



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# Síntese e avaliação biológica de poliaminoamidas esteroides antitumorais que interagem com o G-quadruplex

**Sandrina Campos Maças**

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

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

**Covilhã, Outubro de 2015**



*“There are no secrets to success.  
It is the result of preparation,  
hard work and learning from failure”  
Colin Powell*



## Agradecimentos

Em primeiro lugar um grande agradecimento ao meu orientador, Professor Doutor Samuel Silvestre, por me ter aceitado como aluna, por se ter demonstrado sempre disponível para esclarecer dúvidas e orientar-me para o melhor caminho na resolução dos obstáculos que foram aparecendo, pelo apoio, aprendizagem e desafios que me foi apresentando, pela confiança depositada em mim, que me ajudaram a crescer a nível profissional e pessoal.

Agradeço à minha co-orientadora, Professora Doutora Carla Cruz pela sua orientação, apoio e críticas construtivas que em muito contribuíram para o desenvolvimento e resultado final deste projeto.

Agradeço à Professora Doutora Adriana Santos, pela sua colaboração e disponibilidade para me ensinar e ajudar durante a aquisição e na análise de resultados de citometria de fluxo.

Agradeço aos meus colegas de laboratório pelo bom ambiente de trabalho, pelo apoio nos maus e bons momentos, pelas dicas e amizades que nunca esquecerei. Um especial agradecimento à Sara Cegonho, Elisabete Alves e Mariana Matias, por todo o apoio e ajuda nos ensaios MTT e na manutenção das culturas celulares, como também agradeço ao João Silva pelos ensinamentos e auxílio no ensaio de dicroísmo circular. Não teria conseguido sem a vossa ajuda.

Agradeço aos meus pais pela compreensão, pelo apoio incondicional que me ajudou a passar os momentos mais difíceis, e por acreditarem em mim ao longo destes anos.

Por fim aos meus amigos e familiares por todo o apoio e palavras, como também por todos os bons momentos do meu percurso académico.

A todos o meu bem-haja.



## Resumo

O cancro é uma doença com elevada mortalidade e morbilidade, tem tido um severo impacto socioeconómico. Apesar dos grandes avanços científicos, os fármacos usados atualmente no tratamento de tumores malignos têm uma eficácia geralmente baixa e efeitos secundários severos, o que tem estimulado a investigação de novos fármacos nas últimas décadas.

Os ácidos biliares têm sido vastamente utilizados na síntese química para desenvolvimento de novos fármacos, principalmente devido à elevada estabilidade da estrutura base do esteroide, reatividade das cadeias laterais, baixo custo e alta disponibilidade. Uma estratégia relevante neste âmbito consiste no desenvolvimento de moléculas que possam combinar a estrutura do esteroide com poliaminas, que possuam potencial ação anticancerígena, bem como também com capacidade de interagir e estabilizar o G-quadruplex. De facto, as poliaminas têm o potencial para participar em interações eletrostáticas entre a sua carga positiva ao pH fisiológico e a estrutura polianiónica do DNA, favorecendo as bioatividades pretendidas.

Assim, neste trabalho, a síntese química consistiu, primeiro, na acilação do ácido litocólico ou desoxicólico com o anidrido succínico, seguido do acoplamento com diferentes poliaminas usando o DCC como ativador desta transformação. Posteriormente, os compostos foram avaliados quanto à sua ação antiproliferativa através do ensaio MTT nas linhas celulares LNCaP, MCF-7, T-47D, U87 e NHDF e por citometria de fluxo (em células MCF-7). A capacidade do ligando interagir com o G-quadruplex e a sua estabilização foi avaliada por dicroísmo circular com uma sequência telomérica de G-quadruplex.

Os resultados deste estudo mostraram que os derivados do ácido desoxicólico, destacando-se o produto 7, que parece ter seletividade para tumores hormono-dependentes. No entanto, esta ação não se correlaciona com a estabilização do G-quadruplex telomérico, uma vez que tem fraco efeito estabilizador desta sequência, com tendência para estabilizar a topologia paralela. Os estudos por citometria de fluxo revelam a hipótese de que este composto possa promover a apoptose das células MCF-7.

Em conclusão, foi possível sintetizar novos compostos, sendo que um deles, o produto 7, parece ter algum potencial para continuar a ser estudado e pode ter interesse na criação de novos análogos melhorados, com potencial farmacológico como agentes anticancerígenos.

## Palavras-chave

Ácido litocólico, Ácido desoxicólico, Agentes antitumorais, G-quadruplex, Esteroides.



## Abstract

Cancer is a disease with high morbidity and mortality, and with a severe socio-economic impact. Despite the enormous scientific advances, the drugs currently used in the treatment of malignant tumors have low efficacy and severe side effects, so this has stimulated research in the development of new drugs in this area over the past decades.

Bile acids have been widely applied in synthetic chemistry mainly due to their enantiomeric purity, high stability of the steroid nucleus, reactivity of the side chain groups, low cost and ready availability. A relevant strategy consists in development of molecules that combine its core base with polyamines, with potential anticancer action, as well as their capacity to bind and stabilize the G-quadruplex sequence. In fact, polyamines have the potential to participate in electrostatic interactions between their positively ionized amines and the polyanionic sugar-phosphate backbone of DNA, promoting the intended bioactivities.

Thereby, in this work, the chemical synthesis consisted, firstly, in the acylation of lithocholic or deoxycholic acid with succinic anhydride, followed by the coupling of polyamines using DCC as a reaction activator of this transformation. Then, the compounds were evaluated for their antiproliferative action through the MTT assay in LNCaP, MCF-7, T47D, NHDF and U87 cell lines and flow cytometry (in MCF-7 cells). The binding to and stabilization capacity of the ligand was evaluated by circular dichroism with a G-quadruplex telomeric sequence.

The results of this work show that deoxycholic acid analogues, with emphasis on product 7, which seems to have cytotoxicity and selective effect on hormone-dependent tumours. However, this action is not correlated with its telomeric G-quadruplex stabilization, since it has poor stabilizing effect of this sequence, with a tendency to stabilize the parallel topology. The flow cytometry studies reveal the hypothesis that this compound might promote apoptosis in MCF-7 cells.

In conclusion, it was possible to synthesize new compounds and, one of which, product 7, appears to have some potential to continue being studied and may have an interest in creating new improved analogues, with pharmacologic potential as anticancer agents.

## Keywords

G-Quadruplex, Lithocolic acid, Deoxycholic acid, Cancer therapy, Steroids



# Índice

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vii
Abstract.....	ix
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Gráficos .....	xxi
Lista de Acrónimos.....	xxiii
1. Introdução .....	1
1.1. Cancro .....	1
1.2. G-quadruplex .....	2
1.2.1. Estruturas .....	2
1.2.2. Implicações a nível biológico .....	4
1.2.2.1. Telómeros e Telomerase .....	5
1.2.2.2. Genes tumorais .....	7
1.2.2.2.1. <i>c-MYC</i> .....	8
1.2.2.2.2. <i>c-KIT</i> .....	8
1.2.3. Estabilização da estrutura G-quadruplex com ligandos.....	9
1.2.3.1. Telomestatina .....	10
1.2.3.2. TMPyP4 .....	11
1.2.3.3. Outros ligandos .....	12
1.3. Esteroides .....	14
1.3.1. Generalidades estruturais.....	14
1.3.2. Ácidos biliares .....	15
1.3.2.1. Ácidos biliares secundários .....	18
1.3.3. Esteroides macrociclos .....	20
2. Objetivos .....	23
3. Secção experimental .....	25

3.1.1.	Reagentes e solventes.....	25
3.1.2.	Procedimentos de cromatografia.....	25
3.1.3.	Equipamentos.....	25
3.1.4.	Procedimento experimental.....	26
3.1.4.1.	Ácido 3 $\alpha$ -succinoiloxi-litocólico.....	26
3.1.4.2.	Ácido 3-succinoiloxi-desoxicólico.....	27
3.1.4.3.	Produto 1.....	28
3.1.4.4.	Produto 2.....	29
3.1.4.5.	Produto 3.....	30
3.1.4.6.	Produto 4.....	32
3.1.4.7.	Produto 5.....	33
3.1.4.8.	Produto 6.....	34
3.1.4.9.	Produto 7.....	35
3.2.	Avaliação biológica.....	36
3.2.1.	Material e equipamentos utilizados.....	36
3.2.2.	Culturas celulares.....	36
3.2.2.1.	MCF-7.....	37
3.2.2.2.	LNCaP.....	37
3.2.2.3.	T47D.....	37
3.2.2.4.	U87.....	37
3.2.2.5.	NHDF.....	38
3.2.3.	Técnicas usadas nas culturas celulares <i>in vitro</i> .....	38
3.2.3.1.	Tripsinização.....	38
3.2.3.2.	Contagem, sementeira e incubação.....	39
3.2.3.3.	Aplicação dos compostos.....	39
3.2.3.4.	Ensaio MTT.....	41
3.2.4.	Citometria de fluxo.....	42

3.3.	Estudo de interação com G-quadruplex .....	43
3.4.	Análise estatística .....	44
4.	Resultados e Discussão.....	45
4.1.	Síntese química .....	45
4.2.	Avaliação Biológica .....	48
4.2.1.	Análise preliminar da citotoxicidade dos compostos nas linhas celulares humanas 48	
4.2.2.	Estudo dose-resposta e IC50.....	50
4.3.	Citometria de fluxo .....	53
4.4.	Análise da interação do Produto 7 com o G-quadruplex.....	55
4.5.	Discussão geral .....	57
5.	Conclusão .....	59
6.	Perspectivas futuras.....	61
7.	Bibliografia.....	63
8.	Anexos .....	69



## Lista de Figuras

- Figura 1: Cancros mais frequentes na Europa em 2012, com a respetiva estimativa de casos, mortalidade e prevalência em 5 anos. (Adaptado de [2]) ..... 1
- Figura 2: estrutura do quarteto de guanina, com a exemplificação do seu empacotamento e enrolamento do G-quadruplex intramolecular, formado no promotor c-MYC. (Adaptado de [10]) ..... 3
- Figura 3: Estruturas e topologias do G-quadruplex: A) tetramolecular com cadeias paralelas, B) bimolecular com cadeias anti-paralelas e loops diagonais; C) bimolecular com loops laterais; D) intramolecular com loops laterais; E) intramolecular com um loop diagonal e dois externos. (Adaptado de [11]) ..... 4
- Figura 4: Locais possíveis das estruturas G-quadruplex na célula, como nos promotores (a) e telómeros por serem sequências ricas em guanina, podendo impedir o processo de replicação (b) quando o DNA se encontra temporariamente desenrolado em cadeia simples (c). No entanto fora do núcleo, o G-quadruplex pode se formar numa cadeia de mRNA, impossibilitando a tradução. (Adaptado de [17]) ..... 5
- Figura 5: Diferentes configurações dos telómeros. (a) DNA telomérico em cadeia dupla e simples; (b) *T-loop* formado devido à intercalação da cadeia simples com o DNA duplo com a formação de um segundo *loop*, o *D-loop*. (Adaptado de [24]) ..... 6
- Figura 6: Influência do G-quadruplex na expressão genética, podendo inibir a ligação de fatores de transcrição (FT) e abolir a síntese de RNA (1). A presença do G-quadruplex induz a abertura da cadeia dupla que facilita o começo da transcrição (2). Porém pode impedir a ação da RNA polimerase (3). (Adaptado de [21]) ..... 7
- Figura 7: Estrutura química da telomestatina, um ligando com capacidade de estabilizar a topologia paralela do G-quadruplex telomérico. (Adaptado de [35]) ..... 11
- Figura 8: Estrutura química do ligando TMPyP4, que possui a capacidade de estabilizar a topologia paralela do G-quadruplex. (Adaptado de [35]) ..... 11
- Figura 9: Estrutura química de derivados de esteroides. (Adaptado de [38]) ..... 13
- Figura 10: Estrutura do composto BAA, formado por dois ácidos cólicos interligados por um aminoácido, com capacidade de interagir com o G-quadruplex e estabilizar a topologia paralela. (Adaptado de [42]) ..... 13

- Figura 11: Estrutura base do esteroide, com a representação dos quatro anéis designados pelas letras A, B, C e D, e respetiva numeração dos carbonos. (Adaptado de [41])..... 14
- Figura 12: Estrutura química dos ácidos biliares, com a representação da face  $\alpha$  e face  $\beta$ , dada pela fusão em cis do anel A e B. (Adaptado de [50])..... 15
- Figura 13: Resumo da biossíntese dos ácidos biliares a partir do colesterol, sendo convertido em  $7\alpha$ -hidroxicolesterol por ação da enzima CYP7A1, que posteriormente a desidrogenase HSD3B7 converte-a em  $7\alpha$ -hidroxi-4-colesten-3-ona. A partir deste intermediário iniciam-se duas vias de síntese com diversas enzimas, culminando na produção pela enzima CYP27A1 de ácido cólico e quenodesoxicólico, sendo estes os ácidos biliares primários. No intestino grosso, por ação de enzimas bacterianas ocorre a remoção do grupo hidroxilo do carbono 7, convertendo o ácido cólico e quenodesoxicólico em ácido desoxicólico e litocólico, respetivamente. Posteriormente são excretados ou entram na circulação enterohepática. (Adaptado de [47]) ..... 17
- Figura 14: Estrutura dos ácidos biliares secundários, mais propriamente do ácido litocólico à esquerda e do ácido desoxicólico à direita. .... 19
- Figura 15: Estrutura de esteroides conjugados com aminas, derivados do ácido litocólico. (Adaptado de [63]) ..... 21
- Figura 16: Estruturas monoméricas derivadas do ácido desoxicólico. (Adaptado de [53]) ..... 21
- Figura 17: Estrutura de derivados diméricos de ácidos biliares, mais propriamente colafanos, em que X e Y representam os grupos espaçadores que podem ser iguais ou diferentes, e A-D representam a funcionalidade catalítica ou de ligação. (Adaptado de [53]) ..... 21
- Figura 18: Síntese do macrociclo a partir do ácido biliar por dois passos reacionais, em que  $R_a$  pode ser igual a -H ou -OH correspondendo ao ácido litocólico ou ácido desoxicólico, respetivamente, enquanto  $R_n$  representa uma cadeia poliamina. .... 23
- Figura 19: Esquema representativo da microplaca para o primeiro ensaio dos compostos numa concentração de  $30 \mu\text{M}$ . (C0= controlo; C1, C2, C3, C4, C5 = compostos diferentes)..... 40
- Figura 20: Esquema representativo das microplacas para o ensaio de curva dose-resposta,  $n=5$ , com uma gama de diferentes concentrações (em  $\mu\text{M}$ ) do composto em estudo. .... 41
- Figura 21: Representação geral da síntese química, com comparação entre o composto final pretendido inicialmente e o obtido, sendo o  $R_a$  igual a -H no caso do ácido litocólico ou -OH para o ácido desoxicólico, enquanto o  $R_n$  representa a cadeia poliamina para cada  $R_a$ . .... 45

Figura 22: Fotografias efetuadas às células MCF-7, após 4 horas de incubação com compostos a concentração 50 $\mu$ M para o procedimento de citometria de fluxo, (a) e (b) são controlos, (c) e (d) do produto 7 e (e) e (f) do 5-flourouracil (3x10<sup>4</sup>cel/mL) (Ampliação de 100X - microscópio Olympus CKX 41, equipado com máquina fotográfica digital Olympus SP 500UZ) ..... 69

Figura 23: Fotografias efetuadas às células MCF-7, após 24 horas de incubação com compostos a concentração 50 $\mu$ M para o procedimento de citometria de fluxo, (a) e (b) são controlos, (c) e (d) do produto 7 e (e) e (f) do 5-flourouracil (3x10<sup>4</sup>cel/mL) (Ampliação de 100X - microscópio Olympus CKX 41, equipado com máquina fotográfica digital Olympus SP 500UZ) 70



## Lista de Tabelas

Tabela 1: Percentagem da proliferação celular relativa nas cinco linhas celulares (NHDF, MCF-7, T-47D, LNCaP e U-87) após o tratamento na concentração de 30 $\mu$ M, com os compostos sintetizados, ácido litocólico e ácido desoxicólico, durante 72h, determinada pelo ensaio MTT, com n=2 (concentração=2x10<sup>4</sup> células/mL). ..... 49

Tabela 2: Valores IC<sub>50</sub> em  $\mu$ M, do produto 7, diosgenina e 5-flourouracil nas diferentes linhas celulares testadas ..... 51



## Lista de Gráficos

Gráfico 1: Percentagem da proliferação celular relativa nas cinco linhas celulares (NHDF, MCF-7, T-47D, LNCaP e U87) após o tratamento com os compostos sintetizados e os ácidos litocólico e desoxicólico, na concentração de 30 $\mu$ M durante 72h, realizados pelo ensaio MTT (concentração inicial de células=2x10<sup>4</sup> células/mL). Os dados estão apresentados em relação ao controlo (100%) e são representativos de, no mínimo, duas experiências independentes, com n=5 em cada. No gráfico, as barras representam as médias e as linhas o seu desvio padrão. .... 48

Gráfico 2: Percentagem da proliferação celular relativa nas cinco linhas celulares (NHDF, MCF-7, T-47D, LNCaP e U87) após o tratamento num intervalo de concentrações de 0,01 a 100  $\mu$ M com o produto 7 durante 72h, realizados pelo ensaio MTT (concentração=2x10<sup>4</sup> células/mL). Os dados estão apresentados em relação ao controlo (100%) e são representativos de, no mínimo, duas experiências independentes, com n=5 em cada. No gráfico as barras representam as médias e as linhas o seu desvio padrão, como ainda \* p<0,05 versus respetivo controlo (teste *t*-student). .... 50

Gráfico 3: Percentagem da proliferação celular relativa nas linhas celulares MCF-7, T-47D e LNCaP após o tratamento num intervalo de concentrações de 0,01 a 100  $\mu$ M com a diosgenina durante 72h, realizados pelo ensaio MTT (concentração=2x10<sup>4</sup> células/mL). Os dados estão apresentados em relação ao controlo (100%) e são representativos de, no mínimo, duas experiências independentes, com n=5 em cada. No gráfico as barras representam as médias e as linhas o seu desvio padrão, como ainda \* p<0,05 versus respetivo controlo (teste *t*-student). .... 51

Gráfico 4: Percentagem da proliferação celular relativa nas linhas celulares NHDF, MCF-7, T-47D e LNCaP após o tratamento num intervalo de concentrações de 0,01 a 100  $\mu$ M com o 5-flourouracilo durante 72h, realizados pelo ensaio MTT, com n=2 (concentração=2x10<sup>4</sup> células/mL). Os dados estão apresentados em relação ao controlo (100%) e são representativos de, no mínimo, duas experiências independentes, com n=5 em cada. No gráfico as barras representam as médias e as linhas o seu desvio padrão, como ainda \* p<0,05 versus respetivo controlo (teste *t*-student). .... 52

Gráfico 5: Resultados do estudo de viabilidade celular das células MCF-7 com o marcador iodeto de propídeo. O controlo consiste em células sem qualquer tratamento, e as células foram tratadas com o produto 7, bem como com 5-flourouracilo, tendo sido incubadas por 24 horas após adição dos compostos às culturas celulares (3x10<sup>4</sup> cel/mL). R2=células viáveis e R3=debris. .... 54

Gráfico 6: Titulação de 10 $\mu$ M da sequência telomérica 22AG de G-quadruplex com o produto 7, em tampão KCl 10mM e 20% de DMSO. (a) Espectro da elipticidade em mdeg com a representação do controlo e composto a 5eq e 10eq, obtidos a temperatura de 20°C com variação de comprimento de onda de 240 a 340nm. (b) Espectro a comprimento de onda de 263nm, da variação da temperatura de melting num intervalo de 20°C a 80°C do controlo e composto a 5eq e 10eq. .... 55

Gráfico 7: resultados da viabilidade celular das células MCF-7 com o marcador iodeto de propídeo, em que o controlo consiste em células sem qualquer tratamento, células tratadas com o produto 7, como ainda células tratadas com 5-flourouracil, tendo sido incubadas por 24horas após adição dos compostos às culturas celulares (3x10<sup>4</sup> cel/mL). Em que R2=células viáveis e R3=debris. .... 71

## Lista de Acrónimos

$^{13}\text{C}$ -RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
$^1\text{H}$ -RMN	Ressonância magnética nuclear de protões
ALT	Alongamento alternativo dos telómeros
CCF	Cromatografia de Camada Fina
CD	Dicroísmo circular
d	Dupleto
DCC	Diciclohexilcarbodiimida
DCU	Diciclohexilureia
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de cadeia dupla
eq	Equivalentes molares
FBS	Soro fetal bovino
FG	Funtumina guanil-hidrazona
FTIR	<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
hTERT	Transcriptase reversa da telomerase
hTR	RNA telomerase
IC <sub>50</sub>	Concentração de composto que inibe a atividade enzimática em 50%
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IV	Infravermelho
m	Multiplete
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PBS	Tampão fosfato salino
Rf	Fator de retenção
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Singleto
ssDNA	Cadeia simples DNA
t	Triplete
δ	Desvio químico (ppm)



# 1. Introdução

## 1.1. Cancro

O cancro é uma patologia com elevada morbilidade e mortalidade a nível mundial, estando associado a um enorme impacto socioeconómico. Apesar do rápido avanço científico neste campo observado nas últimas décadas, a sua incidência tem vindo a aumentar. Nos países desenvolvidos, encontra-se associado a diversos fatores, entre eles, o aumento da esperança média de vida da população, os comportamentos e hábitos de consumo como o tabagismo, consumo de álcool, aumento do índice de massa corporal e variados fatores ambientais [1]. Em termos epidemiológicos, estima-se que, por exemplo, no ano 2012, apareceram mais de 3 milhões de novos casos diagnosticados na Europa, e que, destes, cerca de 2 milhões de casos anuais incluem cancro da mama, do intestino grosso, da próstata e dos pulmões, sendo este último o mais mortal (Figura 1) [2]. Entre os mais frequentes em termos de género encontram-se cancros hormono-dependentes, com uma maior frequência o cancro da mama na mulher e no homem o cancro da próstata [1].

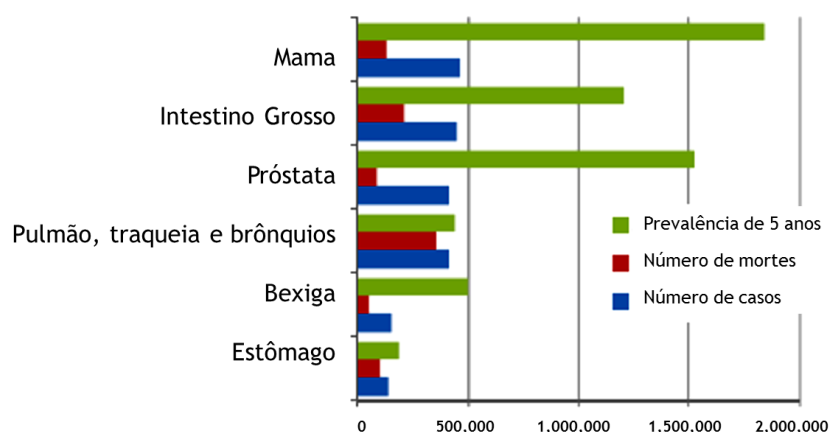


Figura 1: Cancros mais frequentes na Europa em 2012, com a respetiva estimativa de casos, mortalidade e prevalência em 5 anos. (Adaptado de [2])

De acordo com as estatísticas de mortalidade da *Liga Portuguesa Contra os Cancro*, em Portugal falecem cerca de 42 mil pessoas por ano com cancro, existindo um gasto de 20 milhões de euros por ano associado a esta patologia. Com o aumento de casos por ano, verifica-se um aumento significativo do consumo de medicamentos, nomeadamente os imunomoduladores, os quais representam a opção terapêutica mais dirigida [3].

A estratégia terapêutica clássica compreende 3 modos de tratamento: a cirurgia, a radiação e a quimioterapia. No entanto, esta deve ser individualizada, ou seja, selecionada de acordo com o tipo de cancro e a sua agressividade, como ainda a reação do doente ao tratamento, podendo incluir uma variedade de fármacos com diferentes mecanismos de ação farmacológicos e alvos terapêuticos [4].

Dentro das estratégias terapêuticas referidas, a quimioterapia continua a ser uma abordagem efetiva no tratamento do cancro, pretendendo eliminar as células cancerígenas, reduzindo o crescimento tumoral e aliviando a dor. Os agentes quimioterápicos geralmente interferem de formas diferentes com o DNA ou RNA, podendo, por isso, dividir-se em diversas classes, como os agentes alquilantes, os antimetabolitos e os inibidores de topoisomerases [4].

A quimioterapia clássica, no entanto, encontra-se associada a múltiplos efeitos adversos, como por exemplo alopecia, disfunção gastrointestinais, toxicidade neurológica, disfunção cognitiva e imunossupressão, podendo também levar ao aparecimento de infeções e novos tumores [5].

A quimioterapia tem, por isso várias limitações. Uma causa importante do insucesso com este tipo de tratamento é a resistência intrínseca ou adquirida pelo tumor ao agente, o que pode levar ao reaparecimento da doença. Outra limitação na utilização de compostos anticancerígenos, como já referido, é a toxicidade adversa em tecidos saudáveis, consequente da sua fraca seletividade [4].

Devido a estes fatores, torna-se clara a razão da constante procura de novas alternativas à quimioterapia, incluindo a pesquisa de novas moléculas mais seletivas, tendo sempre em conta o alvo pretendido, sendo que uma dessas estratégias se baseia na indução e estabilização de estruturas do G-quadruplex.

## 1.2. G-quadruplex

A forma de dupla hélice do DNA é a sua estrutura mais conhecida, a qual se mantém unida devido à complementaridade das suas bases, segundo o modelo de Watson-Crick. No entanto, os ácidos nucleicos têm a capacidade de sofrerem alterações estruturais, podendo assumir diferentes conformações, incluindo os triplexes como o H-DNA, *DNA hairpins*, G-quadruplexes e i-tetraplexes [6-8].

O G-quadruplex resulta de uma sequência de ácidos nucleicos ricos em guaninas, consistindo numa estrutura altamente organizada de quatro cadeias helicoidais [6]. Tais sequências podem ser encontradas nas extremidades dos cromossomas, mais concretamente nas regiões teloméricas, bem como também em regiões de regulação transcricional de determinados oncogenes importantes, tais como o *c-KIT* e *c-MYC*, sendo biologicamente relevantes [9].

### 1.2.1. Estruturas

O G-quadruplex é uma estrutura secundária do DNA, que consiste num empacotamento múltiplo vertical de quartetos de guanina, em que cada um consiste numa base planar de quatro guaninas estabelecendo ligações de hidrogénio entre si, denominadas por ligações de *Hoogsteen* (Figura 2) [7].

No entanto, para além das ligações de *Hoogsteen*, existem outras interações tais como a interação  $\pi$ - $\pi$  entre guaninas dos planos adjacentes e a interação entre a carga parcialmente

negativa de determinados oxigénios das guaninas e catiões que se situam tipicamente na posição octaédrica entre os planos empacotados [6].

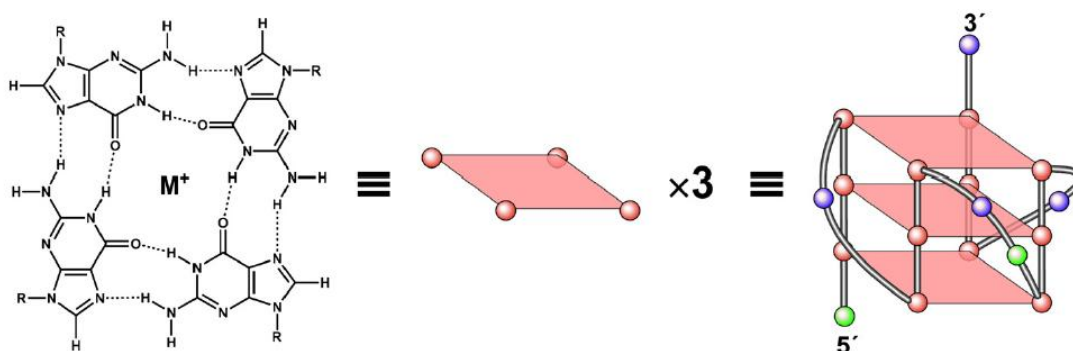


Figura 2: estrutura do quarteto de guanina, com a exemplificação do seu empacotamento e enrolamento do G-quadruplex intramolecular, formado no promotor c-MYC. (Adaptado de [10])

A dependência exibida na correlação entre o oxigénio da guanina e catiões alcalinos monovalentes, como o  $K^+$ ,  $Na^+$  e  $Li^+$ , torna-se relevante para a formação e estabilização do G-quadruplex. No entanto, o efeito do  $K^+$  é superior ao do  $Na^+$ , uma vez que o primeiro apresenta coordenação a oito átomos de oxigénio dos grupos carbonilo presentes no quarteto adjacente. Porém, tendo em conta que uma cadeia oligomérica de DNA possui a capacidade de formar diferentes estruturas de G-quadruplex na presença destes catiões, bem como a elevada prevalência de  $K^+$  e  $Na^+$  nas células, verifica-se que as condições fisiológicas são favoráveis à formação de G-quadruplex [7].

Para além da concentração e presença de catiões, a estabilização e a formação da estrutura pode ser influenciada por outros fatores, tais como: temperatura, pH e outras moléculas de baixo peso molecular [9].

No entanto, a maioria das experiências que têm como objetivo de estudar o G-quadruplex são realizadas *in vitro*, sendo procedidas em soluções aquosas diluídas, o que leva à omissão de vários fatores se as experiências fossem realizadas *in vivo*. Nomeadamente a quantidade de proteínas com a possibilidade de interagirem, estabilizarem, destabilizarem ou clivarem o G-quadruplex, outro fator é a presença de nucleossomas que estabilizam a cadeia dupla [6].

Estruturalmente, as sequências presentes entre as sucessivas guaninas, servem de ligação dos quartetos empacotados e leva à formação de *loops*, num número distinto de forma, levando assim a uma variedade de topologias de G-quadruplex [6, 10]. De facto, o G-quadruplex pode ser formado intramolecularmente com uma sequência rica em guaninas, ou intermolecularmente entre dois ou quatro conjuntos de sequências ricas em guaninas, criando estruturas bimoleculares ou tetramoleculares, respetivamente [11, 12]. As cadeias adjacentes constituem o G-quadruplex podem ser paralelos, antiparalelos ou híbridos, estando relacionado com as ligações glicosídicas entre a guanina e a desoxirribose, já os loops podem ser laterais, diagonais ou possuir um loop diagonal e dois externos, ou seja encontram-se opostas uma à outra (Figura 3). Quando todas as cadeias se encontram na mesma direção, a

estrutura de G-quadruplex é considerada paralela e todas as suas bases encontram-se na conformação anti, podendo conter os seus loops na posição lateral. No caso de existir uma cadeia orientada em direção oposta às outras, a estrutura do G-quadruplex é considerada híbrida, porém se duas cadeias estiverem orientadas para uma direção e as outras duas na direção oposta, a estrutura é considerada antiparalela e contém bases em posição anti e sin [6, 12, 13].

Tendo em conta esta complexidade, existe por isso, um elevado número de possibilidades de estruturas [6].

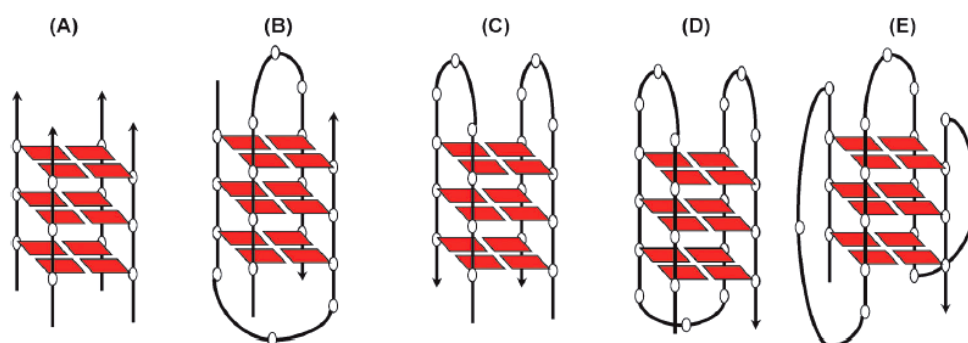


Figura 3: Estruturas e topologias do G-quadruplex: A) tetramolecular com cadeias paralelas, B) bimolecular com cadeias anti-paralelas e loops diagonais; C) bimolecular com loops laterais; D) intramolecular com loops laterais; E) intramolecular com um loop diagonal e dois externos. (Adaptado de [11])

O RNA é uma estrutura de ácidos nucleicos também capaz de formar estruturas de G-quadruplex, sendo até mais estável que a estrutura de G-quadruplex formada a partir do DNA, uma vez que não tem de competir com a estabilidade da estrutura do dupla, como também apresenta uma elevada gama de sequências capazes de formar o G-quadruplex [6, 14].

Por outro lado, o RNA tem a capacidade intrínseca de formar outras estruturas secundárias complexas, o que pode reduzir o número de possíveis estruturas de G-quadruplex de RNA. Várias funções foram propostas para esta estrutura de RNA, que pode incluir um papel estrutural, como na manutenção da integridade das extremidades dos cromossomas, como ainda na regulação translacional, como na repressão de determinados genes, por exemplo proto-oncogenes. Consegue ainda regular de forma indireta a expressão de genes, ao se ligar a proteínas, como por exemplo à helicase, mantendo, assim, um equilíbrio entre folded e unfolded do DNA dupla [15].

### 1.2.2. Implicações a nível biológico

O G-quadruplex desempenha um papel fisiológico importante, sendo encontrado em elevada concentração nos telómeros e em regiões de transcrição, de tradução e de replicação, principalmente promotores, que ao ser estabilizado pode influenciar de forma negativa a sobrevivência e proliferação celular (Figura 4) [6, 16]. Em contra partida, o potencial de se

formar o G-quadruplex é elevado no genoma eucariótico, como ainda tem sido preservado ao longo da evolução [16].

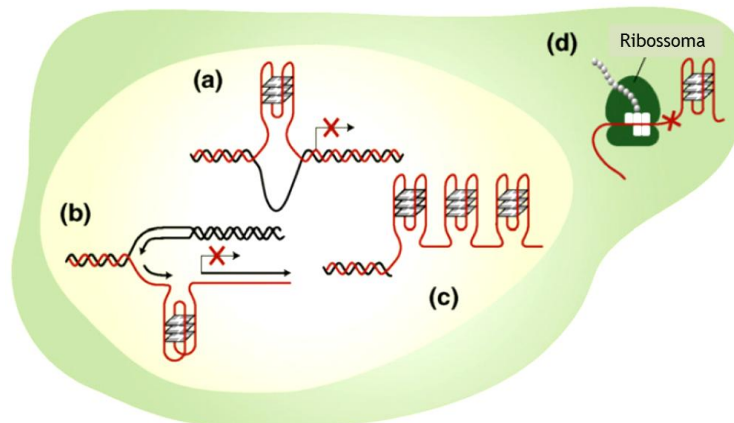


Figura 4: Locais possíveis das estruturas G-quadruplex na célula, como nos promotores (a) e telômeros por serem seqüências ricas em guanina, podendo impedir o processo de replicação (b) quando o DNA se encontra temporariamente desenrolado em cadeia simples (c). No entanto fora do núcleo, o G-quadruplex pode se formar numa cadeia de mRNA, impossibilitando a tradução. (Adaptado de [17])

#### 1.2.2.1. Telômeros e Telomerase

Os telômeros são complexos especializados de DNA e proteínas, presentes nas extremidades dos cromossomas, contribuindo assim para uma organização espacial e funcional do núcleo [18, 19]. A seqüência telomérica humana consiste em repetições contínuas do motivo 5'-GGGGTT-3' com um comprimento de 15kb, terminando com uma extensão curta com o motivo 5'-AATCCC-3' de 15 a 200 nucleótidos na forma de cadeia simples (Figura 5 (a)) [9, 19]. A manutenção da integridade desta cadeia simples é essencial para a sobrevivência da célula, caso contrário pode estar envolvida na fusão não homóloga de cromossomas, levando à perda genética e encurtamento dos cromossomas, causada durante a divisão celular, que consequentemente pode resultar na instabilidade genômica e senescência celular. Por isso esta curta seqüência encontra-se normalmente associada a proteínas, como o hPOT1, como ainda tem a capacidade de formar a estrutura de G-quadruplex [9, 19].

Nas células somáticas humanas, o comprimento dos telômeros diminui a cada divisão celular, então a reversão desta degradação por mecanismos de manutenção aumenta a capacidade replicativa da célula. Por isso, a estrutura e a estabilidade dos telômeros encontram-se intimamente relacionado com o cancro [19, 20]. Neste âmbito, duas classes de mecanismos encontram-se descritas em células tumorais humanas que permitem a manutenção do comprimento dos telômeros. A primeira está relacionada com a enzima telomerase, que possui a função de transcriptase reversa, copiando pequenos motivos TTAGGG nas extremidades dos telômeros. Esta enzima ribonucleoproteína é composta por uma subunidade catalítica, *hTERT* ou “telomerase reverse transcriptase”, que utiliza a subunidade *hTR* ou “telomerase RNA” como modelo no alongamento da cadeia. A telomerase atua ainda no encapsulamento dos telômeros e na resposta aos danos do DNA. Na maioria dos tumores

(cerca de 85-90%), a telomerase encontra-se sobre-expressa e pode atuar como um promotor de tumor, contrastando-se com as células estaminais normais em que a sua presença é baixa ou ausente [18, 20, 21].

Cerca de 15% das células apresenta um segundo mecanismo, em que a atividade da telomerase é ausente, sendo o comprimento do telómero mantido através de mecanismos de recombinação com um outro telómero, conhecido por *ALT* ou “alongamento alternativo dos telómeros”. Este encontra-se associado com a remodelação da cromatina e a metilação da *hTR* do gene promotor de *hTERT* [18, 20].

Na proteção dos telómeros também é essencial a ligação de proteínas ao DNA, por exemplo a *hPOT1* liga-se a cadeias simples associa-se a outras proteínas teloméricas formando um complexo proteico de proteção [21]. Sob condições fisiológicas, existem estruturas de proteção no ciclo celular que se reúnem nos telómeros, com a função de prevenir que as cadeias simples se encontrem expostas e sejam reconhecidas por mecanismos celulares de vigilância, como extremidades de cadeia de DNA danificada, promovendo, assim, a paragem do ciclo celular num ponto de verificação [16]. Uma dessas estruturas é o *T-loop*, em que a extremidade do telómero enrola-se sobre si próprio e a cadeia simples 3' intercala-se com o DNA duplo com a formação de um segundo *loop*, *D-loop* (Figura 5 (b)) [22, 23].

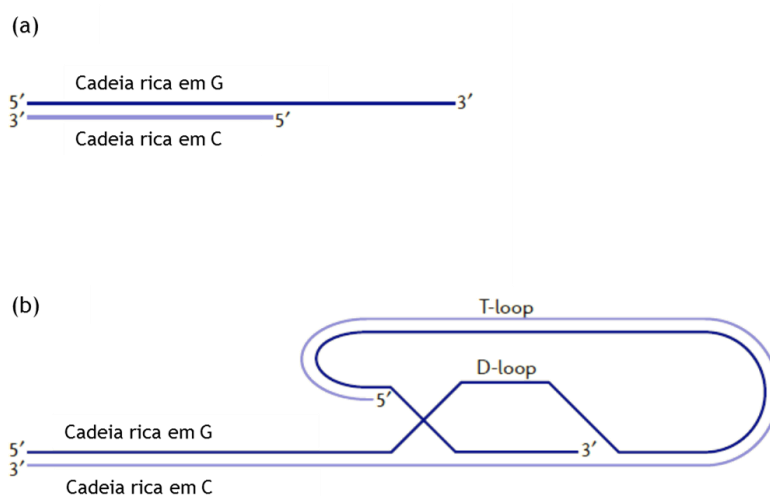


Figura 5: Diferentes configurações dos telómeros. (a) DNA telomérico em cadeia dupla e simples; (b) *T-loop* formado devido à intercalação da cadeia simples com o DNA duplo com a formação de um segundo *loop*, o *D-loop*. (Adaptado de [24])

A extremidade 3' de cadeia simples nos telómeros termina com uma sequência rica em guaninas que, consequentemente apresenta um elevado potencial para formar G-quadruplex. Esta estrutura parece ter uma função de proteção nos telómeros, evitando a degradação nucleolítica e o alongamento inapropriado promovido pela enzima telomerase [20]. Um exemplo da formação do G-quadruplex é durante a replicação, por ser um momento em que a extremidade 3' de cadeia simples se encontra temporariamente exposta e sem interação com

proteínas, existe uma maior probabilidade da formação do G-quadruplex que parece ter um papel protetor contra a perda genética durante o ciclo celular [9, 25].

No entanto a formação de estruturas de G-quadruplex inibem diretamente a atividade da telomerase, por isso uma opção de terapia passa pela síntese de ligandos que estabilizem esta estrutura podendo, então, interferir com a função desta enzima, como ainda atuarem como possíveis inibidores da mesma e, conseqüentemente, terem uma potencial ação anticancerígena [26].

### 1.2.2.2. Genes tumorais

Os motivos de G-quadruplex são muito abundantes em regiões promotoras tumorais, com aproximadamente 50% dos genes a exibirem estas seqüências nos 1000 pb do local de iniciação da transcrição, sugerindo que a formação do G-quadruplex pode influenciar de forma temporária e mecanicamente a atividade transcricional. Assim, a estabilização desta estrutura de DNA com ligandos pode promover uma alteração funcional ocorrendo modulação específica da expressão dos genes regulados por estas seqüências promotoras. Neste contexto, a regulação da expressão genética via G-quadruplex surge como uma nova estratégia terapêutica, tendo como alvo doenças relacionadas com os genes, nomeadamente o cancro [16, 27]. Concretamente, neste caso sabe-se que o G-quadruplex geralmente é menos usual em promotores de genes supressores de tumores e mais frequente em promotores de oncogenes, sugerindo a importância do controlo da sua expressão [16].

Em contraste com o que acontecia nos telómeros, em que a seqüência envolvida era principalmente uma cadeia simples de DNA (ssDNA), já no caso dos promotores, o G-quadruplex é formado apenas a partir de uma cadeia dupla de DNA (dsDNA). Os promotores são ainda, reconhecidos por proteínas específicas, denominadas por fatores de transcrição, que auxiliam na regulação transcricional, que no caso de existirem estruturas de G-quadruplex formadas poderá impedir a ligação destes fatores (Figura 6) [28].

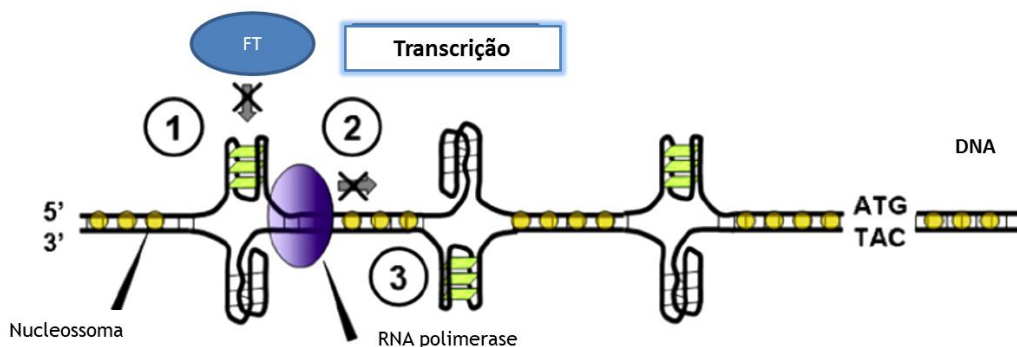


Figura 6: Influência do G-quadruplex na expressão genética, podendo inibir a ligação de fatores de transcrição (FT) e abolir a síntese de RNA (1). A presença do G-quadruplex induz a abertura da cadeia dupla que facilita o começo da transcrição (2). Porém pode impedir a ação da RNA polimerase (3). (Adaptado de [21])

O G-quadruplex pode ser encontrado em diversos promotores, nomeadamente *c-MYC*, *c-KIT*, *bcl-2*, *VEGF KRAS* e *HIF-1a*, sendo que, destes, os dois primeiros são os mais importantes e mais estudados [28].

#### 1.2.2.2.1. *c-MYC*

O *c-MYC* é uma importante oncoproteína e fator de transcrição, que desempenha um papel importante na proliferação celular e indução da apoptose. O gene *c-MYC*, que codifica esta proteína, é altamente regulado em células normais. No entanto, a sua sobre expressão está associada à progressão de mais de 80% dos tumores, como por exemplo tumores gastrointestinais, do pulmão, de ovários e da mama, bem como linfomas não-Hodgkin e glioblastomas. A sua desregulação pode ser resultado de translocação, mutação e/ou amplificação do gene [29, 30].

A transcrição de *c-MYC* está sob um controlo complexo de múltiplos promotores. Um importante elemento na região do promotor de *c-MYC* denomina-se por elemento de hipersensibilidade nuclease III<sub>1</sub>, ou *NHE III<sub>1</sub>*, e controla mais de 90% da transcrição de *c-MYC*. Este elemento contém cerca de 6 sequências contínuas de guaninas, podendo surgir diferentes topologias de G-quadruplex, sendo que a sua estabilização leva à inibição da expressão de *c-MYC*, com a formação mais frequente de estruturas intramoleculares com cadeias paralelas [7, 29].

A regulação da expressão de *c-MYC* através de proteínas pode ser efetuada por 4 diferentes proteínas, sendo a NM23-H2 e a nucleolina as mais relevantes, as quais foram identificadas como proteínas que facilitam o desenrolamento e o enrolamento do G-quadruplex, respetivamente [7, 31].

#### 1.2.2.2.2. *c-KIT*

O gene *c-KIT* codifica um recetor de cinase de tirosina, cuja ligação ao seu ligando ativa uma cascata de sinalização que controla o crescimento e a proliferação celular. A transformação oncogénica do *c-KIT* e o seu aberrante funcionamento pode ser resultado de uma mutação ou sobre-expressão do seu gene e ocorre em vários tipos de cancro e afeta diversos tipos de células, como mielóides, germinativas, melanócitos, células hematopoiéticas e intersticiais de Cajal [29, 32]. A atividade de *c-KIT* encontra-se elevada em tumores do estroma gastrointestinal ou “GIST”, e a sua terapia mediante pequenas moléculas, como o *imatinib* (Glivec/Gleevec™, da Novartis), encontra-se clinicamente validada, sendo o fármaco referido um inibidor específico da cinase de tirosina [32].

Tal como com outras pequenas moléculas para fins terapêuticos contra cinases, o seu uso tem levado ao surgimento de novos padrões de resistência, nomeadamente mutações nos locais ativos destes alvos, levando à diminuição de ligandos que interagem e, conseqüentemente, da eficácia destas terapias. Por isso, em alternativa, a regulação seletiva de genes a um nível

transcricional fornece uma via opcional para a inibição do *c-KIT*, como por exemplo pela estabilização do G-quadruplex [28].

Neste contexto, dois motivos de sequência de G-quadruplex foram identificados na região do promotor *c-KIT*, denominados de *KIT1* e *KIT2*, sendo que este último se encontra na região requerida para a atividade do promotor central [32].

Em termos estruturais, foi demonstrado que o *c-KIT1* forma estruturas de G-quadruplex intermoleculares com cadeias paralelas, enquanto o *KIT2* uma estrutura intramolecular [29].

### 1.2.3. Estabilização da estrutura G-quadruplex com ligandos

A estabilização da estrutura do G-quadruplex com pequenas moléculas emergiu como uma nova abordagem terapêutica, uma vez que tem a capacidade de interferir com a expressão de oncogenes e com a manutenção dos telômeros pela telomerase em células cancerígenas [33].

No geral, os ligandos com capacidade de estabilizar o G-quadruplex apresentam na sua estrutura anéis aromáticos, que favorecem a sua interação com as tétradas de guanina através do empilhamento  $\pi$ - $\pi$ . Os ligandos seletivos do G-quadruplex que apresentam estas características e que mais têm sido estudados foram, nomeadamente, a porfirina catiónica TMPyP4, a telomestatina, o BOQ1, o BRACO-19, a quarfloxina, e o RHPS4 [33]. Porém, estes ligandos possuem a tendência de se ligarem avidamente e indiscriminadamente a um leque variado de macromoléculas celulares, como por exemplo a albumina sérica, sendo esta uma propriedade relacionada com a sua grande superfície hidrofóbica. Outra característica é serem altamente lipofílicos, o que possibilita a sua acumulação nas membranas da célula, podendo ocorrer a disrupção celular [34].

O ligando ideal para a estabilização do G-quadruplex deve apresentar características como a ter permeabilidade adequada para a membrana nuclear e possuir baixo peso molecular até o limite 500 daltons, de forma a melhorar a sua entrada na célula, o que não acontece com a maior parte dos ligandos atuais, embora existam moléculas que são transportadas eficientemente. Outra característica é evitar usar moléculas que possam possuir toxicidade celular ou que tenham na composição grupos funcionais que o sejam [34, 35].

Neste âmbito, têm sido desenvolvidas por vários grupos de investigação, diversas classes de pequenas moléculas com a capacidade de se ligar ao G-quadruplex, sendo classificadas de acordo com a sua natureza catiónica, que podem ser ligandos com poliaminas e com capacidade de protonação, ligandos aromáticos N-metilados e, por fim, os ligandos macrociclos neutros [35].

Por outro lado, existem os compostos naturais, sendo que estes, em geral, não são favoráveis para a indústria farmacêutica, pois habitualmente possuem uma via sintética complexa e

difícil de obter estruturas análogas com atividade. No entanto, ao longo dos anos, novas vias de síntese têm possibilitado ultrapassar alguns desses problemas. Neste grupo pode-se encontrar a telomestatina, um polioxazol não carregado [33].

Tendo em conta estes fatores, a síntese de novos compostos com elevado rendimento obtidos de uma via sintética simples e de baixa toxicidade celular, como ainda apresentar elevada afinidade, seletividade e capacidade estabilizadora do G-quadruplex, é o objetivo desejável de um potencial ligando [33].

#### 1.2.3.1. Telomestatina

A telomestatina (Figura 7) é um composto natural que foi isolado a partir de *Streptomyces anulatus* em 2001 por Shin-ya e colaboradores [36], e que tem vindo a ser extensivamente estudado, devido à sua seletividade para o G-quadruplex e por apresentar propriedades biológicas [33].

Este macrociclo tem uma estrutura composta por 7 anéis oxazóis que interage por empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com uma téttrade e por interações hidrofóbicas, com capacidade preferencial de estabilizar fortemente a topologia paralela do G-quadruplex telomérico, apresentando valores de temperatura de *melting* ( $\Delta T_{1/2}$ ) de 24°C [33, 37]. Esta estabilização não requer a presença de sais, ocorrendo apenas pela adaptação perfeita entre este ligando e o G-quadruplex, podendo esta ser a principal razão da sua elevada seletividade, que é cerca de 70 vezes mais elevada em comparação com o dsDNA [13].

A telomestatina tem uma forte capacidade de inibir a atividade da telomerase, apresentando um  $IC_{50}$  entre 0,1 e 5 $\mu$ M. A sua atividade antiproliferativa foi demonstrada numa grande variedade de linhas de células cancerígenas, incluindo carcinoma pancreático humano, cancro da mama, leucemia mieloide e linhas de neuroblastoma, tendo sido ainda demonstrado que este composto não é significativamente citotóxico para as células não cancerígenas [33].

No entanto, a via sintética da telomestatina é complexa e de baixo rendimento. Contudo, novos derivados deste composto têm sido desenvolvidos para ultrapassar estas desvantagens [35, 37].

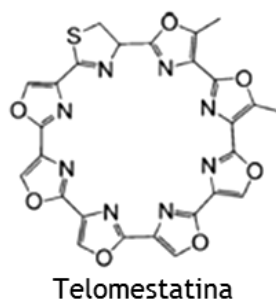


Figura 7: Estrutura química da telomestatina, um ligando com capacidade de estabilizar a topologia paralela do G-quadruplex telomérico. (Adaptado de [35])

### 1.2.3.2. TMPyP4

As porfirinas têm um interesse particular na área do cancro, mais propriamente no tratamento fotodinâmico, tendo a capacidade de se acumular em tecidos tumorais. Em geral, apresentam uma estrutura planar composta por múltiplos anéis aromáticos, e devido a isto conseguem também interagir e estabilizar o G-quadruplex [9, 28].

O TMPyP4 ou *5,10,15,20-tetra-(N-methyl-4-pyridyl)porphyrin* (Figura 8), é uma das porfirinas catiónicas mais estudadas, conseguindo inibir a atividade da telomerase com um  $IC_{50}$  de cerca de  $6\mu M$ , como ainda diminui a expressão de oncogenes, como o *c-MYC*, o *c-KIT* e o *bcl-2* [28, 33]. A atividade biológica desta porfirina tem vindo a ser investigada em diversas linhas celulares cancerígenas humanas, obtendo-se  $IC_{50}$  entre 23 e  $310\mu M$ , nomeadamente em linhas celulares de cancro da mama, linfoma, retinoblastoma e leucemia. Adicionalmente foi também estudada em linhas celulares não cancerígenas, no entanto, apresentou uma moderada a intensa citotoxicidade, com um  $IC_{50}$  abaixo de  $13\mu M$  [33].

Além disso, demonstra possuir uma baixa seletividade entre o G-quadruplex e o dsDNA, contudo pode interagir e estabilizar, preferencialmente a topologia paralela do G-quadruplex. Contudo, ao contrário da telomestatina, possui uma via sintética acessível, e a sua múltipla interação com o G-quadruplex encontra-se francamente caracterizada [33].

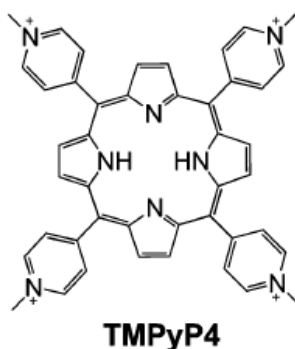


Figura 8: Estrutura química do ligando TMPyP4, que possui a capacidade de estabilizar a topologia paralela do G-quadruplex. (Adaptado de [35])

### 1.2.3.3. Outros ligandos

Para além dos ligandos telomestatina e TMPyP4, existem muitos outros compostos de diferentes naturezas e origens a serem estudados como potenciais ligandos de G-quadruplex. A classe dos compostos naturais e os seus derivados, em particular, têm sido usados há muito tempo na medicina ocidental e oriental, uma vez que vários destes, por serem de baixo custo e estarem disponíveis, têm vindo a atrair a atenção para o seu uso e para síntese dos seus derivados. De facto, muitas destas moléculas têm sido identificadas como potenciais antitumorais, incluindo a camptotecina e a colquicina [11].

Além disso, a complexidade e a diversidade molecular, e a elevada seletividade e atividade biológica específica são também características dos produtos naturais, bem como ainda o facto de muitos destes terem a capacidade de se ligarem a recetores, pelo que, considerando as suas características, deve-se considerar a possibilidade de procurar novos produtos naturais e seus derivados para a interação e estabilização do G-quadruplex [11, 35].

Em 2007, Brassart e colaboradores identificaram dois compostos com capacidade de interagir com o G-quadruplex telomérico e induzir o desencapsulamento dos telómeros [38]. Estes compostos derivam dos produtos naturais malouetina e funtumina (Figura 9), sendo que o primeiro destes é um esteroide alcaloide que foi isolado a partir das folhas de *Malouetia bequaertiana* em 1960, tendo sido descrito como inibidor da atividade neuromuscular e moderadamente tóxico [39]. Por sua vez, a funtumina foi isolada de *Funtuma latifolia stapf*, apresentando propriedades cardiotónicas [38].

Estes dois compostos naturais e seus derivados apresentam uma estrutura não planar e não aromática, sendo a funtumina guanil-hidrazona, ou FG, o que possui maior capacidade de estabilização do G-quadruplex telomérico principalmente por interação hidrofóbica entre o composto e a cavidade maior da conformação antiparalela [11, 38, 40]. Comparativamente com a malouetina, demonstrou-se que o FG é um potente agente antiproliferativo de linhas celulares cancerígenas, como por exemplo de carcinoma pulmonar. O mesmo se verifica em relação à seletividade entre o G-quadruplex e o dsDNA, em que o FG tem uma maior seletividade que a malouetina, porém inferior à da telomestatina [38].

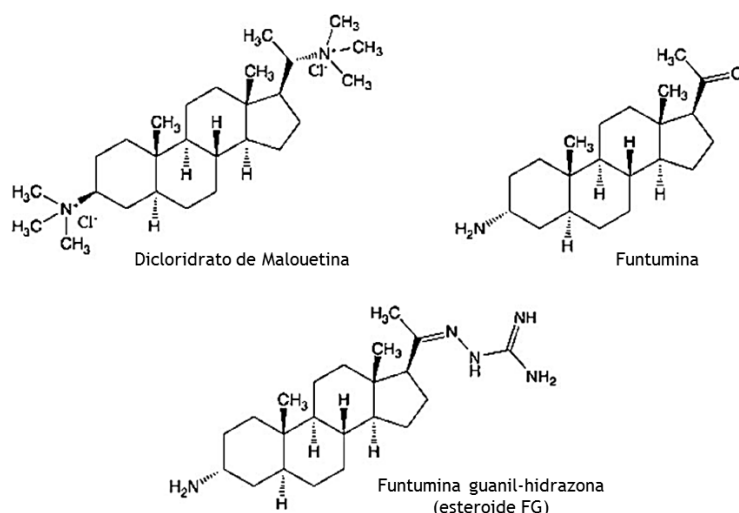


Figura 9: Estrutura química de derivados de esteroides. (Adaptado de [38])

Dentro do grupo dos esteroides, encontra-se a classe dos ácidos biliares, os quais desempenham um papel importante ao nível biológico, tendo já vários compostos deste grupo sido estudados pela sua capacidade de interagir com o DNA, e pelo seu efeito antitumoral e antimicrobiano [40, 41]. Neste contexto, o BAA (Figura 10) é um dímero de ácido cólico conjugado com aminoácidos que consegue seletivamente induzir a formação do G-quadruplex paralelo intramolecular na região promotora do oncogene *c-MYC* [42]. A sua atividade antiproliferativa foi observada numa linha celular cancerígena da mama, mais propriamente na linha MCF-7, onde apresentou um  $IC_{50}$  de cerca  $10\mu M$ , bem como um decréscimo de 21% da expressão de *c-MYC* a uma concentração de  $1\mu M$  [42].

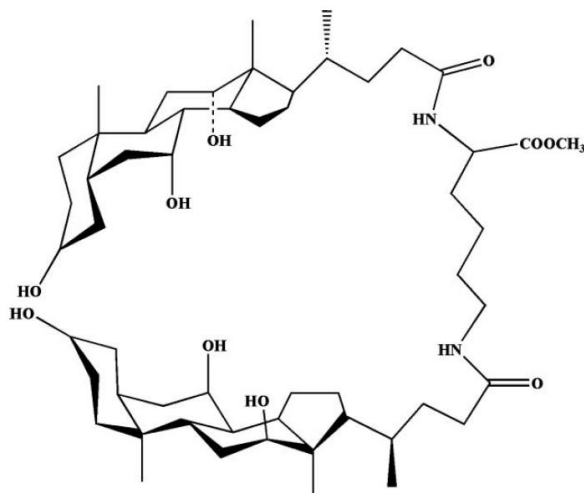


Figura 10: Estrutura do composto BAA, formado por dois ácidos cólicos interligados por um aminoácido, com capacidade de interagir com o G-quadruplex e estabilizar a topologia paralela. (Adaptado de [42])

No entanto, como estes compostos pertencentes à classe dos esteroides, podem ser modificados de forma a melhorar a sua seletividade e potência [38].

## 1.3. Esteroides

### 1.3.1. Generalidades estruturais

Os esteroides consistem numa classe de compostos de grande importância que têm vindo a ser estudados ao longo das últimas décadas, devido ao elevado interesse pela sua ação em termos fisiológicos, patológicos e farmacológicos. Esta classe de compostos é formada por moléculas geralmente lipofílicas, biologicamente ativas e derivadas do terpeno, mais propriamente do triterpeno [41, 43].

Quimicamente os esteroides apresentam, habitualmente, como estrutura base um conjunto de 17 carbonos no total, que formam um esqueleto com 4 anéis denominado de ciclopentanoperidrofenantreno. Ao nível biológico, todos os esteroides derivam da via biossintética da acetil coenzima A [41, 44].

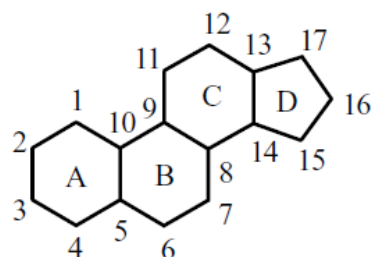


Figura 11: Estrutura base do esteroide, com a representação dos quatro anéis designados pelas letras A, B, C e D, e respetiva numeração dos carbonos. (Adaptado de [41])

Os seus quatro anéis são designados com as letras A, B, C e D, e a numeração dos carbonos inicia-se no anel A (Figura 11).

Todas as moléculas desta classe possuem a mesma estrutura base, no entanto diferem no grau de metilação nos carbonos 10 e 13, e na cadeia carbonada ligada ao C17, podendo possuir insaturações e grupos funcionais como cetonas, ácidos carboxílicos e álcoois, entre outros, podendo-se originar ligações  $\alpha$ , sendo representadas em tracejado, ou ligações  $\beta$ , representadas por linhas sólidas [41, 44, 45]. A fusão dos anéis é habitualmente *trans* e as faces são definidas pelos grupos metilo angulares, sendo que estes têm configuração *beta*. Adicionalmente, é o substituinte em C17 que determina principalmente as diferentes séries de esteroides. As modificações estruturais dos esteroides promovem alterações significativas nas suas propriedades, e consequentemente na sua atividade, tanto em termos biológicos como farmacológicos [41].

Os esteroides são vastamente usados como agentes terapêuticos na medicina, nomeadamente como diuréticos, anticoncecionais, anti-inflamatórios, na regulação do metabolismo de hidratos de carbono e proteínas, na diferenciação sexual e na terapia do cancro [46].

Na classe de esteroides encontram-se incluídos o colesterol, hormonas esteroides, ácidos biliares e esteroides provenientes de plantas ou fitoesteróis. Dada a sua relevância e

potencial, continuam a ter uma grande atenção da química orgânica e medicinal com o objetivo de se desenvolverem novos fármacos [41].

### 1.3.2. Ácidos biliares

Os ácidos biliares são moléculas anfífilas sintetizadas a partir do colesterol, exclusivamente no fígado, e secretados pela bÍlis. Estes compostos auxiliam a digestão nos intestinos, promovendo a absorção dos lípidos ingeridos, esteroides e vitaminas lipofílicas. A maior parte dos ácidos biliares são reabsorvidos no íleo e transportados de volta ao fígado ocorrendo recirculação entero-hepática, sendo de novo secretados pela vesícula biliar. Os ácidos biliares também possuem a capacidade de promover a excreção de colesterol não metabolizado para a bÍlis [47-49].

A conversão enzimática do colesterol em ácidos biliares e a excreção biliar do colesterol constituem mecanismos importantes para remover este substrato do organismo. Adicionalmente, os ácidos biliares têm a capacidade de se ligarem a recetores nucleares, que consequentemente regulam a expressão dos genes responsáveis pela homeostase do colesterol. Além disso, também intervêm na regulação do metabolismo energético da glucose e lipídica, no metabolismo de fármacos e na modulação da resposta imunitária, a partir da ativação e recetores intracelulares [47, 48].

Estruturalmente, os ácidos biliares apresentam o esqueleto comum aos esteroides, diferenciando-se destes por possuírem um grupo hidroxilo em C3 e uma cadeia carbonada lateral em C17 composta por 5 carbonos e terminando num ácido carboxílico [46].

A fusão em *cis* dos anéis A e B dos ácidos biliares dá a origem a uma curvatura da molécula, que acaba por formar uma concavidade, providenciando propriedades diferentes às duas faces criadas. Nos ácidos biliares, a face cônica, ou face  $\alpha$ , é hidrofílica devido à presença dos grupos hidroxilo e do ácido carboxílico da cadeia lateral, enquanto a face  $\beta$  é hidrofóbica por haver átomos de carbono (metilos angulares) e hidrogénios, à exceção do ácido ursodesoxicólico que possui um hidroxilo na posição 7, sendo, por isso, o composto mais hidrofílico dos ácidos biliares (Figura 12). A fusão dos anéis A e B também pode ser em *trans*, no entanto, as junções entre os anéis B e C e C e D são habitualmente em *trans* [41, 44-46].

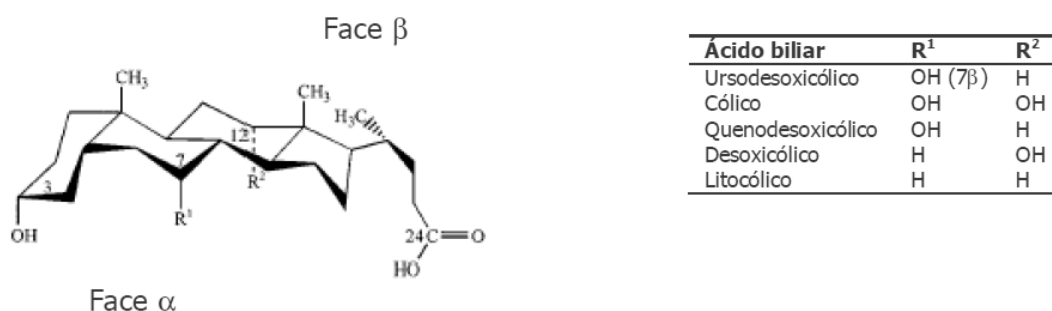


Figura 12: Estrutura química dos ácidos biliares, com a representação da face  $\alpha$  e face  $\beta$ , dada pela fusão em *cis* do anel A e B. (Adaptado de [50])

A biossíntese dos ácidos biliares a partir do colesterol envolve pelo menos 5 passos, estando envolvidas 17 enzimas, no entanto, pode não ser uma síntese direta (Figura 13). Neste contexto, julga-se que a primeira fase seja o passo limitante da reação, em que ocorre a oxidação do colesterol pela 7 $\alpha$ -hidroxilase ou CYP7A1 no retículo endoplasmático, formando 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol. Este é convertido em 7 $\alpha$ -hidroxi-4-colesten-3-ona, por ação de uma desidrogenase, denominada por HSD3B7. A partir deste intermediário iniciam-se duas vias importantes na biossíntese dos ácidos biliares primários que levam à formação de ácido cólico e de ácido quenodesoxicólico. A hidroxilação do carbono 12 pela CYP8B1 leva à formação da estrutura base do ácido cólico, que por sua vez é reduzido estereosseletivamente no carbono 5. Já o ácido quenodesoxicólico não ocorre a hidroxilação no carbono 12 [47, 51].

Outro passo metabolicamente importante é mediado pela enzima 27-hidroxilase ou CYP27A1 e ocorre na mitocôndria, que catalisa a clivagem oxidativa da cadeia lateral, sendo esta uma das enzimas mais importantes na regulação da biossíntese dos ácidos biliares, e que juntamente com a enzima CYP8B1 regulam o equilíbrio do rácio ácido cólico/ ácido quenodesoxicólico [47, 48, 51].

Os ácidos biliares podem ser classificados como primários, ou seja têm origem a partir do colesterol, que são o ácido cólico e quenodesoxicólico, e secundários por resultarem da transformação dos anteriores pelas bactérias durante a passagem pelo intestino, ou seja o ácido litocólico e desoxicólico (Figura 13) [48].

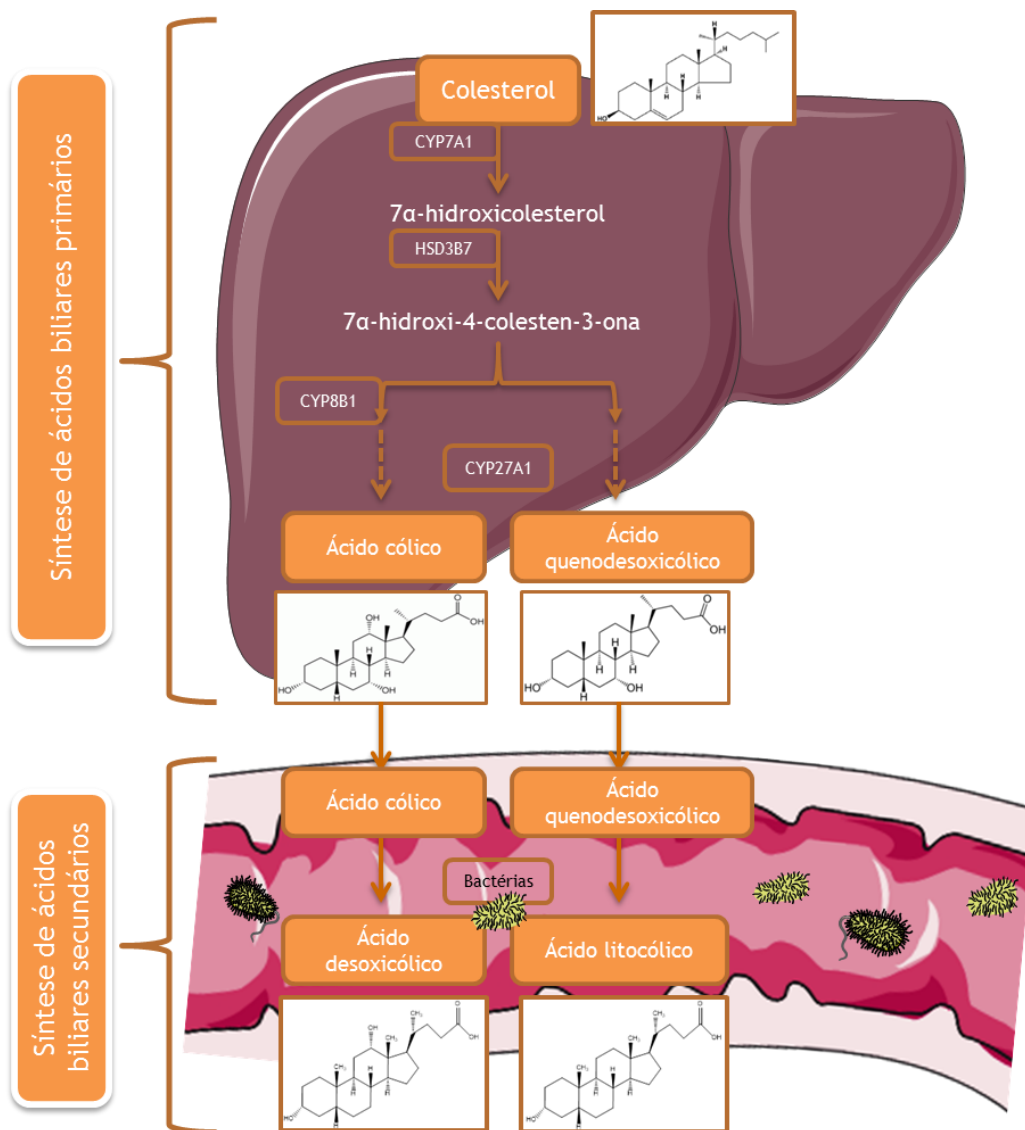


Figura 13: Resumo da biossíntese dos ácidos biliares a partir do colesterol, sendo convertido em 7α-hidroxicolesterol por ação da enzima CYP7A1, que posteriormente a desidrogenase HSD3B7 converte-a em 7α-hidroxi-4-colesten-3-ona. A partir deste intermediário iniciam-se duas vias de síntese com diversas enzimas, culminando na produção pela enzima CYP27A1 de ácido cólico e quenodesoxicólico, sendo estes os ácidos biliares primários. No intestino grosso, por ação de enzimas bacterianas ocorre a remoção do grupo hidroxila do carbono 7, convertendo o ácido cólico e quenodesoxicólico em ácido desoxicólico e litocólico, respectivamente. Posteriormente são excretados ou entram na circulação enterohepática. (Adaptado de [47])

Os ácidos biliares primários são secretados na forma conjugada com a glicina ou taurina e, no intestino são biotransformados. Nos intestinos delgado e grosso, cerca de 10% dos ácidos biliares conjugados são desconjugados por ação de hidrolases bacterianas, tornando-se ácidos biliares livres. Estes têm a capacidade de atravessar a membrana plasmática por difusão passiva, sendo, assim, reciclados ao longo do trajeto intestinal. No intestino grosso ocorre a remoção do grupo hidroxila no carbono 7, formando-se o ácido litocólico e o ácido desoxicólico a partir dos ácidos quenodesoxicólico e cólico, respectivamente. Estes ácidos biliares secundários são os mais hidrofóbicos desta classe de esteroides, sendo, por isso, habitualmente os mais citotóxicos. Adicionalmente existem ainda os ácidos ursodesoxicólico e

sulfolítico, ácidos biliares terciários, que se formam a partir dos que foram absorvidos e que entram na circulação enterohepática, por serem mais solúveis, há uma maior facilidade na sua excreção renal e desintoxicação [47, 52].

Os ácidos biliares aparentam ter um papel significativo na etiologia do cancro, nomeadamente no cancro intestinal. Neste âmbito, estudos têm vindo a indicar que determinados hábitos alimentares têm um efeito sobre o metabolismo dos ácidos biliares, podendo desempenhar um papel na carcinogénese. De facto, uma ingestão muito rica em gorduras, principalmente de fonte animal, é um dos fatores importantes no desenvolvimento de cancro. Inicialmente o ácido cólico e o ácido desoxicólico foram considerados agentes mutagénicos, entretanto nesta última década, tem-se vindo a demonstrar que o mecanismo de ação dos ácidos biliares passa pela ligação ao DNA e ativação de determinadas vias de sinalização, sendo por isto e por outras razões, considerados promotores de tumor, em vez de mutagénicos [47, 51].

Por outro lado, nas últimas décadas tem-se também demonstrado o potencial dos ácidos biliares e seus derivados em aplicações farmacológicas, incluindo no tratamento de insuficiência de ácidos biliares, doenças hepáticas e na dissolução de cálculos biliares de colesterol (sendo, para isto, usados ácido cólico, ácido quenodesoxicólico e ácido ursodesoxicólico), como também na absorção intestinal do colesterol. O ácido ursodesoxicólico é usado na medicina tradicional chinesa no tratamento de doenças digestivas, por ser altamente solúvel e por não ser tóxico, inibindo a apoptose de células hepáticas, como ainda reduz a citotoxicidade de ácidos biliares em circulação no organismo [47, 53].

Além disso, vários ácidos biliares têm demonstrado propriedades antivirais, antifúngicas e antibacterianas. Adicionalmente, na terapia génica, os ácidos biliares conjugados com poliaminas, mais concretamente os ácidos litocólico e desoxicólico, demonstram conseguir ligar ao DNA e promover a sua condensação. Outros derivados de ácidos biliares têm sido aplicados na terapia do cancro, como antitumorais ou veículos de transporte de compostos citostáticos [53].

#### 1.3.2.1. Ácidos biliares secundários

Como já referido, o ácido litocólico é formado a partir do ácido quenodesoxicólico por desconjugação do grupo taurina ou glicina e redução do carbono 7, realizada por bactérias da flora intestinal. Este ácido biliar é pouco absorvido e concentra-se no cólon, podendo aparecer em concentrações de 200  $\mu\text{M}$  ou mais nas fezes (Figura 14) [54]. A este grupo pertence ainda o ácido desoxicólico, um ácido biliar formado a partir do ácido cólico, que sofre também desconjugação por ação bacteriana, representando 50% do conjunto de ácidos biliares no organismo. Contudo, estes têm a capacidade de aumentar a hidrofobicidade do

conjunto de ácidos biliares presentes, o que tem sido associado com o aumento da toxicidade e da secreção de colesterol pelo fígado [55].

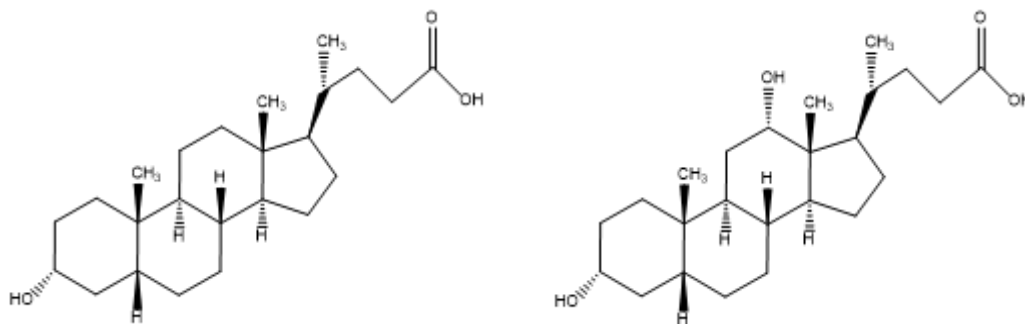


Figura 14: Estrutura dos ácidos biliares secundários, mais propriamente do ácido litocólico à esquerda e do ácido desoxicólico à direita.

Quando existem concentrações elevadas de ácidos biliares secundários, podem ocorrer danos não específicos das membranas celulares, resultando na destruição do epitélio intestinal. Consequentemente, o organismo, numa tentativa de reparar o dano, ativa reações inflamatórias que geram um aumento da proliferação de células não diferenciadas, consequentemente aumenta o risco de transição celular para uma fase pré-cancerígena. Esta proliferação aumentada encontra-se associada com a fase inicial da tumorigênese colo-retal [56].

Os ácidos biliares secundários podem também causar danos no DNA, stress oxidativo e, como já referido, ter propriedades pró-inflamatórias. Neste âmbito, a produção de espécies reativas de oxigénio e de azoto ocorre, ao envolver a ativação de diversas enzimas da membrana plasmática, nomeadamente a fosfolipase A. Isto pode levar a uma perturbação da membrana mitocondrial, aumentando mais os níveis de espécies reativas que, numa última instância, levam a danos no DNA e à ativação da apoptose, ou à disrupção da membrana plasmática e mitocondrial. Assim sendo, estes compostos podem promover o início de tumor ou a apoptose espontânea [56].

A instabilidade genómica produzida pelos ácidos biliares secundários pode ser devida a vários mecanismos, incluindo a disrupção da mitose, defeitos nos pontos de verificação, dano oxidativo do DNA, entrada do ciclo celular na fase G1 e/ou G2, com um alinhamento inapropriado dos cromossomas durante a anafase. Estudos prévios sugerem que o ácido desoxicólico poderá induzir mutações dos genes, nomeadamente o *K-ras* [56, 57].

Já o ácido litocólico, para além de influenciar a dinâmica da respiração mitocondrial e a produção de radicais livres, consegue também induzir a diminuição do encurtamento dos telómeros e retardar a replicação celular. Num estudo em que foi usada uma linha celular de neuroblastoma, revelou que este composto tem um efeito apoptótico por ativação de vias de sinalização intrínsecas e extrínsecas, por exemplo a ativação intracelular da cascata das caspases com a formação do apoptossoma culminando na apoptose, por ativação do recetor

acoplado à proteína G, TRG5. O seu efeito apoptótico foi ainda verificado noutras linhas celulares cancerígenas, nomeadamente da próstata e da mama [58, 59].

Apesar do efeito anticancerígeno do ácido desoxicólico não ter sido ainda muito estudado, existem alguns estudos que demonstram o seu potencial antitumoral em linhas celulares cancerígenas do cancro colo-retal, induzindo a apoptose e diminuindo a proliferação celular [60].

Tendo em conta que os ácidos biliares secundários são os mais hidrofóbicos desta classe, que possuem a capacidade de se ligarem a recetores membranares e nucleares, ativando vias de sinalização e até mesmo se ligarem ao DNA, a produção de derivados destes compostos pode ser importante no desenvolvimento de novos agentes antitumorais.

### 1.3.3. Esteroides macrociclos

Como já referido, na literatura estão descritos diversos ácidos biliares e derivados com potencial farmacológico, por exemplo no transporte de compostos específicos para atuar no fígado, aumentar a absorção de péptidos no intestino e para a diminuição dos níveis de colesterol no organismo [51, 53].

A produção de derivados dos ácidos biliares deve-se a vários fatores, como serem constituídos por uma estrutura extensa e rígida composta por vários anéis. Outra propriedade é a presença de vários grupos funcionais bem distribuídos pela sua estrutura, que podem ser diferenciados e modificados de diversas formas. Além disso, os seus precursores encontram-se facilmente disponíveis e são de baixo custo [61].

Na terapia génica, os ácidos biliares conjugados com poliaminas são potenciais agentes com elevado interesse. De facto, as suas cadeias compostas por vários azotos possuem a habilidade de ligar e de favorecer as interações electrostáticas entre os seus catiões e os fosfatos aniónicos do DNA ou RNA, uma vez que sob condições fisiológicas (pH 7,4), as poliaminas encontram-se parcialmente protonadas [53, 62].

A conjugação de poliaminas com ácidos biliares, mais propriamente com os ácidos litocólico e desoxicólico, é encontrada na literatura, havendo estudos em que variam o comprimento da cadeia, a posição desta na estrutura e a quantidade de amina por molécula de ácido biliar, bem como a sua associação com a interação ao DNA. Num estudo em particular, foi demonstrado que a carga molecular, por si só, não é determinante para os seus efeitos, apesar de longas cadeias de aminas os favorecer, sugerindo que a interação hidrofóbica provavelmente ocorra primeiro, por existir uma baixa solubilidade dos compostos em água (Figura 15) [62, 63].

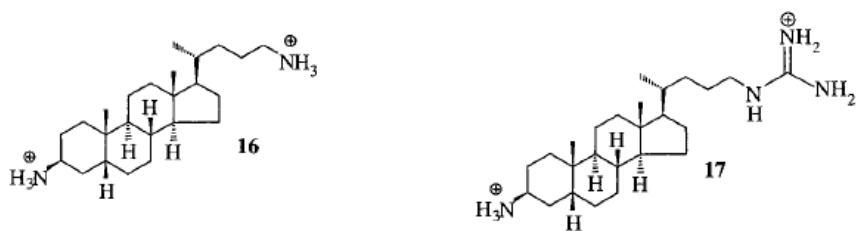


Figura 15: Estrutura de esteroides conjugados com aminas, derivados do ácido litocólico. (Adaptado de [63])

Dentro do grupo dos derivados do ácidos biliares encontram-se os macrociclos, nomeadamente os monoméricos, que são estruturas cíclicas e podem ser formadas por um ácido biliar e uma cadeia que liga habitualmente o carbono 24 com o 3, sendo que esta cadeia pode ter diferentes naturezas, possuir elementos como oxigénios, azotos e/ou anéis aromáticos. Estes derivados são usados, por exemplo, na ligação e reconhecimento de recetores membranares ou nucleares, possuindo como vantagem o facto de serem considerados agentes de baixo peso molecular (Figura 16) [53].

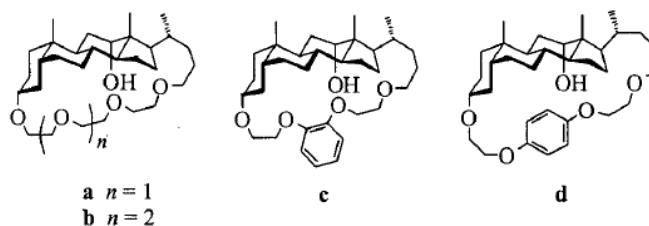


Figura 16: Estruturas monoméricas derivadas do ácido desoxicólico. (Adaptado de [53])

No entanto, neste contexto, existem outros macrociclos, designados por colafanos, que são formados por dímeros de ácidos biliares com grupos espaçadores, que não são obrigatoriamente poliaminas, podendo também ser cadeias com anéis aromáticos, e que podem não ser iguais. Por outro lado, o composto pode ser acíclico na forma dimérica, como é o caso do composto BAA, e só apresentar um grupo espaçador ou apenas um ácido biliar (Figura 17) [51, 53].

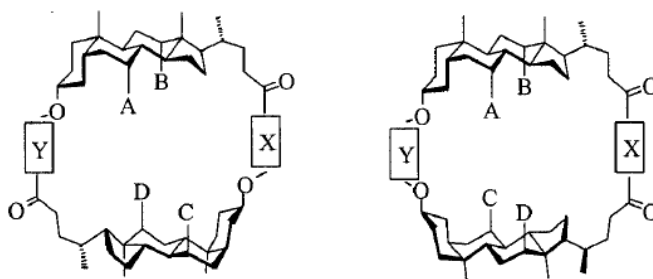


Figura 17: Estrutura de derivados diméricos de ácidos biliares, mais propriamente colafanos, em que X e Y representam os grupos espaçadores que podem ser iguais ou diferentes, e A-D representam a funcionalidade catalítica ou de ligação. (Adaptado de [53])



## 2. Objetivos

O objetivo geral deste estudo é desenvolver novos compostos com potencial interesse antitumoral baseados na estrutura de ácidos biliares combinados com poliaminas. Para isso, estabeleceram-se como objetivos específicos:

- ❖ Síntese de compostos macrociclos a partir do esteroide ácido litocólico e desoxicólico, com o acoplamento de um anidrido succínico, seguido de uma poliamina (Figura 18)

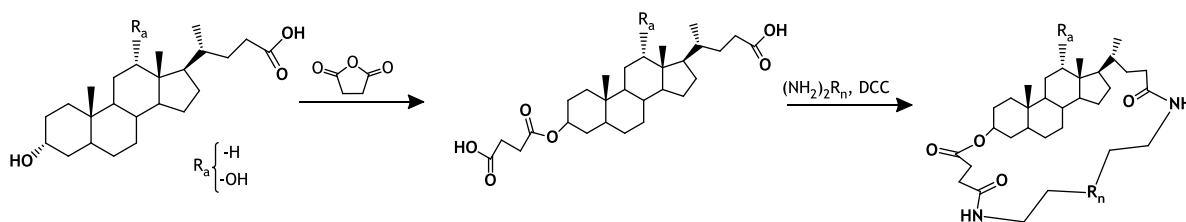


Figura 18: Síntese do macrociclo a partir do ácido biliar por dois passos reacionais, em que  $R_a$  pode ser igual a  $-H$  ou  $-OH$  correspondendo ao ácido litocólico ou ácido desoxicólico, respetivamente, enquanto  $R_n$  representa uma cadeia poliamina.

- ❖ Estudar a viabilidade celular e da atividade antiproliferativa dos compostos sintetizados nas linhas celulares cancerígenas: LNCaP, MCF-7, T47-D e U87, bem como ainda estudar a seletividade destes com linha celular de fibroblastos normais da derme humana, através do ensaio MTT.
- ❖ Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo, com marcação por iodeto de propídio.
- ❖ Estudar a interação dos compostos sintetizados com uma sequência de DNA G-quadruplex, através do método de dicroísmo circular.



## 3. Secção experimental

### 3.1. Síntese química

#### 3.1.1. Reagentes e solventes.

Para o procedimento de síntese, os reagentes ácido litocólico, desoxicolato de sódio, anidrido succínico, 4-dimetilaminopiridina (DMAP), *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) e as poliaminas utilizadas (4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina, tetraetilenopentamina, 4,9-dioxa-1,12-dodecanodiamina, dietilenotriamina e *N,N'*-bis-(3-aminopropil)etilenodiamina) foram adquiridas à Sigma-Aldrich (Portugal).

Os solventes: piridina, tetrahidrofurano (THF), clorofórmio, diclorometano, hexano, acetato de etilo e éter dietílico, utilizados nos procedimentos e *workups* das diversas reações foram igualmente comprados à Sigma-Aldrich (Portugal).

#### 3.1.2. Procedimentos de cromatografia

Na análise e monitorização das reações foram utilizadas placas de cromatografia em camada fina (CCF) Kieselgel 60 F254 da Merck. O eluente utilizado foi uma mistura hexano com acetato de etilo (1:1, v:v). Após a eluição, as placas foram observadas sob luz ultravioleta a 254nm, posteriormente reveladas por imersão numa solução de etanol:ácido sulfúrico (95:5, v:v) seguido do seu aquecimento a 120 °C, o que permitiu o cálculo do fator de retenção (RF).

No isolamento e purificação dos compostos finais foi realizada uma coluna de cromatografia. Para isso, o produto foi dissolvido em quantidades mínimas de diclorometano e efectuou-se a coluna utilizando-se como fase estacionária sílica gel 0,060-0,200mm, adquirida à Merck, e como fase móvel acetato de etilo: hexano (1:1, v:v) ou acetato de etilo: hexano (3:1, v:v).

#### 3.1.3. Equipamentos

As reações foram realizadas sob agitação magnética e temperatura em placas da marca Heidolph. A câmara de exposição a radiação UV 254nm usada foi a CN-15.LC. Na evaporação dos solventes e concentração dos produtos, utilizou-se evaporador rotativo da marca Büchi (R-215). Os compostos foram colocados numa estufa com a temperatura de 50°C e vácuo a -0,6 bar da marca Raypa.

Na análise dos compostos utilizou-se o espectrómetro Avance III 400 Bruker para os espectros de RMN, que foram registados a 400 MHz tanto para <sup>1</sup>H-RMN e a 100 para <sup>13</sup>C-RMN, como também espectros bidimensionais (HSQC e HMBC). Neste tipo de análise, para todas as amostras utilizaram-se solventes deuterados [CDCl<sub>3</sub> ou CDCl<sub>3</sub>:CD<sub>3</sub>OD (1:1, v:v)]. Os resultados das análises de <sup>1</sup>H-RMN estão organizados na seguinte ordem: desvio químico δ (ppm), tipo de sinal, integração e indicação do hidrogénio responsável pelo sinal. Para os espectros de <sup>13</sup>C-

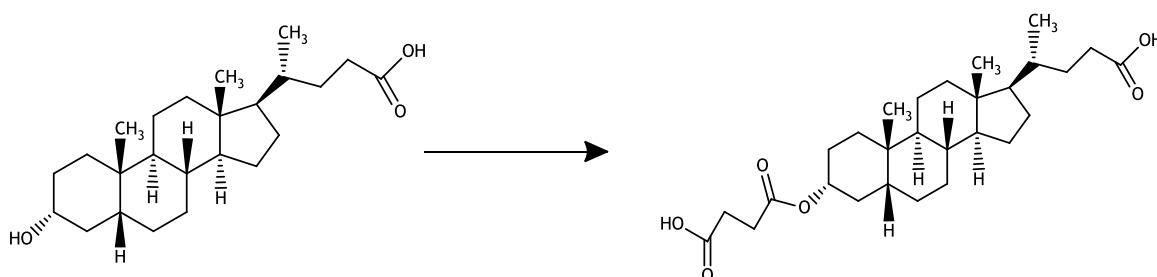
RMN, estão apresentados os desvios químicos e a atribuição do sinal, quando possível e necessário.

Como análise complementar dos compostos, traçaram-se os espectros de infravermelho através do espectrômetro Smart IR Nicolet iS10 da Thermo Scientific, através do método ATR. Os dados foram obtidos sob a forma de gráficos de transmitância, sendo as frequências expressas em  $\text{cm}^{-1}$ .

Sempre que foi possível enviou-se os compostos para a Universidade de Salamanca, a fim de serem analisados no equipamento espectrômetro QSTAR XL da marca Evisa, com o solvente metanol, de forma a se obter o espectro de massa expresso em m/z.

### 3.1.4. Procedimento experimental

#### 3.1.4.1. Ácido 3 $\alpha$ -succinoiloxi-litocólico



A reação teve como base o procedimento descrito por Kai-Hsuan Chang e colaboradores.[64] Num balão de fundo redondo de 100mL, o ácido litocólico (0,09414g; 0,69mmol) foi dissolvido em piridina (10mL), seguindo-se da adição de anidrido succínico (0,207g; 2,07mmol) e DMAP (0,084g; 0,69mmol). A reação foi colocada sob agitação magnética e refluxo durante 15 horas.

Após o tempo reacional, concentrou-se a solução resultante num evaporador rotativo, a fim de remover a piridina. Posteriormente dissolveu-se o resíduo em 400mL de clorofórmio, transferiu-se para uma ampola de extração, lavou-se com 35mL de solução aquosa de HCl 6% e depois com 35mL de água destilada. A fração orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro e filtrada sob vácuo. No fim evaporou-se o solvente e colocou-se numa estufa de temperatura e vácuo, obtendo-se um sólido composto por flocos de cor castanho dourado, com um rendimento de 61,04%.

O produto foi submetido às análises de  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -RMN e bidimensionais, IV e espectrometria de massa que apresentam sinais similares aos descritos na literatura [64]:

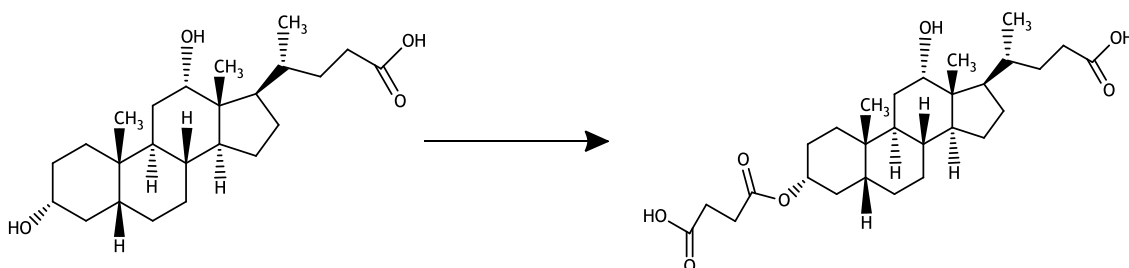
$^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ ) ppm: 0,46 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0,73 (6H, d,  $J=6,41\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ -19 e 21), 0,9-1,9 (28H, m), 1,99 (1H, m,  $J=9,06\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -23), 2,13 (1H, m,  $J=10,29\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -23), 2,39 (4H, t,  $J=3,16\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -26 e 27), 4,51 (1H, m,  $J=11,50\text{Hz}$ , CH-3B).

$^{13}\text{C}$  RMN (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ ) ppm: 11,71 (C-18), 17,93 (C-19), 20,71 (C-11), 22,99 (C-21), 24,02 (C-15), 26,20 (C-7), 26,41 (C-6), 26,89 (C-16), 28,01 (C-26), 29,46 (C-4), 30,95 (C-2), 32,05 (C-23), 34,46 (C-10), 34,86 (C-1), 35,31 (C-20), 35,75 (C-8), 40,05 (C-12), 40,38 (C-9), 41,90 (C-5), 42,63 (C-13), 55,96 (C-14), 56,40 (C-17), 74,99 (C-3), 172,25 (C-25), 174,67 (C-28), 177,089 (C-24).

Análise IV  $\text{cm}^{-1}$ : 2935, 2863, 1784, 1705, 1417, 1385, 1362, 1287, 1260, 1194, 1178.

HRMS calculado para  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_6+\text{Na}$  (M+Na): pico máximo de 499,3031g/mol, produto com 476,3031g/mol.

### 3.1.4.2. Ácido 3-succinoiloxi-desoxicólico



A síntese do intermediário do ácido desoxicólico teve por base o procedimento descrito na secção anterior (3.1.4.1). Num balão de fundo redondo de 100mL dissolveu-se o ácido desoxicólico (0,286g; 0,69mmol) em 10mL de piridina, de seguida adicionou-se o anidrido succínico (0,207g; 2,07mmol) e o DMAP (0,084g; 0,69mmol). A mistura reacional ficou sob agitação e refluxo durante 24horas.

Ao terminar o tempo reacional, concentrou-se a solução num evaporador rotativo, posteriormente dissolveu-se em 300mL de diclorometano e procedeu-se à extração líquido-líquido, primeiro com 30mL de solução de HCl 10% e depois com 30mL de água destilada. A fase orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada sob vácuo e removeu-se o diclorometano com o auxílio de evaporador rotativo, depois colocou-se numa estufa de temperatura e vácuo. Desta reação obteve-se um sólido composto de flocos de cor amarelo com um rendimento de 52,6%.

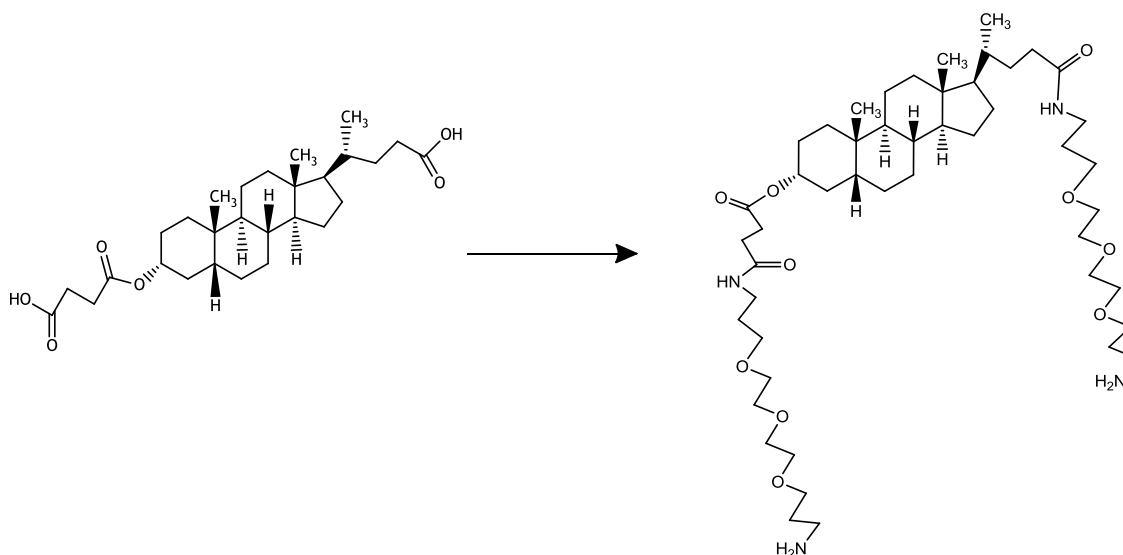
O produto foi submetido às análises de  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -RMN, bidimensionais e IV, apresentando os seguintes sinais:

$^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ ) ppm: 0,70 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0,94 (3H, d,  $J=7,59$  Hz,  $\text{CH}_3$ -19), 1,01 (3H, d,  $J=5,93$ Hz,  $\text{CH}_3$ -21), 1,1-2,0 (27H, m), 2,22 (1H, m,  $J=9,15$ Hz,  $\text{CH}_2$ -23), 2,37 (1h, m,  $J=10,82$ Hz,  $\text{CH}_2$ -23), 2,59 (4H, m,  $J=3,54$ Hz,  $\text{CH}_2$ -26 e 27), 3,98 (1H, s, OH-12) 4,72 (1H, m,  $J=11,24$ Hz, CH-3).

$^{13}\text{C}$  RMN (400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}/\text{CDCl}_3$ ) ppm: 12,99 (C-18), 17,28 (C-21), 23,32 (C-19), 24,11 (C-21), 26,49 (C-15), 26,60 (C-7), 27,41 (C-6), 27,58 (C-16), 27,91 (C-11), 29,11 (C-2), 29,37 (C-27), 30,03 (C-26), 31,41 (C-22), 31,50 (C-23), 32,46 (C-4), 33,97 (C-9), 34,58 (C-10), 35,29 (C-1), 35,77 (C-9), 36,43 (C-20), 42,40 (C-8), 46,43 (C-13), 46,82 (C-13), 47,41 (C-17), 73,28 (C-12), 75,52 (C-3), 173,03 (C-25), 175,20 (C-28), 177,63 (C-24).

Análise IV  $\text{cm}^{-1}$ : 3163, 2929, 2861, 1712, 1446, 1409, 1382, 1363, 1260, 1209, 1168.

### 3.1.4.3. Produto 1



A temperatura ambiente num balão de fundo redondo de duas tubuladuras de 100 mL, dissolveu-se o ácido 3 $\alpha$ -succinoiloxi-litocólico (0,095314g; 0,20mmol) em 5mL de THF. Após 10minutos, adicionou-se o DCC (0,0823532g; 0,40mmol), gota a gota, previamente dissolvido em 3mL de THF e esperando-se 15min para que se forma um complexo entre o substrato e DCC. Após este tempo, adicionou-se gota a gota, a poliamina 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina (92 $\mu\text{L}$ ; 0,40mmol) dissolvida em 2mL de THF, observando-se a passagem da mistura reacional com um aspeto límpido para turvo. Rapidamente, o balão foi colocado sob refluxo e com agitação magnética durante aproximadamente 21horas.

A reação foi seguida por CCF em que o substrato apresenta um  $R_f$  de 0,65 e o produto final de 1. A reação deu-se por terminada quando se verificou que o substrato se encontrava consumido, neste momento o balão possuía algum precipitado branco acastanhado.

O workup iniciou-se com a concentração da mistura reacional num evaporador rotativo, dando um óleo de cor amarelo-torrado. De seguida promoveu-se a precipitação do subproduto *N,N'*-diciclohexilureia (DCU) com a adição de 30mL de acetato de etilo e ficando a 4°C por 15horas. Numa última instância, para obter um composto mais puro, realizou-se uma coluna de cromatografia com o eluente acetato de etilo: hexano (1:1, v:v), a fim de purificar e remover o DCU existente como ainda o substrato que não tenha reagido. Da reação obteve-se um pó branco com rendimento de 23%.

O produto foi submetido às análises de IV,  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -RMN, bidimensionais e espectro de massa:

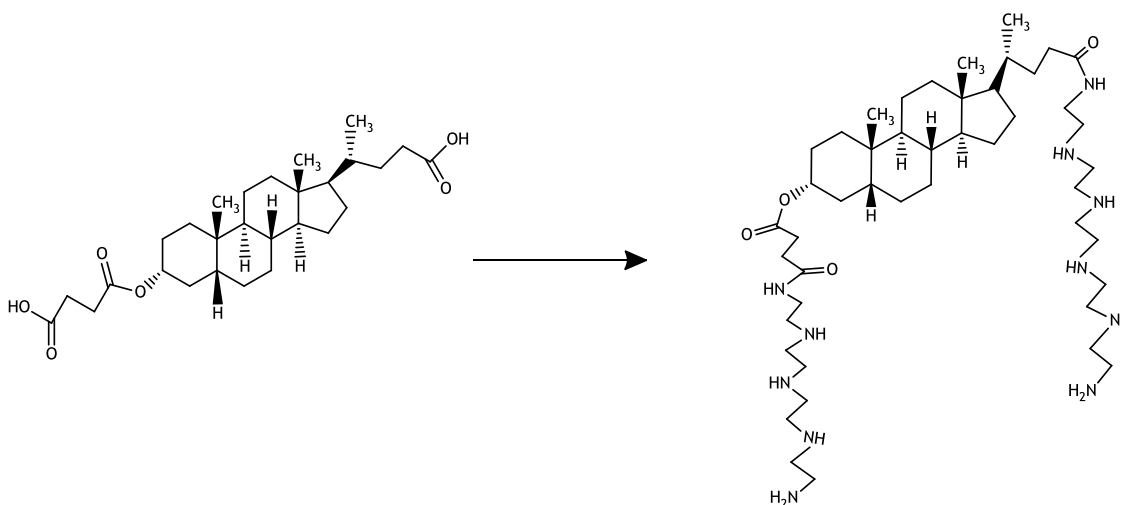
$^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 0,58 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0,86 (6H, s,  $\text{CH}_3$ -19 e 21), 1,0-1,90 (78H, m), 2,23 (1H, m,  $J=7,89\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -23), 2,40 (1h, m,  $J=7,67\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -23), 2,62 (4H, m,  $J=8,31\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -26 e 27), 3,63 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -2' e  $\text{CH}_2$ -2''), 3,80 (1H, t,  $J=11,94\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -4', 9', 4'' e 9''), 3,98 (1H, m,  $\text{CH}_2$ -5', 6', 7', 8', 5'', 6'', 7'' e 8''), 4,64 (1H, m, CH-3), 7,06 (1H, s, CO-NH-1' e 1'').

$^{13}\text{C}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 12,07 (C-18), 18,52 (C-19), 20,05 (C-11), 23,32 (C-21), 24,69 (C-15), 26,58 (C-6), 27,03 (C-7), 28,26 (C-16), 29,73 (C-27), 29,92 (C-26), 30,75 (C-4), 30,94 (C-10'), 31,68 (C-2), 32,20 (C-10''), 32,54 (C-3'), 32,80 (C-3''), 33,09 (C-23), 34,60 (C-10), 35,03 (C-1), 35,54 (C-20), 35,79 (C-8), 40,13 (C-12), 40,42 (C-9), 41,91 (C-5), 42,76 (C-13), 49,65 (C-2'), 49,91 (C-2''), 55,22 (C-8'), 56,07 (C-9'), 56,47 (C-4'), 75,06 (C-3), 171,02 (C-28), 173,06 (C-25), 174,84 (C-24).

Análise IV  $\text{cm}^{-1}$ : 3311, 2927, 2853, 1703, 1642, 1527, 1449, 1382, 1344, 1258, 1228, 1163.

HRMS calculado para  $\text{C}_{48}\text{H}_{88}\text{N}_4\text{O}_{10}+\text{Na}$  ( $M+\text{Na}$ ): pico máximo de 911,66g/mol, produto com 880,65/mol.

#### 3.1.4.4. Produto 2



O procedimento para a síntese do produto 2 foi o descrito na seção anterior (3.1.4.3). No entanto foi utilizada a poliamina tetraetilenepentamina (76 $\mu$ L; 0,4mmol) e decorreu por 48h.

A reação foi seguida por CCF, em que o intermediário do ácido litocólico apresenta um Rf de 0,65 e o produto final de 1. No final do tempo reacional o balão possuía algum precipitado branco acastanhado numa solução de cor amarelo-torrado.

O workup consistiu na concentração da solução num evaporador rotativo e a realização da coluna de cromatografia de sílica com o eluente acetato etilo:hexano (1:1, v:v). No final obteve-se um pó branco com rendimento de 24,8%.

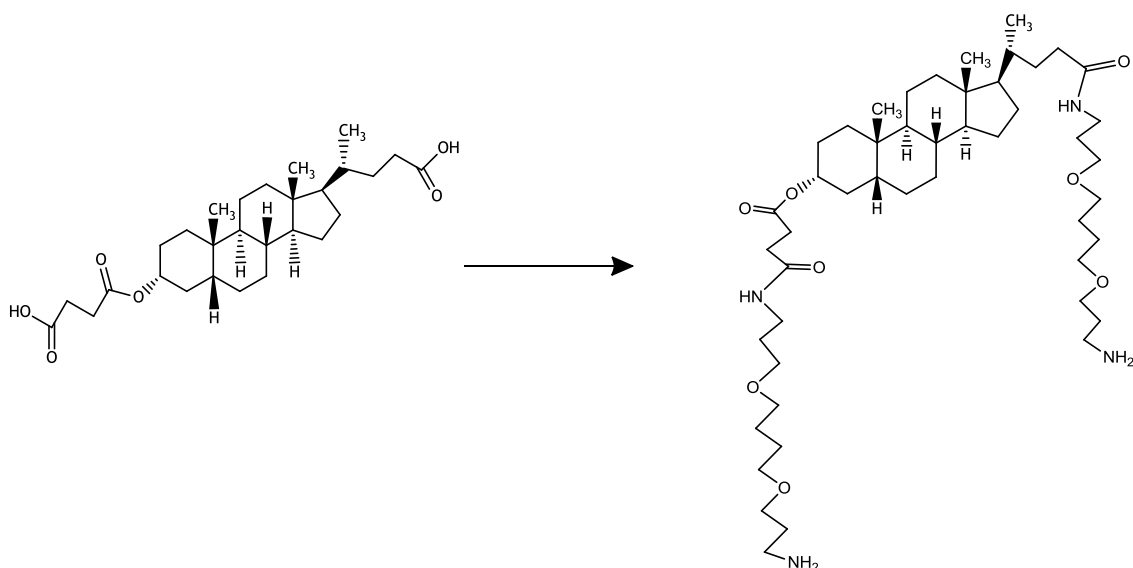
O produto foi submetido às análises de IV,  $^1\text{H}$ - e  $^{13}\text{C}$ -RMN:

$^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 0,65 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0,92 (6H, d,  $J=3,75\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ -19 e 21), 0,92-2 (73H, m), 2,30 (1H, m,  $J=6,06\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -23), 2,46 (1h, m,  $J=5,20\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -23), 2,68 (4H, m,  $J=13,28\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -26 e 27), 3,69 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -2' e 2''), 3,87 (1H, t,  $J=12,41\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -4', 9', 4'' e 9''), 4,05 (1H, m,  $\text{CH}_2$ -5', 6', 7', 8', 5'', 6'', 7'' e 8''), 4,71 (1H, m,  $J=5,77\text{Hz}$ , CH-3), 7,13 (1H, s, CO-NH-1' e 1'').

$^{13}\text{C}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 12.03 (C-18), 18.50 (C-19), 20.81 (C-11), 23,30 (C-21), 24.69 (C-15), 26.56 (C-6), 26.99 (C-7), 28.22 (C-16), 29.70 (C-27), 29.89 (C-26), 30.71 (C-4), 30.91 (C-10'), 31.65 (C-2), 32.17 (C-10''), 32.51 (C-3'), 32.78 (C-3''), 33.07 (C-23), 34.56 (C-10), 34.99 (C-1), 35.52 (C-20) 35.76 (C-8), 40.10 (C-12), 40.39 (C-9), 41.89 (C-5), 42.73 (C-13), 49.61 (C-2'), 49.87 (C-2''), 55.20 (C-8'), 56.04 (C-9'), 56.44 (C-4'), 75.02 (C-3), 170.97 (C-28), 173.02 (C-25), 174. 70 (C-24).

Análise IV  $\text{cm}^{-1}$ : 3278, 2926, 2853, 1704, 1644, 1525, 1450, 1384, 1340, 1259, 1227, 1162.

### 3.1.4.5. Produto 3



O procedimento para a síntese do produto 3 foi o descrito na seção anterior (3.1.4.3). No entanto, utilizou-se a poliamina 4,9-dioxa-1,12-dodecanediamina (84,8µL; 0,4mmol), por 26 horas.

A reação foi seguida por CCF em que o intermediário do ácido litocólico apresenta um Rf de 0,65 e o produto final de 1.

A mistura reacional apresentava um precipitado de cor branco acastanhado, este foi concentrado num evaporador rotativo e promoveu-se a precipitação do DCU com éter dietílico, tendo ficado a 4°C durante dois dias. Após isto, filtrou-se a vácuo, concentrou-se com o auxílio do evaporador rotativo e colocado numa estufa de temperatura e vácuo, o aspeto final foi um óleo de cor branco amarelado.

Na purificação do composto realizou-se uma coluna de cromatografia de sílica com o eluente acetato de etilo:hexano (1:1; v:v), obtendo-se um pó branco com rendimento de 20%.

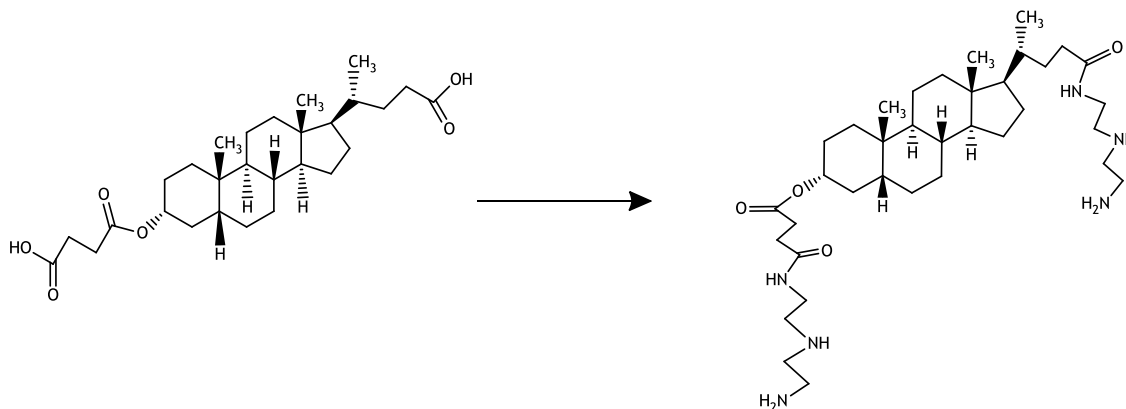
O produto foi submetido às análises de IV, <sup>1</sup>H- e <sup>13</sup>C-RMN:

<sup>1</sup>H RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) ppm: 0,65 (3H, s, CH<sub>3</sub>-18), 0,93 (6H, t, J=3,87Hz, CH<sub>3</sub>-19 e 21), 0,96-2 (74H, m), 2,30 (1H, m, J=9,59Hz, CH<sub>2</sub>-23), 2,46 (1H, m, J=9,18Hz, CH<sub>2</sub>-23), 2,68 (4H, m, J=12,10Hz, CH<sub>2</sub>-26 e 27), 3,69 (2H, m, CH<sub>2</sub>-2' e 2''), 3,88 (1H, t, J=13,50Hz, CH<sub>2</sub>-4', 9', 4'' e 9''), 4,05 (1H, m, CH<sub>2</sub>-5', 6', 7', 8', 5'', 6'', 7'' e 8''), 4,71 (1H, m, J=10,22Hz, CH-3), 7,14 (1H, s, CO-NH-1' e 1'').

<sup>13</sup>C RMN (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) ppm: 12.06 (C-18), 18.52 (C-19), 20.83 (C-11), 23,30 (C-21), 24.69 (C-15), 26.56 (C-6), 27.05 (C-7), 28.25 (C-16), 29.72 (C-27), 29.89 (C-26), 30.73 (C-4), 30.92 (C-10'), 31.66 (C-2), 32.18 (C-10''), 32.53 (C-3'), 32.78 (C-3''), 33.06 (C-23), 34.59 (C-10), 35.00 (C-1), 35.53 (C-20), 35.77 (C-8), 40.11 (C-12), 40.40 (C-9), 41.90 (C-5), 42.75 (C-13), 49.64 (C-2'), 49.89 (C-2''), 55.20 (C-8'), 56.06 (C-9'), 56.46 (C-4'), 75.03 (C-3), 170.96 (C-28), 173.03 (C-25), 174.61 (C-24).

Análise IV cm<sup>-1</sup>: 3300, 2928, 2854, 1703, 1643, 1524, 1449, 1382, 1342, 1258, 1228, 1163.

### 3.1.4.6. Produto 4



O procedimento para a síntese do produto 4 foi o descrito na seção 3.1.4.3. Porém utilizou-se a poliamina dietilenetriamina (43,2 $\mu$ L; 0,4mmol) por 25horas.

A reação foi seguida por CCF em que o intermediário do ácido litocólico apresenta um Rf de 0,65 e o produto final de 1.

A mistura reacional apresentava um precipitado acastanhado no fundo do balão com tonalidade bege e aparência turva. Este foi concentrado num evaporador rotativo e promoveu-se a precipitação do DCU com éter dietílico, tendo ficado a 4°C durante sete dias, apresentando-se mais límpido e com precipitado acastanhado. Após isto, filtrou-se a vácuo, concentrou-se num evaporador rotativo e ficou a secar numa estufa de temperatura e vácuo, o aspeto final foi um produto cremoso de cor branco amarelado.

O resíduo foi purificado por coluna de cromatografia de sílica com o eluente acetato de etilo:hexano (1:1, v:v), obtendo-se um pó de cor branco com um rendimento final da reação foi de 69%.

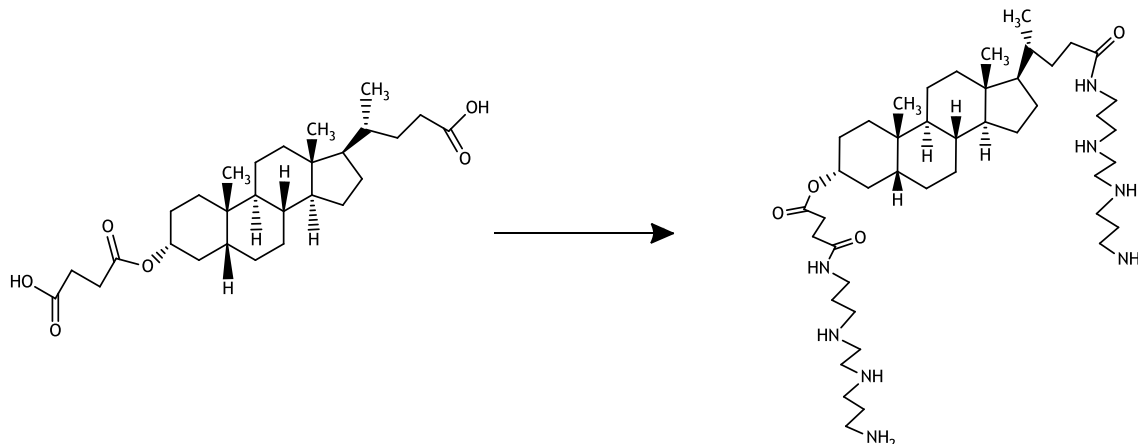
O produto foi submetido às análises de IV,  $^1\text{H}$ - e  $^{13}\text{C}$ -RMN:

$^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 0,65 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0,92 (6H, t,  $J=3,87\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ -19 e 21), 0,96-2 (74H, m), 2,30 (1H, m,  $J=9,59\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -23), 2,46 (1h, m,  $J=9,18\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -23), 2,68 (4H, m,  $J=11,03\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -26 e 27), 3,69 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -2' e 2''), 3,88 (1H, t,  $J=12,60\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -3', 5', 3'' e 5''), 4,05 (1H, m,  $\text{CH}_2$ -6' e 6''), 4,71 (1H, m,  $J=9,71\text{Hz}$ , CH-3), 7,16 (2H, s, CO-NH-1' e 1'').

$^{13}\text{C}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 12.06 (C-18), 18.16 (C-19), 20.85 (C-11), 23,33 (C-21), 24.70 (C-15), 26.59 (C-6), 27.03 (C-7), 28.26 (C-16), 29.72 (C-27), 29.93 (C-26), 30.74 (C-4), 30.93 (C-6'), 31.69 (C-2), 32.19 (C-6''), 32.53 (C-3'), 32.77 (C-3''), 33.02 (C-23), 34.59 (C-10), 35.03 (C-1), 35.55 (C-20) 35.79 (C-8), 40.13 (C-12), 40.42 (C-9), 41.92 (C-5), 42.77 (C-13), 49.69 (C-2'), 49.92 (C-2''), 55.16 (C-5''), 56.08 (C-5'), 56.48 (C-4'), 75.03 (C-3), 171.13 (C-28), 173.03 (C-25), 174.50 (C-24).

Análise IV  $\text{cm}^{-1}$ : 3324, 2928, 2853, 1704, 1644, 1525, 1559, 1385, 1340, 1259, 1228, 1161.

### 3.1.4.7. Produto 5



O procedimento para a síntese do produto 5 foi o descrito na seção 3.1.4.3, no entanto utilizou-se a poliamina *N,N'*-bis-(3-aminopropil) etilenediamina (80 $\mu\text{L}$ ; 0,4mmol), por 24horas.

A reação foi seguida por CCF, em que o intermediário do ácido litocólico apresenta um  $R_f$  de 0,65 e o produto final de 1.

A mistura reacional apresentava um aspeto límpido de cor amarelo-torrado, foi concentrada num evaporador rotativo e procedeu-se à purificação do composto através da coluna de cromatografia de sílica com o eluente acetato de etilo:hexano (1:1, v.v). No final obteve-se um pó branco com rendimento de 25,36%.

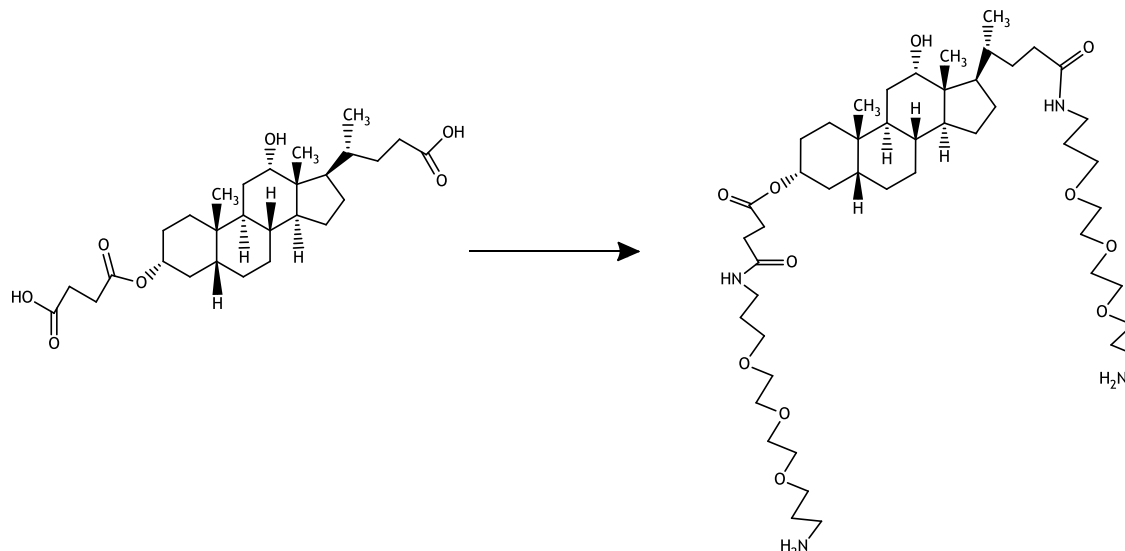
O produto foi submetido às análises de IV,  $^1\text{H}$ - e  $^{13}\text{C}$ -RMN:

$^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 0,65 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0,93 (6H, t,  $J=3,84\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_3$ -19 e 21), 0,96-2 (74H, m), 2,30 (1H, m,  $J=5,70\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -23), 2,46 (1h, m,  $J=6,62\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -23), 2,68 (4H, m,  $J=6,62\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -26 e 27), 3,69 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -2' e 2''), 3,88 (1H, t,  $J=14,35\text{Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ -4', 9', 4'' e 9''), 4,05 (1H, m,  $\text{CH}_2$ -5', 6', 7', 8', 5'', 6'', 7'' e 8''), 4,71 (1H, m,  $J=5,15\text{Hz}$ , CH-3), 7,16 (2H, s, CO-NH-1' e 1'').

$^{13}\text{C}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 12.07 (C-18), 18.55 (C-19), 20.85 (C-11), 23,33 (C-21), 24.70 (C-15), 26.59 (C-6), 27.03 (C-7), 28.26 (C-16), 29.70 (C-27), 29.92 (C-26), 30.74 (C-4), 30.93 (C-10'), 31.69 (C-2), 32.19 (C-10''), 32.53 (C-3'), 32.78 (C-3''), 33.06 (C-23), 34.59 (C-10), 35.02 (C-1), 35.55 (C-20) 35.79 (C-8), 40.13 (C-12), 40.42 (C-9), 41.92 (C-5), 42.77 (C-13), 49.67 (C-2'), 49.92 (C-2''), 55.18 (C-8'), 56.08 (C-9'), 56.48 (C-4'), 75.05 (C-3), 170.95 (C-28), 173.05 (C-25), 174.61 (C-24).

Análise IV  $\text{cm}^{-1}$ : 3299, 2926, 2853, 1704, 1641, 1525, 1450, 1381, 1341, 1258, 1227, 1162.

### 3.1.4.8. Produto 6



O procedimento para a síntese do produto 6 foi o descrito na seção 3.1.4.3, no entanto utilizou-se como substrato o ácido 3-succinoiloxi-desoxicólico (0,180g; 0,35mmol) e a poliamina 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamina (176 $\mu$ L; 0,70mmol), por 48horas.

A reação foi seguida por CCF em que o intermediário do ácido desoxicólico apresenta um Rf de 0,68 e o produto final de 1.

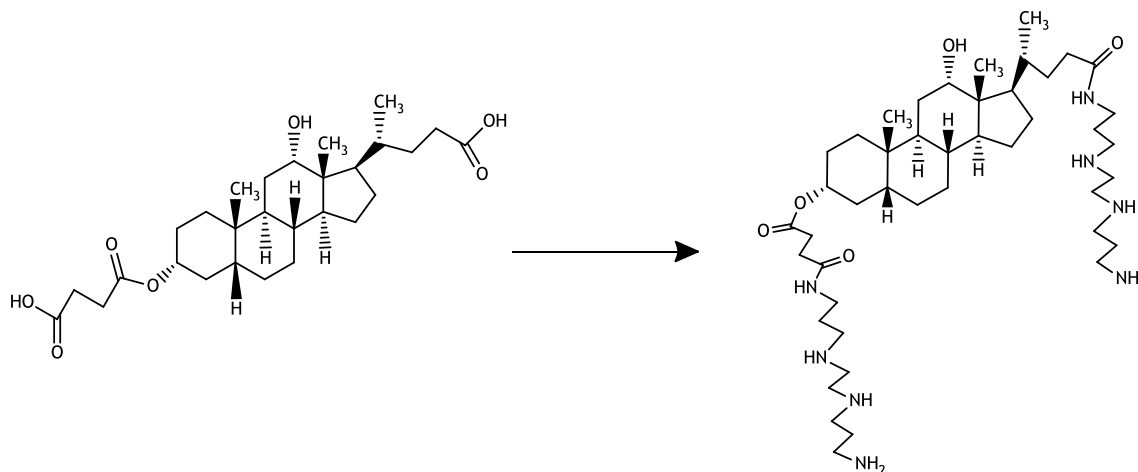
Após o tempo reacional a mistura foi concentrada num evaporador rotativo, dando um óleo amarelo-torrado e realizou-se uma coluna de cromatografia com o eluente acetato de etilo: hexano (3:1). No final obteve-se um pó branco com rendimento de 10%.

O produto foi submetido às análises de IV e  $^1\text{H}$ -RMN

$^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 1,0-1,99 (32H, m), 2,14 (1H, m, J=9Hz,  $\text{CH}_2$ -23), 2,64 (2H, s,  $\text{CH}_2$ -26 e 27), 3,48 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -2' e  $\text{CH}_2$ -2''), 4,05 (1H, t, J=6,2Hz,  $\text{CH}_2$ -4', 9', 4'' e 9'').

Análise IV  $\text{cm}^{-1}$ : 3285, 2927, 2853, 1699, 1633, 1557, 1449, 1375, 1303, 1252, 1189, 1092.

### 3.1.4.9. Produto 7



O procedimento iniciou-se à temperatura ambiente, dissolvendo-se num balão de fundo redondo com duas tubuladuras de 100 mL, o ácido 3-succinoiloxi-desoxicólico (0,204g; 0,40mmol) em 5mL de THF, bem como também o DMAP (0,02932g; 0,24mmol). Após 10 minutos, adicionou-se o DCC (0,164g; 0,80mmol) gota a gota, previamente dissolvido em 3mL de THF. Após 15 minutos, colocou-se o balão sob aquecimento e agitação, adicionou-se a poliamina *N,N'*-bis-(3-aminopropil) etilenediamina (160 $\mu$ L; 0,8mmol) gota a gota, dissolvida em 2mL de THF, promovendo a passagem de um aspeto límpido para turvo. O balão foi colocado sob refluxo e agitação, por 25 horas.

A reação foi seguida por CCF em que o intermediário do ácido desoxicólico apresenta um RF de 0,68 e o produto final de 1.

A purificação do produto ocorreu de acordo com o procedimento descrito na secção 3.1.4.8, obtendo-se um pó branco com rendimento de 18,92%.

O produto foi submetido às análises de IV,  $^1\text{H}$ - e  $^{13}\text{C}$ -RMN:

$^1\text{H}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 0,68 (3H, s,  $\text{CH}_3$ -18), 0,91 (6H, t,  $\text{CH}_3$ -19 e 21), 0,95-2 (76H, m), 2,32 (1H, m,  $\text{CH}_2$ -23), 2,42 (1H, m,  $\text{CH}_2$ -23), 2,64 (2H, m,  $\text{CH}_2$ -26 e 27), 3,46 (1H, m,  $\text{CH}_2$ -4', 9', 4'' e 9''), 3,69 (2H, t,  $\text{CH}_2$ -2' e 2''), 3,98 (1H, m,  $\text{CH}_2$ -5', 6', 7', 8', 5'', 6'', 7'' e 8''), 4,71 (1H, m, CH-3), 7,24 (2H, s, CO-NH-1' e 1'').

$^{13}\text{C}$  RMN (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm: 12.65 (C-18), 17.45 (C-19), 20.85 (C-11), 23.03 (C-21), 24.69 (C-15), 25.45 (C-6), 28.51 (C-7), 29.27 (C-16), 29.59 (C-27), 30.25 (C-26), 30.82 (C-4), 31.44 (C-10'), 31.85 (C-2), 32.09 (C-10''), 32.59 (C-3'), 33.07 (C-3''), 34.09 (C-23), 34.83 (C-10), 35.25 (C-1), 35.98 (C-20) 36.25 (C-8), 41.85 (C-9), 42.06 (C-5), 49.82 (C-2', 2''), 55.45 (C-4'), 74.70 (C-12), 74.96 (C-3), 170.65 (C-28), 173.05 (C-25), 173.77 (C-24).

Análise IV  $\text{cm}^{-1}$ : 3308, 2926, 2854, 1686, 1640, 1533, 1449, 1378, 1342, 1258, 1230, 1090.

## 3.2. Avaliação biológica

### 3.2.1. Material e equipamentos utilizados

Os meios de cultura *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) e *Dulbecco's Modified Eagle Medium high-glucose* (DMEM), o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), a tripsina (0,025% em PBS/EDTA), o HEPES, o piruvato de sódio e o dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Portugal). Já o soro bovino fetal (FBS) foi adquirido à Biochrom AG (Portugal). O azul de triptano foi adquirido à Merck e o bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ) à Panreac (Estados Unidos).

Os antibióticos AB (10,000 unidades/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 25µg/mL de anfotericina-B) e SP (10,000 unidades/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. As soluções de tampão fosfato salino (PBS), composta por 90% de água Mili-Q (Millipore) e 10% de PBS (10x), e de etanol a 70% foram preparadas laboratorialmente.

Os instrumentos aos quais se recorreu foram: câmara de fluxo laminar vertical NuAire, de Classe II, para proceder à maior parte do trabalho experimental em condições de assepsia; o leitor espectrofotométrico de microplacas xMark™ da marca Bio-Rad na realização do ensaio do MTT; estufa Nuair DHD Autoflow  $\text{CO}_2$  Air-Jacketed a 37°C para manter a atmosfera humidificada contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , para incubação das células; centrífuga Bioblock Scientific (Sigma-3K18C); potenciómetro medidor de pH Metrohm 620, para a preparação dos meios de cultura celular; microscópios ópticos Olympus CKX 40/41 para observação e controlo do estado celular; banho de aquecimento da Fisher Scientific, para aquecer os meios de cultura, FBS, PBS e tripsina; microscópio Olympus CKX 41, equipado com máquina fotográfica digital Olympus SP 500UZ usado para fotografar as culturas celulares.

Relativamente aos ensaios de citometria de fluxo, o marcador iodeto de propídio (IP) foi adquirido à Invitrogen, e realizados no equipamento citómetro de fluxo FACSCalibur com o software BD CellQuest Pro.

### 3.2.2. Culturas celulares

Os compostos sintetizados foram avaliados biologicamente em cinco tipos de linhas celulares: células do adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP), células epiteliais humanas do cancro da mama sensíveis a estrogénios (MCF-7 e T47D), células humanas de glioblastoma (U87) e fibroblastos normais da derme humana (NHDF). De forma a criar as condições que favoreçam o seu crescimento celular e a diferenciação, as linhas celulares foram suplementadas com o seu respetivo meio de cultura nos frascos de cultura.

Estas células foram cultivadas em frascos de cultura (T-Flasks) de 75cm<sup>2</sup> e incubadas a 37°C sob atmosfera humidificada com 5% de  $\text{CO}_2$ .

A substituição do meio ocorreu a cada 48-72 horas, realizando-se a tripsinização e expansão para novos frascos de cultura sempre que se apresentaram confluentes.

#### 3.2.2.1. MCF-7

As células MCF-7 são uma linha de células epiteliais do adenocarcinoma mamário, tendo sido isoladas a partir de uma efusão pleural de um indivíduo do sexo feminino com 69 anos que apresentava adenocarcinoma mamário metastático. A sua designação provém de “*Michigan Cancer Foundation-7*”, por se encontrar relacionado com o instituto que realizou o seu isolamento pela primeira vez. As células possuem propriedades aderentes e recetores de estrogénios, ocorrendo o seu crescimento em monocamada [65].

As células MCF-7 foram mantidas em meio de cultura composto por meio DMEM, suplementado com 10% de FBS e 1% de antibiótico/antimicótico Ab.

#### 3.2.2.2. LNCaP

Isoladas pela primeira vez em 1977, as células LNCaP são uma linha celular humana do adenocarcinoma da próstata. Estas células são provenientes de uma metástase de um nódulo linfático supraclavicular, extraída de um homem caucasiano de 50 anos na altura da biopsia, tendo a designação de “*Lymph node carcinoma of the prostate*”. Estas células epiteliais são sensíveis a androgénios e apresentam propriedades aderentes. Porém, o seu crescimento tanto pode ser na forma de agregados como de células isoladas [66].

O meio de cultura no qual foram mantidas estas células é composto por meio RPMI com 10% de FBS e 1% de antibiótico SP.

#### 3.2.2.3. T47D

As células T47D são uma linha de células epiteliais humanas do adenocarcinoma mamário e foram isoladas pela primeira vez em 1979 de uma efusão pleural de uma mulher de 54 anos com carcinoma ductal mamário humano. As células contêm propriedades aderentes e recetores de esteroides, exibindo uma morfologia epitelial e crescimento em monocamada [67]. O meio de cultura no qual foram mantidas as células é composto por meio RPMI com 10% de FBS e 1% de antibiótico SP.

#### 3.2.2.4. U87

As células U87 são uma linha de células humanas de glioblastoma, um astrocitoma de grau avançado, isoladas pela primeira vez em 1966 num homem caucasiano de 44 anos. As células apresentam propriedades aderentes, com morfologia epitelial, podendo inicialmente desenvolver-se em monocamadas, mas com capacidade de formar neuroesferas quando se apresentam confluentes [68]. As células U87 foram mantidas num meio de cultura composto por meio DMEM, com 10% de FBS e 1% de antibiótico/antimicótico Ab.

### 3.2.2.5. NHDF

As células NHDF foram escolhidas com o objetivo de avaliar a seletividade dos compostos em termos de citotoxicidade. Esta linha celular são fibroblastos originários da derme humana saudável de adultos, sendo designados por “*normal human dermal fibroblasts*”, e apresentam capacidade de adesão, porém não de diferenciação celular completa e contêm recetores de estrogénios [69].

As células NHDF foram mantidas em meio de cultura RPMI, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 20mM de L-glutamina, 10mM de HEPES, 1mM de piruvato de sódio e 1% de antibiótico/antimicótico Ab.

## 3.2.3. Técnicas usadas nas culturas celulares *in vitro*

### 3.2.3.1. Tripsinização

A tripsinização tem como objetivo libertar as células aderentes do suporte sólido onde estão aderidas e também a auxiliar as células a dissociarem-se entre si. Nesta técnica usa-se a tripsina, uma enzima proteolítica para degradar as proteínas associadas à adesão celular. Quando as culturas celulares alcançam a fase exponencial de crescimento e atingiram cerca de 80-90% da confluência celular, realiza-se a tripsinização de forma a reduzir a concentração celular presente nos T-Flasks, permitindo ainda a passagem de células para um novo frasco ou para a realização da observação e contagem celular antes de um determinado procedimento experimental. A análise do grau de confluência é realizada através de observação ao microscópio óptico.

O procedimento iniciou-se pela remoção do meio do frasco de cultura de 75cm<sup>2</sup>, e de seguida procedeu-se à lavagem das células com a adição de 10mL de PBS. Após a remoção deste, foram adicionados 10mL de solução de tripsina e deixou-se atuar por 3 minutos na estufa a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, de modo a permitir a dissociação das células da superfície do T-Flask.

Após a incubação das células com a enzima, é necessário inativar a tripsina para que as proteínas da superfície celular não sejam também clivadas e a sua função e a viabilidade celular não fiquem comprometidas. Por isso, para a neutralização da ação da enzima, após confirmação da suspensão de células por observação ao microscópio, adicionou-se 10mL de meio de cultura completo (com FBS). De seguida transferiu-se a suspensão para um tubo Falcon e centrifugou-se a 1000rpm durante 8 minutos.

Por fim, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet no meio de cultura apropriado, transferiu-se uma alíquota da nova suspensão celular em novos frascos de cultura, ou realizaram-se os ensaios experimentais iniciando-se com a etapa de contagem de células e sementeira subsequente.

### 3.2.3.2. Contagem, sementeira e incubação

O procedimento da avaliação da citotoxicidade dos compostos sintetizados foi efetuado em placas de cultura com 48 poços, tendo-se semeado as células numa densidade adequada. Para tal foi necessário proceder-se à contagem do número de células e à preparação das suspensões celulares com a concentração apropriada.

Após a tripsinização, da suspensão celular obtida foram retirados 10 µl para um eppendorf, aos quais se adicionaram 10 µl de solução de azul de triptano, e a mistura resultante foi aplicada numa cámara de *Neubauer*. De seguida, procedeu-se à contagem do número de células existentes em cada um dos 4 quadrantes, realizada com o auxílio de um microscópio óptico. A concentração celular foi determinada através do cálculo da média total dos quadrantes e multiplicado por dois, uma vez que as células encontram-se diluídas numa proporção 1:1 com o corante, e aplicou-se a fórmula de *Neubauer* para se obter a concentração celular. Após se determinar o número de células/mL, foi calculado o volume de suspensão inicial a diluir no volume total de meio necessário para a realização dos ensaios, de forma a conseguir-se uma concentração celular de  $2 \times 10^4$  células/mL. Seguidamente, foram adicionados 250 µl da suspensão celular resultante a cada um dos 35 poços de cada placa de cultura, tendo-se excluído a primeira linha e coluna de poços que constituem os “zeros”, onde apenas se colocou meio completo.

A placa com as células foi incubada por 48 horas, de forma a promover a aderência e o crescimento celular antes da aplicação dos compostos a avaliar.

### 3.2.3.3. Aplicação dos compostos

Inicialmente preparou-se uma solução mãe dos compostos sintetizados e puros numa concentração de 10mM em DMSO, como também dos controlos positivos que foram os compostos diosgenina e 5-fluorouracilo em igual concentração.

De acordo com um estudo prévio, o efeito que o DMSO pode revelar na viabilidade celular não é significativo em concentrações iguais ou inferiores a 1% nos poços. Durante as experiências a concentração máxima de DMSO é 0,3% no ensaio preliminar e 1% no estudo para estabelecimento das curvas dose-resposta a seguir descritos.

Primeiro realizou-se um ensaio preliminar para avaliar o efeito na proliferação celular de uma concentração de 30 µM dos compostos. Para isso, aspirou-se o meio de cada poço da placa após a observação do estado das células ao microscópio, e adicionaram-se os compostos (n=5). Cada placa continha uma coluna de “zeros” contendo apenas meio de cultura, coluna de controlo negativo, com células e meio de cultura, e um composto por coluna com células (Figura 19). A placa de cultura foi incubada com os compostos por 72 horas.

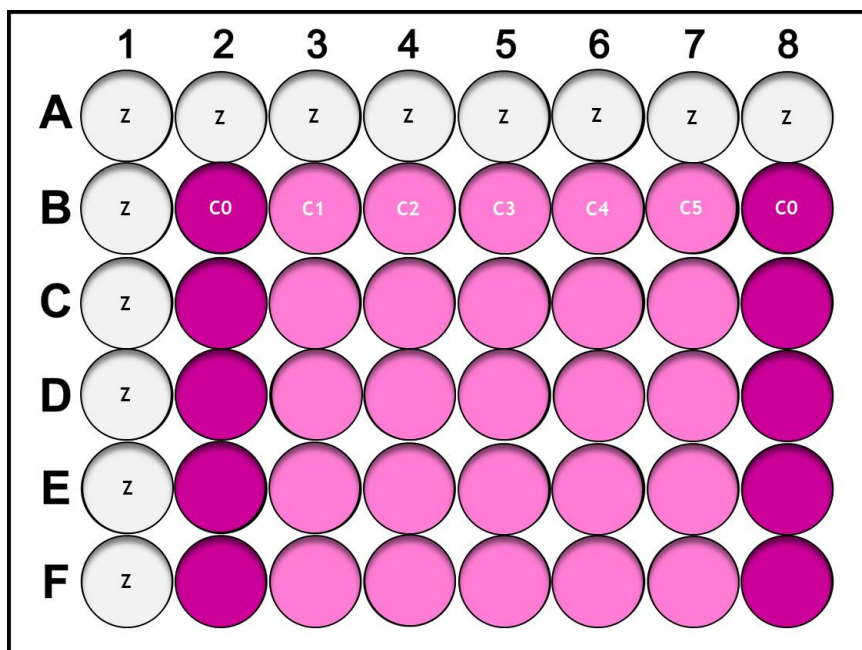


Figura 19: Esquema representativo da microplaca para o primeiro ensaio dos compostos numa concentração de 30  $\mu\text{M}$ . (C0= controlo; C1, C2, C3, C4, C5 = compostos diferentes)

No caso dos compostos que revelaram atividade antiproliferativa significativa a 30  $\mu\text{M}$ , procedeu-se um ensaio para determinação de curvas-dose-resposta, a fim de também calcular o  $\text{IC}_{50}$  (concentração do composto que inibe em 50% o crescimento celular).

Para isso, prepararam-se 6 soluções com diferentes concentrações do composto em estudo (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 20). Assim, depois da aspiração do meio de cada poço, colocaram-se as soluções do composto, mantendo-se a existência de um controlo negativo e dos “zeros”. De seguida, a placa foi a incubar durante 72 horas e no fim realizou-se o ensaio MTT para analisar a proliferação celular.

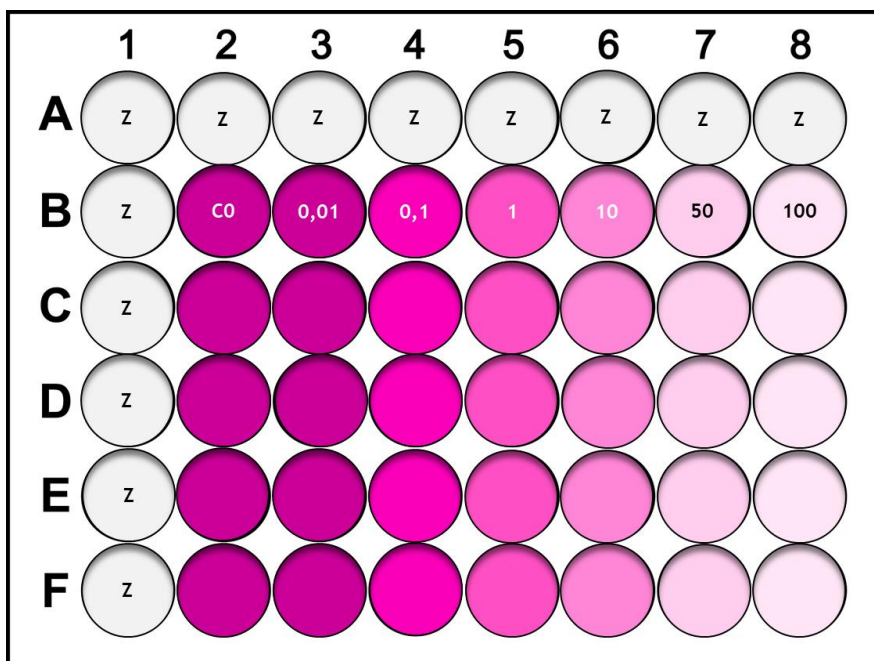


Figura 20: Esquema representativo das microplacas para o ensaio de curva dose-resposta, n=5, com uma gama de diferentes concentrações (em  $\mu\text{M}$ ) do composto em estudo.

#### 3.2.3.4. Ensaio MTT

O efeito dos compostos na viabilidade celular foi estudado com o ensaio MTT. Este teste depende do tipo de células, atividade mitocondrial e da concentração celular existente. Este ensaio fundamenta-se na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio (MTT), que possui uma cor amarela e é solúvel em água e sensível à luz, em cristais de formazano, de cor azul e insolúveis em meio aquoso, por ação da enzima mitocondrial succinato desidrogenase nas células viáveis. A quantidade de formazano produzido e acumulado nestas células pode ser considerado diretamente proporcional ao número de células viáveis existentes em cada poço [70].

Após terminado o tempo de incubação com os compostos, iniciou-se o procedimento com a aspiração do sobrenadante dos poços, seguindo-se da lavagem com PBS e da sua aspiração. Depois adicionou-se 250 $\mu\text{L}$  da solução de MTT (5mg/mL), previamente dissolvida em PBS e em meio de cultura incompleto, a cada um dos poços da placa, incluindo controlos negativos, zeros e compostos. De seguida, as placas foram protegidas com papel de alumínio para minimizar a exposição à luz e colocadas a incubar a 37°C sob atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>, durante 4 horas.

Terminado o tempo de incubação, aspirou-se cuidadosamente o sobrenadante dos poços, a fim de evitar a remoção dos cristais formados. Por fim adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  de DMSO para dissolver os cristais de formazano, obtendo-se uma solução de cor roxa. Visto que a intensidade da cor é diretamente proporcional ao número de cristais de formazano formados, então é também diretamente proporcional ao número de células viáveis resultantes, e

procedeu-se à leitura de absorvância a 570nm. Os valores obtidos para os compostos foram comparados com os valores do controlo, tendo sido definido estes como 100% de viabilidade celular e os restantes calculados em relação a este valor.

#### 3.2.4. Citometria de fluxo

A apoptose é um processo celular normal que ocorre durante o desenvolvimento embrionário e que mantém a homeostase tecidual, sendo por isso um processo antitumoral efetivo e benéfico, desde que mantenha um funcionamento normal e que as células danificadas sejam removidas [71].

Durante este processo altamente conservativo, ocorre a contração da célula, perda da membrana plasmática, condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos [72].

Numa fase inicial, as células modificam a estrutura da membrana plasmática, um dos seus componentes, designado por fosfatidilserina transloca-se a do interior da membrana onde é mais predominante para o exterior, para que a célula seja reconhecida por fagócitos e assim ser removida. Nas células viáveis como possuem as membranas intactas excluem o iodeto de propídeo, enquanto as células mortas ou com membranas danificadas são permeáveis [73].

No procedimento da citometria de fluxo usou-se a linha celular MCF-7 e o composto selecionado de acordo com o seu resultado citotóxico positivo no ensaio de MTT, tendo-se repetido a experiência duas vezes. O procedimento teve como objetivo a análise da viabilidade celular por marcação com iodeto de propídeo, e iniciou-se com a sementeira de células e incubou-se, durante 48 horas, em caixas de cultura celular de 6 poços com 9,6cm<sup>2</sup> de área, 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 50µM e incubou-se durante 24 horas. Como controlo negativo utilizou-se células não tratadas e como controlo positivo o composto 5-flouroucilo a 50µM.

No final da incubação, 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 µl de tripsina e incubou-se por 5 minutos, após isto adicionou-se 700 µl de meio frio, por fim obteve-se uma suspensão de células que foram colocadas nos respetivos falcons utilizados anteriormente. De seguida, centrifugou-se durante 5 minutos a 250G, aos quais aspirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet em 400 µl de meio frio.

Da suspensão celular resultante transferiu-se 395 µL para tubos de citometria de 5mL, seguindo-se da adição do marcador iodeto de propídeo (5 µl). 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, como também para a análise de dados.

Para determinar a percentagem de células viáveis e mortas foi necessário determinar e definir 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, conforme explicado na secção dos resultados. Na determinação da percentagem de células viáveis, procedeu-se à definição de regiões semelhantes (R2 e R3), para exclusão dos “debris”.

### 3.3. Estudo de interação com G-quadruplex

A espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica ótica que dá informação acerca da estrutura de moléculas opticamente ativas, podendo ser aplicada a biomoléculas, como proteínas, bem como também a ácidos nucleicos, como o DNA. Esta técnica baseia-se na diferença de absorção de luz circularmente polarizada à esquerda e à direita, sendo necessário que a amostra tenha centros quirais; caso não o seja, o feixe de luz não varia, ou seja, não é reproduzido um sinal. A variação está diretamente relacionada com o dicroísmo circular da amostra no comprimento de onda, sendo a deteção realizada sucessivamente em diferentes comprimentos de onda, gerando-se um espetro característico de CD. As condições colocadas podem variar consoante o que se pretende estudar, como por exemplo a temperatura, presença de outras moléculas e força iónica [74].

Neste caso, o objetivo deste ensaio reside em estudar a estabilização da estrutura do G-quadruplex após adição de um composto, como ainda avaliar a topologia do G-quadruplex. Na experiência utilizou-se o espectropolarizador Jasco J-815 equipado com um controlador de temperatura Peltier tipo CDF-426S, tendo-se utilizado o software *SpectraManager* da Jasco durante a aquisição e análise de resultados. No decorrer da análise utilizou-se uma célula de quartzo de 0,2mm, utilizando-se com parâmetros de aquisição, a *bandwidth* de 1nm com um scanning speed de 100nm/min e aquisição de 3 eventos por scan, com uma resposta de DTI de 0,5 segundos.

O composto selecionado para este ensaio teve em conta o seu resultado citotóxico positivo no ensaio MTT e a sua solubilidade em água. Primeiro estabeleceu-se uma linha de base que foi subtraído a todos os espetros, o que incluiu: 232µL água, 60µL DMSO e 1,2µL tampão de KCl 10mM, a temperatura de 25°C. De seguida, adicionou-se 6µL de solução de DNA telomérico a 600µM sem adição de composto, e procedeu-se ao *annealing* do DNA, em que após a estabilização da temperatura a 80°C por 10 minutos e diminui-se em intervalos de 10°C até aos 20°C manualmente, tendo sempre o cuidado de deixar a temperatura estabilizar. Posteriormente, fez-se as curvas de *CD melting* do DNA num intervalo de temperatura de 20°C

a 80°C, com 4s de estabilização entre intervalos de 4°C/min e monitorizados em dois comprimentos de onda característicos deste G-quadruplex, 263nm e 290nm.

Neste procedimento utilizou-se uma solução concentrada do composto a 0,1mM em água e 20% de DMSO, que foi adicionado à cubete já com o DNA a 10µM (1eq) previamente colocado, em diferentes equivalentes: 0,1; 0,4; 1; 2; 3; 5; 10. Para cada equivalente foram realizados diferentes ensaios, o *annealing* do DNA e o curva de CD *melting* do DNA, como foi descrito para a amostra sem composto, bem como ainda a aquisição de um espectro em que se variou o comprimento de onda à temperatura de 20°C. Cada ensaio foi apenas realizado uma vez para cada equivalente.

### 3.4. Análise estatística

Os resultados gráficos de citotoxicidade foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão. A comparação entre múltiplos grupos foi analisada pelo teste *t*-student para determinar a existência de diferenças significativas entre as médias. A diferença entre grupos 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. Os gráficos dos ensaios de citometria foram igualmente expressos em valores médios  $\pm$  desvio padrão.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Síntese química

O objetivo inicial consistia na síntese de macrociclos a partir do ácido litocólico (Figura 18), no entanto, obtiveram-se diferentes moléculas compostas por um ácido biliar ligada ao ácido succínico e a duas cadeias aminadas (Figura 21).

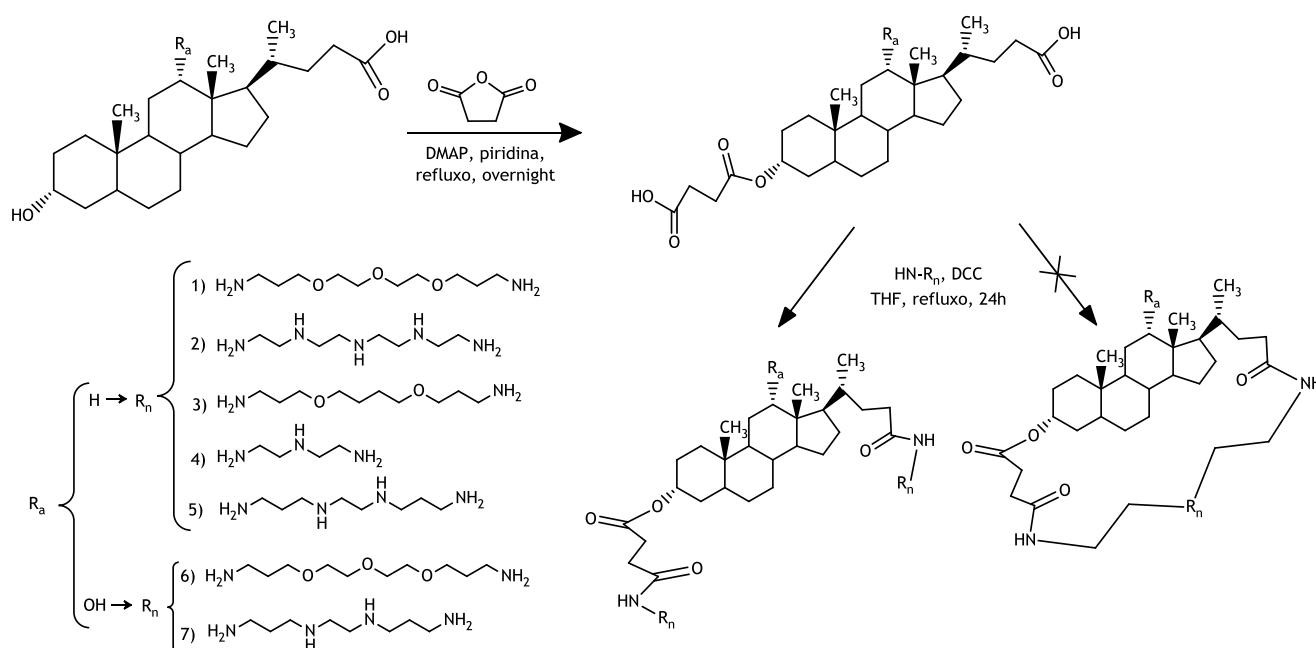


Figura 21: Representação geral da síntese química, com comparação entre o composto final pretendido inicialmente e o obtido, sendo o R<sub>a</sub> igual a -H no caso do ácido litocólico ou -OH para o ácido desoxicólico, enquanto o R<sub>n</sub> representa a cadeia poliamina para cada R<sub>a</sub>.

Os compostos finais foram obtidos por uma síntese que compreendeu dois passos reacionais, encontrando-se o primeiro descrito na literatura para o ácido litocólico [64]. Neste passo ocorre a acilação do grupo 3-OH do ácido biliar com o anidrido succínico, utilizando como catalisador o 4-(*N,N*-dimetilamino)piridina (DMAP). Esta base nucleofílica é muito eficaz na esterificação de álcoois e ácidos carboxílicos com compostos anidridos, promovendo a desprotonação destes grupos, neste trabalho em particular, no álcool ligado ao carbono 3 do ácido litocólico. Este evento facilita o ataque do oxigênio do carbono 3 ao carbonilo do anidrido succínico, criando uma ligação éster.

O ácido 3 $\alpha$ -succinoiloxi-litocólico foi caracterizado por FTIR, e também por <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-RMN e bidimensionais, por comparação com o substrato ácido litocólico e mediante o que está descrito na literatura [64], confirmou-se a existência do produto. No espectro <sup>1</sup>H-RMN, entre

outros sinais, verifica-se o aparecimento de um multipletto a 2,34ppm de integração igual a 4H, já no  $^{13}\text{C}$  ocorreu um pequeno deslocamento do sinal do carbono 3, indicando a ligação do anidrido succínico, bem como ainda o aparecimento de dois novos picos a 172,25 e 174,67 ppm, referindo-se à formação do grupo éster e de um novo ácido carboxílico. A reação foi posteriormente adaptada para o ácido desoxicólico, tendo-se verificado que existe reprodutibilidade do procedimento, apresentando espectros de RMN e FTIR semelhantes. Por razões de impedimento estereoquímico, o acoplamento ocorre no carbono 3 do ácido desoxicólico em vez do carbono 12, tendo sido um fator analisado por RMN bidimensional (HSQC e HMBC).

A formação de grupos amida são tipicamente sintetizados a partir da união entre ácidos carboxílicos e aminas, no entanto, não ocorre espontaneamente. Por isso, na segunda e última reação, o mecanismo reacional é mais complexo, tendo como interveniente a *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC), que atua como agente desidratante em vários compostos que possuem o grupo -OH, por exemplo os ácidos carboxílicos, ocorrendo a ativação do carbono acilo para que ocorra substituição nucleofílica e a formação do grupo amida ao se acoplar à amina [75, 76].

No entanto, esta via reacional tem como desvantagem o baixo rendimento e a formação do subproduto diciclohexilureia (DCU), sendo esta uma impureza frequentemente difícil de remover [75]. Por isso, a purificação do composto e a remoção do DCU no presente trabalho tornou-se um desafio a ultrapassar. Ao pesquisar a literatura por procedimentos descritos que utilizassem o DCC, verificou-se que o método mais utilizado para purificar o produto seria a precipitação do DCU com solventes adequados, atendendo às suas características de polaridade, tentou-se a diferentes temperaturas e tempos neste processo, e experimentou-se o n-hexano, o acetato de etilo e o éter dietílico como solventes, por terem diferentes polaridades [77, 78]. Depois de testadas todas as condições, verificou-se que a mais favorável tinha sido com o solvente acetato de etilo a 4°C por 24 horas, no entanto, a quantidade de DCU removido era baixa e havia a precipitação de algum produto.

Assim, outros métodos de purificação foram analisados, e tentou-se remover o DCU por extração líquido-líquido e cristalização, os quais não resultaram, até que se concluiu que a coluna de cromatografia de sílica seria o método a experimentar, verificando-se, a nível de eluição, que o DCU é o primeiro composto a sair da coluna e que o composto pretendido puro era eluído logo a seguir, existindo apenas o problema de se encontrar o eluente certo para cada composto sintetizado e de se recolher pequenas quantidades de amostra durante a eluição [64]. Desta forma, acabou por ser possível obter os produtos pretendidos puros.

Para cada produto final foram adquiridos os espectros de FTIR, bem como também de  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -RMN e bidimensionais, com o objetivo de caracterizar os compostos e analisar a sua pureza. Nos espectros de infravermelhos verificou-se o aparecimento da banda forte das ligações N-H a

$3300\text{cm}^{-1}$  e  $\text{C}=\text{O}$  a  $1640\text{cm}^{-1}$ , característicos dos grupos amida. No espectro  $^1\text{H}$ -RMN verifica-se o aparecimento da banda larga a 7 ppm que representa o grupo  $-\text{NH}$  da amida com integração de 2H o que demonstra que a poliamina se acoplou em ambas as extremidades, e no  $^{13}\text{C}$ -RMN verifica-se um pequeno deslocamento dos carbonos do grupo éster e das amidas, bem como ainda ao se comparar com um espectro de amina livre, observa-se que os carbonos desta não se encontram presentes.

O DCU possui picos característicos nos espectros de  $^1\text{H}$ - e  $^{13}\text{C}$ -RMN, sendo no primeiro a 6,87ppm e a 2,15ppm. Por outro lado, no  $^{13}\text{C}$ -RMN, os sinais mais significantes e fáceis de identificar são os quatro picos a 125, 128, 135 e 156ppm, bem como ainda os dois picos a 54,1 e 54,66ppm.

Ambas as reações foram adaptadas para o ácido desoxicólico, porém para a segunda reação houve a necessidade de se alterar as condições, uma vez que o tempo de reação era o dobro e ainda havia a formação de vários subprodutos. Por estas razões, adicionou-se à reação 0,5eq do catalisador DMAP, tornando a solução mais básica e facilitando o ataque nucleofílico do  $-\text{OH}$  dos ácidos carboxílicos do substrato ao DCC [76, 77].

## 4.2. Avaliação Biológica

### 4.2.1. Análise preliminar da citotoxicidade dos compostos nas linhas celulares humanas

A avaliação biológica da citotoxicidade dos compostos foi efetuada nas diferentes linhas celulares humanas, mais propriamente na proliferação das células de cancro da mama sensíveis a estrogénios (MCF-7 e T-47D), células do adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP), células de glioblastoma (U87) e fibroblastos normais da derme (NHDF). A análise efetuou-se através do ensaio MTT, sendo que numa primeira fase, com o objetivo de avaliar numa forma geral o efeito, se incubaram as células com os compostos a uma concentração de 30 $\mu$ M durante 72h. O tempo de exposição foi escolhido de acordo com o ciclo celular das células, uma vez que para todas elas é superior a 24h e inferior a 48h, possibilitando a análise do efeito biológico dos compostos num ciclo celular completo. Os resultados obtidos nesta primeira fase encontram-se expostos na Tabela 1 e no Gráfico 1.

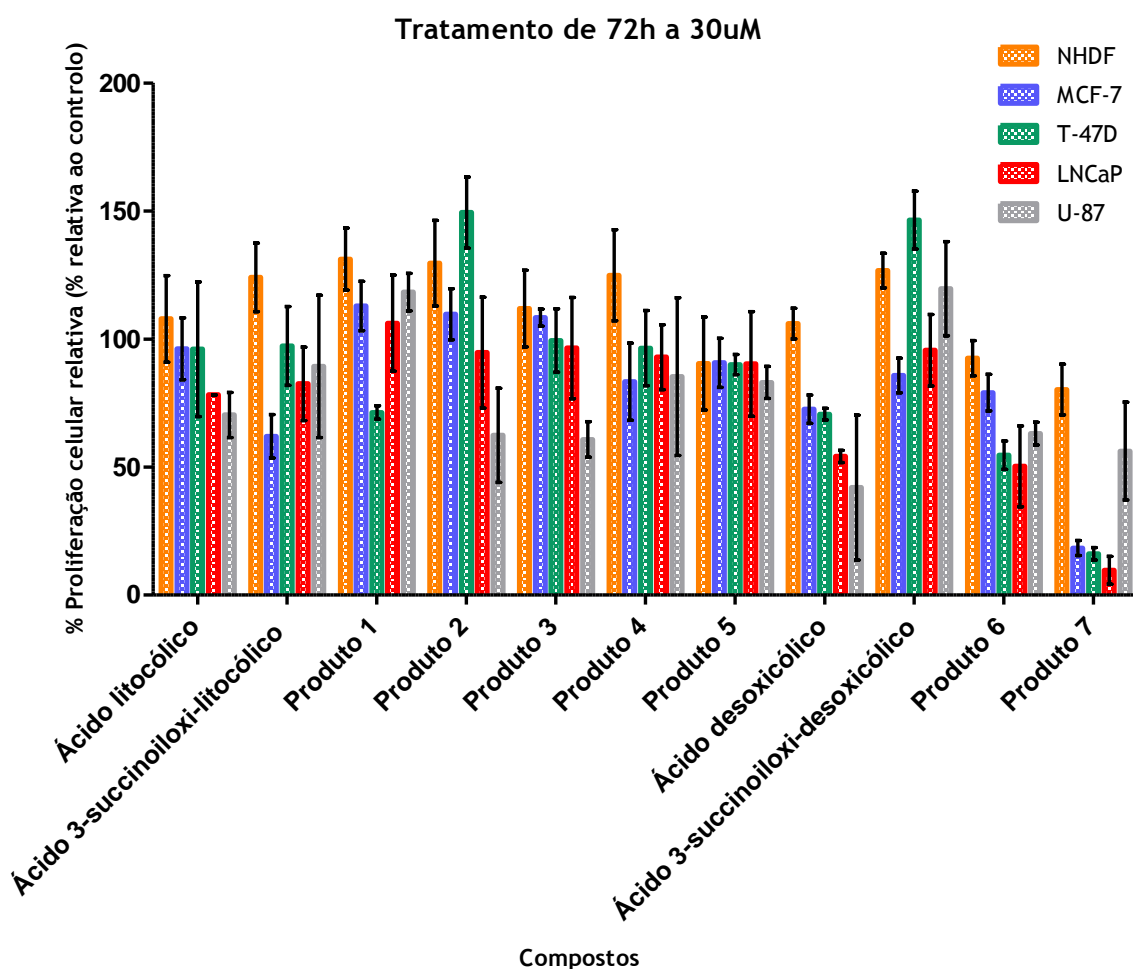


Gráfico 1: Percentagem da proliferação celular relativa nas cinco linhas celulares (NHDF, MCF-7, T-47D, LNCaP e U87) após o tratamento com os compostos sintetizados e os ácidos litocólico e desoxicólico, na concentração de 30 $\mu$ M durante 72h, realizados pelo ensaio MTT (concentração inicial de células=2x10<sup>4</sup> células/mL). Os dados estão apresentados em relação ao controlo (100%) e são

representativos de, no mínimo, duas experiências independentes, com n=5 em cada. No gráfico, as barras representam as médias e as linhas o seu desvio padrão.

Tabela 1: Percentagem da proliferação celular relativa nas cinco linhas celulares (NHDF, MCF-7, T-47D, LNCaP e U87) após o tratamento na concentração de 30 $\mu$ M, com os compostos sintetizados e os ácidos litocólico e desoxicólico, durante 72h, determinada pelo ensaio MTT (concentração inicial de células=2x10<sup>4</sup> células/mL). Os dados estão apresentados em relação ao controlo (100%) e são representativos de, no mínimo, duas experiências independentes, com n=5 em cada.

% Proliferação celular relativa (% relativa ao controlo)	NHDF	MCF-7	T-47D	LNCaP	U87
Ácido Litocólico	107,872	96,194	96,036	78,230	70,331
Ácido 3-succinoiloxi-litocólico	124,073	62,000	97,296	82,517	89,360
Produto 1	131,227	112,912	71,302	106,195	118,301
Produto 2	129,603	109,684	149,408	94,690	62,418
Produto 3	111,913	108,325	99,408	96,460	60,784
Produto 4	124,910	83,350	96,450	92,920	85,294
Produto 5	90,380	90,713	90,000	90,265	83,036
Ácido desoxicólico	106,025	72,597	70,650	54,1975	42,000
Ácido 3-succinoiloxi-desoxicólico	126,715	85,729	146,450	95,575	119,608
Produto 6	92,515	79,050	54,630	50,323	63,095
Produto 7	80,240	18,359	16,111	9,677	56,250

Dos resultados obtidos desta primeira fase, verifica-se que o composto que possui uma maior citotoxicidade é o produto 7, sendo também seletivo para determinadas linhas celulares cancerígenas, mais propriamente LNCaP, MCF-7 e T-47D, que são tumores hormono-dependentes. No geral, os compostos não aparentam ter um efeito citotóxico marcado nas células NHDF, e nas linhas celulares tumorais a redução da proliferação celular é também inferior a 50%. Um facto importante a destacar é o efeito do produto 5 em comparação ao do produto 7, sintetizados a partir de dois ácidos biliares diferentes, ácido litocólico e ácido desoxicólico, respetivamente, com a mesma poliamina, observando-se um efeito citotóxico marcadamente diferente. Este é um exemplo de que pequenas diferenças estruturais podem levar a uma alteração marcada da atividade anticancerígena, sendo que neste caso a diferença é um grupo álcool na posição 12 do produto 7, que lhe confere um caráter mais hidrofílico. Como este composto foi o único a originar valores inferiores a 50% da proliferação celular nas linhas LNCaP, MCF-7 e T-47D, decidiu-se realizar um estudo de dose-resposta e determinar o valor de IC<sub>50</sub>, ou seja, da concentração que o composto permite inibir 50% da proliferação celular, comparativamente com a ausência do mesmo. Por razões de comparação do efeito antiproliferativo, realizou-se o mesmo estudo também nas linhas NHDF e U87.

#### 4.2.2. Estudo dose-resposta e IC<sub>50</sub>

O estudo de dose-resposta foi realizado nas diferentes linhas celulares com o produto 7, a diosgenina e o 5-fluorouracil, numa gama de concentrações entre 0,01  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , incubadas durante 72h, tendo-se efetuado o ensaio MTT em que se quantificou espectrofotometricamente a absorvância do formazano a 570nm.

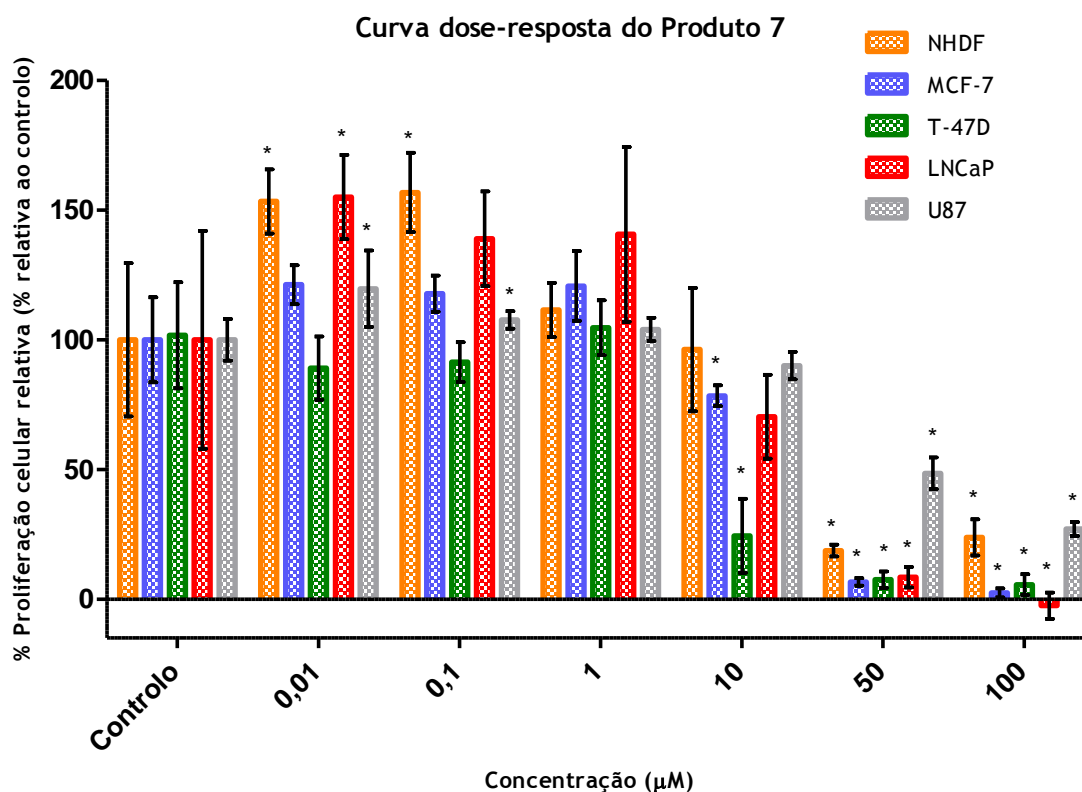


Gráfico 2: Percentagem da proliferação celular relativa nas cinco linhas celulares (NHDF, MCF-7, T-47D, LNCaP e U87) após o tratamento num intervalo de concentrações de 0,01 a 100  $\mu\text{M}$  com o produto 7 durante 72h, realizados pelo ensaio MTT (concentração= $2 \times 10^4$  células/mL). Os dados estão apresentados em relação ao controlo (100%) e são representativos de, no mínimo, duas experiências independentes, com n=5 em cada. No gráfico as barras representam as médias e as linhas o seu desvio padrão, como ainda \*  $p < 0,05$  versus respetivo controlo (teste t-student).

Como se verifica no gráfico 2, confirma-se a elevada seletividade do produto 7 para as linhas celulares hormono-dependentes, ou seja nas células LNCaP, MCF-7 e T-47D, e a baixa toxicidade nas células NHDF. Através do cálculo do IC<sub>50</sub> (Tabela 2), observa-se que na linha celular não cancerígena é de 41,92 $\mu\text{M}$ , na linha U87 é 48,49  $\mu\text{M}$ , e nas células MCF-7 e LNCaP é 16,97  $\mu\text{M}$  e 14,71  $\mu\text{M}$ , respetivamente. Por fim, na linha T-47D é 6,892  $\mu\text{M}$ , sendo nestas células em que se denota um maior efeito deste composto. É de realçar ainda que, nas células NHDF, nas concentrações de 0,01 e 0,1  $\mu\text{M}$ , se observa um estímulo da proliferação celular, sendo uma diferença significativa comparativamente ao controlo, e o mesmo parece acontecer nas células LNCaP e U87 nas mesmas concentrações. Ao longo da experiência foram captadas imagens do estado celular às 4 horas e 24 horas após tratamento com os compostos, que podem ser encontradas na secção de anexos. Mediante estas, verificaram-se algumas

alterações morfológicas ao longo do tempo, aumentando a concentração de células com formato redondo e diferentes tamanhos.

Para afeitos comparativos realizaram-se também experiências para obter as curvas dose-resposta de dois compostos comerciais, a diosgenina e o 5-flourouracilo (Tabela 2 e Gráficos 3 e 4) em algumas linhas celulares.

Tabela 2: Valores de IC<sub>50</sub>, em μM, do produto 7, diosgenina e 5-flourouracilo nas diferentes linhas celulares testadas com os correspondentes coeficientes de correlação.

	NHDF		MCF-7		T-47D		LNCaP		U87	
	IC <sub>50</sub> (μM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)	r <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)	r <sup>2</sup>
Produto 7	41,92	0,49	16,97	0,92	6,89	0,97	14,71	0,74	48,49	0,93
Diosgenina	-	-	52,86	0,04	>100	0,80	12,71	0,82	-	-
5-Flourouracil	3,394	0,98	>100	0,94	>100	0,36	2,227	0,96	-	-

A diosgenina é um esteroide, mais propriamente uma sapogenina que se encontra em diversas espécies vegetais, sendo um dos principais constituintes bioativos de várias plantas, por exemplo o inhame. Este composto é utilizado como precursor químico na preparação industrial de diversos esteroides sintéticos, nomeadamente pílulas anticoncepcionais orais [79]. A diosgenina tem demonstrado potencial antitumoral em diferentes linhas celulares cancerígenas humanas, tendo uma ação que envolve a inibição do ciclo celular e indução da apoptose, nomeadamente na linha MCF-7 [79].

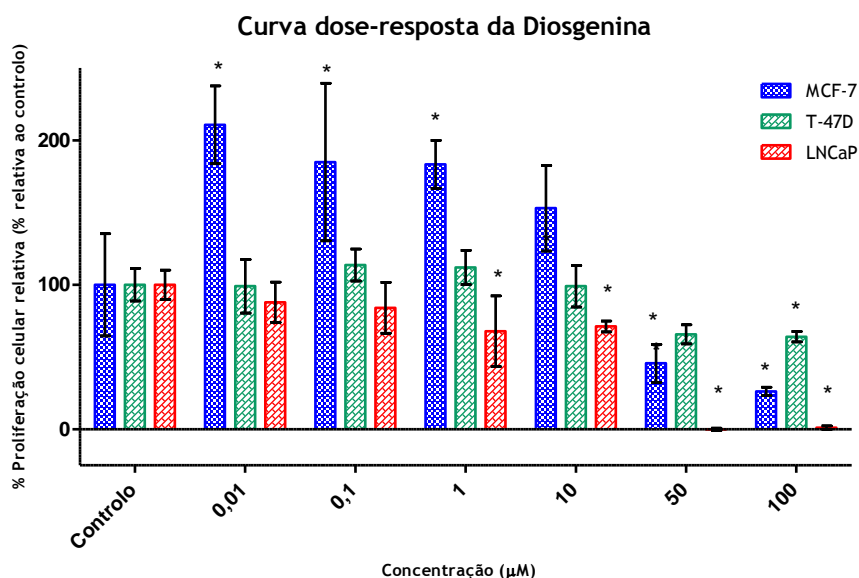


Gráfico 3: Percentagem da proliferação celular relativa nas linhas celulares MCF-7, T-47D e LNCaP após o tratamento num intervalo de concentrações de 0,01 a 100 μM com a diosgenina durante 72h, realizados pelo ensaio MTT (concentração=2x10<sup>4</sup> células/mL). Os dados estão apresentados em relação ao controle (100%) e são representativos de, no mínimo, duas experiências independentes, com n=5 em cada. No gráfico as barras representam as médias e as linhas o seu desvio padrão, como ainda \* p<0,05 versus respetivo controle (teste t-student).

A curva dose-resposta da diosgenina não está totalmente de acordo com a literatura, sendo que na linha MCF-7 encontra-se descrito o valor de  $IC_{50}$  de cerca de  $31,32\mu M$  [80], enquanto neste trabalho se obteve o valor de  $52,86\mu M$ . Nas outras linhas celulares verifica-se que as células LNCaP, que são sensíveis a androgénios, são as mais afetadas por este composto.

O 5-flourouracilo é um composto usado no tratamento de diversos cancros, nomeadamente cancro da mama, pescoço, estômago, colon e da pele, podendo ser combinado com outros fármacos ou radioterapia. Este composto pertence ao grupo antimetabolitos quimioterápicos, sendo similar a algumas moléculas do organismo, inibindo a enzima timidilato sintetase, evitando que exista uma manutenção do DNA nas células cancerígenas e, assim, bloqueia o seu crescimento e multiplicação, e inicia a apoptose [81].

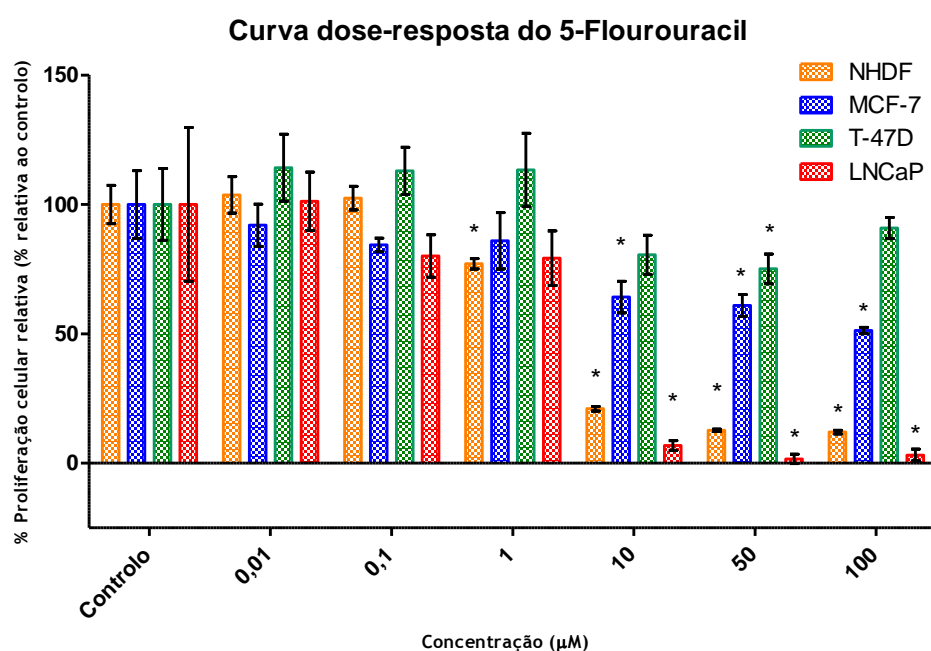


Gráfico 4: Percentagem da proliferação celular relativa nas linhas celulares NHDF, MCF-7, T-47D e LNCaP após o tratamento num intervalo de concentrações de 0,01 a 100  $\mu M$  com o 5-flourouracilo durante 72h, realizados pelo ensaio MTT, com  $n=2$  (concentração= $2 \times 10^4$  células/mL). Os dados estão apresentados em relação ao controlo (100%) e são representativos de, no mínimo, duas experiências independentes, com  $n=5$  em cada. No gráfico as barras representam as médias e as linhas o seu desvio padrão, como ainda \*  $p < 0,05$  versus respetivo controlo (teste  $t$ -student).

O efeito do 5-flourouracilo encontra-se também descrito na literatura, principalmente para a linha MCF-7, por ser utilizado no tratamento do cancro da mama. No entanto, verifica-se que os resultados aqui presentes (gráfico 4) não são semelhantes ao descrito, nomeadamente para a linha MCF-7, em que se encontra descrito um valor de  $IC_{50}$  cerca de  $6,16\mu M$  [82]. O mesmo se verifica para a linha LNCaP, sendo que na literatura se encontra descrito um  $IC_{50}$  de cerca de  $68,5\mu M$ , enquanto neste trabalho se obteve  $2,23\mu M$ . Não só as condições experimentais podem ser diferentes das descritas na literatura, mas também pode ter acontecido as células terem sofrido alterações nas suas características, nomeadamente as células MCF-7 usadas no presente trabalho serem resistentes a este antitumoral.

### 4.3. Citometria de fluxo

Tendo como objetivo avaliar a viabilidade celular, utilizou-se a linha celular MCF-7 para os testes de citometria de fluxo, tendo estas células sido tratadas com o produto 7 e 5-fluorouracilo na concentração 50 $\mu$ M, e incubadas durante 24 horas. A concentração e o tempo usado foram pensados de forma que as células se encontrassem a sofrer os primeiros efeitos dos compostos no momento da análise, por exemplo em apoptose inicial.

A citometria de fluxo é uma técnica que permite distinguir subpopulações celulares, tendo como base o estado fisiológico ou metabólico. Isto é conseguido com o auxílio de sondas fluorescentes que marcam as células de acordo com o pretendido e funcionalidade.

Durante o processo de apoptose ocorrem alterações nas células, sendo que numa fase inicial se modifica a estrutura da membrana plasmática e, posteriormente, a condensação do DNA e a diminuição do tamanho da célula. Por isso, utilizou-se o marcador iodeto de propídio, que consegue entrar nas células mortas ou com membranas danificadas e intercala-se com o DNA, enquanto as células viáveis não permitem a passagem da sonda, uma vez que possuem a membrana intacta. Assim, o iodeto de propídio, ao entrar nas células que lhe são permeáveis permite fazer a exclusão das células viáveis, bem ainda possibilita a distinção das células apoptóticas numa fase inicial das necróticas, sendo a sua utilização um método rápido e simples [72, 73].

Tendo em conta isso e, como já foi mencionado na parte experimental, foram criadas 2 regiões no software de análise, de forma a excluir os eventos sem marcação que passam pelo citómetro, que poderão ser fragmentos sem DNA (lixo), bem como também excluir os agregados, para que não apareçam na análise e apenas sejam observáveis as células viáveis e *debris*, ou restos celulares com DNA.

Os resultados deste estudo demonstraram que o produto 7 após 24 horas de incubação origina uma morte celular de cerca 13%, sendo representada pela região R3, verificando-se também nesta região que existe uma maior densidade de restos celulares comparativamente com o controlo negativo e com o 5-fluorouracilo. Assim, o produto 7 origina um maior efeito citotóxico que o 5-fluorouracilo, que levou a 7,6% de células mortas, também numa exposição de 24 horas, e que o observado no controlo negativo (3,5% de células mortas).

O tipo de morte das células foi outro aspeto analisado, verificando-se que o produto 7 poderá ter como mecanismo preferencial a indução da apoptose, uma vez que na região 3 parecem existir *debris* de pequeno tamanho, que podem ser células em processo de apoptose. Em anexo encontra-se o resultado para o produto 7 indicando-se as regiões 2 e 3, bem como ainda a região não representada no gráfico 5.

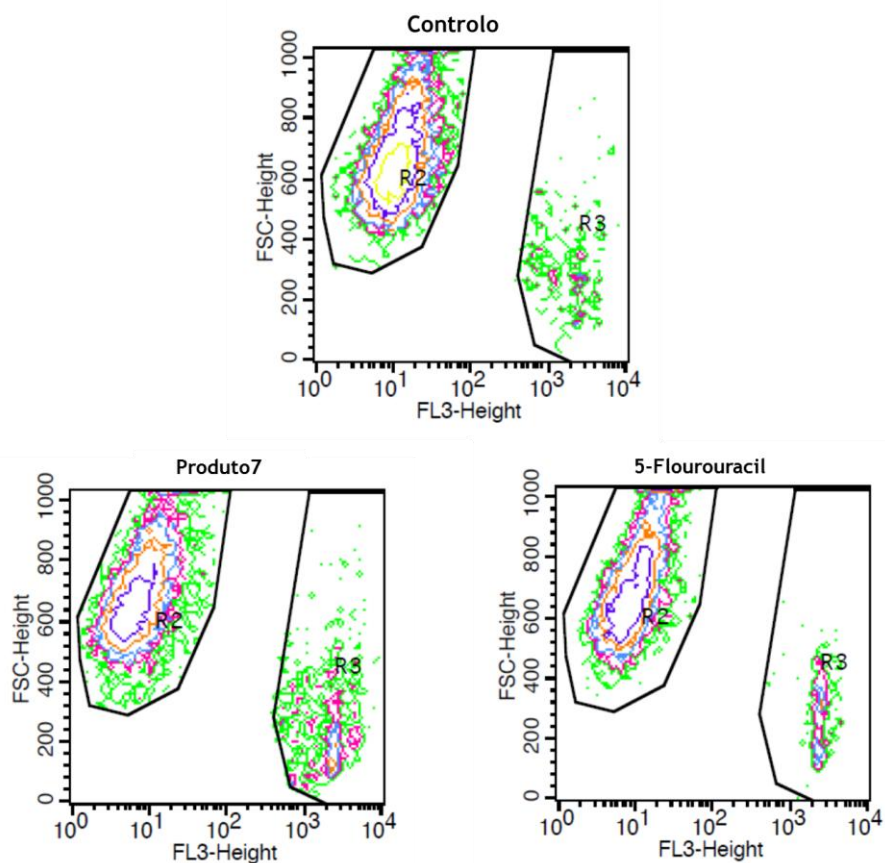


Gráfico 5: Resultados do estudo de viabilidade celular das células MCF-7 com o marcador iodeto de propídeo. O controlo consiste em células sem qualquer tratamento, e as células foram tratadas com o produto 7, bem como com 5-flourouracil, tendo sido incubadas por 24horas após adição dos compostos às culturas celulares ( $3 \times 10^4$  cel/mL). R2=células viáveis e R3=debris.

#### 4.4. Análise da interação do Produto 7 com o G-quadruplex

O dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica que tem sido utilizada para analisar as conformações do G-quadruplex, apresentando as suas características principais de acordo com a topologia adquirida, estando isto relacionado com as interações entre as tétradas de G adjacentes [13].

A titulação do G-quadruplex com o composto pode induzir alterações no espectro que podem estar relacionadas com as propriedades do ligando, levando a estabilização preferencial de uma determinada topologia da estrutura G-quadruplex [13].

Neste trabalho utilizou-se a sequência telomérica 22AG, que tem demonstrado ser mais sensível que algumas sequências comerciais às variações de concentração de  $K^+$  em solução. Por isso, e de acordo com trabalhos realizados anteriormente pelo grupo de trabalho, a concentração de 10mM de  $K^+$  é a ideal para as experiências de dicroísmo circular no estudo de interação entre ligandos e esta sequência de G-quadruplex.

No tampão de KCl usado sem a presença de qualquer ligando, a sequência telomérica 22AG apresenta-se na forma híbrida tendo como sinais característicos uma banda positiva forte a 290nm com uma pequena saliência a 265nm, uma pequena banda positiva a 250nm e uma banda negativa pequena a 235nm.

Durante a titulação recolheu-se espectros de *CD melting* a 263nm num intervalo de temperatura de 20°C a 80°C, como ainda um espectro a 20°C, variando-se o comprimento de onda de 240nm a 340nm, tal como demonstra os seguintes gráficos (gráfico 6) para os três diferentes equivalentes do composto.

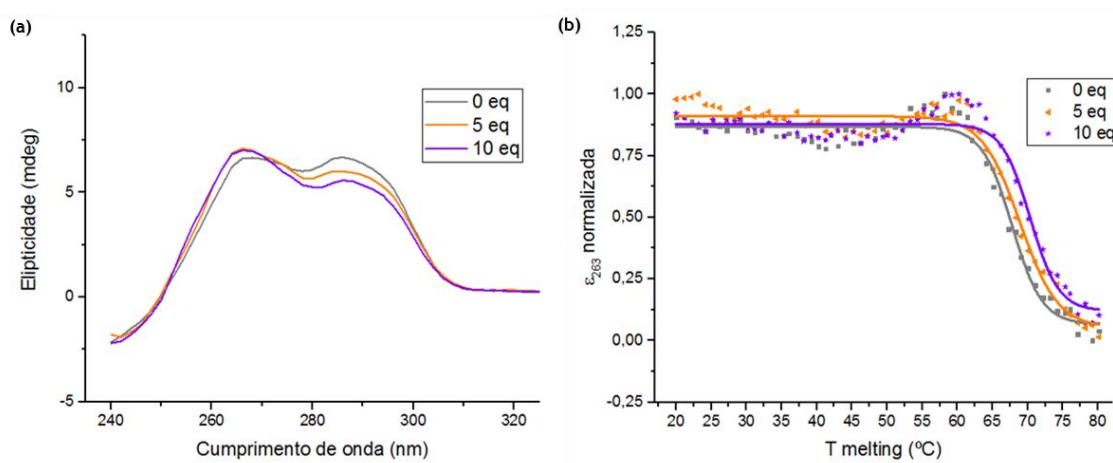


Gráfico 6: Titulação de 10µM da sequência telomérica 22AG de G-quadruplex com o produto7, em tampão KCl 10mM e 20% de DMSO. (a) Espectro da elipticidade em mdeg com a representação do controlo e composto a 5eq e 10eq, obtidos a temperatura de 20°C com variação de comprimento de onda de 240

a 340nm. (b) Espectro a comprimento de onda de 263nm, da variação da temperatura de melting num intervalo de 20°C a 80°C do controlo e composto a 5eq e 10eq.

Como se verifica, não parecem haver diferenças significativas com o aumento da concentração do produto 7 em solução com a sequência, podendo apenas sugerir que a sua interação e estabilização existe, mas que pode não ser forte, o que pode ser justificado pela pequena diferença entre as curvas de temperatura de melting ( $\Delta T_{1/2} < 1$ ). Para além disso pode-se ainda verificar que o ligando favorece a que o G-quadruplex passe de híbrido para a conformação paralela, uma vez que ao se aumentar a concentração do composto ocorre, em termos de elipticidade, uma diminuição da banda a 285nm, bem como ainda o aumento da banda a 263nm. Caso fosse antiparalela verificar-se-ia o contrário, pois tem como características a banda negativa a 263nm e uma banda positiva a 295nm, no espectro de dicroísmo circular [83].

#### 4.5. Discussão geral

Neste trabalho um dos objetivos que era desenvolver compostos para a interação e estabilização da estrutura de G-quadruplex. De acordo com os resultados obtidos por dicroísmo circular, estes ligandos tem fraca afinidade e estabilização com as estruturas teloméricas. No entanto, isto não significa que não poderá estabilizar outras sequências de G-quadruplex. Uma vez que as poliaminas na forma livre se podem ligar ao DNA ou RNA, sendo reguladores essenciais da expressão genética e da divisão celular, podendo afetar a interação entre proteínas e o DNA [84]. Devido à sua capacidade de interagir com o DNA, um outro objetivo foi desenhar as moléculas de forma a conter pelo menos uma poliamina ligada a um ácido biliar, uma vez que estes também possuem a capacidade de entrar na célula e interagir com o DNA e moléculas intracelulares.

Os valores dos  $IC_{50}$  para cada composto em estudo e para cada tipo de célula estão sumarizados na Tabela 2. De todos os compostos sintetizados, na concentração de  $30\mu M$  apenas se obtiveram resultados significativos em termos de citotoxicidade para o produto 7, que se distingue dos restantes ao ser mais hidrofílico por apresentar um grupo OH na posição 12, podendo ser esta a razão da sua citotoxicidade perante as linhas celulares cancerígenas, não afetando a linha NHDF, ou seja as células saudáveis. De acordo com os resultados da citometria de fluxo este composto parece ativar um mecanismo de apoptose, ficando a dúvida de qual será a via ativada. Como após 4 horas havia já alterações evidentes nas células, sugere-se que possa ter sido por ativação de recetores de membrana, uma vez que são vias mais rápidas, e não tanto pela interação com o DNA, já que esta ação foi também descartada pelo dicroísmo circular, pelo menos para a sequência telomérica de G-quadruplex.

O produto 7 demonstra também ser mais seletivo para as linhas celulares MCF-7, LNCaP e T-47D, que são de tumores hormono-dependentes, sendo que estas células apresentam como característica a presença de recetores sensíveis a esteroides, mais propriamente estrogénios, nas células MCF-7 e T-47D, sendo nas LNCaP receptores de androgénios. Os compostos que a que estas células são sensíveis apresentam uma estrutura base esteroide, tal como os ácidos biliares, sendo talvez esta a razão explicativa dos efeitos do produto 7 nestas linhas celulares [72, 73].

Quanto aos restantes compostos, na literatura encontra-se descrito o ácido 3-succinoiloxilicólico, tendo-se provado que apresenta um  $IC_{50}$  de  $12\mu M$  em culturas de células de fígado de rato em estudos de inibição da enzima  $\alpha$ -2,3-sialiltransferase, sugerindo que os compostos sintetizados a partir deste possam vir a apresentar um efeito nouro tipo de células ou de estudo [64].

Num outro estudo, com o objetivo de analisar a interação de compostos derivados de ácidos biliares com o DNA, verificou-se que o ácido desoxicólico com uma cadeia poliaminada apenas no carbono 24, apresenta uma elevada afinidade com o DNA devido à posição e

estereoquímica dos grupos hidroxilo. No entanto, um outro composto semelhante sintetizado a partir do ácido litocólico tem ainda uma maior capacidade de interação com o DNA que o derivado do ácido desoxicólico [63]. Ou seja, a interação com o DNA pode ocorrer, mas está dependente dos compostos, bem como ainda da sequência com que pode interagir.

Adicionalmente, num estudo envolvendo ácidos biliares com substituição nas cadeias laterais, concluíram que a interação com o DNA era favorecida pela quantidade de aminas, em vez de elementos de oxigénio, por apresentarem uma maior superfície hidrofóbica [62]. Esta pode ser uma razão explicativa de o produto 7 não ser um bom estabilizador do G-quadruplex.

## 5. Conclusão

O cancro é uma patologia com elevada morbidade e mortalidade a nível mundial, estando associado a um enorme impacto socioeconómico. Apesar do rápido avanço científico neste campo observado nas últimas décadas, a sua incidência tem vindo a aumentar, principalmente os cancros hormono-dependentes, como o cancro da mama na mulher e o cancro da próstata no homem, sendo por isso cada vez mais urgente a procura de novas alternativas.

Desta forma, o objetivo geral deste trabalho consistiu na síntese de novos compostos derivados do ácido litocólico e desoxicólico com um potencial antiproliferativo em diferentes linhas cancerígenas e não-cancerígenas, bem como com potencial para a interação e estabilização da sequência telomérica de G-quadruplex.

Dos resultados obtidos pode-se concluir:

- ❖ A via sintética adaptada é reprodutível para diferentes ácidos biliares, como também para diferentes poliaminas, porém obtém-se rendimentos relativamente baixos.
- ❖ O produto 7 apresenta seletividade para as células tumorais hormono-dependentes estudadas, não afetando a linha celular saudável NHDF, podendo a sua citotoxicidade seletiva estar relacionada com a presença de recetores de estrogénios e de androgénios.
- ❖ A estrutura condiciona os efeitos observados, uma vez que dois compostos estruturalmente semelhantes apresentam efeitos antiproliferativos diferentes, como é o caso do produto 7 e do produto 5, em que o primeiro apresenta apenas mais um grupo hidroxilo na posição 12.
- ❖ Como ligando, o produto 7 interage e estabiliza pouco a sequência telomérica do G-quadruplex, porém são necessários estudos noutros tipos de sequências.
- ❖ Todos os compostos que revelaram baixa citotoxicidade são potencialmente exploráveis em estudos futuros noutras áreas, nomeadamente a sua potencial aplicação como agentes antimicrobianos.

Concluindo, com este trabalho foi possível sintetizar novos compostos que não se encontram descritos na literatura, em que um deles tem potencial para continuar a ser estudado e ser a base para gerar novos análogos com potencial farmacológico melhorado de forma a aumentar a seletividade e potência dos efeitos.



## 6. Perspetivas futuras

Ao longo do atual trabalho desenvolvido e apresentado foram surgindo dúvidas e novas ideias para futuros estudos:

- ❖ Procura de novas vias alternativas para a reação de síntese de aminoamidas esteroides, de forma a ultrapassar a dificuldade de purificação e do baixo rendimento.
- ❖ Adaptar a via sintética a outros ácidos biliares, nomeadamente o ácido cólico, por apresentar mais um grupo -OH ligado ao carbono 7, comparativamente com o ácido desoxicólico.
- ❖ Estudo de relação estrutura-atividade do produto 7, uma vez que aparenta ser o mais promissor em termos de seletividade entre células saudáveis e tumorais. As alterações estruturais a realizar podem ser, por exemplo, a formação de uma estrutura macrocíclica com um segundo ácido desoxicólico ou com um anel aromático a ligar as duas poliaminas do composto, de forma a aumentar o efeito citotóxico nas linhas celulares tumorais e/ou favorecer a estabilização do G-quadruplex.
- ❖ Estudo dos mecanismos biológicos explicativos da citotoxicidade do composto 7 e análogos que aparentem ser promissores depois de estudos de viabilidade celular, nomeadamente a identificação de vias de morte celular, por exemplo por apoptose, envolvendo caspases, bax, P53 e citocromo c, etc.
- ❖ Estudo farmacocinético, nomeadamente de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, dos compostos obtidos posteriormente a partir do produto 7 e/ou de análogos, que aparentem ser promissores depois de estudos de viabilidade celular
- ❖ Estudar a interação do produto 7 e análogos com outras sequências de DNA G-quadruplex, nomeadamente c-MYC.

Os compostos sintetizados, exceto o produto 7, apresentam baixa citotoxicidade em todas as linhas celulares tumorais e não tumorais e, para todos, os outros estudos poderão passar por:

- Estudar a atividade antimicrobiana dos compostos.
- Estudar a possibilidade dos compostos sintetizados como scaffolds de transporte de compostos, uma vez que não apresentam citotoxicidade na linha NHDF.



## 7. Bibliografia

1. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., et al., *Global cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2011. **61**(2): p. 69-90.
2. Steliarova-Foucher, E., O'Callaghan, M., Ferlay, J., et al., *The European Cancer Observatory: A new data resource*. Eur J Cancer, 2014.
3. LPCC., in *Doenças Oncológicas em números*, L.P.C.o. Cancro, Editor. 2013.
4. Cheung-Ong, K., G. Giaever, and C. Nislow, *DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology*. Chem Biol, 2013. **20**(5): p. 648-59.
5. Vichaya, E.G., Chiu, G. S., Krukowski, K., et al., *Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities*. Front Neurosci, 2015. **9**: p. 131.
6. Huppert, J.L., *Structure, location and interactions of G-quadruplexes*. FEBS J, 2010. **277**(17): p. 3452-8.
7. Qin, Y. and L.H. Hurley, *Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions*. Biochimie, 2008. **90**(8): p. 1149-71.
8. Potaman, V.N. and R.R. Sinden, *DNA: Alternative Conformations and Biology*, in *Madame Curie Bioscience Database*. 2000, Landes Bioscience.
9. Han, H. and L.H. Hurley, *G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design*. Trends Pharmacol Sci, 2000. **21**(4): p. 136-42.
10. Neidle, S., *The structures of quadruplex nucleic acids and their drug complexes*. Curr Opin Struct Biol, 2009. **19**(3): p. 239-50.
11. Shan, C., Tan, J.-H., et al. Ou, T.-M., et al., *Natural products and their derivatives as G-quadruplex binding ligands*. Science China Chemistry, 2013. **56**(10): p. 1351-1363.
12. Neidle, S., *2 - DNA and RNA Quadruplex Structures*, in *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*, S. Neidle, Editor. 2012, Academic Press: Boston. p. 21-42.
13. Murat, P., Y. Singh, and E. Defrancq, *Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions*. Chem Soc Rev, 2011. **40**(11): p. 5293-307.
14. Huppert, J.L., *Hunting G-quadruplexes*. Biochimie, 2008. **90**(8): p. 1140-8.
15. Agarwala, P., S. Pandey, and S. Maiti, *The tale of RNA G-quadruplex*. Org Biomol Chem, 2015. **13**(20): p. 5570-85.
16. Tarsounas, M. and M. Tijsterman, *Genomes and G-quadruplexes: for better or for worse*. J Mol Biol, 2013. **425**(23): p. 4782-9.
17. Lipps, H.J. and D. Rhodes, *G-quadruplex structures: in vivo evidence and function*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(8): p. 414-22.
18. Riou, J.F., *G-quadruplex interacting agents targeting the telomeric G-overhang are more than simple telomerase inhibitors*. Curr Med Chem Anticancer Agents, 2004. **4**(5): p. 439-43.

19. Dai, J., M. Carver, and D. Yang, *Polymorphism of human telomeric quadruplex structures*. *Biochimie*, 2008. **90**(8): p. 1172-83.
20. De Cian, A., Lacroix, L., Douarre, C., et al., *Targeting telomeres and telomerase*. *Biochimie*, 2008. **90**(1): p. 131-55.
21. Duchler, M., *G-quadruplexes: targets and tools in anticancer drug design*. *J Drug Target*, 2012. **20**(5): p. 389-400.
22. Lu, W., Zhang, Y., Liu, D., et al., *Telomeres—structure, function, and regulation*. *Experimental Cell Research*, 2013. **319**(2): p. 133-141.
23. Giardini, M.A., Segatto, M., da Silva, M. S., et al., *Chapter One - Telomere and Telomerase Biology*, in *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, T.C. Rodrigo, Editor. 2014, Academic Press. p. 1-40.
24. Nandakumar, J. and T.R. Cech, *Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(2): p. 69-82.
25. Johnson, J.E., Smith, J. S., Kozak, M. L., et al., *In vivo veritas: using yeast to probe the biological functions of G-quadruplexes*. *Biochimie*, 2008. **90**(8): p. 1250-63.
26. Franceschin, M., *G-Quadruplex DNA Structures and Organic Chemistry: More Than One Connection*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2009. **2009**(14): p. 2225-2238.
27. Balasubramanian, S. and S. Neidle, *G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets*. *Curr Opin Chem Biol*, 2009. **13**(3): p. 345-53.
28. Patel, D.J., A.T. Phan, and V. Kuryavyi, *Human telomere, oncogenic promoter and 5'-UTR G-quadruplexes: diverse higher order DNA and RNA targets for cancer therapeutics*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(22): p. 7429-55.
29. Balasubramanian, S., L.H. Hurley, and S. Neidle, *Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy?* *Nat Rev Drug Discov*, 2011. **10**(4): p. 261-75.
30. Qin, Y. and L.H. Hurley, *Structures, folding patterns, and functions of intramolecular DNA G-quadruplexes found in eukaryotic promoter regions*. *Biochimie*, 2008. **90**(8): p. 1149-1171.
31. Mathad, R.I., Hatzakis, E., Dai, J., et al., *c-MYC promoter G-quadruplex formed at the 5'-end of NHE III1 element: insights into biological relevance and parallel-stranded G-quadruplex stability*. *Nucleic Acids Research*, 2011. **39**(20): p. 9023-9033.
32. Shirude, P.S. and S. Balasubramanian, *Single molecule conformational analysis of DNA G-quadruplexes*. *Biochimie*, 2008. **90**(8): p. 1197-206.
33. Monchaud, D., Granzhan, A., Saettel, N., et al., *"One ring to bind them all"-part I: the efficiency of the macrocyclic scaffold for g-quadruplex DNA recognition*. *J Nucleic Acids*, 2010. **2010**.
34. Neidle, S., *9 - Design Principles for Quadruplex-binding Small Molecules*, in *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids*, S. Neidle, Editor. 2012, Academic Press: Boston. p. 151-174.
35. Monchaud, D. and M.P. Teulade-Fichou, *A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands*. *Org Biomol Chem*, 2008. **6**(4): p. 627-36.

36. Shin-ya, K., Wierzba, K., Matsuo, K.-i., et al., *Telomestatin, a Novel Telomerase Inhibitor from Streptomyces anulatus*. Journal of the American Chemical Society, 2001. **123**(6): p. 1262-1263.
37. Rzuczek, S.G., Pilch, D. S., Liu, A., et al., *Macrocyclic pyridyl polyoxazoles: selective RNA and DNA G-quadruplex ligands as antitumor agents*. J Med Chem, 2010. **53**(9): p. 3632-44.
38. Brassart, B., Gomez, D., De Cian, A., et al., *A new steroid derivative stabilizes g-quadruplexes and induces telomere uncapping in human tumor cells*. Mol Pharmacol, 2007. **72**(3): p. 631-40.
39. McKenzie, A.G., *Prelude to pancuronium and vecuronium*. Anaesthesia, 2000. **55**(6): p. 551-556.
40. Li, J., Jin, X., Hu, L., et al., *Identification of nonplanar small molecule for G-quadruplex grooves: molecular docking and molecular dynamic study*. Bioorg Med Chem Lett, 2011. **21**(23): p. 6969-72.
41. Nahar, L. and S.D. Sarker, *Introduction*, in *Steroid Dimers*. 2012, John Wiley & Sons, Ltd. p. 1-6.
42. Tian, M., Zhang, X., Li, Y., et al., *Inducement of G-quadruplex DNA forming and down-regulation of oncogene c-myc by bile acid-amino acid conjugate-BAA*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2010. **29**(3): p. 190-9.
43. Hofmann, A.F. and L.R. Hagey, *Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades*. Journal of Lipid Research, 2014. **55**(8): p. 1553-1595.
44. *IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). The nomenclature of steroids. Recommendations 1989*. Eur J Biochem, 1989. **186**(3): p. 429-58.
45. Morgan, B.P. and M.S. Moynihan, *Steroids*, in *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*. 2000, John Wiley & Sons, Inc.
46. Thomas, G., *Fundamentals of Medicinal Chemistry*. 2003: Wiley.
47. Li, T. and J.Y. Chiang, *Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy*. Pharmacol Rev, 2014. **66**(4): p. 948-83.
48. Norlin, M. and K. Wikvall, *Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids*. Curr Mol Med, 2007. **7**(2): p. 199-218.
49. Houten, S.M., M. Watanabe, and J. Auwerx, *Endocrine functions of bile acids*. EMBO J, 2006. **25**(7): p. 1419-25.
50. Zhu, X.-X. and M. Nichifor, *Polymeric Materials Containing Bile Acids*. Accounts of Chemical Research, 2002. **35**(7): p. 539-546.
51. Mukhopadhyay, S. and U. Maitra, *Chemistry and biology of bile acids*. Current Science, 2004. **87**(12): p. 1666-1683.
52. Debruyne, P.R., Bruyneel, E. A., Li, X., et al., *The role of bile acids in carcinogenesis*. Mutat Res, 2001. **480-481**: p. 359-69.
53. Virtanen, E. and E. Kolehmainen, *Use of Bile Acids in Pharmacological and Supramolecular Applications*. European Journal of Organic Chemistry, 2004. **2004**(16): p. 3385-3399.

54. Ogawa, A., Murate, T., Suzuki, M., et al., *Lithocholic Acid, a Putative Tumor Promoter, Inhibits Mammalian DNA Polymerase  $\beta$* . Japanese Journal of Cancer Research, 1998. **89**(11): p. 1154-1159.
55. Hylemon, P.B., Zhou, H., Pandak, W. M., et al., *Bile acids as regulatory molecules*. Journal of Lipid Research, 2009. **50**(8): p. 1509-1520.
56. Ajouz, H., D. Mukherji, and A. Shamseddine, *Secondary bile acids: an underrecognized cause of colon cancer*. World J Surg Oncol, 2014. **12**: p. 164.
57. Centuori, S.M. and J.D. Martinez, *Differential regulation of EGFR-MAPK signaling by deoxycholic acid (DCA) and ursodeoxycholic acid (UDCA) in colon cancer*. Dig Dis Sci, 2014. **59**(10): p. 2367-80.
58. Arlia-Ciommo, A., Piano, A., Svistkova, V., et al., *Mechanisms underlying the anti-aging and anti-tumor effects of lithocholic bile acid*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(9): p. 16522-43.
59. Goldberg, A.A., Beach, A., Davies, G. F., et al., *Lithocholic bile acid selectively kills neuroblastoma cells, while sparing normal neuronal cells*. Oncotarget, 2011. **2**(10): p. 761-82.
60. Perrone, E.E., Liu, L., Turner, D. J., et al., *Bile salts increase epithelial cell proliferation through HuR-induced c-Myc expression*. J Surg Res, 2012. **178**(1): p. 155-64.
61. Davis, A.P., *Bile acid scaffolds in supramolecular chemistry: the interplay of design and synthesis*. Molecules, 2007. **12**(9): p. 2106-22.
62. Hsieh, H.P., J.G. Muller, and C.J. Burrows, *Synthesis and DNA binding properties of C3-, C12-, and C24-substituted amino-steroids derived from bile acids*. Bioorg Med Chem, 1995. **3**(6): p. 823-38.
63. Blagbrough, I.S., D. Al-Hadithi, and A.J. Geall, *Cheno-, Urso- and Deoxycholic Acid Spermine Conjugates: Relative Binding Affinities for Calf Thymus DNA*. Tetrahedron, 2000. **56**(21): p. 3439-3447.
64. Chang, K.H., Lee, L., Chen, J., et al., *Lithocholic acid analogues, new and potent alpha-2,3-sialyltransferase inhibitors*. Chem Commun (Camb), 2006(6): p. 629-31.
65. Levenson, A.S. and V.C. Jordan, *MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line*. Cancer Res, 1997. **57**(15): p. 3071-8.
66. Russell, P.J. and E.A. Kingsley, *Human prostate cancer cell lines*. Methods Mol Med, 2003. **81**: p. 21-39.
67. ATCC. *T-47D*. 06-09-15]; Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-133.aspx>.
68. ATCC. *U-87*. 06-09-15]; Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-14.aspx>.
69. ATCC. *Primary Dermal Fibroblasts*. 06-09-15]; Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/PCS-201-012.aspx>.
70. ATCC. *MTT Cell Proliferation Assay*. 06-09-15]; Available from: <http://www.atcc.org/~media/DA5285A1F52C414E864C966FD78C9A79.ashx>.

71. Ramos, S., *Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention*. J Nutr Biochem, 2007. **18**(7): p. 427-42.
72. Khan, N., V.M. Adhami, and H. Mukhtar, *Apoptosis by dietary agents for prevention and treatment of prostate cancer*. Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(1): p. R39-52.
73. Mooney, L.M., Al-Sakkaf, K. A., Brown, B. L., et al., *Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells*. Br J Cancer, 2002. **87**(8): p. 909-17.
74. Bulheller, B.M., A. Rodger, and J.D. Hirst, *Circular and linear dichroism of proteins*. Phys Chem Chem Phys, 2007. **9**(17): p. 2020-35.
75. Valeur, E. and M. Bradley, *Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(2): p. 606-31.
76. Montalbetti, C.A.G.N. and V. Falque, *Amide bond formation and peptide coupling*. Tetrahedron, 2005. **61**(46): p. 10827-10852.
77. Nahar, L. and S.D. Sarker, *Synthesis of Acyclic Steroid Dimers*, in *Steroid Dimers*. 2012, John Wiley & Sons, Ltd. p. 7-186.
78. Nie, Y., Ji, L., Ding, H., et al., *Cholesterol derivatives based charged liposomes for doxorubicin delivery: preparation, in vitro and in vivo characterization*. Theranostics, 2012. **2**(11): p. 1092-103.
79. Raju, J. and R. Mehta, *Cancer chemopreventive and therapeutic effects of diosgenin, a food saponin*. Nutr Cancer, 2009. **61**(1): p. 27-35.
80. Raju, J. and R. Mehta, *Cancer Chemopreventive and Therapeutic Effects of Diosgenin, a Food Saponin*. Nutrition and Cancer, 2008. **61**(1): p. 27-35.
81. Vinod, B.S., Antony, J., Nair, H. H., et al., *Mechanistic evaluation of the signaling events regulating curcumin-mediated chemosensitization of breast cancer cells to 5-fluorouracil*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e505.
82. Li, X., Kong, X., Kong, X., et al., *53BP1 sensitizes breast cancer cells to 5-fluorouracil*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e74928.
83. Shi, S., Gao, S., Cao, T., et al., *Targeting Human Telomeric G-Quadruplex DNA and Inhibition of Telomerase Activity With [(dmb)<sub>2</sub>Ru(obip)Ru(dmb)<sub>2</sub>]<sup>4+</sup>*. PLoS ONE, 2013. **8**(12): p. e84419.
84. Chang, Y.M., C.K. Chen, and M.H. Hou, *Conformational changes in DNA upon ligand binding monitored by circular dichroism*. Int J Mol Sci, 2012. **13**(3): p. 3394-413.



## 8. Anexos

### 8.1. Culturas celulares às 4h e 24h de incubação com compostos

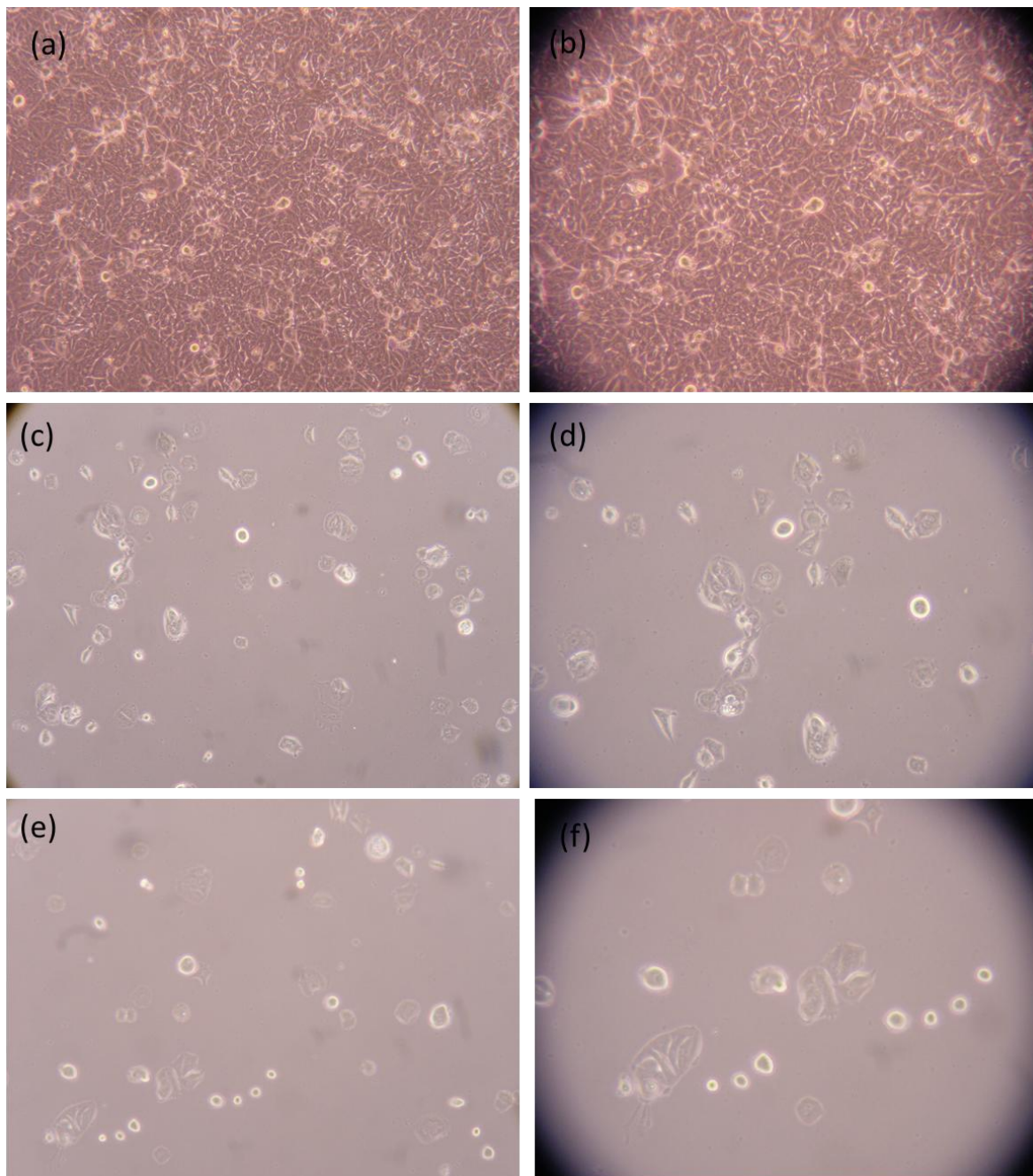


Figura 22: Fotografias efetuadas às células MCF-7, após 4 horas de incubação com compostos a concentração  $50\mu\text{M}$  para o procedimento de citometria de fluxo, (a) e (b) são controlos, (c) e (d) do produto 7 e (e) e (f) do 5-flourouracil ( $3 \times 10^4 \text{ cel/mL}$ ) (Ampliação de 100X - microscópio Olympus CKX 41, equipado com máquina fotográfica digital Olympus SP 500UZ)

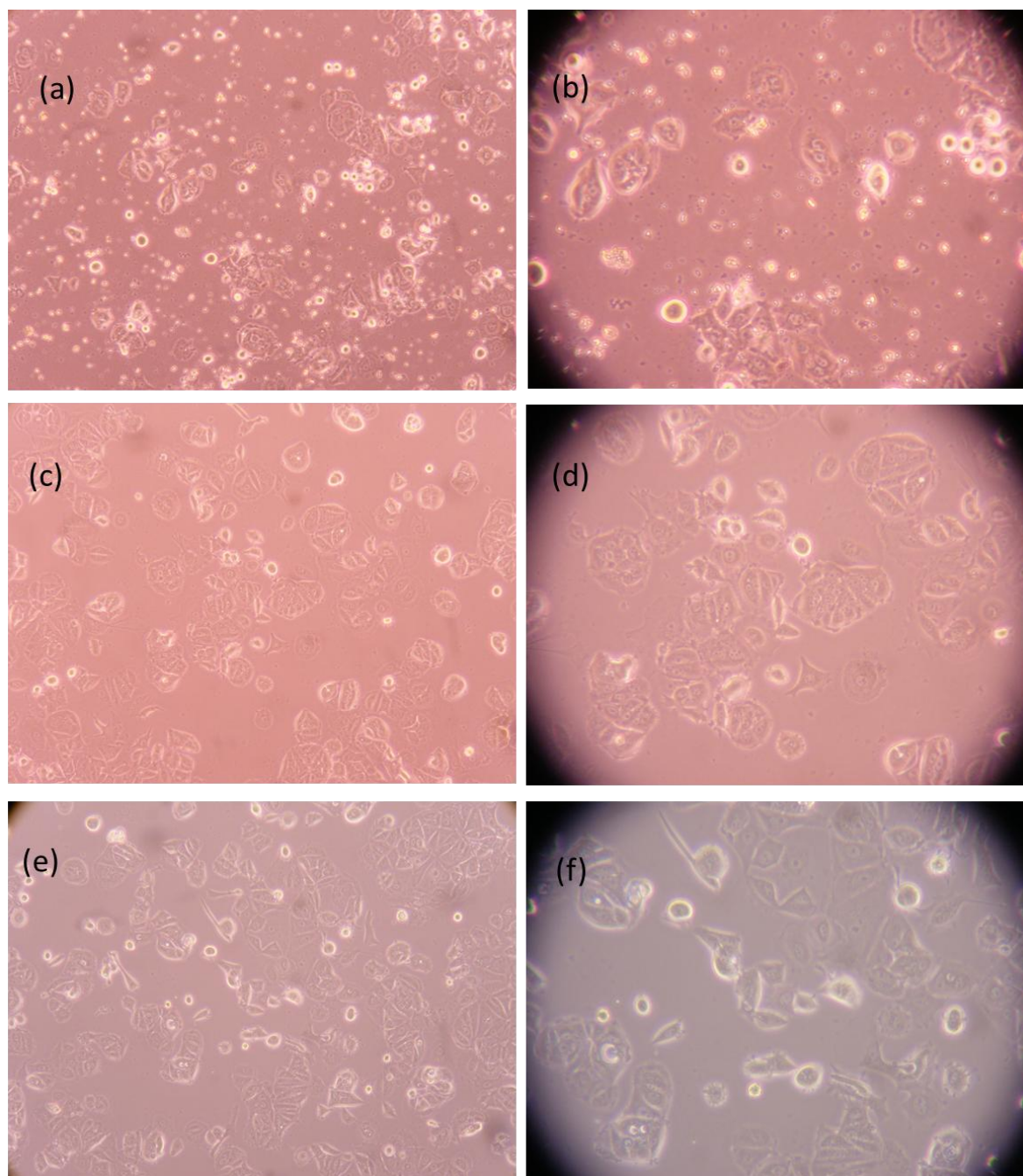


Figura 23: Fotografias efetuadas às células MCF-7, após 24horas de incubação com compostos a concentração  $50\mu\text{M}$  para o procedimento de citometria de fluxo, (a) e (b) são controlos, (c) e (d) do produto 7 e (e) e (f) do 5-flourouracil ( $3 \times 10^4 \text{ cel/mL}$ ) (Ampliação de 100X - microscópio Olympus CKX 41, equipado com máquina fotográfica digital Olympus SP 500UZ)

## 8.2. Citometria de fluxo

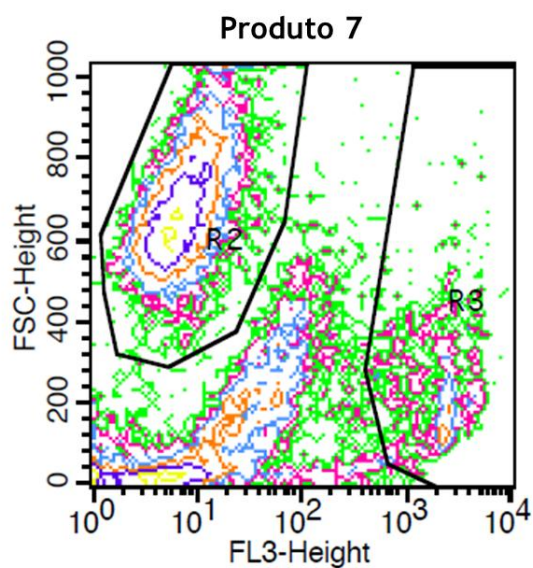


Gráfico 7: resultados da viabilidade celular das células MCF-7 com o marcador iodeto de propídeo, em que o controlo consiste em células sem qualquer tratamento, células tratadas com o produto 7, como ainda células tratadas com 5-flourouracil, tendo sido incubadas por 24 horas após adição dos compostos às culturas celulares ( $3 \times 10^4$  cel/mL). Em que R2=células viáveis e R3=debris.