



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências da Saúde

Nanosistema de entrega de fármacos para o tratamento de infeções por HPV

(Versão Final Após Defesa Pública)

Francisca Ferreira Antunes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof. Doutora Carla Cruz

Covilhã, outubro de 2018

O conteúdo do presente trabalho é da exclusiva responsabilidade do autor:

(Francisca Ferreira Antunes)

Dedicatória

Ao meu avô, Júlio Valente Ferreira.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à minha orientadora, professora Carla Cruz, por me ter dado a oportunidade de desenvolver este tema com motivação e interesse.

Aos meus colegas de laboratório, Josué Carvalho e Tiago Santos, pelo apoio e partilha de conhecimentos.

Às minhas fiéis companheiras e amigas, Catarina Lopes e Márcia Ribeiro, por terem sido as melhores surpresas deste ano. Obrigada por nunca me terem deixado baixar os braços e por estarem ao meu lado nos bons e nos maus momentos.

Por último, mas não menos importante, à minha mãe, ao meu pai, ao meu irmão, à minha avó, ao meu tio e à Noa por terem sido o meu grande pilar e me terem ensinado que a vida é muito mais do que uma etapa e o mais importante é estarmos orgulhosos de nós mesmos.

Um reconhecimento especial ao meu avô Júlio, o grande amor da minha vida, que apesar de já não estar ao meu lado me deu a força necessária para ir à luta e mostrar o meu valor. Esta vitória é para ti!

Resumo

O AS1411 é uma sequência de oligonucleótidos rica em guaninas e altamente polimórfica, apresentando uma ampla variedade de estruturas de G-quadruplex (G4). Este aptamero é seletivo para a nucleolina (NCL), uma proteína sobre-expressa em muitas células cancerosas e que se apresenta como um potencial alvo terapêutico. Devido à ligação à NCL, o aptamero G4 AS1411 pode ser internalizado por estas células.

Embora o G4 AS1411 apresente um perfil de segurança e capacidade de induzir respostas em alguns pacientes, é importante melhorar a sua farmacologia e potência, de forma a proporcionar uma melhor eficácia. Deste modo, novos derivados do G4 AS1411, como o G4 AT11-B0, foram desenvolvidos.

O uso de aptameros derivados do G4 AS1411 para fins terapêuticos requer a sua estabilização através da presença de ligandos. Macrociclos derivados de fenantrolina, como o [32]phen₂N₄ e [16]phenN₂, e derivados de laranja de acridina, como o C₈, C₈-NH₂, C₅ e C₃, são apresentados como potenciais ligandos do G4 AT11-B0.

O objetivo deste trabalho é desenvolver nanosistemas conjugados G4 AT11-B0-ligandos e avaliar os seus efeitos *in vitro* na linha celular do cancro do colo do útero (HeLa) *versus* fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF).

Estudos de estabilização e afinidade dos ligandos em relação ao G4 AT11-B0 foram realizados por espectroscopia de dicroísmo circular e de fluorescência. Os resultados revelaram alta afinidade e estabilização térmica dos ligandos [32]phen₂N₄ ($K_D = 2,1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$) e C₈ ($\Delta T_m = 44,5 \text{ }^\circ\text{C}$), respetivamente, em relação ao G4 AT11-B0. Os conjugados, os ligandos e o G4 AT11-B0 foram incubados em células HeLa e NHDF e posteriormente fez-se uma avaliação da citotoxicidade celular através do ensaio de MTT. Os conjugados G4 AT11-B0-C₃ e G4 AT11-B0-C₅ apresentaram as menores percentagens de viabilidade celular, 17 % e 10,7 %, respetivamente, nas células HeLa. No ensaio de microscopia de fluorescência confocal observou-se a internalização celular do conjugado G4 AT11-B0-C₈.

O presente trabalho relata a importância do uso de nanosistemas conjugados formados por derivados do G4 AS1411 e ligandos como agentes anticancerígenos, inibindo a proliferação de células cancerosas, com danos mínimos nas células saudáveis.

Palavras-chave

G-quadruplex, Derivados do AS1411, AT11-B0, Ligandos, Nanosistema, Cancro do colo do útero.

Abstract

AS1411 is a G-rich oligonucleotide sequence highly polymorphic, presenting a wide variety of G-quadruplex (G4) structures. This aptamer exhibits selectivity to nucleolin (NCL), a protein overexpressed in many tumour cells and which presents itself as a potential therapeutic target. Due to the binding to NCL, G4 AS1411 aptamer can be internalized by these cells.

Although G4 AS1411 has a safety profile and ability to induce responses in some patients, it is important to improved pharmacology and potency for better efficacy. By this way, new G4 AS1411 derivatives aptamers, like G4 AT11-B0, have been developed.

The use of G4 AS1411 derivatives aptamers for therapeutic purposes requires their stabilization with ligands. Phenanthroline macrocycles, such as [32]phen₂N₄ and [16]phenN₂, and acridine orange derivatives, such as C₈, C₈-NH₂, C₅ and C₃, are presented as potential binders of G4 AT11-B0.

The aim of this study is to develop G4 AT11-B0-ligands conjugated nanosystems and evaluate their biological effects in human cervical cancer cell line (HeLa) *versus* normal human dermal fibroblasts (NHDF).

In order to evaluate the stability and affinity of ligands to G4 AT11-B0, circular dichroism and fluorescence spectroscopy were performed. The results revealed high affinity and G4 thermal stabilization of [32]phen₂N₄ ($K_D = 2.1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$) and C₈ ($\Delta T_m = 44.5 \text{ }^\circ\text{C}$), respectively. The conjugated, ligands and G4 AT11-B0 were transfected into HeLa and NHDF and the cytotoxicity was assessed by MTT assay. The G4 AT11-B0-C₃ and G4 AT11-B0-C₅ conjugated showed low percentages of cellular viability, 17 % and 10.7 %, respectively, on HeLa. Confocal fluorescence microscopy revealed cellular uptake of the G4 AT11-B0-C₈ conjugated.

The present work reports the importance of using G4 AS1411 derivative-ligands conjugated nanosystems as anticancer agents, inhibiting the proliferation of cancer cells, with minimal damages on healthy cells.

Keywords

G-quadruplex, AS1411 derivatives, AT11-B0, Ligands, Nanosystem, Cervical cancer.

Índice

1. Introdução	1
1.1 Cancro	1
1.1.1 Cancro do colo do útero	2
1.2 Aptameros de ácidos nucleicos	3
1.3 Estrutura e topologia de G-quadruplex (G4)	4
1.4 Características biológicas das estruturas de G-quadruplex (G4)	5
1.5 G-quadruplex (G4) no genoma humano	6
1.5.1 G-quadruplex (G4) teloméricos.....	6
1.5.2 G-quadruplex (G4) promotores	8
1.6 Aplicações terapêuticas de aptameros de G-quadruplex (G4)	8
1.7 Aptamero de G-quadruplex (G4) AS1411	11
1.7.1 Fases do desenvolvimento clínico do G-quadruplex (G4) AS1411.....	13
1.7.2 Aptameros derivados do G-quadruplex (G4) AS1411	14
1.8 Ligandos de G-quadruplex (G4)	16
1.8.1 Derivados de laranja de acridina	17
1.8.2 Macrociclos derivados de fenantrolina	19
2. Objetivos	21
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Síntese de ligandos de G-quadruplex (G4)	23
3.1.1 Síntese do ligando de partida 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona (C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₂)	23
3.1.2 Síntese do ligando de partida 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona (C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₂) com um novo protocolo.....	24
3.1.3 Síntese do ligando 6,9-dimetil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina (C ₁₅ H ₁₂ N ₄)	25
3.1.4 Síntese do ligando 6,9-dimetil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina (C ₁₅ H ₁₂ N ₄) com um novo protocolo	26
3.1.5 Síntese do ligando 1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina-6,9-dicarbaldeído (C ₁₅ H ₈ N ₄ O ₂)	27
3.1.6 Síntese do ligando de partida 2,9-dicarbaldeído-1,10-fenantrolina (C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₂)	28
3.1.7 Síntese do ligando 2,9-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina (C ₁₄ H ₁₂ N ₂ O ₂)..	29
3.1.8 Síntese do ligando 2,9-bis(bromometil)-1,10-fenantrolina (C ₁₄ H ₁₀ Br ₂ N ₂)..	30

3.1.9	Síntese do ligando 2,2'-((etano-1,2-diilbis(azanodiil))bis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) (C ₂₂ H ₂₂ N ₄ O ₄)	30
3.1.10	Síntese do ligando 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) (C ₂₀ H ₁₇ N ₃ O ₄)	31
3.1.11	Síntese do ligando N,N'-((1,10-fenantrolina-2,9-diil)bis(metileno))bis(3-(4-(3-aminopropil)piperazin-1-il)propan-1-amina) (C ₃₄ H ₅₆ N ₁₀)	33
3.2	Preparação do aptamero e dos ligandos	34
3.3	Espectro de Diferença Térmica (TDS)	35
3.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	35
3.5	Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	36
3.6	Espectroscopia de Fluorescência	36
3.7	Ensaio de Viabilidade Celular	38
3.8	Microscopia de Fluorescência Confocal	39
4.	Resultados e Discussão	41
4.1	Espectro de Diferença Térmica (TDS)	41
4.2	Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)	41
4.3	Espectroscopia de Fluorescência	48
4.4	Ensaio de Viabilidade Celular	52
4.4.1	Determinação dos valores de IC ₅₀ dos ligandos incubados nas linhas celulares HeLa e NHDF	52
4.4.2	Conjugados G4 AT11-B0-ligandos derivados de laranja de acridina incubados nas linhas celulares HeLa e NHDF	57
4.5	Microscopia de Fluorescência Confocal	59
5.	Conclusões e Perspetivas Futuras	63
6.	Referências	65
7.	Anexo I	75
8.	Anexo II: Comunicações em forma de poster	77

Lista de Figuras

Figura 1: Etapas do processo de carcinogénese. Adaptado de ^[3] .	1
Figura 2: Estrutura unimolecular, biomolecular e tetramolecular de G4. Adaptado de ^[17] .	5
Figura 3: Topologias de G4. Adaptado de ^[24] .	5
Figura 4: Formação de G4 no ADN telomérico e ação da telomerase. Adaptado de ^[34] .	7
Figura 5: Formação de G4 em promotores. Adaptado de ^[34] .	8
Figura 6: Mecanismos de acumulação seletivos do G4 AS1411. Adaptado de ^[45] .	13
Figura 7: Efeito do G4 AS1411 em células malignas e em células normais. Adaptado de ^[15] .	14
Figura 8: Estruturas de ligandos de G4. Adaptado de ^[57] ^[58] .	17
Figura 9: Estrutura dos derivados de laranja de acridina. A vermelho a unidade aromática planar, a azul os substituintes de alquilamida e a verde o anel de iodobenzeno. Adaptado de ^[59] .	18
Figura 10: Estruturas dos macrociclos derivados de fenantrolina. A azul a(s) unidade(s) de fenantrolina e a preto a cadeia de poliamina. Adaptado de ^[55] .	19
Figura 11: Síntese do ligando de partida 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona. Adaptado de ^[63] .	24
Figura 12: Síntese do ligando de partida 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona. Adaptado de ^[64] .	25
Figura 13: Síntese do ligando 6,9-dimetil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina. Adaptado de ^[65] .	26
Figura 14: Síntese do ligando 6,9-dimetil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina. Adaptado de ^[66] .	27
Figura 15: Síntese do ligando 1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina-6,9-dicarbaldéido. Adaptado de ^[60] .	28

Figura 16: Síntese do ligando de partida 2,9-dicarbaldeído-1,10-fenantrolina. Adaptado de ^[67]	29
Figura 17: Síntese do ligando 2,9-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina. Adaptado de ^[67]	29
Figura 18: Síntese do ligando 2,9-bis(bromometil)-1,10-fenantrolina. Adaptado de ^[67]	30
Figura 19: Síntese do ligando 2,2'-((etano-1,2-diilbis(azanodiil))bis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona). Adaptado de ^[68] ^[69]	31
Figura 20: Síntese do ligando 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona). Adaptado de ^[68] ^[69]	33
Figura 21: Síntese do ligando N,N'-((1,10-fenantrolina-2,9-diil)bis(metileno))bis(3-(4-(3-aminopropil)piperazin-1-il)propan-1-amina). Adaptado de ^[70]	34
Figura 22: TDS normalizado do G4 AT11-B0 em tampão de KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ a 30 mM, contendo 100 mM de KCl, resultante da subtração do espectro de 20 °C ao espectro de 90 °C.....	41
Figura 23: Espectro de CD ilustrativo da topologia paralela apresentada pelo G4 AT11-B0 em (A) tampão de KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ a 30 mM, contendo 100 mM de KCl e em (B) tampão de KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ a 1 mM (pH 7,1), contendo LiCl a 90 mM e 10 mM de KCl. .	42
Figura 24: Ligandos derivados de laranja de acridina e respectivas diferenças no comprimento da cadeia lateral de alquilamida e a ausência do anel de iodobenzeno no ligando C ₈ -NH ₂ . Adaptado de ^[59]	44
Figura 25: Estrutura do ligando 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona). A laranja as duas unidades de isoindolina-1,3-diona e a preto a cadeia de poliamina. Adaptado de ^[68] ^[69]	45
Figura 26: Estrutura do ligando PhenDC ₃ . A azul a unidade de fenantrolina e a rosa as duas cadeias laterais com os anéis de quinolina. Adaptado de ^[79]	45
Figura 27: Curvas de desnaturação do G4 AT11-B0 na presença de (A) [32]phen ₂ N ₄ , (B) [16]phenN ₂ , (C) C ₈ , (D) C ₈ -NH ₂ , (E) C ₅ , (F) C ₃ , (G) 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) e (H) PhenDC ₃ de 0 a 4 equivalentes.	47
Figura 28: Espectros de emissão de fluorescência de (A) [32]phen ₂ N ₄ e (B) [16]phenN ₂ com concentrações crescentes de G4 AT11-B0 (0 - 10 μM) e respectivos gráficos de <i>saturation binding</i>	49

Figura 29: Espectros de emissão de fluorescência de (A) C ₈ , (B) C ₈ -NH ₂ , (C) C ₃ e (D) C ₅ com concentrações crescentes de G4 AT11-B0 (0 - 10 μM) e respectivos gráficos de <i>saturation binding</i>	51
Figura 30: Curvas dose-resposta dos ligandos (A) C ₈ , (B) C ₈ -NH ₂ , (C) C ₃ , (D) C ₅ , (E) [16]phenN ₂ e (F) 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) incubados em células HeLa.	55
Figura 31: Curvas dose-resposta dos ligandos (A) C ₈ , (B) C ₈ -NH ₂ , (C) C ₃ , (D) C ₅ , (E) [16]phenN ₂ e (F) 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) incubados em células NHDF.	56
Figura 32: Viabilidade celular, em porcentagem, dos ligandos derivados de laranja de acridina, do aptamero G4 AT11-B0 e dos respectivos conjugados incubados nas células (A) HeLa e (B) NHDF.	59
Figura 33: Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células HeLa tratadas com 0,5 μM de C ₈ (segunda coluna), com 1 μM de 5'-Cy5-G4 AT11-B0 (terceira coluna) e o conjugado 5'-Cy5-G4 AT11-B0-C ₈ (terceira coluna). Na primeira coluna estão marcados os núcleos a azul. As setas de cor branca, rosa e amarela representam a internalização do ligando C ₈ , do 5'-Cy5-G4 AT11-B0 e do conjugado, respectivamente. Escala 22 μm, objetiva 63x.	61
Figura 34: Espectros de ¹ H RMN dos ligandos (A) 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona e (B) 2,9-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina.	76

Lista de Tabelas

Tabela 1: Aplicações de aptameros de G4. Adaptado de ^[18]	9
Tabela 2: Estabilização térmica do G4 AT11 e respetivos derivados. Adaptado de ^[46] . 16	
Tabela 3: Massas obtidas e respetivos rendimentos resultantes das reações realizadas para a obtenção do ligando de partida 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona.	25
Tabela 4: Massas obtidas e respetivos rendimentos resultantes das reações realizadas para a obtenção do ligando de partida 2,9-dicarbaldéido-1,10-fenantrolina.	28
Tabela 5: Correlações obtidas nos espectros 2D HSQC, HMBC e COSY do ligando 2,2'-(azanodiilbis (etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona).	32
Tabela 6: Estabilização térmica induzida pelos ligandos no G4 AT11-B0.	47
Tabela 7: Valores de K_D obtidos a partir de titulações espectrofluorimétricas entre os ligandos e o G4 AT11-B0.	52
Tabela 8: Valores de IC_{50} de cada ligando nas linhas celulares HeLa e NHDF.	53

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
VPH	Vírus do papiloma humano
%	Por cento
kb	Quilobase
CIN	Neoplasias cervicais intraepiteliais
AIS	Adenocarcinomas <i>in situ</i>
ARN	Ácido ribonucleico
K_D	Constante de dissociação
kDa	Quilodalton
ARN _i	Ácido ribonucleico de interferência
ARN _m	Ácido ribonucleico mensageiro
G4	G-quadruplex
K ⁺	ião potássio
Na ⁺	ião sódio
pm	Picômetro
mM	Milimolar
min	Minuto
h	Hora
HeLa	Células do cancro do colo do útero
NCL	Nucleolina
BMVC	3,6-bis(1-metil-4-vinilpiridina)di-hidrodéno carbazole
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
PDGFR- β	Recetor β do fator de crescimento derivado das plaquetas
HIF-1 α	Fator 1 α induzido por hipoxia
VIH	Vírus da imunodeficiência humana
VHC	Vírus da hepatite C
SEC	Cromatografia de exclusão por tamanho
CD	Dicroísmo circular
nm	Nanómetro
mg	Miligramma
Kg	Quilograma
μ g	Micrograma
mL	Mililitro
μ M	Micromolar
IC ₅₀	Concentração que induz 50 % de inibição proliferativa
°C	Graus celsius
T_m	Temperatura de desnaturação (°C)
Da	Dalton
π	Pi
M	Molar
MCF-7	Células humanas do cancro da mama
NHDF	Fibroblastos dérmicos humanos normais
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
TDS	Espectro de diferença térmica

$C_{14}H_{10}N_2O_2$	2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona
g	Grama
$C_{14}H_{12}N_2$	2,9-dimetil-1,10-fenantrolina
KBr	Brometo de potássio
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HNO_3	Ácido nítrico
NaOH	Hidróxido de sódio
$CHCl_3$	Clorofórmio
Na_2SO_4	Sulfato de sódio
CH_3OH	Metanol
1H RMN	Ressonância magnética nuclear de próton
C_2D_6OS	Dimetilsulfóxido deuterado
$KBrO_3$	Bromato de potássio
CH_2Cl_2	Diclorometano
H_2O	Água
MHz	Megahertz
δ	Desvio químico (ppm)
ppm	Partes por milhão
d	Dupleto
H	Hidrogénio
s	Singleto
$C_{15}H_{12}N_4$	6,9-dimetil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina
C_2H_6O	Etanol
$[(CH_2)_6N_4]$	Hexametenotetramina
$C_2H_7NO_2$	Acetato de amónia
CH_3COOH	Ácido acético
NH_4O_2	Hidróxido de amónia
$C_{15}H_8N_4O_2$	1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina-6,9-dicarbaldeído
$C_4H_8O_2$	Dioxane
SeO_2	Óxido de selénio
μL	Microlitro
^{13}C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
$C_{14}H_8N_2O_2$	2,9-dicarbaldeído-1,10-fenantrolina
$C_{14}H_{12}N_2 \cdot 0.5H_2O$	2,9-dimetil-1,10-fenantrolina hemihidratada
C_4H_8O	Tetrahidrofurano
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
$C_{14}H_{12}N_2O_2$	2,9-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina
$NaBH_4$	Borohidreto de sódio
t	Tripleto
$C_{14}H_{10}Br_2N_2$	2,9-bis(bromometil)-1,10-fenantrolina
HBr	Ácido hidrobromico
Na_2CO_3	Carbonato de sódio anidro
$C_{22}H_{22}N_4O_4$	2,2'-((etano-1,2-diilbis(azanodiil))bis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona)
$C_6H_{18}N_4$	Trietilenotetramina
$C_8H_4O_3$	Anidrido ftálico
C_3H_8O	Propanol
$C_{20}H_{17}N_3O_4$	2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona)
$C_4H_{13}N_3$	Dietilenotriamina

DEPT	Espectroscopia sem distorção por transferência de polarização
C	Carbono
HSQC	Espectroscopia de correlação quântica heteronuclear única
HMBC	Espectroscopia de correlação heteronuclear múltipla
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear
J	Constante de acoplamento
C ₃₄ H ₅₆ N ₁₀	N,N'-((1,10-fenantrolina-2,9-diil)bis(metileno))bis(3-(4-(3-aminopropil)piperazin-1-il)propan-1-amina)
C ₇ H ₈	Tolueno
C ₁₀ H ₂₄ N ₄	1,4-bis(3-aminopropil)piperazina
G	Força gravitacional
A	Absorvância
UV	Ultravioleta
ϵ	Coeficiente de extinção molar
l	Largura da célula
(CH ₃) ₂ SO	Dimetilsulfóxido
Δ Abs	Varição da absorvância
KH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de potássio
K ₂ HPO ₄	Hidrogenofosfato dipotássico
KCl	Cloreto de potássio
RMN	Ressonância magnética nuclear
LiCl	Cloreto de lítio
mm	Milímetro
s	Segundo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
FBS	Soro bovino fetal
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
PBS	Solução salina com tampão fosfato
SEM	Erro padrão
Cy5	Fluoróforo cianina 5
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindole
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
ΔT_m	Varição da temperatura de desnaturação (°C)
A549	Células humanas do cancro do pulmão
WI-38	Fibroblastos humanos do tecido pulmonar
Hs27	Fibroblastos humanos da pele
λ	Comprimento de onda (nm)
μ m	Micrómetro
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>

1. Introdução

1.1 Cancro

O cancro é uma doença mundial, cujo nível de incidência vai aumentando ao longo dos anos. O prognóstico dos pacientes está intimamente relacionado com a capacidade de metastização das células e embora os avanços científicos nesta área tenham sido relevantes, o fenómeno de disseminação e os fatores que o controlam ainda não são totalmente conhecidos [1].

O processo de carcinogénese tem origem em danos no ácido desoxirribonucleico (ADN) de células normais que perdem a sua capacidade de diferenciação, sendo incapazes de formar estruturas funcionais estáveis, multiplicando-se de forma desorganizada e invadindo os tecidos circundantes ou até mesmo outras partes do organismo, processo denominado por metastização [2] [3]. As diferentes etapas de formação do cancro são apresentadas na figura 1.

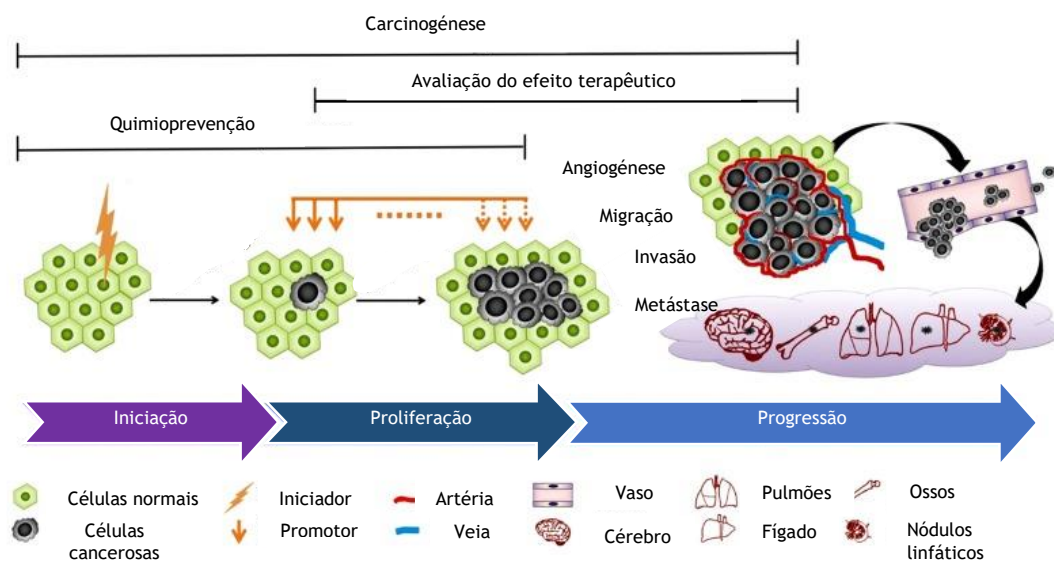


Figura 1: Etapas do processo de carcinogénese. Adaptado de [3].

A complexidade e imprevisibilidade do cancro são indiscutíveis, contudo é possível definir oito características biológicas, designadas de “hallmarks do cancro” que são adquiridas pelas células durante o desenvolvimento da doença, tais como i) manutenção da sinalização proliferativa, ii) ativação de mecanismos de evasão e metástase, iii) imortalidade replicativa, iv) indução de angiogénese, v) resistência à morte celular, vi) reprogramação do metabolismo energético e vii) impedimento da ação imunológica [4].

Subjacente a estas características, as células cancerosas têm ainda a capacidade de recrutar fibroblastos, macrófagos, leucócitos e matriz extracelular, criando um microambiente tumoral ^[4] ^[5].

As causas do cancro não são totalmente conhecidas, mas a predisposição genética, os fatores ambientais e o estilo de vida podem ser considerados fatores de risco ^[6].

1.1.1 Cancro do colo do útero

A família do vírus do papiloma humano (VPH) é formada por cerca de 120 vírus, onde aproximadamente metade são sexualmente transmissíveis e 15 são considerados de alto risco devido às suas propriedades carcinogénicas ^[7].

A infeção por VPH pode originar o desenvolvimento de cancro da cabeça, pescoço, pele, anogenital e colo do útero, sendo este último considerado o segundo carcinogéneo mais importante ^[8]. Os vírus VPH16, VPH18 e VPH45 contribuem para cerca de 70 % dos casos de cancro do colo do útero ^[7] ^[9].

O VPH é um vírus formado por ADN circular em dupla hélice com um tamanho de 8 quilobases (kb) que não apresenta invólucro. A sua integração na célula hospedeira induz instabilidade no genoma, desenvolvendo-se uma infeção na camada intraepitelial da mucosa. Embora 50 % dos pacientes desenvolvam anticorpos séricos, estes só são eficientes se tiverem como alvo a proteína L1. A seroconversão demora 8 a 12 meses a ocorrer após a infeção. Uma vez infetadas, as células podem desenvolver propriedades pré-cancerosas que originam neoplasias cervicais intraepiteliais (CIN) ou adenocarcinomas *in situ* (AIS). Não tratadas, as CIN grau II / III e AIS podem evoluir para carcinomas de células escamosas ou adenocarcinomas, respetivamente. Nos países ocidentais, exames citológicos, como o teste Papanicolaou, e análises de ADN do VPH são usadas como formas de prevenção e diagnóstico ^[7] ^[10].

A quimioterapia e a radioterapia são duas das terapias mais comumente usadas no tratamento do cancro do colo do útero. No entanto, em alguns casos, são incapazes de eliminar na totalidade. O peculiar microambiente tumoral e o aumento da resistência das células cancerosas aos fármacos administrados e à radiação dificultam a sua erradicação. Deste modo, é importante o surgimento de novas estratégias terapêuticas que sejam capazes de ultrapassar estes obstáculos ^[11].

Os aptameros de ácidos nucleicos, considerados “anticorpos químicos” que se ligam a alvos específicos, são uma nova e promissora estratégia não só na vertente terapêutica, mas também de diagnóstico em casos de doentes com cancro ^[11].

1.2 Aptameros de ácidos nucleicos

Os aptameros de ácidos nucleicos são sequências de ADN ou ácido ribonucleico (ARN) geralmente formadas por aproximadamente 20 a 60 nucleótidos. A sua elevada especificidade confere-lhes constantes de dissociação (K_D) geralmente na gama do pico a nano-molar ^[12]^[13].

Estas sequências têm sido um dos principais alvos de investigação nas últimas décadas devido i) à sua capacidade em reconhecer estruturalmente alvos específicos, processo semelhante à interação antígeno-anticorpo, ii) à facilidade de penetração nos tecidos devido ao seu baixo peso molecular (8 a 25 kDa para os aptameros *versus* aproximadamente 150 kDa para os anticorpos), iii) ao facto de não serem imunogénicas *in vivo*, iv) à sua estabilidade térmica e v) ao reconhecimento específico de um conjunto de alvos, tais como iões, péptidos, proteínas, vírus, bactérias e células ^[12]^[13]. Tendo em conta todas as características supracitadas, os aptameros têm desempenhado um papel preponderante no desenvolvimento de terapias específicas em casos de doenças malignas, virais e inflamatórias ^[14].

Aptameros de ácido ribonucleico de interferência (ARN_i) têm sido amplamente estudados, uma vez que podem impedir a expressão de genes associados a doenças. Para além disso, também o desenvolvimento de classes de aptameros que têm como função reconhecer especificamente proteínas ou moléculas e “atrair” fatores de transcrição têm sido objeto de estudo. Outros aptameros com potencial terapêutico contêm regiões imunoestimuladoras que atuam como agonistas do recetor *Toll-like 9*, induzindo a libertação de várias citocinas potencialmente úteis como adjuvantes de vacinas ou imunoterapia ^[15].

A ação terapêutica dos aptameros envolve dois tipos de abordagem, a *antisense* e a antigénica. A estratégia *antisense* promove a regulação negativa da expressão de um gene alvo por hibridação do aptamero com o ácido ribonucleico mensageiro (ARN_m) específico, inibindo a tradução do mesmo. Por outro lado, a estratégia antigénica permite inibir a transcrição de um gene específico através da formação da tripla hélice entre o aptamero e o ADN em dupla hélice ^[14]^[15].

Estudos recentes relativos à ação *antisense* dos aptameros sugeriram que alguns dos efeitos biológicos observados não se devem na totalidade à hibridação com o ARN_m alvo, uma vez que a ação do aptamero não é acompanhada por uma regulação negativa da proteína alvo e, adicionalmente, aptameros não específicos para a sequência alvo conseguiam exercer efeitos biológicos que igualavam ou excediam os da sequência *antisense*. Em particular, aptameros ricos em guaninas têm tido uma ação não *antisense* no crescimento de células em cultura. Há evidências de que esta atividade está

relacionada com a capacidade destes aptameros de G-quadruplex (G4) formarem estruturas mais estáveis ^[14] ^[15].

1.3 Estrutura e topologia de G-quadruplex (G4)

O G4 é definido como uma estrutura secundária não canónica de ácidos nucleicos, ADN ou ARN, rica em guaninas ^[16] ^[17]. Estas bases azotadas originam pelo menos duas tétradas, arranjos planares cíclicos de quatro guaninas ligadas por pontes de hidrogénio do tipo *Hoogsteen*, no núcleo da estrutura de G4 ^[18]. Os *loops* ligam as cadeias de guaninas e suportam as tétradas no núcleo ^[19].

A formação de G4 exige a presença de catiões monovalentes, tais como potássio (K^+) ou sódio (Na^+), que estabilizam a estrutura, posicionando-se no centro ou entre as tétradas de guaninas para formarem complexos de coordenação com os átomos de oxigénio eletronegativos dos arranjos planares adjacentes ^[17] ^[20] ^[21]. O ião K^+ devido ao facto de apresentar maior raio iónico que o Na^+ (133 pm para o K^+ versus 95 pm para o Na^+) complexa melhor com as tétradas, uma vez que forma complexos de coordenação fora do plano definido pelas mesmas, existindo menor energia de hidratação ^[22] ^[23]. Para além disso, o ião K^+ é biologicamente mais relevante por ter maior concentração intracelular, aproximadamente 140 mM, comparativamente ao Na^+ (5 a 15 mM) ^[17].

As estruturas de G4 podem ser formadas por uma, duas ou quatro cadeias de ADN ou ARN e apresentam um conjunto de topologias distintas ^[16].

Tendo em conta o número de cadeias de ácidos nucleicos que constituem o G4, estes podem ser classificados em intramoleculares e intermoleculares. Os G4 intramoleculares ou unimoleculares são formados por uma única cadeia de ADN ou ARN que possui quatro ou mais cadeias de guaninas que possibilitam o seu enrolamento ^[20]. As cadeias não têm que ter o mesmo comprimento e se uma for mais comprida que as outras, os resíduos de guanina localizar-se-ão maioritariamente no *loop* ^[16]. As estruturas de G4 intermoleculares são formadas por duas, G4 biomolecular ou dimérico, a quatro, G4 tetramolecular ou tetramérico, cadeias que interagem entre si ^[16] ^[20]. As três estruturas podem ser observadas na figura 2.

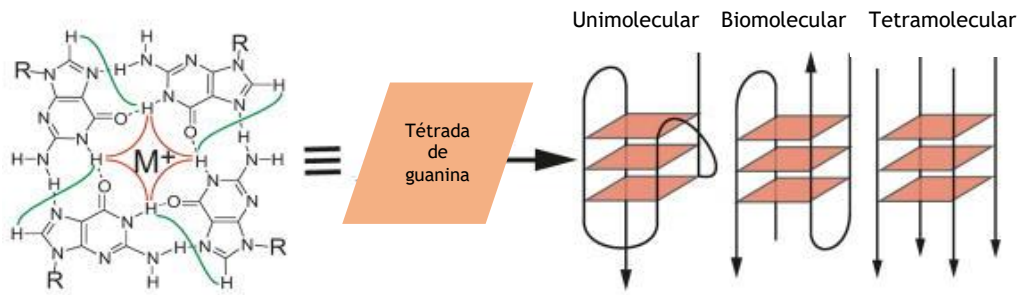


Figura 2: Estrutura unimolecular, biomolecular e tetramolecular de G4. Adaptado de [17].

As conformações *anti* e *sin* que as guaninas adotam na téttrade definem três tipos de topologia de G4. Na topologia paralela todos os ângulos glicosídeos das guaninas estão numa conformação *anti* e por isso as cadeias adjacentes têm a mesma orientação. Quando existem guaninas em conformações *anti* e *sin*, a topologia é antiparalela e a orientação das cadeias é oposta. A topologia híbrida surge quando há uma mistura das duas topologias anteriores [16] [17] [21]. Na figura 3 é possível observar estas topologias.

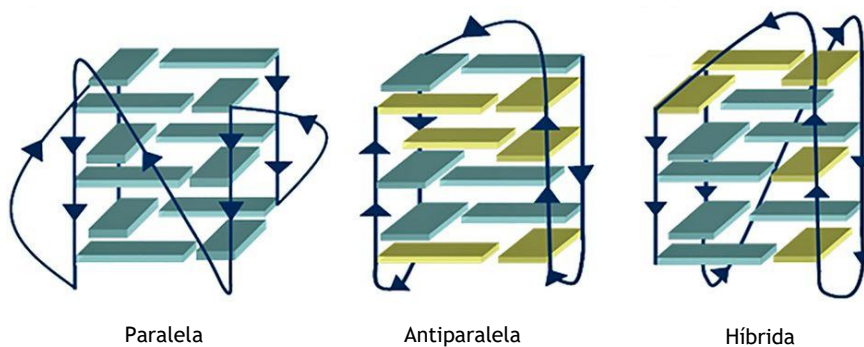


Figura 3: Topologias de G4. Adaptado de [24].

1.4 Características biológicas das estruturas de G-quadruplex (G4)

A ação biológica dos aptameros de G4 não se limita ao seu efeito não *antisense*, uma vez que para além desta característica apresentam resistência às nucleases séricas, eficiente internalização celular e capacidade de ligação a proteínas [15].

No soro, a maioria dos aptameros tem um tempo de semivida reduzido, cerca de 3 a 7 min, uma vez que não são resistentes às exonucleases séricas. No entanto, no caso de aptameros de G4, como as bases de guanina estão bem protegidas dos ataques químicos dentro do núcleo, os seus tempos de semivida são superiores, sendo capazes de resistir ao processo de clivagem cerca de 1 h no mínimo [15] [25].

O papel da estrutura de G4 na proteção contra a ação das nucleases séricas foi confirmado pela descoberta de que uma única mutação que envolvesse a substituição de uma guanina por uma adenina e consequentemente perturbasse a formação de G4 resultaria numa redução drástica do tempo de semivida no soro para cerca de 3 min [15].

No que diz respeito à internalização celular, estudos revelaram que aptameros de G4 são eficientemente internalizadas por células do cancro do colo do útero (HeLa), atingindo uma concentração intracelular 8 a 10 vezes superior comparativamente à presente no meio extracelular [15] [26].

A adição de sequências ricas em guaninas à extremidade 3' de um aptamero aumenta em cerca de 10 vezes a sua entrada em macrófagos J774E e a mesma adição em aptameros com regiões imunoestimuladoras aumenta a sua internalização em linfócitos B, células NK, células Th1, células dendríticas, monócitos do sangue periférico, macrófagos e células microgliais [15] [27] [28]. Tornou-se claro que a atividade dos aptameros de G4 está diretamente relacionada com a sua capacidade de ligação às células-alvo e posterior internalização [15].

A endocitose é o mecanismo de internalização celular usado pelos aptameros de G4 após a sua ligação a proteínas expressas à superfície das células-alvo. No caso dos leucócitos e hepatócitos é a Mac-1 e em células cancerosas, como as HeLa, é a nucleolina (NCL) [15].

1.5 G-quadruplex (G4) no genoma humano

Estudos computacionais que permitiram a construção de mapas genómicos humanos revelaram a presença de mais de 300,000 sequências com potencial de formação de G4. Verificou-se ainda que a localização das mesmas não é aleatória, uma vez que co-localizam em regiões funcionais do genoma. Para além disso, são altamente conservadas entre espécies diferentes, existindo em locais genómicos específicos. A conservação é maior entre espécies de mamíferos comparativamente às restantes. Bactérias e vírus também possuem sequências com potencial de formação de G4 [20].

As estruturas de G4 no genoma humano estão essencialmente presentes nos telómeros, em regiões promotoras, locais de iniciação da replicação e regiões 5' e 3' de ARN_m não codificante [21] [29] [30]. Dada a sua localização, estes G4 estão envolvidos em processos biológicos desde a regulação da expressão génica ao envelhecimento [30].

1.5.1 G-quadruplex (G4) teloméricos

A primeira estrutura de G4 no genoma humano foi observada em ADN telomérico com a utilização de um composto fluorescente seletivo para esta estrutura. O 3,6-bis(1-metil-4-

vinilpiridina)di-hi deno carbazole (BMVC) marcou G4 em telómeros de cromossomas em metáfase ^{[17] [31]}.

Os telómeros humanos são formados por repetições em *tandem* de 5 a 30 kb do hexanucleótido d(TTAGGG)_n em cadeia dupla e terminam na extremidade 3' com uma cadeia simples de 35 a 600 bases ^{[17] [21] [32]}. Estas estruturas são complexos únicos de ADN e proteínas que asseguram a integridade das extremidades dos cromossomas, protegendo-as da degradação ^[29]. A manutenção da estrutura e estabilidade dos telómeros humanos é importante em casos de cancro, envelhecimento e estabilidade genética em geral ^[21].

Nas células somáticas normais, em cada ciclo de replicação celular existe uma perda de 50 a 200 bases nos telómeros. Quando o encurtamento do ADN telomérico já se encontra numa fase crítica, tamanho mínimo atingido, a célula entra em senescência e sofre apoptose ^{[17] [32] [33]}. No entanto, nas células cancerosas este processo não se verifica devido à ativação da telomerase, uma transcriptase reversa que adiciona sequências repetidas de TTAGGG à extremidade 3' dos telómeros ^{[17] [31]}. Esta enzima é ativada em 80 a 85 % das células cancerosas humanas, desempenhando um papel fundamental na manutenção do fenótipo maligno, uma vez que permite uma replicação celular infinita ^{[17] [21]}. A formação de G4 intramolecular na extremidade 3' da cadeia de ADN telomérico humano, induzida pelo ião K⁺, inibe a atividade da telomerase, uma vez que esta perde a capacidade de reconhecer os telómeros, tal como pode ser observado na figura 4 ^{[17] [31]}.

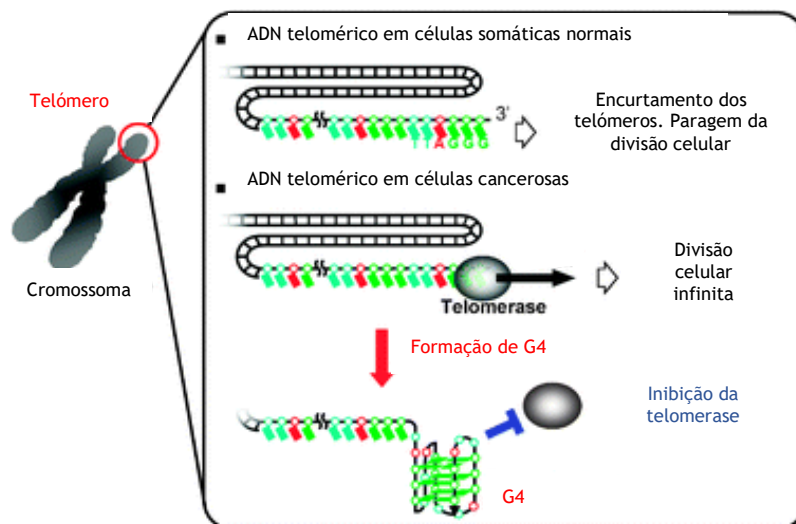


Figura 4: Formação de G4 no ADN telomérico e ação da telomerase. Adaptado de ^[34].

1.5.2 G-quadruplex (G4) promotores

As estruturas de G4 presentes em regiões promotoras encontram-se aproximadamente a 1 kb do local onde se inicia a transcrição de genes associados ao crescimento e proliferação celular [21].

Promotores de proto-oncogenes, tais como o c-MYC, KRAS, c-KIT, RET, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Bcl-2, recetor β do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR- β), fator 1α induzido por hipoxia (HIF- 1α), formam estruturas de G4 [21] [35].

Ao contrário dos G4 presentes nos telômeros que se formam a partir de cadeias simples de ADN telomérico, os G4 promotores formam-se em regiões de cadeia dupla, tal como se pode observar na figura 5. Para além disso, as sequências de G4 dos promotores apresentam maior diversidade [21].

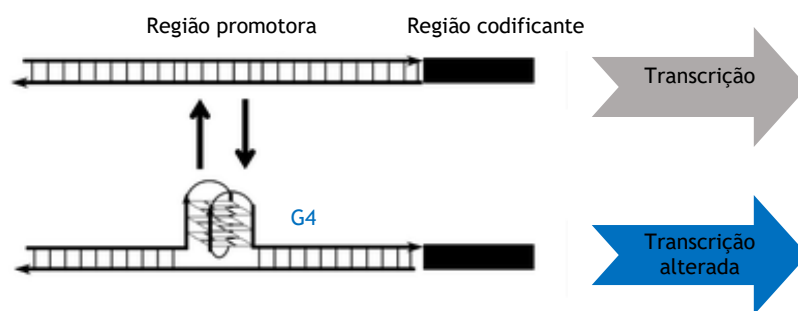


Figura 5: Formação de G4 em promotores. Adaptado de [34].

A formação de G4 nestas regiões transcrpcionais não é totalmente conhecida, mas julga-se que a presença de uma região G3N3 possa ser a base da sua existência [21]. Em relação à sua ação, as estruturas de G4 nestas regiões impedem a ligação da ARN polimerase ao gene que se pretende transcrever, desempenhando assim um papel preponderante na regulação da transcrição genética [32].

1.6 Aplicações terapêuticas de aptameros de G-quadruplex (G4)

Os aptameros de G4 têm a capacidade de reconhecer proteínas expressas nas células, desempenhando um papel fundamental como agentes de diagnóstico e terapêutica em diferentes tipos de patologias, como o cancro, doenças neurodegenerativas, diabetes, trombozes, degeneração macular, inflamação, osteoporose, tuberculose, vírus da imunodeficiência humana (VIH) e controlo de coagulação, tal como se pode observar na tabela 1 [18] [36].

Tabela 1: Aplicações de aptameros de G4. Adaptado de [18].

Doença	Aptamero de G4	Sequência (5'-3')	Alvo	Estado atual
Câncer	AS1411	d(GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG)	NCL	Fase II completa
	T40214	d(GGGCGGGCGGGCGGGC)	STAT3	Fase 0
	HJ24	d(AGCGTCGAATACCACACGGGGGTTTGGTGGGGGGGCTGGGTTGTCTTGGGGTGGGCTAATGGAGCTCGTGGTCAT)	Shp2	Estudos <i>in vitro</i>
	3R02	d(TGTGGGGGTGGACTGGGTGGGTAC)	VEGF	Estudos <i>in vitro</i>
VIH	ISIS 5320	d(T*T*G*G*G*G*T*T)	VIH gp120	Estudos <i>in vitro</i>
	Hotoda	DBB-d(TGGGAG) e TBDPS-d(TGGGAG)	VIH gp120	Estudos <i>in vitro</i>
	AS1411	d(GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG)	NCL	Estudos <i>in vitro</i>
	93del	d(GGGGTGGGAGGAGGGT)	VIH integrase	Estudos <i>in vitro</i>
	Zintevir	d(G*TGGTGGGTGGGTGGG*T)	VIH integrase	Fase I completa
	RT6	d(ATCCGCTGATTAGCGATACTCAGGC GTTAGGGAAGGGCGTCGAAAGCAGGG GGGACTTGAGCAAATCACCTGCAGGG G)	VIH transcriptase reversa	Estudos <i>in vitro</i>
	ODN 93	d(GGGGGTGGGAGGAGGGTAGGCCTTAGGTTTCTGA)	VIH RNase H	Estudos <i>in vitro</i>
	ODN 112	d(CCAGTGGCGGGTGGGTGGGTGGTG GGGACTTGG)	VIH RNase H	Estudos <i>in vitro</i>
Coagulação	TBA	d(GGTTGGTGTGGTTGG)	Trombina	Fase I completa
	HD22	d(AGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGT)	Trombina	Estudos <i>in vitro</i>
	HD1-22	d(GGTTGGTGTGGTTGGAAAAAAAAA AAAAAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGG GGTGACT)	Trombina	Estudos <i>in vitro</i>
	RA-36	d(GGTTGGTGTGGTTGGTGGTTGGTGTGGTTGG)	Trombina	Fase 0
	NU172	d(CGCCTAGGTTGGGTAGGGTGGTGGCG)	Trombina	Fase II
Osteoporose	Scl2	d(TTGCGCGTTAATTGGGGGGTGGGTGGGTT)	Esclerostina	Estudos <i>in vitro</i>
Tuberculose	PPK2 G9	d(AACACATAGGTTTGGTTAGGTTGGTTGGTTGAATTA)	PPK2	Estudos <i>in vitro</i>

*=ligação fosforotioato; DBB = 3,4-dibenziloxi benzilo; TBDPS = terc-butil difenil silil.

Tendo em conta a ação dos aptameros de G4, estes podem ser classificados em aptameros contra agentes infecciosos, anticoagulantes e anticancerígenos ^[18] ^[36].

Um dos aptameros de G4 contra agentes infecciosos, como o VIH, a ser identificado foi o G4 ISIS 5320, d(TTGGGGTT) ^[18]. Com o passar do tempo, outros aptameros foram surgindo, mas todos eles têm as mesmas características, entre as quais a capacidade de interagir com i) a glicoproteína gp120 expressa à superfície do invólucro e principal responsável pela ligação aos recetores celulares CD4 ou CCR5 / CXCR4, favorecendo a entrada do vírus na célula, ii) a integrase do VIH e iii) a transcriptase reversa do VIH. Deste modo, conseguem inibir em simultâneo a ligação e entrada do vírus na célula-alvo, a integração do genoma viral e a transcrição reversa ^[18] ^[36].

Em casos de vírus de hepatite C (VHC) e tuberculose também foram encontrados aptameros de G4 capazes de inibir a atividade da ARN polimerase do subtipo 3a na presença de VHC e a polifosfato cinase 2 da *Mycobacterium tuberculosis* ^[36].

No que diz respeito aos aptameros de G4 anticoagulantes, um dos seus objetivos é inibir a trombina, uma protéase de serina que desempenha um papel fundamental na última etapa do processo de coagulação do sangue, convertendo o fibrinogénio solúvel em fibrina insolúvel ^[37]. Os aptameros de G4 mais relevantes são o HD1, o HD22, HD1-22, RA-36 e NU172 ^[18] ^[36].

O G4 HD1, também conhecido como TBA, é um aptamero de ADN rico em guaninas que tem a capacidade de se ligar ao exosito I da trombina. O G4 HD22, por sua vez, reconhece o exosito II, região de ligação da heparina à trombina, inibindo a ativação de plaquetas ^[18] ^[38].

A junção das duas estruturas de G4, HD1 e HD22, originaram o G4 HD1-22, um aptamero de ADN bivalente formado pelo G4 HD1 que se liga ao exosito I e pelo G4 HD22 que reconhece o exosito II ^[18] ^[39].

O G4 RA-36 é um aptamero de ADN formado por dois G4 ligados covalentemente, sendo que cada um deles contém um motivo de G4 HD1 que permite a ligação ao exosito I da trombina, bloqueando a ligação do fibrinogénio à enzima ^[18] ^[40]. O G4 NU172 também é um aptamero de ADN que reconhece o exosito I da trombina ^[18].

Por fim, o grupo dos aptameros de G4 anticancerígenos do qual fazem parte o AS1411, o T40214, o HJ24 e o 3R02 que têm como principal função inibir a proliferação e o crescimento celular ^[18].

O G4 T40214 tem como principal alvo a proteína STAT3, um fator de transcrição envolvido na diferenciação celular, proliferação e apoptose [18]. Este aptamero de G4 interage com o domínio SH2 da proteína, inserindo-se entre este e o ADN alvo [41].

O aptamero de G4 HJ24 reconhece uma proteína da família tirosina fosfatase, a Shp2, que está envolvida no crescimento, diferenciação e proliferação celular, bem como no ciclo mitótico e na transformação oncogénica. O valor de K_D do aptamero em relação à proteína é definido na ordem do nano-molar [18] [42].

O G4 3R02, forma alterada do aptamero Vap7, tem a capacidade de se ligar ao VEGF, uma proteína que atua como reguladora na angiogénese, apresentando diferentes isoformas, sendo que a mais relevante é a VEGF-165 [18] [43].

O G4 AS1411 é dos aptameros anticancerígenos mais importantes e o primeiro a entrar numa fase de testes clínicos. Este aptamero liga-se à NCL, uma proteína sobre-expressa à superfície das células cancerosas, sendo depois internalizado pelas mesmas, inibindo a replicação do ADN, que resulta numa acumulação de células na fase S. Para além disso, tem também um efeito citotóxico nas células cancerosas [18] [36].

1.7 Aptamero de G-quadruplex (G4) AS1411

O aptamero AS1411, também designado por AGRO100, é uma molécula de ADN rica em guaninas formada por 26 nucleótidos que definem a sequência: 5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3' [44] [45]. Este aptamero tem a capacidade de formar estruturas de G4, no entanto devido ao seu polimorfismo em solução é difícil definir e identificar a sua topologia *in vivo* [45].

A estrutura do G4 AS1411 permanece por esclarecer devido à coexistência de 8 estruturas distintas de G4, sendo que cinco já foram isoladas e caracterizadas *ex vivo* por cromatografia de exclusão por tamanho (SEC), revelando que algumas são estruturas de G4 unimoleculares, outras G4 biomoleculares e num dos casos Z-G4 [45] [46].

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) demonstrou que quatro das cinco estruturas caracterizadas *ex vivo* por SEC apresentam topologia paralela, com um pico positivo a 264 nm e um pico negativo a 240 nm, enquanto uma das estruturas apresentou um espectro diferente, com um pico positivo a 245 nm e uma forte elipticidade negativa a 277 nm, característico de Z-G4 [45] [46].

In vivo, a topologia do G4 AS1411 é influenciada pela ligação a proteínas e pela sua localização no organismo, por exemplo, no sangue haverá uma maior concentração de

Na⁺ e dentro das células uma maior concentração de K⁺, diferença que afetará a estrutura do aptamero [45].

A ação antiproliferativa do G4 AS1411 está relacionada tanto com a sua degradação pelas exonucleases séricas, uma vez que se obtêm produtos responsáveis pela citotoxicidade celular, como também pela sua capacidade de ligação à NCL, uma proteína multifuncional nucleolar sobre-expressa à superfície das células cancerosas em resposta a estímulos mitogênicos ou *stress* [45] [46] [47].

Nas células normais a expressão de NCL é menor à superfície da membrana plasmática, o que significa que esta proteína pode ser considerada como um biomarcador tumoral para distinguir células cancerosas de células saudáveis. Assim, a interação G4 AS1411-NCL é utilizada como uma potencial estratégia terapêutica [48].

A internalização do G4 AS1411 nas células cancerosas ocorre por macropinocitose, uma forma de endocitose independente de clatrina [45] [49].

Após 24 a 72 h da entrada do aptamero G4 AS1411 nas células cancerosas, este tem a capacidade de induzir macropinocitose adicional dependente de NCL, por ativação da Rac-1, permitindo a internalização de mais aptamero [45]. Esta hiperestimulação pode constituir um mecanismo válido na destruição seletiva de células cancerosas, induzindo uma nova forma de morte celular não apoptótica que tem sido referida como *metuosis* e que se caracteriza por uma formação intensa de vacúolos nas células cancerosas após 96 h da entrada do G4 AS1411 [49].

Nas células normais o G4 AS1411 pode ser internalizado por endocitose dependente de dinamina e não por macropinocitose, acabando depois por ser eliminado por efluxo, exocitose, degradação lisossômica ou ainda a cada ciclo de divisão celular [45]. Na figura 6 é possível observar os pressupostos mecanismos de acumulação seletivos do G4 AS1411.

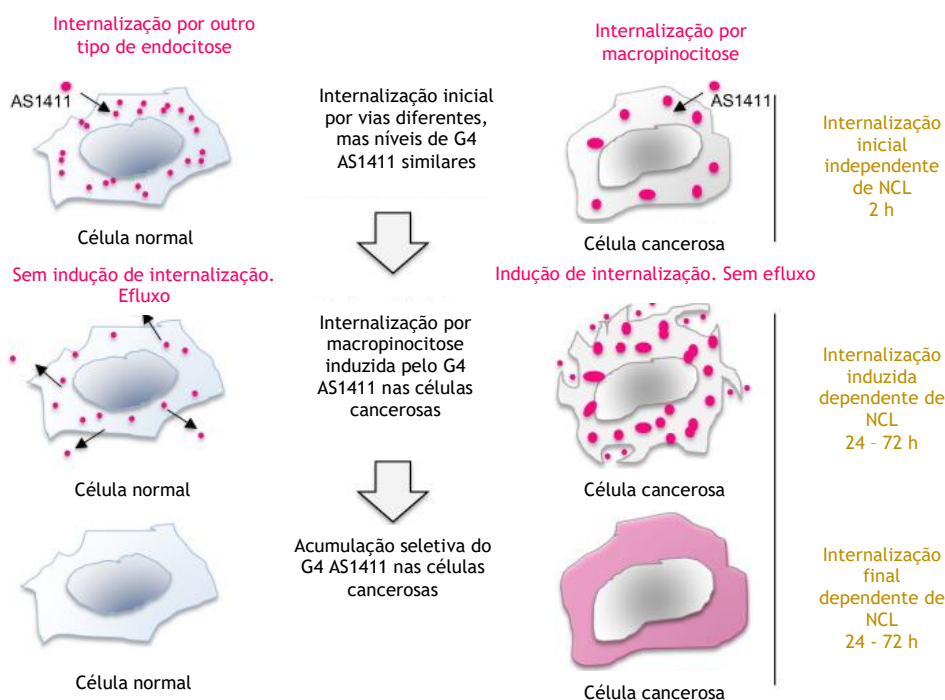


Figura 6: Mecanismos de acumulação seletivos do G4 AS1411. Adaptado de [45].

O efeito do G4 AS1411 nas células cancerosas reflete-se tanto ao nível da inibição da replicação do ADN e consequentemente na paragem do ciclo celular na fase S, como também na desestabilização do ARN_m do gene Bcl-2 e indução da apoptose celular [49] [50]. Para além disso, a NCL é um marcador de angiogénese, expresso em vasos sanguíneos de células endoteliais [45] [51].

1.7.1 Fases do desenvolvimento clínico do G-quadruplex (G4) AS1411

Os ensaios clínicos de fase I do G4 AS1411 foram iniciados em 2003 e em 2005 prosseguiram para fase II, mas acabaram por ser encerrados nesta fase em 2011 [45].

O aptamero foi testado em mais de 100 pacientes que apresentavam tumores sólidos em estado avançado e com níveis de metastização elevados [15].

O G4 AS1411 foi administrado numa dose intravenosa até 40 mg/Kg/dia durante 4 a 7 dias, uma vez que a inibição da divisão e a indução da morte celular ocorrem somente após exposição prolongada. Durante este período de tempo, a administração do aptamero não apresentou efeitos graves nem danos colaterais [15] [50]. Apenas em 7 pacientes, 3 com cancro renal e 4 com leucemia mieloide aguda, ocorreu um desaparecimento ou diminuição substancial da massa tumoral. Na figura 7 é possível observar o efeito distinto do G4 AS1411 em células malignas e em células normais. Verificou-se ainda que o G4 AS1411 tem uma depuração rápida, aproximadamente 1 h e

43 min, e atinge uma concentração plasmática máxima de 25,4 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ou cerca de 3 μM . A concentração de G4 AS1411 para induzir 50 % de inibição proliferativa (IC_{50}) varia entre 1 a 10 μM para a maioria das células cancerosas [45].



Figura 7: Efeito do G4 AS1411 em células malignas e em células normais. Adaptado de [15].

Perante os resultados obtidos, o G4 AS1411 tem potencial clínico devido ao seu perfil de segurança e capacidade de originar um desaparecimento ou diminuição substancial da massa tumoral em alguns pacientes. No entanto, a farmacologia subótima, devido à rápida depuração, o grau de polimorfismo e a baixa eficácia, uma vez que só produziu efeito em 7 pacientes, limitam a sua utilização. Uma abordagem alternativa seria desenvolver novos aptameros derivados do G4 AS1411, com bases azotadas ou esqueletos modificados, que tenham uma farmacocinética melhorada, uma única topologia e que produzam o efeito desejado num maior número de pacientes [45].

1.7.2 Aptameros derivados do G-quadruplex (G4) AS1411

O Z-G4, 5'-TGGTGGTGGTGGTTGGTGGTGGTGGTGGT-3', é um aptamero derivado do G4 AS1411 que apresenta quatro tétradas que originam duas subunidades paralelas tipo hélice ligadas por um *linker* central, T13-T14. No entanto, como se trata de uma forma Z-ADN a hélice enrola para a esquerda e não para a direita. O empilhamento das duas subunidades ocorre entre as extremidades 5' de ambas. A subunidade superior tem três *loops* (T4, T7 e T10) e a inferior tem quatro (T16, T19, T22 e T25). Todas as guaninas apresentam uma conformação *anti*, exceto a G2 que apresenta uma conformação *sin* [52].

Espectros de CD do aptamero Z-G4 apresentam um pico negativo a aproximadamente 275 nm e um pico positivo a cerca de 250 nm, valores semelhantes aos obtidos para uma das estruturas do G4 AS1411 (página 11) [52].

O G4 AT11, 5'TGGTGGTGGTTGTTGTGGTGGTGGTGGT-3', também é um aptamero de ADN derivado do G4 AS1411 que resulta da adição de uma timina nas extremidades 5' e 3' da cadeia, para impedir o empilhamento do G4 na superfície destas regiões, e na substituição de uma guanina por uma timina na posição 11, com o objetivo de promover uma única forma de enrolamento e, portanto uma única topologia [46].

O espectro de CD do aptamero G4 AT11 é semelhante ao obtido para quatro das estruturas do G4 AS1411 (página 11), apresentando um pico negativo a 240 nm e um pico positivo a 260 nm, característico de topologia paralela [46].

No que diz respeito à atividade antiproliferativa, o aptamero G4 AT11 apresenta um efeito semelhante ao do G4 AS1411 em células do cancro do pulmão e ambos não exibem efeito antiproliferativo em células normais [46].

Em solução, na presença de K^+ , o G4 AT11 apresenta uma estrutura formada por quatro tétradas que originam duas subunidades paralelas do tipo hélice que se encontram ligadas através de um *linker* de resíduo simples, uma timina presente na posição 16. A subunidade superior contém três *loops* (T4, T7 e T10-T11) e duas inserções (T13 e T14), enquanto a subunidade inferior contém três *loops* (T19, T22 e T25). Todas as guaninas apresentam uma conformação *anti* [46].

Para analisar a relação entre o número de inserções e o tamanho do *linker* com a estabilidade térmica do G4 AT11 realizaram-se uma série de modificações neste aptamero, resultando no surgimento de derivados de G4 AT11 [46].

O G4 AT11-B0 não tem nenhuma inserção de timina, o G4 AT11-L0 não apresenta nenhuma timina no *linker*, o G4 AT11-B1 contém uma inserção de timina e o G4 AT11-L2 apresenta duas timinas no *linker*. Observou-se que diminuindo o número de inserções ou tamanho do *linker* do G4 AT11 há um aumento da estabilidade térmica. Por exemplo, o aptamero G4 AT11-B0 apresenta um aumento da temperatura de desnaturação de 16 °C comparativamente ao G4 AT11. Na tabela 2 é possível observar as temperaturas de desnaturação (T_m) do G4 AT11 e respetivos derivados [46].

Tabela 2: Estabilização térmica do G4 AT11 e respetivos derivados. Adaptado de [46].

Aptamero de G4	5'	Inserção		Linker	3'	T_m (°C)
AT11	TGGTGGTGGTTG	TT	G	T	GGTGGTGGTGGT	43
AT11-B1	TGGTGGTGGTTG	T	G	T	GGTGGTGGTGGT	45
AT11-B0	TGGTGGTGGTTG		G	T	GGTGGTGGTGGT	59
AT11-L0	TGGTGGTGGTTG	TT	G		GGTGGTGGTGGT	51
AT11-L2	TGGTGGTGGTTG	TT	G	TT	GGTGGTGGTGGT	Indefinida

Os derivados do G4 AS1411 apresentam características promissoras, no entanto estas podem ser realçadas e melhoradas na presença de ligandos que têm a capacidade de interagir com as estruturas de G4 não só para as estabilizar, como também para potenciar o seu efeito anticancerígeno, originando-se nanosistemas conjugados aptamero G4-ligandos [53].

1.8 Ligandos de G-quadruplex (G4)

As estruturas de G4 são um alvo por parte de ligandos de baixo peso molecular (<700 Da). Nas últimas duas décadas vários tipos de ligandos foram sintetizados com o objetivo de reconhecer sequências de G4, intensificando o seu papel biológico, permitindo o surgimento de estratégias promissoras, com particular relevância no desenvolvimento de terapêuticas contra o cancro [54] [55] [56].

Os ligandos para interagirem seletivamente e com afinidade com estruturas de G4 devem apresentar três características principais i) ter um núcleo aromático, de forma a maximizar as interações de empilhamento π - π com as superfícies das tétradas, ii) carga positiva para que se possam ligar aos grupos fosfato negativos da estrutura de G4 e iii) cadeia lateral diversificada, possibilitando a introdução de grupos funcionais específicos para a interação com os *grooves*, *loops* e bases individuais [29] [34] [54].

A estabilização de estruturas de G4 por ligandos é conseguida por interações eletrostáticas e de empilhamento π - π , pontes de hidrogénio, forças hidrofóbicas e de *Van der Waals* [34] [54].

O ligando tem que apresentar um valor de K_D na gama do sub-micromolar em relação ao G4, aumentar a sua estabilidade térmica e proteger o aptamero de ataques enzimáticos [54].

Os ligandos de G4 (figura 8) incluem derivados de acridina (BRACO-19), quinacridina (BOQ1, NCQ), porfirina (TMPyP4), perileno (PIPER), bisquinolina (360A, PhenDC₃, piridostatina) e oxazoles (telomestatina, HXDV) que apresentam um potencial de ligação a estruturas de G4 [29] [54].

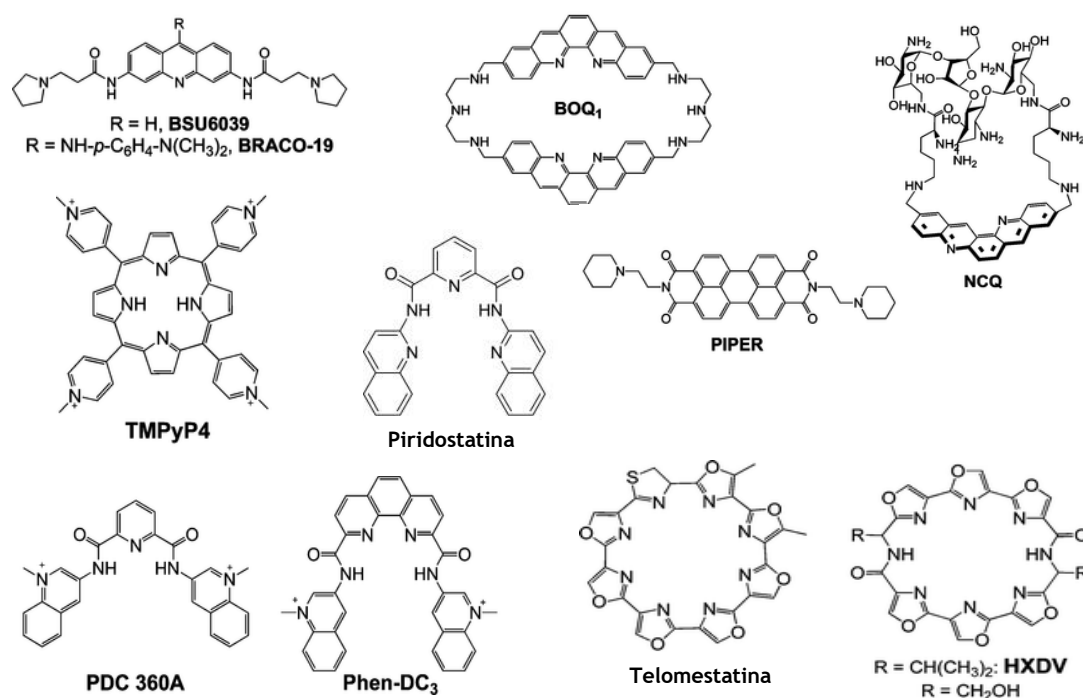


Figura 8: Estruturas de ligandos de G4. Adaptado de [57] [58].

Ligandos derivados de laranja de acridina e macrociclos derivados de fenantrolina foram os grupos de ligandos escolhidos para este trabalho como possíveis ligandos de G4, potenciando o seu efeito anticancerígeno.

1.8.1 Derivados de laranja de acridina

Os derivados de laranja de acridina podem ser potenciais ligandos de G4, uma vez que apresentam características relevantes, entre as quais, fluorescência intrínseca,

internalização celular com capacidade de penetração no núcleo, presença de uma unidade de acridina e existência de um átomo de nitrogênio protonado [59].

Recentemente, derivados de laranja de acridina designados por C₃, C₅, C₈ e C₈-NH₂ foram sintetizados com o objetivo de serem potenciais ligandos de G4. Estes ligandos apresentam i) uma unidade aromática planar favorável ao empilhamento π-π com as tétradas de guanina terminais das estruturas de G4, ii) substituintes alquilamida que favorecem interações adicionais com os *grooves*, *loops* e grupos fosfato através de pontes de hidrogênio e iii) um átomo doador carregado positivamente no anel de acridina que pode ocupar uma posição similar àquela do íão central nas tétradas de guanina, uma vez que aproveita o potencial electroestático negativo dos grupos carbonilo presentes nestas regiões [54] [59]. A introdução do anel de iodobenzeno, exceto no C₈-NH₂, não só aumentará o grau de estabilização dos ligandos, como também melhorará a internalização celular, proporcionando interações adicionais com a interface dos *grooves* e *loops* do G4. Na figura 9 apresentam-se as estruturas destes derivados de laranja de acridina [59].

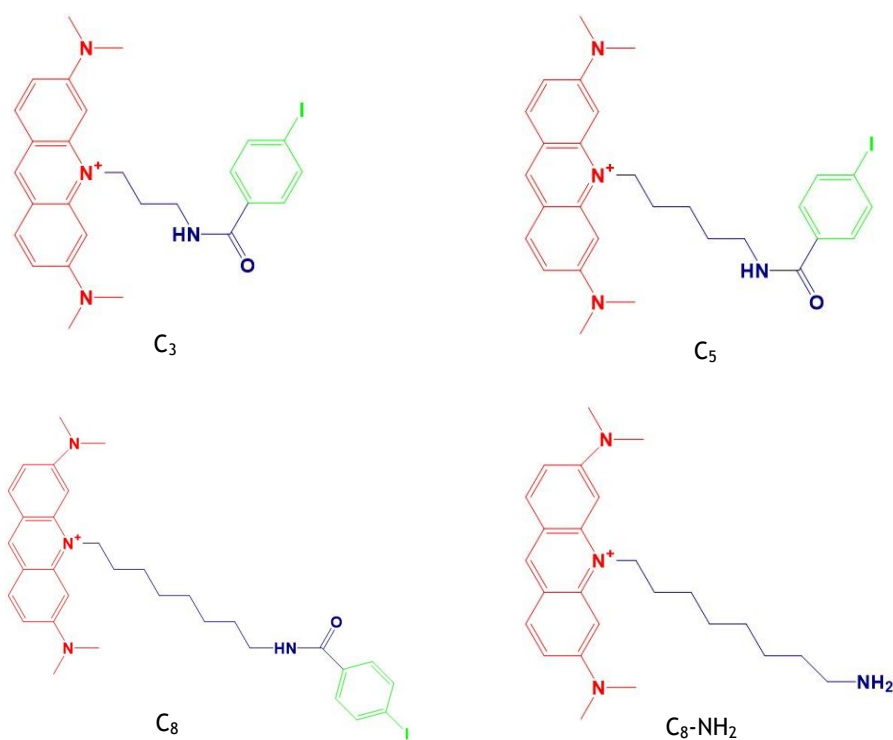


Figura 9: Estrutura dos derivados de laranja de acridina. A vermelho a unidade aromática planar, a azul os substituintes de alquilamida e a verde o anel de iodobenzeno. Adaptado de [59].

Estudos efetuados em sequências de G4, como o KRAS-22RT, c-MYC e 22AG híbrido e antiparalelo, revelaram que os ligandos derivados de laranja de acridina têm a capacidade de aumentar a estabilização térmica das sequências, em alguns casos cerca de 40 °C, e apresentam valores de K_D na ordem do sub-micromolar, resultados

semelhantes aos que haviam sido obtidos em ligandos comerciais como a piridostatina. Para além destes resultados, demonstraram seletividade para estruturas de G4 comparativamente ao ADN em dupla hélice ($K_D \approx 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ para estruturas de G4 *versus* $K_D \approx 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ para ADN em dupla hélice). Ensaio de viabilidade celular revelaram que os derivados C₃, C₅ e C₈ afetaram a proliferação das células HeLa, apresentando valores de IC₅₀ de 5,7 μM , 2,4 μM e 0,9 μM , respetivamente. Assim, perante os resultados obtidos os derivados de laranja de acridina apresentam os requisitos estruturais necessários para atuar como ligandos de G4 na formação de nanosistemas conjugados [59].

1.8.2 Macrociclos derivados de fenantrolina

Os macrociclos derivados de fenantrolina, como o [32]phen₂N₄, [30]phen₂N₆, [34]phen₂N₆ e [16]phenN₂, apresentam duas unidades aromáticas extensas e planares, exceto o [16]phenN₂ que tem apenas uma. O sistema aromático permite o empilhamento π - π com as tétradas de guanina terminais [56] [60]. As cadeias de poliamina com diferentes tamanhos têm carga positiva e átomos doadores, favorecendo interações adicionais com os *grooves* e os *loops* da estrutura de G4, nomeadamente através de pontes de hidrogénio ou interações electrostáticas com os grupos fosfato do G4 [55] [56]. As estruturas dos macrociclos derivados de fenantrolina são apresentadas na figura 10.

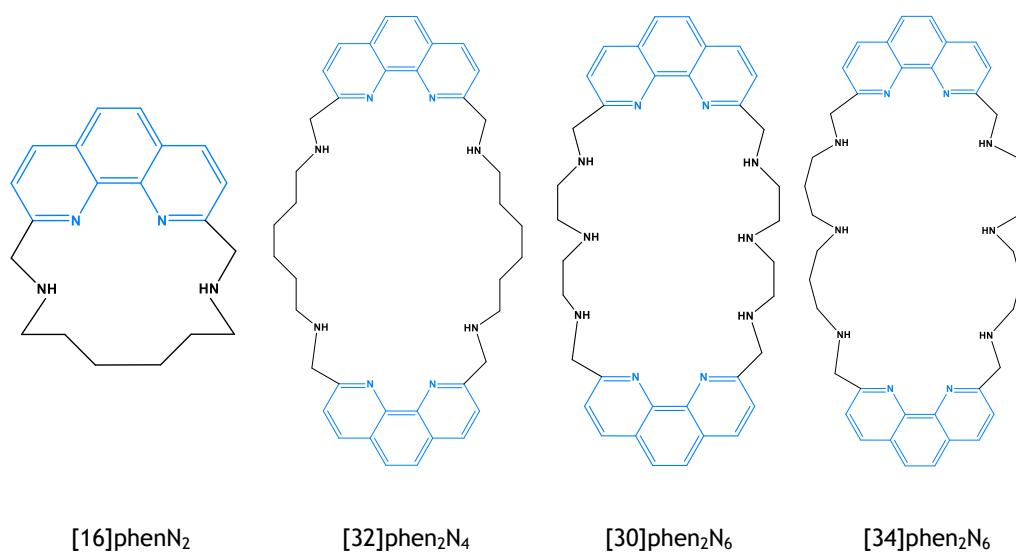


Figura 10: Estruturas dos macrociclos derivados de fenantrolina. A azul a(s) unidade(s) de fenantrolina e a preto a cadeia de poliamina. Adaptado de [55].

Estes ligandos macrocíclicos apresentam especificidade para estruturas de G4 comparativamente ao ADN em dupla hélice, uma vez que a sua estrutura cíclica dificulta a intercalação entre os pares de bases por razões estéricas, sendo este o modo de ligação mais comum para a forma B do ADN [55] [60].

Estudos realizados revelaram que os ligandos [16]phenN₂ e [32]phen₂N₄ são os que mais estabilizam estruturas de G4 paralelas, quando comparados com outros macrociclos derivados de fenantrolina. Todos os ligandos apresentaram constantes de afinidade moderada na ordem de 10⁵ a 10⁶ M⁻¹ [55]. No que diz respeito à viabilidade celular, estes ligandos só apresentaram algum efeito nas HeLa e em células humanas do cancro da mama (MCF-7) a uma concentração de 100 µM. Em fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF) os resultados foram semelhantes aos obtidos para as células cancerosas, não existindo seletividade citotóxica [55] [61] [62]. Perante os resultados obtidos nestes estudos, a utilização de nanosistemas conjugados de aptamero G4-macrociclos derivados de fenantrolina pode apresentar um efeito biológico bastante promissor.

No presente trabalho foi avaliado o potencial de estabilização térmico e afinidade dos macrociclos derivados de fenantrolina, [16]phenN₂ e [32]phen₂N₄, bem como dos derivados de laranja de acridina, C₃, C₅, C₈ e C₈-NH₂, em relação ao aptamero G4 AT11-B0, derivado do G4 AS1411. A síntese de ligandos derivados de fenantrolina com potencial de ligação e estabilização em relação ao G4 AT11-B0 também foi realizada. Para além disso, a viabilidade celular dos ligandos, do aptamero G4 AT11-B0 e dos conjugados foi determinada nas células HeLa e NHDF através de ensaios de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), enquanto a internalização celular do conjugado G4 AT11-B0-C₈ foi avaliada por microscopia de fluorescência confocal. A criação de nanosistemas conjugados surge assim como uma alternativa terapêutica em casos de infeções provocadas por VPH.

2. Objetivos

O principal objetivo deste trabalho é desenvolver novos nanosistemas baseados em conjugados aptamero G4 AT11-B0 e ligandos derivados de laranja de acridina e macrociclos derivados de fenantrolina, com propriedades anticancerígenas. A expressão da NCL à superfície das células cancerosas é uma vantagem, uma vez que permitirá não só uma internalização do G4 AT11-B0 nas células HeLa, como também dos ligandos conjugados com o aptamero, potenciando-se um efeito citotóxico. Os objetivos específicos são:

- Caracterizar a estrutura do aptamero G4 AT11-B0 por espectroscopia de diferença térmica (TDS) e de dicroísmo circular (CD);
- Sintetizar ligandos da família das fenantrolinas com afinidade e que promovam a estabilização da estrutura de G4 do aptamero AT11-B0;
- Avaliar a estabilização térmica dos ligandos sintetizados, dos derivados de laranja de acridina e dos macrociclos derivados de fenantrolina em relação ao aptamero G4 AT11-B0 por espectroscopia de dicroísmo circular (CD);
- Avaliar a afinidade dos ligandos derivados de laranja de acridina e macrociclos derivados de fenantrolina em relação ao aptamero G4 AT11-B0 por espectroscopia de fluorescência;
- Avaliar o efeito citotóxico e antiproliferativo dos ligandos sintetizados, dos derivados de laranja de acridina, dos macrociclos derivados de fenantrolina, do G4 AT11-B0 e dos conjugados G4 AT11-B0-ligandos nas linhas celulares HeLa e NHDF através de ensaios de MTT;
- Avaliar a internalização e localização celular do ligando C₈, do G4 AT11-B0 e do conjugado G4 AT11-B0-C₈ em células HeLa por microscopia de fluorescência confocal.

3. Materiais e Métodos

3.1 Síntese de ligandos de G-quadruplex (G4)

Sintetizaram-se ligandos da família das fenantrolinas constituídos por uma unidade aromática mais extensa e novas cadeias de poliamina que contêm grupos NH disponíveis, com o objetivo de avaliar o seu potencial de ligação e estabilização em relação ao aptamero G4 AT11-B0 e o seu efeito citotóxico e antiproliferativo nas linhas celulares HeLa e NHDF.

3.1.1 Síntese do ligando de partida 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona (C₁₄H₁₀N₂O₂)

A síntese deste ligando de partida foi baseada no protocolo de Che *et al.*, 2006 [63]. Pesou-se 2,024 g de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (C₁₄H₁₂N₂) num balão de fundo redondo que foi posteriormente inserido num banho de gelo e sal até atingir a temperatura de 0 °C. Adicionou-se lentamente e sob agitação 2,918 g de brometo de potássio (KBr) e 38,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄). A 30 °C, adicionou-se 19,25 mL de ácido nítrico (HNO₃). O balão foi tapado e a solução ficou em agitação durante 3 h a 40 °C. Após este período de tempo, o balão foi aberto para ocorrer libertação de gases e voltou a ser novamente tapado, mantendo-se a agitação durante mais 2 h a 85 °C. Após as 2 h, abriu-se o balão durante 30 min para libertar os gases e perder a cor laranja. A solução ficou à temperatura ambiente durante 10 min e depois foi colocada em gelo para ser neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH). Fizeram-se 10 extrações com clorofórmio (CHCl₃) e recolheram-se as fases orgânicas para balões de fundo redondo. Adicionou-se sulfato de sódio (Na₂SO₄) aos balões até preencher o fundo para secar as fases orgânicas. Filtrou-se, evaporou-se o CHCl₃ e pôs-se na estufa a secar. Adicionou-se metanol (CH₃OH) quente a cada um dos balões, decantou-se e pôs-se novamente na estufa a secar.

Fez-se espectro de ¹H RMN em dimetilsulfóxido deuterado (C₂D₆O₅) que revelou a ausência de ligando. Na figura 11 é possível observar a síntese deste ligando de partida.

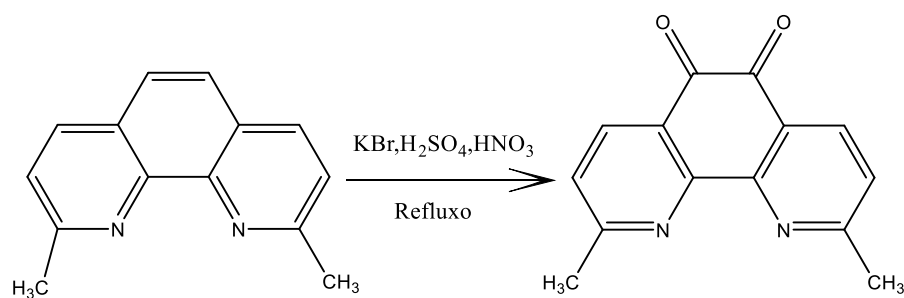


Figura 11: Síntese do ligando de partida 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona. Adaptado de [63].

3.1.2 Síntese do ligando de partida 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona ($C_{14}H_{10}N_2O_2$) com um novo protocolo

A primeira síntese realizada para a obtenção do ligando de partida 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona, descrita anteriormente (página 23), não resultou, desde modo procedeu-se a uma segunda tentativa com um protocolo diferente.

A nova síntese deste ligando de partida foi baseada no protocolo de Zheng *et al.*, 2010 [64]. Pesou-se 1,5 g de $C_{14}H_{12}N_2$ num balão de fundo redondo e adicionou-se aproximadamente 17 mL de H_2SO_4 a 60 %. A solução foi posta em agitação até se dissolver na totalidade. Posteriormente, adicionou-se lentamente 1,332 g de bromato de potássio ($KBrO_3$) durante 1 h. Terminada a adição, a solução ficou em agitação à temperatura ambiente durante 20 h. Após este período de tempo, colocou-se o balão, mantendo a agitação, num banho de gelo até atingir os 0 °C. Depois de atingida esta temperatura, mantendo o balão em gelo, neutralizou-se com uma solução de 8 M de NaOH até o pH ser aproximadamente 7. Adicionou-se diclorometano (CH_2Cl_2) ao balão onde estava a solução e verteu-se o conteúdo do mesmo para um copo que ficou em agitação durante 1 h à temperatura ambiente. Após o período de agitação, filtrou-se o conteúdo do copo, sendo que o precipitado que é o sal e que fica retido no filtro tem que ser lavado várias vezes com CH_2Cl_2 até passar de amarelo a branco. O filtrado foi sujeito a 5 extrações líquido - líquido com CH_2Cl_2 e água (H_2O). Evaporaram-se as fases orgânicas resultantes da extração e adicionou-se ao balão CH_3OH quente para recrystalizar. O conteúdo do balão foi transferido para um *erlenmeyer* e deixou-se no frigorífico a 4 °C a precipitar durante 6 dias. Após este período de tempo, retirou-se o *erlenmeyer* do frigorífico e filtrou-se o seu conteúdo com um filtro de papel. Recolheu-se o precipitado e deixou-se a secar na estufa durante um dia.

Fez-se espectro de 1H RMN (400 MHz, C_2D_6OS): δ 8,32 ppm (d, 2H), δ 7,57 ppm (d, 2H) e δ 2,74 ppm (s, 6H) que revelou a presença do ligando de partida no estado puro (anexo I).

Seguindo este procedimento, a massa obtida na primeira reação foi 0,668 g com um rendimento de 39 %. A reação foi repetida mais 4 vezes, tendo-se obtido as massas e rendimentos apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Massas obtidas e respectivos rendimentos resultantes das reações realizadas para a obtenção do ligando de partida 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona.

Massa obtida (g)	Rendimento (%)
0,983	37,5
0,754	33,0
0,227	22,7
0,949	45,5

Na figura 12 é possível observar a síntese deste ligando de partida.

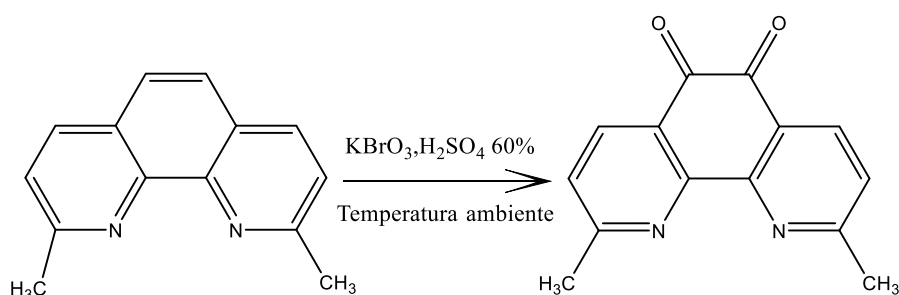


Figura 12: Síntese do ligando de partida 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona. Adaptado de [64].

3.1.3 Síntese do ligando 6,9-dimetil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina (C₁₅H₁₂N₄)

A síntese deste ligando foi baseada no protocolo de Adel M.S. Garas e Robert S. Vagg, 2000 [65]. Pesou-se 0,101 g de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona num balão de 50 mL e adicionou-se 6 mL de etanol (C₂H₆O) a 99,9 %, ficando a agitar até dissolver o conteúdo do balão. Adicionou-se lentamente 0,053 g de hexametenotetramina [(CH₂)₆N₄] e pôs-se em refluxo a 100 °C durante 7 dias. Após 4 dias de refluxo, o solvente evaporou na totalidade e por isso adicionou-se 6 mL de C₂H₆O. No sétimo dia retirou-se a reação do refluxo e deixou-se arrefecer durante um curto período de tempo. Filtrou-se com filtro de papel e simultaneamente foi-se lavando com C₂H₆O. O filtrado ficou na *hotte* durante 1 mês para que ocorresse precipitação do composto. Após este período de tempo, não se verificou qualquer alteração e procedeu-se à evaporação do C₂H₆O. Recristalizou-se com CH₃OH quente e pôs-se o balão no frigorífico a 4 °C durante 6 dias,

verificando-se a formação de um óleo. Após este período de tempo, evaporou-se o CH₃OH.

Fez-se espectro de ¹H RMN em C₂D₆OS que revelou a ausência de ligando. Na figura 13 é possível observar a síntese deste ligando.

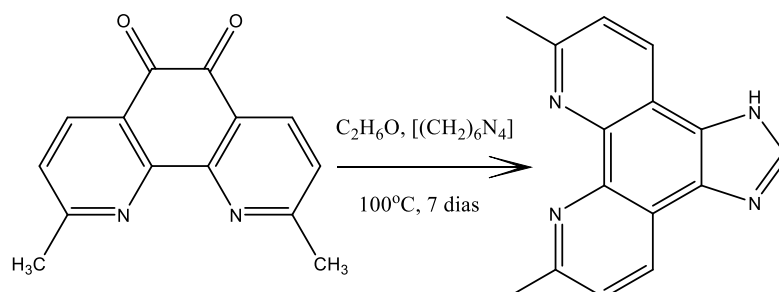


Figura 13: Síntese do ligando 6,9-dimetil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina. Adaptado de [65].

3.1.4 Síntese do ligando 6,9-dimetil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina (C₁₅H₁₂N₄) com um novo protocolo

O primeiro protocolo seguido para a síntese do ligando 6,9-dimetil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina, descrito no subcapítulo 3.1.3 (página 25), não resultou e por isso avançou-se para outro procedimento.

A nova síntese deste ligando foi baseada no protocolo de Zhong *et al.*, 2016 [66]. Pesou-se 0,150 g de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona num balão de duas tubuladuras de 100 mL e adicionou-se 0,971 g de acetato de amónia (C₂H₇NO₂) e 10 mL de ácido acético (CH₃COOH). Pôs-se em refluxo a 60 °C durante 30 min em ambiente inerte com nitrogénio e com agitação até dissolver. Após este período de tempo, adicionou-se lentamente a [(CH₂)₆N₄]. Aumentou-se a temperatura do refluxo para 97 °C, mantendo o ambiente inerte e a agitação. Após 1 h, a garrafa de nitrogénio foi desligada e adicionou-se mais 25 mL de CH₃COOH. Manteve-se o refluxo a 97 °C com agitação durante 6 dias. Após este período de tempo, retirou-se o balão do refluxo e, mantendo a agitação, pôs-se em gelo para se realizar a neutralização com uma solução de hidróxido de amónia (NH₄O₂). Após a neutralização, como não ocorreu formação de precipitado, procedeu-se à evaporação do CH₃COOH, formando-se um óleo. Adicionou-se CH₃OH quente ao balão para ocorrer a precipitação do sal, mas sem sucesso. Evaporou-se o CH₃OH e adicionou-se CHCl₃ ao balão, vertendo-se o seu conteúdo para uma ampola de extração. Já na ampola, adicionou-se H₂O e fizeram-se 2 extrações, recolhendo-se duas fases orgânicas para balões distintos. Evaporou-se o solvente de ambas as frações e colocaram-se a secar na estufa.

Fez-se espectro de ^1H RMN (400 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$): δ 12,36 ppm (s, 1H), δ 8,75 ppm (d, 2H), δ 8,43 ppm (s, 1H), δ 7,71 ppm (d, 2H) e δ 2,84 ppm (s, 6H) que revelou a presença do ligando.

A reação só foi realizada uma única vez, sendo que a massa obtida foi 0,072 g com um rendimento de 46 %. Na figura 14 é possível observar a síntese deste ligando.

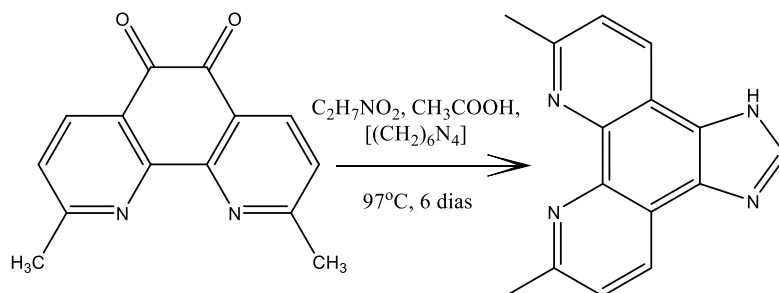


Figura 14: Síntese do ligando 6,9-dimetil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina. Adaptado de [66].

3.1.5 Síntese do ligando 1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina-6,9-dicarbaldeído ($\text{C}_{15}\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_2$)

A síntese deste ligando foi baseada no protocolo de Medeiros *et al.*, 2017 [60]. Dissolveu-se 0,072 g de 6,9-dimetil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina em 5,21 mL de dioxane ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$). Num balão de 50 mL pesou-se 0,142 g de óxido de selênio (SeO_2) e adicionou-se 100 μL de H_2O e 5 mL de $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$. Adicionou-se o 6,9-dimetil-1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina previamente dissolvido ao balão e pôs-se em refluxo a 105°C com agitação durante 1 dia. Após o período de refluxo, filtrou-se, evaporou-se e recristalizou-se com CHCl_3 . O balão ficou 2 dias no frigorífico a 4°C para ocorrer precipitação. Posteriormente, filtrou-se e recolheu-se o precipitado e o filtrado cujo solvente foi evaporado. Colocaram-se a secar na estufa.

Fizeram-se espectros de ^1H RMN e ^{13}C RMN em $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$ que revelaram a ausência de ligando. Na figura 15 é possível observar a síntese deste ligando.

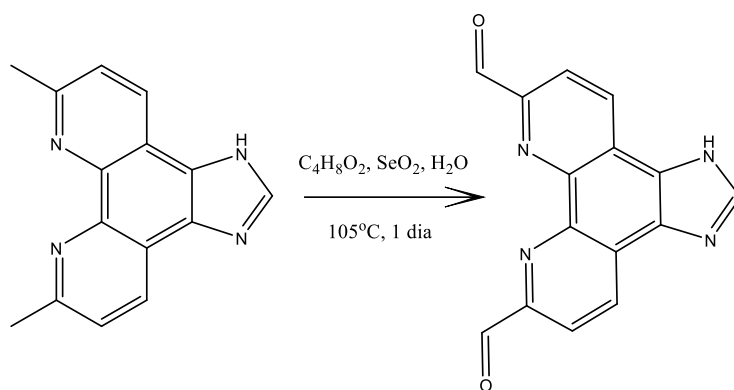


Figura 15: Síntese do ligando 1H-imidazo[4,5-f][1,10]fenantrolina-6,9-dicarbaldeído. Adaptado de [60].

3.1.6 Síntese do ligando de partida 2,9-dicarbaldeído-1,10-fenantrolina ($C_{14}H_8N_2O_2$)

Este ligando de partida foi sintetizado de acordo com o protocolo de Chandler *et al.*, 2008 [67]. Pesou-se 2,006 g de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina hemihidratada ($C_{14}H_{12}N_2 \cdot 0.5H_2O$) num copo de 250 mL e adicionou-se 60 mL de $C_4H_8O_2$. Agitou-se até a mistura estar totalmente dissolvida. Posteriormente, pesou-se 4,01 g de SeO_2 num balão de 250 mL e adicionou-se 1,4 mL de H_2O . Colocou-se a agitar até o SeO_2 se dissolver. Depois do SeO_2 estar dissolvido, adicionou-se 100 mL de $C_4H_8O_2$ ao balão. A mistura já dissolvida no copo foi adicionada ao balão e pôs-se em refluxo a 115 °C durante a noite. Filtrou-se a quente e recolheu-se o filtrado para um balão. Evaporou-se e adicionou-se tetrahidrofurano (C_4H_8O). Transferiu-se o conteúdo do balão para um *erlenmeyer* e pôs-se durante 3 semanas no frigorífico a 4 °C para ocorrer precipitação. Após este período de tempo, filtrou-se com filtro de papel, recolheu-se o precipitado e deixou-se secar.

Fez-se espectro de 1H RMN em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$) que revelou a presença deste ligando de partida: 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 10,56 ppm (s, 2H), δ 8,51 ppm (d, 2H), δ 8,38 ppm (d, 2H) e δ 8,05 ppm (s, 2H).

A reação foi realizada 4 vezes. As massas obtidas e os respectivos rendimentos são apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Massas obtidas e respectivos rendimentos resultantes das reações realizadas para a obtenção do ligando de partida 2,9-dicarbaldeído-1,10-fenantrolina.

Massa obtida (g)	Rendimento (%)
0,613	28,1
0,266	12,2
0,593	27,2
0,670	30,8

Na figura 16 é possível observar a síntese deste ligando de partida.

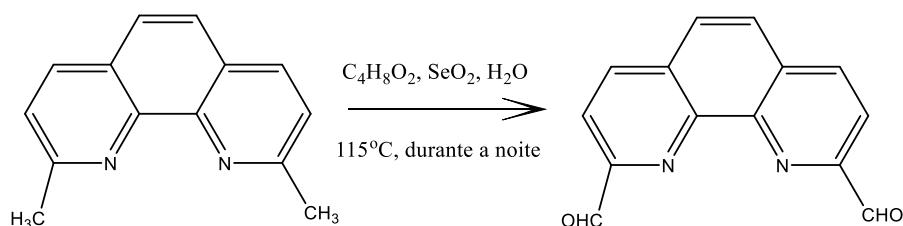


Figura 16: Síntese do ligando de partida 2,9-dicarbaldéido-1,10-fenantrolina. Adaptado de [67].

3.1.7 Síntese do ligando 2,9-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina (C₁₄H₁₂N₂O₂)

A síntese deste ligando foi baseada no protocolo de Chandler *et al.*, 2008 [67]. Pesou-se 0,203 g de 2,9-dicarbaldéido-1,10-fenantrolina e 0,097 g de borohidreto de sódio (NaBH₄). Colocou-se o 2,9-dicarbaldéido-1,10-fenantrolina num balão de 50 mL e adicionou-se 25 mL de C₂H₆O. Posteriormente, adicionou-se lentamente o NaBH₄ e pôs-se em refluxo a 105 °C durante 1 h e 30 min. Após este período de tempo, retirou-se o balão do refluxo e deixou-se arrefecer. Evaporou-se aproximadamente metade do volume de C₂H₆O e filtrou-se o conteúdo do balão. Durante a filtração foi-se adicionando C₂H₆O ao balão e verteu-se para o papel de filtro, de forma a aproveitar o máximo de composto. Evaporou-se o solvente e colocou-se o balão na estufa para secar.

Fez-se espectro de ¹H RMN (400 MHz, C₂D₆OS): δ 8,55 ppm (d, 2H), δ 7,99 ppm (s, 2H), δ 7,94 ppm (d, 2H), δ 5,74 ppm (d, 4H) e δ 4,95 ppm (t, 2H) que revelou a presença deste ligando no estado puro (anexo I).

A reação foi realizada duas vezes. A massa obtida na primeira reação foi 0,025 g e o rendimento de 12,1 %, enquanto na segunda síntese foi 0,111 g com um rendimento de 47,4 %. Na figura 17 é possível observar a síntese deste ligando.

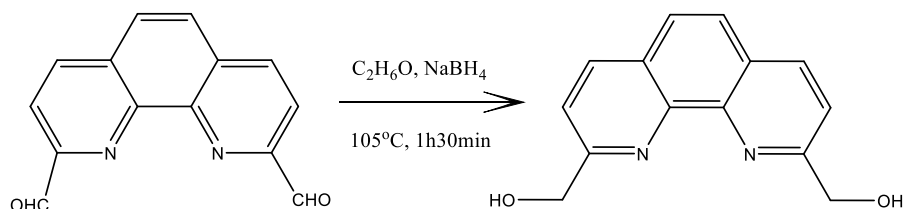


Figura 17: Síntese do ligando 2,9-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina. Adaptado de [67].

3.1.8 Síntese do ligando 2,9-bis(bromometil)-1,10-fenantrolina (C₁₄H₁₀Br₂N₂)

A síntese deste ligando foi baseada no protocolo de Chandler *et al.*, 2008 [67]. Pesou-se 0,136 g de 2,9-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina num balão e adicionou-se 6 mL de ácido bromídrico (HBr). Colocou-se a agitar e em refluxo a 100 °C durante 3 h. Após este período de tempo, colocou-se o balão em agitação num banho de gelo e neutralizou-se a solução com carbonato de sódio anidro (Na₂CO₃). Filtrou-se o conteúdo do balão com H₂O quente, recolheu-se o precipitado castanho que ficou retido no filtro e pôs-se a secar na estufa. Paralelamente, lavou-se o filtro com CH₃OH quente e recolheu-se o filtrado. Evaporou-se e secou-se na estufa.

Fizeram-se espectros de ¹H RMN e ¹³C RMN do precipitado e do filtrado em CDCl₃ que revelaram a ausência de ligando. Na figura 18 é possível observar a síntese deste ligando.

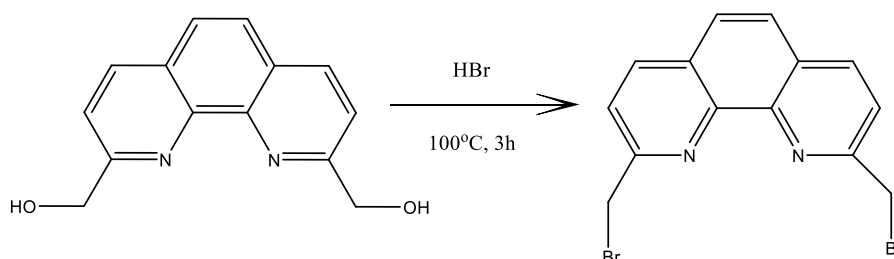


Figura 18: Síntese do ligando 2,9-bis(bromometil)-1,10-fenantrolina. Adaptado de [67].

3.1.9 Síntese do ligando 2,2'-((etano-1,2-diilbis(azanodiil))bis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) (C₂₂H₂₂N₄O₄)

A síntese deste ligando foi baseada nos protocolos de Barrett *et al.*, 1995 [68] e Bohuslav Drahoš e Zdeněk Trávníček, 2013 [69]. Pipetou-se 3,77 mL de trietilenotetramina (C₆H₁₈N₄) e 66,7 mL de CH₃COOH num copo e colocou-se em agitação durante 10 min. Num balão de 100 mL pesou-se 7,5 g de anidrido ftálico (C₈H₄O₃). Adicionou-se gota a gota e à temperatura ambiente a mistura de C₆H₁₈N₄ e CH₃COOH ao C₈H₄O₃ presente no balão. Após a adição, a solução permaneceu em agitação e à temperatura ambiente durante toda a noite. Posteriormente, foi posta em refluxo durante 1 h a 100 °C. Após 1 h de refluxo, evaporou-se o CH₃COOH e aqueceu-se o CH₃OH a 100 °C para se adicionar ao balão até preencher o fundo. Colocou-se o balão no frigorífico a 4 °C durante 1 dia. Posteriormente, filtrou-se o seu conteúdo, fazendo-se várias lavagens do balão com C₂H₆O a 99,9 %. Recolheu-se o filtrado, evaporou-se o C₂H₆O e colocou-se o balão na estufa durante 1 h para secar. Preparou-se uma solução de Na₂CO₃ a 10 % em H₂O. Dissolveu-se todo o composto em Na₂CO₃ e fizeram-se 27 extrações com CHCl₃. Recolheram-se todas as fases orgânicas e adicionou-se Na₂SO₄ até preencher o fundo dos diversos balões. Estes foram deixados durante toda a noite na *hotte*. No dia seguinte,

filtrou-se, evaporou-se o CHCl_3 e procedeu-se à realização de uma coluna. Começaram por se fazer várias cromatografias em camada fina, de forma a perceber qual a melhor mistura de solventes que permitiria a separação do composto de interesse da contaminação. Assim, dissolveu-se uma porção mínima de composto em CHCl_3 e após várias tentativas a mistura escolhida foi a que seria constituída por 13 mL de propanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) e 1 mL de CH_3OH . Num copo juntaram-se os volumes de $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ e CH_3OH e sílica. Misturou-se tudo com uma vareta e foi-se adicionando à coluna. Após a compactação da coluna, adicionou-se a amostra e foram recolhidas as frações cujo solvente foi posteriormente evaporado.

Fez-se espectro de ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 7,67 ppm (t, 4H), δ 7,65 ppm (d, 4H), δ 3,74 ppm (t, 4H), δ 3,56 ppm (t, 4H), δ 2,91 ppm (t, 4H) e δ 1,57 ppm (s, 2H) que revelou a presença de ligando.

A reação foi realizada uma única vez, sendo que a massa obtida foi 0,712 g com um rendimento de 7 %. Na figura 19 é apresentada a síntese do ligando.

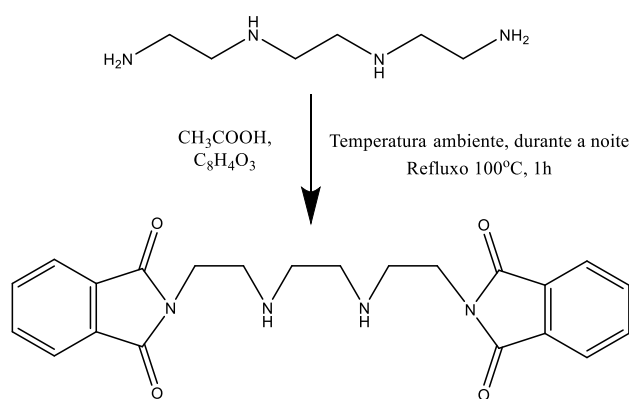


Figura 19: Síntese do ligando 2,2'-((etano-1,2-diilbis(azanodiil))bis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona). Adaptado de ^[68] ^[69].

3.1.10 Síntese do ligando 2,2'-((azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) ($\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$)

A síntese deste ligando foi baseada nos protocolos de Barrett *et al.*, 1995 ^[68] e Bohuslav Drahoš e Zdeněk Trávníček, 2013 ^[69]. Colocou-se 3,77 mL de dietilenotriamina ($\text{C}_4\text{H}_{13}\text{N}_3$) e 66,7 mL de CH_3COOH num copo em agitação durante 10 min. Num balão de 100 mL pesou-se 7,5 g de $\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_3$. Adicionou-se gota a gota e à temperatura ambiente a mistura de $\text{C}_4\text{H}_{13}\text{N}_3$ e CH_3COOH ao $\text{C}_8\text{H}_4\text{O}_3$ presente no balão. Terminada a adição, a solução ficou em agitação e à temperatura ambiente durante a noite. Posteriormente, foi posta em refluxo durante 1 h a 100°C . Após 1 h de refluxo, evaporou-se o CH_3COOH e aqueceu-se o CH_3OH a 100°C para se adicionar ao balão até preencher o fundo. Colocou-se o balão

no frigorífico a 4 °C durante 1 dia. Posteriormente, filtrou-se e fez-se várias lavagens com C₂H₆O a 99,9 %. Recolheu-se o precipitado retido no filtro.

Fizeram-se espectros de ¹H RMN (400 MHz, C₂D₆OS): δ 7,80 ppm (t, 4H), δ 7,75 ppm (d, 4H), δ 3,59 ppm (t, 4H), δ 2,76 ppm (t, 4H) e δ 1,91 ppm (s, 1H); ¹³C RMN (400 MHz, C₂D₆OS): δ 168,40 ppm, δ 134,64 ppm, δ 132,14 ppm, δ 123,28 ppm, δ 46,66 ppm e δ 37,70 ppm; DEPT135 (400 MHz, C₂D₆OS): δ 134,65 ppm (CH), δ 123,28 ppm (CH), δ 46,66 ppm (CH₂) e δ 37,69 ppm (CH₂); DEPT90 (400 MHz, C₂D₆OS): δ 134,65 ppm (CH), δ 123,28 ppm (CH) e espectros 2D de correlação quântica heteronuclear única (HSQC), correlação múltipla heteronuclear (HMBC) e correlação homonuclear (COSY) que revelaram a presença do ligando.

O espectro de HSQC permite-nos avaliar o acoplamento entre os átomos de carbono e hidrogénio até 1 J e o espectro de HMBC até 4 J. Por outro lado, o espectro COSY determina o acoplamento entre os átomos de hidrogénio até 1 J.

Na tabela 5 são apresentadas as respetivas correlações entre os átomos de carbono e hidrogénio, obtidas a partir dos espectros de HSQC e HMBC, e entre os átomos de hidrogénio, obtidas através do espectro COSY.

Tabela 5: Correlações obtidas nos espectros 2D HSQC, HMBC e COSY do ligando 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona).

HSQC		HMBC		COSY	
¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹ H	¹ H
168,41 ppm	Sem correlação	168,41 ppm	3,59 ppm	1,91 ppm	Sem correlação
			7,75 ppm		
			7,80 ppm		
46,66 ppm	2,76 ppm	46,66 ppm	3,59 ppm	2,76 ppm	2,76 ppm
			2,76 ppm		3,59 ppm
37,70 ppm	3,59 ppm	37,70 ppm	2,76 ppm	3,59 ppm	3,59 ppm
			3,59 ppm		2,76 ppm
123,28 ppm	7,75 ppm	123,28 ppm	7,80 ppm	7,75 ppm	7,75 ppm
			7,75 ppm		7,80 ppm
134,65 ppm	7,80 ppm	134,65 ppm	7,80 ppm	7,80 ppm	7,80 ppm
			7,75 ppm		7,75 ppm

A reação foi realizada uma única vez, sendo que a massa obtida foi 1,022 g com um rendimento de 7,8 %. Na figura 20 é apresentada a síntese do ligando.

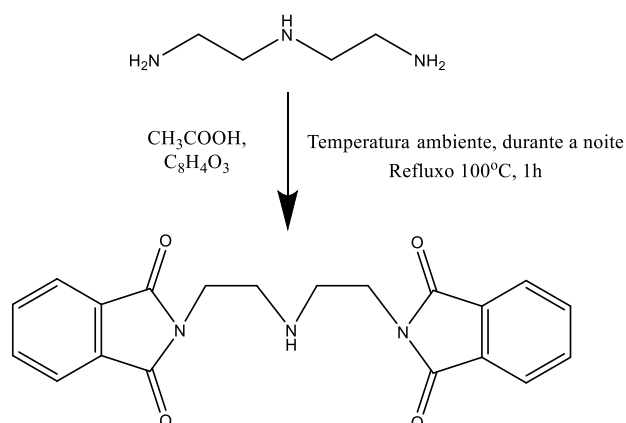


Figura 20: Síntese do ligando 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona). Adaptado de ^[68] ^[69].

3.1.11 Síntese do ligando N,N'-((1,10-fenantrolina-2,9-diil)bis(metileno))bis(3-(4-(3-aminopropil)piperazin-1-il)propan-1-amina) (C₃₄H₅₆N₁₀)

A síntese deste ligando foi baseada no protocolo de Bossmann *et al.*, 2006 ^[70]. Pesou-se 0,234 g de 2,9-dicarbaldéido-1,10-fenantrolina num balão de 25 mL e adicionou-se 10 mL de tolueno (C₇H₈). Colocou-se em agitação e à temperatura ambiente até dissolver. Posteriormente, adicionou-se *molecular sieves* até preencher o fundo do balão e 411 µL de 1,4-bis(3-aminopropil)piperazina (C₁₀H₂₄N₄). Pôs-se a agitar à temperatura ambiente durante a noite. No dia seguinte, deixou-se em refluxo a 90 °C durante 40 min. Posteriormente, filtrou-se, recolheu-se o filtrado e evaporou-se. Adicionou-se 4 mL de C₂H₆O a 99,9 % ao balão e pôs-se a agitar. Pesou-se 0,053 g de NaBH₄ e adicionou-se lentamente ao balão. Este foi deixado em agitação à temperatura ambiente durante 2 dias. Após este período de tempo, o composto precipitou e por isso pôs-se em refluxo durante 1 h a 100 °C. Evaporou-se o C₂H₆O e adicionou-se cerca de 30 mL de H₂O ao balão. Procedeu-se à extração com CHCl₃ e recolheu-se a primeira fase orgânica para um *erlenmeyer* e as restantes para outro. Evaporou-se o solvente e secou-se na estufa.

Fizeram-se espectros de ¹H RMN e ¹³C RMN em CDCl₃ para as duas amostras que revelaram a ausência de ligando. Na figura 21 é apresentada a síntese do ligando.

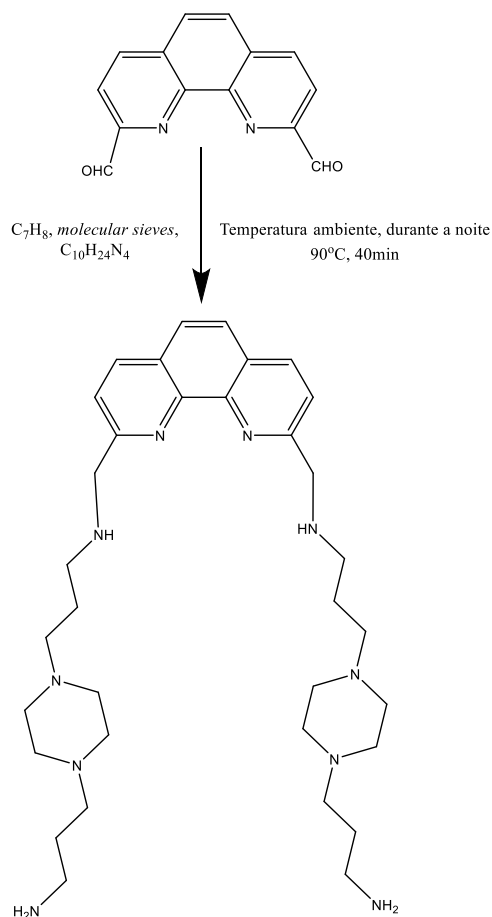


Figura 21: Síntese do ligando N,N'-((1,10-fenantrolina-2,9-diil)bis(metileno))bis(3-(4-(3-aminopropil)piperazin-1-il)propan-1-amina). Adaptado de [70].

3.2 Preparação do aptamero e dos ligandos

O aptamero usado neste estudo foi o AT11-B0: 5'-TGGTGGTGGTTGGTGGTGGTGGTGGT-3' adquirido à STAB VIDA Genomics Lab (Lisboa, Portugal) na forma *salted*.

A remoção do sal para a purificação da sequência foi feita em concentradores Millipore Ultracel® YM-3 com membranas de celulose. O aptamero foi diluído em 2 mL de H₂O mili-Q no concentrador e centrifugado a 3500 G durante 30 min à temperatura ambiente. Após este ciclo de centrifugação, descartou-se a solução impura e adicionou-se mais 2 mL de H₂O mili-Q. O processo foi repetido cinco vezes. Terminadas as lavagens para remoção do sal, a absorvância (A) da sequência a 260 nm foi medida no espectrofotómetro UV-visível Thermo Scientific™ Evolution 201. Usando o coeficiente de extinção molar (ϵ), a largura da célula (l) e A, pela lei de Lambert-Beer (equação 1), determinou-se a concentração da solução do aptamero. Soluções *stock* de 5,36 mM de AT11-B0 foram preparadas em H₂O milli-Q e armazenadas a -20 °C.

$$c = \frac{A}{\epsilon l} \quad (1)$$

A utilização do aptamero para qualquer um dos ensaios abaixo descritos requer sempre o seu *annealing* que consiste num aquecimento a 95 °C durante 15 min, seguido de um arrefecimento em gelo durante 20 min na presença de um tampão [55]. Este processo permite a formação da estrutura de G4.

A síntese e purificação dos ligandos [32]phen₂N₄, [16]phenN₂, C₈, C₈-NH₂, C₃ e C₅ foram realizadas como previamente descrito [71] [72]. Soluções *stock* dos ligandos foram preparadas a 10 mM em dimetilsulfóxido ((CH₃)₂SO).

3.3 Espectro de Diferença Térmica (TDS)

A análise do espectro de TDS permite distinguir diferentes topologias de G4 com base em rácios, $\Delta\text{Abs}_{240\text{nm}}/\Delta\text{Abs}_{295\text{nm}}$ e $\Delta\text{Abs}_{255\text{nm}}/\Delta\text{Abs}_{295\text{nm}}$, que têm em conta a variação das absorvâncias (ΔAbs) a determinados comprimentos de onda. Se o valor do rácio $\Delta\text{Abs}_{240\text{nm}}/\Delta\text{Abs}_{295\text{nm}}$ for superior a 4 a topologia é paralela, enquanto se for inferior a 2 é antiparalela. No caso do rácio $\Delta\text{Abs}_{255\text{nm}}/\Delta\text{Abs}_{295\text{nm}}$ se o valor for superior a 3,5 a topologia é paralela e se for inferior a 1,5 é antiparalela [73].

De acordo com Carvalho *et al.*, 2016 [74] os ensaios foram realizados no espectrofotómetro Thermo Scientific™ Evolution 201 e o TDS foi obtido por varrimento de 220 a 335 nm a uma velocidade de 200 nm/min.

O G4 AT11-B0 foi preparado à concentração de 2,5 µM em tampão de fosfato de potássio 30 mM (KH₂PO₄ 15 mM, K₂HPO₄ 15 mM, pH 7,1), contendo 100 mM de cloreto de potássio (KCl), e sujeito a *annealing*. Após este processo, o aptamero foi inserido num banho de gelo e foi adquirido um espectro a 20 °C, isto é, abaixo da T_m do aptamero. Posteriormente, o G4 AT11-B0 foi posto numa placa de aquecimento a 95 °C durante 5 min, sendo adquirido o espectro a uma temperatura de 90 °C, a qual que se situa acima da T_m do aptamero. O espectro de TDS foi calculado subtraindo ao espectro de 90 °C o espectro a 20 °C. Os dados foram normalizados em relação ao pico positivo mais alto no programa OriginPro8 [74].

3.4 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de RMN foi utilizada para avaliar se os ligandos resultantes da síntese eram realmente os esperados e se se encontravam puros.

Segundo Carvalho *et al.*, 2018 [59] os espectros de ¹H RMN, ¹³C RMN, DEPT135, DEPT90 e os espectros 2D de HSQC, HMBC e COSY foram adquiridos no equipamento Bruker Avance III

400 com uma sonda de gradiente Z, a 400 MHz e 25 °C. Os espectros foram analisados utilizando o programa Bruker Topspin 3.5.

3.5 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

A espectroscopia de CD permite detetar alterações conformacionais e analisar a desnaturação térmica de ácidos nucleicos. Esta técnica biofísica foi utilizada para estudar a topologia da estrutura do G4 AT11-B0 e o potencial de estabilização dos ligandos em relação ao aptamero [75].

Os ensaios de CD foram realizados no espectropolarímetro Jasco J-815 equipado com um sistema de controlo de temperatura [55] [59].

De acordo com Carvalho *et al.*, 2018 [59] para as titulações de CD preparou-se uma solução de 10 µM de G4 AT11-B0 em tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a 1 mM (pH 7,1), contendo cloreto de lítio (LiCl) a 90 mM e 10 mM de KCl, que sofreu posterior *annealing*. Foram preparadas soluções de 1 mM de cada um dos ligandos, [32]phen₂N₄, [16]phenN₂, C₈, C₈-NH₂, C₃, C₅, 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) e PhenDC₃ em H₂O mili-Q. O volume de ligando necessário para a titulação foi adicionado diretamente na célula de quartzo com um caminho ótico de 1 mm.

Os espectros de CD, obtidos a cada ponto de titulação antes da realização de cada ensaio de desnaturação térmica, foram adquiridos a 25 °C, a uma velocidade de varrimento de 200 nm/min, com um tempo de resposta de 1 s e comprimentos de onda de 220 a 340 nm [55].

Os estudos de desnaturação térmica de CD foram realizados entre 20 e 110 °C, com uma taxa de aquecimento de 2 °C/min, monitorizando a elipticidade a 261 nm. Os espectros foram adquiridos entre 0 e 4 equivalentes de ligando. Os resultados foram tratados no programa OriginPro8 e convertidos em frações enroladas, adequadas a uma distribuição de Boltzmann, obtendo-se as curvas de desnaturação térmica [59].

3.6 Espectroscopia de Fluorescência

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para avaliar a interação dos ligandos com o aptamero G4 AT11-B0 e consequentemente determinar os valores de K_D de cada ligando relativamente ao aptamero [59].

As experiências de espectroscopia de fluorescência foram realizadas no fluorímetro Horiba FluoroMax4, equipado com um sistema de controlo de temperatura [55] [59].

De acordo com Carvalho *et al.*, 2018 [55] os ligandos foram testados a uma concentração de 5 μM em tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a 30 mM (pH 7,1), contendo KCl a 100 mM. Os macrociclos derivados de fenantrolina [32]phen₂N₄ e [16]phenN₂ foram excitados a 271 nm e os valores de emissão de fluorescência foram recolhidos entre 286 e 600 nm [55]. Por outro lado, os derivados de laranja de acridina C₈, C₅ e C₃ foram excitados a 498 nm e o C₈-NH₂ a 494 nm. Os valores de emissão de fluorescência foram recolhidos entre 500 e 700 nm [59].

Para estudar a formação dos conjugados G4 AT11-B0-ligandos fez-se o *annealing* prévio do aptamero em tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a 30 mM (pH 7,1), contendo KCl a 100 mM que, posteriormente, foi titulado diretamente na cuvete de quartzo de 10 mm, onde se encontrava o ligando a uma concentração de 5 μM dissolvido no tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a 30 mM (pH 7,1), contendo KCl a 100 mM. Os espectros foram adquiridos após um período de equilíbrio de 10 min [55].

Os dados obtidos foram convertidos em frações de ligando ligado, α no caso dos derivados de laranja de acridina (equação 2) e β para os macrociclos derivados de fenantrolina (equação 3), usando as seguintes equações [59] :

$$\alpha = \frac{I - I_{\lambda}^{\text{Livre}}}{I_{\lambda}^{\text{Ligado}} - I_{\lambda}^{\text{Livre}}} \quad (2)$$

$$\beta = I_{\lambda}^{\text{Livre}} - I \quad (3)$$

onde I é a intensidade de fluorescência dos ligandos em cada concentração de titulante e I_{livre} e I_{ligado} correspondem às intensidades de fluorescência dos ligandos livres (0 equivalentes) e ligados (2 equivalentes). Após obtido o conjunto de pontos relativo à fração de ligando ligado, estes foram transferidos para o programa OriginPro8, no qual se fez um ajuste com a função hiperbólica no caso dos macrociclos derivados de fenantrolina e sigmoide no caso dos derivados de laranja de acridina. Os valores de K_D foram determinados a partir de um modelo de *saturation binding* segundo a equação 4 para os derivados de laranja de acridina e a equação 5 para os macrociclos derivados de fenantrolina [59]:

$$\alpha = \frac{[\text{ADN}]^h}{K_D + [\text{ADN}]^h} \quad (4)$$

$$\beta = \frac{[\text{ADN}]}{K_D + [\text{ADN}]} \quad (5)$$

onde a e β correspondem às frações de ligando ligado dos derivados de laranja de acridina e macrociclos derivados de fenantrolina, respectivamente, $[ADN]$ é a concentração de G4 AT11-B0 e h é a constante de *Hill* que descreve a cooperatividade de ligação do ligando.

3.7 Ensaios de Viabilidade Celular

Os ensaios de viabilidade celular foram realizados em duas fases. Em primeiro lugar testaram-se os ligandos a diferentes concentrações nas linhas celulares HeLa e NHDF com o objetivo de se calcularem os valores de IC_{50} . As concentrações testadas nas HeLa foram as seguintes:

- C_5 : 0,01 μM , 0,05 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM e 3 μM ;
- C_3 : 0,01 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 1,25 μM , 1,75 μM e 3 μM ;
- C_8 : 0,01 μM , 0,025 μM , 0,075 μM , 0,1 μM , 0,125 μM , 0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM e 2 μM ;
- C_8-NH_2 : 0,01 μM , 0,1 μM , 0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM e 5 μM ;
- [16]phen N_2 : 0,1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 25 μM , 50 μM e 100 μM ;
- 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona): 1 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM .

Nas NHDF as concentrações testadas são apresentadas abaixo:

- C_5 : 0,01 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 3 μM e 5 μM ;
- C_3 : 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 1,5 μM , 2 μM e 3 μM ;
- C_8 : 0,01 μM , 0,1 μM , 0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM e 5 μM ;
- C_8-NH_2 : 0,01 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 5 μM e 10 μM ;
- [16]phen N_2 : 5 μM , 10 μM , 15 μM , 25 μM , 35 μM , 50 μM e 100 μM ;
- 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona): 1 μM , 2 μM , 10 μM , 50 μM , 100 μM , 150 μM e 200 μM .

Em segundo lugar, depois dos valores de IC_{50} terem sido determinados, prosseguiu-se para a incubação dos conjugados G4 AT11-B0-derivados de laranja de acridina, com *annealing* prévio do aptamero em tampão de KH_2PO_4/K_2HPO_4 a 30 mM (pH 7,1), contendo KCl a 100 mM.

No caso da linha HeLa, tendo em conta os valores de IC_{50} , os conjugados G4 AT11-B0-derivados de laranja de acridina testados foram os seguintes:

- C_5 (1 μM) - G4 AT11-B0 (15 μM);
- C_3 (1 μM) - G4 AT11-B0 (15 μM);
- C_8 (0,125 μM) - G4 AT11-B0 (15 μM);

- C₈-NH₂ (0, 25 μM) - G4 AT11-B0 (15 μM).

No caso da linha NHDF, os conjugados G4 AT11-B0-derivados de laranja de acridina estudados foram os seguintes:

- C₅ (2 μM) - G4 AT11-B0 (15 μM);
- C₃ (2 μM) - G4 AT11-B0 (15 μM);
- C₈ (1 μM) - G4 AT11-B0 (15 μM);
- C₈-NH₂ (2 μM) - G4 AT11-B0 (15 μM).

De acordo com Carvalho *et al.*, 2018 ^[59] e Cruz *et al.*, 2011 ^[61] a linha celular HeLa foi cultivada em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FBS) e 1 % de antibiótico/antimicótico e a linha NHDF foi cultivada em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) suplementado com L-glutamina, piruvato de sódio, 10 % de FBS, HEPES e 1% de antibiótico/antimicótico. As culturas foram mantidas a 37 °C numa atmosfera humidificada, contendo 5 % de dióxido de carbono (CO₂).

As duas linhas celulares foram semeadas em placas de 48 poços a uma densidade de 5 × 10³ células/poço. No caso das HeLa, os ligandos, o G4 AT11-B0 e os conjugados foram incubados após 24 h e no caso das NHDF após 48 h. O período de incubação nas duas linhas celulares foi 7 dias. Atingido o sétimo dia, o meio foi substituído por uma mistura formada pelo MTT, uma solução salina com tampão fosfato (PBS) e meio, no caso das HeLa meio DMEM incompleto e no caso das NHDF meio RPMI incompleto com 1 % de FBS. Após este procedimento, as células foram incubadas no escuro a 37 °C numa atmosfera humidificada, contendo 5 % de CO₂, durante 1 h no caso das HeLa e 1 h e 30 min no que diz respeito às NHDF. Finalmente, o meio contendo MTT foi removido, os cristais de formazano foram dissolvidos em (CH₃)₂SO e a absorvância foi determinada num leitor de microplacas Bio-Rad xMark™ a 570 nm. Os valores da absorvância foram convertidos em percentagens de viabilidade celular, as quais foram expressas como média ± erro padrão (SEM) de triplicados em comparação com o controlo. Os valores de IC₅₀ foram determinados usando o programa GraphPad Prism 6 ^[59].

3.8 Microscopia de Fluorescência Confocal

O ensaio de microscopia de fluorescência confocal foi realizado com o objetivo de avaliar a localização do ligando C₈ a 0,5 μM, do aptamero G4 AT11-B0 a 1 μM e do conjugado G4 AT11-B0-C₈ em células HeLa.

O aptamero marcado com o fluoróforo cianina 5 (Cy5) na extremidade 5' sofreu *annealing* prévio em tampão de KH₂PO₄/K₂HPO₄ a 30 mM (pH 7,1), contendo KCl a 100 mM.

A linha celular HeLa foi semeada a uma densidade de 5×10^4 células/poço, em sete placas de oito poços com fundo de vidro e mantida a 37 °C numa atmosfera humidificada, contendo 5 % de CO₂. O conjugado 5'-Cy5-G4 AT11-B0-C₈ foi incubado no escuro nas sete placas após 24 h. O ensaio foi realizado durante 7 dias, sendo que a cada dia era analisada uma placa ^[59].

De acordo com Carvalho *et al.*, 2018 ^[59] após atingido o tempo de incubação, o conteúdo dos poços foi aspirado, fizeram-se 2 lavagens com PBS quente e incubou-se no escuro com a sonda nuclear Hoescht 33342 a 1 µM durante 15 min a 37 °C em atmosfera humidificada, contendo 5 % de CO₂. Após este período de tempo, a solução foi aspirada e fizeram-se mais 2 lavagens com PBS quente. Adicionou-se 200 µL de PBS quente e utilizou-se o microscópio Zeiss AxioObserver LSM 710 com excitação a laser de 405, 488 e 514 nm para os canais 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), isotiocianato de fluoresceína (FITC) e rodamina, respetivamente. Bandas de emissão apropriadas foram selecionadas para que não ocorresse sobreposição espectral entre os canais. As imagens foram processadas com o programa Zeiss ZEN.

4. Resultados e Discussão

4.1 Espectro de Diferença Térmica (TDS)

O TDS foi obtido com o objetivo de analisar e determinar a topologia do G4 AT11-B0. Na figura 22 é possível observar que este aptamero apresenta um espectro característico de G4, com dois picos positivos a 243 e 273 nm e um pico negativo a 295 nm, na presença do tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a 30 mM, contendo 100 mM de KCl [74].

Os resultados dos rácios $\Delta\text{Abs}_{240\text{nm}}/\Delta\text{Abs}_{295\text{nm}}$ e $\Delta\text{Abs}_{255\text{nm}}/\Delta\text{Abs}_{295\text{nm}}$ foram 2,331 e 1,880, respetivamente, não sendo portanto conclusivos quanto à topologia do G4 AT11-B0, uma vez que nenhum dos valores obtidos se inclui nos intervalos definidos. No caso do rácio $\Delta\text{Abs}_{240\text{nm}}/\Delta\text{Abs}_{295\text{nm}}$ a topologia só seria paralela se o valor fosse superior a 4 e antiparalela no caso de ser inferior a 2 e no que diz respeito ao rácio $\Delta\text{Abs}_{255\text{nm}}/\Delta\text{Abs}_{295\text{nm}}$ se o valor fosse superior a 3,5 a topologia seria paralela e se fosse inferior a 1,5 seria antiparalela [73].

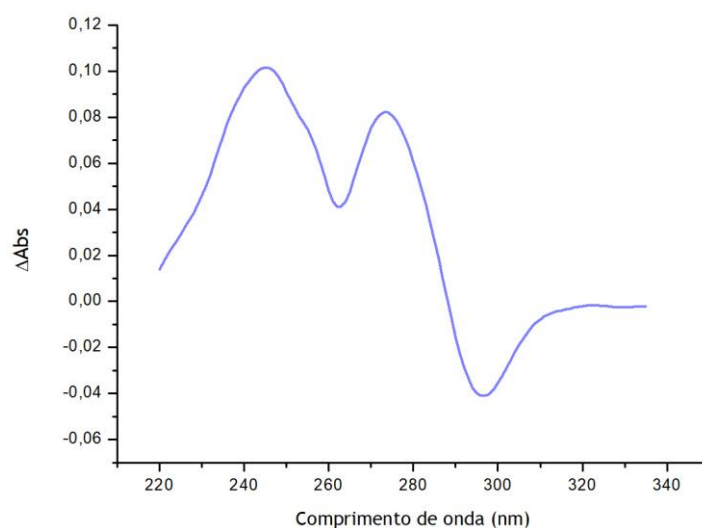


Figura 22: TDS normalizado do G4 AT11-B0 em tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a 30 mM, contendo 100 mM de KCl, resultante da subtração do espectro de 20 °C ao espectro de 90 °C.

4.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

Apesar do TDS ter sido inconclusivo quanto à topologia do G4 AT11-B0, o espectro de CD do aptamero em tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a 30 mM, contendo 100 mM de KCl, revelou

que este tem topologia paralela, com uma banda positiva máxima a 261 nm e uma banda negativa a 240 nm, tal como se pode observar na figura 23A [76]. Deste modo, não se coloca a hipótese de que o resultado obtido no TDS se possa dever à concentração e constituição do sal presente no tampão [77]. Contudo, este tampão não foi usado nos ensaios de CD, uma vez que a T_m do aptamero na presença do mesmo não se encontrava entre 50 e 60 °C.

Após várias tentativas, o tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a 1 mM (pH 7,1), contendo LiCl a 90 mM e 10 mM de KCl, foi o selecionado para os ensaios de CD, uma vez que permitiu uma diminuição da T_m do aptamero e manteve a topologia paralela do G4 AT11-B0, com uma banda positiva máxima a 261 nm e uma banda negativa a 240 nm, tal como se pode observar na figura 23B [76].

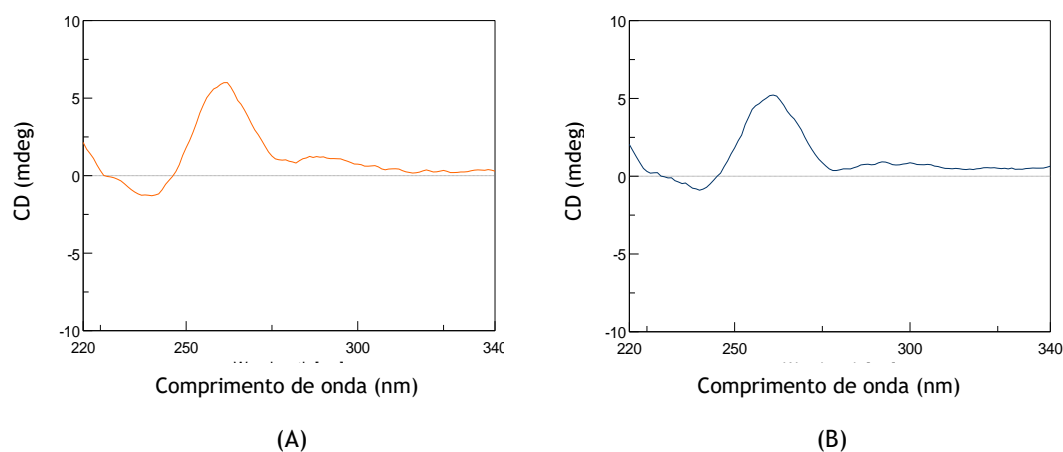


Figura 23: Espectro de CD ilustrativo da topologia paralela apresentada pelo G4 AT11-B0 em (A) tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a 30 mM, contendo 100 mM de KCl e em (B) tampão de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a 1 mM (pH 7,1), contendo LiCl a 90 mM e 10 mM de KCl.

A topologia paralela do G4 AT11-B0 manteve-se sempre ao longo das titulações com os ligandos [32]phen₂N₄, [16]phenN₂, C₈, C₈-NH₂, C₅, C₃, 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) e PhenDC₃ de 0 a 4 equivalentes.

A estabilização térmica de cada ligando em relação ao aptamero foi analisada através de ensaios de desnaturação térmica. A T_m do G4 AT11-B0 na ausência e na presença de 4 equivalentes de ligando foi determinada monitorizando a elipticidade a 261 nm e aumentando a temperatura de 20 a 110 °C.

Nas condições experimentais utilizadas, o G4 AT11-B0 apresentou uma T_m de 53,8 °C a 0 equivalentes e após a adição dos ligandos este valor foi aumentando, existindo um potencial de estabilização considerável em alguns casos. As variações de temperatura de desnaturação (ΔT_m) do G4 AT11-B0 na presença de cada um dos ligandos foram

determinadas tendo em conta a diferença entre a T_m do G4 AT11-B0 na presença de 4 equivalentes de ligando e a T_m do G4 AT11-B0 a 0 equivalentes.

Os macrociclos derivados de fenantrolina [32]phen₂N₄ e [16]phenN₂ estabilizaram o G4 AT11-B0 cerca de 11,6 °C e 9,0 °C, respetivamente. A diferença estrutural entre os macrociclos reside na ciclo-adição [2+2] no caso do [32]phen₂N₄ e [1+1] no que diz respeito ao [16]phenN₂.

A presença de duas cadeias alifáticas de poliamina separadas pelas duas unidades de fenantrolina no ligando [32]phen₂N₄ (figura 10) parece promover o aumento da T_m do G4 AT11-B0, tal como já havia sido observado com macrociclos de diimidazóis de naftaleno, nos quais a presença de pelo menos quatro grupos metileno na cadeia lateral alifática permitiu um aumento da afinidade e estabilização em relação aos G4 F21T e c-KIT [78]. Contudo, a diferença entre a estabilização dos ligandos [32]phen₂N₄ e [16]phenN₂ não foi considerável e a presença de uma única unidade aromática de fenantrolina parece já ser suficiente para se ligar a estruturas de G4 e estabilizá-las, uma vez que a acessibilidade às tétradas de guanina pode ser facilitada pelo menor tamanho do ligando [55].

Estudos anteriores com G4 c-MYC, G4 22AG híbrido e G4 22AG antiparalelo revelaram uma preferência por parte dos macrociclos derivados de fenantrolina [32]phen₂N₄ e [16]phenN₂ em estabilizar estruturas de G4 com topologia paralela, uma vez que em G4 22AG híbrido e antiparalelo as ΔT_m foram inferiores comparativamente às obtidas para o G4 c-MYC que apresenta topologia paralela. No caso do G4 22AG híbrido, os valores de ΔT_m de [32]phen₂N₄ e [16]phenN₂ a 5 equivalentes foram 6,5 °C e 5,1 °C, respetivamente, e para o G4 22AG antiparalelo houve uma diminuição considerável da estabilização, com valores de ΔT_m de 1,5 °C para o [32]phen₂N₄ e 2,2 °C para o [16]phenN₂. No caso do G4 c-MYC obtiveram-se valores de ΔT_m na presença de [32]phen₂N₄ e [16]phenN₂ de 15,1 °C e 19,3 °C, respetivamente [55].

No caso dos ligandos derivados de laranja de acridina, o C₈ estabilizou o G4 AT11-B0 cerca de 44,5 °C, seguido do C₈-NH₂ com 24,8 °C, o C₅ com 13,3 °C e por fim o C₃ com 11,7 °C. Tendo em conta os resultados obtidos, quanto maior for o número de carbonos que constituem a cadeia de alquilamida, maior é a estabilização do ligando em relação ao G4 AT11-B0.

O ligando C₈, como possui uma cadeia de alquilamida metilénica com oito carbonos e tem um anel de iodobenzeno, foi o ligando que mais estabilizou o G4 AT11-B0, seguido do C₈-NH₂ que apesar de também possuir oito carbonos na cadeia de alquilamida metilénica não tem o anel de iodobenzeno, o que diminui a sua estabilização comparativamente ao C₈. Os ligandos C₅ e C₃ têm cinco e três carbonos, respetivamente, na cadeia de alquilamida metilénica e possuem um anel de iodobenzeno. Na figura 24 é

possível observar as diferenças de comprimento da cadeia lateral de alquilamida entre os derivados de laranja de acridina e a ausência do anel de iodobenzeno no ligando C₈-NH₂.

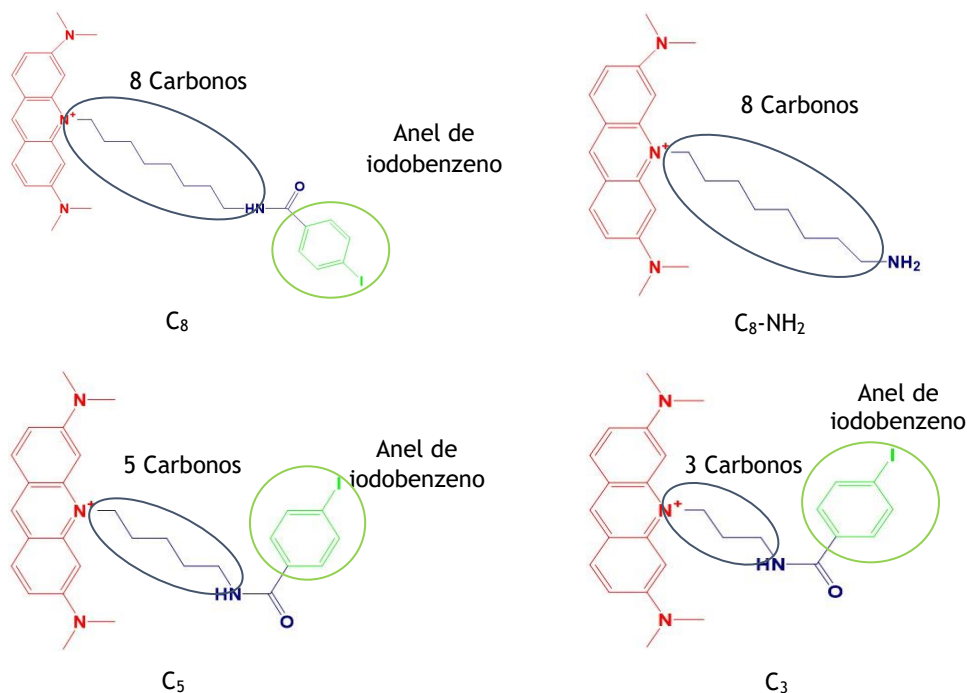


Figura 24: Ligandos derivados de laranja de acridina e respectivas diferenças no comprimento da cadeia lateral de alquilamida e a ausência do anel de iodobenzeno no ligando C₈-NH₂. Adaptado de [59].

De acordo com a literatura, ensaios de desnaturação de CD que envolveram outras estruturas de G4, tais como G4 KRAS-22RT, G4 c-MYC, G4 22AG híbrido e G4 22AG antiparalelo, também revelaram um maior grau de estabilização na presença do ligando C₈ a 2 equivalentes, com valores de ΔT_m de 40,7 °C, 33,9 °C, 13,2 °C e 6,8 °C, respetivamente. Adicionalmente, os valores mais baixos de ΔT_m para estas estruturas de G4 foram obtidos na presença do ligando C₃, tal como observado para o G4 AT11-B0. A relação entre o aumento do comprimento da cadeia lateral de alquilamida e a presença do anel de iodobenzeno (figura 24) promovem a estabilidade térmica, conferindo uma maior plasticidade ao ligando e consequentemente aumentando as zonas de contacto entre os ligandos e a estrutura de G4 [59].

O 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona), ligando sintetizado pelo grupo, apresenta duas unidades de isoindolina-1,3-diona unidas por uma cadeia de poliamina, tal como se pode observar na figura 25. Este ligando apresentou um potencial de estabilização reduzido de cerca de 1,5 °C em relação ao G4 AT11-B0.

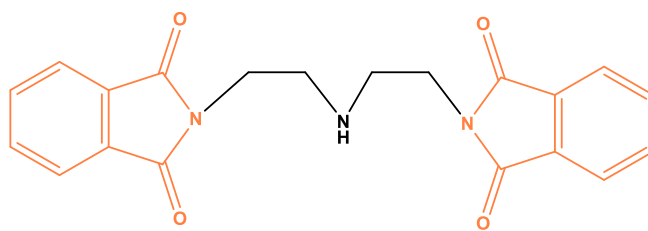


Figura 25: Estrutura do ligando 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona). A laranja as duas unidades de isoindolina-1,3-diona e a preto a cadeia de poliamina. Adaptado de [68] [69].

O PhenDC₃, ligando comercial da família das bisquinolinas que contém uma unidade aromática de fenantrolina e duas cadeias laterais de quinolina (figura 26), foi usado como controlo [79]. Este ligando apresentou uma ΔT_m superior a 30 °C em relação ao G4 AT11-B0, o que pode ser justificado pelo facto de os anéis aromáticos de quinolina permitirem um empilhamento π - π mais extenso com as tétradas de guanina da estrutura do G4 AT11-B0 [80].

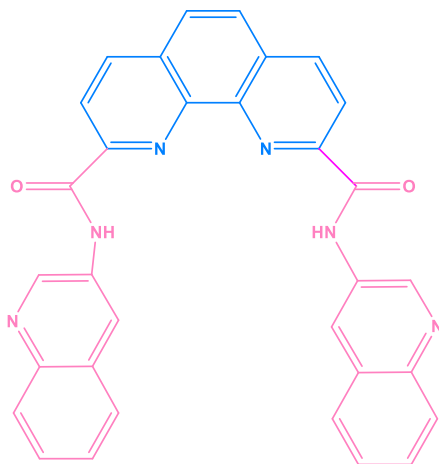
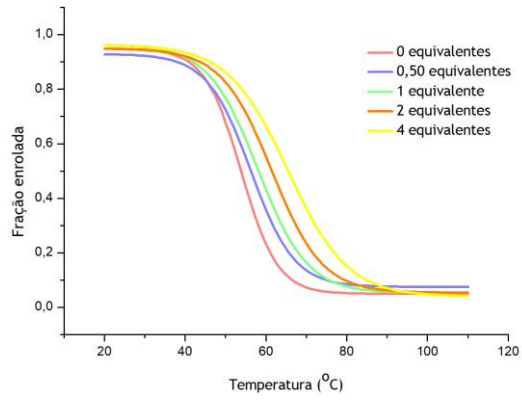


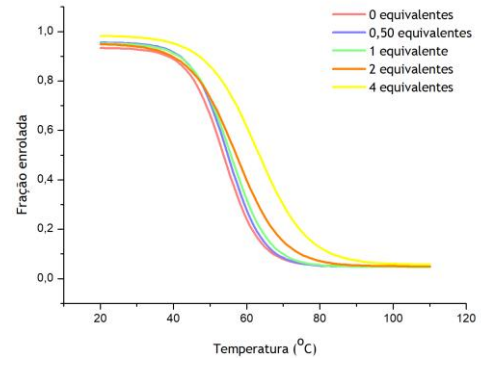
Figura 26: Estrutura do ligando PhenDC₃. A azul a unidade de fenantrolina e a rosa as duas cadeias laterais com os anéis de quinolina. Adaptado de [79].

Perante os resultados obtidos, a ordem que pode ser definida em termos de potencial de estabilização dos ligandos em relação ao G4 AT11-B0 é a seguinte: $C_8 > C_8\text{-NH}_2 > C_5 > C_3 > [32]\text{phen}_2\text{N}_4 > [16]\text{phenN}_2 > 2,2' \text{-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona)}$. O ligando C_8 , em relação ao PhenDC₃, foi o ligando que teve maior estabilização e o ligando 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) a menor ΔT_m .

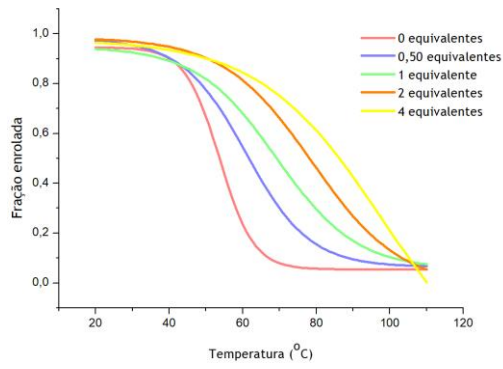
Na figura 27 são apresentadas as curvas de desnaturação do G4 AT11-B0 na presença e ausência de cada um dos ligandos (0 - 4 equivalentes). Na tabela 6 são apresentados os valores de ΔT_m dos ligandos em estudo.



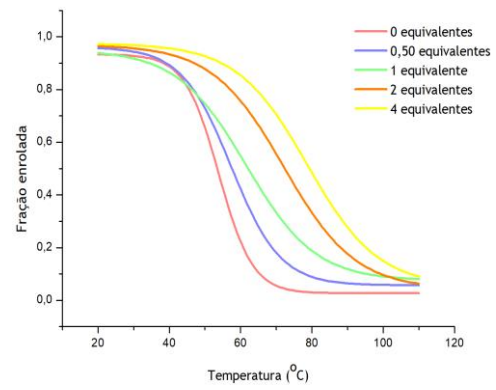
(A)



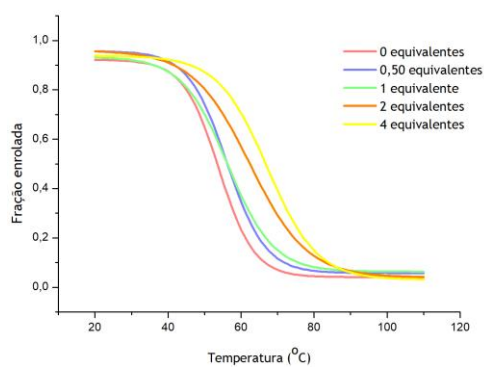
(B)



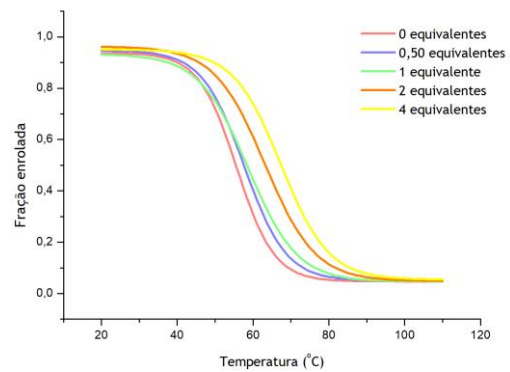
(C)



(D)



(E)



(F)

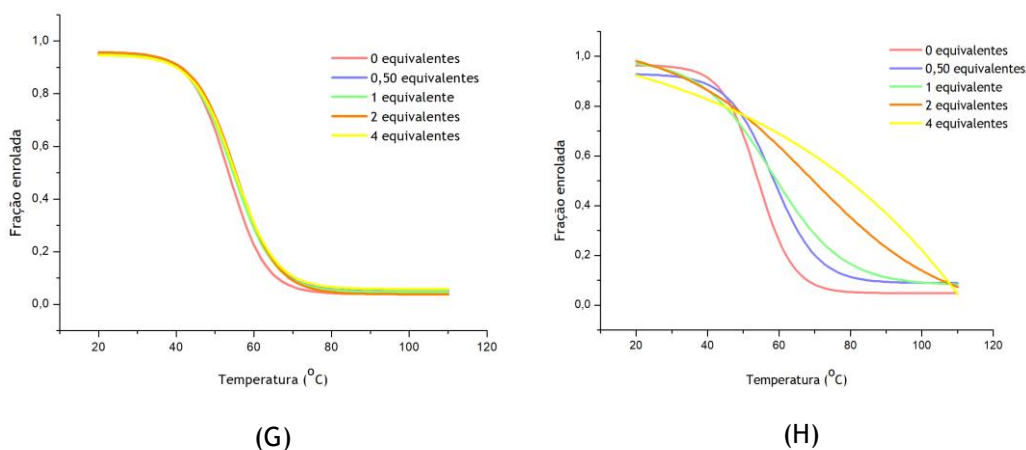


Figura 27: Curvas de desnaturação do G4 AT11-B0 na presença de (A) [32]phen₂N₄, (B) [16]phenN₂, (C) C₈, (D) C₈-NH₂, (E) C₅, (F) C₃, (G) 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) e (H) PhenDC₃ de 0 a 4 equivalentes.

Tabela 6: Estabilização térmica induzida pelos ligandos no G4 AT11-B0.

Ligando	ΔT_m (°C)
[32]phen ₂ N ₄	11,6 ± 0,2
[16]phenN ₂	9,0 ± 0,1
C ₈	44,5 ± 1,4
C ₈ -NH ₂	24,8 ± 0,3
C ₅	13,3 ± 0,2
C ₃	11,7 ± 0,2
2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona)	1,5 ± 0,1
PhenDC ₃	>30

A interação dos ligandos com o G4 AT11-B0 parece ter ocorrido maioritariamente através de empilhamento π - π , pontes de hidrogénio, forças hidrofóbicas e de *Van der Waals* [54]. Estudos anteriores demonstraram que a doxorrubicina, fármaco bastante conhecido e usado como agente quimioterapêutico indutor da morte de células cancerosas, consegue conjugar-se não covalentemente com aptameros de G4, como por exemplo o G4 AS1411, precursor do G4 AT11-B0 [81].

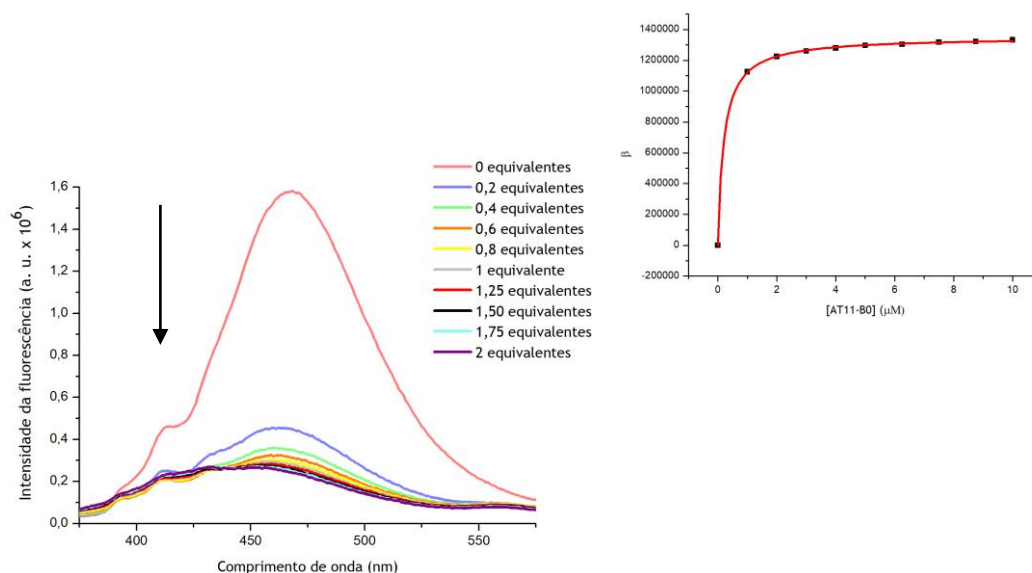
4.3 Espectroscopia de Fluorescência

As titulações espectrofluorimétricas de 0 a 2 equivalentes foram realizadas com o G4 AT11-B0 e os valores de K_D determinados para os ligandos [32]phen₂N₄, [16]phenN₂, C₈, C₈-NH₂, C₅ e C₃.

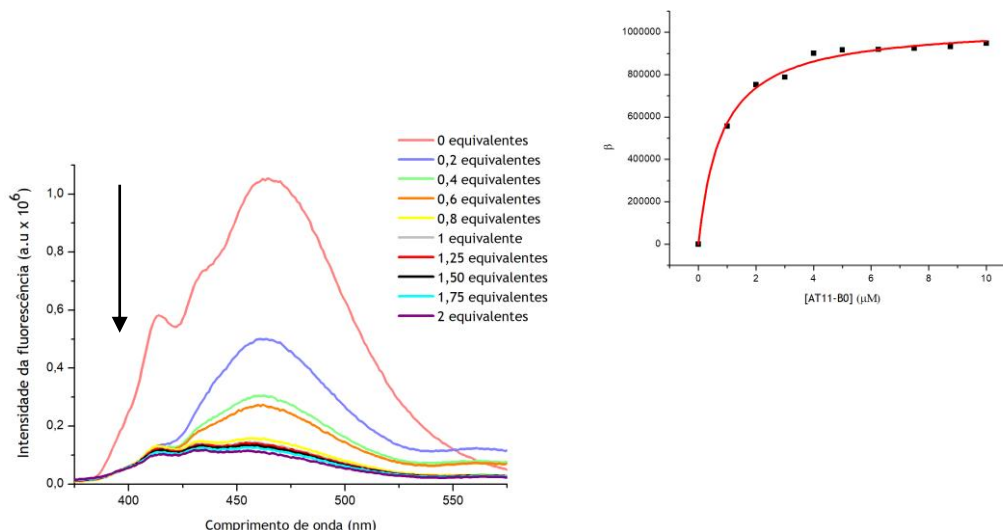
Os macrociclos derivados de fenantrolina [32]phen₂N₄ e [16]phenN₂ apresentaram uma diminuição da intensidade de emissão da fluorescência ao longo da titulação e os valores de K_D obtidos foram $2,1 \times 10^{-7} M^{-1}$ e $7,9 \times 10^{-7} M^{-1}$, respectivamente.

O [32]phen₂N₄ apresentou uma maior afinidade relativamente ao G4 AT11-B0 e o seu valor de ΔT_m também foi ligeiramente superior quando comparado com o ligando [16]phenN₂. No entanto, é importante referir que ambos exibiram uma elevada afinidade na faixa do sub-micromolar em relação à estrutura de G4 AT11-B0, faixa essa na qual se encontram outros macrociclos naturais muito potentes como a piridostatina ($K_D \approx 4,90 \times 10^{-7} M^{-1}$) ou a telomestatina ($K_D \approx 3,0 \times 10^{-8} M^{-1}$) [82] [83]. Comparativamente a outros ligandos, como por exemplo a porfirina aniônica, que apresenta um valor de $K_D \approx 2 \times 10^{-6}$ a $1 \times 10^{-5} M^{-1}$, o [32]phen₂N₄ e o [16]phenN₂ exibiram uma afinidade consideravelmente muito superior [83].

Na figura 28 são apresentados os espectros de emissão de fluorescência dos macrociclos derivados de fenantrolina [32]phen₂N₄ e [16]phenN₂, com concentrações crescentes de G4 AT11-B0 (0 - 10 μM).



(A)



(B)

Figura 28: Espectros de emissão de fluorescência de (A) [32]phen₂N₄ e (B) [16]phenN₂ com concentrações crescentes de G4 AT11-B0 (0 - 10 μM) e respectivos gráficos de *saturation binding*.

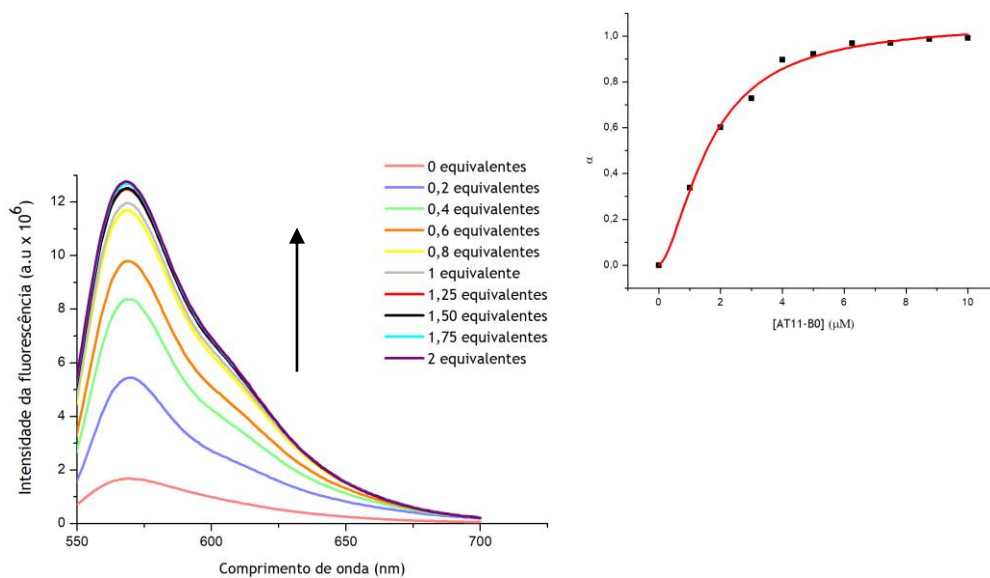
Estudos anteriores que envolveram titulações espectrofluorimétricas com os G4 c-MYC e 22AG revelaram uma afinidade moderada para os macrociclos derivados de fenantrolina. No caso do G4 c-MYC, os ligandos [32]phen₂N₄ e [16]phenN₂ apresentaram valores de K_D de $7,7 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ e $7,1 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$, respectivamente, enquanto no caso do G4 22AG, o K_D foi $2,2 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ para o [16]phenN₂, contrariamente ao [32]phen₂N₄ que apresentou um K_D de $2,2 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ [55]. Estes valores foram diferentes dos obtidos para o G4 AT11-B0, exceto o resultado que traduz a afinidade do [16]phenN₂ em relação ao G4 22AG.

Os derivados de laranja de acridina C₈, C₈-NH₂, C₃ e C₅ apresentaram um aumento da intensidade de emissão da fluorescência ao longo das titulações e os respectivos valores de K_D foram: $1,7 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$, $7,7 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$, $1,1 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$ e $1,3 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$, demonstrando que o ligando C₈-NH₂ tem uma maior afinidade em relação ao G4 AT11-B0 e que as diferenças de afinidade entre os restantes derivados de laranja de acridina C₈, C₅ e C₃ não são significativas (tabela 7).

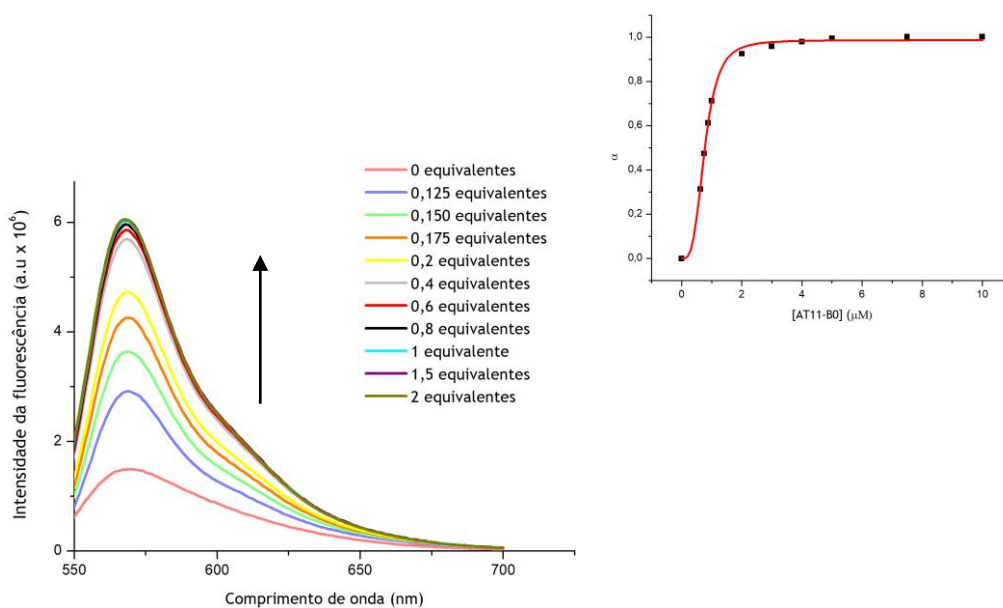
A ausência do anel de iodobenzeno no ligando C₈-NH₂ (figura 24) parece promover um aumento da afinidade em relação ao G4 AT11-B0, uma vez que os ligandos C₈, C₅ e C₃ que contêm o anel (figura 24) apresentaram valores de K_D superiores ao obtido para o C₈-NH₂. Adicionalmente, apesar das diferenças terem sido pouco significativas entre os derivados de laranja de acridina C₈, C₅ e C₃, a presença simultânea do anel de iodobenzeno e de uma cadeia de alquilamida curta, ligandos C₃ e C₅ (figura 24), parecem promover um aumento da afinidade dos mesmos em relação ao G4 AT11-B0, sendo que à medida que o número de carbonos da cadeia em questão aumenta, a afinidade diminui, tal como acontece no caso do ligando C₈ (figura 24). No entanto, é importante referir que a

presença do anel de iodobenzeno conjugada com uma cadeia de alquilamida longa, ligando C₈ (figura 24), promoveram um aumento da estabilização térmica do G4 AT11-B0 (tabela 6) comparativamente aos restantes derivados de laranja de acridina.

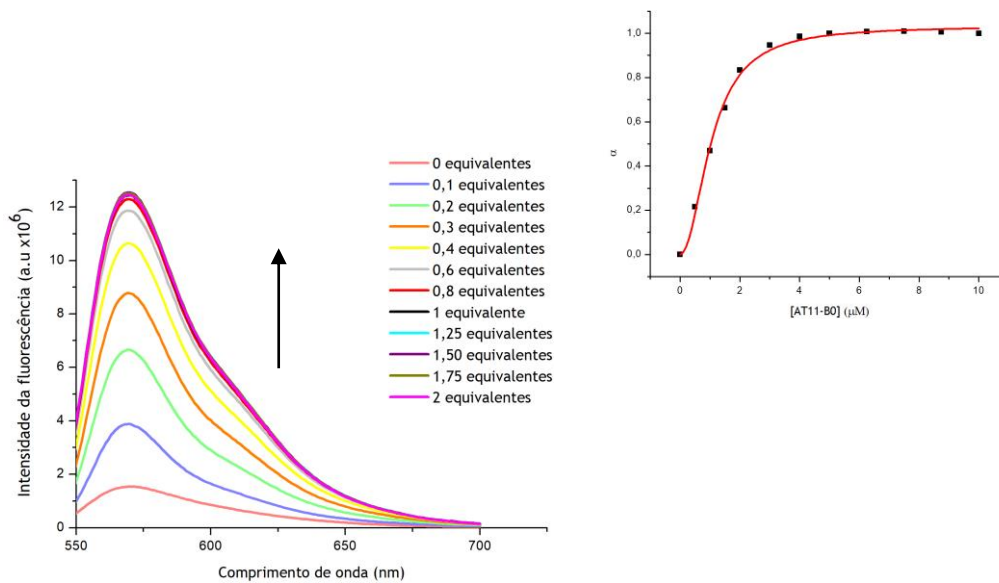
Na figura 29 são apresentados os espectros de emissão de fluorescência dos ligandos derivados de laranja de acridina C₈-NH₂, C₃, C₅ e C₈, com concentrações crescentes de G4 AT11-B0 (0 - 10 μM).



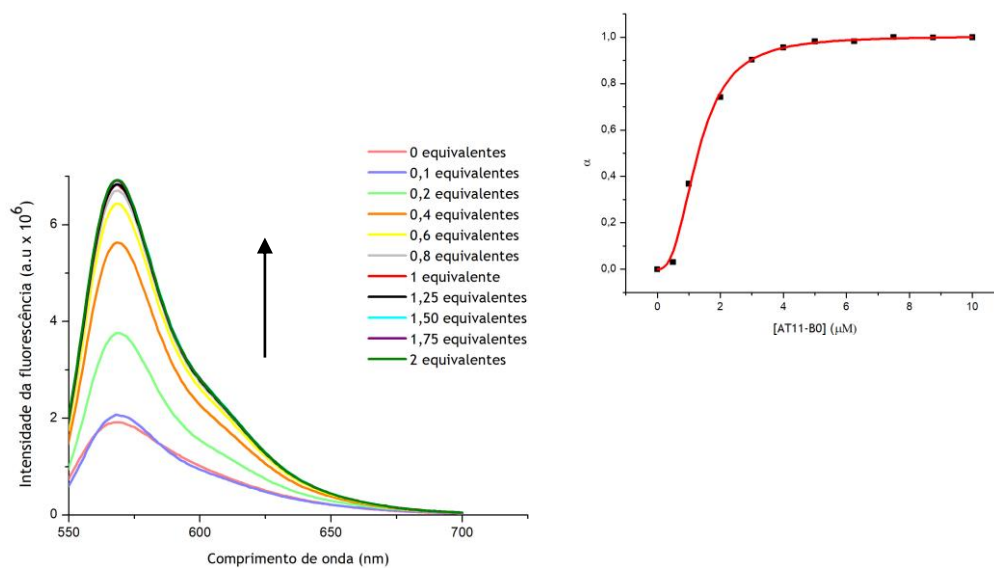
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura 29: Espectros de emissão de fluorescência de (A) C₈, (B) C₈-NH₂, (C) C₃ e (D) C₅ com concentrações crescentes de G4 AT11-B0 (0 - 10 μM) e respetivos gráficos de *saturation binding*.

Estudos anteriores realizados com G4 KRAS-22RT, G4 c-MYC e G4 22AG revelaram valores de K_D na gama do sub-micromolar para os ligandos C₅, C₈ e C₃, facto que não se observou neste estudo, e com uma diferença pouco significativa entre si, resultado não muito dispar do obtido para o G4 AT11-B0 [59].

Comparativamente à acridina BRACO-19 ($K_D \approx 10^{-8} \text{ M}^{-1}$), os derivados de laranja de acridina não apresentaram elevada afinidade em relação a estruturas de G4, exceto o C₈-

NH₂ cujo valor de K_D também se encontrou na faixa do sub-micromolar ^[84]. No entanto, em relação à quinacridina BOQ1 ($K_D \approx 1 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$), os ligandos C₈, C₅ e C₃ apresentaram valores de K_D equiparáveis e muito semelhantes, enquanto o C₈-NH₂ exibiu uma maior afinidade comparativamente à BOQ1 ^[85].

Perante os resultados obtidos, a ordem que pode ser definida em termos de afinidade em relação ao G4 AT11-B0 é a seguinte: [32]phen₂N₄ > [16]phenN₂ > C₈-NH₂ > C₃ ≈ C₅ ≈ C₈. Apresentando-se o [32]phen₂N₄ e o C₈ como os ligandos com maior e menor afinidade, respetivamente, em relação ao G4 AT11-B0.

Na tabela 7 é apresentado um resumo com os valores de K_D dos ligandos em estudo.

Tabela 7: Valores de K_D obtidos a partir de titulações espectrofluorimétricas entre os ligandos e o G4 AT11-B0.

Ligando	$K_D \text{ (M}^{-1}\text{)}$
[32]phen ₂ N ₄	$2,1 \times 10^{-7}$
[16]phenN ₂	$7,9 \times 10^{-7}$
C ₈	$1,7 \times 10^{-6}$
C ₈ -NH ₂	$7,7 \times 10^{-7}$
C ₃	$1,1 \times 10^{-6}$
C ₅	$1,3 \times 10^{-6}$

4.4 Ensaios de Viabilidade Celular

4.4.1 Determinação dos valores de IC₅₀ dos ligandos incubados nas linhas celulares HeLa e NHDF

Todos os ligandos tiveram uma ação antiproliferativa nas células HeLa e NHDF sem qualquer tipo de efeito citotóxico seletivo para as células cancerosas, tal como previamente descrito para os derivados de laranja de acridina e macrociclos derivados de fenantrolina ^[59] ^[61].

Os valores de IC₅₀ dos derivados de laranja de acridina foram sempre inferiores aos obtidos para o [16]phenN₂ e 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona)

nas duas linhas celulares, sendo, deste modo, mais citotóxicos. Poços sem ligando foram utilizados como controlo.

Nas células HeLa, os ligandos C₈ e C₈-NH₂ apresentaram os valores mais baixos de IC₅₀, revelando-se, portanto, mais citotóxicos. Os ligandos C₃ e C₅ exibiram valores de IC₅₀ mais elevados comparativamente ao C₈ e C₈-NH₂. Os ligandos [16]phenN₂ e 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) apresentaram reduzida citotoxicidade celular, com o 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) a atingir o valor mais elevado de IC₅₀ no grupo dos ligandos testados nas HeLa.

Na linha celular NHDF, os ligandos C₈, C₈-NH₂ e C₅ apresentaram os valores mais baixos de IC₅₀, sendo que os ligandos C₈ e C₈-NH₂ exibiram uma citotoxicidade mais elevada, tal como observado na linha celular HeLa. O ligando C₃, quando comparado com os restantes derivados de laranja de acridina, apresentou o valor de IC₅₀ mais elevado. O ligando [16]phenN₂ exibiu reduzida citotoxicidade, enquanto o ligando 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) apresentou um valor de IC₅₀ elevadíssimo, não sendo considerado, deste modo, um ligando promissor.

Na tabela 8 são apresentados todos os valores de IC₅₀ de cada um dos ligandos nas linhas celulares HeLa e NHDF.

Tabela 8: Valores de IC₅₀ de cada ligando nas linhas celulares HeLa e NHDF.

	C ₈	C ₈ -NH ₂	C ₅	C ₃	[16]phenN ₂	2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona)
HeLa	1,5 x 10 ⁻⁷ M (0,2 μM)	3,1 x 10 ⁻⁷ M (0,3 μM)	3,5 x 10 ⁻⁶ M (3,5 μM)	1,1 x 10 ⁻⁶ M (1,1 μM)	8,2 x 10 ⁻⁶ M (8,2 μM)	5,1 x 10 ⁻⁵ M (51 μM)
NHDF	4,7 x 10 ⁻⁷ M (0,5 μM)	8,0 x 10 ⁻⁷ M (0,8 μM)	9,8 x 10 ⁻⁷ M (0,9 μM)	1,7 x 10 ⁻⁶ M (1,7 μM)	2,0 x 10 ⁻⁵ M (20 μM)	6,1 x 10 ⁻⁴ M (610 μM)

No caso dos derivados de laranja de acridina, a diferença entre os valores de IC₅₀ nas células HeLa e NHDF foi reduzida, exceto no caso do C₅ em que apesar de a diferença ter sido considerável o valor de IC₅₀ nas NHDF foi inferior ao obtido nas HeLa, o que significa que a incubação destes ligandos foi citotóxica para as duas linhas celulares e no caso do C₅ mais citotóxica para a linha celular NHDF.

Ensaio de viabilidade celular anteriores realizados em HeLa demonstraram que após 24 h de incubação, os valores de IC_{50} exibidos pelos ligandos C_3 , C_5 e C_8 foram 5,7 μM , 2,4 μM e 0,9 μM , respetivamente. Por outro lado, na linha celular NHDF, os ligandos C_3 , C_5 e C_8 apresentaram valores de IC_{50} de 3,7 μM , 2,5 μM e 0,7 μM , respetivamente [59]. Comparando estes resultados supracitados com os obtidos no nosso estudo (tabela 8), estes foram consideravelmente díspares em alguns casos, no entanto este facto pode dever-se ao tempo de incubação e ao número e valor das concentrações testadas. Apesar das diferenças, é possível concluir que o aumento do comprimento da cadeia de alquilamida nos derivados de laranja de acridina é importante para a ação citotóxica do ligando, uma vez que existe uma relação entre um maior grau de estabilização, citotoxicidade e comprimento da cadeia lateral [59].

No que diz respeito ao macrociclo derivado de fenantrolina testado nas células HeLa e NHDF, o ligando [16]phenN₂ apresentou uma citotoxicidade reduzida comparativamente aos ligandos C_3 , C_5 , C_8 e C_8-NH_2 . No entanto, ao contrário do observado nos derivados de laranja de acridina, o valor de IC_{50} do [16]phenN₂ nas NHDF foi superior ao obtido na linha celular HeLa (tabela 8), o que significa que é possível, caso o objetivo seja incubar este ligando na forma livre, utilizar concentrações mais baixas que inibam 50 % da proliferação das células cancerosas sem comprometer a viabilidade das células saudáveis.

Estudos anteriores realizados em HeLa, MCF-7 e NHDF revelaram que o ligando [16]phenN₂ não é significativamente citotóxico para estas células após 2 dias de incubação, apresentado um valor de IC_{50} em torno de 100 μM nas três linhas celulares [55] [61]. No entanto, de acordo com os resultados aqui apresentados, o ligando em questão após 7 dias de incubação foi consideravelmente mais citotóxico. A duração de 7 dias de incubação não só para o [16]phenN₂, como também para os restantes ligandos deve-se ao facto de aquando da incubação dos conjugados G4 AT11-B0-ligandos, o aptamero só desencadear o seu efeito citotóxico, pela formação excessiva de vacúolos, após 4 dias [49].

Nas figuras 30 e 31 são apresentadas as curvas dose-resposta das duas linhas celulares

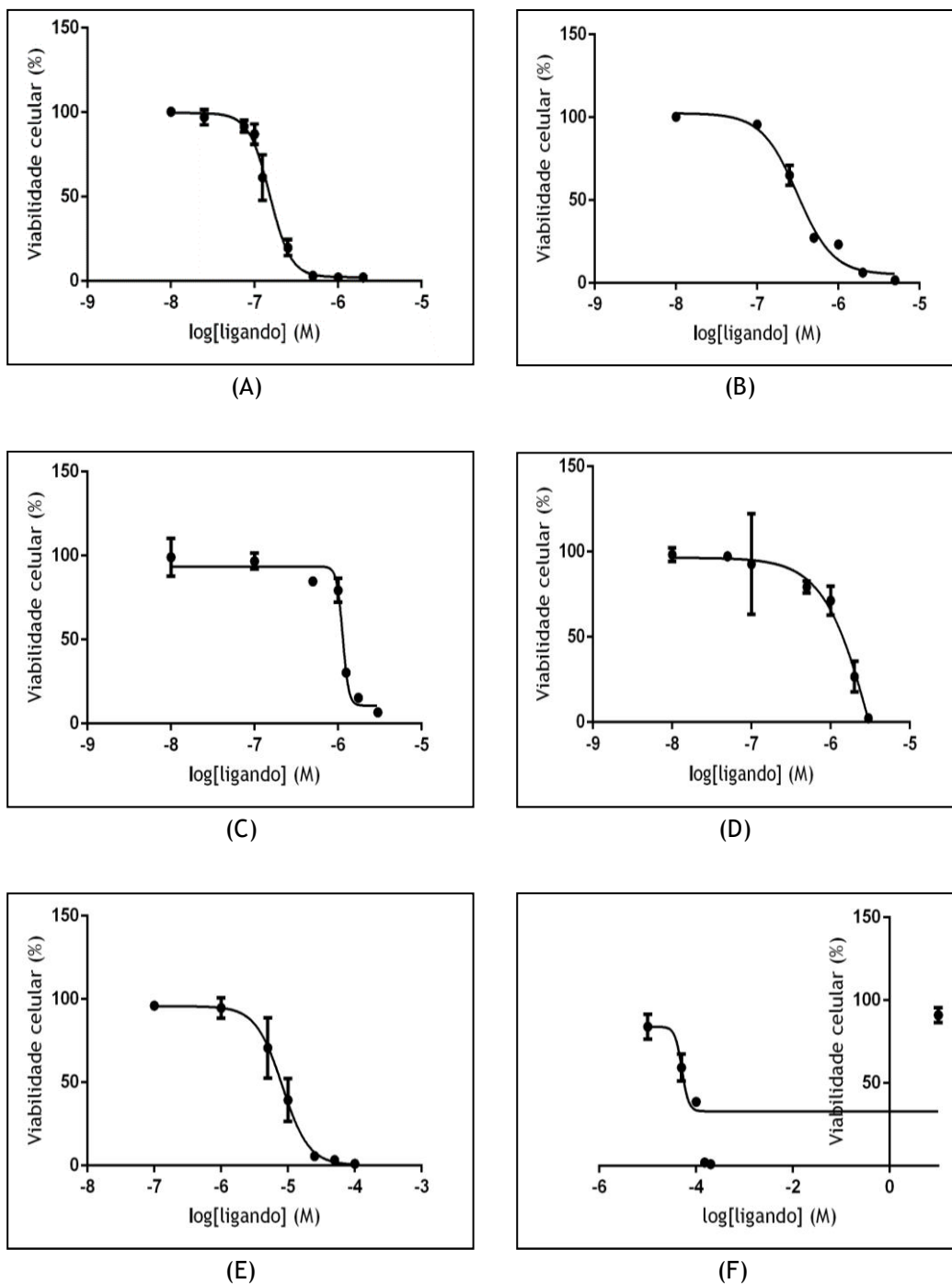


Figura 30: Curvas dose-resposta dos ligandos (A) C_8 , (B) C_8-NH_2 , (C) C_3 , (D) C_5 , (E) [16]phen N_2 e (F) 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) incubados em células HeLa.

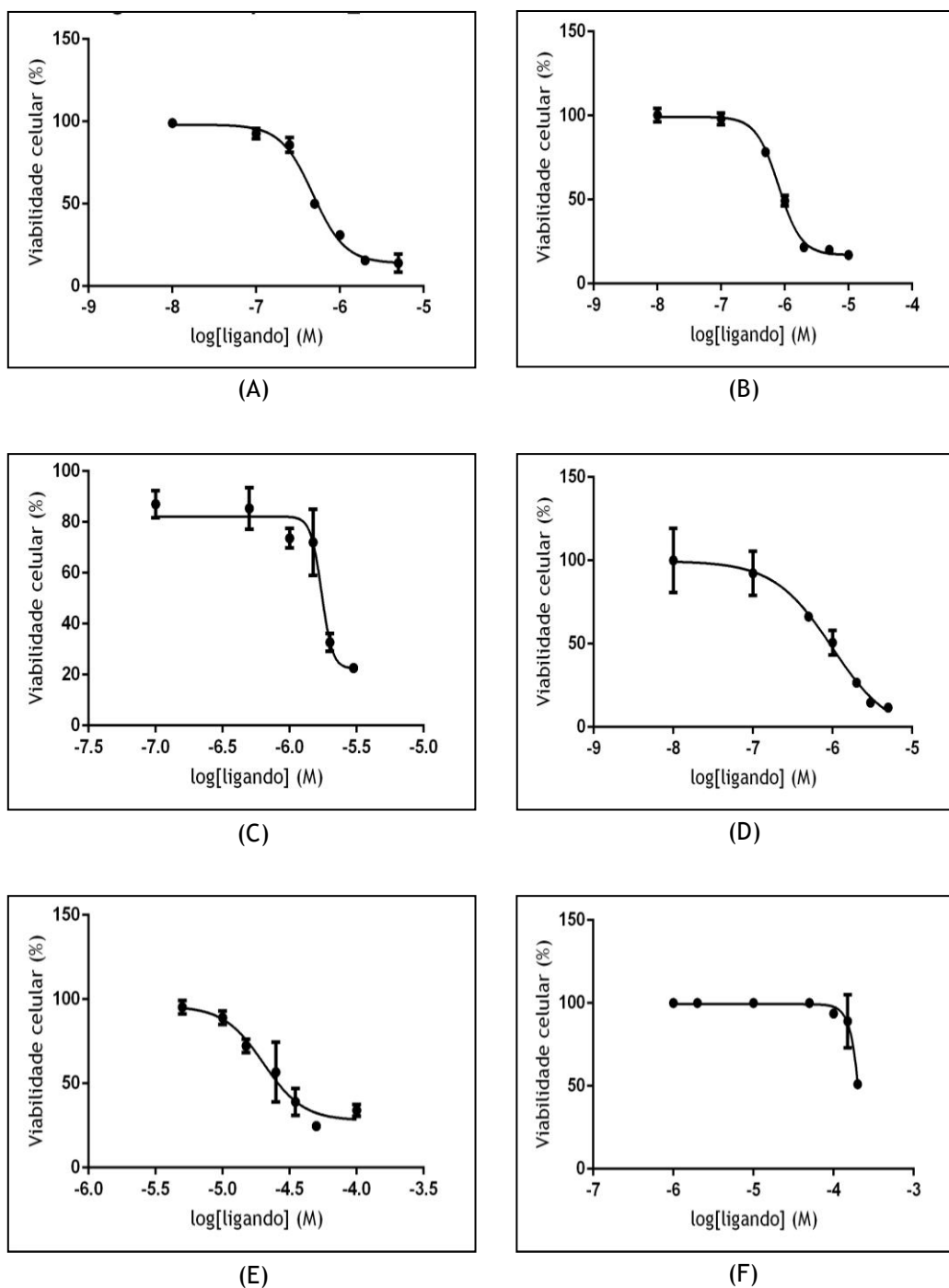


Figura 31: Curvas dose-resposta dos ligandos (A) C₈, (B) C₈-NH₂, (C) C₃, (D) C₅, (E) [16]phenN₂ e (F) 2,2'-(azanodiilbis(etano-2,1-diil))bis(isoindolina-1,3-diona) incubados em células NHDF.

De acordo com os resultados obtidos relativos aos valores de IC₅₀, na linha celular HeLa selecionaram-se concentrações sub-IC₅₀ para a incubação dos ligandos, de forma a potenciar o efeito do aptamero G4 AT11-B0 aquando da incubação do conjugado, esperando-se uma diminuição da viabilidade celular em relação ao uso do ligando na forma livre. Deste modo, o C₈, C₈-NH₂, C₅ e C₃ foram incubados a $1,25 \times 10^{-7}$ M (0,125 μM), $2,5 \times 10^{-7}$ M (0,25 μM), 1×10^{-6} M (1 μM) e 1×10^{-6} M (1 μM), respetivamente.

Por fim, no que diz respeito à linha celular NHDF selecionaram-se concentrações supra- IC_{50} para a incubação dos ligandos, esperando-se um aumento da viabilidade celular na presença do aptamero G4 AT11-B0. Deste modo, o C_8 , C_8-NH_2 , C_5 e C_3 foram incubados a 1×10^{-6} M (1 μ M), 2×10^{-6} M (2 μ M), 2×10^{-6} M (2 μ M) e 2×10^{-6} M (2 μ M), respetivamente.

4.4.2 Conjugados G4 AT11-B0-ligandos derivados de laranja de acridina incubados nas linhas celulares HeLa e NHDF

O aptamero G4 AT11-B0 foi testado em ambas as linhas celulares HeLa e NHDF a uma concentração de 15 μ M, uma vez que em estudos prévios de viabilidade celular a incubação durante 5 dias dos G4 AS1411 e AT11, precursores do G4 AT11-B0, em células humanas do cancro do pulmão (A549) e fibroblastos humanos do tecido pulmonar (WI-38), revelou que num intervalo de 10 a 20 μ M o efeito antiproliferativo manteve-se relativamente constante ^[46].

Neste estudo, a viabilidade celular do G4 AT11-B0 a 15 μ M foi registada em torno de 75 % e 79,7 % nas linhas celulares HeLa e NHDF, respetivamente, após 7 dias de incubação.

Ensaios de viabilidade celular anteriores realizados em células HeLa, A549, fibroblastos humanos da pele (Hs27) e WI-38 demonstraram que após 5 dias de incubação com o G4 AS1411 a uma concentração de 10 μ M, as percentagens de viabilidade celular registadas foram 57,1 %, 16,7 %, 66,7 % e 83,7 %, respetivamente ^[46] ^[86]. No caso do G4 AT11, também testado a uma concentração de 10 μ M, os valores de viabilidade celular observados após 5 dias de incubação nas células A549 e WI-38 foram 16,8 % e 81,6 %, respetivamente ^[46]. Comparativamente aos resultados obtidos nestes estudos, é possível concluir que o derivado G4 AT11-B0 tem simultaneamente um efeito citotóxico e antiproliferativo inferior ao dos seus precursores em células cancerosas, contudo em relação às células saudáveis os resultados podem ser considerados equiparáveis, registando-se uma menor inibição da proliferação celular e do efeito citotóxico.

No que diz respeito aos conjugados G4 AT11-B0-derivados de laranja de acridina, estes afetaram a viabilidade das células HeLa de formas distintas, registando-se um maior efeito citotóxico em alguns casos comparativamente a outros. Na linha celular NHDF, os conjugados G4 AT11-B0-derivados de laranja de acridina não afetaram consideravelmente a viabilidade das células, apresentando valores superiores a 50 %, exceto num dos casos.

Nas HeLa, o ligando C_8 a uma concentração de 0,125 μ M e o conjugado G4 AT11-B0- C_8 apresentaram viabilidades celulares de 61,3 % e 74 %, respetivamente, registando-se um maior efeito citotóxico na presença do ligando livre. Com o ligando C_8-NH_2 a 0,25 μ M ocorreu algo idêntico ao C_8 , uma vez que o ligando exibiu uma viabilidade celular de 65 % e o respetivo conjugado de 89,3 %. Os resultados obtidos não foram auspiciosos, uma vez

que o objetivo era potenciar o efeito do aptamero G4 AT11-B0 aquando da incubação do conjugado, esperando-se uma diminuição da viabilidade celular em relação ao ligando livre.

Os conjugados G4 AT11-B0-C₃ e G4 AT11-B0-C₅ tiveram as menores percentagens de viabilidade celular nas células HeLa, com valores de 17 % e 10,7 %, respetivamente, enquanto o ligando C₃ a 1 µM apresentou uma viabilidade celular de 79,3 % e o C₅ a 1 µM de 71,3 %. Neste caso, os resultados obtidos em relação aos conjugados foram promissores, promovendo uma diminuição da viabilidade celular.

Nas células NHDF, o ligando C₈ a 1 µM apresentou uma viabilidade celular de 31 % e o respetivo conjugado exibiu um valor de 36 %, sendo esta a menor percentagem registada na linha celular NHDF. Tal como observado nas HeLa, também aqui o objetivo não foi atingido, uma vez que ao ser selecionada uma concentração de C₈ supra -IC₅₀, o G4 AT11-B0 não teve potencial para aumentar a viabilidade celular ao interagir com o ligando em questão.

Contrariamente ao conjugado G4 AT11-B0-C₈, os conjugados G4 AT11-B0-C₈-NH₂, G4 AT11-B0-C₅ e G4 AT11-B0-C₃ apresentaram uma viabilidade celular elevada em torno de 64,7 %, 58,7 % e 66,7 %, respetivamente. Os ligandos livres incubados a 2 µM exibiram um maior efeito citotóxico, com valores de viabilidade celular de 21,7 % para o C₈-NH₂, 26,7 % para o C₅ e 32,7 % no caso do C₃.

Por fim, considerando as duas linhas celulares e o objetivo deste estudo, que consistiu em potenciar o efeito do aptamero G4 AT11-B0, é possível observar que os conjugados G4 AT11-B0-C₃ e G4 AT11-B0-C₅ são seletivamente citotóxicos para as células HeLa, apresentando-se como potenciais agentes terapêuticos em casos de cancro do colo do útero.

Na figura 32 são apresentados os gráficos de barras relativos às percentagens de viabilidade celular dos ligandos derivados de laranja de acridina, do aptamero G4 AT11-B0 e dos respetivos conjugados nas linhas celulares HeLa e NHDF.

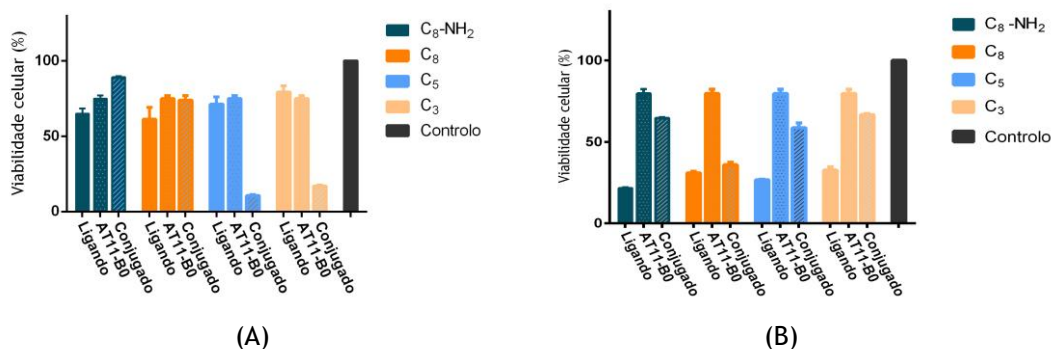


Figura 32: Viabilidade celular, em percentagem, dos ligandos derivados de laranja de acridina, do aptamero G4 AT11-B0 e dos respectivos conjugados incubados nas células (A) HeLa e (B) NHDF.

4.5 Microscopia de Fluorescência Confocal

O potencial de estabilização do ligando C₈ em relação ao G4 AT11-B0, observado nos ensaios de desnaturação térmica de CD ($\Delta T_m = 44,5$ °C), e a sua citotoxicidade e efeito antiproliferativo, comprovados pelo reduzido valor de IC₅₀ (0,2 μ M para as HeLa *versus* 0,5 μ M para as NHDF), aliados à fluorescência intrínseca apresentada pelos derivados de laranja de acridina permitiram uma avaliação da internalização e localização celular do ligando C₈ nas células HeLa.

O 5'-Cy5-G4 AT11-B0 e o conjugado 5'-Cy5-G4 AT11-B0-C₈ também foram estudados. O ligando e o aptamero emitiram fluorescência na região do verde ($\lambda_{\text{excitação}} = 488$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 500$ nm) e vermelho ($\lambda_{\text{excitação}} = 633$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 731$ nm), respetivamente. Os núcleos foram marcados a azul com a sonda nuclear Hoescht 33342 ($\lambda_{\text{excitação}} = 405$ nm e $\lambda_{\text{emissão}} = 427$ nm).

A internalização celular do C₈ ocorreu em menos de 1 dia após a incubação, sendo possível observar a presença simultânea deste ligando no citoplasma (figura 33, setas brancas) e no nucléolo das células (figura 33, setas brancas a tracejado).

Estudos anteriores revelaram que a captação celular do ligando C₈ é rápida, uma vez que foi observada uma elevada emissão de fluorescência na região do verde 5 minutos após a incubação do mesmo em células HeLa. Para além deste facto, a localização preferencial do ligando parece ser dentro do núcleo e particularmente no nucléolo, apesar de alguma presença no citoplasma [59]. Estes resultados já publicados corroboram os observados por nós neste ensaio e realçam a importância da unidade aromática planar na ação do C₈, uma vez que os derivados de acridina são conhecidos pela sua capacidade de penetração no núcleo, influenciando a síntese de ADN e interagindo com enzimas como a topoisomerase e a telomerase e outros alvos celulares como cinases dependentes de ciclina ou vias bioquímicas, incluindo proteínas e metabolismo dos lípidos [59] [87] [88].

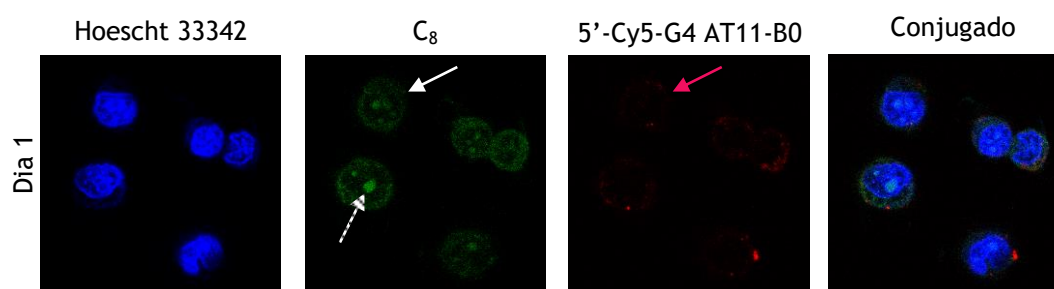
A internalização do ligando C_8 foi sendo crescente, uma vez que a intensidade de emissão da fluorescência na região do verde tornou-se cada vez mais intensa tanto no nucléolo como no citoplasma das células. Contudo, este fenómeno só se registou até ao quinto dia do ensaio, provavelmente devido aos efeitos biológicos causados pela entrada do ligando nas células HeLa e pela formação de vacúolos devido à internalização do aptamero.

No que diz respeito ao 5'-Cy5-G4 AT11-B0 também no primeiro dia após a incubação já era possível detetar a sua presença no citoplasma das células (figura 33, setas rosa), tal como observado em estudos prévios realizados com o seu precursor G4 AS1411 incubado em células MCF-7 [89].

Até ao final da experiência, dia 7, não se observou a presença de 5'-Cy5-G4 AT11-B0 no núcleo das células HeLa, pois tal como previamente descrito também o precursor do aptamero em estudo, o G4 AS1411, demonstrou ter apenas como alvo um pequeno subconjunto da NCL total presente na célula, presumivelmente limitado à superfície celular e/ou formas localizadas no citoplasma, não tendo a capacidade de penetrar no núcleo. Assim, apenas a NCL não nucleolar, membranar e citoplasmática, é alvo quer do G4 AS1411 como do 5'-Cy5-G4 AT11-B0 [90] [91].

A internalização do aptamero foi sendo cada vez mais intensa até ao quinto dia do ensaio devido a uma hiperestimulação dependente de NCL com origem no próprio. Nos dias 6 e 7 a presença de 5'-Cy5-G4 AT11-B0 não foi tão intensa, uma vez que a hiperestimulação conduziu a uma formação de vacúolos no citoplasma, tal como observado em estudos anteriores após incubação com o G4 AS1411 [49].

O processo de internalização do conjugado 5'-Cy5-G4 AT11-B0- C_8 revelou-se lento, uma vez que só ao quarto dia é que se registou pela primeira vez a presença evidente do mesmo no citoplasma das células HeLa (figura 33, setas amarelas). Enquanto a experiência decorreu não se detetou internalização crescente do conjugado, uma vez que a vacuolização causa pelo 5'-Cy5-G4 AT11-B0 começa a ocorrer após 96 h de incubação, conduzindo à morte celular denominada *metuosis*, tal como previamente descrito [49]. Este processo parece não só diminuir a quantidade de 5'-Cy5-G4 AT11-B0 e de C_8 dentro da célula, como também dificultar a internalização do conjugado.



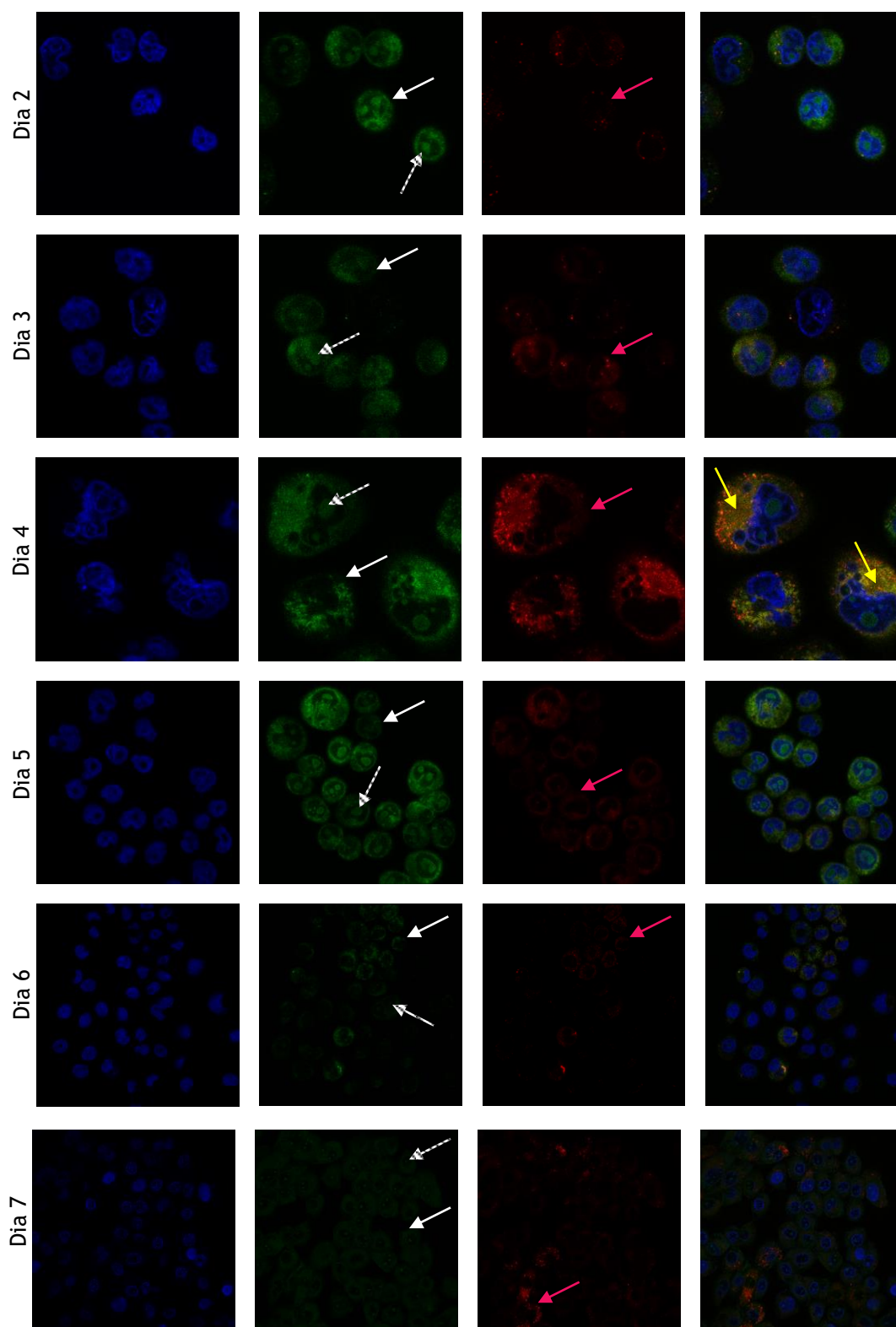


Figura 33: Imagens de microscopia de fluorescência confocal de células HeLa tratadas com $0,5 \mu\text{M}$ de C_8 (segunda coluna), com $1 \mu\text{M}$ de $5'$ -Cy5-G4 AT11-B0 (terceira coluna) e o conjugado $5'$ -Cy5-G4 AT11-B0- C_8 (terceira coluna). Na primeira coluna estão marcados os núcleos a azul. As setas de cor branca, rosa e amarela representam a internalização do ligando C_8 , do $5'$ -Cy5-G4 AT11-B0 e do conjugado, respetivamente. Escala $22 \mu\text{m}$, objetiva $63\times$.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

A aplicação de nanosistemas conjugados formados por aptameros de ADN G4 e ligandos na área da saúde, mais concretamente no tratamento de lesões cancerosas provocadas pelo vírus VPH, surge como uma alternativa promissora aos métodos convencionais e evasivos, como a quimioterapia ou a radioterapia, utilizados atualmente, mas sem grande sucesso, em alguns casos, na eliminação de células pré-cancerosas e/ou cancerosas.

No presente trabalho estudaram-se vários grupos de ligandos, nomeadamente macrociclos derivados de fenantrolina e derivados de laranja de acridina. O derivado de laranja de acridina C₈ foi o ligando que mais estabilizou o aptamero G4 AT11-B0, com uma ΔT_m de 44,5 °C. No que diz respeito à afinidade, em alguns casos esta situou-se na gama do sub-micromolar, com os ligandos [32]phen₂N₄, [16]phenN₂ e C₈-NH₂ a apresentarem valores de K_D de $2,1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$, $7,9 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$ e $7,7 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$, respetivamente.

Nos ensaios de viabilidade celular todos os ligandos exibiram uma internalização efetiva nas células cancerosas HeLa e nas células saudáveis NHDF, não apresentando seletividade. Os derivados de laranja de acridina revelaram-se mais citotóxicos e com maior efeito antiproliferativo comparativamente ao macrociclo derivado de fenantrolina [16]phenN₂.

A ação combinada do aptamero G4 AT11-B0 com os derivados de laranja de acridina produziu efeitos citotóxicos e antiproliferativos nas células HeLa, com especial relevância para os nanosistemas conjugados G4 AT11-B0-C₃ e G4 AT11-B0-C₅ que exibiram as menores percentagens de viabilidade celular nas células HeLa, com valores de 17 % e 10,7 %, respetivamente.

A avaliação da localização e internalização celular do ligando C₈, do 5'-Cy5-G4 AT11-B0 e do conjugado 5'-Cy5-G4 AT11-B0-C₈ por microscopia de fluorescência confocal revelou que a captação celular tanto do C₈ como do 5'-Cy5-G4 AT11-B0 é rápida, uma vez que um dia após a incubação já era observável a presença de C₈ no nucléolo e no citoplasma das células HeLa, enquanto a presença de 5'-Cy5-G4 AT11-B0 se restringia ao citoplasma. A internalização do nanosistema conjugado 5'-Cy5-G4 AT11-B0-C₈ revelou-se lenta, pois só ao quarto dia é que se registou pela primeira vez a presença evidente do mesmo no citoplasma das células HeLa.

Em resumo, os resultados obtidos foram auspiciosos, uma vez que demonstram que alguns destes nanossistemas conjugados, nomeadamente os G4 AT11-B0-C₃ e G4 AT11-B0-C₅, podem ser estudados *in vivo* em terapias do cancro do colo do útero e realçam a capacidade do aptamero G4-AT11-B0 em funcionar como veículo de transporte de ligandos com propriedades anticancerígenas.

Por fim, como perspetivas futuras, realçam-se os seguintes tópicos i) avaliar e caracterizar a interação e afinidade do G4 AT11-B0 em relação à NCL através da técnica de *Surface Plasmon Resonance* (SPR), ii) determinar os valores de IC₅₀ para o [32]phen₂N₄ nas células HeLa e NHDF, iii) incubar os conjugados G4 AT11-B0-[16]phenN₂ e G4 AT11-B0-[32]phen₂N₄ nas células HeLa e NHDF, iv) avaliar a internalização celular dos conjugados G4 AT11-B0-C₃ e G4 AT11-B0-C₅ por microscopia de fluorescência confocal, v) realizar microscopia de fluorescência confocal em NHDF, vi) terminar a síntese dos ligandos e efetuar estudos físicos e biológicos, vii) realizar os mesmos ensaios biológicos em células epiteliais humanas saudáveis do colo do útero e viii) prosseguir para estudos *in vivo*.

6. Referências

- [1] W. G. Jiang, A. J. Sanders, M. Katoh, H. Ungefroren, F. Gieseler, M. Prince, S. K. Thompson, M. Zollo, D. Spano, P. Dhawan, D. Sliva, P. R. Subbarayan, M. Sarkar, K. Honoki, H. Fujii, A. G. Georgakilas, A. Amedei, E. Niccolai, A. Amin, S. S. Ashraf, L. Ye, W. G. Helferich, X. Yang, C. S. Boosani, G. Guha, M. R. Ciriolo, K. Aquilano, S. Chen, A. S. Azmi, W. N. Keith, A. Bilsland, D. Bhakta, D. Halicka, S. Nowsheen, F. Pantano and D. Santini, "Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives," *Semin. Cancer Biol.*, **35**, S244-S275 (2015).
- [2] S. L. Floor, J. E. Dumont, C. Maenhaut and E. Raspe, "Hallmarks of cancer: Of all cancer cells, all the time?," *Trends Mol. Med.*, **18**, 509-515 (2012).
- [3] Y. Liu, T. Yin, Y. Feng, M. Cona, G. Huang, J. Liu, S. Song, Y. Jiang, Q. Xia, J. Swinnen, G. Bormans, U. Himmelreich, R. Oyen and Y. Ni, "Mammalian models of chemically induced primary malignancies exploitable for imaging-based preclinical theragnostic research.," *Quant. Imaging Med. Surg.*, **5**, 708-729 (2015).
- [4] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "Hallmarks of cancer: The next generation," *Cell*, **144**, 646-674 (2011).
- [5] K. Pietras and A. Östman, "Hallmarks of cancer: Interactions with the tumor stroma," *Exp. Cell Res.*, **316**, 1324-1331 (2010).
- [6] C. B. Blackadar, "Historical review of the causes of cancer," *World J. Clin. Oncol.*, **7**, 54-86 (2016).
- [7] M. Metifiot, S. Amrane, S. Litvak and M.L. Andreola, "G-quadruplexes in viruses: function and potential therapeutic applications," *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12352-12366 (2014).
- [8] K. Tlučková, M. Marušič, P. Tóthová, L. Bauer, P. Šket, J. Plavec and V. Viglasky, "Human papillomavirus G-quadruplexes," *Biochemistry*, **52**, 7207-7216 (2013).
- [9] G. M. Clifford, J. S. Smith, T. Aguado and S. Franceschi, "Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: A meta-analysis," *Br. J. Cancer*, **89**, 101-105 (2003).
- [10] N. Nour, "Cervical Cancer: A Preventable Death Nawal," *Rev. in Obstetrics and Gynecology*, **2**, 240-244 (2009).

- [11] D. Xiang, S. Shigdar, G. Qiao, T. Wang, A. Z. Kouzani, S. F. Zhou, L. Kong, Y. Li, C. Pu and W. Duan, "Nucleic acid aptamer-guided cancer therapeutics and diagnostics: The next generation of cancer medicine," *Theranostics*, **5**, 23-42 (2015).
- [12] A. V. Lakhin, V. Z. Tarantul and L. V. Gening, "Aptamers: Problems, solutions and prospects," *Acta Naturae*, **5**, 34-43 (2013).
- [13] H. Sun, X. Zhu, P. Y. Lu, R. R. Rosato, W. Tan and Y. Zu, "Oligonucleotide aptamers: New tools for targeted cancer therapy," *Mol. Ther. - Nucleic Acids*, **3**, e182 (2014).
- [14] P. J. Bates, J. B. Kahlon, S. D. Thomas, J. O. Trent and D. M. Miller, "Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding," *J. Biol. Chem.*, **274**, 26369-26377 (1999).
- [15] P. J. Bates, D. A. Laber, D. M. Miller, S. D. Thomas and J. O. Trent, "Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer," *Exp. Mol. Pathol.*, **86**, 151-164 (2009).
- [16] S. Burge, G. N. Parkinson, P. Hazel, A. K. Todd and S. Neidle, "Quadruplex DNA: Sequence, topology and structure," *Nucleic Acids Res.*, **34**, 5402-5415 (2006).
- [17] Z. Songyang, *Telomeres and Telomerase: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, **1587** (Springer Science, 2017).
- [18] C. Platella, C. Riccardi, D. Montesarchio, G. N. Roviello and D. Musumeci, "G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **1861**, 1429-1447 (2017).
- [19] H. Zhu, S. Xiao and H. Liang, "Structural Dynamics of Human Telomeric G-Quadruplex Loops Studied by Molecular Dynamics Simulations," *PLoS One*, **8**, e71380 (2013).
- [20] D. Rhodes and H. J. Lipps, "Survey and summary G-quadruplexes and their regulatory roles in biology," *Nucleic Acids Res.*, **43**, 8627-8637 (2015).
- [21] B. Onel, L. Clement and Y. DanZhou, "DNA G-quadruplex and its potential as anticancer drug target," *Sci. China Chem.*, **57**, 1605-1614 (2014).
- [22] D. Bhattacharyya, G. Mirihana Arachchilage and S. Basu, "Metal Cations in G-Quadruplex Folding and Stability," *Front. Chem.*, **4**, 1-14 (2016).
- [23] A. N. Lane, J. B. Chaires, R. D. Gray and J. O. Trent, "Stability and kinetics of G-

- quadruplex structures,” *Nucleic Acids Res.*, **36**, 5482-5515 (2008).
- [24] F. Moraca, J. Amato, F. Ortuso, A. Artese, B. Pagano, E. Novellino, S. Alcaro, M. Parrinello and V. Limongelli, “Ligand binding to telomeric G-quadruplex DNA investigated by funnel-metadynamics simulations,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **114**, E2136-E2145 (2017).
- [25] T. Agarwal, S. Kumar and S. Maiti, “Unlocking G-quadruplex: Effect of unlocked nucleic acid on G-quadruplex stability,” *Biochimie*, **93**, 1694-1700 (2011).
- [26] T. Chang, C. Qi, J. Meng, N. Zhang, T. Bing, X. Yang, Z. Cao and D. Shangguan, “General Cell-Binding Activity of Intramolecular G-Quadruplexes with Parallel Structure,” *PLoS One*, **8**, 1-10 (2013).
- [27] H. Bartz, Y. Mendoza, M. Gebker, T. Fischborn, K. Heeg and A. Dalpke, “Polyguanosine strings improve cellular uptake and stimulatory activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in human leukocytes,” *Vaccine*, **23**, 148-155 (2004).
- [28] A. H. Dalpke, S. Zimmermann, I. Albrecht and K. Heeg, “Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: Polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo,” *Immunology*, **106**, 102-112 (2002).
- [29] G. W. Collie and G. N. Parkinson, “The application of DNA and RNA G-quadruplexes to therapeutic medicines,” *Chem. Soc. Rev.*, **40**, 5867-5892 (2011).
- [30] N. M. Gueddouda, O. Mendoza, D. Gomez, A. Bourdoncle and J. L. Mergny, “G-quadruplexes unfolding by RHAU helicase,” *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **1861**, 1382-1388 (2017).
- [31] Y. H. Hsu and J. J. Lin, “Telomere and telomerase as targets for anti-cancer and regeneration therapies,” *Acta Pharmacol. Sin.*, **26**, 513-518 (2005).
- [32] H. Han and L. H. Hurley, “G-quadruplex DNA: A potential target for anti-cancer drug design,” *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 136-142 (2000).
- [33] E. P. Calvo and M. Wasserman, “G-Quadruplex ligands: Potent inhibitors of telomerase activity and cell proliferation in *Plasmodium falciparum*,” *Mol. Biochem. Parasitol.*, **207**, 33-38 (2016).
- [34] H. Yaku, T. Fujimoto, T. Murashima, D. Miyoshi and N. Sugimoto, “Phthalocyanines: a new class of G-quadruplex-ligands with many potential

- applications,” *Chem. Commun.*, **48**, 6203-6216 (2012).
- [35] S. Balasubramanian and L. H. Hurley, “UKPMC Funders Group Targeting G-quadruplexes in gene promoters : a novel anticancer,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 261-275 (2011).
- [36] W. O. Tucker, K. T. Shum and J. A. Tanner, “G-quadruplex DNA Aptamers and their Ligands: Structure, Function and Application,” *Curr. Pharm. Des.*, **18**, 2014-2026 (2012).
- [37] I. Russo Krauss, V. Napolitano, L. Petraccone, R. Troisi, V. Spiridonova, C. A. Mattia and F. Sica, “Duplex/quadruplex oligonucleotides: Role of the duplex domain in the stabilization of a new generation of highly effective anti-thrombin aptamers,” *Int. J. Biol. Macromol.*, **107**, 1697-1705 (2018).
- [38] I. Russo Krauss, V. Spiridonova, A. Pica, V. Napolitano and F. Sica, “Different duplex/quadruplex junctions determine the properties of anti-thrombin aptamers with mixed folding,” *Nucleic Acids Res.*, **44**, 983-991 (2016).
- [39] J. Müller, D. Freitag, G. Mayer and B. Pötzsch, “Anticoagulant characteristics of HD1-22, a bivalent aptamer that specifically inhibits thrombin and prothrombinase,” *J. Thromb. Haemost.*, **6**, 2105-2112 (2008).
- [40] A. V. Yuminova, I. G. Smirnova, A. M. Arutyunyan, A. M. Kopylov, A. V. Golovin and G. V. Pavlova, “The structure of G-quadruplex thrombin-binding DNA aptamer RA36,” *Moscow Univ. Chem. Bull.*, **70**, 43-46 (2015).
- [41] H. Qi, C.P. Lin, X. Fu, L. M. Wood, A. A. Liu, Y.C. Tsai, Y. Chen, C. M. Barbieri, D. S. Pilch and L. F. Liu, “G-Quadruplexes Induce Apoptosis in Tumor Cells,” *Cancer Res.*, **66**, 11808-11816 (2006).
- [42] J. Hu, J. Wu, C. Li, L. Zhu, W. Y. Zhang, G. Kong, Z. Lu and C. J. Yang, “A G-Quadruplex Aptamer Inhibits the Phosphatase Activity of Oncogenic Protein Shp2 in vitro,” *ChemBioChem*, **12**, 424-430 (2011).
- [43] Y. Liu, W. Lan, C. Wang and C. Cao, “A putative G-quadruplex structure in the proximal promoter of vegfr-2 has implications for drug design to inhibit tumor angiogenesis,” *J. Biol. Chem.*, **293**, 8947-8955 (2018).
- [44] C. R. Ireson and L. R. Kelland, “Discovery and development of anticancer aptamers,” *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 2957-2962 (2006).
- [45] P. J. Bates, E. M. Reyes-Reyes, M. T. Malik, E. M. Murphy, M. G. O’Toole and J. O.

- Trent, "G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **1861**, 1414-1428 (2017).
- [46] N. Q. Do, W. J. Chung, T. H. A. Truong, B. Heddi and A. T. Phan, "G-quadruplex structure of an anti-proliferative DNA sequence," *Nucleic Acids Res.*, **45**, 7487-7493 (2017).
- [47] R. Perrone, E. Butovskaya, S. Lago, A. Garzino-Demo, C. Pannecouque, G. Palù and S. N. Richter, "The G-quadruplex-forming aptamer AS1411 potently inhibits HIV-1 attachment to the host cell," *Int. J. Antimicrob. Agents*, **47**, 311-316 (2016).
- [48] J. Ai, Y. Xu, B. Lou, D. Li and E. Wang, "Multifunctional AS1411-functionalized fluorescent gold nanoparticles for targeted cancer cell imaging and efficient photodynamic therapy," *Talanta*, **118**, 54-60 (2014).
- [49] E. M. Reyes-Reyes, F. R. Šalipur, M. Shams, M. K. Forsthoefel and P. J. Bates, "Mechanistic studies of anticancer aptamer AS1411 reveal a novel role for nucleolin in regulating Rac1 activation," *Mol. Oncol.*, **9**, 1392-1405 (2015).
- [50] J. E. Rosenberg, R. M. Bambury, E. M. Van Allen, H. A. Drabkin, P. N. Lara, A. L. Harzstark, N. Wagle, R. A. Figlin, G. W. Smith, L. A. Garraway, T. Choueiri, F. Erlandsson and D. A. Laber, "A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma," *Invest. New Drugs*, **32**, 178-187 (2014).
- [51] Z. Luo, Z. Yan, K. Jin, Q. Pang, T. Jiang, H. Lu, X. Liu, Z. Pang, L. Yu and X. Jiang, "Precise glioblastoma targeting by AS1411 aptamer-functionalized poly (L- γ -glutamylglutamine)-paclitaxel nanoconjugates," *J. Colloid Interface Sci.*, **490**, 783-796 (2017).
- [52] W. J. Chung, B. Heddi, E. Schmitt, K. W. Lim, Y. Mechulam and A. T. Phan, "Structure of a left-handed DNA G-quadruplex," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **112**, 2729-2733 (2015).
- [53] A. De Rache and J. L. Mergny, "Assessment of selectivity of G-quadruplex ligands via an optimised FRET melting assay," *Biochimie*, **115**, 194-202 (2015).
- [54] N. G. Dolinnaya, A. M. Ogloblina and M. G. Yakubovskaya, "Structure, properties, and biological relevance of the DNA and RNA G-quadruplexes: Overview 50 years after their discovery," *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 1602-1649 (2016).
- [55] J. Carvalho, T. Quintela, N. M. Gueddouda, A. Bourdoncle, J. L. Mergny, G. F.

- Salgado, J. A. Queiroz and C. Cruz, "Phenanthroline polyazamacrocycles as G-quadruplex DNA binders," *Org. Biomol. Chem.*, **16**, 2776-2786 (2018).
- [56] M. C. Nielsen, A. F. Larsen, F. H. Abdikadir and T. Ulven, "Phenanthroline-2,9-bistriazoles as selective G-quadruplex ligands," *Eur. J. Med. Chem.*, **72**, 119-126 (2014).
- [57] L. X. Wang, Q. Shang, Q. Li, J. F. Xiang, Y. Liu, A. J. Guan, H. X. Sun, L. J. Yu and Y. L. Tang, "Pyridostatins selectively recognize two different forms of the human telomeric G-quadruplex structures and their anti-tumor activities in vitro," *Tetrahedron*, **71**, 4982-4986 (2015).
- [58] D. Monchaud and M. P. Teulade-Fichou, "A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands," *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 627-636 (2008).
- [59] J. Carvalho, E. Pereira, J. Marquevielle, M. P. C. Campello, J. L. Mergny, A. Paulo, G. F. Salgado, J. A. Queiroz and C. Cruz, "Fluorescent light-up acridine orange derivatives bind and stabilize KRAS-22RT G-quadruplex," *Biochimie*, **144**, 144-152 (2018).
- [60] J. Medeiros-Silva, A. Guédin, G. F. Salgado, J. L. Mergny, J. A. Queiroz, E. J. Cabrita and C. Cruz, "Phenanthroline-bis-oxazole ligands for binding and stabilization of G-quadruplexes," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, **1861**, 1281-1292 (2017).
- [61] C. Cruz, E. Cairrao, S. Silvestre, L. Breitenfeld, P. Almeida and J. A. Queiroz, "Targeting of mitochondria-endoplasmic reticulum by fluorescent macrocyclic compounds," *PLoS One*, **6**, e27078 (2011).
- [62] C. Cruz, E. Cairrão, O. Lourenço, P. Almeida, I. Verde and J. A. Queiroz, "Polyazamacrocycles as Potential Antitumor Agents for Human Prostate Cancer Cells," *Chem. Biol. Drug Des.*, **81**, 517-526 (2013).
- [63] G. Che, W. Li, Z. Kong, Z. Su, B. Chu, B. Li, Z. Zhang, Z. Hu and H. Chi, "Hydrothermal syntheses of some derivatives of tetraazatriphenylene," *Synth. Commun.*, **36**, 2519-2524 (2006).
- [64] R. H. Zheng, H. C. Guo, H. J. Jiang, K. H. Xu, B. B. Liu, W. L. Sun and Z. Q. Shen, "A new and convenient synthesis of phendiones oxidated by $\text{KBrO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$ at room temperature," *Chinese Chem. Lett.*, **21**, 1270-1272 (2010).
- [65] A. M. S. Garas and R. S. Vagg, "Synthesis of Some Novel Derivatives of 1,10-Phenanthroline." *J. Heterocyclic Chem.*, **37**, 151 - 158 (2000).

- [66] R. Zhong, S. Xu, J. Wang, F. Zhao, H. Xia and Y. Wang, "Experimental and theoretical investigations on spectroscopic properties of the imidazole-fused phenanthroline and its derivatives," *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, **161**, 27-32 (2016).
- [67] C. J. Chandler, L. W. Deady and J. A. Reiss, "Synthesis of some 2,9-Disubstituted-1,10-phenanthrolines" *J. Heterocyclic Chem.*, **18**, 599-601 (1981).
- [68] D. M. Y. Barrett, I. a Kahwa, J. T. Mague and G. L. Mcpherson, "Preparations, Crystal Structures, and Unusual Proton NMR Characteristics of Some Phthalimides," *J. Org. Chem.*, **60**, 5946-5953 (1995).
- [69] B. Drahoš and Z. Trávníček, "Synthesis of a versatile building block combining cyclen-derivative DO3A with a polyamine via a rigid spacer," *Molecules*, **18**, 13940-13956 (2013).
- [70] S. H. Bossmann, N. D. Ghatlia, M. F. Ottaviani, C. Turro, H. Dürr and N. J. Turro, "Synthesis and Characterization of Nitroxide-Linked Ruthenium Complexes as Molecular Probes for Microheterogeneous Environments," *Synthesis*, **11**, 1313-1319 (1996).
- [71] E. Pereira, L. Do Quental, E. Palma, M. C. Oliveira, F. Mendes, P. Raposinho, I. Correia, J. Lavrado, S. Di Maria, A. Belchior, P. Vaz, I. Santos and A. Paulo, "Evaluation of Acridine Orange Derivatives as DNA-Targeted Radiopharmaceuticals for Auger Therapy: Influence of the Radionuclide and Distance to DNA," *Sci. Rep.*, **7**, 1-16 (2017).
- [72] C. Cruz, V. Cahsto, R. Delgado and V. Félix, "Design of protonated polyazamacrocycles based on phenanthroline motifs for selective uptake of aromatic carboxylate anions and herbicides," *Chem. A European J.*, **15**, 3277-3289 (2009).
- [73] A. I. Karsisiotis, N. M. A. Hessari, E. Novellino, G. P. Spada, A. Randazzo and M. Webba Da Silva, "Topological characterization of nucleic acid G-quadruplexes by UV absorption and circular dichroism," *Angew. Chemie Int. Ed.*, **50**, 10645-10648 (2011).
- [74] J. Carvalho, J. Ferreira, P. Pereira, E. Coutinho, A. Guédin, P. Nottelet, G. F. Salgado, J. L. Mergny, J. A. Queiroz, F. Sousa, E. J. Cabrita and C. Cruz, "Stabilization of novel immunoglobulin switch regions G-quadruplexes by naphthalene and quinoline-based ligands," *Tetrahedron*, **72**, 1229-1237 (2016).
- [75] J. Carvalho, J. A. Queiroz and C. Cruz, "Circular dichroism of G-Quadruplex: A

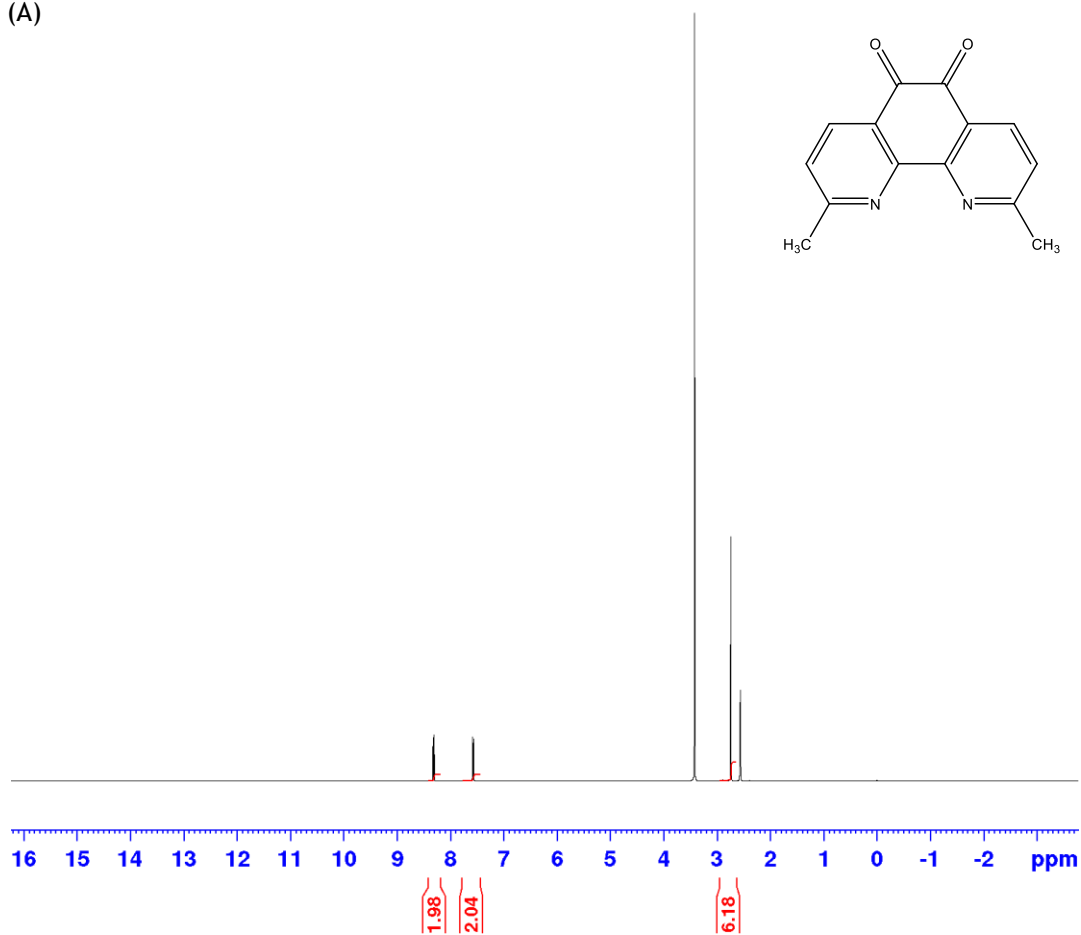
- laboratory experiment for the study of topology and ligand binding,” *J. Chem. Educ.*, **94**, 1547-1551 (2017).
- [76] E. Y. N. Lam, D. Beraldi, D. Tannahill and S. Balasubramanian, “G-quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA,” *Nat. Commun.*, **4**, 1796-1798 (2013).
- [77] T. Fujii, P. Podbevšek, J. Plavec and N. Sugimoto, “Effects of metal ions and cosolutes on G-quadruplex topology,” *J. Inorg. Biochem.*, **166**, 190-198 (2017).
- [78] C. Marchetti, A. Minarini, V. Tumiatti, F. Moraca, L. Parrotta, S. Alcaro, R. Rigo, C. Sissi, M. Gunaratnam, S. A. Ohnmacht, S. Neidle and A. Milelli, “Macrocyclic naphthalene diimides as G-quadruplex binders,” *Bioorganic Med. Chem.*, **23**, 3819-3830 (2015).
- [79] O. Mendoza, A. Bourdoncle, J. B. Boulé, R. M. Brosh and J. L. Mergny, “G-quadruplexes and helicases,” *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1989-2006 (2016).
- [80] W. J. Chung, B. Heddi, F. Hamon, M. P. Teulade-Fichou and A. T. Phan, “Solution structure of a G-quadruplex bound to the bisquinolinium compound phen-DC3,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, **53**, 999-1002 (2014).
- [81] S. Hori, A. Herrera, J. Rossi and J. Zhou, “Current Advances in Aptamers for Cancer Diagnosis and Therapy,” *Cancers (Basel)*, **10**, 1-33 (2018).
- [82] D. Koirala, S. Dhakal, B. Ashbridge, Y. Sannohe and R. Rodriguez, “A single-molecule platform for investigation of interactions between G-quadruplexes and small-molecule ligands,” *Nat Chem.*, **3**, 782-787 (2012).
- [83] N. W. Luedtke, “Targeting G-Quadruplex DNA with Small Molecules,” *Chim. Int. J. Chem.*, **63**, 134-139 (2009).
- [84] S. Gilbert-Girard, A. Gravel, S. Artusi, S. N. Richter, N. Wallaschek, B. B. Kaufer and L. Flamand “Stabilization of Telomere G- Quadruplexes Interferes with Human Herpesvirus 6A Chromosomal Integration,” *J. Virology*, **91**, e00402-e00417 (2017).
- [85] M. P. Teulade-Fichou, C. Carrasco, L. Guittat, C. Bailly, P. Alberti, J. L. Mergny, A. David, J. M. Lehn and W. D. Wilson, “Selective recognition of G-quadruplex telomeric DNA by a bis(quinacridine) macrocycle,” *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 4732-4740 (2003).
- [86] A. C. Girvan, “AGRO100 inhibits activation of nuclear factor- B (NF- B) by forming

a complex with NF- κ B essential modulator (NEMO) and nucleolin,” *Mol. Cancer Ther.*, **5**, 1790-1799 (2006).

- [87] R. Horobin, F. Rashid-Doubell, J. Padiani and G. Milligan, “Predicting small molecule fluorescent probe localization in living cells using QSAR modeling. 1. Overview and models for probes of structure, properties and function in single cells,” *Biotech. Histochem.*, **88**, 440-460 (2013).
- [88] P. Kumar, R. Kumar and D. N. Prasad, “Synthesis and anticancer study of 9-aminoacridine derivatives,” *Arab. J. Chem.*, **6**, 79-85 (2013).
- [89] S. Soundararajan, W. Chen, E. K. Spicer, N. Courtenay-Luck and D. J. Fernandes, “The nucleolin targeting aptamer AS1411 destabilizes Bcl-2 messenger RNA in human breast cancer cells,” *Cancer Res.*, **68**, 2358-2365 (2008).
- [90] Y. Teng, A. C. Girvan, L. K. Casson, W. M. Pierce, M. Qian, S. D. Thomas and P. J. Bates, “AS1411 alters the localization of a complex containing protein arginine methyltransferase 5 and nucleolin,” *Cancer Res.*, **67**, 10491-10500 (2007).
- [91] E. M. Reyes-Reyes, Y. Teng and P. J. Bates, “A new paradigm for aptamer therapeutic AS1411 action: Uptake by macropinocytosis and its stimulation by a nucleolin-dependent mechanism,” *Cancer Res.*, **70**, 8617-8629 (2010).

7. Anexo I

(A)



(B)

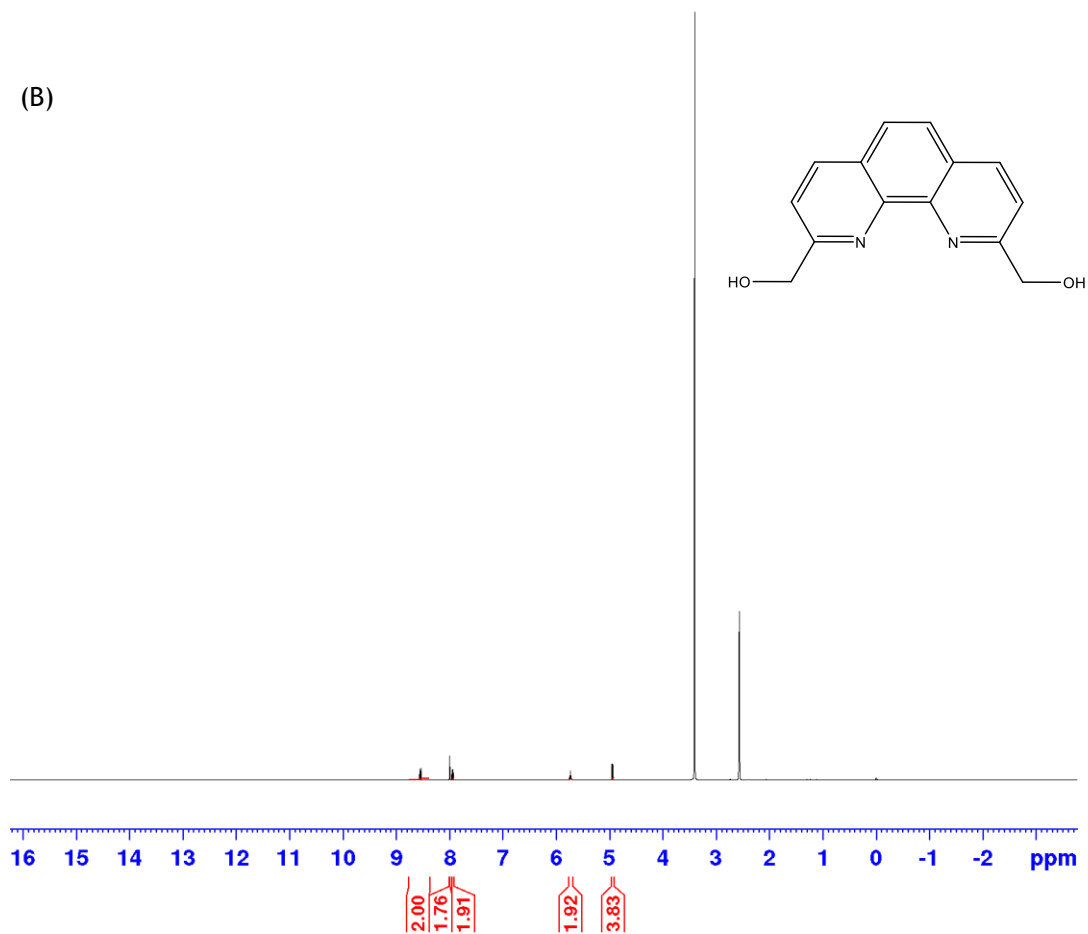


Figura 34: Espectros de ¹H RMN dos ligandos (A) 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona e (B) 2,9-bis(hidroximetil)-1,10-fenantrolina.

8. Anexo II: Comunicações em forma de poster

Abstract I

F. Antunes, João A. Queiroz and C. Cruz, G-quadruplex AS1411 derivative-phenanthroline nanosystem for cervical cancer therapy, XII Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery, 14 a 16 de Janeiro de 2018, Coimbra, Portugal.

G-quadruplex AS1411 derivative-phenanthroline nanosystem for cervical cancer therapy

F. Antunes¹, João A. Queiroz¹ and C. Cruz^{1*}

¹ CICS-UBI - Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal; Tel: +351 275 329 076; Fax: +351 275 329 099

*e-mail: carlacruz@fcsaude.ubi.pt
franciscaantunes@hotmail.com

Introduction: AS1411 is a G-rich oligonucleotide sequence and are highly polymorphic, presenting a wide variety of G-quadruplexes (G4) structures. This aptamer exhibits selectivity for nucleolin, a protein overexpressed in many tumor cells and which binds preferentially to G-quadruplex structures. Due to the binding to nucleolin, AS1411 can be internalized by the cell, presenting itself as a potential therapeutic target [1], [2]. The use of this aptamer for therapeutic purposes requires its stabilization through ligands [3]. In addition, the ligands can be used as cargoes with therapeutic effect against HPV-associated oncogenicity. Phenanthroline macrocycles, such as [32]phen₂N₄ and [16]phenN₂, are presented as potential stabilizers of G4 AS1411 derivative. The aim of this study is to produce a nanosystem based on G4 aptamer AS1411-ligands and evaluate it as cancer-selective antiproliferative agent in cervical cancer cells.

Materials and Methods: The G4 aptamers sequences AS1411 and AT11 are used in these studies.

Phenanthroline macrocycles were synthesised as previously described [4]. Circular dichroism (CD) was performed to evaluate stability of ligands with aptamers AS1411 and AT11. The binding affinity of nucleolin to the G4 aptamers is evaluated by Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensor.

Finally, the G4 aptamers AS1411 and AT11 was bounded to the phenanthroline ligands via supramolecular approach. The G4 aptamer AS1411-ligand was transfected into human cervical cancer cell line (HeLa) following by assessment of cytotoxicity and co-localization by MTT assay and confocal microscopy, respectively.

Results and Discussion: The results of CD revealed high affinity and G4 thermal stabilization of [32]phen₂N₄ and [16]phenN₂ to G4 aptamers AS1411 and AT11. The modified G4 AT11 showed better results comparatively to AS1411.

The binding affinity determined by SPR biosensor between nucleolin and G4 aptamers AS1411 and AT11 is high being promising candidates for the in vitro studies. Cells incubated with G4 aptamer AS1411-ligands showed decreased cell viability and proliferation.

Conclusions: The present work reports the importance of the study of G4 aptamers AS1411 and AT11 bound to phenanthroline ligands being promising anticancer agents, inhibiting the proliferation of cancer cells, with minimal damage to healthy tissues.

Acknowledgments: This work was supported by FCT project “Projeto de Investigação Exploratória” reference IF/00959/2015 “Nucleolin targeting by G-quadruplex aptamers for cervical cancer therapy” supported by Fundo Social Europeu e ao Programa Operacional Potencial Humano.

- [1] P. J. Bates, E. M. Reyes-Reyes, M. T. Malik, E. M. Murphy, M. G. O’Toole and J. O. Trent, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2017, **1861**, 1414-1428.
- [2] Z. Bagheri, B. Ranjbar, H. Latifi, M. I. Zibaii, T. T. Moghadam and A. Azizi, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, **72**, 806-811.
- [3] A. De Rache and J. L. Mergny, *Biochimie*, 2015, **115**, 194-202.
- [4] C. Cruz, V. Calisto, R. Delgado and V. Félix, *Chem. - A Eur. J.*, 2009, **15**, 3277-3289.

Abstract II

F. Antunes, Josué Carvalho, Maria P. C. Campello, João A. Queiroz, António Paulo and Carla Cruz, G-quadruplex AS1411 DNA derivatives for cervical cancer therapy, Encontro Nacional de Estudantes de Química (ENEQUI), 23 a 26 de Março de 2018, Covilhã, Portugal.

G-quadruplex AS1411 DNA derivatives for cervical cancer therapy

F. Antunes^a, Josué Carvalho^a, Maria P. C. Campello^b, João A. Queiroz^a, António Paulo^b and Carla Cruz^{a*}

^a CICS-UBI - Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal; Tel: +351 275 329 076; Fax: +351 275 329 099.

^b Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Estrada Nacional 10 (km 139,7), 2695-066 Bobadela LRS, Portugal.

*e-mail: carlacruz@fcsaude.ubi.pt
franciscaantunes@hotmail.com

Abstract: AS1411 is a G-rich oligonucleotide sequence and highly polymorphic, presenting a wide variety of G-quadruplexes (G4) structures. This aptamer exhibits selectivity to nucleolin, a protein overexpressed in many tumor cells and which binds preferentially G4 structures. Due to the binding to nucleolin, AS1411 can be internalized by the cell, presenting itself as a potential therapeutic target [1],[2].

The use of this aptamer for therapeutic purposes requires its stabilization through ligands, which can be used as cargoes with therapeutic effects against HPV-associated

oncogenicity [3]. Phenanthroline macrocycles, such as [32]phen₂N₄ and [16]phenN₂, and acridine orange derivatives, such as C₈ and C₈-NH₂, are presented as potential stabilizers of G4 AS1411 derivative.

The aim of this study is to evaluate G4 aptamer AS1411-ligands as cancer-selective antiproliferative agent in cervical cancer cells.

In order to evaluate the stability of ligands with G4 aptamers AS1411 and AT11, circular dichroism (CD) was performed. The results revealed high affinity and G4 thermal stabilization of [32]phen₂N₄ to G4 aptamers AS1411 and AT11. The G4 aptamer AS1411-ligand was transfected into human cervical cancer cell line (HeLa) following by assessment of cytotoxicity by MTT assay. The modified G4 AT11 showed better results comparatively to AS1411. Cells incubated with G4 aptamer AS1411-ligands showed decreased cell viability and proliferation.

The present work reports the importance of the study of G4 aptamers AS1411 and AT11 bound to ligands being promising anticancer agents, inhibiting the proliferation of cancer cells, with minimal damage to healthy tissues.

Acknowledgements: This work was supported by FCT project “Projeto de Investigação Exploratória” reference IF/00959/2015 “Nucleolin targeting by G-quadruplex aptamers for cervical cancer therapy” supported by Fundo Social Europeu, Programa Operacional Potencial Humano and Project Fundação Luso-Americana (FLAD) Healthcare 2020 ref. 45/2018.

References:

- [1] P. J. Bates, E. M. Reyes-Reyes, M. T. Malik, E. M. Murphy, M. G. O’Toole and J. O. Trent, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2017, **1861**,1414-1428.
- [2] Z. Bagheri, B. Ranjbar, H. Latifi, M. I. Zibaii, T. T. Moghadam and A. Azizi, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, **72**, 806-811.
- [3] A. De Rache and J. L. Mergny, *Biochimie*, 2015, **115**, 194-202.

Abstract III

F. Antunes, J. Carvalho, M. P. C. Campello, J. A. Queiroz, A. Paulo and C. Cruz, G-quadruplex DNA aptamer for cervical cancer therapy, XII Annual CICS-UBI Symposium, 5 a 6 de julho de 2018, Covilhã, Portugal.

G-quadruplex DNA aptamer for cervical cancer therapy

F. Antunes¹, J. Carvalho¹, M.P. C. Campello², J. A. Queiroz¹, A. Paulo² and C. Cruz^{1*}

¹ CICS-UBI - Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal; Tel: +351 275 329 076; Fax: +351 275 329 099.

² Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares, Instituto Superior Técnico, Universidade de Lisboa, Estrada Nacional 10 (km 139,7), 2695-066 Bobadela LRS, Portugal.

(*)Email: carlacruz@fcsaude.ubi.pt

AS1411 is a G-rich oligonucleotide sequence and highly polymorphic, presenting a wide variety of G-quadruplexes (G4) structures. This aptamer exhibits selectivity to nucleolin,

a protein overexpressed in many tumour cells. Due to the binding to nucleolin (NCL), G4 AS1411 can be internalized by the cell, being itself a potential therapeutic target[1],[2]. Although G4 AS1411 has an excellent safety profile and ability to induce prolonged responses in some patients, improved pharmacology and potency are required for optimal efficacy. To improve G4 AS1411 pharmacological properties and binding to NCL, new AS1411 derivatives must be developed [1].

The use of G4 AS1411 derivatives aptamers for therapeutic purposes requires their stabilization with ligands[3]. Phenanthroline macrocycles, such as [32]phen₂N₄ and [16]phenN₂, and acridine orange derivatives, such as C₈, C₈-NH₂, C₅ and C₃, are presented as potential binders of G4 AS1411 derivative.

The aim of this study is to evaluate the formation of complexes G4 AS1411 derivative - ligands and their effects in human cervical cancer cell line (HeLa) versus fibroblasts (NHDF).

In order to evaluate the stability and affinity of G4 AS1411 derivative to ligands, circular dichroism and fluorescence spectroscopy were performed. The results revealed high affinity and G4 thermal stabilization of [32]phen₂N₄ and C₈, respectively. The complexes were transfected into HeLa followed by cytotoxicity assessment by MTT assay. The complexes showed low cellular viability and proliferation on HeLa. Confocal microscopy revealed cellular uptake of the complexes.

The present work reports the importance of using G4 AS1411 derivative -ligand complexes as anticancer agents, inhibiting the proliferation of cancer cells, with minimal damage to healthy tissues.

Keywords: AS1411, G-quadruplex, Ligands, Cervical cancer.

Acknowledgements: This work was supported by FCT project “Projeto de Investigação Exploratória” reference IF/00959/2015 “Nucleolin targeting by G-quadruplex aptamers for cervical cancer therapy” supported by Fundo Social Europeu, Programa Operacional Potencial Humano and Project Fundação Luso-Americana (FLAD) Healthcare 2020 ref. 45/2018.

References:

- [1] P. J. Bates, E. M. Reyes-Reyes, M. T. Malik, E. M. Murphy, M. G. O’Toole, and J. O. Trent, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, 2017, **1861**,1414-1428.
- [2] Z. Bagheri, B. Ranjbar, H. Latifi, M. I. Zibaii, T. T. Moghadam, and A. Azizi, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2015, **72**, 806-811.
- [3] A. De Rache and J. L. Mergny, *Biochimie*, 2015, **115**,194-202.