



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências da Saúde

# Síntese e avaliação biológica de poliaminas esteroides potencialmente antitumorais

**Elisabete Valente Alves**

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

Orientador: Prof. Doutor Samuel Silvestre  
Co-orientador: Prof. Doutor Carla Cruz

**Covilhã, outubro de 2015**



*"I have not failed.  
I have just found 10.000 ways that won't work"*  
Thomas Edison



# Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Samuel Silvestre por ter aceitado orientar-me na elaboração desta dissertação de mestrado. Agradeço todo o apoio, confiança, disponibilidade e todos os conhecimentos transmitidos ao longo deste trabalho.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Carla Cruz, por todo o apoio, disponibilidade e dedicação.

À professora Adriana Santos por toda a ajuda e disponibilidade.

O meu agradecimento a todos os meus colegas de laboratório, pela amizade, compreensão, bom ambiente, e apoio diário. Um agradecimento especial à Sara, Sandrina e Mariana pois sem elas não seria possível formar o “*gang*” das células, pela amizade e apoio durante este percurso.

À minha família e ao Francisco Lucas por toda a compreensão, apoio e carinho mostrado ao longo desta dissertação.

Obrigado.



## Resumo

O cancro atualmente é considerado uma das principais causas de morte em todo o mundo, sendo que a sua incidência continua a aumentar, apesar de todos os avanços científicos ao longo dos anos. Atualmente métodos como a cirurgia, radioterapia e a terapia sistémica são usados para tratar e controlar a doença. Contudo, a investigação na descoberta de novos fármacos é fundamental para que o tratamento desta patologia se torne cada vez mais eficaz. Neste contexto, não só vários esteroides têm mostrado ação antiproliferativa e pró-apoptótica em diversos estudos, mas também várias poliaminas são capazes de encaminhar o composto para o interior das células cancerígenas e favorecem a sua interação com o DNA. Desta forma, o objetivo deste estudo foi sintetizar novos compostos com ação anticancerígena com possível interação com o G-quadruplex envolvendo a combinação de poliaminas com estruturas esteroides.

Desta forma, foram preparadas e caracterizadas várias poliaminas esteroides e a sua ação anti-proliferativa, bem como a dos seus intermediários sintéticos foram avaliadas em células cancerígenas da mama (MCF-7, T47D), da próstata (LNCaP), do glioblastoma (U87) e em células normais (NHDF) pelo ensaio MTT, de modo a se concluir a cerca do seu potencial interesse anticancerígeno. Neste contexto, e no sentido de explorar o seu mecanismo de acção, também foram realizados ensaios de fluorescência e de citometria de fluxo.

Assim, da síntese química resultaram cinco compostos cujas ações antiproliferativas foram posteriormente estudadas. Destes, mediante o ensaio MTT, o composto c8 foi o que originou os melhores resultados, evidenciando não só uma acção marcada contra a linha de cancro da próstata, com um  $IC_{50} = 1,368$ , bem como uma selectividade relevante em comparação com as células normais ( $IC_{50} = 31,75$ ). Mediante estudos de citometria de fluxo, realizada com este composto em células MCF-7, verificou-se não existirem valores significativos de morte celular. Quanto ao ensaio de *fluorescence resonance energy transfer*, os compostos C1, C3, C4 e C7 não evidenciaram interação com o G-quadruplex.

## Palavras-chave

Esteroides, Poliaminas, Cancro, G-quadruplex, Ação antiproliferativa



# Abstract

Cancer today is considered to be one of the main causes of death anywhere in the world. It's a disease that, in spite of all the scientific advances along the years, continues to spread. Nowadays methods like surgery, radiotherapy and systemic therapy are used to treat and control this illness. However, the development of new drugs remains crucial to the treatment of all forms of cancer. Various steroids have shown antiproliferative and pro-apoptotic properties in numerous studies. Many polyamines have the capability to route compounds to the interior of the cancer cells and to favour their interaction with the DNA. Having this in mind, the aim of this project is to synthesize new anti-cancer compounds that can possibly interact with G-quadruplex and that involve the combination of polyamines with steroid structures.

Thus, several steroidal polyamines were synthesized and their antiproliferative properties, as well as those of their intermediate synthetics, were evaluated in cancerous breast cells (MCF-7, T47D), cancerous prostate cells (LNCaP), glioblastoma cells (U87) and in non-tumoral cells (NHDF). This was done recurring to the MTT assay in order to study the potential anti-cancer properties of these compounds. In this context and in order to explore their action mechanism, fluorescence and flow cytometry studies were also conducted.

From the chemical synthesis resulted five compounds that were posteriorly studied. Regarding the MTT study, the compound with which the best results were observed was C8 that has shown, not only meaningful action against the prostate cancer line with a  $IC_{50}=1,368$ , but also relevant selectivity when compared with the non-tumoral cells whose  $IC_{50}=31,75$ . The flow cytometry study conducted on this compound for the MCF-7 cells revealed low cell death values. Concerning the fluorescence resonance energy transfer study, the compounds C1, C3, C4 and C7 did not show interaction with the G-quadruplex.

## Keywords

Steroids, Polyamines, Cancer, G-quadruplex, Antiproliferative effects



# Índice

<b>Capítulo 1 - Introdução</b> .....	1
<b>1.1 O cancro</b> .....	1
1.1.1 Carcinogénese .....	1
1.1.2 Prevenção e tratamento .....	2
<b>1.2 G-quadruplex</b> .....	2
1.2.1 Estruturas do G-quadruplex .....	3
1.2.2 Funções biológicas do G-quadruplex .....	5
1.2.2.1 G-quadruplex em promotores de genes .....	6
1.2.3 Estabilização do G- quadruplex com ligandos .....	8
1.2.3.1 Análogos de antraquinona .....	8
1.2.3.2 Análogos de berberina.....	8
1.2.3.3 Análogos de Porfirina .....	9
1.2.3.4 Telomestatina .....	9
1.2.3.5 Esteroides como ligandos do G-Quadruplex .....	10
<b>1.3 Esteroides</b> .....	10
1.3.1 Características estruturais gerais .....	10
1.3.2 Aspectos fisiológicos e farmacológicos .....	11
1.3.3 Ácidos Biliares - Aspectos gerais.....	11
1.3.3.1 Ácidos biliares antitumorais.....	13
<b>Capítulo 2 - Justificação do tema e objetivos</b> .....	16
2.1 Objetivos gerais .....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
<b>Capítulo 3 - Materiais e Métodos</b> .....	18
<b>3.1 Síntese Química</b> .....	18
3.1.1 Reagentes e solventes.....	18
3.1.2 Equipamentos.....	18
3.1.3 Procedimentos de cromatografia .....	19
3.1.4 Procedimentos experimentais realizados.....	19
3.1.4.1 Síntese do 5 $\beta$ -colano-3 $\alpha$ ,24-diol (C1).....	19
3.1.4.2 Síntese de 24-(7-cloroquinolinil-4-oxi)-colan-3 $\alpha$ -ol (C2) .....	20
3.1.4.3 Síntese do 3 $\alpha$ ,24-di(8-cloroquinolinil-2-oxi)-5 $\beta$ -colano (C3) e 24-(8-cloroquinolinil-2-oxi)-5 $\beta$ -colano-3 $\alpha$ -ol (C4) .....	21
3.1.4.4 Síntese do Composto 5 (C5) .....	22
3.1.4.5 Síntese do Composto 6 (C6) .....	24
3.1.4.6 Síntese do Composto (C7) .....	25
3.1.4.7 Síntese do Composto 8 (C8) .....	26

3.1.4.8 Síntese do Composto 9 (C9) .....	27
<b>3.2 Avaliação biológica</b> .....	<b>27</b>
3.2.1 Materiais .....	27
3.2.2 Equipamentos .....	28
3.2.3 Linhas celulares .....	28
3.2.3.1 NHDF .....	29
3.2.3.2 LNCaP .....	29
3.2.3.3 MCF-7 .....	29
3.2.3.4 T-47D .....	29
3.2.3.5 U87 .....	29
3.2.4 Técnicas de Cultura Celular .....	30
3.2.4.1 Preparação dos meios de cultura .....	30
3.2.4.2 Congelamento e Descongelamento de células .....	30
3.2.4.3 Tripsinização .....	31
3.2.4.5 Contagem e sementeira celular .....	31
3.2.5 Ensaio de viabilidade celular .....	32
3.2.5.1 Preparação e incubação dos compostos .....	32
3.2.5.2 Ensaio MTT .....	33
3.2.6 Microscopia de fluorescência .....	33
3.2.7 Citometria de fluxo .....	34
3.2.8 <i>Fluorescence resonance energy transfer</i> (FRET) .....	35
3.2.9 Análise estatística .....	35
<b>Capítulo 4 - Resultados e Discussão</b> .....	<b>36</b>
<b>4.1 Síntese Química</b> .....	<b>36</b>
<b>4.2 Avaliação Biológica</b> .....	<b>39</b>
4.2.1 Análise dos efeitos dos compostos a 30 $\mu$ M em células LNCaP, MCF-7, T47D, U87 e NHDF .....	39
4.2.2 Determinação do IC <sub>50</sub> dos compostos e comparação dos seus efeitos nas diferentes linhas celulares .....	41
4.2.3 Citometria de fluxo .....	46
4.2.4 Microscopia de fluorescência .....	47
4.2.5 Interação com o G-quadruplex .....	47
<b>Capítulo 5 - Conclusão</b> .....	<b>48</b>
<b>Capítulo 6 - Bibliografia</b> .....	<b>49</b>

## Lista de Figuras

Figura 1. Conformação do A-DNA que é uma estrutura orientada para a direita (a). Conformação do B- DNA a sugerida por Watson e Crick, Conformação Z-DNA orientada para a esquerda.	3
Figura 2. Estrutura de DNA duplex (a) e estrutura de G-quadruplex (b).	4
Figura 3. Estruturas de G-quadruplex intramoleculares e intermoleculares.	4
Figura 4. Estrutura do telómero (A). Regulação do tamanho do telómero pela telomerase em células normais e células cancerígenas (B).	5
Figura 5. Promotor do oncogene c-Myc. Regulação da transcrição pelo G-quadruplex.	7
Figura 6. Derivados de antraquinona.	8
Figura 7. Derivados de berberina.	9
Figura 8. Porphirina TMPyP4.	9
Figura 9. Telomestatina.	10
Figura 10. Esteroide derivado da funtumina (FG).	10
Figura 11. Estrutura do núcleo esteroide.	11
Figura 12. Estrutura do ácido cólico, um exemplo de um ácido biliar.	12
Figura 13. Biossíntese dos ácidos biliares primários a partir do colesterol.	12
Figura 14. Estrutura do ácido litocólico.	13
Figura 15. Mecanismo de acção anti-tumoral do ácido litocólico em células de neuroblastoma.	14
Figura 16. Derivados do ácido ursodesoxicólico (a)(c) e do ácido quenodesoxicólico (b)(c).	14
Figura 17. Estrutura do ácido litocólico e do composto C1.	19
Figura 18. Estrutura do composto C1 e C2.	20
Figura 19. Estrutura dos compostos C1, C2 e C3.	21
Figura 20. Estrutura dos compostos C4 e C5.	22
Figura 21. Estrutura dos compostos C4 e C6.	24
Figura 22. Estrutura do ácido litocólico e do composto C7.	25
Figura 23. Estrutura dos compostos C7 e C8.	26
Figura 24. Estrutura dos compostos C7 e C9.	27
Figura 25: Esquema representativo das microplacas para o ensaio de curva dose-resposta, com uma gama de diferentes concentrações ( $\mu\text{M}$ ).	32
Figura 26. Esquema geral da primeira via de síntese.	36
Figura 27. Esquema geral da segunda via de síntese.	37
Figura 28. Proliferação celular relativa nas diferentes linhas celulares estudadas incubadas com o ácido litocólico (AL) e os compostos sintetizados, numa concentração de 30 $\mu\text{M}$ por 72 horas.	40
Figura 29. Proliferação celular relativa nas linhas celulares LNCaP, MCF-7, T47D, U87 e NHDF incubadas com o composto C1, numa gama de concentrações entre 0,01 $\mu\text{M}$ e	

100 $\mu\text{M}$ por 72 horas.	41
Figura 30. Proliferação celular relativa nas linhas celulares LNCaP, MCF-7 e T47D e NHDF incubadas com o composto C3, numa gama de concentrações entre 0,01 $\mu\text{M}$ e 100 $\mu\text{M}$ por 72 horas.	42
Figura 31. Proliferação celular relativa nas linhas celulares LNCaP, MCF-7, T47D, U87 e NHDF incubadas com o composto C4, numa gama de concentrações entre 0,01 $\mu\text{M}$ e 100 $\mu\text{M}$ por 72 horas.	43
Figura 32. Proliferação celular relativa em todas as linhas celulares estudadas e incubadas com o composto C8, numa gama de concentrações entre 0,01 $\mu\text{M}$ e 100 $\mu\text{M}$ por 72 horas.	43
Figura 33. Proliferação celular relativa em todas as linhas celulares estudadas e incubadas com o composto C9, numa gama de concentrações entre 0,01 $\mu\text{M}$ e 100 $\mu\text{M}$ por 72 horas.	44
Figura 34. “Dot plots” da análise com a marcação com iodeto de propídeo em células MCF-7 controlo negativo, e tratadas com o controlo positivo, 5-Flu, e com o composto C8. Os quadrantes R2 são representativos das células sem IP, e os quadrantes R3 representam as células marcadas com IP.	46

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Comparação das sequências ricas em guaninas nos promotores de oncogenes e nos telómeros.	7
Tabela 2 - Média das percentagens da proliferação celular relativa nas diferentes linhas celulares estudadas incubadas com o ácido litocólico (AL) e os compostos sintetizados, numa concentração de 30 $\mu$ M por 72 horas.	40
Tabela 3 - Valores de IC50 para os compostos C1, C3, C4, C8, C9 e os controlos 5-Flu e Diosgenina.	45
Tabela 4 - Distribuição percentual dos eventos pelos quadrantes nos <i>Dot plots</i> da figura 33.	47
Tabela 5 - Valores aproximados de excitação e de emissão dos compostos C3, C4 e C7.	47



## Lista de Acrónimos

Ab	Solução com 10,000 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina e 25 µg/ml de anfotericina-B
AL	Ácido litocólico
A/T	Adenina/Timina
BD	Becton Dickinson
CD	Dicroísmo circular
C/G	Citosica/Guanina
CCF	Cromatografia de camada fina
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DavePhos	2-diciclo-hexilfosfino-2'-( <i>N,N</i> -dimetilamino)bifenilo
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
DCU	Diciclohexilureia
DEAD 40%	Dietilo azodicarboxilato 40% em tolueno
DMAP	4-dimetilaminopiridina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FG	Esteróide derivado de funtumina
Flu	Fluorucilo
FRET	<i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
IC <sub>50</sub>	Concentração de composto que inibe a proliferação celular em 50%
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale
IECB	Institut Européen de Chimie et Biologie
IV	Infravermelho
IP	Iodeto de propídeo
m	Múltiplo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NHEIII <sub>1</sub>	Elemento de hipersensibilidade nuclease III <sub>1</sub>
PBS	Tampão fosfato salino
PC	Células da próstata
PFA	paraformaldéido
PKA	Proteína cinase A
QBDI	Quinolino-benzo-[5,6]-dihidroisoquindolinio
RNA	Ácido ribonucleico
RMPI	Roswell Park Memorial Institute
s	Singleto
SFB	Soro Fetal Bovino
SP	Solução com 10,000 unidades de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina
THF	tetrahidrofurano
TMPyP4	tetra(4- <i>N</i> -metilpiridil)porfirina
UV	Ultra violeta

VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
Vis	Visível
<sup>1</sup> H RMN	Ressonância Magnética nuclear de Hidrogénio
<sup>13</sup> C-RMN	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13

# Capítulo 1 - Introdução

## 1.1 O cancro

O cancro é uma das principais causas de morte em países desenvolvidos e a sua incidência tem vindo a aumentar ao longo dos últimos anos. Os principais fatores apontados como sendo responsáveis pelo aumento da incidência desta patologia são o envelhecimento da população, o tabagismo, o sedentarismo, agentes ambientais, agentes químicos, o álcool e também a alimentação<sup>1</sup>. De acordo com a Organização Mundial de Saúde estima-se que em 2012 tenham ocorrido 8,2 milhões de mortes por cancro em todo o mundo<sup>2</sup>. No mesmo ano, na Europa foi estimado terem surgido mais de 3,4 milhões de novos casos desta doença<sup>3</sup>. Em Portugal, o número de vítimas mortais devidas ao cancro em 2014 estima-se que foi cerca de 27200<sup>2</sup>. Acredita-se que o número de casos desta patologia continue a aumentar nos próximos anos. A nível mundial os tipos de cancro mais prevalentes são o do pulmão, da mama, do colo-retal, do fígado, da próstata e do estômago<sup>4</sup>. Entre o sexo feminino e masculino, o cancro da mama é o mais comum entre as mulheres sendo o da próstata o mais comum nos homens<sup>1,5</sup>. A elevada morbilidade, mortalidade e o impacto socioeconómico associado ao cancro têm levado a vários avanços científicos nesta área ao longo dos anos.

### 1.1.1 Carcinogénese

A carcinogénese é um processo complexo em que uma sucessão de alterações genéticas leva à conversão de células normais para células cancerígenas<sup>6</sup>. Este processo divide-se em três etapas: a iniciação, a promoção e a progressão. Na iniciação observa-se a modificação dos genes envolvidos no cancro. A promoção é a etapa intermédia e caracteriza-se pela multiplicação alterada das células. A progressão caracteriza-se por uma autonomia de replicação das células, assim como, pela capacidade de invasão das mesmas<sup>7</sup>. Os genes envolvidos neste processo são os proto-oncogenes que codificam proteínas que, por sua vez estimulam a divisão celular. Estes genes podem sofrer mutações e, transformando-se em oncogenes, estimulam proteínas a tornarem-se resultando em proliferação celular excessiva. Os genes supressores de tumores codificam proteínas que inibem a divisão celular, sendo que mutações nestes genes podem também levar a uma proliferação desregulada<sup>8</sup>. Modificações epigenéticas também têm um papel importante na carcinogénese incluindo a metilação do DNA, modificações na cromatina, e a modificação pós-tradução de histonas<sup>9,10</sup>. As principais diferenças entre as células tumorais e as células normais são o seu potencial proliferativo ilimitado, a perda de inibição de crescimento, angiogénese e a capacidade invasiva para outros tecidos<sup>11</sup>.

### 1.1.2 Prevenção e tratamento

A prevenção e o tratamento do cancro têm-se apresentado como um enorme desafio para a comunidade científica<sup>12</sup>. Diversas são as abordagens atualmente utilizadas para o tratamento, tais como, a cirurgia, a radioterapia, e a terapia sistémica como a quimioterapia, e a imunoterapia<sup>13</sup>. A cirurgia pode permitir a remoção dos tumores sólidos com eficácia<sup>14</sup>, no entanto, se o tumor for grande ou afetar tecidos vitais, a remoção cirúrgica pode ser difícil ou impossível<sup>15</sup>. Atualmente, existem diversos tipos de cirurgia, como a eletrocirurgia que usa para efeitos de corte e coagulação a corrente de alta frequência aplicados por agulha, lâmina ou eléctrodos. Este tipo de cirurgia usa-se principalmente no caso de cancros da pele, da cavidade oral ou no cancro retal. Outro tipo de cirurgia é a criocirurgia, que envolve a aplicação de azoto líquido no interior do tumor através de uma sonda. A criocirurgia é utilizada em cancros da cavidade oral, próstata e cérebro. A cirurgia a laser recorre a um feixe laser para remoção do tumor, e é usada em retinoblastomas e cirurgia às cordas vocais<sup>15</sup>. A radioterapia consiste na utilização de raios X ou raios Gama para provocar danos celulares e, desta forma, a morte das células cancerígenas<sup>13,15</sup>. A radioterapia pode ser utilizada isoladamente, como método principal de tratamento, ou como pré-operatória, ou pós-operatória<sup>15</sup>. Existem vários tipos de radioterapia, tais como a radioterapia externa em que os raios provêm de um aparelho emissor, a radioterapia interna onde são colocados diretamente no tumor materiais radioativos, e a radioterapia sistémica, onde a radiação provém de um líquido ou de cápsulas que contêm material radioativo<sup>15</sup>. A terapia sistémica consiste em terapias tais como, a quimioterapia, a terapia hormonal e a imunoterapia<sup>15</sup>. O objetivo principal da quimioterapia consiste na utilização de fármacos que provoquem a morte celular das células cancerígenas, preservando as normais. A terapia hormonal baseia-se na administração de fármacos que inibem a biossíntese e/ou as ações de hormonas específicas de alguns tipos de cancro. A imunoterapia ou terapia biológica consiste em utilizar o sistema imunitário no combate às células cancerígenas<sup>13</sup>.

## 1.2 G-quadruplex

Em 1953, foi proposto por Watson e Crick, o modelo antiparalelo da estrutura em dupla hélice de DNA, em que cada cadeia está unida pelo emparelhamento das bases A/T e C/G. No entanto, com o decorrer do tempo foi demonstrado que a estrutura de DNA não é limitada a esse modelo, podendo adquirir outras conformações<sup>16</sup>. Acredita-se que a maioria do DNA existe na forma B-DNA, porém, o DNA pode adotar formas, como a A-DNA, uma forma muito semelhante ao B-DNA, sendo ambas orientadas para a direita, o Z-DNA uma forma cuja direção da hélice é orientada para a esquerda (Figura 1), os triplexes (H-DNA), o hairpin, o *i-motif* e o G-quadruplex. Este polimorfismo de conformação é determinado, por exemplo, pela composição da sequência de DNA, iões e proteínas de ligação de DNA<sup>17,18</sup>. Por exemplo, o DNA rico em guaninas (G) pode formar estruturas de quatro cadeias chamadas G-quadruplex<sup>19</sup>.

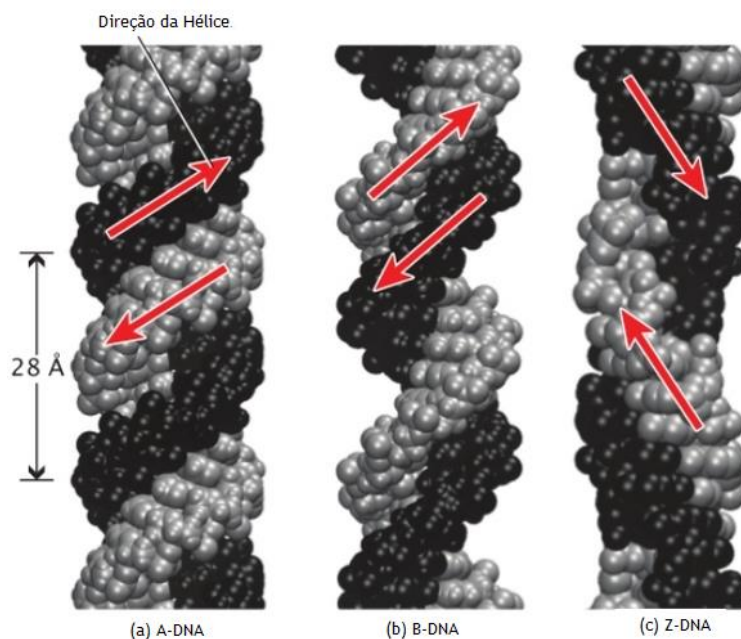


Figura 1. Conformação do A-DNA que é uma estrutura orientada para a direita (a). Conformação do B-DNA a sugerida por Watson e Crick, Conformação Z-DNA orientada para a esquerda. (Adaptado de<sup>20</sup>).

### 1.2.1 Estruturas do G-quadruplex

As estruturas de G-quadruplex têm uma unidade estrutural básica que é o G-quarteto ou G-tétrada, isto é, um conjunto planar quadrado de quatro bases de G ligadas por ligações *Hoogsteen* (Figura 2)<sup>21</sup>. Assim sendo, o empilhamento vertical de várias G-tétradas ligadas por interações  $\pi$ - $\pi$ , resulta no G-quadruplex<sup>22</sup>. O G-quadruplex pode ter várias topologias, de acordo com a orientação das cadeias e o arranjo em “loop”<sup>17</sup>.

A formação e estabilidade do G-quadruplex depende, nomeadamente, de cátions monovalentes. Isto deve-se ao potencial electrostático negativo criado pelos oxigénios O6 do grupo carbonilo das guaninas, que formam um canal central na G-tétrada com os cátions localizados no interior da mesma. O Na<sup>+</sup> e o K<sup>+</sup> são cátions que se ligam eficazmente, induzindo e estabilizando, assim, o G-quadruplex, sendo que, destes, o K<sup>+</sup> é o ião mais recomendado<sup>17,23</sup>.

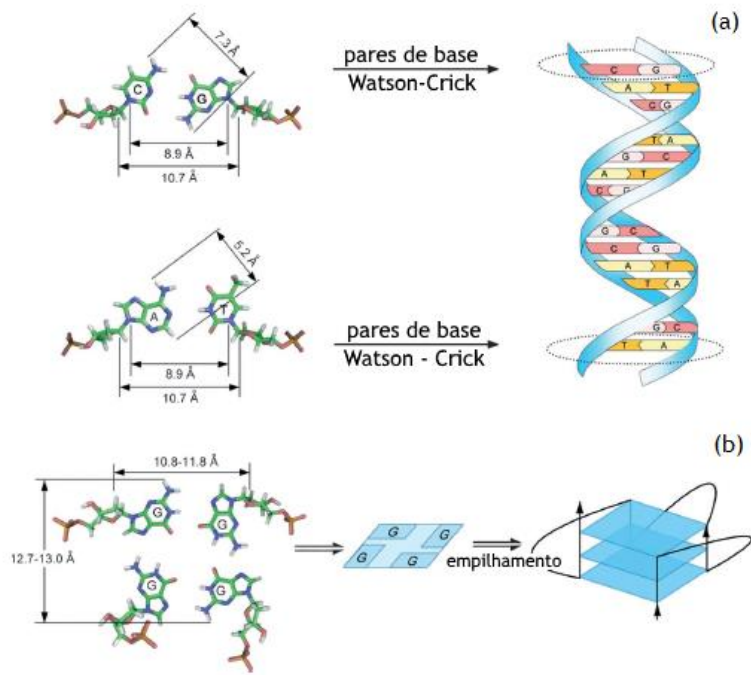


Figura 2. Estrutura de DNA duplex (a) e estrutura de G-quadruplex (b). (Adaptado de<sup>24</sup>).

Com base no número de cadeias de DNA, o G-quadruplex pode ser classificado como intramolecular, tendo uma única cadeia, ou intermolecular (Figura 2). Dentro do grupo intermolecular pode ser bimolecular (duas cadeias; dímero) ou tetramolecular (quatro cadeias; tetrâmero) (Figura 3)<sup>21,25</sup>. O G-quadruplex intramolecular depende da orientação da cadeia que forma as tétradas, estas estruturas podem ser classificadas em três grupos: paralela, antiparalela, ou híbrida (paralela e antiparalela) (Figura 3)<sup>26</sup>.

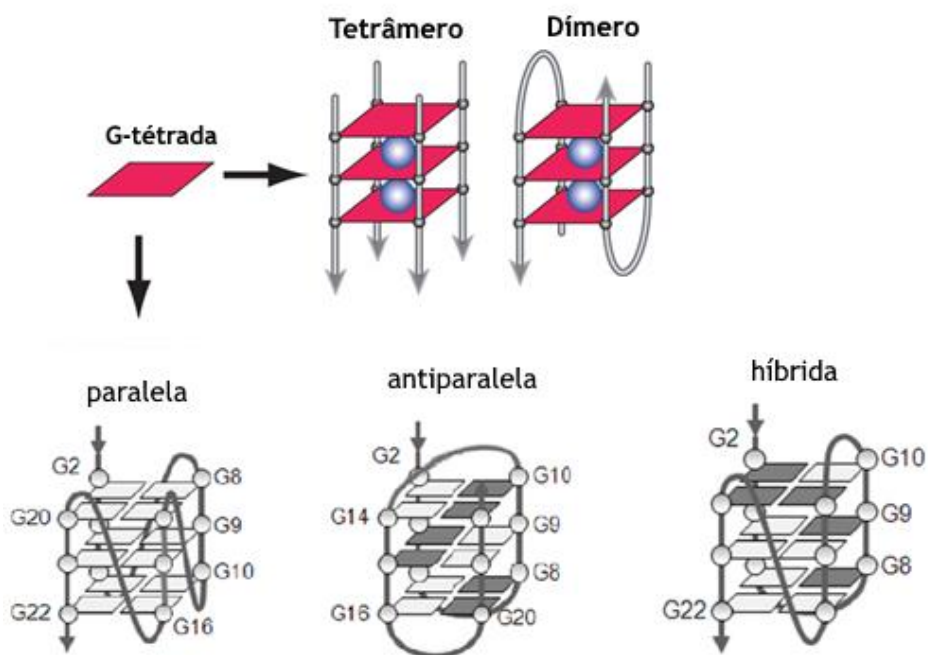


Figura 3. Estruturas de G-quadruplex intramoleculares e intermoleculares. (Adaptado de<sup>26,27</sup>).

### 1.2.2 Funções biológicas do G-quadruplex

Ao longo dos anos, tem sido sugerido que o G-quadruplex está envolvido em diversos eventos celulares, tais como, a recombinação, a replicação, e o alinhamento cromossômico. Esta estrutura também está envolvida na regulação de alguns genes, como por exemplo os oncogenes c-MYC, c-FOS, c-ABL, c-KIT, entre outros<sup>28,29</sup>. Sendo assim, o G-quadruplex tornou-se num alvo terapêutico na descoberta de novos fármacos<sup>28</sup>.

As sequências de DNA com tendência para formar G-quadruplex têm sido encontradas nos telômeros, nos promotores de oncogenes e em regiões de troca de imunoglobulinas<sup>16,30</sup>. O G-quadruplex está envolvido em processos de manutenção de telômeros pela telomerase e na regulação da transcrição de genes<sup>30</sup>. Os telômeros são constituídos por sequências repetidas de CG, contendo sequências de DNA 5'-TTAGGG-3', e estas estruturas estão localizadas nas extremidades dos cromossomas (Figura 4)<sup>31,32</sup>. Os telômeros atuam como uma capa protetora, estabilizando os cromossomas e prevenindo a sua degradação durante a divisão celular<sup>33</sup>. De facto, sabe-se que através da divisão celular os cromossomas são replicados e que cerca de 50 pares de bases são perdidos, uma vez que o mecanismo de replicação não é capaz de completar a replicação até ao fim do cromossoma. Como resultado, os telômeros ficam mais curtos após cada divisão até que a célula gera um sinal que cessa a divisão celular entrando assim em senescência (Figura 4)<sup>33,34</sup>.

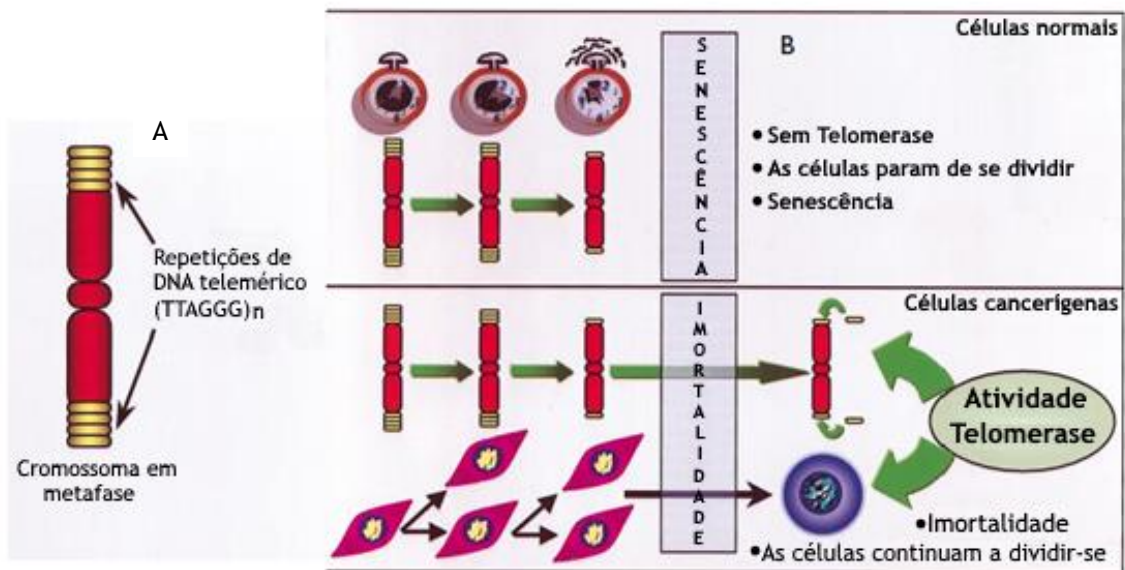


Figura 4. Estrutura do telômero (A). Regulação do tamanho do telômero pela telomerase em células normais e células cancerígenas (B). (Adaptado de<sup>33</sup>).

No entanto, existem mecanismos que impedem o encurtamento dos telómeros. A telomerase é uma enzima responsável pela manutenção dos telómeros promovendo o alongamento do cromossoma na extremidade 3', sendo a cadeia complementar, completada pela DNA polimerase. A telomerase é um complexo ribonucleoproteico que é uma transcriptase reversa<sup>34</sup>. Esta enzima é essencialmente composta por subunidades de RNA (hTERC) juntamente com a subunidade telomerase transcriptase reversa (hTERT). A telomerase em células cancerígenas promove a proliferação celular, invasão e resistência à apoptose<sup>32</sup>.

Assim sendo, a inibição da telomerase em células cancerígenas previne a formação de tumores. Neste contexto, com a estabilização das estruturas intramoleculares de G-quadruplex formadas nas sequências dos telómeros é possível inibir a ação da telomerase prevenindo assim a manutenção dos telómeros. Desta forma, o G-quadruplex tem sido alvo de estudo para novos ligandos com o objetivo de induzir e estabilizar a sua estrutura<sup>35</sup>.

### 1.2.2.1 G-quadruplex em promotores de genes

Estruturas de G quadruplex têm sido encontradas nos promotores de diversos oncogenes, como o c-MYC, VEGF, HIF-1 $\alpha$ , Ret, KRAS, Bcl-2, c-Kit, PDGF-A e c-Myb<sup>17</sup>. Em contraste com a sequência telomérica, as regiões promotoras de genes são mais ricas em regiões com guaninas. De facto, cada região frequentemente tem mais do que 4 sequências de duas ou mais guaninas seguidas, pelo qual podem potencialmente formar várias estruturas G-quadruplex (Tabela 1)<sup>17,27</sup>.

Tabela 1. Comparação das sequências ricas em guaninas nos promotores de oncogenes e nos telómeros. (Adaptado de<sup>27</sup>).

	G3NG3					G3NG3			
Myc2345	5'-	GGG	T	GGG	GA	GGG	T	GGG	-3'
Myc1245	5'-	GGG	A	GGG	TG	GGG	A	GGG	-3'
VEGF	5'-	GGG	C	GGG	CCGG	GGG	C	GGG	-3'
HIF-1 $\alpha$	5'-	GGG	A	GGG	AGAGG	GGG	C	GGG	-3'
RET	5'-	GGG	C	GGG	GCG	GGG	C	GGG	-3'
c-KIT21	5'-	GGG	C	GGG	CGCGA	GGG	A	GGG	-3'
bcl2Mid	5'-	GGG	CGC	GGG	AGGAAGG	GGG	C	GGG	-3'
Telómero	5'-	GGG	TTA	GGG	TTA	GGG	TTA	GGG	-3'

O c-Myc é um dos genes mais estudados e está desregulado em vários tumores, nomeadamente da mama, do colón, cervical, do pulmão, e em glioblastomas, osteossarcomas e leucemia mielóide. De facto, constatou-se que este gene desempenha um papel importante no crescimento celular e na sua proliferação<sup>17,36</sup>. A sua transcrição é 75% a 85% regulada pelo

elemento de hipersensibilidade nuclease III<sub>1</sub> (NHEIII<sub>1</sub>) (Figura 5). Neste contexto a estrutura de G-quadruplex atua como um silenciador da transcrição<sup>27,29</sup>. Para além da regulação pelo NHEIII<sub>1</sub>, existem diversas proteínas que regulam a transcrição do c-Myc através do G-quadruplex, como é o caso da NM23-H2 e da nucleolina. Estas duas proteínas têm efeitos opostos na regulação, sendo que, enquanto o NM23-H2 desestabiliza o G-quadruplex do promotor de c-Myc, ativando a transcrição, a nucleolina estabiliza-o, inativando a transcrição<sup>27,36</sup>.

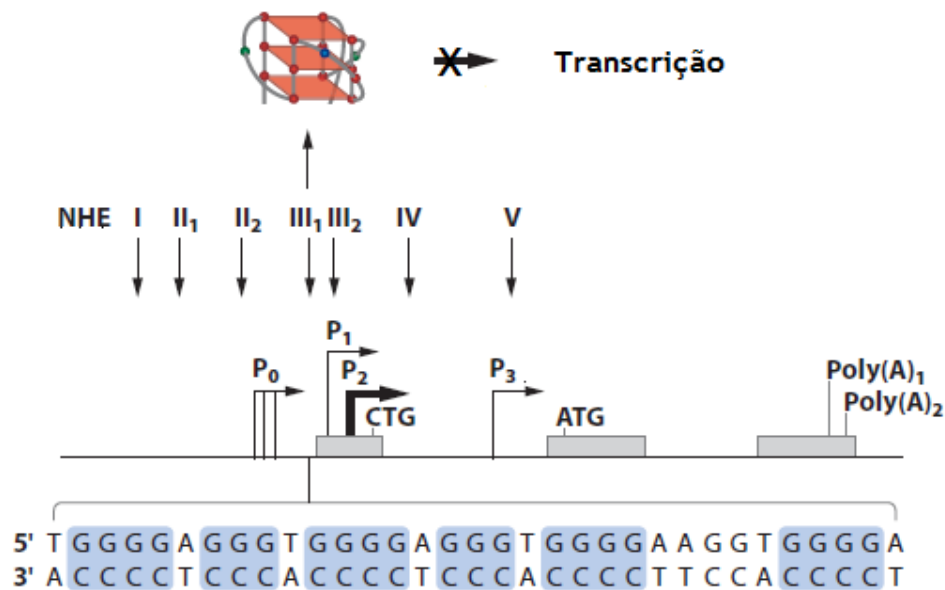


Figura 5. Promotor do oncogene c-Myc. Regulação da transcrição pelo G-quadruplex. (Adaptado de<sup>36</sup>).

Outro gene muito estudado nesta temática é o c-Kit, o qual codifica o recetor tirosina cinase e regula o crescimento e proliferação celular, encontrando-se sobreexpresso em vários tumores, nomeadamente da mama, ovário, melanoma, neuroblastoma e gastrointestinais<sup>17,37,38</sup>. O gene promotor de c-Kit forma estruturas de G-quadruplex localizado entre 87-109 pares de bases (KIT1), e 140-160 pares de bases (KIT2)<sup>29</sup>.

O fator de crescimento VEGF estimula a produção de novos vasos sanguíneos possibilitando a oxigenação e o fornecimento de nutrientes aos tumores sólidos, favorecendo a sua proliferação. O promotor de VEGF é igualmente rico em guaninas, sendo composto por cinco extensões com pelo menos 3 guaninas<sup>38</sup>. Isto sugere que estas regiões são também suscetíveis à formação de estruturas de G-quadruplex que podem ser estabilizadas para regulação da transcrição<sup>17</sup>.

O Bcl-2 é um gene que está também sobreexpresso em alguns tumores e que funciona como um inibidor de apoptose. A região promotora do Bcl-2 contém seis sequências ricas em guaninas com três ou mais guaninas<sup>38</sup>.

### 1.2.3 Estabilização do G- quadruplex com ligandos

A estabilização do G-quadruplex na sequência telomérica inibe a atividade da telomerase, o que leva à senescência e apoptose das células. Como já referido, a avaliação de novos ligandos seletivos e estabilizadores do G-quadruplex é uma abordagem terapêutica potencialmente relevante para o cancro<sup>39</sup>.

Neste âmbito, diversos ligandos já foram avaliados e alguns mostraram seletividade para o G-Quadruplex, como por exemplo: derivados de antraquinona, quindolina, berberina, porfirina, telomestatina e esteroides como a malouetina e a funtumina<sup>40</sup>.

#### 1.2.3.1 Análogos de antraquinona

A estrutura base antraquinónica (Figura 6 (a)) está presente em várias plantas<sup>40</sup>. O primeiro ligando de G-quadruplex a ser reportado foi o BSU-1051 (figura 6 (b)), em 1997, sendo que estabiliza o G-quadruplex e inibe a atividade da enzima telomerase ( $IC_{50} \approx 23 \mu M$ )<sup>24,40</sup>. Neste âmbito, estudos revelam que derivados de antraquinona ligam ao G-quadruplex estabilizando-o via “*threading intercalation mode*”, nos quais as cadeias amino terminais empilham com as regiões *groove* do G-quadruplex<sup>40,41</sup>.

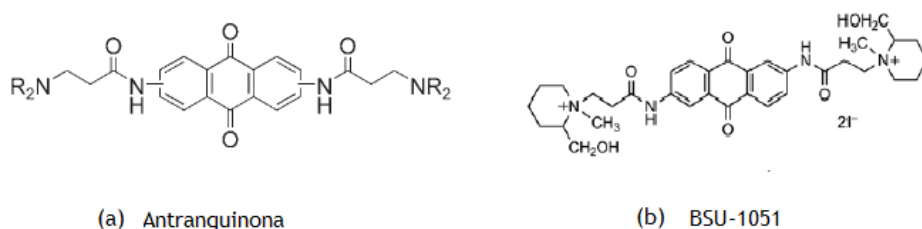


Figura 6. Derivados de antraquinona. (Adaptado de<sup>40</sup>).

#### 1.2.3.2 Análogos de berberina

Vários estudos sobre derivados de berberina (Figura 7 (a)) mostraram que estes têm atividade anticancerígena. De facto, análogos da berberina com substituintes na posição 9 (Figura 7 (b)) interagem com o G-quadruplex telomérico inibindo a telomerase, enquanto que o derivado quinolino-benzo-[5,6]-dihidroisoquindolínio (QBDI) (Figura 7 (C) ) mostra afinidade com o G-quadruplex do c-Myc<sup>40</sup>.

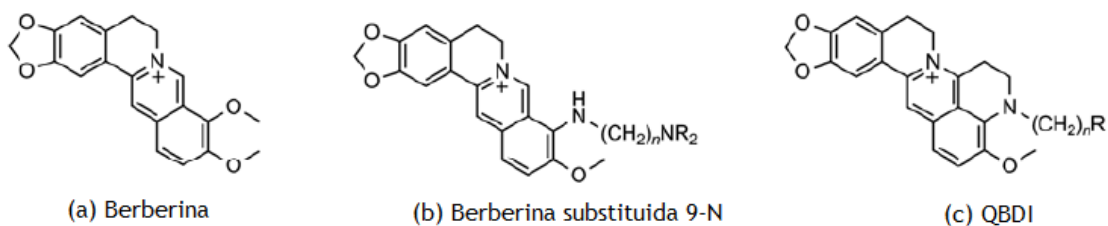


Figura 7. Derivados de berberina. (Adaptado de<sup>40</sup>).

### 1.2.3.3 Análogos de Porfirina

Outros estudos revelaram que a porfirina tetra(4-N-metilpiridil)porfirina (TMPyP4) (Figura 8) se liga ao G-quadruplex telomérico e inibe a telomerase<sup>40</sup>. De facto, acredita-se que o arranjo planar dos anéis aromáticos em análogos de porfirina pode-se ligar ao G-quadruplex. Neste contexto, estudos de RMN e de UV sugerem que TMPyP4 liga-se fortemente ao G-quadruplex por empilhamento com as G-tétradas nas extremidades do G-quadruplex<sup>24,40</sup>, assim como estudos de CD e RMN sugerem que TMPyP4 se liga ao G-quadruplex paralelo e antiparalelo<sup>24</sup>.

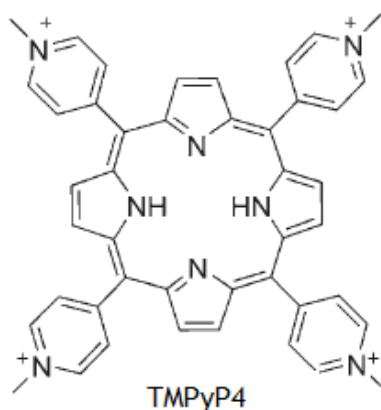
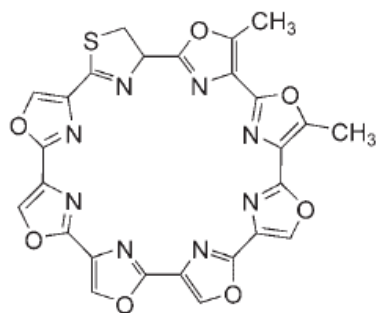


Figura 8. Porfirina TMPyP4. (Adaptado de<sup>24</sup>).

### 1.2.3.4 Telomestatina

A telomestatina (Figura 9) é um produto natural constituído por sete anéis de oxazole e um anel de tiazolína<sup>24</sup> e é um importante inibidor da telomerase, exibindo atividade anti-proliferativa em diversos tumores<sup>40</sup>. A telomestatina é atualmente o inibidor mais eficiente, *in vitro*, da telomerase ( $\text{IC}_{50} = 5\text{nM}$ ) e parece interagir preferencialmente com G-quadruplexes intramoleculares<sup>24</sup>.

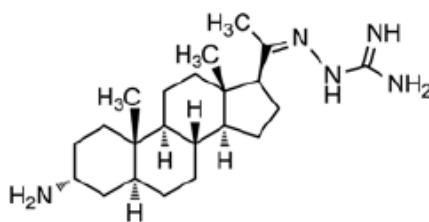


Telomestatina

Figura 9. Telomestatina. (Adaptado de<sup>24</sup>).

### 1.2.3.5 Esteroides como ligandos do G-Quadruplex

Esteroides, como a malouetina e a funtumina, foram identificados como sendo ligandos do G-quadruplex, inibindo a telomerase. Destes, um derivado da funtumina, o esteróide FG (Figura 10) também estabiliza o G-quadruplex, tendo-se considerado que os grupos hidrofóbicos (como os grupos metilo no sistema tetracíclico) efetuam interações hidrofóbicas nas regiões *groove* do G-quadruplex<sup>39,40</sup>.



Esteróide FG

Figura 10. Esteróide derivado da funtumina (FG). (Adaptado de<sup>40</sup>).

## 1.3 Esteroides

Os esteroides fazem parte de uma extensa família de compostos e têm sido amplamente estudados nos últimos anos. Isto deve-se à sua importância fisiológica e na medicina sendo a sua estrutura fundamental no desenvolvimento de novos fármacos<sup>42,43</sup>.

### 1.3.1 Características estruturais gerais

Os esteroides têm uma estrutura base denominada ciclopentanoperhidrofenantreno, constituída por 17 carbonos, dispostos em 4 anéis ligados entre si, sendo três constituídos por 6 carbonos (anéis A, B e C) e um composto por 5 carbonos (anel D) (figura 11). A numeração dos esteroides é efetuada segundo regras estabelecidas pela IUPAC e deve ser iniciada no anel A, como indicado na figura 5<sup>44,45</sup>. Na maior parte dos esteroides um grupo metilo angular axial

encontra-se nas posições C-10 e outro em C-13, podendo também existir uma cadeia alquila presente no C-17<sup>44</sup>, bem como outros possíveis substituintes.

Quanto à sua estereoquímica, quando os substituintes se apresentam acima do plano formado pelos 4 anéis e determinado pelos metilos angulares, eles são designados  $\beta$ , sendo graficamente representados por uma linha preenchida. Quando os substituintes estão abaixo do plano são denominados  $\alpha$ , sendo representados graficamente por uma linha a tracejado<sup>46</sup>.

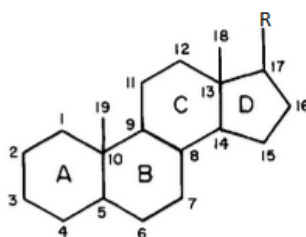


Figura 11. Estrutura do núcleo esteroide. (Adaptado de<sup>46</sup>)

### 1.3.2 Aspectos fisiológicos e farmacológicos

Os esteroides são encontrados principalmente em animais, plantas e microrganismos. A sua família inclui os ácidos biliares, as hormonas adrenocorticais, as hormonas sexuais, derivados da vitamina D, entre outras substâncias<sup>44,47</sup>.

Os esteroides animais derivam do colesterol e regulam algumas funções nomeadamente o metabolismo, a digestão e o funcionamento dos órgãos sexuais<sup>48</sup>. Neste contexto, a presença de diferentes grupos funcionais localizados no seu núcleo rígido tem explicado a variedade de funções. Por este motivo, os esteroides têm sido muito importantes no desenvolvimento de novos fármacos para doenças cardiovasculares, auto-imunes, tumores, osteoartrite, entre outras<sup>49</sup>. A título de exemplo, alguns esteroides podem ser usados no tratamento de determinados cancros hormono-dependentes como alguns cancros da mama e da próstata. No cancro da mama diversos esteroides podem atuar como inibidores da aromatase e como inibidores de sulfatases<sup>50,51</sup>. No cancro da próstata alguns esteroides têm ação inibitória da 5 $\alpha$ -redutase e do CYP 17<sup>51</sup>.

Os ácidos biliares pertencem à família dos esteroides e são também alvo de grande investigação no desenvolvimento de novos fármacos, nomeadamente para tratamentos de tumores, como antivirais, antifúngicos, entre outros<sup>43,52</sup>.

### 1.3.3 Ácidos Biliares - Aspectos gerais

Os ácidos biliares são uma família de moléculas esteroides que derivam do colesterol e são sintetizados nos hepatócitos. Estruturalmente, estes compostos apresentam duas unidades conectadas, um núcleo esteroide rígido e uma pequena cadeia alifática que termina num álcool ou num ácido carboxílico (Figura 12)<sup>43</sup>.

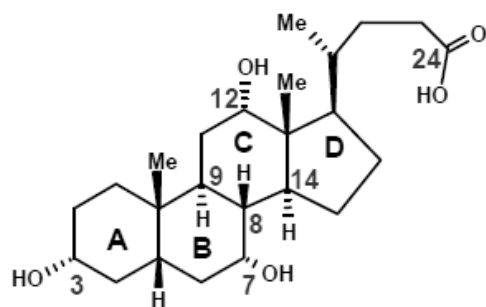


Figura 12. Estrutura do ácido cólico, um exemplo de um ácido biliar<sup>52</sup>.

Os ácidos biliares têm como funções principais a regulação lipídica (solubilização e transporte) e a homeostase da glicose e do colesterol<sup>43,52</sup>. Existem diferentes ácidos biliares, que podem ser agrupados em primários, secundários e terciários. Os ácidos biliares primários, tais como, o ácido cólico e o ácido quenodesoxicólico, são biossintetizados a partir do colesterol por duas vias diferentes (Figura 13). Os ácidos biliares secundários, como os ácidos desoxicólico e litocólico, são formados a partir dos ácidos biliares primários, enquanto que os ácidos biliares terciários, como o ursodesoxicólico e o sulfolitocólico são obtidos a partir destes ácidos biliares secundários<sup>53</sup>.

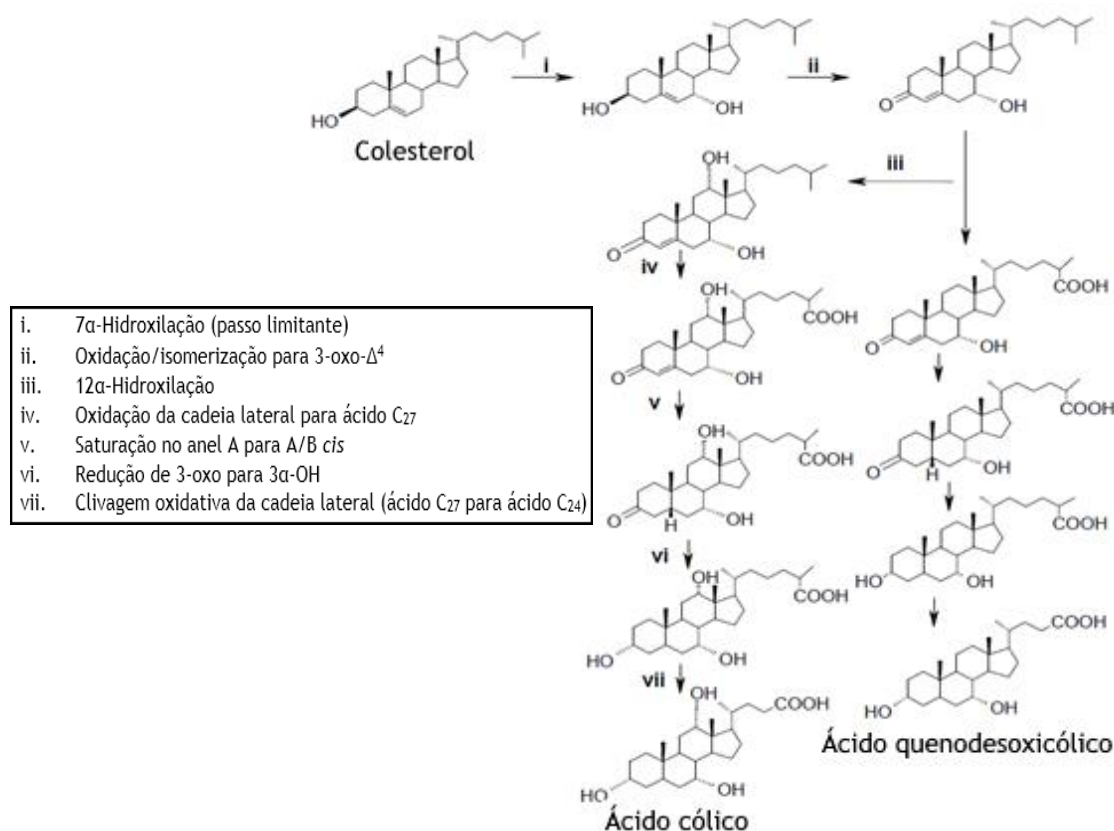


Figura 13. Biossíntese dos ácidos biliares primários a partir do colesterol. (Adaptado de <sup>52</sup>).

O ácido litocólico (Figura 14) é um ácido biliar secundário que deriva do ácido quenodesoxicólico por ação da enzima bacteriana 7 $\alpha$ -desidroxilase<sup>54</sup>.

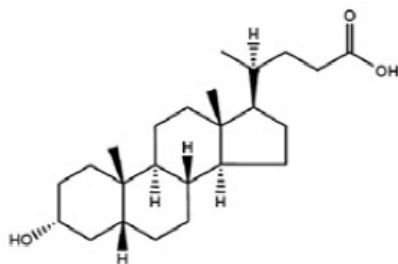


Figura 14. Estrutura do ácido litocólico<sup>55</sup>.

### 1.3.3.1 Ácidos biliares antitumorais

Além dos papéis já referidos, os ácidos biliares podem também interferir em vias apoptóticas e inflamatórias. De facto, devido à capacidade citotóxica de vários ácidos biliares, estes têm sido alvo de estudo para o desenvolvimento de novos derivados para o tratamento de diversos tumores. Neste contexto, vários derivados dos ácidos biliares têm mostrado ter ação anti-proliferativa e pró-apoptótica em diversas linhas celulares cancerígenas como as de cancro hepático, da mama, de leucemia, da próstata, do estômago, cervical, do do intestino e glioblastoma. Contudo, estes derivados induzem diferentes respostas dependendo da linha celular e da sua estrutura química<sup>43</sup>. Por exemplo, em linhas cancerígenas da mama e da próstata o mecanismo apoptótico associado a ácidos biliares sintéticos é o aumento da regulação de BAX, p21 e p53. Numa linha do cancro cervical (SiHa) a apoptose induzida está associada à *c-jun N-terminal kinase* e à via NF- $\kappa$ B<sup>56</sup>.

Neste contexto, alguns ácidos biliares foram estudados e demonstraram efeitos anticancerígenos, nomeadamente em células do cancro do cólon. De facto, o ácido cólico mostrou efeitos antitumorais através da indução da proteína citoplasmática MAP cinase (MAPK). Por sua vez, o ácido quenodesoxicólico pode induzir a actividade de Ap-1. O ácido ursodesoxicólico também pode inibir a progressão do cancro através da inibição do ciclo celular, pelo bloqueio do ciclo celular na fase G1. O ácido litocólico pode ativar também Ap-1 e induzir Egr-1 pela activação de MAPK<sup>56</sup>. Adicionalmente, alguns estudos têm evidenciado que o ácido litocólico e alguns derivados apresentam atividade antiproliferativa em diversas linhas celulares como as do neuroblastoma (BE(2)-m17 e SK-n-MCIXC), da mama (MCF-7) e da próstata (LNCaP e PC-3)<sup>57,58</sup>. Outros estudos mostraram também que o mecanismo subjacente à ação anticancerígena em células do neuroblastoma é um mecanismo semelhante ao observado nas células do cancro da próstata, tendo-se observado que o ácido litocólico interage com a proteína TGR5, que se encontra na membrana plasmática. Assim, o ácido litocólico ativa a via de sinalização cAMP/proteína cinase A (PKA), alterando o equilíbrio redox na mitocôndria e a sua morfologia. A ativação da caspase-8 leva à permeabilização da

mitocôndria, que desencadeia um mecanismo apoptótico que vai incluir a fragmentação da mitocôndria e a ativação da caspase -9 e caspase - 3 (Figura 15) <sup>57,59</sup>.

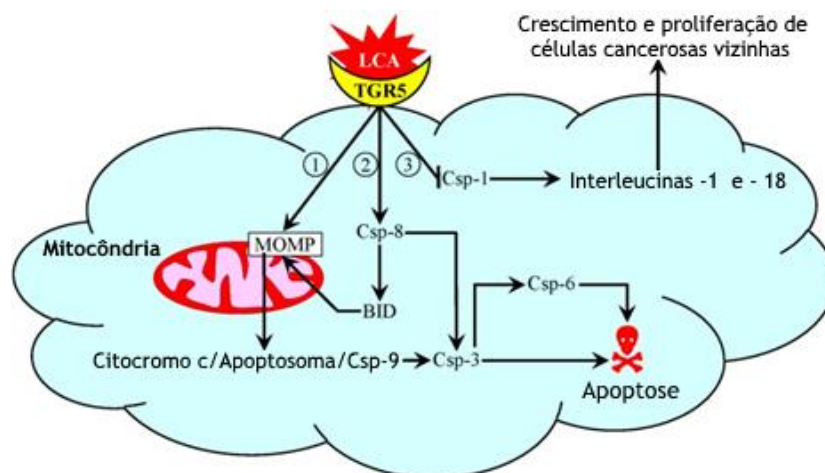


Figura 15. Mecanismo de acção anti-tumoral do ácido litocólico em células de neuroblastoma. (Adaptado de<sup>57</sup>).

Adicionalmente, derivados de ácidos biliares também têm mostrado interesse na descoberta de potenciais novos fármacos. Por exemplo, conjugados do ácido ursodesoxicólico com um éster glicil metílico (composto HS-1030, Figura 16) mostrou induzir apoptose em células do cancro hepático (HepG2) e em células do cancro da mama (MCF-7)<sup>60</sup>. Outros ácidos biliares como os ácidos quenodesoxicólico e o ursodesoxicólico conjugados com benzil *L*-fenilalanina (compostos HS-1199 e HS-1183, respectivamente, Figura 16), e conjugados de ácido quenodesoxicólico com benzil *L*-alanina (composto HS-1200) induzem a via apoptótica p-53 em células do cancro da mama (MCF-7 e MDA-MG-231) e mostram atividade apoptótica através da activação das caspases em células do linfoma humano<sup>60,61</sup>, e mostram inibição do ciclo celular na fase G1 em células da próstata (PC-3)<sup>62</sup>. Os compostos HS-1199 e HS-1200 também foram estudados em células do glioblastoma humano (U87, U118, U373), revelando activação da via das caspases, e mostrando a inibição do crescimento tumoral. Estes derivados foram também testados em modelo animal (ratos NOD/SCID) mostrando igualmente inibição do crescimento do tumor<sup>63</sup>.

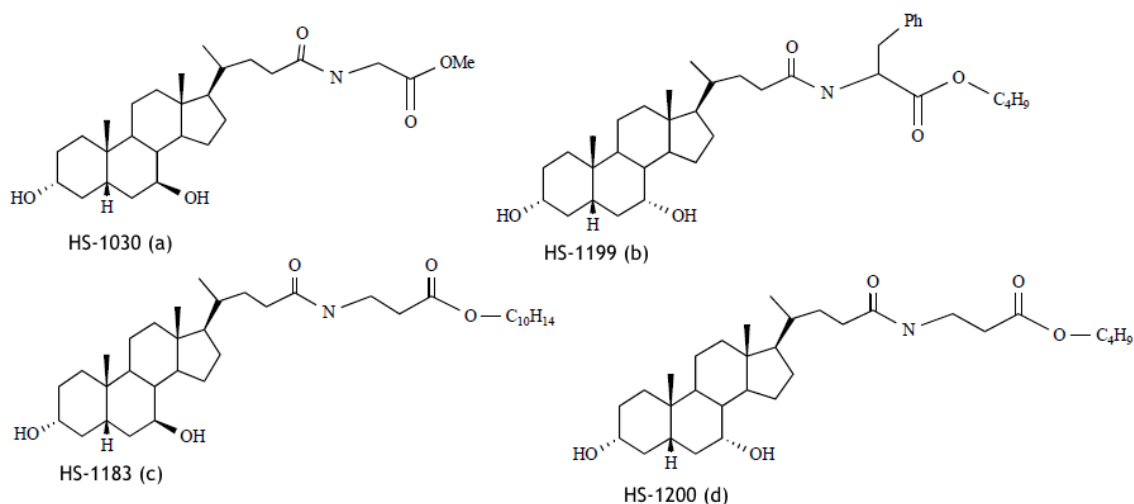


Figura 16. Derivados do ácido ursodesoxicólico (a)(c) e do ácido quenodesoxicólico (b)(c). (Adaptado de<sup>43</sup>).

Outros derivados de ácidos biliares ligados a aminoácidos foram também estudados, como o ácido litocólico e o quenodesoxicólico conjugados com piperazinilcarboxamidas e foram testados em células do glioblastoma multiforme (GMB-12), do mieloma (KMS-11) e do carcinoma do cólon (HCT-116), mostrando inibição de NF-kB e fragmentação do DNA e apoptose das células cancerígenas<sup>64</sup>.

Por outro lado também já foram estudados ácidos biliares combinados com poliaminas, como por exemplo, conjugados com a poliamina 3'-azido-3'-deoxitimidina (AZT), usada já no tratamento do HIV, demonstrando também efeitos na indução da apoptose e inibição do crescimento celular em células cancerígenas do cancro cervical (HeLa) e do cancro renal (786-0). Além disso, os ácidos biliares conjugados podem ser muito úteis no fornecimento de fármacos ao fígado e ao intestino e melhoram a sua absorção intestinal <sup>65</sup>. As poliaminas, por sua vez, regulam também o crescimento celular<sup>66</sup>, interagem com o DNA e modulam a transcrição de genes<sup>67</sup>.

# Capítulo 2 - Justificação do tema e objetivos

Dada a prevalência do cancro na sociedade e da previsão do aumento de casos desta patologia, torna-se importante o desenvolvimento de agentes anticancerígenos promissores no combate a esta patologia<sup>1</sup>.

Como referido anteriormente, vários esteroides, nomeadamente o ácido litocólico, têm capacidade anticancerígena<sup>58,59</sup>. Assim sendo, neste trabalho serão sintetizados compostos derivados do ácido litocólico, utilizando duas estratégias de síntese diferentes, sendo o objectivo final a adição de poliaminas aos derivados obtidos.

Neste âmbito, as células cancerígenas apresentam uma elevada proliferação celular, e um sistema de transporte de poliaminas “*upregulated*” ocorrendo a captação de poliaminas exógenas. Por conseguinte, as células cancerígenas podem acumular poliaminas de forma mais eficaz do que as células normais. Desta forma, a conjugação de compostos antiproliferativos com poliaminas pode ser uma forma de os encaminhar para dentro das células cancerígenas, através do mecanismo de transporte das mesmas<sup>68</sup>. As poliaminas regulam também o crescimento celular<sup>66</sup>, interagem com o DNA e modulam a transcrição de genes<sup>67</sup>, sendo também estruturas promissoras na interação com o G-quadruplex.

## 2.1 Objetivos gerais

O objetivo geral deste trabalho consistiu em preparar e avaliar o efeito de diferentes compostos derivados do ácido litocólico na proliferação de diferentes células cancerígenas, pretendendo-se desenvolver e caracterizar potenciais agentes anticancerígenos com ação no G-quadruplex.

## 2.2 Objetivos específicos

- ✓ Síntese química dos compostos derivados do ácido litocólico, purificação e caracterização estrutural;
- ✓ Avaliação da ação antiproliferativa em linhas celulares cancerígenas humanas, como células do adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP), células epiteliais do adenocarcinoma mamário metastático (MCF-7), células epiteliais do carcinoma ductal da mama (T47D) e células do glioblastoma humano (U87) e em células normais, como fibroblastos da derme humana não cancerígenos (NHDF), através do ensaio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT);

- ✓ Estudos de fluorescência e de localização celular por microscopia de fluorescência;
- ✓ Análise de morte celular e de viabilidade celular através do ensaio de citometria de fluxo com marcação com iodeto de propídio;
- ✓ Interpretação dos resultados obtidos da interação dos compostos sintetizados com o G-quadruplex resultantes do ensaio *fluorescence resonance energy transfer* (FRET).

# Capítulo 3 - Materiais e Métodos

## 3.1 Síntese Química

### 3.1.1 Reagentes e solventes

Para os procedimentos de síntese, os reagentes utilizados foram o ácido litocólico, o borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ), o dietil-eterato de trifluoreto de boro ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ), o sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), o bis(dibenzilidenoacetona) paládio [ $\text{Pd}(\text{dba})_2$ ], a trifenilfosfina, e o *terc*-butóxido de sódio e foram adquiridos à Acros Organics. O anidrido ftálico, o diisopropil azodicarboxilato, o 2-diciclo-hexilfosfino-2'-(*N,N*-dimetilamino)bifenilo (DavePhos), a 8-cloro-2-hidroxiquinolina, a 7-chloro-4-hidroxiquinolina, a 4-dimetilaminopiridina (DMAP), a *N,N'*-díciclohexilcarbodiimida (DCC), o dietilo azodicarboxilato 40% em tolueno (DEAD 40%), o cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ) e as poliaminas utilizadas [tetraetilenopentamina e tris(2-aminoetil)amina], foram adquiridos à Sigma-Aldrich.

Os solventes utilizados nas reações e procedimentos de purificação foram a acetona, a piridina, a tetrahidrofurano (THF), o clorofórmio, diclorometano, o *n*-hexano e o acetato de etilo, que foram adquiridos à Fischer Scientific. O ácido clorídrico (HCl) foi adquirido à Panreac.

### 3.1.2 Equipamentos

As reações foram realizadas em placas de aquecimento e de agitação da marca Heidolph e a evaporação dos solventes foi efectuada com o auxílio de evaporadores rotativos da marca Büchi. Os compostos foram secos em atmosfera de vácuo na estufa Raypa drying oven digit e a monitorização das reações usando a radiação UV 245 nm foi efectuada no leitor CN-15.LC.

Os espectros de infravermelhos (IV) foram obtidos através de um espectrofotómetro Nicolet iS10 da Thermo Scientific, em modo ATR, apresentando-se os dados obtidos destes espectros em frequência máxima, expressa em  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos no espectrómetro Bruker Avance III 400, utilizando as frequências de 400 para os espectros de protão ( $^1\text{H}$ ) e de 100 para os espectros de carbono ( $^{13}\text{C}$ ). O solvente utilizado para dissolver os compostos para o RMN foi o clorofórmio deuterado ou uma mistura de solventes com clorofórmio deuterado e Metanol (proporção v:v). Os dados obtidos nos espetros de RMN de  $^1\text{H}$ - estão indicados pela seguinte ordem: desvio químico,  $\delta$  (ppm), integração, multiplicidade do sinal, constante de acoplamento e indicação do protão que originou o sinal. Os espetros de  $^{13}\text{C}$ -RMN foram realizados com desacoplamento de protão sendo apresentados os desvios químicos observados.

### 3.1.3 Procedimentos de cromatografia

As reações foram monitorizadas e analisadas através da utilização de placas de cromatografia em camada fina (CCF) Kieselgel 60 F254 da Merck. Como já referido, para visualizar as placas cromatográficas foi utilizado um leitor UV a 254nm, que possibilitou a observação dos compostos com absorção UV. Após a leitura UV, a placa cromatográfica é imersa numa solução de revelação composta por uma mistura de etanol e ácido sulfúrico (95:5). De seguida, a placa é submetida a aquecimento (120°C) numa placa de aquecimento e desta forma tornam-se visíveis os potenciais produtos no meio reacional.

A purificação de alguns produtos reacionais foi efectuada através de cromatografia em coluna, utilizando-se sílica gel (0.063-0.200 nm), da Merck, como fase estacionária. Os eluentes utilizados são indicados segundo a proporção v/v no procedimento experimental.

### 3.1.4 Procedimentos experimentais realizados

#### 3.1.4.1 Síntese do 5 $\beta$ -colano-3 $\alpha$ ,24-diol (C1)<sup>69</sup>

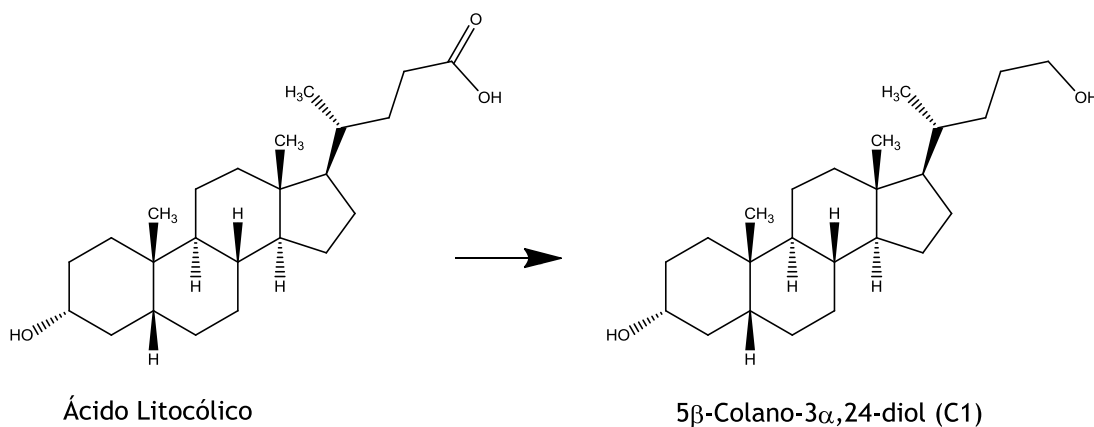


Figura 17. Estrutura do ácido litocólico e do composto C1.

Num balão de 3 tubuladuras de 250 mL, o ácido litocólico (2.65 mmol; 1 g) e o NaBH<sub>4</sub> (20.07 mmol; 0.754 g) foram dissolvidos em THF anidro (30 mL). Seguidamente foi adicionado o BF<sub>3</sub>.Et<sub>2</sub>O (26.64 mmol; 3.286 mL) gota a gota. A reação ocorreu à temperatura ambiente durante 3 horas sob agitação e atmosfera de argón e foi seguida por CCF [eluyente: diclorometano : éter dietílico (1:2, v:v)].

No fim da reação, foi adicionada uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) (50 mL) gota a gota, seguida pela adição de 100 ml de água e realizou-se a extração com diclorometano (250 mL). No final desta, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrada e concentrada com auxílio de um evaporador rotativo, obtendo-se um produto sólido de cor branca, o qual foi seco sob atmosfera de vácuo durante 12 horas.

Após a secagem fez-se a recristalização usando-se acetona, sendo que após a dissolução do produto a quente, filtrou-se e colocou-se a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante a noite. Os cristais obtidos foram recuperados por filtração e secos sob atmosfera de vácuo durante cerca de 12 horas, obtendo-se um produto com um rendimento final de 73,25 % e 1,42 g de massa final.

Após a purificação, o produto (figura 17) foi analisado por  $^1\text{H}$ - e  $^{13}\text{C}$ -RMN:  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm: 0,646 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0,919 (6H, s,  $J=5.62\text{Hz}$   $\text{CH}_3$ -19 e  $\text{CH}_3$ -21), 0,96 - 1,9 (38H, m), 1,95 (1H, m,  $J=12.49$   $\text{CH}_2$ -23), 3.61 (3H, m,  $\text{CH}$ -3 e  $\text{CH}_2$ -24).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm: 12,05, 18,64, 20,84, 23.38, 24,23, 26,44, 27,21, 28,32, 29,44, 30,57, 31,83, 34,58, 35,36, 35,60, 35,86, 36,47, 40,20, 40,45, 42,11, 42,71, 56,18, 56,52, 63,63, 71,90.

### 3.1.4.2 Síntese de 24-(7-cloroquinolinil-4-oxi)-colano-3 $\alpha$ -ol (C2)<sup>70</sup>

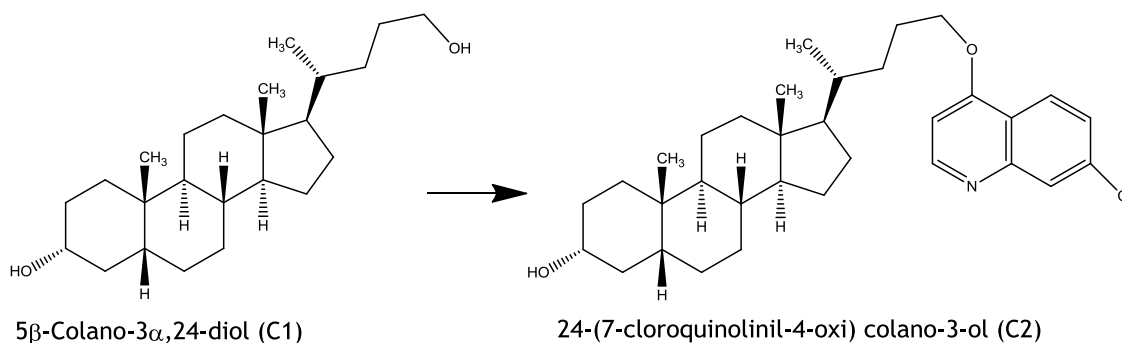


Figura 18. Estrutura do composto C1 e C2.

Num balão de duas tubuladuras de 250 mL, sob árgon, adicionou-se o 5 $\beta$ -colano-3 $\alpha$ ,24-diol (0.778 mmol; 0.284 g), a 7-cloroquinolina-4-ol (0.778 mmol; 0.141 g), a trifetilfosfina (0.778 mmol; 0.205 g), e dissolveu-se em THF (20 mL). Seguidamente, adicionou-se diisopropil azodicarboxilato (0.778 mmol; 153  $\mu\text{L}$ ). A reação ocorreu durante 24 horas à temperatura ambiente. Após as 24 horas adicionou-se 7-cloroquinolina-4-ol (0.26 mmol; 0.047 g), trifetilfosfina (0.26 mmol; 0.068 g) e diisopropil azodicarboxilato (0.26 mmol; 0.052 g). A reação ocorreu durante mais 24 horas à temperatura ambiente e foi seguida por CCF (eluentes: diclorometano : metanol (3:1, v:v) ).

No final da reação, o produto foi transferido para um balão de uma tubuladura e o solvente foi evaporado com o auxílio de um evaporador rotativo e seco sob atmosfera de vácuo.

O produto foi purificado através de cromatografia em coluna usando o eluente diclorometano : metanol (3:1, v:v). Dado que a fração que continha o produto ainda continha óxido de trifetilfosfina, o mesmo foi submetido novamente a purificação por cromatografia em coluna usando o eluente diclorometano : clorofórmio (50:1, v:v).

Após a purificação as frações obtidas foram analisadas por  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -RMN 400 MHz, porém não foi possível identificar o produto (figura 18).

### 3.1.4.3 Síntese do $3\alpha,24$ -di(8-cloroquinolinil-2-oxi)- $5\beta$ -colano (C3) e $24$ -(8-cloroquinolinil-2-oxi)- $5\beta$ -colano- $3\alpha$ -ol (C4)<sup>70</sup>

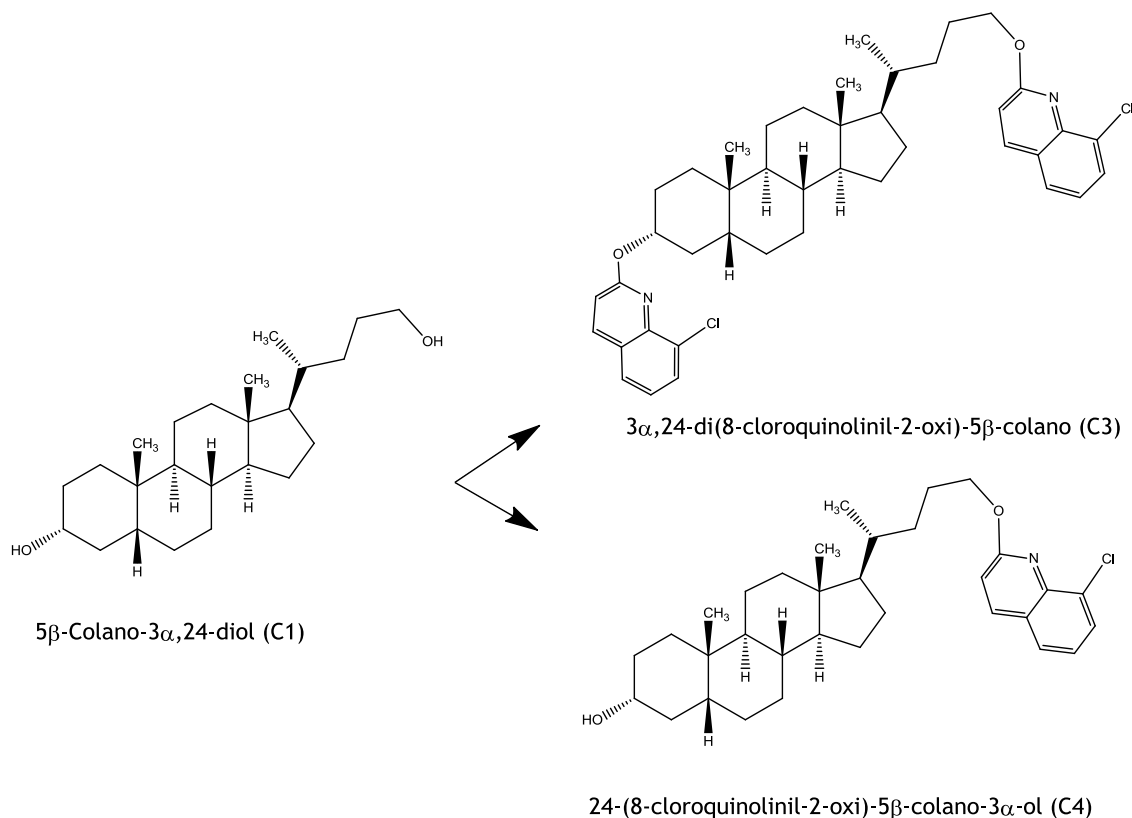


Figura 19. Estrutura dos compostos C1, C2 e C3

Num balão de 100 mL de duas tubuladuras, sob atmosfera de árgon, adicionou-se o  $5\beta$ -colano- $3\alpha,24$ -diol (1.5 mmol; 0.543 g), a 8-cloroquinolina-2-ol (1.5 mmol; 0.2695 g), a trifetilfosfina (1.5 mmol; 0.393 g) 38 mL de THF e, por fim, adicionou-se o DEAD 40% (1.5 mmol; 0.7 mL). A reação decorreu durante 26 horas à temperatura ambiente. Após as 26 horas, adicionou-se novamente 8-cloroquinolin-2-ol (1.5 mmol; 0.2695 g), trifetilfosfina (1.5 mmol; 0.393 g) e DEAD 40% em tolueno (1.5 mmol; 0.7 mL). A reação decorreu à temperatura ambiente durante 26 horas adicionais. Após esse tempo voltou a adicionar-se todos os reagentes adicionados no passo anterior. A reação ocorreu durante mais 26 horas à temperatura ambiente. A reação foi seguida por CCF (eluente: diclorometano).

No final da reação, o produto foi transferido para um balão monotubulado e o solvente foi evaporado com o auxílio de um evaporador rotativo e seco sob atmosfera de vácuo.

O produto foi purificado por cromatografia em coluna usando-se diclorometano como eluente, obtendo-se dois produtos (figura 19): 3 $\alpha$ ,24-di(8-cloroquinolinil-2-oxi)-5 $\beta$ -colano (566 mg, 55%) e 24-(8-cloroquinolinil-2-oxi)-5 $\beta$ -colano-3 $\alpha$ -ol (217 mg, 27,6%).

Após a purificação, o produto 3 $\alpha$ ,24-di(8-cloroquinolinil-2-oxi)-5 $\beta$ -colano (C3) foi analisado por  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -RMN:

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm: 0,54 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0,86 (6H, m,  $\text{CH}_3$ -19 e  $\text{CH}_3$ -21), 0,89 - 1,9 (29H,m), 1,97 (1H, t,  $J=14,16$ ,  $\text{CH}_2=23$ ), 4,42 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -24), 5,61 (1H, s, CH-3), 6,78 (2H, dd,  $J=9,014$ , CH-33 e CH-33'), 7,07 (2H, m, CH-29 e CH-29'), 7,41 (2H, m,  $J=8,49$ , CH-28 e CH-28'), 7,56 (2H, m, CH-30 e CH-30'), 7,76 (2H, m, CH-32 e CH-32').

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm: 11,03, 17,65, 20,07, 22,86, 23,18, 23,62, 24,37, 25,18, 25,58, 27,24, 29,38, 29,88, 31,13, 33,90, 34,49, 34,63, 36,41, 38,90, 39,19, 41,67, 55,05, 55,54, 65,87, 70,83, 112,99, 113,59, 122,34, 122,55, 125,15, 125,21, 128,33, 128,46 130,19, 130,26, 136,04, 136,15, 137, 62, 137,76, 141,86, 141,93, 160,93, 161,49.

Após a purificação o produto 24-(8-cloroquinolinil-2-oxi)-5 $\beta$ -colano-3 $\alpha$ -ol (C4) foi analisado por  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -RMN:

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm: 0,66 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0,919 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -19), 0,972 (3H, d,  $J=6,76$  Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 0,98 - 1,95 (32H, m), 1,98 (1H, m,  $J=11,96$ Hz  $\text{CH}_2$ -23), 3,62 (1H, m, CH-3), 4,53 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -24), 6,94 (1H, d,  $J=8,48$  Hz, CH-33), 7,26 (1H, dd, CH-29),), 7,62 (1H, d,  $J=8,26$  Hz, CH-28), 7,72 (1H, d,  $J=7,18$  Hz CH-30) 7,97 (1H, d,  $J=8,9$  Hz, CH-32).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm: 12,06, 18,68, 20,84, 23,39, 24,25, 25,43, 26,45, 27,22, 28,28, 30,59, 32,18, 34,59, 35,36, 35,55, 35,88, 36,47, 40,21, 40,46, 42,13, 42,73, 56,15, 56,53, 66,96, 71,91, 114,13, 123,67, 126,2, 126,32, 129,57, 131,34, 138,89,162,64.

#### 3.1.4.4 Síntese do Composto 5 (C5)<sup>70</sup>

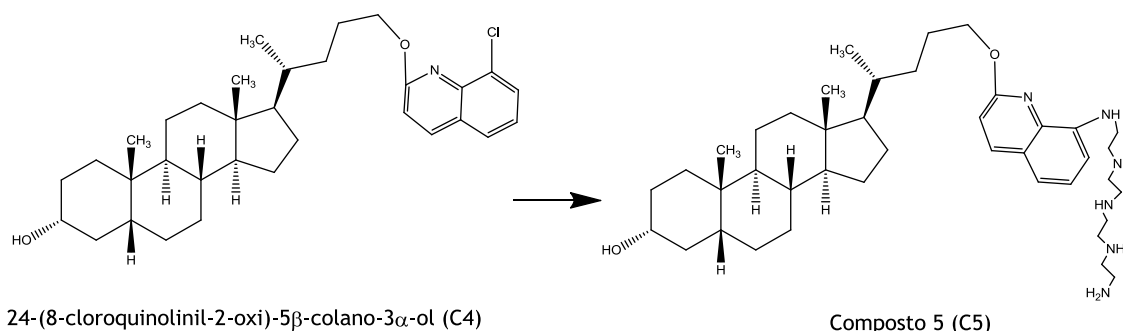


Figura 20. Estrutura dos compostos C4 e C5

Num balão de 100 mL de duas tubuladuras em atmosfera de árgon, adicionou-se o composto C4 (0.15 mmol; 0.07863 g), Pd(dba)<sub>2</sub> (16 mol%; 0.01380 g) e DavePhos (18 mol%; 0.01063 g). Previamente, a amina tetraetilenopentamina (0.3 mmol; 57 µl) e o *terc*-butóxido de sódio (0.47 mmol; 0.04497 g) foram dissolvidos em aproximadamente 3 mL de dioxano anidro, que foram depois adicionados à mistura reacional bem como mais 9mL de dioxano anidro. A reação decorreu em refluxo por aproximadamente 25-30h e foi seguida por CCF (eluente: diclorometano).

Após o término da reação, o conteúdo foi transferido para um balão de uma tubuladura de 100 mL e evaporou-se o solvente com o auxílio de um evaporador rotativo.

Na purificação do produto utilizou-se uma solução de tolueno (20 mL) com dois equivalentes de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), colocando-se sob agitação a solução, ocorrendo a formação de um produto sólido acastanhado. Após a filtração a vácuo, concentrou-se para metade o solvente com o auxílio de um evaporador rotativo. Ao fim de 24 horas filtrou-se novamente a vácuo o precipitado e concentrou-se o produto através do evaporador rotativo<sup>71</sup>. Obteve-se um produto com um rendimento final de 58% e 60,9 mg de massa final.

Após a purificação, o produto (Figura 20) foi analisado por IV, <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-RMN:

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 0,65 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 0,917 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19), 0,973 (3H, d, J=6,12 Hz, CH<sub>3</sub>-21), 0,98 - 1,95 (34H, m), 1,98 (1H, m, J=12,00 Hz CH<sub>2</sub>-23), 2,5 (1H, s) 3.62 (1H, m, CH-3), 4,53 (2H, m, CH<sub>2</sub>-24), 6,94 (1H, d, J=9,29 Hz, CH-33), 7,26 (1H, dd, CH-29), 7,62 (1H, d, J=8,12 Hz, CH-28), 7,72 (1H, d, J=6,96 Hz CH-30) 7,97 (1H, d, J=8,51 Hz, CH-32).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 12,06, 18,68, 20,84, 23,39, 24,25, 25,43, 26,44, 27,22, 28,28, 30,57, 32,18, 34,59, 35,37, 35,55, 35,87, 36,48, 40,20, 40,45, 42,13, 42,72, 43,98, 56,14, 56,52, 66,95, 71,89, 114,12, 123,66, 16,17, 126,31, 129,57, 131,34, 138,89, 142,96, 162,54.

Análise IV cm<sup>-1</sup>: 3324,51, 2927,27, 2856,82, 1614,26, 1603,64, 1498,55, 1462,77, 1446,94, 1426,60, 1366,68, 1328,11, 1260,80, 1201,05, 1120,91, 1088,50, 1067,60, 1011,89

### 3.1.4.5 Síntese do Composto 6 (C6)<sup>70</sup>

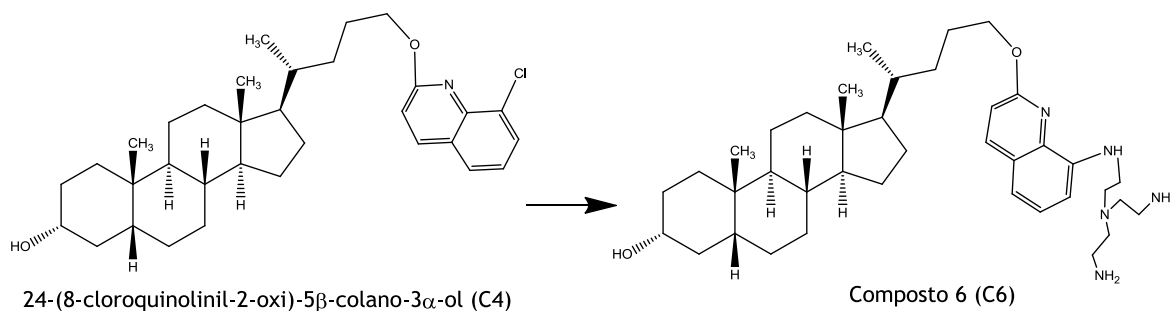


Figura 21. Estrutura dos compostos C4 e C6

O procedimento para obtenção do composto C6 foi o mesmo descrito na secção 3.1.4.4, sendo que neste caso se adicionou a amina tris(2-aminoetil)amina (0.3 mmol; 45 µl). A reação foi seguida por CCF (eluente: diclorometano).

O produto foi purificado envolvendo da precipitação com dioxano durante 48 horas. Obteve-se um produto com um rendimento final de 48% e 54.60 mg de massa final.

Após a purificação, o produto (figura 21) foi analisado por IV, <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-RMN:

<sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 0,65 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 0,917 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19), 0,973 (3H, d, J=6,12 Hz, CH<sub>3</sub>-21), 0,98 - 1,95 (34H, m), 1,98 (1H, m, j=17,11 Hz CH<sub>2</sub>-23), 2,5 (1H, s), 3.66 (13H, m, ), 4,53 (2H, m, CH<sub>2</sub>-24), 6,87 (1H, m, CH-33), 7,00 (1H, m, CH-29), 7,27 (1H,d), 7,34 (1H, m) 7,47 (1H, m), 7,65 (1H, m, CH-28), 7,82 (1H, d, J=9,00 Hz, CH-30), 7,96 (1H, d, J=9,91 Hz, CH-32).

<sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) ppm: 12,08, 14,12, 18,62, 20,84, 23,39, 24,25, 25,61, 26,44, 27,21, 28,28, 29,70, 30,58, 34,59, 35,36, 35,61, 35,87, 36,49, 40,22, 40,46, 42,12, 42,73, 56,21, 56,53, 66,48, 71,89, 113,33, 123,81, 127,20, 127,39, 129,37, 139,55.

Análise IV cm<sup>-1</sup>: 3324,74, 2923,86, 2854,96, 1667,12, 1616,09, 1605,09, 1581,24, 1522,83, 1488,07, 1431,31, 1376,08, 1352,53, 1309,19, 1259,45, 1110,84, 1067,57, 1039,61, 1011,86

### 3.1.4.6 Síntese do Composto (C7) (Adaptado de <sup>72</sup>)

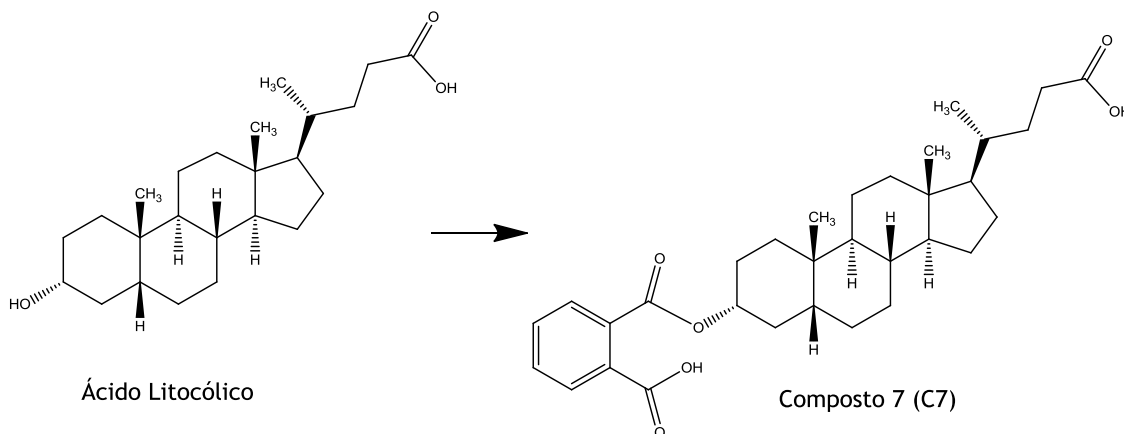


Figura 22. Estrutura do ácido litocólico e do composto C7

Num balão de duas tubuladuras de 100 mL dissolveu-se o ácido litocólico (1.38 mmol; 0.520 g) em piridina (1.38 mmol; 20 mL). Seguidamente, adicionou-se o anidrido ftálico (4.14 mmol; 0.613 g) e a DMAP (1.38 mmol; 0.168 g). A solução resultante foi colocada em refluxo e sob agitação magnética durante aproximadamente 19 horas. A reação foi seguida por CCF [eluente: éter de petróleo: acetato etilo 4:1 (v/v)].

Após a paragem da reação transferiu-se o conteúdo para um balão de uma tubuladura de 100 ml e a piridina foi evaporada com o auxílio de um evaporador rotativo. De seguida dissolveu-se o resíduo com acetato de etilo (30 mL) e transferiu-se para uma ampola de decantação. Ao conteúdo da ampola adicionou-se mais 50 ml de acetato de etilo e 20ml de sol. aq. de HCl 10%. Seguidamente, a fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (30 mL) tendo-se repetido este procedimento mais duas vezes. A fase orgânica reunida foi novamente lavada com mais 20mL de sol. aq. de HCl 10%. Por fim, procedeu-se à secagem da fase orgânica com sulfato de sódio anidro e posterior filtração e evaporação do solvente com auxílio de um evaporador rotativo. O produto foi seco sob atmosfera de vácuo por 12 horas, tendo-se obtido um rendimento final de 89% e 650 mg de massa final.

O produto (figura 22) foi analisado por <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C-RMN:

<sup>1</sup>H RMN [CDCl<sub>3</sub>- MeOH 50:50 (v:v), 400 MHz] ppm: 0,67 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 0,94 (3H, d, J=6.30 Hz CH<sub>3</sub>-21), 0,98 (3H, s, CH<sub>3</sub>-19), 1,02 - 2,08 (28H, m), 2,27 (2H, m, CH<sub>2</sub>-23), 4,96 (1H, m, CH-3), 7,57 (3H, m, CH-27, CH-28, CH-29), 7,66 (1H, m, CH-30), 7,78 (1H, m, CH-32)

<sup>13</sup>C RMN [CDCl<sub>3</sub>- MeOH 50:50 (v:v), 400 MHz] ppm: 12,30, 18,51, 21,34, 23,61, 24,62, 26,80, 27,53, 28,61, 31,55, 32,42, 35,13, 35,53, 35,92, 36,37, 40,64, 40,98, 42,62, 43,23, 56,58, 56,98, 76,84, 128,91, 129,59, 131,21, 131,65, 132,44, 133,65, 168,97, 177,68.

### 3.1.4.7 Síntese do Composto 8 (C8)

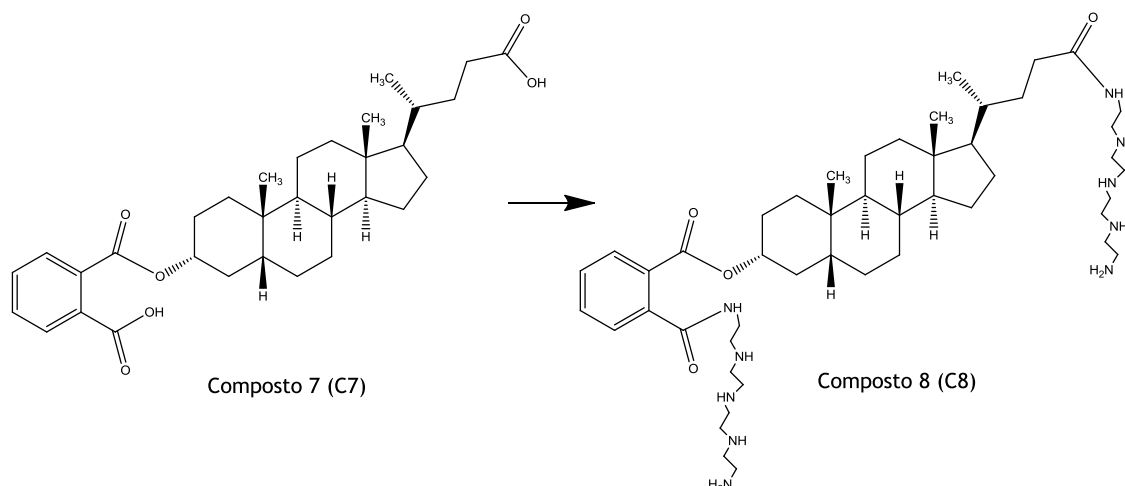


Figura 23. Estrutura dos compostos C7 e C8

Num balão de duas tubuladuras de 100 mL dissolveu-se o composto C7 (0.25 mmol; 0.1312 g) em 5 mL de THF. Posteriormente dissolveu-se a DMAP (0.15 mmol; 0.0183 g) em 2 mL de THF e adicionou-se esta mistura, gota a gota, ao balão de reação. Após 10 minutos, adicionou-se, gota a gota, o DCC (0.50 mmol; 0.1032 g) dissolvido previamente em 2 mL de THF. Após 15 minutos adicionou-se, gota a gota, a tetraetilenopentamina (0.5 mmol; 95  $\mu$ l) previamente dissolvida em 2 mL de THF. A reação decorreu sob refluxo durante 26 horas e foi seguida por CCF [eluente: acetato de etilo: hexano (4:1; v/v)].

Após o término da reação foi transferido o conteúdo um balão de uma tubuladura de 50 mL e evaporou-se o solvente com o auxílio de um evaporador rotativo. O resíduo obtido foi seco em atmosfera de vácuo.

O produto foi purificado através de cromatografia em coluna usando como eluente a mistura de solventes acetato de etilo : hexano (4:1, v:v). Dado que, a fração obtida ainda continha o subproduto DCU o composto foi submetido novamente a purificação por cromatografia em coluna usando o eluente: acetato de etilo : hexano (1:1, v:v), obtendo-se o produto com um rendimento final de 14% e 24.3 mg de massa final.

Após a purificação o produto (figura 23) foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -RMN:

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm: 0, 0,65 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0,93 (6H, m,  $\text{CH}_3$ -21 e  $\text{CH}_3$ -19), 1,02 - 2,08 (161H, m), 2,40 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -23), 3,47 (9H, m,  $\text{CH}_2$ ), 4,04 (7H, s, CH-3 e  $\text{CH}_2$ ).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm: 53,68, 55,27, 55,71, 124,14, 124,511, 125,07, 128,65, 129,03, 131,67, 138,04, 171,88, 172,31.

Análise IV  $\text{cm}^{-1}$ : 3321,89, 2926,71, 2849,43, 1624,54, 1568,24, 1448,12, 1374,71, 1309,54, 1270,72, 1249,19, 1228,16, 1185,57.

### 3.1.4.8 Síntese do Composto 9 (C9)

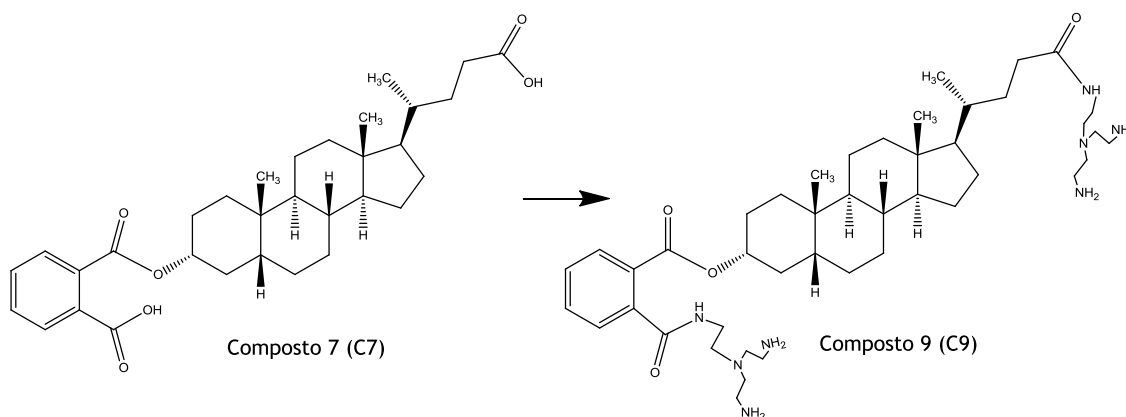


Figura 24. Estrutura dos compostos C7 e C9

O procedimento para obtenção do composto C9 é similar ao descrito na secção 3.1.4.7. Neste caso, adicionou-se a amina tris(2-aminoetil)amina (0.5 mmol; 75  $\mu\text{l}$ ). A reação foi seguida por CCF [eluente: acetato de etilo : hexano (4:1; v/v)].

O produto foi purificado através de cromatografia em coluna usando como eluente: acetato de etilo : hexano (4:1, v:v) e obteve-se um rendimento final de 15% e 29,6 mg de massa final. Após a purificação, o produto (figura 24) foi analisado por IV,  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ -RMN:

$^1\text{H}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm: 0,65 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0,91 (6H, m,  $\text{CH}_3$ -21 e  $\text{CH}_3$ -19), 0,99 - 2,08 (99H, m), 2,40 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -23), 3,47 (4H, m,  $\text{CH}_2$ ), 3,66 (3H, m), 3,87 (1H, m) 4,17 (4H, m) 7,5 (1H, m, CH).

$^{13}\text{C}$  RMN ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz) ppm: 38,55, 42,10, 42,74, 53,52, 56,03,125,51, 135,80, 157,01, 170,29, 178,63.

Análise IV  $\text{cm}^{-1}$ : 3324,23, 2926,22, 2849,38, 1626,02, 1603,13, 1569,07, 1537,76, 1435,80, 1376,54, 1309,90, 1270,31, 1243,10, 1227,42, 1157,78, 1087,16, 1045,66.

## 3.2 Avaliação biológica

### 3.2.1 Materiais

Para o ensaio com células, o meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) e meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) foram adquiridos à Sigma Aldrich. O Soro Fetal Bovino (SFB) foi adquirido à Biochrom AG. Os antibióticos Ab (solução com 10,000 unidades/ml de penicilina, 10 mg/ml de estreptomicina e 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de anfotericina-B) e SP

(solução com 10,000 unidades de penicilina e 10mg/ml de estreptomicina) e a tripsina (1 g de tripsina para 666 ml de PBS/EDTA), o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT), o dimetilsulfóxido (DMSO) a L-Glutamina, o HEPES, o piruvato de sódio foram igualmente todos adquiridos à Sigma Aldrich. O corante azul de triptano (0,4%) foi adquirido à Merck e o bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) à Panreac.

Para o ensaio de microscopia de fluorescência, a sonda Hoechst 33342 foi adquirida à Invitrogen. A poli-D-lisina e o paraformaldeído (PFA) foram adquiridos à Sigma Aldrich e o tampão borato à GE Healthcare.

### 3.2.2 Equipamentos

Os equipamentos usados ao longo deste trabalho foram; a câmara de fluxo laminar vertical NuAire, de Classell, para realizar a maior parte do trabalho experimental em condições de assepsia; a incubadora Nuair DHD Autoflow CO<sub>2</sub> Air-Jacketed, para manter as células a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>; a centrífuga Bioblock Scientific (Sigma-3K18C), para separação das células e do meio em que se encontram; o microscópio ótico Olympus CKX 40/41, para observação das células; o banho de aquecimento Fisher Scientific, para aquecimento dos meios de cultura; o leitor de placas Bio-rad xmark *spectrophotometer*, para quantificar a absorvância dos cristais de formazano no ensaio de MTT; o espectrofotómetro Thermo Scientific Evolution 201/220 UV-Vis para determinação do comprimento de onda de excitação dos compostos; o fluorímetro Perkin Elmer Precisely luminiscence Spectrometer model LS 45 para determinação dos comprimentos de onda de emissão dos compostos; e o microscópio invertido AxioObserver, Zeiss para realização dos ensaios de fluorescência. Para o ensaio de citometria de fluxo foi utilizado o citometro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, BD) e por fim para a realização do ensaio *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) foi utilizado o Stratagene Mx3005P.

### 3.2.3 Linhas celulares

Para a realização dos estudos de avaliação biológica utilizaram-se cinco linhas celulares distintas, que incluíram fibroblastos da derme humana não cancerígenos (NHDF), células de adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP), células epiteliais de adenocarcinoma mamário metastático (MCF-7), células epiteliais de carcinoma ductal da mama (T47D) e células de glioblastoma humano (U87).

Estas células foram geralmente cultivadas em frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> e incubadas a 37°C sob atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. A substituição do meio de cultura foi realizada a cada 2 a 3 dias e as células foram tripsinizadas e expandidas para novos frascos de cultura, quando a confluência das mesmas era alcançada.

### 3.2.3.1 NHDF

As células NHDF (*Normal Human Dermal Fibroblasts*) são fibroblastos saudáveis da derme humana adulta. As NHDF são células aderentes que expressam recetores de estrogénios<sup>73</sup>. Estas células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-Glutamina, 10 mM de HEPES, 1mM de piruvato de sódio e 1% de antibiótico/antimicótico Ab) a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.3.2 LNCaP

As células LNCaP (*Lymph node carcinoma of the prostate*) são uma linha celular do adenocarcinoma da próstata sensível a androgénios. Estas células foram isoladas em 1977, a partir de uma metástase num nódulo linfático de um homem caucasiano de 50 anos. As células LNCaP são aderentes e podem crescer de forma isolada ou sob a forma de agregados<sup>74,75</sup>. Estas células foram mantidas em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico SP.

### 3.2.3.3 MCF-7

As células MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*) são células epiteliais obtidas a partir da efusão pleural de uma mulher caucasiana com 69 anos que apresentava adenocarcinoma mamário metastático. O seu acrónimo diz respeito ao local onde foi feita pela primeira vez o seu isolamento. As MCF-7 são células aderentes, sensíveis a estrogénios e crescem em monocamada<sup>76</sup>. Estas células foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico Ab.

### 3.2.3.4 T-47D

As células T-47D são células epiteliais isoladas a partir de uma efusão pleural de uma mulher caucasiana com 54 anos que apresentava carcinoma ductal da mama. Estas células apresentam capacidade aderente, expressam recetores de estrogénios de progestagénios, de glucocorticoides e de androgénios e formam monocamada em cultura<sup>77,78</sup>. As células foram mantidas com meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico SP.

### 3.2.3.5 U87

As células U87 são célula epiteliais do glioblastoma humano obtidas a partir de um homem caucasiano de 44 anos. Estas células são aderentes e podem crescer em forma de neuroesferas ou de forma isolada<sup>73</sup>. As células foram mantidas com meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico Ab.

## 3.2.4 Técnicas de Cultura Celular

### 3.2.4.1 Preparação dos meios de cultura

Os meios de cultura indicados para cada linha celular foram referidos na secção 3.2.3. Os meios de cultura foram preparados com água MiliQ e o seu pH foi ajustado usando o potenciómetro para medir e soluções 1M de HCl e NaH para ajustar, sendo 7,4 para o meio de cultura DMEM e 7,2 para o meio de cultura RPMI. Considera-se o meio de cultura completo aquele que é suplementado com SFB e meio de cultura incompleto o meio sem a adição de SFB.

Após a preparação, cada um dos meios foi esterilizado por filtração com o auxílio do sistema de vácuo ligado à câmara de fluxo laminar e, seguidamente, foi identificado e datado. Os mesmos foram armazenados a uma temperatura de 4 a 8°C, em frigorífico. Para utilização dos meios de cultura nas linhas celulares, foi realizado um aquecimento prévio num banho de água a 37°C.

### 3.2.4.2 Congelamento e Descongelamento de células

Para conservar as células por longos períodos de tempo é necessário armazená-las na presença de um reagente crioprotetor (Ex: DMSO) em azoto líquido (-180°C).

Este procedimento permite que as células sobrevivam por um período de tempo de cerca de 3 anos. Para tal, quando as células apresentavam confluência quase completa, aplicou-se o processo de tripsinização. Depois de uma etapa de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi ressuscitado num volume adequado de meio de cultura completo com 10% de DMSO. A suspensão final foi dividida por tubos de criopreservação (1 ml por cada tubo), que foram colocados a -20°C por 4 horas, transferidos para -80°C por 1 a 3 dias e, por fim, armazenados a -180°C em azoto líquido.

As linhas celulares usadas ao longo deste trabalho estavam armazenadas em bancos de células em azoto líquido. O conteúdo do tubo de criopreservação foi descongelado à temperatura ambiente. Seguidamente, adicionou-se 3 ml de meio completo, previamente aquecido, a cada falcon, juntamente com o conteúdo da alíquota de criopreservação. Depois procedeu-se à centrifugação a 1000 rpm, durante 8 minutos. O sobrenadante foi descartado com o objetivo de remover o meio com DMSO e o *pellet* foi ressuscitado em meio completo. Por fim, transferiu-se a suspensão celular para um frasco de cultura de 75 cm<sup>2</sup>, e adicionou-se 15 ml de meio de cultura adequado para cada tipo celular. As células foram mantidas a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.2.4.3 Tripsinização

Ao longo do tempo, as células foram ficando confluentes nos frascos de cultura. Após atingirem a sua fase exponencial de crescimento, isto é, cerca de 70% a 90% de confluência, recorreu-se à sua tripsinização. A avaliação da confluência das células foi efetuada por observação microscópica.

O processo de tripsinização consistiu na aspiração do meio de cultura, que se encontrava no frasco. Seguidamente lavou-se as células com 10 mL de tampão fosfato salino (PBS) (90% água miliQ e 10% PBS 10x), e após a aspiração deste, adicionou-se 3 mL de tripsina. As células foram colocadas em contacto com a tripsina durante 3 minutos na incubadora, para que as células aderidas se soltassem e dissociassem. Após este tempo de incubação observou-se as células ao microscópio para confirmação da formação da suspensão celular. A neutralização da acção da tripsina foi feita através da adição de meio de cultura completo. A suspensão resultante foi transferida para um tubo falcon e centrifugada a 1000 rpm durante 8 minutos. De seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado com meio de cultura completo. A suspensão celular foi colocada em novos frascos de cultura, ou utilizada para contagem e sementeira para realização de um ensaio.

### 3.2.4.5 Contagem e sementeira celular

A suspensão celular resultante do passo da tripsinização permite semear as células com o objetivo de realizar ensaios. Contudo, é necessário proceder à contagem do número de células para que estas possam ser semeadas na densidade adequada. Desta forma, retiraram-se 10 µl de suspensão celular e adicionou-se 10 µl de solução de azul de tripano 0,4% num tubo *eppendorf*. O conteúdo resultante foi aplicado numa câmara de *Neubauer*, procedendo-se à contabilização do número de células em cada quadrante. Para o cálculo do volume a retirar da suspensão celular em estudo foi necessário calcular a média de células existentes por quadrante e multiplicar-se o valor obtido por 2 (devido à diluição das células pela adição da solução de azul de tripano). Aplicou-se a fórmula de *Neubauer* para saber a concentração inicial de células para de seguida fazer a diluição adequada.

No presente estudo, foram preparadas placas *multiwells* de 48 poços e preparou-se uma suspensão celular de  $2 \times 10^4$  células/mL. Esta suspensão foi colocada em 35 poços da placa (250 µl), tendo-se colocado somente meio nos restantes 13, posicionados na periferia superior e esquerda da placa. A periferia esquerda constitui os zeros do ensaio. A placa foi incubada durante 48 horas, a fim de favorecer a aderência e o crescimento celular antes de proceder à aplicação dos compostos.

### 3.2.5 Ensaio de viabilidade celular

#### 3.2.5.1 Preparação e incubação dos compostos

Para realizar o estudo de viabilidade celular, foram preparadas soluções mãe (10 mM) dos compostos, C1, C3, C4, C7, C8, C9 em DMSO.

As células foram incubadas com os compostos nas placas *multiwells* durante 48 horas, num primeiro ensaio a uma concentração de 30  $\mu\text{M}$ , para avaliar o seu efeito na viabilidade celular. Para isso, os compostos foram então previamente diluídos no respetivo meio de cultura adequado para cada tipo de células, sendo a concentração final de DMSO 0,3%, verificando-se que esta concentração de DMSO não provoca efeito relevante na viabilidade celular.

Assim, após a observação das células ao microscópio, foi removido o meio de cultura e adicionadas as soluções dos compostos aos poços (n=5). A placa continha o “zero” (apenas meio de cultura, sem células nem compostos), o controlo negativo (apenas células), e os compostos aplicados e uma última coluna destinada ao DMSO, para analisar também a sua influência nas células. As células foram incubadas com os compostos por 72 horas. Posteriormente, realizou-se o ensaio MTT para avaliar a viabilidade celular.

Após este ensaio os compostos mais relevantes foram selecionados para o ensaio de determinação do  $\text{IC}_{50}$  (concentração de composto que inibe 50% do crescimento celular). Por conseguinte, a partir das soluções mãe preparadas anteriormente foram preparadas seis soluções diluídas no respetivo meio de cultura com as concentrações de 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , e 100  $\mu\text{M}$  (Figura 25). Após a sementeira e sua aderência e crescimento durante 48 horas foram aplicadas estas soluções às células. Seguidamente, a placa foi novamente incubada durante 72 horas. Posteriormente, realizou-se o ensaio MTT para avaliar a viabilidade celular a estas diferentes concentrações de composto.

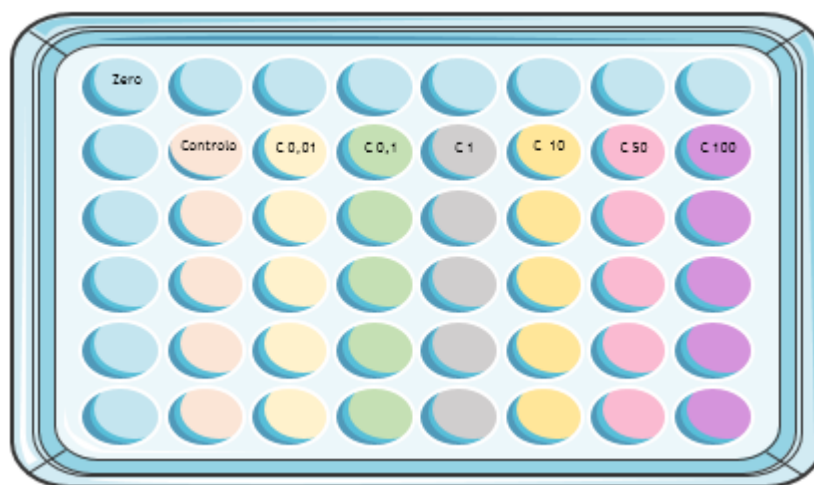


Figura 25. Esquema representativo das microplacas para o ensaio de curva dose-resposta, com uma gama de diferentes concentrações ( $\mu\text{M}$ ). Foram realizados ensaios com n=5, para todas as concentrações.

### 3.2.5.2 Ensaio MTT

O teste MTT é um ensaio colorimétrico utilizado para a medição da citotoxicidade e proliferação celular *in vitro*. Este ensaio baseia-se na capacidade que as células viáveis têm de reduzir o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a cristais de formazano (de cor azul-arroxeadado) através da enzima mitocondrial succinato-desidrogenase, existente no interior de células viáveis. O ensaio MTT depende do número de células presentes e da atividade mitocondrial, sendo a quantidade de formazano produzida considerada proporcional ao número de células viáveis<sup>79</sup>.

Deste modo, ao fim do tempo de incubação com os compostos a avaliar, procedeu-se à aspiração cuidadosa do sobrenadante de cada poço, lavagem com PBS, e no fim acrescentou-se, na ausência de luz, 250 µL da solução de MTT (5 mg/mL em PBS) dissolvida em meio de cultura incompleto, que permaneceu durante um período de 4 horas em contacto com as células, numa atmosfera de 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após o tempo de incubação, aspirou-se cuidadosamente o sobrenadante existente nos poços das placas e adicionou-se 250 µL de DMSO para solubilizar os cristais de formazano obtendo-se uma solução de cor roxa. Seguidamente, quantificou-se a absorvância a 570 nm num leitor espectrofotométrico. A intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazano formados, sendo que, como referido, a absorvância está relacionada com o número de células viáveis no final do ensaio. No fim do ensaio, as placas são descartadas no contentor dos resíduos químicos.

### 3.2.6 Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência foi realizada com o intuito de se concluir que o composto se co-localizava no núcleo. Para a realização da microscopia de fluorescência foram traçados os espectros de excitação e de emissão dos compostos C3, C4 e C7.

Primeiramente, foram colocadas lamelas nas placas *multiwells* e depois estas foram revestidas com solução de poli-*D*-lisina em tampão borato (250 µL em cada poço). O revestimento das placas passou pela adição da solução de poli-*D*-lisina a cada poço durante pelo menos 2h30m a 37°C. Seguidamente recolheu-se o excesso de solução e realizou-se três lavagens com água estéril. Por fim, para garantir toda a esterilidade do processo, as placas foram submetidas à luz UV por 15 minutos. As placas foram armazenadas a 4°C.

Após a tripsinização das células U87, estas foram incubadas numa placa *multiwell* por 24 horas a uma concentração de 3x10<sup>4</sup> células/ml. Após esse período de tempo, as células foram incubadas com os compostos C3, C4 e C7 a 30 µM durante 1 hora e 6 horas.

Seguidamente fixou-se as células com PFA 4% durante 10 minutos. Após esse tempo, removeu-se o PFA e lavou-se com PBS. Na ausência de luz, adicionou-se o marcador nuclear *Hoechst* 33342 a 1 $\mu$ M (preparado em PBS-Tween 1%) e incubou-se durante 10 minutos. Depois, aspirou-se a solução e lavou-se os poços três vezes com PBS. Seguidamente, procedeu-se à montagem das lâminas com *entellan*. Neste processo, colocaram-se algumas gotas de PBS nas lamelas para que estas não secassem nos poços durante a montagem. As lâminas foram analisadas no microscópio AxioObserver Zeiss e o *software* utilizado foi o AxioVision Rel (versão 4.8.1). Usou-se o laser que opera a 405nm de excitação para o filtro azul (*Hoechst* 33342).

### 3.2.7 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é um método utilizado para avaliar a morte celular e a viabilidade celular. Neste estudo, o objetivo foi a análise da viabilidade celular por marcação com iodeto de propídio (IP). Para o procedimento da citometria de fluxo utilizou-se a linha celular MCF-7 e o composto C8 foi selecionado para o estudo, de acordo com o seu resultado citotóxico positivo no ensaio MTT. As células foram semeadas em caixas de 6 *wells*, durante 48 horas, numa densidade de 3x10<sup>4</sup> células/mL num volume de trabalho de 3mL. Após este tempo foi colocado o composto nas concentrações de 15 $\mu$ M e incubadas durante 24 horas. Como controlo negativo utilizou-se células não tratadas e como controlo positivo o composto 5-flourouracilo a 50 $\mu$ M.

Após as 24 horas de incubação do composto, os sobrenadantes de cada poço foram recolhidos para diferentes falcons de 15mL, de seguida lavou-se cada poço com 2mL de PBS, recolheu-se depois para os falcons com os sobrenadantes correspondente do poço e manteve-se em gelo. Entretanto procedeu-se à tripsinização das células com 700  $\mu$ l de tripsina e incubou-se por 5 minutos e, seguidamente, adicionou-se 700  $\mu$ l de meio frio. Por fim, obteve-se uma suspensão de células que foram colocadas nos respetivos falcons contendo já o sobrenadante anterior. De seguida, centrifugou-se durante 5 minutos a 250G, aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 400  $\mu$ l de meio frio.

Da suspensão celular resultante transferiu-se 395  $\mu$ L para tubos de citometria de 5mL, seguindo-se da adição do marcador iodeto de propídio (5  $\mu$ l). Os tubos foram ligeiramente agitados, mantidos no escuro e em gelo. Posteriormente, realizou-se a aquisição de dados no citómetro de fluxo, até um total de 10.000 eventos, para tal utilizou-se *software* BD CellQuest Pro para a aquisição, e também para a análise de dados.

Para determinar a percentagem de células viáveis e mortas foi necessário determinar e definir inicialmente três regiões para excluir “debris”. A análise da marcação por iodeto de propídio foi efetuada em *dot plots*, apresentando apenas eventos contidos nas regiões R2 e R3, por definição de quadrantes

### 3.2.8 Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

O ensaio para avaliar a interação dos compostos com o G-quadruplex foi o *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), realizado com a colaboração do grupo liderado pelo Dr. Jean-Louis Mergny, do laboratório IECB no INSERM em França.

O procedimento experimental foi de acordo com o descrito na literatura<sup>80</sup>, e foi utilizado o equipamento Stratagene Mx3005P com comprimentos de excitação e de emissão de 492nm e 516 nm, respetivamente, e placas de 96 wells para a realização do ensaio. Primeiro foi feita uma incubação inicial de 5 minutos a 5°C, a cada minuto foi aumentada a temperatura 1°C até alcançar os 95°C. As amostras continham 0,2 mM de oligonucleótido, 10mM de cacodilato de lítio e concentrações indicadas de KCl, LiCl e NaCl (para uma concentração de sal total de 100mM). Para as medições na presença de um ligando a concentração do mesmo foi entre 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M, cada experiencia foi testada em duplicado em pelo menos três placas distintas.

### 3.2.9 Análise estatística

Os resultados gráficos provenientes do ensaio de MTT foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão. A comparação entre os múltiplos grupos foi analisada pelo teste *t-Student* para determinar a existência de diferenças significativas entre as médias. Esta diferença foi considerada estatisticamente significativa quando  $p < 0,05$ . Os valores de IC<sub>50</sub> indicados foram calculados a partir da curva dose-resposta por cálculos de ajustamento sigmóide.

# Capítulo 4 - Resultados e Discussão

## 4.1 Síntese Química

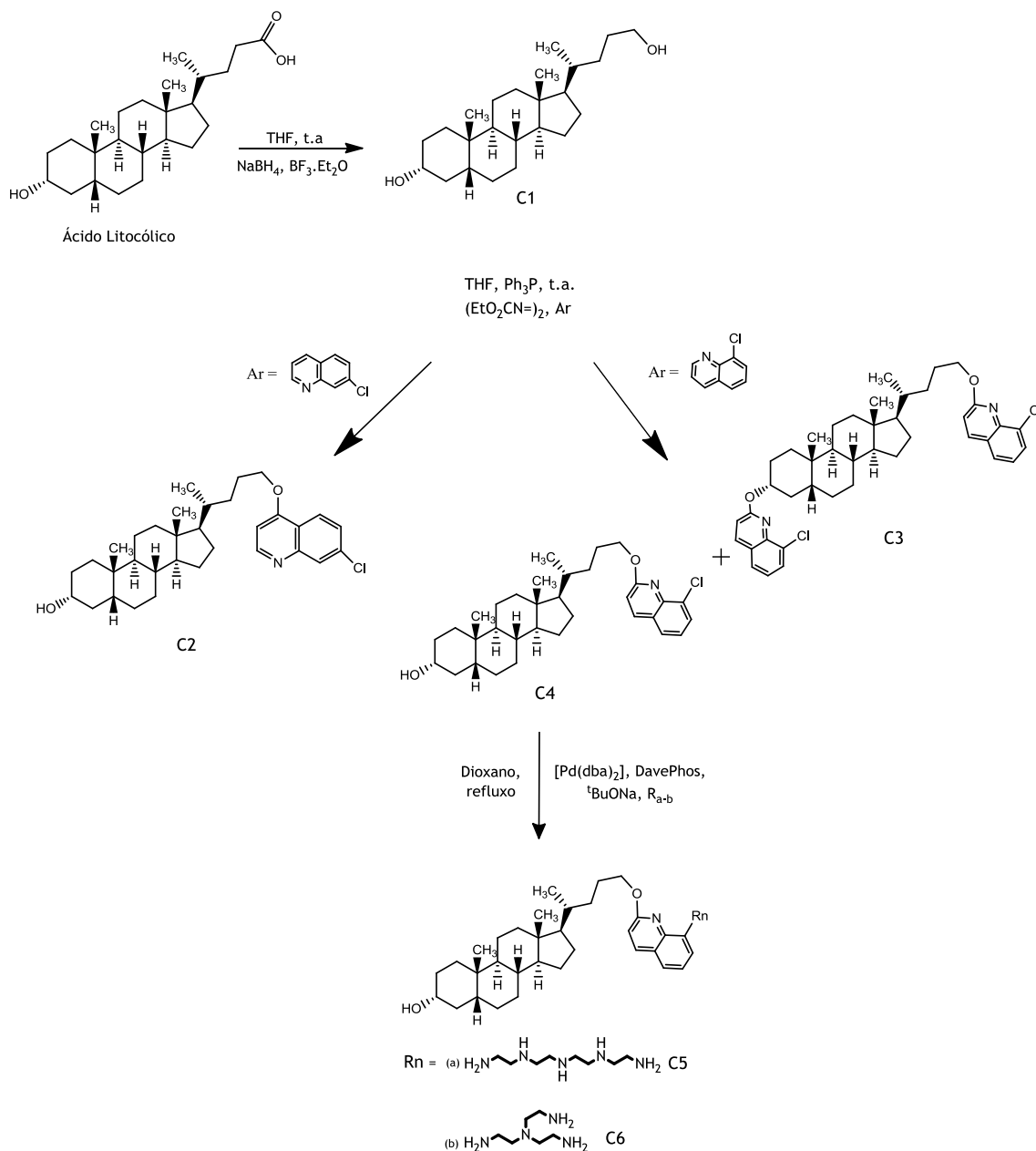


Figura 26. Esquema geral da primeira via de síntese.

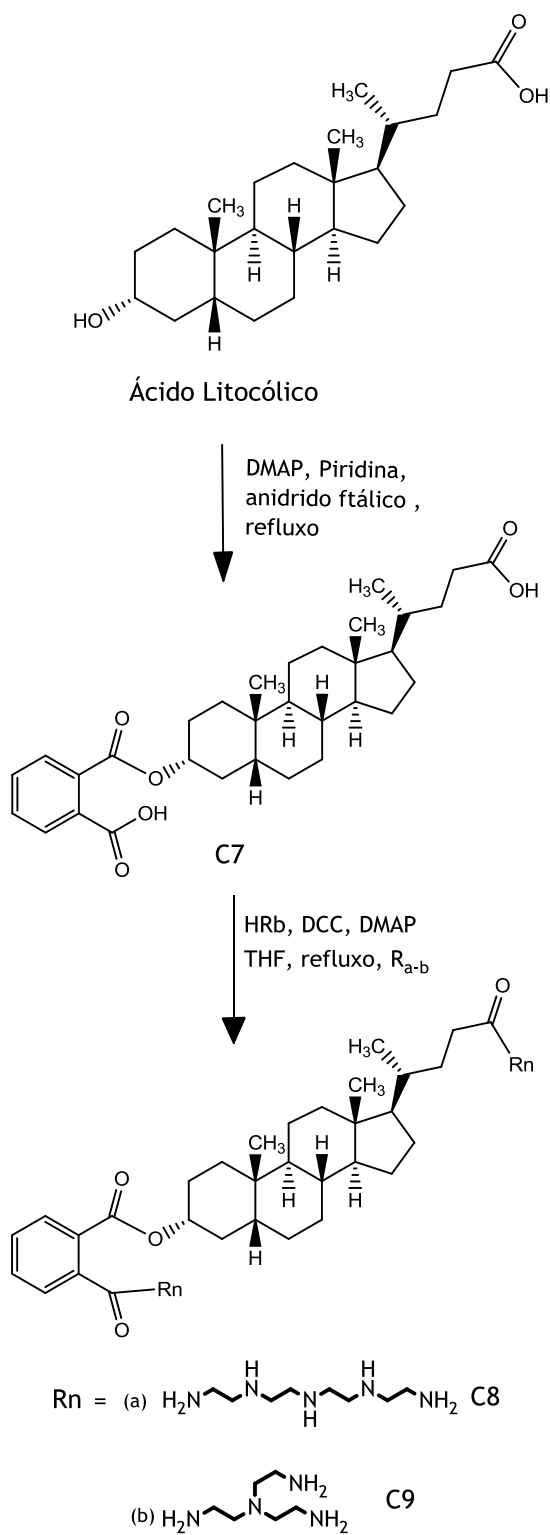


Figura 27. Esquema geral da segunda via de síntese.

Os compostos em causa no presente trabalho foram obtidos através de duas vias de síntese diferentes (figura 26 e figura 27), ambas partindo do ácido litocólico. A primeira via (1) envolve a redução do ácido litocólico dando origem ao substrato (C1) usado nas reações seguintes<sup>69</sup>. As reações que sucedem a este primeiro passo correspondem à adição de diferentes quinolinas cloradas através da reação de *Mitsunobu*, com o objetivo de obter os compostos C2, C3 e C4<sup>70</sup>. O mecanismo desta reação envolve três passos: inicialmente a trifenilfosfina faz um ataque nucleofílico na presença de DEAD formando um aduto, seguidamente dá-se a ativação do álcool e por último a reação  $S_N2$ <sup>81</sup>.

Os compostos resultantes foram submetidos a um processo de purificação com o objetivo principal de se eliminar o óxido de trifenilfosfina resultante da reação de *Mitsunobu*. De facto, uma das grandes dificuldades sentidas na preparação deste grupo de compostos foi a eliminação do óxido de trifenilfosfina e, para tal, foram tentadas várias estratégias tais como precipitações do mesmo com éter dietílico e com dioxano, mas sem sucesso. Um dos métodos de purificação utilizado foi também a coluna de cromatografia. Para isso, o composto C2 impuro foi submetido a duas colunas, não tendo sido possível, contudo, o seu isolamento. O composto C3 foi isolado pela coluna de cromatografia no entanto não foi separado totalmente do óxido de trifenilfosfina. No entanto, o composto C4 foi obtido puro através deste método de purificação.

O passo seguinte, efetuado para o composto C4, foi a adição de duas poliaminas, a tetraetilenopentamina (C5) e a tris(2-aminoetil)amina (C6), com o auxílio do catalisador bis(dibenzilidenoacetona) paládio  $[Pd(dba)_2]$ <sup>70</sup>. A reação realizada foi a reação de aminação de *Buchwald-Hartwig*, que consiste em ligar um carbono ao azoto através de uma reação de acoplamento cruzado envolvendo o catalisador de paládio. O mecanismo de reação inclui adição oxidativa do haleto de arilo ao paládio(0), adição da amina ao complexo de adição oxidativa e desprotonação seguido por eliminação redutiva<sup>82,83</sup>. Os compostos resultantes desta via de síntese o C5 e o C6 foram obtidos puros e o próximo passo será a avaliação biológica dos mesmos num estudo futuro.

Dadas as dificuldades em obter esteroides aaminados por esta primeira via sintética e uma vez que no grupo tinha sido iniciada uma via sintética alternativa envolvendo anidridos, foi proposta uma segunda estratégia, representada na figura 27. Os compostos obtidos por esta via (2), usando igualmente o ácido litocólico como ponto de partida, resultaram de duas etapas reacionais. A primeira consistiu na acilação do grupo 3-OH do ácido litocólico com o anidrido ftálico, usando-se como catalisador a DMAP, que promove a desprotonação do OH em C3, facilitando o ataque nucleofílico ao anidrido ftálico, dando origem ao composto C7, tendo este procedimento sido adaptado da literatura<sup>83</sup>. A segunda etapa corresponde à adição de duas poliaminas, a tetraetilenopentamina e a tris(2-aminoetil)amina. Esta reação foi efetuada através do acoplamento com o DCC, que ativa o grupo carbonilo do ácido carboxílico e

potencia o ataque nucleofílico da amina<sup>84,85</sup>. Uma desvantagem significativa da utilização do DCC é a formação do subproduto diciclohexilureia (DCU), que também foi difícil de separar do produto final pretendido. Após alguma pesquisa, foram realizados vários métodos de precipitação, de forma a eliminar o DCU do produto final. Assim, dadas as características de polaridade do DCU e dos produtos reacionais que se pretendiam isolar, tentou-se a precipitação com solventes como o hexano, o acetato de etilo, o éter dietilo e uma mistura de diclorometano com hexano a 5%. Destas tentativas, a que apresentou melhores resultados foi o uso de acetato de etilo a 4 °C, apesar de a remoção ter sido pouco eficaz. Após estas tentativas de remoção do DCU, com base na literatura<sup>86</sup>, decidiu-se efetuar uma coluna de cromatografia como um método de remoção deste subproduto. Da realização da coluna, constatou-se que o DCU era o primeiro produto a ser isolado da mesma e o produto de interesse era eluído posteriormente, tendo sido possível obter o produto puro. Outra dificuldade encontrada foi que a reação originava outros subprodutos, sendo que a solução encontrada para este problema foi a de adicionar um catalisador à reação. O catalisador adicionado foi o DMAP, que originou uma redução significativa de subprodutos<sup>84</sup>.

## 4.2 Avaliação Biológica

### 4.2.1 Análise dos efeitos dos compostos a 30µM em células LNCaP, MCF-7, T47D, U87 e NHDF

Após a purificação, a avaliação do efeito dos compostos sintetizados C1, C3, C4, C7, C8, C9 e do ácido litocólico (AL) na proliferação de células humanas do cancro da próstata (LNCaP), do cancro da mama (MCF-7 e T47D), do glioblastoma (U87) e em fibroblastos normais da derme (NHDF) foi realizada através do ensaio MTT. Inicialmente, com o objetivo de se avaliar genericamente a citotoxicidade dos compostos referidos nas diferentes linhas celulares, estas foram incubadas a uma concentração de 30 µM de cada composto em meio de cultura durante 72 horas. Os resultados obtidos neste ensaio inicial estão representados na figura 28 e, de forma complementar, na tabela 2.

Através da análise da figura 28 e da tabela 2, constata-se que os compostos C8 e C9 apresentam valores de proliferação celular abaixo dos 50% para células tumorais LNCaP, MCF-7 e T47D, o composto C1 apresenta uma proliferação ligeiramente abaixo dos 50% para as células LNCaP, assim como o composto C4 para a linha celular T47D.

As células NHDF foram também incluídas no estudo com o objetivo de analisar o efeito seletivo dos compostos em relação às células tumorais e células não tumorais. Através da análise deste primeiro ensaio verifica-se que nenhum composto afeta a proliferação celular das células NHDF abaixo dos 50%. Porém, os compostos C8 e C9 levam a uma proliferação

celular relativa de 53,16% e 57,86%, respectivamente, para esta linha celular. Adicionalmente, alguns compostos (AL, C3 e C4) parecem estimular ligeiramente o crescimento destas células.

Após este ensaio preliminar, os compostos que apresentaram ação antiproliferativa acima de 50% nas diversas linhas celulares foram submetidos a ensaios para determinação das curvas dose-resposta com o objetivo de se estabelecer a relação do efeito dos compostos com as concentrações estudadas. Para tal, incubaram-se os diferentes tipos celulares com os compostos em concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , durante 72 horas, tal como indicado na parte experimental da dissertação. Neste contexto, determinar a concentração do composto que inibe 50 % da proliferação celular em relação ao controlo ( $\text{IC}_{50}$ ) é importante no desenvolvimento de novos compostos anticancerígenos.

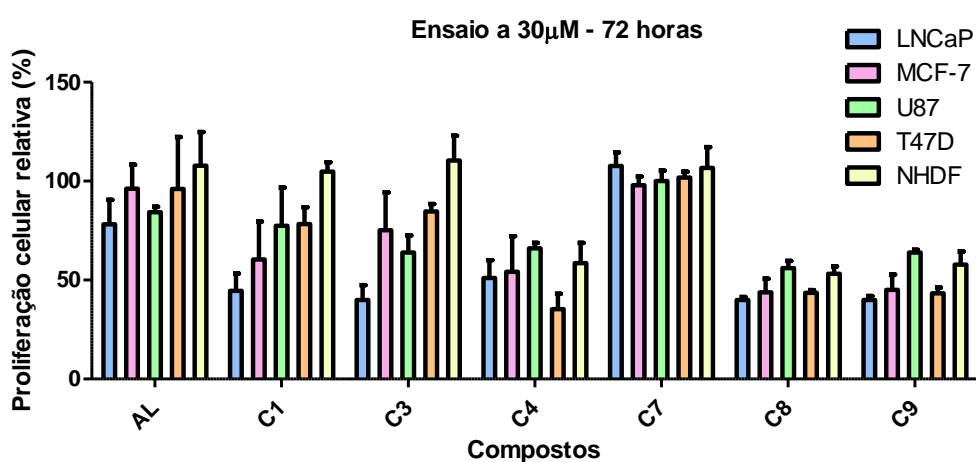


Figura 28. Proliferação celular relativa nas diferentes linhas celulares estudadas incubadas com o ácido litocólico (AL) e os compostos sintetizados, numa concentração de 30  $\mu\text{M}$  por 72 horas. Os dados estão apresentados em relação ao controlo (100%) e são representativos de, no mínimo, duas ou três experiências independentes, com n=5 em cada.

Tabela 2. Média das percentagens da proliferação celular relativa nas diferentes linhas celulares estudadas incubadas com o ácido litocólico (AL) e os compostos sintetizados, numa concentração de 30  $\mu\text{M}$  por 72 horas. Os dados estão apresentados em relação ao controlo (100%) e são representativos de, no mínimo, duas ou três experiências independentes, com n=5 em cada.

Proliferação Celular Relativa (%)	LNCaP	MCF-7	U87	T47D	NHDF
AL	78.23	96.19	84.35	96.04	107.87
C1	44.60	60.47	77.46	78.27	104.82
C3	39.90	75.19	63.87	84.74	110.43
C4	51.07	54.133	66.12	35.25	58.51
C7	107.66	97.95	100.03	101.76	106.67
C8	39.89	43.79	56.06	43.50	53.16
C9	39.89	45.08	63.95	43.33	57.86

#### 4.2.2 Determinação do IC<sub>50</sub> dos compostos e comparação dos seus efeitos nas diferentes linhas celulares

No seguimento do estudo, os compostos C1, C4, C8 e C9 foram avaliados em todas as linhas celulares cancerígenas e na linha celular não cancerígena estudada neste trabalho, e o composto C3 nas células LNCaP, MCF-7, T47D e NHDF.

Analisando os resultados obtidos na figura 29 constata-se que a baixas concentrações (0,01 $\mu$ M e 0,1 $\mu$ M) o composto C1 nas células LNCaP parece não originar efeito significativo sobre a proliferação celular. No entanto, observa-se uma diminuição gradual da proliferação a partir dessas concentrações, sendo esta diminuição mais acentuada nas concentrações de 50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M. Nas células MCF-7, o composto C1 comporta-se de maneira semelhante, no entanto, o efeito na proliferação celular em relação ao controlo começa a ser significativo logo a baixas concentrações. Para a linha celular U87 verifica-se que o composto apresenta efeitos significativos na proliferação celular apenas na concentração mais elevada, verificando-se a mesma situação para as células T47D. Observa-se, ainda, um efeito marcado na proliferação celular para a linha celular NHDF a concentrações elevadas. O valor de IC<sub>50</sub> foi calculado para os efeitos deste composto nas células referidas anteriormente (Tabela 3) e, mais uma vez, pode constatar-se que para as células LNCaP (IC<sub>50</sub>= 6,857  $\mu$ M) e MCF-7 (IC<sub>50</sub>= 3,442  $\mu$ M) a proliferação celular começa a ser afetada a baixas concentrações. Para a linha celular U87 observa-se que o IC<sub>50</sub> para este composto é marcadamente superior. Porém, obteve-se um IC<sub>50</sub> para as células NHDF (IC<sub>50</sub>= 5,932  $\mu$ M) com um valor próximo do obtido para o das células que mostraram melhores resultados, o que pode sugerir que o composto mostra uma baixa seletividade para as células cancerígenas.

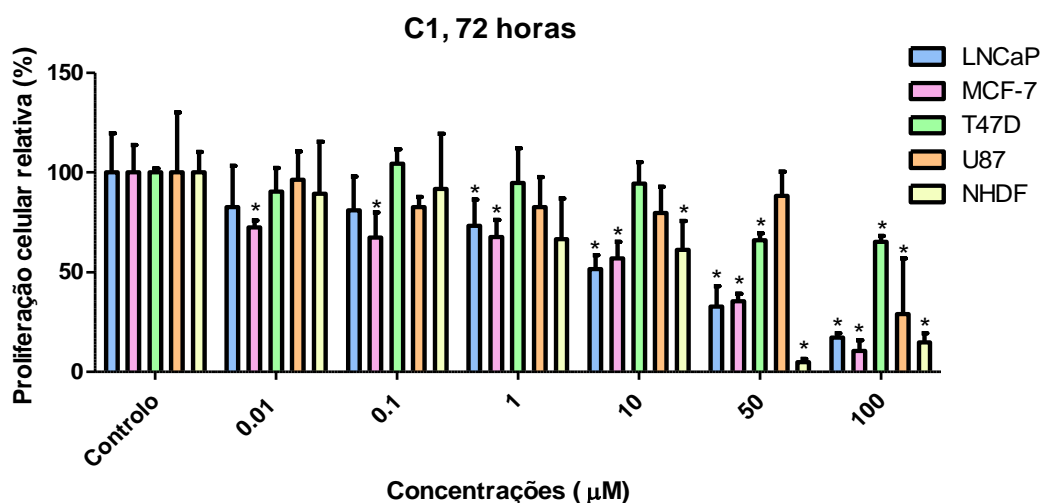


Figura 29. Proliferação celular relativa nas linhas celulares LNCaP, MCF-7, T47D, U87 e NHDF incubadas com o composto C1, numa gama de concentrações entre 0,01  $\mu$ M e 100  $\mu$ M por 72 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo negativo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. \* $p < 0,05$  versus respetivo controlo (teste *t-Student*). Os dados são representativos de, no mínimo, duas ou três experiências independentes, com  $n=5$  em cada.

Com base no ensaio preliminar a 30  $\mu\text{M}$ , o composto C3 apresenta uma maior citotoxicidade para as células LNCaP. Analisando a figura 30, pode observar-se que, para todas as linhas celulares analisadas não existe um decréscimo significativo da proliferação celular para concentrações mais baixas (entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ ). Para a linha celular LNCaP começa a verificar-se uma diminuição gradual da proliferação celular relativa a partir dessas concentrações, sendo esta mais acentuada nas concentrações de 50 $\mu\text{M}$  e 100 $\mu\text{M}$ . Nas células MCF-7 verifica-se uma diminuição acentuada da proliferação celular apenas na concentração de 100  $\mu\text{M}$ . Para a linha T47D observa-se que a diminuição da proliferação é modesta sendo, contudo, significativa para as concentrações de 50 $\mu\text{M}$  e 100 $\mu\text{M}$ . Adicionalmente, observa-se, ainda, que para a linha celular NHDF o composto afeta a proliferação celular apenas na concentração mais elevada. O valor de  $\text{IC}_{50}$  foi calculado para este composto nestas células (Tabela 3), podendo constatar-se que, para haver uma diminuição de 50% da proliferação celular das células LNCaP ( $\text{IC}_{50}= 10,67 \mu\text{M}$ ) são necessárias concentrações ligeiramente superiores a 10  $\mu\text{M}$  e que para a linha celular NHDF o  $\text{IC}_{50}$  mostra-se superior a 100.

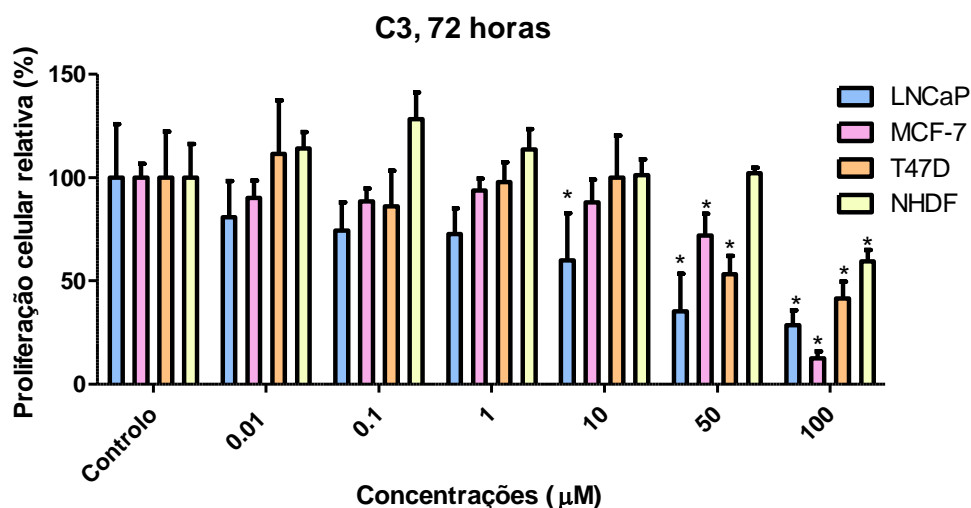


Figura 30. Proliferação celular relativa nas linhas celulares LNCaP, MCF-7 e T47D e NHDF incubadas com o composto C3, numa gama de concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  por 72 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. \* $p < 0,05$  versus respetivo controlo (teste *t-Student*). Os dados são representativos de, no mínimo, duas ou três experiências independentes, com  $n=5$  em cada.

Analisando a figura 31, pode observar-se que a baixas concentrações do composto C4 (entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 1  $\mu\text{M}$ ) não se verifica uma diminuição significativa na proliferação celular em todas as linhas celulares estudadas. Comparando a generalidade destes resultados podemos constatar que, para a linha MCF-7, o composto C4 revela ter um efeito inibitório da proliferação para concentrações iguais ou superiores a 10  $\mu\text{M}$ . Para as restantes linhas, o efeito de inibição parece ser mais ténue. O valor de  $\text{IC}_{50}$  foi calculado para estas linhas celulares e observa-se que o valor de  $\text{IC}_{50}$  mais baixo ( $\text{IC}_{50}= 6,69 \mu\text{M}$ ) ocorreu com a linha NHDF, o que sugere que o composto poderá ser tóxico para células normais.

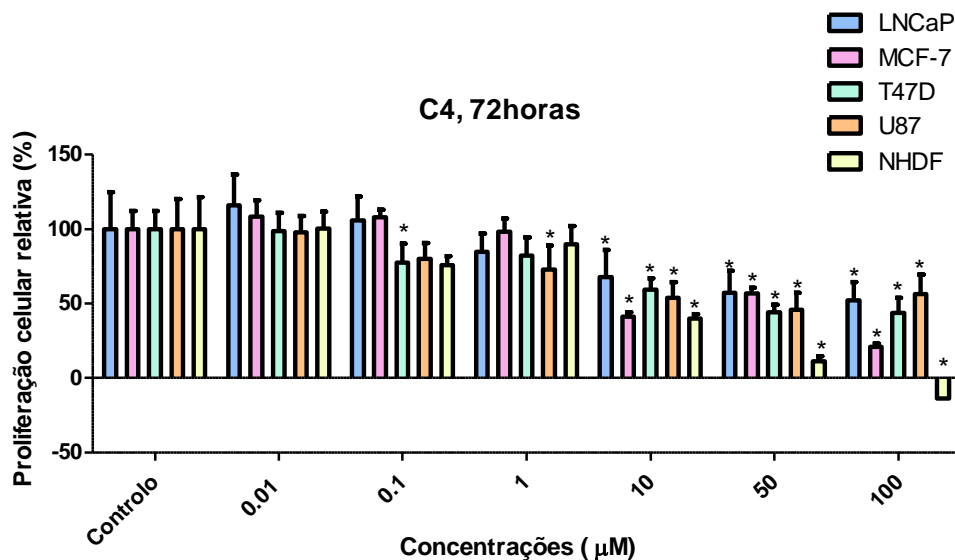


Figura 31. Proliferação celular relativa nas linhas celulares LNCaP, MCF-7, T47D, U87 e NHDF incubadas com o composto C4, numa gama de concentrações entre 0,01 µM e 100 µM por 72 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. \* $p < 0,05$  versus respetivo controlo (teste *t-Student*). Os dados são representativos de, no mínimo, duas ou três experiências independentes, com  $n=5$  em cada.

No seguimento do estudo preliminar, o composto C8 foi igualmente testado em diversas concentrações e em todas as linhas celulares estudadas neste trabalho. Analisando a figura 32, que apresenta os resultados obtidos, observa-se que, para a linha celular da próstata (LNCaP), o composto começa a afetar a sua proliferação celular logo a baixas concentrações, enquanto que, para as restantes linhas, isso só se verifica nas duas concentrações mais elevadas. O valor de  $IC_{50}$  foi calculado para todas as linhas celulares (tabela 3) e pode observar-se que para haver uma diminuição de 50% da proliferação celular das células LNCaP ( $IC_{50} = 1,68 \mu M$ ) são necessárias concentrações superiores a 1 µM.

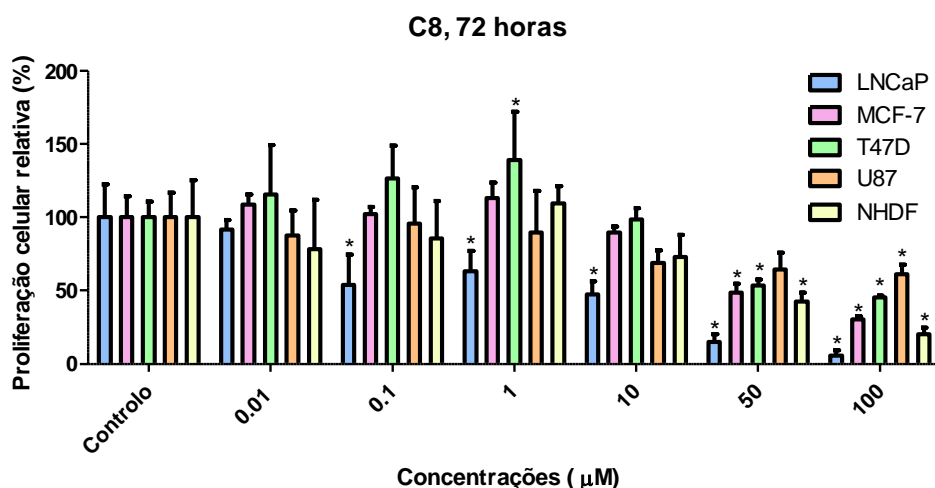


Figura 32. Proliferação celular relativa em todas as linhas celulares estudadas e incubadas com o composto C8, numa gama de concentrações entre 0,01 µM e 100 µM por 72 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. \* $p < 0,05$  versus respetivo controlo (teste *t-Student*). Os dados são representativos de, no mínimo, duas ou três experiências independentes, com  $n=5$  em cada.

A figura 33 apresenta os resultados obtidos na proliferação celular para o composto C9 testado em todas as linhas celulares estudadas neste trabalho. Com este composto, observa-se que para as linhas celulares começa a verificar-se uma diminuição gradual da proliferação celular relativa a partir de 10  $\mu\text{M}$ , sendo esta mais acentuada nas linhas celulares T47D e NHDF. O valor de  $\text{IC}_{50}$  foi calculado para todas as linhas celulares verificando-se que para a linha T47D ( $\text{IC}_{50} = 29,52 \mu\text{M}$ ) e NHDF ( $\text{IC}_{50} = 6,867 \mu\text{M}$ ) este era mais baixo, sugerindo-se existir toxicidade deste composto em células normais.

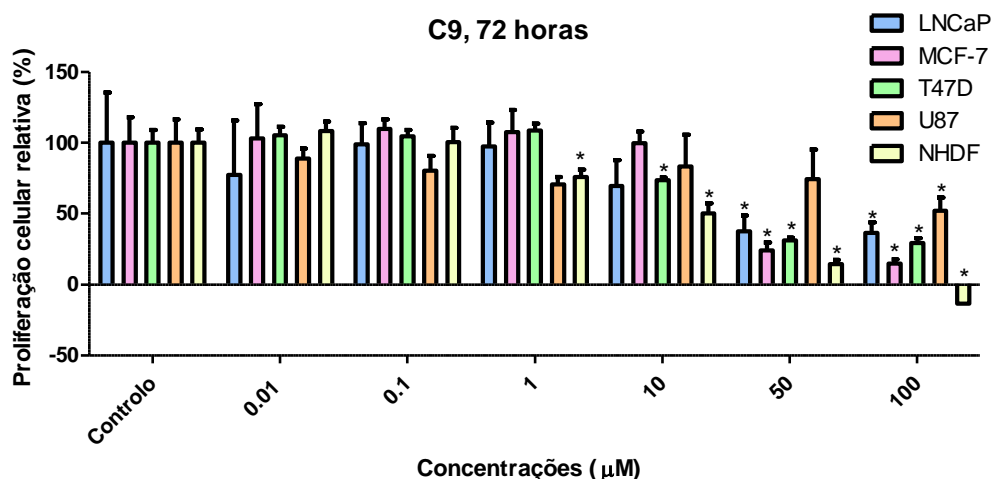


Figura 33. Proliferação celular relativa em todas as linhas celulares estudadas e incubadas com o composto C9, numa gama de concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$  por 72 horas. Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, onde as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. \* $p < 0,05$  versus respetivo controlo (teste *t-Student*). Os dados são representativos de, no mínimo, duas ou três experiências independentes, com  $n=5$  em cada.

Para efeitos de comparação, alguns controlos positivos, como o 5-Fluoruracilo (5-Flu), usado na terapia de diversos cancros como o da mama<sup>87,88</sup>, e a diosgenina, estudada em diversos cancros como o da mama e da próstata, e por mostrar inibição da migração celular<sup>83</sup>, foram também testados neste trabalho em algumas linhas celulares.

Por análise da tabela 3 com os valores de  $\text{IC}_{50}$  obtidos para os compostos em estudo e para os controlos positivos. Na literatura indica que o 5-Flu para as MCF-7 apresenta um  $\text{IC}_{50} = 0,71$  e para as T47D um  $\text{IC}_{50} = 2,80$  obtidos pelo ensaio de sulforrodamina B<sup>87</sup> Pelo estudo indicado em<sup>88</sup>, pelo ensaio de MTT obteve-se um  $\text{IC}_{50} = 12,03 \mu\text{M}$  para as MCF-7 a 48 horas. Comparando os valores da literatura com os compostos sintetizados, o composto C1 é o que mostra ser mais promissor para o cancro da mama, porém, apresenta um  $\text{IC}_{50}$  igualmente baixo para a linha celular NHDF, sugerindo uma baixa seletividade dos seus efeitos. No entanto, pelo ensaio realizado, o 5-Flu tem um comportamento semelhante nas células NHDF.

A diosgenina, de acordo com a literatura, foi estudada em células da próstata (PC-3) a 48 horas de incubação e em concentrações abaixo de 20  $\mu\text{M}$  não aparenta afetar a viabilidade

celular<sup>89</sup>. Este composto foi também estudado em células do cancro da mama, como as MCF-7, mostrando que a baixas concentrações a diosgenina não afeta a proliferação celular<sup>90</sup>. No estudo relatado na literatura para as MCF-7 incubadas durante 24 horas com 20 e 30  $\mu\text{M}$  de diosgenina, obtiveram-se valores de 52,6% e 99,3%, respetivamente, para a viabilidade celular<sup>91</sup>. Neste trabalho, a diosgenina foi estudada também em células da próstata LNCaP ( $\text{IC}_{50} = 12,71 \mu\text{M}$ ) e comparando com os compostos sintetizados, parece ser geralmente menos potente. De facto, os compostos C1, C3 e C8 são os que mostram valores de  $\text{IC}_{50}$  mais promissores, sendo que para o cancro da mama são os compostos C8 e C9 os mais promissores. No entanto, mais estudos necessitam de ser feitos para complementar e levar a uma melhor compreensão dos resultados.

Tabela 3. Valores de  $\text{IC}_{50}$  para os compostos C1, C3, C4, C8, C9 e os controlos 5-Flu e Diosgenina.

Composto	Linha Celular	$\text{IC}_{50}$	$\text{R}^2$
C1	LNCaP	6,857	0,93
	MCF-7	3,442	0,74
	U87	80,87	0,65
	T47D	>100	-
	NHDF	5,932	0,89
C3	LNCaP	10,67	0,89
	MCF-7	62,76	0,91
	U87	>100	-
	T47D	67,17	0,89
	NHDF	>100	-
C4	LNCaP	89,59	0,86
	MCF-7	21,58	0,83
	U87	56,85	0,87
	T47D	35,17	0,93
	NHDF	6,69	0,92
C8	LNCaP	1,368	0,83
	MCF-7	50,30	0,95
	U87	>100	-
	T47D	71,59	0,65
	NHDF	31,75	0,83
C9	LNCaP	33,36	0,85
	MCF-7	33,77	0,97
	U87	>100	-
	T47D	29,52	0,96
	NHDF	6,867	0,94

5-Flu	LNCaP	2,227	0,96
	MCF-7	-	-
	U87	-	-
	T47D	-	-
	NHDF	3,394	0,98
Diosgenina	LNCaP	12,71	0,82
	MCF-7	-	-
	U87	-	-
	T47D	-	-
	NHDF	-	-

#### 4.2.3 Citometria de fluxo

A fim de avaliar a morte celular e viabilidade das células MCF-7 expostas ao tratamento com o composto C8 por 24 horas, foi realizada a técnica de citometria de fluxo, após marcação com iodeto de propídio (IP), um marcador de necrose celular.

A técnica de citometria de fluxo permite discriminar célula a célula, subpopulações com base no seu estado fisiológico e metabólico. A análise da citometria de fluxo recorrendo à marcação pelo IP é um método simples e rápido por diferenciar facilmente células viáveis de células mortas, criando-se assim duas subpopulações<sup>92</sup>.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo com IP nas células MCF-7 estão representados na figura 34 e na tabela 4. O ensaio foi realizado em duplicado estando representados os resultados de uma das repetições.

Os resultados obtidos por este ensaio sugerem que o composto C8 a 15  $\mu\text{M}$  durante 24 horas não origina uma morte celular significativa em relação ao controlo negativo, e o mesmo se verifica para o controlo positivo, o 5-Flu a 50 $\mu\text{M}$  durante 24 horas. Este resultado pode sugerir, por um lado uma ação semelhante à do controlo positivo. Contudo, é importante aumentar o tempo de incubação dos compostos para se perceber com maior confiança como estes afetam as células.

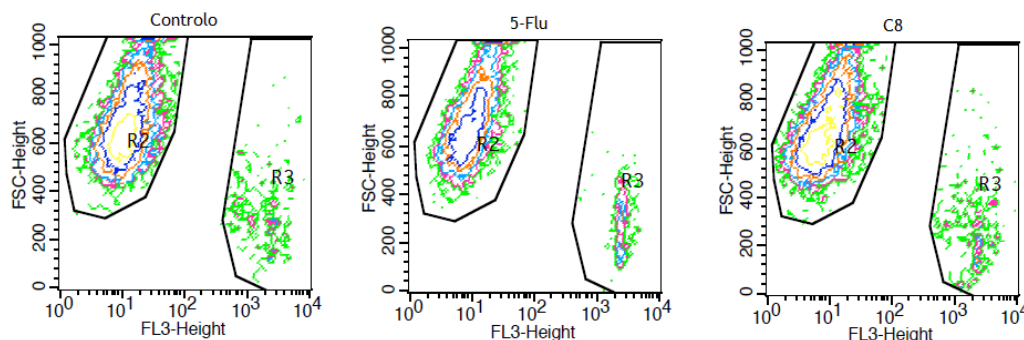


Figura 34. “Dot plots” da análise com a marcação com iodeto de propídeo em células MCF-7 controlo negativo, e tratadas com o controlo positivo, 5-Flu, e com o composto C8. Os quadrantes R2 são representativos das células sem IP, e os quadrantes R3 representam as células marcadas com IP.

Tabela 4. Distribuição percentual dos eventos pelos quadrantes nos *Dot plot* da figura 34.

<i>Dot plot</i>	Grupo	Região	Eventos	% gate	Total
A	Controlo	R2	8298	96,93	71,44
		R3	263	3,07	2,26
B	5-flu	R2	8116	92,21	67,60
		R3	686	7,79	5,71
C	C8	R2	7858	95,83	53,80
		R3	342	4,17	2,34

#### 4.2.4 Microscopia de fluorescência

A microscopia de fluorescência foi realizada principalmente com o intuito de se concluir que o composto se co-localizava no núcleo e para tentar perceber qual a sua possível localização no interior celular. Neste estudo, os compostos analisados foram o C3, o C4 e o C7 que têm estruturas compatíveis com a existência de fluorescência. No entanto, uma das dificuldades sentidas foi a compreensão do resultado obtido, uma vez que não foi possível visualizar o composto nas imagens. Assim, para tentar perceber esta situação, efetuou-se a aquisição dos espectros de excitação e de emissão dos compostos, cujos principais dados estão representados na tabela 5, concluindo-se que, apesar de existir fluorescência, não era possível excitar os compostos em questão utilizando os canais disponíveis no microscópio.

Tabela 5. Valores aproximados de excitação e de emissão dos compostos C3, C4 e C7

Composto	Excitação	Emissão
C3	310	450
C4	310	380
C7	280	350

#### 4.2.5 Interação com o G-quadruplex

O ensaio para avaliar a interação dos compostos com o G-quadruplex foi o *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), realizado em a colaboração do grupo liderado pelo Dr. Jean-Louis Mergny, do laboratório no IECB, INSERM em França. Os compostos avaliados por este ensaio foram o C1, o C3, o C4 e o C7, sendo que todos eles deram resultados negativos para interação com o G-quadruplex.

# Capítulo 5 - Conclusão

O cancro é uma patologia com elevada mortalidade e com um grande impacto socioeconómico nos dias de hoje. O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de novos compostos derivados do ácido litocólico, que pudessem ter interesse como agentes anticancerígenos e com ação no G-quadruplex. Neste sentido duas vias sintéticas a partir do ácido litocólico foram seguidas tendo sido sintetizados, purificados e caracterizados vários compostos.

A ação antiproliferativa dos compostos sintetizados foi avaliada em diversas linhas celulares humanas, tais como em células do cancro da próstata (LNCaP), do cancro da mama (MCF-7 e T47D), de glioblastoma humano (U87) e fibroblastos normais da derme (NHDF), através do ensaio MTT. Para isso, fez-se ensaio de *screening* a 30  $\mu\text{M}$  aos compostos, após esse ensaio, para os compostos que mostraram efeitos mais significativos, foi determinado o  $\text{IC}_{50}$ , sempre que possível, em todas as linhas celulares. Tendo em conta a análise dos resultados e dos valores de  $\text{IC}_{50}$  conclui-se que o composto C8, ftaloiloxilitocolanodiamida da tetraetilenopentamina mostra uma ação potente e seletiva para as células LNCaP de cancro da próstata.

Adicionalmente, pelo ensaio de citometria em que o composto C8 foi avaliado nas células MCF-7, verificou-se que não mostrou morte celular, de forma similar ao observado para o controlo positivo 5-Flu.

O ensaio FRET, demonstrou que os compostos C1, C3, C4 e C7 não mostram interação com o G-quadruplex.

Assim, através deste estudo, foi possível observar o interesse biológico de novos compostos esteroides derivados do ácido litocólico ligados a poliamidas, embora mais ensaios e testes tenham de ser aplicados aos compostos mais promissores para aprofundamento dos seus efeitos e dos seus mecanismos de ação, para a continuação da avaliação do seu potencial interesse como potenciais futuros compostos anticancerígenos.

Como perspectivas futuras a desenvolver neste âmbito, são de considerar mais ensaios *in vitro*, de forma a dar um maior esclarecimento do modo de atuação dos compostos.

## Capítulo 6 - Bibliografia

- [1] Jemal, A., Bray, F., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global Cancer Statistics. *Ca Cancer Journal. Clinical*, **61**: 69-90.
- [2] OMS. Organização Mundial de Saúde, 2015, consultado a 29 de Setembro de 2015.
- [3] Steliarova - Foucher, G. O' Callaghan, M. Ferlay, S. Masuyer, E. Rosso, S. Forman, D. Bray, F. Camber. H. (2014). The european cancer Observatory: A new data resource. *Elseier*.
- [4] Agnihotri, Acko. Bahorun, T. Aruoma, O.I. (2014). Cancer: Global Health Perspectives. *Archives of Medical Research*, **1**:1-9.
- [5] Bashir, M.N. (2015). Epidemiology of Prostate cancer. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, **16**(13): 137-141.
- [6] Ducasse, M., Brown, M.A. (2006). Epigenetic aberrations and cancer. *Molecular Cancer*, **5**(60).
- [7] Farber, E. (1988). Cancer Development and its natural history a cancer prevention perspective. *Cancer*, **62**: 1676-1679.
- [8] Weinberg, R.A. (1996). How Cancer Arises. *Scientific American*, **275**(3): 62-70.
- [9] Semi, K., Matsuda, Y., Ohnishi, K., Yamada, Y. (2013). Cellular Reprogramming and cancer development. *International Journal of Cancer*, **132**: 1240-1248.
- [10] Feinberg, A.P., Tycko B. (2004). The History of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*, **4**: 143-153.
- [11] Hanahan, D., Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, **144**(5): 646-674.
- [12] Los, M. (2009). New, Exciting developments in experimental therapies in the early 21st century. *European Journal of Pharmacology*, **625**: 1-5.
- [13] LPCC. Liga Portuguesa contra o cancro. Consultado em 29 de Setembro de 2015
- [14] Choi, Y. Y., Noh, S.H., Cheong, J.-H., (2015). Evolution of gastric cancer treatment: from the golden age of surgery to an era of precision medicine. *Yonsei Medical Journal*, **56**(5): 1177-1185
- [15] Porth, C.M. (2003). *Essentials of pathophysiology: concepts of altered health states*. Quarta Edição. Lippincott Williams Wilkins. North American.
- [16] Murat, P., Singh, Y., Defrancq, E. (2011). Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. *Chemical Society Reviews*, **40**: 5293-5307.

- [17] Qin, Y., Hurley, L. H. (2008). Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions. *Biochemie*, **90**(8): 1149-1171.
- [18] Murat, P., Balasubramanian, S. (2014). Existence and consequences of G-quadruplex structures in DNA. *Current Opinion in Genetics & Development*. **25**: 22-29.
- [19] Lam, E.Y.N., Beraldi, D., Tannahill, D., Balasubramanian, S. (2013). G-Quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA. *Nature Communications*, **4**: 1796.
- [20] Pray, L. (2008). Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. *Nature Education*, **1**: 100.
- [21] Tarsounas, M., Tijsterman, M. (2014). Genomes and G-quadruplexes: For better or for worse. *Journal of Molecular Biology*, **425**: 4782-4789.
- [22] Huppert, J. L. (2010). Structure, location and interactions of G-quadruplexes. *The FEBS Journal*, **277**: 3452-3458.
- [23] Burge, S., Parkinson, G., N. Hazel, P., Todd, A. K., Neidle, S. (2006). Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research*. **39**(19): 5402-5415.
- [24] Ou, T-m., Lu, Y.-j., Huang, Z-s., Wong, K-y., Gu, L-q. (2008). G-Quadruplexes: Targets in anticancer drug design. *ChemMedChem*, **3**: 690-713.
- [25] Campbell, N. H., Neidle, S. (2012). G-Quadruplexes and Metal Ions. *Springer*, **10**: 119-134.
- [26] Sattin, G., Artese, A., Nadai, M., Costa, G., Parrotta, Lucia., Alcaro, S., Palumbo, Manlio., Richter, S. N. (2013) Conformation and stability of intramolecular telomeric gquadruplexes: sequence effects in the loops. *PLoS One*, **8**: e84113.
- [27] Chen, Y., Yang, D. (2012). Sequence, stability, structure of G-quadruplexes and their drug interactions. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, **50**: 17.
- [28] Kim, M.-Y., Guzman-G., Izbicka, E., Nisioka, D., Hurley, L.H. (2003). The different biological effects of Telomestatin and Tmpyp4 can be attributed to their selectivity for interaction with intramolecular or intermolecular G-quadruplex structures. *Cancer Research*, **63**: 3247-3256.
- [29] Balasubramanian, S., Hurley, L.H., Neidle, S. (2011). Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy?. *Nature Reviews*, **10**: 261-275.
- [30] Han, H., Hurley, L.H. (2000). G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Trends in Pharmacological Sciences*, **24**(4): 136-142.

- [31] Pagano, B., Margarucci, L., Zizza, P., Amato, J., Laccarino, N., Cassiano, C., Salvati, E., Novellino, A., Biroccio, A., Casapullo, A., Randazzo, A. (2015). Identification of novel interactors of human telomeric G-quadruplex DNA. *Chemical Communications*, **51**: 2964-2967.
- [32] Zhou, J., Ding, D., Wang, M., Cong S. (2014). Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression. *BMB Reports*, **47**(1): 8-14.
- [33] Keith, W., N., Evans, T. R.J., Glasspool, R. M. (2001). Telomerase and cancer: time to move from a promising target to a clinical reality. *Journal of Pathology*, **195**: 404-414.
- [34] Zvereva, M. I., Shcherbakova, D. M., Dontsova, O. A. (2010). Telomerase: Structure, Functions, and Activity Regulation. *Biochemistry (Moscow)*, **75**(13): 1563-1583.
- [35] Dai, J., Carver, M., Yang, D. (2008). Polymorphism of human telomeric quadruplex structures. *Biochimie*, **90**: 1172-1183.
- [36] González, V., Hurley, L. H. (2010). The c-MYC NHE III1: Function and regulation. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **50**: 111-129.
- [37] Heinrich, M. C., Blanke, C. D., Brian J. Druker, and Corless, C. L. (2002). Inhibition of kit tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of kit-positive malignancies. *Journal of Clinical Oncobiology*, **20**: 1692-1703.
- [38] Patel, D. J., Phan, A. T., Kuryavyi, V. (2007). Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics. *Nucleic Acids Research*, **35**(2): 7429-7455.
- [39] Brassart, B., Gomez, D., Cian, A., Paterski, R., Montagnac, A., Qui, K., Temime-Smaali, N., Trentesaux, C., Mergny, J., Gueritte, F., Riou, J. (2007). A New Steroid Derivative Stabilizes G-Quadruplexes and Induces Telomere Uncapping in Human Tumor Cells. *Molecular Pharmacology*, **72**: 631-640.
- [40] Shan, C., Tan, J., Ou, T., Huang, Z. (2013). Natural products and their derivatives as G-quadruplex binding ligands. *Science China Chemistry*, **56**: 1351-1363.
- [41] Tan, J., Gu, L., Wu, J. (2008). Design of Selective G-quadruplex Ligands as Potential Anticancer Agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, **8**: 1163-1178.
- [42] Sjövall, J. (2004). Fifty Years with Bile Acids and Steroids in Health and Disease. *Lipids*, **39**: 703-722.
- [43] Sharma, R., Long, A., Gilmer, J. F. (2011). Advances in Bile Acid Medicinal Chemistry. *Current Medicinal Chemistry*, **18**: 4029-4052.
- [44] Yadav, S. K., Chandra, P., Goyal, R. N., Shim, Y. (2013). A review on determination of steroids in biological samples exploiting nanobio-electroanalytical methods. *Analytica Chimica Acta*, **762**: 14-24.

- [45] Moss, G. P. (1989). The nomenclature of steroids. *European journal of Biochemistry*, **186**: 429-458.
- [46] Block, J. H., Beale, J. M. (2010). *Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. 12<sup>a</sup> Edição, Lippincott Williams & Wilkins, New York.
- [47] Kar, H. (2007). *Medicinal Chemistry*. 4<sup>a</sup> Edição, New Age International Publishers, New Delhi.
- [48] Gomes, R. L., Meredith, W., Snape, C. E., Sephton, M. A. (2009). Conjugated steroids: analytical approaches and applications. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, **393**: 453-458.
- [49] Banday, A. H., Shameem, S., Gupta, B. D., H.M. Sampath Kumar, H. M. S. (2010). D-ring substituted 1,2,3-triazolyl 20-keto pregnenanes as potential anticancer agents: Synthesis and biological evaluation. *Steroid,s* **75**: 801-804.
- [50] Séralini, G., Moslemi, S. (2001). Aromatase inhibitors: past, present and future. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **178**: 117-131.
- [51] Salvador, J. A. R., Carvalho, J. F. S., Neves, M. A. C., Silvestre, S. M., Leitão, A. J., Silva, M. M. S., Melo, M. L. S. (2013). Anticancer steroids: linking natural and semi-synthetic compounds. *Natural Products Reports*, **30**: 324-374.
- [52] Mukhopadhyay, S., Uday Maitra, U. (2004). Chemistry and biology of bile acids. *Current Science*, **87**: 1666-1683
- [53] Debruyne, P. R., Bruyneel, E. A., Li, X., Zimber, A., Gespach, C., Mareel, M. M. (2001). The role of bile acids in carcinogenesis. *Mutation Research*, **480-481**: 359-369.
- [54] Hofmann, A. F. (2004). Detoxification of lithocholic acid, a toxic bile acid: relevance to drug hepatotoxicity. *Drug Metabolism Reviews*, **36**: 703-722.
- [55] Chae, S. Y., Jin, C., Shin, J. H., Son, S., Kim, T. H., Lee, S., Youn, Y. S., Byun, Y., Lee, M., Lee, K. C. (2010). Biochemical, pharmaceutical and therapeutic properties of long-acting lithocholic acid derivatized exendin-4 analogs. *Journal of Controlled Release*, **142**: 206-213.
- [56] Kim, N.D., Im, E., Yoo, Y. H., Choi, Y.H. (2006). Modulation of the cell cycle and induction of apoptosis in human cancer cells by synthetic bile acids. *Current Cancer Drug Targets*, **6**: 681-689.
- [57] Arlia-Ciommo, A., Piano, A., Svistkova, V., Mohtashami, S., Titorenko, V. (2014). Mechanisms underlying the anti-aging and anti-tumor effects of lithocholic bile acid. *International Journal of Molecular Sciences*, **15**: 16522-16543.
- [58] Goldberg, A. A., Beach, A., Davies, G. F., Harkness, T. A. A., LeBlanc, A., Titorenko, V. I. (2011). Lithocholic bile acid selectively kills neuroblastoma cells, while sparing normal neuronal cells. *Oncotarget*, **2**: 761-782.

- [59] Goldberg, A. A., Titorenko, V. I., Beach, A., Sanderson, J. T. (2013). Bile acids induce apoptosis selectively in androgen-dependent and -independent prostate cancer cells. *PeerJ*, **1**: e122.
- [60] Kim, N. P., Im, E. O., Choi, Y. H., Yoo, Y. H. (2002). Synthetic bile acids: Novel mediators of apoptosis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **35**(1): 134-141.
- [61] Im, E. O., Choi, Y. H., Paik, K.-J., Suh, H., Jim, Y., Kim, K.-W., Yoo, Y. H., Kim, N. D. (2001). Novel bile acid derivatives induce apoptosis via a p53-independent pathway in human breast carcinoma cells. *Cancer Letters*, **163**: 83-93.
- [62] Choi, H. Y., Im, E. O., Suh, H., Jin, Y., Yoo, Y. H., Kim, N.D. Apoptosis and modulation of cell cycle control by synthetic derivatives of ursodeoxycholic acid and chenodeoxycholic acid in human prostate cancer cells. *Cancer Letters*, **199**: 157-167.
- [63] Yee S. B., Yeo, W.J., Park, B.S., Kim, J.Y., Baek, S.J., Kim, Y.C., Seo, S.Y., Lee, S.H., Kim, J.H., Suh, H., Kim, N.D., Lim, Y.J., Yoo, Y.H. (2005). Synthetic chenodeoxycholic acid derivatives inhibit glioblastoma multiform tumor growth in vitro and in vivo. *International Journal of Oncobiology*, **27**(3): 653-659.
- [64] Brossard, D., Kihel E. L., Clément, M., Sebbahi, W., Khalid, M., Roussakis, C., Rault, S. (2010). Synthesis of bile acid derivatives and in vitro cytotoxic activity with pro-apoptotic process on multiple myeloma (KMS-11), glioblastoma multiforme (GBM), and colonic carcinoma (HCT-116) human cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**(7): 2912-2918.
- [65] Wu, D., Ji, S., Wu, Y., Ju, Y., Zhao, Y. (2007). Design, synthesis, and antitumor activity of bile acid-polyamine-nucleoside conjugates. **17**(11): 2983-8986.
- [66] Patel, A., R., Wang, J.-Y. Polyamine depletion is associated with an increase in JunD/AP-1 activity in small intestinal crypt cells. *America Journal of Physiology*, **276**(2): 441-450.
- [67] Panagiotidis, C.A., Artandi, S., Calame, K., Silverstein, S.J. (1995). Polyamines alter sequence-specific DNA-protein interactions. *Nucleic Acids Research*, **23**(10): 1800-1809.
- [68] Xie, S., Wang, J., Zhang, Y., Wang, C. (2010). Antitumor conjugates with polyamine vectors and their molecular mechanisms. *Expert Opinion on drug delivery*, **7**(9): 1049-1061.
- [69] Averin A. D., Ranyuk, E. R., Lukashev, N. V., and Beletskaya, I. P. (2005). Synthesis of nitrogen- and oxygen-containing macrocycles—derivatives of lithocholic acid. *Chemistry a European Journal*, **11**: 7030-7039.
- [70] Ranyuk, E. R., Averin, A. D., Lukasheva, N. V., Buryak, A. K., Beletskaya I. P. (2009). Palladium-catalyzed amination in the synthesis and modification of acyclic oxadiazamino cholane derivatives. *Russian Journal of Organic Chemistry*, **45**(12): 1765-1776.

- [71] Lukin, K., Kishore, V., Gordon, T. (2013). Development of a scalable synthesis of oxadiazole based s1p1 receptor agonists. *Organic Process Research and Development*, **17**(4): 666-671.
- [72] Chang, K.-H., Lee, L.,Chena, J., Li, W.-S. (2006). Lithocholic acid analogues, new and potent alpha-2,3-sialyltransferase inhibitors. *Chemical Communications*, **14**(6): 623-631.
- [73] ATCC. American Type Culture Collection. Consultado em 29 de Setembro de 2015.
- [74] Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J. P., Rosenthal, H., Chu, T. M., Mirand, E. A., Murphy G. P. (1983). Lncap model of human prostatic carcinoma. *Cancer Research*, **42**: 1809-1818.
- [75] Russell, P. J., Kingsley, E.A. (2003). Human prostate cancer cell lines. *Prostate cancer Methods and Protocols*, **81**: 21-39.
- [76] Levenson, A. S., Jordan, V. C. (1997). MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Perspectives in Cancer Research*, **57**: 3071-3078.
- [77] Judge, S. M., Chatterton, R. T. (1963). Progesterone-specific stimulation of triglyceride biosynthesis in a breast cancer cell line (T-47D). *Cancer Research*, **43**: 4407-4412.
- [78] Keydar, I., Chen, T L., Karby, S.,Weiss, F.R., Delarea, T.J., Radu, M., Chaitcik, S., Brenner, H. J. (1979). Establishment and characterization of cell line of human breast carcinoma origin. *European Journal of Cancer*, **15**(5): 659-670.
- [79] Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**: 55-63.
- [80] Cian, A. D., Guittat, L., Kaiser, M., Saccà, B., Amrane, S., Bourdoncle, A., Alberti, P., Teulade-Fichou, M.-P., Lacroix L., Mergny J.-L. (2007). Fluorescence-based melting assays for studying quadruplex ligands. *Methods*, **42**(2): 183-195.
- [81] Hughes, D.L., Reamer, R. A., Bergan, J. J., Grabowski, E. J. J. (1988). A mechanistic study of the Mitsunobu esterification reaction. *Journal of the American Chemical Society*, **110**(19): 6487-6491.
- [82] Hartwing, J.F. (1998). Carbon-heteroatom bond-forming reductive eliminations of amines, ethers, and sulfides. *Accounts of Chemical Research*, **31**: 852-860.
- [83] Jordan, R. B. (2007). Amination of aryl halides: quantitative assessment of stoichiometric and catalytic kinetic studies. **26**: 4763-4770.
- [84] Montalbetti, C. A. G. N., Falque, V. (2005). Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, **61**: 10827-10852.

- [85] Valeur, E., Bradley, M. (2008). Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*, **38**(2): 606-631.
- [86] Kamal, A., Kumar, B. A., Arifuddina, M., Dastidar S. G. (2003). Synthesis of 4B-amido and 4B-sulphonamido analogues of podophyllotoxin as potential antitumour agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **11**: 5135-5142.
- [87] Garcia, M. A., Carrasco, E., Aguilera, M., Alvare, P., Rivas, C., Campos, J. M., Prados, J. C., Calleja, M. A, Esteban, M., Marchal, J. A., Aránega, A. (2011). The chemotherapeutic drug 5-fluorouracil promotes PKR-mediated apoptosis in a p53-independent manner in colon and breast cancer cells. *PLoS One*, **6**(8): e23887.
- [88] Li, X., Kong, X., Kong, X., Wang, Y., Yan, S., Yang, Q. (2013). 53BP1 sensitizes breast cancer cells to 5-fluorouracil. *PLoS One*, **6**(8): e74928.
- [89] Chen, P. S., Shih, Y. W., Huang, H. C., Cheng, H. W. (2011). Diosgenin, a steroidal saponin, inhibits migration and invasion of human prostate cancer PC-3 cells by reducing matrix metalloproteinases expression. *PLoS One*, **6**(5): e20164.
- [90] He, Z., Chen, H., Li, G., Zhu, H., Gao, Y., Zhang, L., Sun J. (2014). Diosgenin inhibits the migration of human breast cancer MDA-MB-231 cells by suppressing Vav2 activity. *Phytoomedicine*, **21**(6): 871-876.
- [91] Srinivasan, S., Koduru, S., Kumar, R., Venguswamy, G., Kyprianou, N., Damodaran, C. (2009). Diosgenin targets Akt-mediated prosurvival signaling in human breast cancer cells. *International Journal of Cancer*, **125**(4): 961-967.
- [92] Ricarddi, C., Nicoletti, I (2006). Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nature Protocols*, **1**: 1458-1461.