidas na célula electroquímica após diluição do composto com o electrólito desejado. Estas diluições e todos os procedimentos que tenham envolvido a transferência de volumes, foram realizados com pipetas ajustáveis Pipetman P1000, P200 e P20 da Gilson S.A., Villiers-le-Bel, França, e respetivas pontas D1000, D200 e D10 EcoPack. Todas as medidas experimentais foram efectuadas à temperatura ambiente de  $25 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A solução de Rituximab (MabThera<sup>®</sup>) foi gentilmente cedida pelos Serviços Farmacêuticos do Hospital Universitário de Coimbra (H.U.C) e provém da Roche.

As fibras de dsDNA foram adquiridas à Sigma-Aldrich e têm de ser sempre armazenadas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . São provenientes do timo de vitela (*calf thymus*) tipo I (altamente polimerizado) e têm um peso molecular de 10 - 15 milhões de daltons por frasco de 1 g. A sua concentração foi determinada por espectrofotometria sabendo que 1u (unidade de absorvância) para o comprimento de onda de 260 nm (A260nm) corresponde a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  dsDNA.

O tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) foi adquirido à Sigma-Aldrich.

A solução de ditiotreitol (DTT) 1 M foi igualmente adquirida à Sigma-Aldrich. Apesar de ser estável a temperatura ambiente, o seu manuseamento tem de ser realizado dentro da hotte, devido ao seu odor. Foi preparada uma solução stock de 0,2 M, mantida à temperatura ambiente, no interior da hotte.

O dodecil sulfacto de sódio (SDS) foi adquirido à Sigma-Aldrich e tem de ser armazenado à temperatura ambiente, uma vez que sofre hidrólise a temperaturas elevadas.

As soluções mãe de rituximab e de TCEP foram armazenadas no frigorífico a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , enquanto que o SDS e o DTT foram armazenadas à temperatura ambiente.



Nas Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3, encontram-se as soluções tampão de electrólito de suporte a diferentes pH que foram utilizadas nas experiências, a partir de reagentes de pureza analítica.

**Tabela 2.1** - Composição das soluções de electrólito de suporte.

<b>Electrólitos de Suporte</b>			<b>pH</b>
<b>Diluição para 100 mL</b>			
0,2 M KCl (25,0 mL)	+	0,2 M HCl (42,5 mL)	<b>1,2</b>
0,2 M KCl (25,0 mL)	+	0,2 M HCl (6,5 mL)	<b>2,02</b>
0,2 M NaAcO (3,7 mL)	+	0,2 M Haco (46,3 mL)	<b>3,4</b>
0,2 M NaAcO (13,2 mL)	+	0,2 M Haco (36,8 mL)	<b>4,3</b>
0,2 M NaAcO (41,2 mL)	+	0,2 M Haco (8,8 mL)	<b>5,4</b>
0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (6,15 mL)	+	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (43,85 mL)	<b>6,08</b>
0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (30,5 mL)	+	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (19,5 mL)	<b>6,9</b>
0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (47,35 mL)	+	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (2,65 mL)	<b>8,05</b>
0,025 M Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> ·10H <sub>2</sub> O (50 mL)	+	0,1 M NaOH (3,0 mL)	<b>9,25</b>
0,2 M KCl (25,0 mL)	+	0,2 M NaOH (6,0 mL)	<b>12,04</b>
0,2 M KCl (25,0 mL)	+	0,2 M NaOH (42,0 mL)	<b>12,85</b>

**Tabela 2.2**- Composição das soluções de electrólito de suporte.

	<b>pH</b>	
	<b>10,2</b>	<b>11,2</b>
<b>0,025 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O</b>	25,0 mL	-
<b>0,05 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	-	25,0 mL
<b>0,1 M NaOH</b>	10,25 mL	3,15 mL

**Tabela 2.3** - Composição das soluções de electrólito de suporte.

	<b>pH</b>				
	<b>8,0</b>	<b>8,7</b>	<b>9,3</b>	<b>10,3</b>	<b>12,3</b>
<b>0,1 M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	95,0 mL	75,0 mL	-	-	-
<b>0,1 M Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O</b>	5,0 mL	25,0 mL	100,0 mL	12,5 mL	12,5 mL
<b>0,1 M NaOH</b>	-	-	-	24,75 mL	35,0 mL
<b>H<sub>2</sub>O</b>	-	-	-	62,75 mL	52,5 mL

Todos os gráficos e figuras de voltamogramas, foram efectuadas utilizando o software ORIGIN versão 6.0 da Microcal Software, Inc., (E.U.A.).

Os esquemas das estruturas moleculares aqui representadas, foram realizadas com o programa ChemDraw Ultra versão 8.0 (CambridgeSoft Corporation, E.U.A)

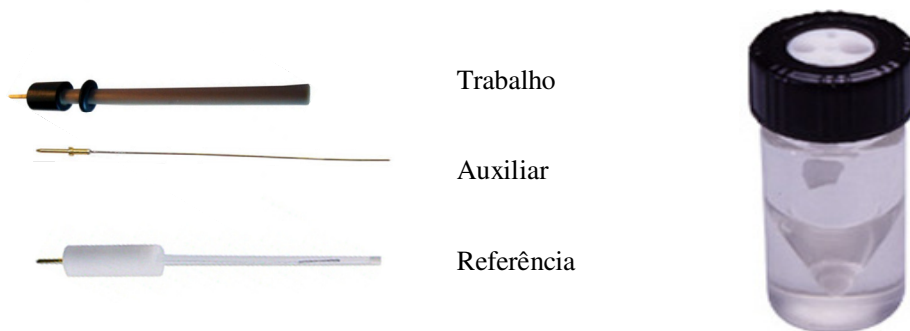
## 2.2 INSTRUMENTAÇÃO

O procedimento experimental foi levado a cabo num potenciostato,  $\mu$ Autolab tipo III, da Autolab Electrochemical Instruments, Fig. 2.1, com o software GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4.9, da Echo-Chemie (Utrecht, Holanda) para tratamento dos dados.



**Figura 2.1:** Imagem dos aparelhos  $\mu$ Autolab tipo III.

Os ensaios voltamétricos foram realizados numa célula electroquímica com um único compartimento de volume máximo de 2 mL, Fig. 2.2, onde foram mergulhados todos os eléctrodos necessários para o desenrolar das experiências: eléctrodo de trabalho de carbono vítreo (GCE) com diâmetro de  $\Phi = 1,5$  mm, eléctrodo de referência de Ag/AgCl (KCl 3 M) e eléctrodo auxiliar de platina.



**Figura 2.2:** Imagem dos eléctrodos e da célula electroquímica intervenientes no procedimento experimental.

As medições dos valores de pH das soluções foram efectuadas utilizando o medidor de pH Crison 21, Crison Instruments S.A. (Barcelona, Espanha) com um eléctrodo de vidro combinado Crison.

A análise espectrofotométrica da concentração final do dsDNA foi efectuada utilizando um espectrofotómetro UV-VIS SPECORD S100 da Analytik Jena GmbH (Jena, Alemanha), medindo as soluções em cuvetes de quartzo com um volume de 1 mL. Os espectros foram obtidos na gama de comprimento de onda entre os 200 e 400 nm.

Em todos os ensaios realizados em voltametria de DP, foram sempre mantidos constantes os seguintes parâmetros: largura do impulso 70 ms, amplitude de impulso 50 mV e velocidade de varrimento  $v = 5 \text{ mV s}^{-1}$ .

Durante as medidas voltamétricas por CV foi sempre utilizado um degrau de potencial  $\Delta E_s = 1 \text{ mV}$ .

Durante as medidas por voltametria de SW foram sempre mantidos constantes os seguintes parâmetros: o degrau de potencial a  $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$  e a amplitude de impulso a 50 mV. A frequência do impulso foi modificada em função da experiência efectuada.

## 2.3 CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Para todas as experiências, foram utilizadas duas células electroquímicas, uma para a solução tampão para medir a linha de base e outra para a amostra. As diluições para as concentrações da mostra foram realizadas na própria célula electroquímica.

Antes de se iniciar qualquer leitura e de modo a certificar que a resposta electroquímica correspondia exclusivamente à amostra em estudo, o eléctrodo de trabalho sofreu um tratamento mecânico com polimento em spray de diamante com partículas de 1  $\mu\text{m}$  e de 3  $\mu\text{m}$  (Kemet International Ltd, Reino Unido), com posterior limpeza mediante um jato de água desionizada. Após este procedimento, o eléctrodo foi condicionado registando vários voltamogramas cíclicos ou de DP na solução de electrólito de suporte até que a resposta electroquímica permanecesse inalterável (linhas de base estáveis).

O procedimento experimental desenhado para o estudo do mecanismo de oxidação do TCEP à superfície do GCE revelou-se mais minucioso comparativamente

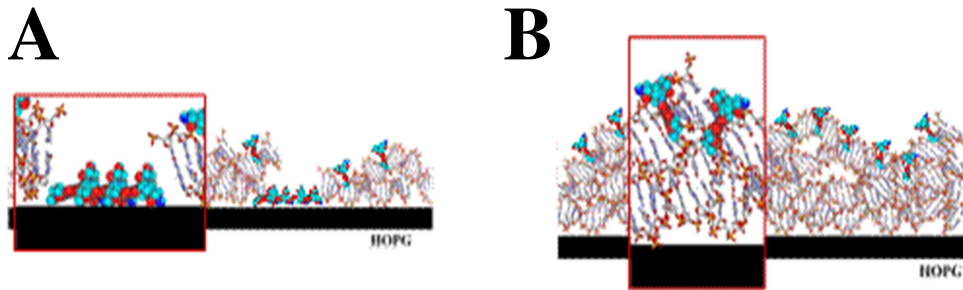
ao DTT uma vez que da sua dissolução em água desionizada, resulta uma solução com um valor de pH aproximadamente 2,5. Deste modo, para que ocorra tamponação da solução, para cada electrólito de suporte a cada respetivo pH, uma solução de TCEP foi realizada antes de cada experiência pesando massas reduzidas. Posteriormente, foi medido o pH da solução com o objetivo de confirmar se o seu valor é concordante com o electrólito a partir do qual a solução foi preparada. Outra particularidade deste protocolo reside no facto de o TCEP ser pouco estável em electrólitos de fosfato com valor de pH entre 7,0 e 8,0, tendo havido a necessidade de trabalhar com um tampão diferente. Pelos estudos de estabilidade do TCEP [37,40] verificou-se que a alternativa ao tampão fosfato é o tampão borato tendo sido, assim, essa a escolha para prosseguir com os estudos, Tabela 2.3, a partir do pH = 7,0.

Os ensaios para o estudos dos mecanismos de oxidação do DTT e do TCEP foram realizados em solução. Para os ensaios com o rituximab, foram preparados filmes e biossensores electroquímicos de RTX com posterior incubação com o agente desnaturante/redutor pretendido:

1. **Filme de rituximab monocamada:** preparado procedendo à cobertura do GCE com uma gota de 5  $\mu\text{L}$  de RTX 10 mg/mL retirada diretamente do frasco, com secagem sobre um fluxo constante de azoto;
2. **Biossensor de rituximab multicamada:** preparado procedendo à cobertura do GCE com quatro gotas sucessivas de 5  $\mu\text{L}$  de RTX 10 mg/mL retiradas diretamente do frasco, com secagem sobre um fluxo constante de azoto, entre cada gota adicionada. Incubação posterior com o DTT ou o TCEP, consoante o ensaio a ser realizado.

A preparação do biossensor electroquímico com RTX multicamada, garante que a resposta electroquímica produzida diga respeito única e exclusivamente ao processo de transferência de electrões entre o eléctrodo e o RTX e não à oxidação dos agentes redutores, que também são electroativos. A complementar este procedimento, no final de cada incubação, submeteu-se o biossensor a um leve jato de água desionizada de modo a tirar o excesso do respetivo redutor. Antes de se iniciar a leitura, hidratou-se o filme de RTX durante 5 minutos na célula electroquímica com o respetivo tampão. Uma vez que nas experiências com o filme de RTX monocamada

não houve incubação com analitos, não há a possibilidade de haver erros de sinal. No Esquema 2.1, pode observar-se a orientação do dsDNA na superfície do HOPG em monocamada (A) e em multicamada (B), sendo semelhante o modelo de cobertura da superfície do GCE com o RTX para o biossensor electroquímico e para o filme.



**Esquema 2.1:** Representação da orientação do dsDNA na superfície do HOPG para (A) biossensor monocamada e (B) biossensor multicamada.

A interação entre o dsDNA e o rituximab foi monitorizada em solução e por modificação da superfície do eléctrodo de carbono previamente limpa e condicionada em electrólito de suporte. A preparação do biossensor electroquímico de dsDNA foi conseguida pelo seguinte método:

1. **Biossensor de dsDNA multicamada:** preparado pela cobertura da superfície eléctrodo com três gotas sucessivas de 5  $\mu\text{L}$  de uma solução de dsDNA 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , com secagem sobre um fluxo constante de azoto, entre cada gota adicionada. Incubação posterior com o RTX a  $\text{pH} = 7,0$ , Fig. 2.3 (B).

# *CAPÍTULO 3*

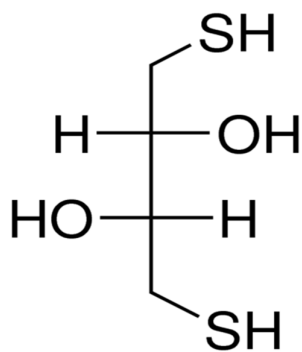
---

ESTUDO ELECTROQUÍMICO DOS  
AGENTES REDUTORES  
DITIOTREITOL E  
TRIS(2-CARBOXIETIL)FOSFINA

Este capítulo centra-se essencialmente no estudo dos mecanismos de oxidação, por electroquímica, dos agentes redutores que foram utilizados no procedimento experimental para reduzir o rituximab uma vez que é estritamente necessário conhecer a resposta à superfície do eléctrodo de todos os intervenientes no processo. Assim, o estudo completo de cada um dos agentes redutores irá ser apresentado em diferentes tópicos. Há que referir que também foi realizado um estudo prévio para o SDS em tampão fosfato 0,1 M a pH = 7,0. Para CV, nos varrimentos sucessivos obtidos, não houve registo de qualquer pico no intervalo de potencial - 1,0 V a + 1,4 V, o mesmo acontecendo para voltametria de DP, pelo que se conclui que o SDS não é electroativo à superfície do GCE, nessas condições experimentais.

### 3.1 OXIDAÇÃO ELECTROQUÍMICA DO DITIOTREITOL

O DTT, Fig. 3.1, é um forte agente redutor que, a elevadas concentrações (1-10 mM), permite a clivagem das pontes dissulfeto constituintes das proteínas, forçando o equilíbrio a deslocar-se no sentido da redução das cisteínas [40]



**Figura 3.1:** Estrutura do DTT.

É constituído por dois grupos tiol (-SH), cada um com um pKa de 8,3 e 9,5 [41] respetivamente que, na forma oxidada e na presença de proteínas, reagem formando um anel cíclico [36]. A sua solubilidade em água é elevada, bem como em solventes polares orgânicos, originando um produto incolor [42]. Contudo, a redução pela ação de tióis traz alguns inconvenientes. Quando numa experiência se adiciona uma sonda à amostra proteica em conjunto com o DTT, a mesma vai competir com os grupos tiol de ambos os componentes, dificultando a marcação e obrigando a que seja

necessário retirar o DTT antes da adição da sonda. Para além deste facto, o DTT também não é estável durante muito tempo na forma reduzida, nem na presença de iões metálicos capazes de o oxidar, sendo necessário a adição de um agente quelante à reação [42]. Para pontes dissulfeto que sejam inacessíveis ao solvente, é necessário adicionar desnaturantes em conjunto com o DTT, de modo facilitar a redução. O DTT é aplicado na maioria das técnicas que tenham por base um processo electroforético, como por exemplo o SDS-PAGE, tendo sido recentemente aplicado na técnica de zimografia na determinação da atividade das proteínas [43].

### 3.1.1 ELECTROXIDAÇÃO

Um estudo completo do comportamento do DTT à superfície do eléctrodo de carbono foi realizado por voltametria cíclica, voltametria de DP e voltametria de SW. Inicialmente, foi realizado um varrimento por CV na faixa de potencial de - 1,0 V até + 1,4 V (faixa de potencial para o eléctrodo de carbono) para uma solução de 500  $\mu\text{M}$  DTT diluída a partir da solução stock de 0,2 M num electrólito de suporte com pH ácido, de modo a verificar o aparecimento de picos nesse intervalo de potencial para processos de redução e oxidação. Apenas se registou um pico na região anódica e a potenciais positivos, pelo que as experiências seguintes iniciaram-se no intervalo de potencial de 0,0 V até + 1,4 V.

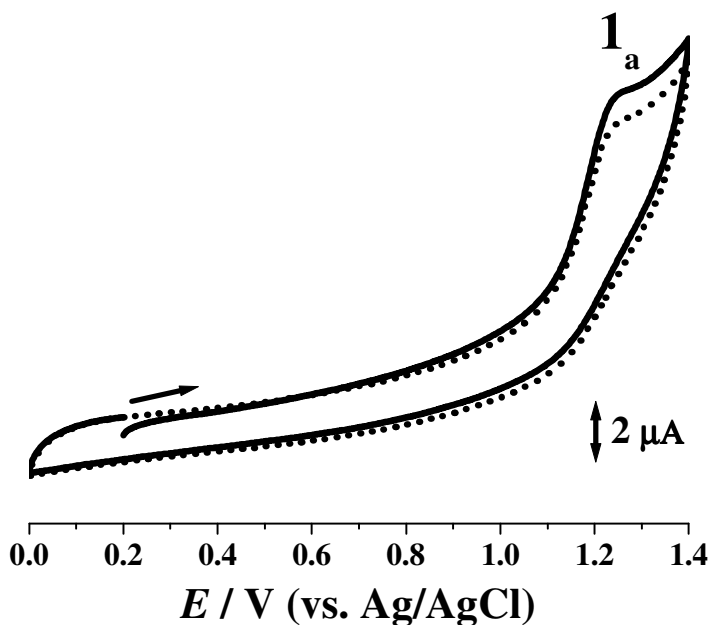
#### 3.1.1.1 Voltametria Cíclica

A electroxidação do DTT foi investigada por CV a uma concentração de 500  $\mu\text{M}$  preparada a partir da solução stock 0,2 M DTT, em tampão fosfato 0,1 M a pH = 7,0. Varrimentos sucessivos foram registados no intervalo de potencial + 0,0 V a + 1,4 V, com a deteção de apenas um pico na zona anódica, pico 1<sub>a</sub>, Fig. 3.2.

O valor do potencial do pico 1<sub>a</sub> ocorre a  $E_{p1a} = + 1,24$  V e corresponde à oxidação do grupo -SH da molécula de DTT, Fig. 3.1, num processo irreversível já que não se observa o aparecimento de picos na região catódica. Foram igualmente registados voltamogramas a pH = 4,0 cujo potencial do pico 1<sub>a</sub> ocorre a  $E_{p1a} = + 1,33$  V. Existe, assim, um desvio para potenciais menores à medida que o valor de pH aumenta e este elevado valor de potencial de oxidação junto ao limite da

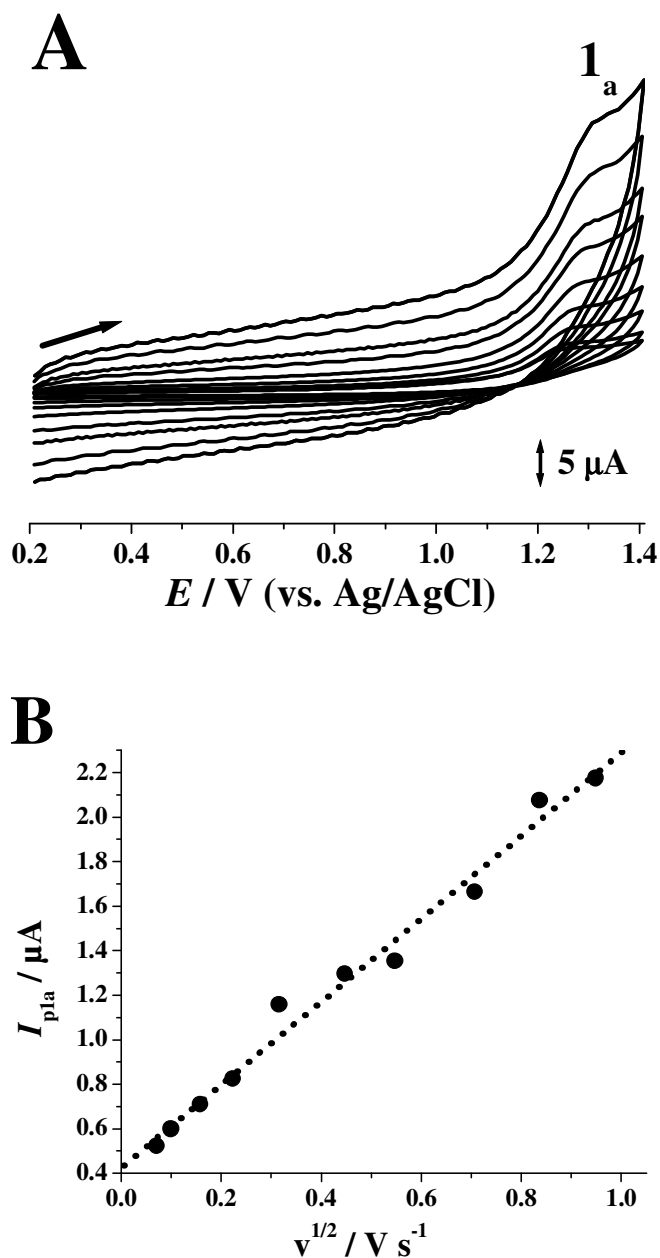


faixa de oxidação do eléctrodo de carbono (+ 1,40 V), reflete a dificuldade em retirar electrões ao DTT. O facto de não se registarem novos picos no segundo varrimento, sem limpeza do eléctrodo, mostra a inexistência de produtos de oxidação electroativos.



**Figura 3.2:** Voltamogramas cíclicos numa solução de 500  $\mu\text{M}$  DTT em tampão fosfato 0,1 M pH = 7,0 (—) primeiro e (•••) segundo varrimento,  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ .

A influência da velocidade de varrimento em função da corrente de oxidação do pico  $1_a$  foi também avaliada com o objetivo de verificar se o processo de transporte de massa do DTT no electrólito e consequente troca de electrões com a superfície do eléctrodo, ocorre predominantemente por difusão ou por adsorção. Deste modo, foram realizados CVs para 500  $\mu\text{M}$  de DTT em tampão fosfato 0,1 M a pH = 7,0, para velocidades de varrimento entre 5 e 900  $\text{mV s}^{-1}$ , sem limpeza do eléctrodo entre cada medida, Fig. 3.3 (A).



**Figura 3.3:** Voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de 500  $\mu\text{M}$  DTT em tampão fosfato 0,1 M pH = 7,0 (A) Primeiro varrimento de potencial para diferentes velocidades de varrimento de 5 a 900  $\text{mV s}^{-1}$ ; (B) Relação entre corrente,  $I_{p1a}$ , (●) do pico 1<sub>a</sub> e  $v^{1/2}$ .

Observou-se que quanto maior a velocidade de reação, maior a intensidade do pico pelo que através da relação entre a raiz quadrada da velocidade e a intensidade do pico, Fig. 3.3 (B), obtém-se a equação da recta e a respetiva inclinação,  $I_{p1a} (\mu\text{A}) = 0,07 + 2,29 v^{1/2}$ , sendo possível concluir que o processo de transferência de electrão ocorre predominantemente por difusão em meio neutro.

A diferença entre o potencial do pico  $E_{p1a}$  e o potencial a meia altura do pico  $E_{p/2a}$  foi de 28,2 mV. Uma vez que, para um sistema irreversível controlado por difusão  $|E_{pa} - E_{p/2a}| = 47,7 / (\alpha_c n')$  onde  $\alpha_c$  é o coeficiente de transferência de carga e  $n'$  o número de electrões na etapa determinante [31], pode ser calculado o valor de  $\alpha_c n' = 1,69$ .

Para um sistema irreversível controlado por difusão:

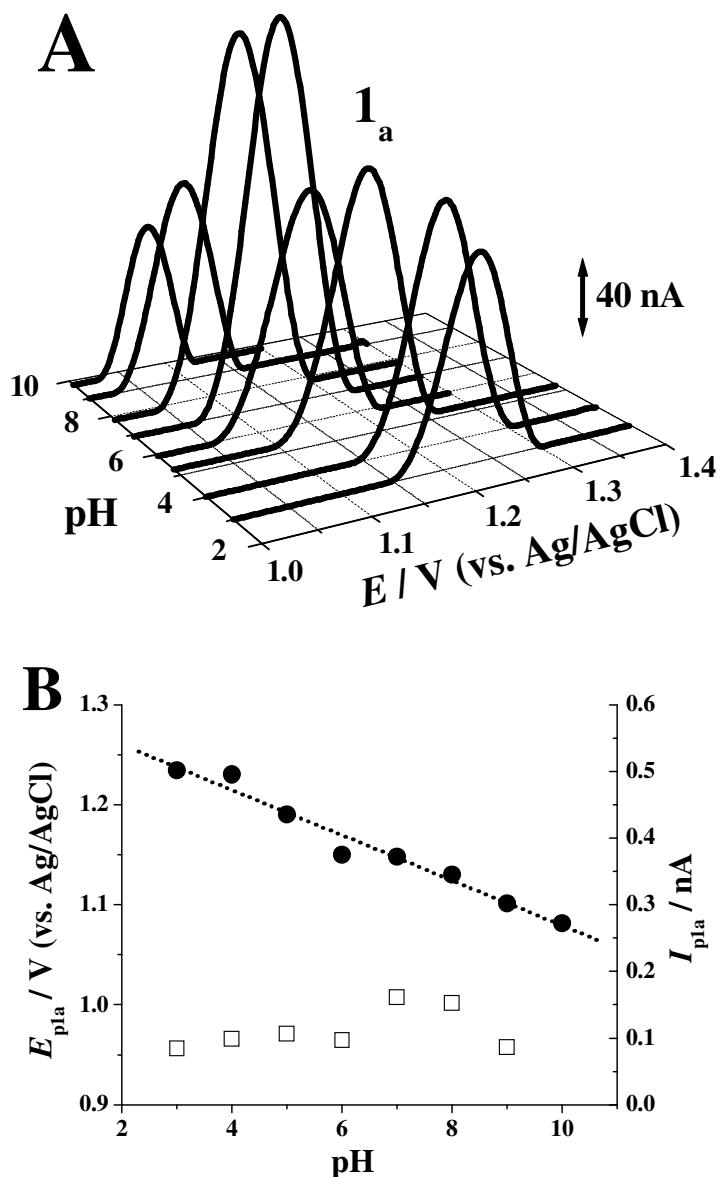
$$I_{pa} \text{ (A)} = 2,99 \times 10^5 \cdot n (\alpha_c n')^{1/2} \cdot A \cdot D_O^{1/2} \cdot [O] \cdot v^{1/2}$$

a área do eléctrodo,  $A$ , é dada em  $\text{cm}^2$ ,  $n$  é o número de electrões envolvidos durante a oxidação do DTT ( $n = 2$ , calculado na secção 3.1.1.2),  $D_O$  é o coeficiente de difusão dado em  $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $[O]$  é a concentração do DTT em  $\text{mol cm}^{-3}$  e  $v$  a velocidade de varrimento em  $\text{V s}^{-1}$ . O valor do coeficiente de difusão para o DTT ( $D_{\text{DTT}}$ ) é, assim, calculado a partir da equação da recta obtida graficamente, Fig. 3.3 (B),  $I_{p1a} \text{ (}\mu\text{A)} = 0,07 + 2,29 v^{1/2}$ . Sabendo que a área do eléctrodo do carbono vítreo foi previamente determinada e obtida por CV para uma solução de 2,5 mM de hexacianoferrato em tampão fosfato 0,1 M pH = 7,0, sendo o seu coeficiente de difusão é de  $D_O = 7,35 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , o coeficiente de difusão do DTT foi determinado,  $D_{\text{DTT}} = 2,83 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

### 3.1.1.2 Voltametria de Impulso Diferencial

O efeito do pH na oxidação electroquímica do DTT foi avaliado por voltametria de DP, para os electrólitos de suporte entre os valores de pH = 3,0 e 10,0, Fig. 3.4 (A), com o objetivo de determinar o número de electrões e prótons envolvidos no processo. Foi preparada uma solução de 50  $\mu\text{M}$  de DTT na célula electroquímica diretamente na solução tampão.

Confirmando os resultados obtidos em CV, apenas o pico  $1_a$  foi obtido, Fig 3.4 (A), com deslocação do seu potencial de oxidação para valores menos positivos, com o aumento do pH, Fig. 3.4 (B).



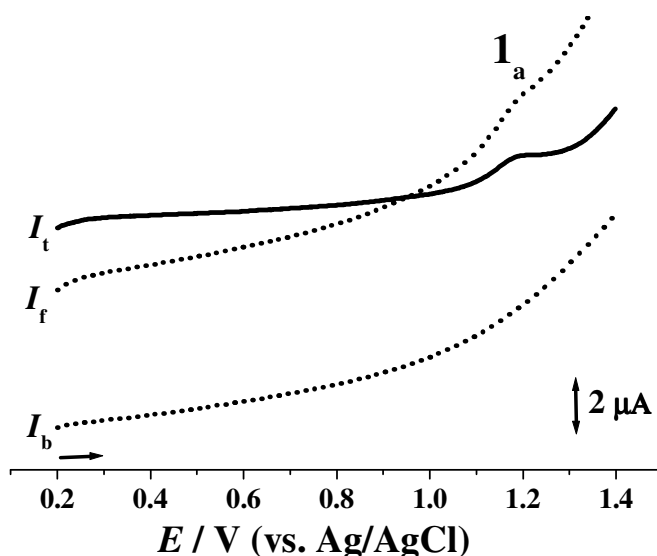
**Figura 3.4:** (A) Gráfico 3D para voltamogramas de DP com linha de base corrigida em 50  $\mu$ M DTT em função do pH. (B) Relação entre potencial ( $E_{p1a}$ ) (●) e a intensidade ( $I_{p1a}$ ) (□) do pico  $1_a$ , em função do pH. A recta a ponteados tem um valor de - 30 mV correspondente ao declive.

A obtenção de apenas um pico e o valor de - 30 mV da inclinação da recta por unidade de pH calculado a partir da relação do potencial em função do pH, Fig. 3.4 (B), diz que o mecanismo de oxidação do DTT ocorre em apenas uma etapa e com a transferência de dois electrões e um protão.

Também foi verificado que o pH influencia a intensidade da corrente do pico de oxidação do DTT, Fig. 3.4 (A), atingindo o máximo para o electrólito de suporte fosfato 0,1 M a pH = 7,0.

### 3.1.1.3 Voltametria de Onda Quadrada

Para confirmar os resultados obtidos por voltametria cíclica e voltametria de DP, foi realizada voltametria de SW para electrólitos de suporte a pH ácido, neutro e alcalino. O comportamento do DTT foi semelhante em todas as soluções testadas, pelo que é apresentado aqui o resultado obtido para valor de pH = 7,0. Deste modo, as corrente total ( $I_t$ ), direta ( $I_f$ ) e inversa ( $I_b$ ) do primeiro varrimento, Fig. 3.5, foram registadas em tampão fosfato 0,1 M a pH = 7,0 para 500  $\mu\text{M}$  de DTT.



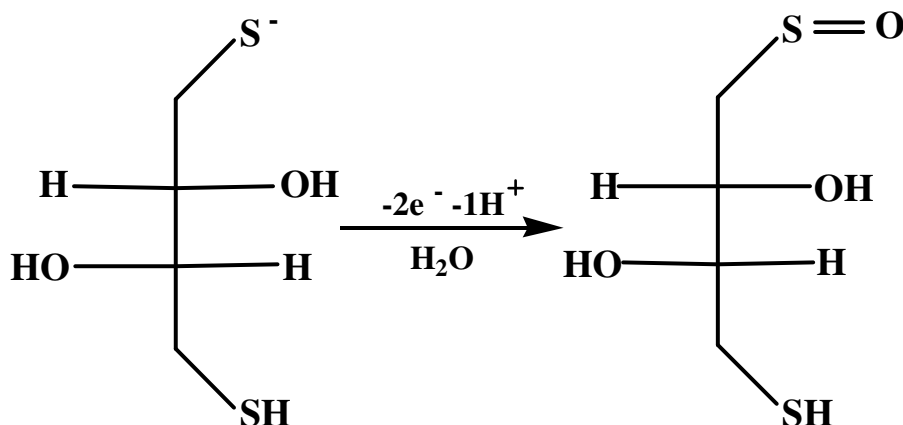
**Figura 3.5:** Voltamograma de SW para 500  $\mu\text{M}$  de DTT em tampão fosfato 0,1 M a pH = 7,0;  $v_{\text{effective}} = 50 \text{ mVs}^{-1}$ .

Após o desdobramento da corrente total nas suas componentes respetivas - corrente inversa e direta - verificou-se o aparecimento de um pico para o mesmo potencial e com uma intensidade aproximada ao pico 1<sub>a</sub> apenas na corrente direta, corroborando os resultados obtidos na CV que determinaram a irreversibilidade do processo de oxidação do DTT.

### 3.1.1.4 Mecanismo de Oxidação do DTT

Reunindo todos os dados conseguidos experimentalmente para o comportamento do DTT à superfície do eléctrodo de carbono vítreo, conclui-se que o mesmo sofre oxidação em apenas um dos grupos -SH, aquele que tem o valor de pKa

mais baixo ( $pK_a = 8,3$ ), sendo um processo dependente do pH, irreversível, sem produtos de oxidação electroativos e controlado por difusão com um coeficiente de difusão de  $D_{DTT} = 2,83 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ . O mecanismo de oxidação proposto ilustra-se no Esquema 1.

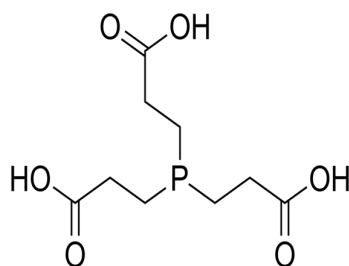


**Esquema 1:** Mecanismo proposto para a oxidação do DTT à superfície do GCE.

O pico  $1_a$  obtido para as diferentes técnicas de voltametria corresponde, assim, à oxidação do grupo tiol em apenas uma etapa, envolvendo a perda de dois electrões e de um protão.

### 3.2 OXIDAÇÃO ELECTROQUÍMICA DO TRIS(2-CARBOXIETIL)FOSFINA

O TCEP, Fig. 3.6, é um agente redutor que foi desenvolvido de modo a ultrapassar algumas propriedades de certas fosfinas, como a sua instabilidade em meio aquoso, não aplicáveis a técnicas bioquímicas. O  $pK_a$  do átomo de fósforo central é de 7,66 [44].



**Figura 3.6:** Estrutura do TCEP.

O TCEP é um composto não volátil, altamente solúvel em água e sem odor [44]. Ao contrário de alguns tióis como o DTT que se tornam menos potentes a baixos valores de pH, o TCEP é capaz de reduzir completa e rapidamente, em condições acídicas, ligações muito estáveis. Apesar de ser altamente específico para ligações dissulfeto e de não reagir com grupos funcionais existentes na proteína (uma vez que a sua estrutura não compreende um grupo tiol) [45], o seu preço é bastante mais elevado comparativamente com o DTT, pelo que a escolha do desnaturante vai depender muito das condições e das metodologias experimentais. Para além disto, a sua aplicação fica limitada a ligações dissulfeto expostas ao ambiente aquoso, uma vez que não permeia o núcleo hidrofóbico da proteína.

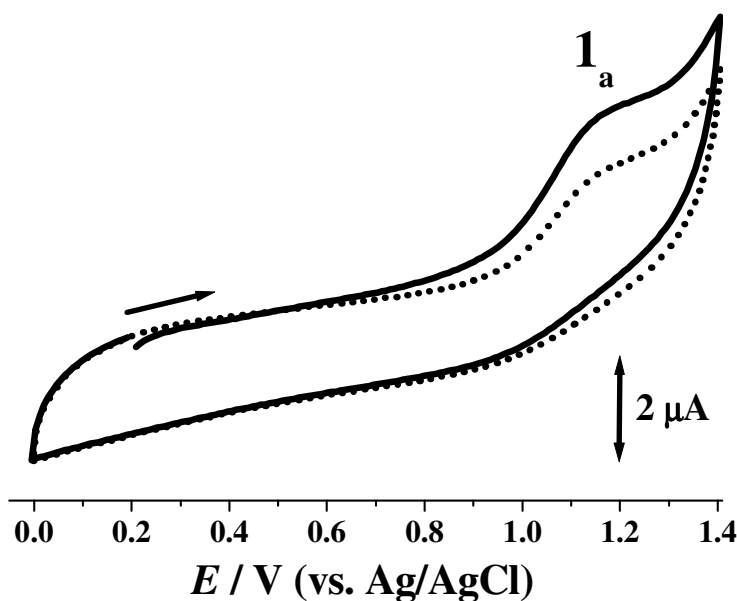
A estabilidade do TCEP em meio aquoso tem sido bastante controversa. Burns *et al* [44] demonstraram a sua instabilidade em solução básica, enquanto que Han *et al*. [46] defendem a sua estabilidade em ambos os meios, alcalino e ácido. Este último também verificou instabilidade na presença de electrólitos de suporte entre pH = 7,0 e 8,0 que contenham fosfato, daí as experiências com o TCEP tenham sido executadas em tampão borato.

### **3.2.1 ELECTROXIDAÇÃO**

O estudo do comportamento electroquímico do TCEP foi iniciado com experiências de CV em soluções de 500  $\mu$ M TCEP em electrólito de suporte acetato 0,1 M a pH = 4,0. O varrimento de potencial efetuado para estas experiências teve início a 0,00 V até ao limite positivo de + 1,40 V, onde foi invertido o sentido, atingindo um limite negativo de - 1,00 V. Observou-se apenas o aparecimento de correntes anódicas a potencial positivo, pelo que as experiências prosseguiram sempre no intervalo anódico de 0,00 V a + 1,40 V.

### 3.2.1.1 Voltametria Cíclica

O estudo por CV foi realizado para 500  $\mu\text{M}$  de TCEP numa solução de electrólito de suporte acetato 0,1 M a  $\text{pH} = 4,0$ , Fig. 3.7, uma vez que a sua atividade redutora é máxima para valores acídicos.

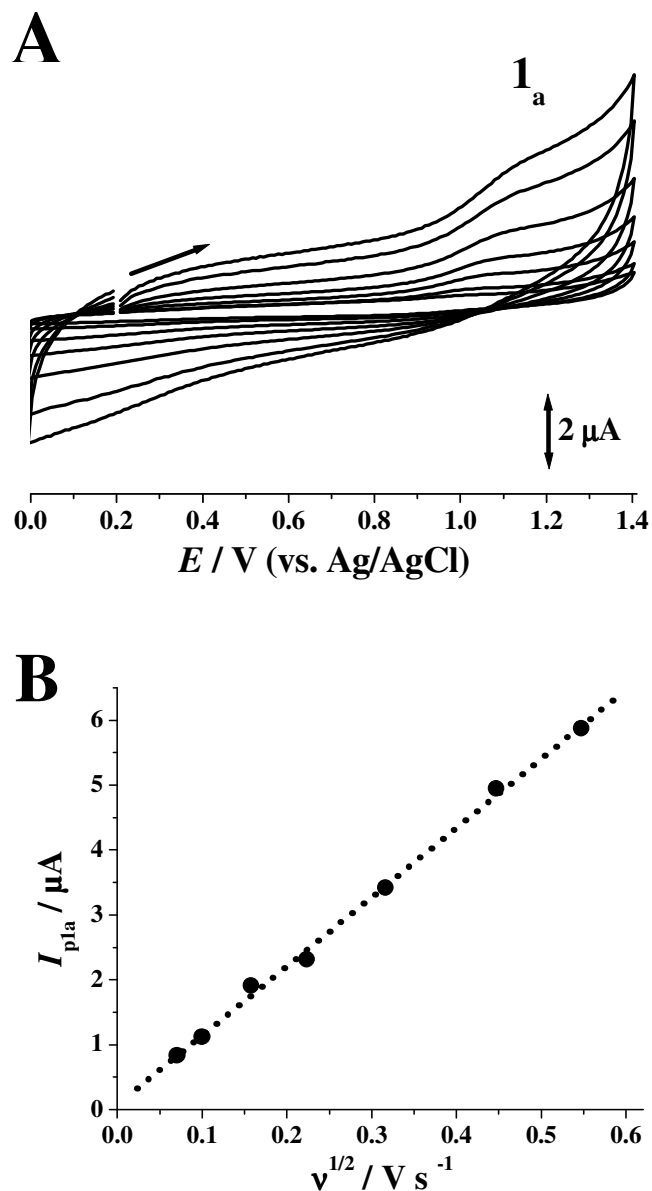


**Figura 3.7:** Voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de 500  $\mu\text{M}$  DTT em tampão acetato 0,1 M  $\text{pH} = 4,0$  (—) primeiro e (•••) segundo varrimento,  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ .

Observou-se o aparecimento de um pico irreversível, pico  $1_a$ , a um potencial de  $E_{p1a} = + 1,21 \text{ V}$ . Comparando este valor, no mesmo electrólito de suporte, com o potencial ao qual o DTT se oxida ( $E_{p1a} = + 1,33 \text{ V}$ ), confirma-se a superioridade do poder redutor do TCEP. Sendo o seu valor inferior, significa que se oxida mais facilmente, reduzindo em maior extensão.

A influência da velocidade de varrimento na intensidade da corrente e no potencial do pico foi igualmente avaliada por CV, para 500  $\mu\text{M}$  de TCEP em solução tampão 0,1 M acetato a  $\text{pH} = 4,0$ , Fig.3.8 (A), para velocidades de varrimento de 5 a 300  $\text{mV s}^{-1}$ , sem limpeza do eléctrodo entre cada medida, uma vez que para velocidades superiores o pico não foi identificável



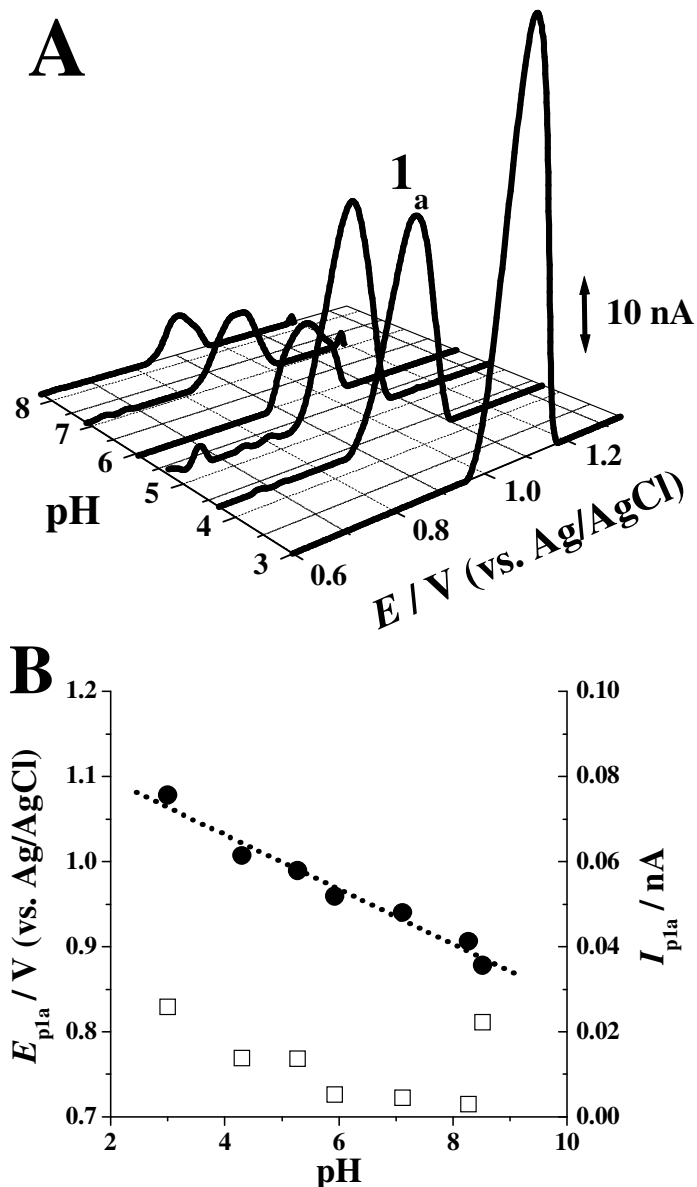


**Figura 3.8:** Voltamogramas cíclicos obtidos numa solução de 500 μM TCEP em tampão acetato 0,1 M pH = 4,0 (A) Primeiro varrimento de potencial e diferentes velocidades de varrimento de 5 a 300 mV s<sup>-1</sup>; (B) Relação entre a corrente,  $I_{p1a}$ , (●) do pico 1<sub>a</sub> e  $v^{1/2}$ .

Observou-se que quanto maior a velocidade de reação, maior a intensidade do pico pelo que através da relação entre a raiz quadrada da velocidade e a intensidade do pico, Fig. 3.8 (B), obteve-se a equação da recta e a respetiva inclinação,  $I_{p1a} (\mu A) = - 0.0059 + 0.89 v^{1/2}$ , sendo possível concluir que o processo de transferência de electrão ocorre por difusão. Do mesmo modo como calculado na secção 3.1.1.1, o  $D_{TCEP} = 1.12 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

### 3.2.1.2 Voltametria de Impulso Diferencial

O estudo do efeito do pH na oxidação do TCEP foi realizado por voltametria de DP para 50  $\mu\text{M}$  de TCEP em várias soluções de electrólito de suporte com diferentes valores de pH e veio permitir o cálculo do número de electrões e de prótons envolvidos no processo. O registo dos voltamogramas de DP para cada valor de pH está representado graficamente na Fig. 3.9 (A).



**Figura 3.9:** (A) Gráfico 3D para voltamogramas de DP com linha de base corrigida, obtidos para 50  $\mu\text{M}$  TCEP em função do pH. (B) Relação entre potencial ( $E_{p1a}$ ) (●) e a intensidade ( $I_{p1a}$ ) (□) do pico 1<sub>a</sub> em função do pH. A recta a ponteados tem um valor de - 30 mV correspondente ao declive.

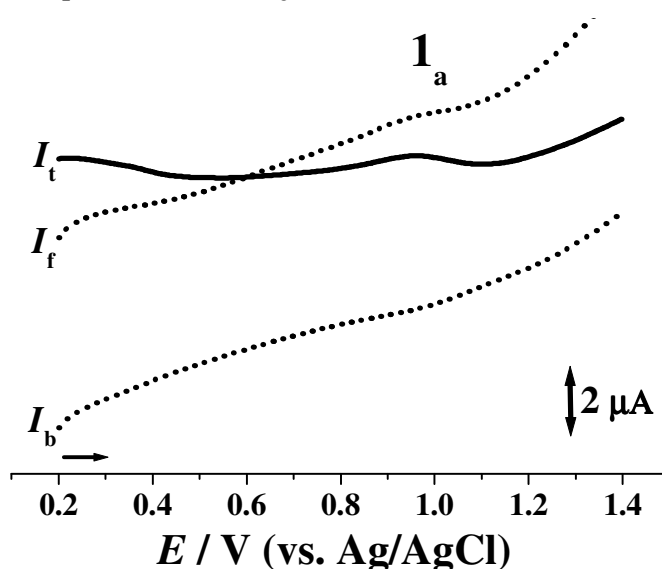
Confirmando os resultados obtidos para CV, observa-se a ocorrência apenas do pico  $I_a$ , para a oxidação da fosfina. O processo é dependente do pH uma vez que o valor do potencial se desloca para valores menos positivos à medida que o pH aumenta, Fig. 3.10. Esta dependência linear permitiu o cálculo da inclinação da recta, - 30 mV, concluindo que o mecanismo de oxidação do TCEP envolve a transferência de dois electrões e de um protão.

A dependência do pH nas correntes anódicas do TCEP também foi avaliada, observando-se valores superiores de corrente para pH mais acídicos.

Voltamogramas de DP sucessivos para o TCEP em tampão borato 0,1 M a pH = 7,0 demonstraram claramente que a superfície do eléctrodo é rapidamente bloqueada muito provavelmente devido à polimerização do produto de oxidação do TCEP. Facto este igualmente justificável pela necessidade que houve em proceder a uma limpeza electroquímica do eléctrodo por CV com dez varrimentos sucessivos, em meio ácido e neutro e seguido, durante uma hora, no ultrassom Branson 5510 (Wethersfield, Estados Unidos da América) com 60 000 frequências, mergulhado em etanol.

### 3.2.1.3 Voltametria de Onda Quadrada

No final dos estudos por voltametria de DP e cíclica, tirando partido da rapidez e sensibilidade da voltametria de SW, pretendeu-se confirmar a irreversibilidade do processo de oxidação do TCEP.



**Figura 3.11:** Voltamograma de onda quadrada em 400 μM de DTT em tampão acetato 0,1 M a pH = 4,0:  $v_{\text{effectiva}} = 50 \text{ mVs}^{-1}$ .

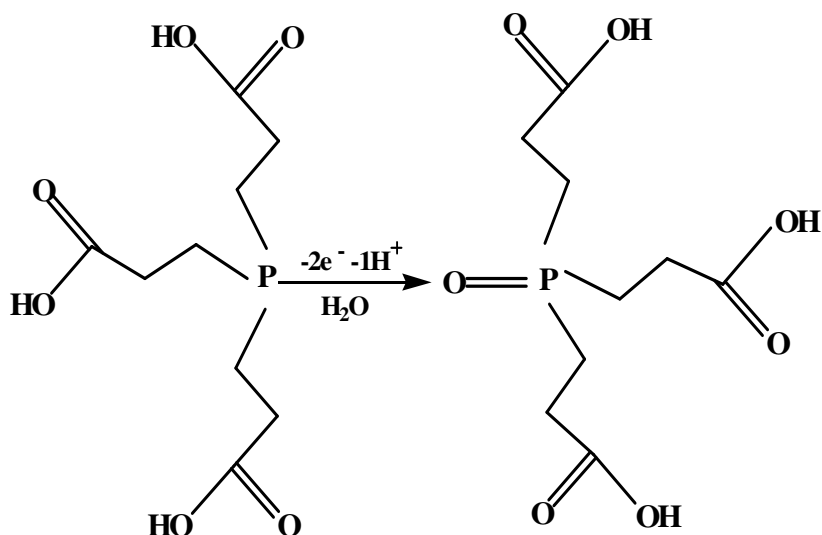
Utilizando a mesma metodologia aplicada ao DTT, voltamogramas em electrólitos de suporte a pH básico, ácido e neutro foram registados para uma solução de 400  $\mu\text{M}$  TCEP. Uma vez que a resposta voltamétrica foi concordante entre os diferentes meios, apenas é apresentado o gráfico referente à solução tampão acetato 0,1 M a pH = 4,00, Fig. 3.11, pelo que foi explicado inicialmente neste subcapítulo.

Pelo desdobramento da corrente total obtida por voltametria de SW, pode observar-se que o pico 1<sub>a</sub> ocorreu apenas na corrente direta, sustentando as conclusões que apontam para um processo irreversível.

### 3.2.1.4 Mecanismo de oxidação do TCEP

O TCEP é um agente redutor considerado mais potente que o DTT. Os resultados obtidos electroquimicamente concluíram que a sua oxidação é dependente do pH, seguindo um processo irreversível e controlado por difusão, em meio ácido, com o valor do coeficiente de difusão de  $D_{\text{TCEP}} = 1.12 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

Agrupando todos os dados obtidos experimentalmente e reunindo informação na literatura acerca do mecanismo de oxidação do TCEP quando ocorre redução das proteínas [44], foi proposto um mecanismo para a sua electrooxidação à superfície do eléctrodo de carbono vítreo a pH = 4,0, Esquema 2.



**Esquema 2:** Mecanismo proposto para a oxidação do TCEP à superfície do GCE.

O pico  $1_a$  observado nas técnicas de voltametria diz respeito à oxidação da fosfina, ocorrendo a transferência de dois electrões e de um protão em apenas uma etapa. Outra alternativa a esta reacção, justificada pela grande dificuldade no polimento do eléctrodo, consiste na reacção entre dois radicais existentes na solução, iniciando um processo de polimerização com grande adsorção à superfície do eléctrodo.

# *CAPÍTULO 4*

---

MECANISMO DE  
ELECTROXIDAÇÃO DO  
RITUXIMAB E SUA INTERAÇÃO  
COM O DNA

Neste capítulo pretende-se estudar o comportamento electroquímico do rituximab, para posteriormente investigar o seu efeito no DNA em hélice dupla. A primeira abordagem consistiu em aplicar a técnica de voltametria de pulso diferencial para conhecer a resposta electroquímica da proteína à superfície de um eléctrodo de carbono vítreo, com o auxílio de agentes desnaturantes e redutores. Na segunda parte deste estudo pretendeu-se, pela primeira vez, verificar se existe interação direta entre o RTX e o B-DNA e o tipo de alterações na dupla hélice.

## **4.1 COMPORTAMENTO ELECTROQUÍMICO DO RITUXIMAB**

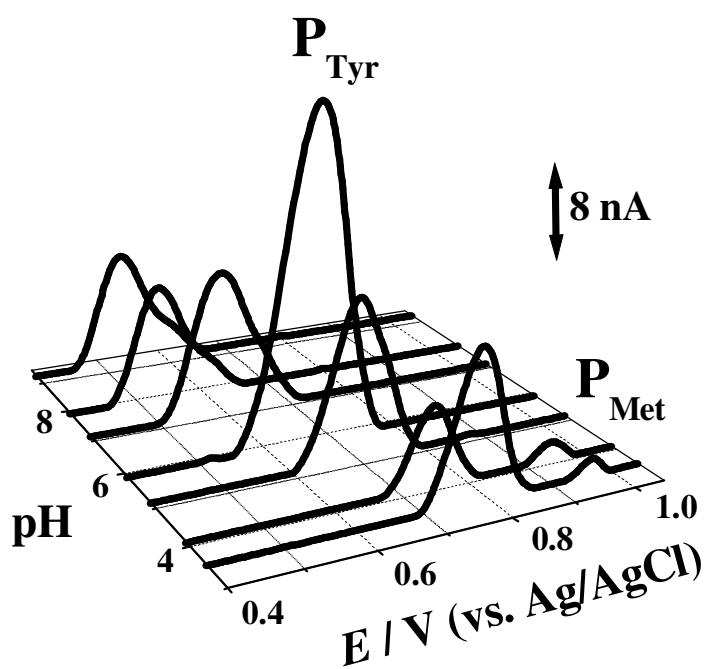
O Rituximab é uma proteína extremamente complexa que se assemelha muito às imunoglobulinas existentes naturalmente no nosso organismo. Tirando partido de todas as vantagens que as técnicas voltamétricas oferecem como a elevada sensibilidade, a possibilidade na determinação da concentração da amostra/analito, rapidez de resposta e baixo custo, caracterizou-se electroquimicamente o rituximab na sua forma nativa e na forma desnaturada/redutora. Há que ter em conta que a sua estrutura química compreende cinco tipos de aminoácidos diferentes que produzem resposta electroquímica à superfície do eléctrodo: 12 metioninas, 32 cisteínas, 26 histidinas, 28 triptofanos e 62 tirosinas, cada uma produzindo um número de picos respetivos, como referenciado na Tabela 1.2, na secção 1.6.

### **4.1.1 ELECTROXIDAÇÃO DO RTX NATIVO**

A primeira experiência realizada com o intuito de verificar o comportamento geral da proteína, consistiu num varrimento por CV em 5 mg/mL de RTX colocado diretamente na célula electroquímica, numa solução de electrólito de suporte fosfato 0,1 M a pH = 7,00. Não foi possível obtenção de qualquer resposta na faixa de potencial - 1,00 V a + 1,30 V, pelo que no passo seguinte utilizou-se uma técnica mais sensível. Com a mesma concentração de RTX em solução tampão fosfato 0,1 M a pH = 7,0 por voltametria de DP, os resultados nunca foram reproduzíveis, isto é, de experiência para experiência o(s) pico(s) obtido(s) variaram sempre de potencial e nem sempre foi possível obter uma resposta electroquímica. Estes resultados devem-se muito provavelmente ao facto de, em solução, a proteína ter inúmeros graus de

liberdade devido à sua complexidade estrutural, o que faz com que a transferência dos seus electrões se faça de modo diferencial para cada experiência.

De modo a aumentar a sensibilidade do processo e garantir a reprodutibilidade na obtenção dos registos voltamétricos, procedeu-se à imobilização de um filme em monocamada de RTX à superfície do eléctrodo e para cada valor de solução de electrólito de suporte a diferentes pH, registaram-se os primeiros varrimentos por voltametria de DP, Fig. 4.1.



**Figura 4.1:** Gráfico 3D para voltamogramas de DP com linha de base corrigida, obtidos para filmes de RTX em monocamada em função do pH.

Com esta metodologia foi possível expor dois resíduos diferentes à superfície do eléctrodo: a tirosina (Tyr) a  $E_{p1a} \approx + 0,60$  V (pH = 7,14) e a metionina (Met)  $E_{p1a} \approx + 0,97$  V (pH = 3,53). A oxidação da tirosina origina um pico,  $P_{Tyr}$ , no primeiro varrimento e traduz um processo dependente do pH com o seu valor de potencial a decrescer à medida que o pH aumenta, confirmando o que a literatura refere sobre o primeiro passo do mecanismo de oxidação da tirosina [41,43]. Para os valores de pH mais ácidos, observa-se o aparecimento de outro pico,  $P_{Met}$ , a um potencial mais elevado em relação ao pico da tirosina. Comparando este resultado com a literatura [40], pode concluir-se que o pico obtido é relativo à oxidação da metionina. Observa-



se igualmente que a intensidade do pico  $P_{Met}$  é seis vezes inferior à intensidade do pico  $P_{Tyr}$ . Isto deve-se ao facto de, na estrutura da molécula do rituximab, existirem aproximadamente seis vezes mais resíduos de tirosina em relação aos resíduos de metionina. Assim, fica comprovada a capacidade electroanalítica que as técnicas voltamétricas possuem, bem como a reprodutibilidade no uso de compostos biológicos imobilizados diretamente na superfície do eléctrodo.

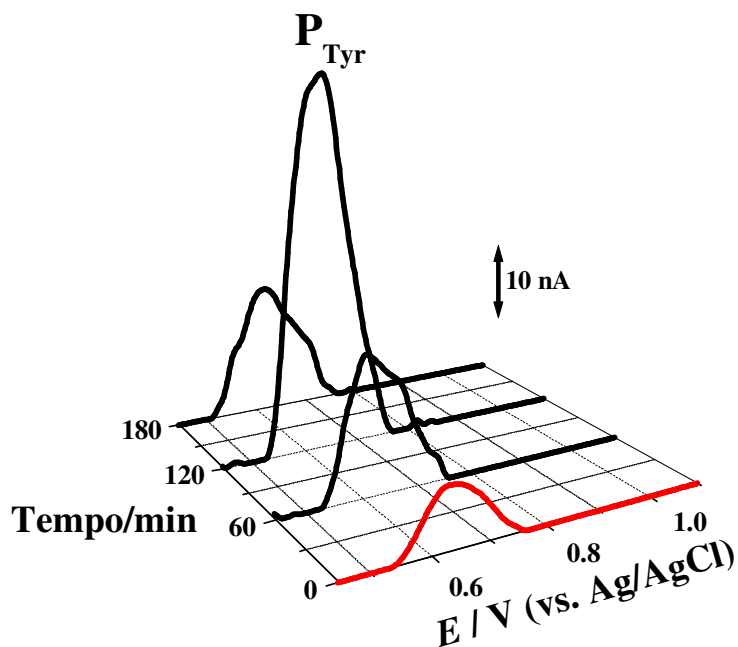
#### **4.1.2 ELECTROXIDAÇÃO DO RTX DESNATURADO**

Foi possível, através da imobilização do filme de RTX, obter uma resposta electroquímica dos grupos de tirosina e da metionina na superfície do GCE. Contudo, sendo a estrutura primária do RTX composta por 5 tipos de aminoácidos electroativos, o protocolo experimental foi alterado de modo a completar a sua caracterização. Um facto implícito é que estes aminoácidos estão arrançados na proteína consoante a sua polaridade/hidrofobicidade pelo que houve a necessidade de desestabilizar a sua estrutura tridimensional.

Foi investigada a interação do RTX imobilizado em multicamada sobre a superfície do eléctrodo (biossensor electroquímico de RTX multicamada) com o agente desnaturante SDS e os agentes redutores DTT e TCEP, tendo em conta que o SDS não tem resposta electroquímica e que, por voltametria de DP em solução fosfato 0,1 M a pH = 7,0, o DTT tem um pico de oxidação a  $E_{p1a} = + 1,148$  V e o TCEP a  $E_{p1a} = + 0,940$  V.

##### ***4.1.2.1 Electroquímica do RTX na presença do SDS***

Procedeu-se à preparação de biossensores electroquímicos de RTX multicamada e incubaram-se com uma solução de 33,33 mM de SDS em diferentes tempos, 60, 120 e 180 minutos. Após esses tempos, transferiu-se o eléctrodo para a solução de fosfato 0,1 M a pH = 7,0, esperou-se 5 minutos para o filme proteico hidratar e registaram-se os voltamogramas de DP para o primeiro varrimento. O resultado obtido está representado na Fig. 4.2.

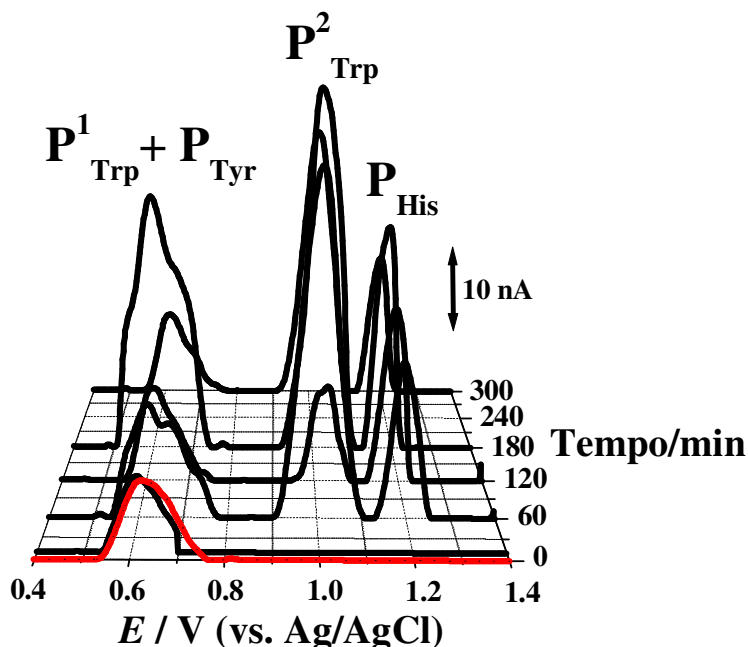


**Figura 4.2:** Gráfico 3D para voltamogramas de DP com linha de base corrigida, em tampão fosfato 0,1 M a pH = 7,0, obtidos para biossensores de RTX em multicamada (—) controle e (—) incubados a diferentes tempos com 33,33 mM de SDS.

O SDS é um agente desnaturante que promove a disrupção das interações não covalentes da proteína, eliminando os pontos de contacto entre os seus resíduos tornando a cadeia numa estrutura linear, mas sem qualquer quebra de ligação. Deste modo, expõe um maior número de resíduos de aminoácidos à superfície do eléctrodo. Pelo que se observa nos resultados, comparativamente ao controlo que consiste no varrimento do biossensor electroquímico de RTX sem incubação (a vermelho), observou-se um aumento de intensidade do pico  $P_{Tyr}$  significando um aumento no número de resíduos de tirosina em contacto com a superfície do eléctrodo. Por outro lado, nos tempos de incubação 60 e 180 minutos pode observar-se um aumento da largura a meia altura do pico,  $W_{1/2}$ , podendo concluir-se que a oxidação da tirosina não é a única a ocorrer. Deste modo e uma vez que mais nenhum pico foi registado a outro potencial, a experiência foi realizada com agentes redutores que clivam a proteína.

#### 4.1.2.2 Electroquímica do RTX na presença do DTT

O biossensor electroquímico com RTX foi incubado com 10 mM de DTT, durante os intervalos de tempo de 10, 60, 120, 180 e 300 minutos. Esta concentração de DTT é usualmente aplicada para desnaturar proteínas em processos electroforéticos. Os resultados desta incubação podem observar-se na Fig. 4.3.



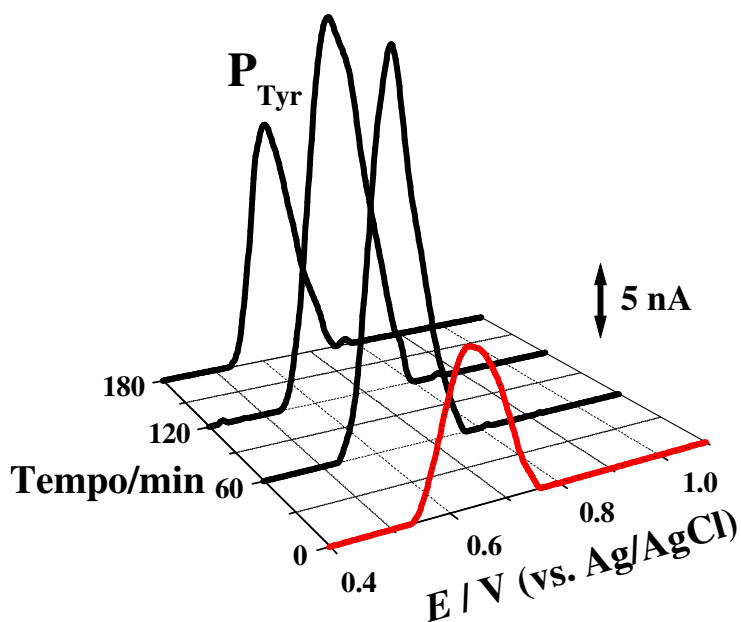
**Figura 4.3:** Gráfico 3D para voltamogramas de DP com linha de base corrigida, em tampão fosfato 0,1 M a pH = 7,0, obtidos para biossensores de RTX em multicamada (—) controle e (—) incubados a diferentes tempos com 10 mM de DTT.

Com o DTT, o resultado obtido foi concordante com o que era esperado. Este agente redutor cliva as ligações dissulfeto estabelecidas entre os átomos de enxofre dos resíduos de cisteína, “destruindo” a estrutura tridimensional da proteína. Assim, ocorreu o aparecimento de novos picos. Aos 10 minutos de incubação não houve tempo suficiente para reduzir o RTX, pelo que o único pico obtido foi o da tirosina,  $P_{Tyr}$ , a  $E_{p1a} \approx +0,62$  V. A partir dos 60 minutos, inclusive, as intensidades e as formas dos picos variaram de incubação para incubação muito provavelmente devido ao facto de a morfologia do RTX à superfície do eléctrodo variar ao longo da experiência. Tendo em conta a Tabela 1.2 do Capítulo 1: o pico obtido a potenciais mais baixos corresponde ao primeiro passo de oxidação dos resíduos de triptofano ( $P^1_{Trp}$ ) e de

tirosina ( $P_{Tyr}$ ) uma vez que a largura do pico é grande; o pico a  $E_{p1a} \approx + 1,00$  V corresponde ao segundo passo de oxidação do triptofano ( $P^2_{Trp}$ ); o terceiro e último pico a potenciais mais elevados,  $E_{p1a} \approx + 1,15$  V diz respeito à oxidação da histidina ( $P_{His}$ ).

#### 4.1.2.3 Electroquímica do RTX na presença do TCEP

Conhecendo as vantagens do TCEP relativamente ao DTT, principalmente a sua superior capacidade de reduzir as proteínas, o mesmo procedimento com o TCEP foi utilizado. Uma vez que este agente redutor é mais forte para pH acídicos, principalmente a pH = 5,0 [44], a solução de TCEP foi preparada diretamente na solução de electrólito de suporte acetato 0,1 M a pH = 5,00. Os voltamogramas de DP em solução tampão fosfato 0,1 M a pH = 7,00 estão expostos no gráfico da Fig. 4.4.



**Figura 4.4:** Gráfico 3D para voltamogramas de DP com linha de base corrigida, em tampão fosfato 0,1 M a pH = 7,0, obtidos para biossensores de RTX em multicamada (—) controle e (—) incubados a diferentes tempos com 10 mM de TCEP.

Apesar de o TCEP ser um agente redutor mais forte, não se verificou a ocorrência de novos picos para além da tirosina, como foi observado na experiência com o DTT. O resultado foi idêntico à ação do SDS, isto é, apenas a intensidade do

pico  $P_{\text{Tyr}}$  aumentou quando comparado com o controlo, corroborando o que se escreveu no Capítulo 3 quanto à dificuldade do TCEP em aceder à proteína total.

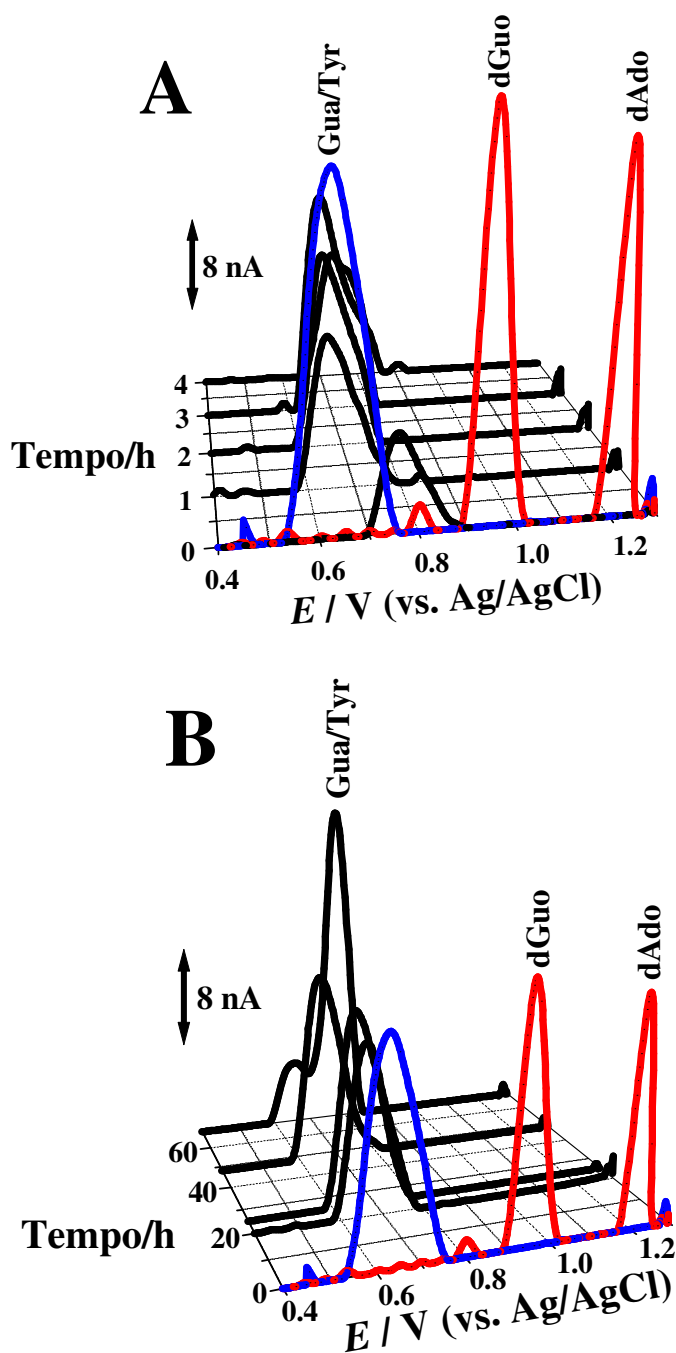
## 4.2 ESTUDO DA INTERAÇÃO RTX-DNA

### 4.2.1 DETECÇÃO ELECTROQUÍMICA DA INTERAÇÃO RTX - dsDNA, EM SOLUÇÃO

Como mencionado anteriormente, o efeito do RTX sob o DNA ainda não é conhecido, pelo que foi investigada a existência ou não de alterações ou danos oxidativos na sua estrutura. Caracterizando de uma forma completa o mecanismo de interação entre o RTX e o dsDNA, seria possível esclarecer sobre a ação do RTX como um antineoplásico genotóxico.

Estudos por voltametria de DP usando o GCE foram levados a cabo para concluir sobre a capacidade de o RTX induzir alterações estruturais ou mesmo conformacionais na molécula de DNA. Assim, numa primeira abordagem, foram realizadas experiências em solução por incubação em diferentes períodos de tempo de 250  $\mu\text{g/mL}$  de dsDNA com 2500  $\mu\text{g/mL}$  de RTX, em tampão fosfato 0,1 M a  $\text{pH} = 7,4$ . Após cada tempo de incubação, a interação entre RTX-dsDNA foi caracterizada electroquimicamente. Entre cada experiência, a superfície do eléctrodo foi bem limpa para evitar falsos positivos e para evitar a diminuição das correntes de oxidação por adsorção dos compostos à superfície do eléctrodo.

A interação RTX-dsDNA foi avaliada electroquimicamente tendo em conta alterações dos picos de oxidação característicos da molécula de dsDNA em solução a  $\text{pH} = 7,4$ , desoxiguanosina (dGuo)  $E_{\text{dGuo}} = + 0,90 \text{ V}$  e desoxiadenosina (dAdo)  $E_{\text{dAdo}} = + 1,17 \text{ V}$ , e pela monitorização do aparecimento dos seus respetivos produtos de oxidação, a 8-OxoGua ou a 2,8-DHA a  $+ 0,35 \text{ V}$ . Soluções controlo de 250  $\mu\text{g/mL}$  de dsDNA foram também preparadas e incubadas apenas em tampão fosfato por igual período e avaliadas electroquimicamente, após esse tempo.



**Figura 4.5:** Voltamogramas de DP com correção de linha de base obtidos para uma solução de 250  $\mu\text{g/mL}$  dsDNA em solução tampão fosfato 0,1 M a  $\text{pH} = 7,4$ : (—) controle e (—) incubada com 2500  $\mu\text{g/mL}$  de RTX durante: (A) 1 h, 2 h, 3 h e 4 h e (B) 24 h, 48 h e 72 h. (—) filme RTX monocamada.

A primeira medida electroquímica realizada foi imediatamente após adição do RTX ao dsDNA - tempo 5 minutos. O voltamograma de DP registado na amostra não detetou qualquer pico referente à electrooxidação do dsDNA, observando-se o

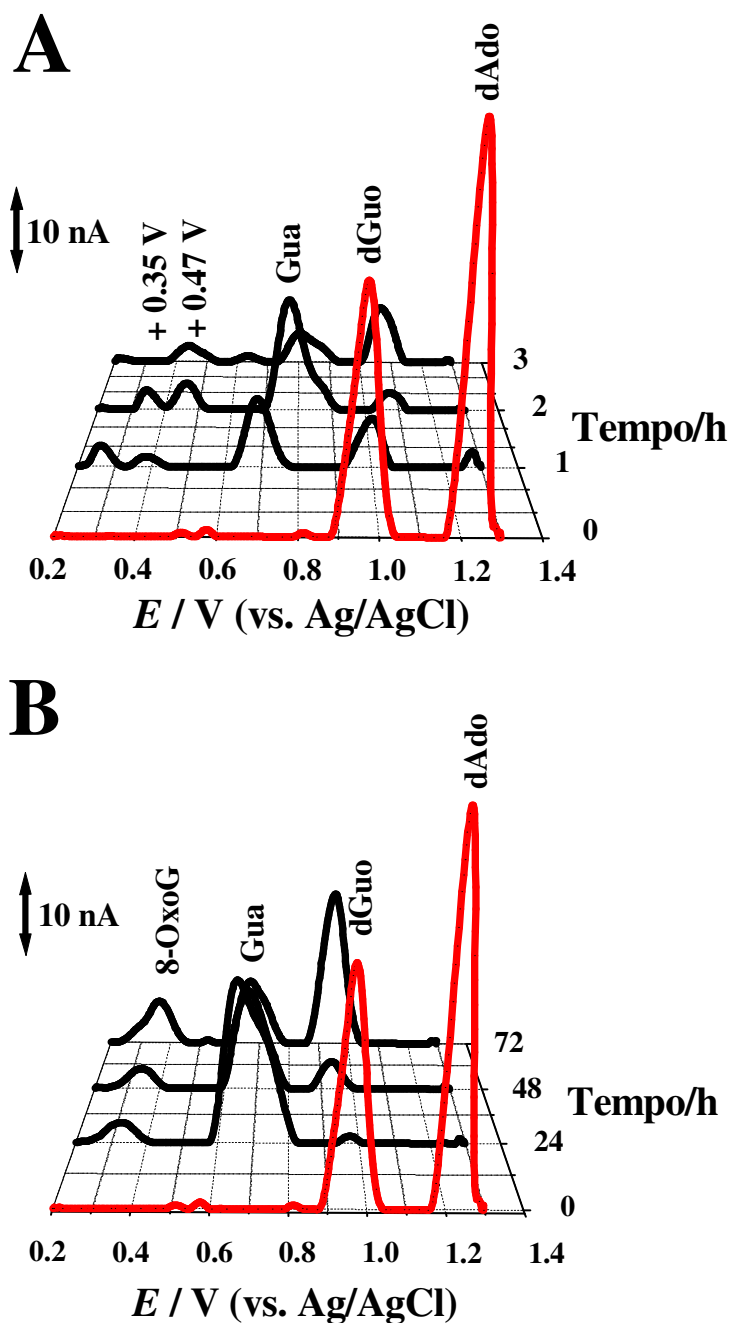
aparecimento de um novo pico com baixo valor de corrente, a potenciais inferiores, Fig. 4.5 (A). Este resultado pode levar a pensar que a molécula do dsDNA condensou completamente mediante a interação do RTX (com carga *net* positiva) com os grupos negativos dos fosfatos. Até 4 h de interação, apesar do novo pico continuar a ser detetado, as suas correntes de oxidação são maiores. Pode estar a ocorrer uma de três situações: 1) sendo o seu valor de potencial muito próximo do valor do pico de oxidação da tirosina,  $P_{Tyr}$ , incluída na estrutura do RTX (secção 1.3.1), como confirmado na secção 4.1 do presente capítulo, e uma vez que eles existem em solução na razão de 1:10 dsDNA: RTX, é possível que a resposta do dsDNA seja mascarada pelo RTX; 2) o pico corresponde ao RTX interagindo electrostaticamente com o DNA; 3) a guanina livre também se oxida a este valor de potencial, o que pode levar a inferir que houve interação imediata entre o RTX e o dsDNA com depurinação, mais especificamente, com a libertação da guanina (Gua).

Para tempos longos de interação, Fig 4.4 (B), o comportamento manteve-se constante, com um maior aumento das intensidades de correntes. No último tempo, 69 h, observa-se desdobramento do pico, o que poderá estar a indicar o início do efeito do RTX sob o dsDNA. Pode concluir-se, assim, que neste procedimento não ocorreram danos oxidativos na molécula de DNA e que é necessário realizar estudos adicionais para conseguir identificar o novo pico obtido.

#### **4.2.2 ESTUDO *IN-SITU* DA INTERAÇÃO RTX - dsDNA COM UM BIOCSENSOR ELECTROQUÍMICO DE DNA**

De modo a confirmar os resultados obtidos para a interação do RTX com o dsDNA em solução, preparou-se um biossensor electroquímico de DNA de multicamada à superfície do eléctrodo garantindo que o RTX não chega à superfície do eléctrodo e que a resposta electroquímica seja exclusivamente devida a alterações provocadas no DNA. Após preparação dos biossensores de DNA, como descrito no Capítulo 2, a interação entre os dois compostos foi seguida por diferentes períodos tempos após incubação com RTX 2500 µg/mL, comparando as variações dos picos de electrooxidação característicos do dsDNA e o aparecimento ou não dos picos respetivos da oxidação dos seus produtos. Os estudos foram realizados em tempos curtos, de 1 h até 4 h, e em tempos longos de interação, de 24 h a 72 h. Como controlo,

biossensores de dsDNA também foram preparados e incubados em tampão fosfato por igual período de tempo.



**Figura 4.6:** Voltamogramas de DP com correção de linha de base obtidos para biossensor electroquímico de dsDNA em solução tampão fosfato 0,1 M a pH = 7,0 (—) controlo e (—) incubada com 2500  $\mu\text{g/mL}$  de RTX durante: (A) 1 h, 2 h, 3 h e 4 h e (B) 24 h, 48 h e 72 h.



No intervalo de tempo entre 1 h e 4 h, observaram-se bastantes diferenças comparativamente aos estudos realizados em solução, Fig. 4.6 (A). Verifica-se o desaparecimento do pico referente à dAdo enquanto que o pico referente à oxidação da dGuo decresce de intensidade, inferindo uma maior afinidade de interação do RTX para os resíduos de deoxiadenosina na molécula do dsDNA. Para além disto, confirma-se a elevada condensação do dsDNA uma vez que esta alteração estrutural leva a que haja uma grande dificuldade no contacto das bases com a superfície do eléctrodo provocando, assim, a diminuição da intensidade dos picos respetivos. O pico detetado a um potencial inferior relativamente à dGuo,  $E = + 0,69$  V, diz respeito à oxidação da molécula de guanina livre (Gua) a  $E_{\text{Gua}} = + 0,68$  V, libertada da estrutura do dsDNA. Isto porque o biossensor está completamente coberto com o dsDNA e porque a definição dos picos traduz apenas uma resposta electroquímica. Deste modo, pode concluir-se que para além de interações electrostáticas entre o RTX e a molécula de dsDNA, a proteína provoca danos oxidativos já que a depurinação resulta da oxidação no carbono C<sub>1</sub> na molécula de desoxirribose do DNA. Para além disto, podem-se observar picos de baixa intensidade de corrente aos potenciais + 0,35 V e + 0,47 V iniciando o início do processo de oxidação dos resíduos de dAdo/dGuo com produção de 2,8-DHA/8-OxoG, respetivamente.

Para tempos mais longos de interação, Fig. 4.6 (B), o pico da dAdo continua a não ser detetado o que prova com clareza a forte interação entre o RTX e esta base azotada. Ocorreram também danos oxidativos na molécula de dsDNA, acentuados pela definição do pico a potenciais mais reduzidos,  $E = + 0,33$  V, correspondente à formação de 2,8-DHA ou de 8-OxoG.

A interação entre o RTX e o dsDNA parece ser bastante peculiar. Isto porque não existe uma evolução gradual da resposta electroquímica, mas sim uma dinâmica intemporal. Quer isto dizer que o processo é desigual e reversível pelo facto de, por exemplo, a 72h e a 3h haver desnaturação da molécula de DNA por aumento da intensidade do pico de dGuo. O mesmo acontece para o processo de depurinação, em que, para 2h e 24h de interação, se observa uma maior oxidação da dGuo com libertação da guanina para a solução. Isto deve-se essencialmente à complexidade estrutural tanto do dsDNA como do RTX.

Pode concluir-se, assim, que o processo de interação entre o RTX e o dsDNA é dinâmico promovendo alterações estruturais parciais, mas havendo sempre oxidação numa das purinas com formação ou de 8-OxoG ou de 2,8-DHA.

# *CAPÍTULO 5*

---

CONCLUSÕES

Ao longo deste trabalho, o comportamento electroquímico do RTX na superfície do GCE, bem como a sua interação com o dsDNA foram investigados, numa ampla gama de pH utilizando técnicas voltamétricas.

Uma vez que o RTX é uma proteína bastante complexa, foi desenhado um protocolo minucioso de modo a contemplar o estudo da sua desnaturação por ação de desnaturantes e de agentes redutores. Foi, assim, necessário averiguar os mecanismos de oxidação do SDS, agente desnaturante escolhido que não mostrou electroatividade à superfície do eléctrodo, ao contrário do DTT e do TCEP, agentes redutores utilizados.

O oxidação electroquímica dos agentes redutores foi investigada por CV e por voltametria de DP numa vasta gama de pH, num eléctrodo de carbono vítreo. O mecanismo de oxidação de ambos é um processo dependente de pH, irreversível, controlado por difusão e que ocorre em um passo, com a transferência de dois electrões seguida de desprotonação. No caso do DTT, a oxidação ocorre no grupo tiol que tem um pKa de 8,3, enquanto que a oxidação do TCEP ocorre na fosfina central da molécula. Contudo, na oxidação do TCEP em meio neutro, o radical formado poderá reagir com outros radicais, formando um polímero na superfície do GCE com bloqueio do eléctrodo e dificultando a transferência dos electrões. Os resultados mostram ainda que nenhum dos agentes redutores originam produtos de oxidação electroativos. Os coeficientes de difusão calculados para os agentes redutores foram: a pH = 7,0 para o DTT, de  $D_{\text{DTT}} = 2,83 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  e a pH = 4,0 para o TCEP de  $D_{\text{TCEP}} = 1.12 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ .

Numa proteína, os aminoácidos que são oxidados e detetados electroquimicamente são: metionina, tirosina, histidina, triptofano e cisteína. Tendo como base estudos dos seus mecanismos de oxidação previamente realizados, foi possível concluir sobre a resposta electroquímica do RTX no GCE.

Em primeiro lugar, foi realizado o estudo electroquímico para o RTX na sua forma nativa, por imobilização do RTX em monocamada para uma vasta gama de pH. Observou-se o aparecimento do pico correspondente à oxidação da tirosina para todos os pH, enquanto que para pH = 3,0 e 4,0 observou-se também o aparecimento do pico de oxidação da metionina.

Sendo o RTX constituído por vários aminoácidos electroativos pensou-se que ao desestabilizar a cadeia polipeptídica, deveria ser possível caracterizar ainda melhor

o RTX. Deste modo, efetuaram-se incubações de biossensores electroquímicos de RTX com o SDS, o DTT e o TCEP, durante vários períodos de tempo numa solução fosfato 0,1 M pH = 7,0. O SDS aumentou o número de tirosinas detetadas quando comparado com o controlo, mas deu origem a picos de oxidação com uma grande largura a meia altura, inferindo a existência de outros aminoácidos possíveis de serem detetadas. O DTT, a partir de 60 minutos de incubação, inclusive, permitiu uma desestabilização de tal modo que foi possível detetar os dois passos de oxidação do triptofano na superfície do eléctrodo, bem como a oxidação da histidina e da tirosina já encontrada para o RTX nativo. Apesar de o TCEP ser um agente redutor mais forte que o DTT, a sua dificuldade em aceder às pontes dissulfeto é maior e os resultados da sua incubação com o RTX demonstraram isso mesmo: só foi possível aumentar o número de tirosinas detectáveis, tal como aconteceu com o SDS.

Colocar o RTX em contacto com o dsDNA era o grande desafio deste trabalho. Não existe qualquer referência de que alguma vez se tenha observado a interação do RTX com o DNA, para além do receptor CD20. Os resultados apresentados indicam que o RTX pode provocar diversos efeitos sobre a estrutura do B-DNA. O pico da dAdo desapareceu por completo nas experiências com os biossensores, demonstrando que o RTX tem preferência de interação com este desoxirribonucleótido e também o pico da dGuo reduziu de intensidade. Estes resultados indicam que o RTX induz a condensação do DNA, já que as bases deixam de estar disponíveis a transferir electrões para a superfície do eléctrodo. Para além desta desestabilização, o RTX provocou danos oxidativos na molécula de dsDNA, confirmado pelo aparecimento do pico correspondente à oxidação da guanina livre (depurinação) e do pico correspondente à 8-oxoGuanina, produto de oxidação da dGuo. O processo de interação entre RTX-dsDNA mostrou ser bastante dinâmico e independente do tempo de interação.

Tendo em conta os resultados aqui apresentados, é possível pensar que o RTX possa afectar os linfócitos B envolvido nas diversas patologias para as quais o fármaco é administrado, por interação com o DNA. Mais uma vez, as técnicas electroquímicas demonstraram ser vantajosas para estudos preliminares da interação entre diversos compostos.

# *REFERÊNCIAS*

---

- [1] King RJB (2000) Cancer Biology, 2nd Edition. *Pearson Education Limited*, England.
- [2] Ruddon RW (2007) Cancer Biology, 4th Edition. *Oxford University Express*, United States of America.
- [3] Oliveira SCB and Oliveira-Brett AM (2010) DNA-Electrochemical biosensors: AFM surface characterization and application to detection of *in situ* oxidative damage to DNA. *Comb Chem high Throughput Screen* **13**: p. 628-40.
- [4] Palecek E (2005) Electroactivity of Proteins: Possibilities in biomedicine and proteomics. *Perspectives in Bioanalysis* **I**: p. 679-750.
- [5] Watson JD and Crick FHC (1953) A structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* **171**: p. 737-738.
- [6] Voet D and Voet JG (2011) Biochemistry, 4th Edition. *Wiley*, United States of America.
- [7] Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey JL *et al* (2011) Analysis of anticancer drugs. *Talanta* **85**: p. 2265-2289.
- [8] Lind MJ (2011) Principles of cytotoxic chemotherapy. *Medicine* **39**: p. 711-716.
- [9] Almeida VL, Leitão A, Reina LCB *et al* (2005) Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Química Nova* **28**: p. 118-129.
- [10] Neves AP and Vargas MD (2011) Complexos de platina (II) na terapia do câncer. *Revista Virtual de Química* **3**: p. 196-209.
- [11] Wang D and Lippard SJ (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs, *Nature Reviews Drug Discovery* **4**: p. 307-320.
- [12] Frese S and Diamond B (2011) Structural modification of DNA - a therapeutic option in SLE? *Nature Reviews Rheumatology* **7**: p. 733-738.
- [13] Ahmad N and Kumar R (2011) Steroid hormone receptors in cancer development: A target for cancer therapeutics. *Cancer Letters* **300**: p. 1-9.
- [14] Binyamin L, Borghaei H and Weiner LM (2006) Cancer therapy with engineered monoclonal antibodies. *Update on Cancer Therapeutics* **I**: p. 147-157.

- [15] Reff ME, Carner K, Chambers KS *et al.* (1994) Depletion of B cells *in vivo* by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* **83**: p. 435-445.
- [16] Wood AM (2001) Rituximab: an innovative therapy for non-Hodgkin's lymphoma. *American Journal of Health-System Pharmacology* **58**: p. 215-229.
- [17] Gurcan HM, Keskin DB, Stern JNH *et al.* (2009) A review of the current use of rituximab in autoimmune diseases. *International Immunopharmacology* **9**: p. 10-25.
- [18] Pescovitz MD, Greenbaum CJ, Krause-Steinrauf H *et al.* (2009) Rituximab, B-lymphocyte depletion and preservation of beta-cell function. *The New England Journal of Medicine* **361**: p. 2143-2152.
- [19] Du J, Wang H, Zhong C *et al.* (2007) Structural basis for recognition of CD20 by therapeutic antibody Rituximab. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: p. 1503-15080.
- [20] Perosa F, Favoino E, Caragnano MA *et al.* (2005) CD20: a target antigen for immunotherapy of autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews* **4**: p. 526-531.
- [21] Schilling C. (2003) Immunotherapy with anti-CD20 compounds. *Sem. In Canc. Biology* **13**: p. 211-222.
- [22] Polyak MJ, Li H, Shariat N *et al.* (2008) CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: p. 18545-18552.
- [23] Walshe CA, Beers, SA, French RR *et al.* (2008) Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B cell receptor signaling. *The Journal of Biological Chemistry* **283**: p. 16971-16984.
- [24] Janas E, Priest R, Wilde JI *et al.* (2005) Rituxan (anti-CD20 antibody)-induced translocation of CD20 into lipid rafts is crucial for calcium influx and apoptosis. *Clinical and Experimental Immunology*. **139**: p. 439-446.
- [25] Mitchell R. Smith (2003) Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* **22**: p. 7359-7368.
- [26] Rezvani AR and Maloney DG (2011) Rituximab resistance. *B Practice & R Clin Haematology* **24**: p. 203-216.
- [27] Alduaij W and Illidge T (2010) The future of anti-CD20 monoclonal antibodies: are we making progress? *Blood* **117**: p. 2993-2999.

- [28] Flieger D, Renoth D, Tilman *et al* (2000) Mechanism of cytotoxicity induced by chimeric house human monoclonal antibody IDEC-C2B8 in CD20-expressing lymphoma cell lines. *Cell Immunol* **204**: p. 55-63.
- [29] Clynes RA, Towers TL, Presta LG *et al* (2000) Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* **6**: p. 443-446.
- [30] Hilchey AP, Hyrien O, Mosmann TR *et al* (2009) Rituximab immunotherapy results in the induction of a lymphoma idiotype-specific T-cell response in patients with follicular lymphoma: support for a “vaccinal effect” of rituximab. *Blood* **113**: p. 3809–3812.
- [31] Brett CMA and Oliveira-Brett AM (1993) Electrochemistry. Principles, Methods and Applications. *Oxford University Press* United States of America.
- [32] Brett CMA and Oliveira-Brett AM (1998) Electroanalysis. *Oxford University Press* United States of America.
- [33] Oliveira-Brett AM, Piedade JAP, Silva LA, Diculescu VC (2004) Voltammetric determination of all DNA nucleotides. *Analytical Biochemistry* **332**: p. 321–329.
- [34] Bartlett PN (edited) (2008) Bioelectrochemistry: Fundamentals, Experimental Techniques and Application. *John Wiley and Sons* p. 411-436.
- [35] Butterfield DA and Sultana R (2011) Methionine-35 of  $\alpha\beta$  (1-42): Importance for oxidative stress in Alzheimer Disease. *Journal of Amino Acids* **2011**: p. 1-10.
- [36] Enache TA and Oliveira-Brett AM (2011) Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine. *Bioelectrochemistry* **81**: p. 46-52.
- [37] Enache TA and Oliveira-Brett AM (2011) Phenol and para-substituted phenols electrochemical oxidation pathways. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **655**: p. 9-16.
- [38] Tese de Doutorado de Teodor Adrian Enache (2011) Mecanismos redox de compostos aromáticos, aminoácidos e proteínas, em eléctrodos de carbono. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra p. 189-194.
- [39] Enache TA and Oliveira-Brett AM (2011) Pathways of electrochemical oxidation of indolic compounds. *Electroanalysis* **23**: p. 1337-1344.



- [40] Cleland WW (1963) Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* **3**: p. 480-482.
- [41] Zahler WL and Cleland WW (1967) A Specific and sensitive assay for disulfides. *The Journal of Biological Chemistry* **243**: p. 716-719.
- [42] Getz EB, Xiao M, Chakrabarty T *et al* (1999) A comparison between the sulfhydryl reductants tris(2-carboxyethyl)phosphine and dithiothreitol for use in protein biochemistry. *Analytical Biochemistry* **273**: p. 73-80.
- [43] Choi NS, Chung DM, Yoon KS *et al* (2005) A Method for direct application of human plasmin on a dithiothreitol-containing agarose stacking gel system. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* **38**: p. 763-765.
- [44] Burns JA, Butler JC, Moran J, *et al* (1991) Selective reduction of disulfides by tris(2-carboxyethyl)phosphine. *Journal of Organic Chemistry* **56**: p. 2648-2650
- [45] Ruegg UT and Rudinger J (1977) Cleavage of disulfide bonds in proteins. *Methods Enzymology* **47**: p. 111-114.
- [46] Han JC and Han GY (1994) A Procedure for quantitative determination of tris(2-carboxyethyl)phosphine, an odorless reducing agent more stable and effective than dithiothreitol. *Analytical Biochemistry* **220**: p. 5-10.