



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Desenvolvimento de novos potenciais anticancerígenos com ação no G-quadruplex

Diana Sofia Serra dos Santos

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

Orientadora: Prof.^a Doutora Carla Cruz
Co-orientador: Prof. Doutor Samuel Silvestre

Covilhã, Outubro de 2014

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Carla Cruz por todo o tempo de aprendizagem, disponibilidade, apoio e pela confiança depositada em mim. Um especial obrigado por toda a dedicação e por me fazer superar os desafios que me propôs.

Ao meu co-orientador, Professor Doutor Samuel Silvestre por toda a ajuda, confiança e orientação científica que me transmitiu.

À Professora Doutora Adriana Santos por toda a ajuda, disponibilidade e colaboração.

À minha família por toda a compreensão, amigos, colegas de curso e de laboratório pela amizade e preocupação que demonstraram durante o meu percurso, especialmente à Filipa pela disponibilidade imediata e toda a ajuda que prestou.

Obrigado.

Resumo

Atualmente, o cancro apresenta uma elevada mortalidade perante a população mundial e novas estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas com o objetivo de combater esta patologia.

Recentemente verificou-se que uma das formas de diminuir a atividade dos genes tumorais é através da estabilização das estruturas do G-quadruplex. O G-quadruplex é uma estrutura de quatro cadeias formada por sequências específicas ricas em guanina e estão presentes em regiões de extrema importância biológica, como telómeros humanos e promotores de oncogenes. A sua estabilização pode ser obtida com compostos orgânicos de baixo peso molecular que promovem a inibição da atividade da enzima telomerase.

Assim, o contexto deste trabalho foca-se no desenvolvimento de compostos derivados de calixarenos, capazes de se ligarem seletivamente ao G-quadruplex telomérico. Os compostos foram sintetizados, purificados e caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massa (MS). A interação entre as estruturas G-quadruplex e os derivados de calixarenos foi estudada utilizando titulações de RMN de ^1H , de modo a avaliar a estabilização do G-quadruplex a diferentes temperaturas e identificar os locais de ligação envolvidos na interação. O efeito dos compostos na proliferação das linhas celulares tumorais (MCF-7 e LNCaP) e normais (NHDF) foi avaliado pelo ensaio MTT, de modo a se poder concluir acerca do seu interesse como potenciais agentes anticancerígenos. Adicionalmente, a localização celular dos calixarenos foi avaliada por microscopia de fluorescência confocal e o estudo do mecanismo de morte celular por citometria de fluxo.

Da síntese química resultaram vários intermediários e dois macrociclos, os quais foram posteriormente estudados. A formação e estabilidade da estrutura G-quadruplex foi seguida por RMN e observou-se que à temperatura de 65°C este desnaturou, passando à forma de duplex. Por microscopia de fluorescência, observou-se que os compostos macrociclos são fluorescentes e que, ao nível de localização celular, não se observou fluorescência no núcleo da célula com o composto Calix-Benz. Relativamente à avaliação biológica dos derivados de calixarenos pelo ensaio MTT, verificou-se existirem diferentes efeitos antiproliferativos. O composto que revelou ser mais tóxico para as várias linhas celulares foi o intermediário Calix-NH₂, especialmente em células cancerígenas da próstata, uma vez que foram observados valores elevados de inibição da proliferação celular e IC₅₀ de $1,474\ \mu\text{M}$, demonstrando também ser mais tóxico para estas células do que para as células normais da derme humana. Este mesmo composto não relevou marcação significativa pela Anexina V-FITC e originou valores significativos de morte celular em comparação com compostos padrão ativos contra o cancro da mama.

Palavras-chave

G-quadruplex, calixarenos, citotoxicidade, morte celular, agentes anticancerígenos.

Abstract

Currently, cancer has a high mortality rate in global population and new therapeutic strategies have been developed in order to treat this disease.

Recently, it was found that stabilization of the G-quadruplex structures reduce the activity of tumoral genes. The G-quadruplex structure is constituted by four specific chains rich in guanine sequences, which are present in regions with biological importance such as human telomeres and oncogene promoters. The stabilization of these structures can be achieved through binding of molecular compounds that can promote inhibition of telomerase activity in cancer cells.

Therefore, this work focuses on the development of calixarene derivatives, able to selectively bind the telomeric G-quadruplex. These compounds were synthesized, purified and characterized using nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS). The interaction between the G-quadruplex structures and the calixarene derivatives is studied using ^1H -NMR titration, in order to evaluate the stabilization of G-quadruplex at different temperatures and also to identify the compounds binding sites involved in the interaction. The effects of these compounds on proliferation of tumoral (MCF-7 and LNCaP) and normal (NHDF) cell lines were assessed by MTT assay to evaluate as potential anti-cancer agents. Moreover, their cellular localization is evaluated by confocal fluorescence microscopy and the cell death follows by flow cytometry.

From the chemical synthesis resulted several calixarene intermediates and two macrocycles that are studied as G-quadruplex binders. The formation and stability of G-quadruplex structure is monitored by NMR, and revealed a denaturation to a duplex at $T=65^\circ\text{C}$. The fluorescence microscopy revealed that the macrocycles compounds are fluorescent and no fluorescence is observed for Calix-Benz in the nucleus of the cells.

The biological evaluation of calixarene derivatives by the MTT assay revealed different anti-proliferative effects. The Calix-NH₂ is found to be the most cytotoxic compound in these cell lines, especially for the prostate cancer cells, since high levels of inhibition of cell proliferation and a IC_{50} of $1.474\ \mu\text{M}$ is observed in cancer cells than in normal human dermal cells. This compound also evidenced to have more toxic effects for these cells than to normal human dermal cells. This compound do not have significant staining using FITC Annexin V; however significant cell death is obtained when compared to standard compounds against breast cancer.

Keywords

G-quadruplex, calixarenes, cytotoxicity, cell death, anticancer agents.

Índice

Capítulo 1- Introdução.....	1
1.1 Cancro: relevância e principais abordagens terapêuticas.....	1
1.2 Estruturas do G-quadruplex	2
1.3 Implicações dos G-quadruplexes a nível biológico	4
1.3.1 Telómeros e Telomerase	4
1.3.2 Regulação das estruturas do G-quadruplex na transcrição	5
1.3.2.1 c-MYC	6
1.3.2.2 c-Kit	6
1.4 Métodos para estudar as estruturas do G-quadruplex	7
1.4.1 Espectroscopia de RMN	8
1.4.2 Varrimento Diferencial de Fluorescência (DSF)	9
1.5 Estabilização das estruturas do G-quadruplex utilizando ligandos	10
1.5.1 TMPyP4	10
1.5.2 MMQ1	11
1.5.3 Telomestatina	12
1.5.4 Calixarenos	13
1.5.4.1 Propriedades físico químicas e conformacionais	13
1.6 Avaliação dos efeitos celulares dos macrociclos derivados de calixarenos	15
1.7 Objetivos	17
Capítulo 2- Materiais e Métodos	18
2.1 Síntese Química	18
2.1.1 Materiais	18
2.1.2 Equipamentos	18
2.1.3 Procedimento Experimental	18
2.1.3.1- Síntese do 2-(2-(1,3-dioxoisindolina-2-il)etoxi)etilacetato de 4- metilbenzenossulfonato (composto A)	19
2.1.3.2- Síntese do calix[4]-NPhth (composto C)	20
2.1.3.3- Síntese do calix[4]-NP e calix[4]-NP ₂ (compostos C1 e C2, respetivamente).....	21
2.1.3.4- Síntese do calix[4]-NH ₂ (composto D)	22
2.1.3.5- Síntese do calix[4]-Benz (composto E1)	23
2.1.3.6- Síntese do calix[4]-Pyr (composto E2)	23
2.2 Análise estrutural das estruturas do G-quadruplex	25
2.2.1 Técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	25
2.2.1.1 Materiais	25
2.2.1.2 Preparação das amostras de DNA	25

2.2.1.3	Preparação dos ligandos	25
2.2.1.4	Preparação dos complexos G-quadruplex-ligandos	25
2.2.1.5	Experiências de RMN	25
2.3	Avaliação Biológica dos macrociclos	26
2.3.1	Material	26
2.3.1.1	Reagentes	26
2.3.1.2	Equipamentos e sua função	26
2.3.2	Tipo de células utilizadas no estudo e sua cultura	27
2.3.2.1	Células cancerígenas da mama (MCF-7)	27
2.3.2.2	Células cancerígenas da próstata (LNCaP)	27
2.3.2.3	Células normais dos fibroblastos dérmicos (NHDF)	28
2.3.3	Técnicas de cultura celular	28
2.3.3.1	Tripsinização	28
2.3.3.2	Contagem e sementeira de células	28
2.3.3.3	Estudo do efeito dos compostos na viabilidade celular	29
2.3.3.4	Ensaio de proliferação celular-MTT	31
2.3.3.5	Microscopia de fluorescência	31
2.3.3.6	Citometria de fluxo	32
2.3.4	- Análise Estatística	33
Capítulo 3-	Resultados e Discussão	34
3.1	Síntese Química	34
3.2	Análise da interação dos ligandos com o G-quadruplex	36
3.2.1	Formação da estrutura G-quadruplex.....	36
3.2.2	Interação G-quadruplex-derivados do calixareno	37
3.3	Avaliação Biológica	38
3.3.1	Análise da citotoxicidade dos compostos em células MCF-7, LNCaP e NHDF.	38
3.3.2	Comparação da citotoxicidade dos compostos avaliados nas diferentes linhas celulares.....	39
3.3.3	Microscopia de Fluorescência	47
3.3.4	Citometria de fluxo	51
3.3.4.1	Marcação por Anexina V-FITC (apoptose inicial)	51
3.3.4.2	Marcação por Iodeto de Propídio (IP) (viabilidade celular)	53
Capítulo 4-	Conclusão	56
Capítulo 5-	Perspetivas Futuras	58
Capítulo 6-	Bibliografia	59
Anexo 1	65

Índice de Figuras

Figura 1- (A) Estrutura tridimensional de um quadruplex; (B) Ligações de hidrogénio estabelecidas para formação de uma estrutura de quadruplex.....	2
Figura 2- (A) Estruturas intramoleculares (unimolecular) designadas por “cesta” e cadeira; (B) Estruturas intermoleculares tetraméricas, diméricas e monoméricas.....	3
Figura 3- Telómeros estão presentes na extremidade dos cromossomas. (A) Telómeros protegidos por uma “tampa”; (B) Telómeros desprotegidos.....	4
Figura 4- Mecanismo de ação da telomerase (com os seus componentes TERC e TERT).....	5
Figura 5- (A) As sequências promotoras de genes apresentam grande diversidade de sequências em relação às sequências dos telómeros humanos que consistem em repetições em tandem de d(TTAGGG) _n ; (B) Moléculas que se liguem especificamente ao G-quadruplex podem alterar a via e a atividade da transcrição do gene em causa.....	7
Figura 6- Espectro de RMN de ¹ H, representando os prótons imino, amino e bases da sequência d(GCGGTCGGA) ₄	9
Figura 7- Gráfico representativo das transições de estados. A intensidade de fluorescência é dependente da temperatura.....	9
Figura 8- Porphirina catiónica TMPyP4.....	11
Figura 9- Estrutura dos compostos derivados de quinacridina. (A) MMQ1; (B) BBQ1.....	12
Figura 10- Estrutura molecular de (A) G-tétradas e (B) Telomestatina.....	12
Figura 11- (A) Estrutura da molécula calixareno e suas cavidades; (B) Diferentes tamanhos de calix[n]arenos.....	13
Figura 12- Conformações adotadas do calix[4]areno. (A) Cone; (B) Cone parcial; (C) 1,2-Alternado e (D) 1,3-Alternado.....	14
Figura 13- Esquema da síntese geral dos derivados de calix[4]areno.....	19
Figura 14- Esquema representativo da microplaca para o primeiro ensaio de todos os compostos numa concentração de 30 µM. (Z=Zero; C=Controlo; CB= Calix-Benz; CP=Calix-Pyr; NH ₂ =Calix-NH ₂ ; NP ₂ =Calix-NP ₂ ; NP=Calix-NP; DMSO= dimetilsulfóxido).....	30

- Figura 15-** Esquema representativo das microplacas para o segundo ensaio - Curva-dose-resposta, com uma gama de diferentes concentrações. Foram realizados ensaios com n=5 para todas as concentrações (μM), zero e controlo, em células MCF-7, LNCaP e NHDF.....30
- Figura 16-** Composto de partida tosilado (A)34
- Figura 17-** Compostos cíclicos sintetizados derivados de calixarenos e seus intermediários...35
- Figura 18-** Espectros de RMN de ^1H do varrimento de temperaturas da sequência $[\text{d}(\text{TAGGGT})]_4$ em tampão 70 mM KCl e 10 mM KH_2PO_4 (pH=7,2)36
- Figura 19-** Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7 após o tratamento com o composto Calix-Benz, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com n=5 (concentração= 2×10^4 células/mL).....39
- Figura 20-** Gráfico da proliferação celular relativa em células LNCaP, após o tratamento com o composto Calix-Benz, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com n=5 (concentração = 2×10^4 células/mL).....40
- Figura 21-** Gráfico da proliferação celular relativa das linhas celulares LNCaP e MCF-7 após o tratamento com o composto Calix-Benz, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com n=5 (concentração= 2×10^4 células/mL).....40
- Figura 22-** Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7, após o tratamento com o composto Calix-Pyr, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. Ensaio de uma experiência com n=5 (concentração= 2×10^4 células/mL).....41
- Figura 23-** Gráfico da proliferação celular relativa em células LNCaP, após o tratamento com o composto Calix-Pyr, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são

expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL).....41

Figura 24- Gráfico da proliferação celular relativa das linhas celulares LNCaP e MCF-7 após o tratamento com o composto Calix-Pyr, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL).....42

Figura 25- Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7 após o tratamento com o composto Calix-NH₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL)..... 42

Figura 26- Gráfico da proliferação celular relativa em células LNCaP após o tratamento com o composto Calix-NH₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL)..... 43

Figura 27- Gráfico da proliferação celular relativa em células NHDF após o tratamento com o composto Calix-NH₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL)..... 43

Figura 28- Gráfico da proliferação celular relativa das linhas celulares LNCaP, MCF-7 e NHDF após o tratamento com o composto Calix-NH₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL).....44

Figura 29- Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7, após o tratamento com o composto Calix-NP₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são

expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL).....45

Figura 30- Gráfico da proliferação celular relativa em células LNCaP, após o tratamento com o composto Calix-NP₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL).....45

Figura 31- Gráfico da proliferação celular relativa das linhas celulares LNCaP e MCF-7 após o tratamento com o composto Calix-NP₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL).....46

Figura 32- Imagens obtidas do microscópio de fluorescência em (1) células MCF-7 e (2) células LNCaP, expostas ao composto Calix-Benz a 30 μM durante (A) 4 horas e (B) 12 horas. (3×10^4 células/mL).....47

Figura 33- Imagens obtidas do microscópio de fluorescência em (1) células MCF-7 e (2) células LNCaP, expostas ao composto Calix-Pyr a 30 μM durante 4 horas. (3×10^4 células/mL).....48

Figura 34- Imagens obtidas do microscópio de fluorescência em (1) células MCF-7 e (2) células LNCaP, expostas ao composto Calix-NH₂ a 30 μM durante 12 horas. (3×10^4 células/mL).....48

Figura 35- Imagens de fluorescência obtidas no microscópio confocal do controlo (1) e do composto Calix-Benz a 50 μM durante 4 h de incubação (2), em células LNCaP (3×10^4 células/mL). (A)= canais vermelhos; (B)=zona do visível e (C)=sobreposição de A e B.....49

Figura 36- Imagens de fluorescência obtidas no microscópio confocal sobre a distribuição do Calix-Benz a 50 μM durante 4 h de incubação em células LNCaP em marcadores fluorescentes. Incubação com o ER-Tracker™ Green (1 μM) e Hoechst 33342 (5 μM) durante 30 min. (A)= canais azuis; (B)=zona do visível; (C)= canais verdes; (D)= canais vermelhos e (E)= sobreposição de todos os canais anteriores.....50

Figura 37- Imagens de fluorescência obtidas no microscópio confocal sobre a distribuição do Calix-Benz a 50 μM durante 4 h de incubação em células LNCaP em marcadores fluorescentes. (1) Incubação com o MitoTracker GreenTM (1 μM) e Hoechst 33342 (5 μM) durante 30 min.

(A)= canais azuis; (B)=zona do visível; (C)= canais verdes; (D)= canais vermelhos e (E)= sobreposição de todos os canais anteriores..... 50

Figura 38- “Dot plots” da análise da fluorescência da Anexina V-FITC e do Iodeto de Propídio em combinação um com o outro em células MCF-7 tratadas com o composto Calix-NH₂ (B e C), Diosgenina (D) e Tamoxifeno (E) durante 24 h, por citometria de fluxo. (UL=Células positivas para IP- mortas/indefenido; UR= Células positivas para Anexina V-FITC e IP- mortas; LL= Células viáveis; LR= Células positivas para Anexina V-FITC e negativas para IP - em apoptose inicial)..... 52

Figura 39- Análise da apoptose inicial em células MCF-7 tratadas com o composto Calix-NH₂ (NH₂), diosgenina (Diosg) e tamoxifeno (Tam) durante 24 h..... 53

Figura 40- Análise da viabilidade celular em células MCF-7 tratadas com o composto Calix-NH₂ (NH₂), diosgenina (Diosg) e tamoxifeno (Tam) durante 24 h (n=3, 1 experiência representativa); *p<0,05 em relação ao controlo..... 54

Figura 41- Figura 41- Análise da viabilidade celular em células LNCaP tratadas com o composto Calix-NH₂ (NH₂), 24 h; Combinação de duas experiências (n>5, 2 experiências independentes); *p<0,05 em relação ao controlo..... 54

Figura 42- Regiões geométricas marcadas em R1, R2, R3 e R4 com base nas diferentes propriedades dos parâmetros analisados. (1= Controlo; 2- Diosgenina)..... 65

Índice de Tabelas

Tabela 1- Estruturas estudadas de interações entre G-quadruplex e ligandos.....	8
Tabela 2- Médias das percentagens da proliferação celular em relação ao controlo nas diferentes linhas celulares, após tratamento com todos os compostos estudados em concentração de 30 μ M, durante 48 h realizados pelo ensaio MTT	38
Tabela 3- Valores de IC_{50} do composto Calix-NH ₂ em linhas de células MCF-7, LNCaP e NHDF.....	45
Tabela 4- Distribuição percentual dos eventos por quadrantes nos <i>dot plots</i> da Figura 38. (UL=Células positivas para IP- mortas/indefenido; UR= Células positivas para Anexina V-FITC e IP- mortas; LL= Células viáveis; LR= Células positivas para Anexina V-FITC e negativas para IP - em apoptose inicial).....	52

Lista de Acrónimos

Å	Ångström - medida de comprimento
br	<i>broad</i>
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
δ	Desvio químico (ppm)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dsDNA	DNA de cadeia dupla
d	Dubleto
FBS	Soro fetal bovino
g	Unidade de aceleração
h	Horas
IC ₅₀	Concentração de composto que inibe a atividade enzimática em 50%
LNCaP	<i>(Lymph node carcinoma of the prostate)</i> - Células cancerígenas da próstata
K _a	Constante de associação
m	Múltiplo
M	Molar
MCF-7	<i>(Michigan Cancer Foundation-7)</i> - Células cancerígenas da mama
min	Minutos
mL	Mililitro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NHDF	<i>(Normal human dermal fibroblasts)</i> - Células normais dos fibroblastos da derme humana
PBS	Tampão fosfato salino
ppm	Partes por milhão
¹³ C RMN	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
¹ H RMN	Ressonância magnética nuclear de prótons
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
μM	Micromolar
s	Singuleto
ssDNA	Cadeia simples DNA
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano

Capítulo 1 - Introdução

1.1-Cancro: relevância e principais abordagens terapêuticas

Ao longo dos últimos anos, a incidência de cancro na população tem vindo a aumentar gradualmente, sendo considerada atualmente a principal causa de morte a nível mundial. De acordo com os dados estatísticos de mortalidade, em Portugal morrem por ano cerca de 42 mil pessoas com cancro, estando esta situação associada a gastos de 20 milhões de euros/ano (LPCC, 2014). Adicionalmente, por todo o mundo, ocorreram 8,2 milhões de mortes em 2012 e estima-se que o número de casos anuais desta patologia aumentará para 22 milhões nas próximas duas décadas. Estes dados alarmantes têm sido associados, em grande parte, a comportamentos e hábitos alimentares da sociedade, como por exemplo o tabagismo, álcool, elevado índice de massa corporal e falta de exercício físico, e também a fatores ambientais. Assim, medidas preventivas, implementações de programas de controle, deteção precoce e de tratamento, tornam-se importantes no combate às doenças oncológicas (OMS, 2014) (Jemal *et al.*, 2011). Os tipos de cancro mais prevalentes são o cancro do pulmão, próstata, mama, fígado, estômago e colo-retal, diferenciando-se, no entanto, a sua frequência, entre o sexo masculino e feminino (Siegel *et al.*, 2014). O cancro da mama é o tumor mais frequente em mulheres e o cancro da próstata destaca-se nos homens. Estes dois tipos de cancro inserem-se no grupo dos cancros hormono-dependentes, sendo das principais doenças que afectam o mundo (Smith *et al.*, 2014). Neste contexto, o desenvolvimento de novos fármacos com capacidade de impedir a proliferação de tumores tem sido extensivamente estudado. A quimioterapia clássica envolve o uso, nomeadamente, de agentes alquilantes e intercalantes do DNA, antimetabolitos e inibidores de topoisomerasas, os quais têm fraca selectividade, originando elevada toxicidade nos doentes. Além disso, nem todos os tipos de tumores respondem aos tratamentos e ocorre frequentemente o aparecimento de resistências. Os tratamentos dos tumores hormono-dependentes com base em fármacos (exemplo: terapia hormonal) envolvem a inibição das hormonas específicas de cada tipo de cancro (exemplo: estrogénios e androgénios). Dos fármacos já estudados e descritos destacam-se, por exemplo, a enzalutamida e a bicalutamida para o cancro da próstata e o tamoxifeno, anastrozole e outros inibidores da aromatase para o cancro da mama (Ahmed *et al.*, 2014) (Mufudza *et al.*, 2012). Também nestes casos pode haver efeitos secundários e relativamente baixa eficácia, o que, em conjunto com a elevada prevalência e custos destas doenças, tem levado os investigadores em todo o mundo a desenvolverem terapias alternativas mais eficazes e seguras.

Uma dessas estratégias é o desenvolvimento de estabilizadores do G-quadruplex, no qual se baseia o presente trabalho de investigação.

1.2-Estruturas do G-quadruplex

O DNA G-quadruplex (G_4 -DNA) resulta da ligação de quatro cadeias de DNA, as quais são formadas por sequências de ácidos nucleicos ricos em guanina (G). Nestas podem formar-se ligações de hidrogénio entre quatro guaninas de várias cadeias ou de partes da mesma cadeia, designadas por ligações de *Hoogsteen*. Cada quarteto de guanina pode estabelecer interações π - π com tétradas adjacentes e formar arranjos empilhados (Figura 1) (Sattin *et al.*, 2013). Por um lado, o G-quadruplex apresenta-se como uma estrutura altamente ordenada, em que moléculas de guanosina se auto-organizam em padrões complexos. Por outro lado, estas estruturas são muito instáveis em comparação com o DNA de cadeia dupla (dsDNA) e, conseqüentemente, precisam de estabilizadores de modo a promover e a manter esta conformação. Factores como a temperatura, concentração da solução, pH, adição de catiões e moléculas de baixo peso molecular (ligandos) podem influenciar a formação e estabilização das estruturas de G-quadruplex (Fritzsche & Spindler, 2013). Por exemplo, a coordenação dos oxigénios O6 dos grupos carbonilo das guaninas com catiões monovalentes (K^+ e Na^+), confere à estrutura uma estabilização adicional. De facto, estes oxigénios estão direcionados para o centro da tétrada, para catiões específicos localizados entre tétradas adjacentes, reduzindo-se assim a repulsão electrostática entre as guaninas e os átomos de oxigénio existentes neste arranjo. O número de catiões estabilizadores presente corresponde a $(n-1)$ relativamente ao número de quartetos (n). O catião K^+ é considerado o estabilizador mais recomendado (Chen & Yang, 2012)(Yang & Okamoto, 2010).

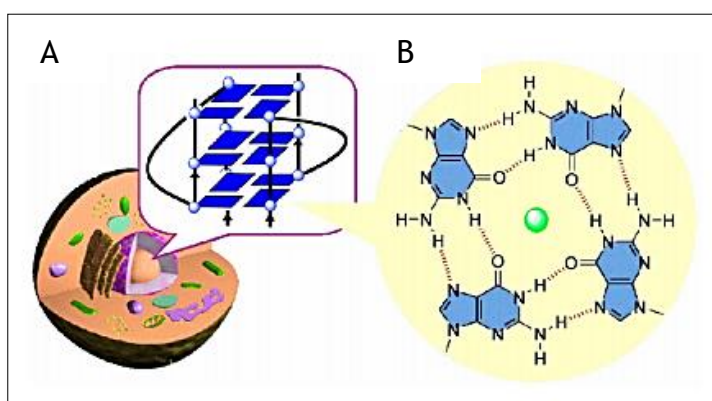


Figura 1- (A) Estrutura tridimensional de um quadruplex; (B) Ligações de hidrogénio estabelecidas para formação de uma estrutura de quadruplex. Adaptado de (Xu *et al.*, 2010).

As estruturas dos G-quadruplexes variam em diferentes características, incluindo estequiometria e orientação das cadeias, existência ou não de alças ou “*loops*”, e ângulos de torção glicosídicos. Essas características determinam o tipo de estruturas do G-quadruplex e a sua estabilidade (Burge *et al.*, 2006), (Xu, 2011).

Com base no número de cadeias de DNA envolvidas na formação de um G-quadruplex, este pode ser intramolecular, quando envolve uma única cadeia rica em guaninas, ou intermolecular quando envolve duas (bimolecular) ou quatro cadeias (tetramolecular) (Figura 2) (Luedtke, 2009). A formação de cada uma destas topologias está diretamente relacionada com o tamanho da cadeia simples, uma vez que, para que haja a formação de “*loops*” (estruturas bi e unimoleculares) a cadeia tem que ter um número suficiente de bases (Sattin *et al.*, 2013).

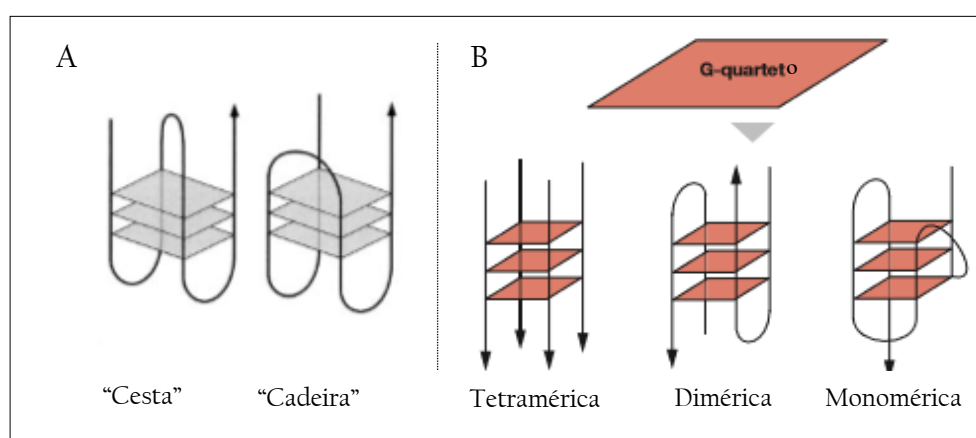


Figura 2 - (A) Estruturas intramoleculares (unimolecular) designadas por “cesta” e cadeira. (B) Estruturas intermoleculares tetraméricas, diméricas e monoméricas. Adaptado de (Kim *et al.*, 2003) e (Bates *et al.*, 2007).

Um G-quadruplex intramolecular envolve geralmente a presença de três “*loops*” (ansas). Estes “*loops*” são constituídos por outras bases da cadeia simples que não são guaninas e que não estão envolvidas na formação dos quartetos. As estruturas podem ser classificadas pela orientação da cadeia, apresentando, por exemplo, um formato de cesta ou cadeira (Figura 2-A) (Fritzsche & Spindler, 2013). Os G-quadruplexes intermoleculares podem ser classificados de acordo com a orientação das cadeias: paralelos quando todas as cadeias se encontram no mesmo sentido e anti-paralelos quando duas cadeias se encontram numa direção e as outras duas na direção oposta, e mistos (paralelo/antiparalelo), consoante a direção em que se encontram as diferentes cadeias umas em relação às outras. As estruturas intermoleculares têm sido estudadas em diferentes aplicações, nomeadamente como intermediários ou percursores de recombinação e integração viral. A sua formação é muito lenta e os parâmetros termodinâmicos da mesma são difíceis de estudar. Ao contrário, os G-quadruplexes intramoleculares, como por exemplo a cadeia telomérica humana $d(T_2AG_3)_4$, formam-se rapidamente, são termodinamicamente mais favoráveis (Bates *et al.*, 2007), (Luedtke, 2009), (Fritzsche & Spindler, 2013) e é reconhecida a sua utilização na regulação da

expressão de genes e estabilidade dos telômeros (tema desenvolvido a seguir). A diversidade estrutural do G-quadruplex transforma-o num alvo para a obtenção de novos fármacos (Chen & Yang, 2012).

1.3-Implicações dos G-quadruplexes a nível biológico

Através de análise bioinformática, demonstrou-se que as várias sequências do G-quadruplex se encontram no genoma humano, (Murat *et al.*, 2011) nomeadamente em regiões promotoras de oncogenes, troca de imunoglobulina (Gavathiotis & Searle, 2003), intrões (Luedtke, 2009), DNA ribossômico, RNA (Fritzsche & Spindler, 2013) e nos telômeros (Yi *et al.*, 2013). Vários G-quadruplexes estão envolvidos na regulação do comprimento telomérico e desempenham um papel fundamental na regulação da transcrição de genes.

1.3.1- Telômeros e Telomerase

Os telômeros são complexos DNA-proteína, localizados nas extremidades dos cromossomas lineares, contendo repetições de sequências de DNA (5'-TTAGGG-3') de 5-10 kilo pares de bases. As suas principais funções são manter a estabilidade estrutural do cromossoma, assegurar que a informação genética é perfeitamente copiada quando a célula se duplica e, impedir a junção de extremidades entre cromossomas consecutivos, o que poderia conduzir à degradação do DNA, por ação de proteínas específicas ou à ocorrência de mutações genéticas (Zhou *et al.*, 2014) (Ruden & Puri, 2013).

A estrutura em forma de tampa (do inglês “*capping*”) (Figura 3) no terminal dos cromossomas serve para proteger os telômeros de danos no DNA. Por outro lado, quando adota a estrutura contrária (“*uncapping*”), ocorre a disfunção dos telômeros, originando alterações genéticas e podendo culminar no aparecimento de tumores (Xu, 2011).

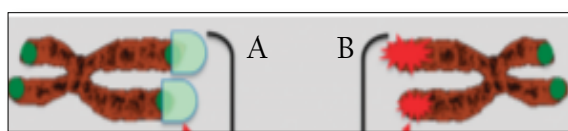


Figura 3- Telômeros estão presentes na extremidade dos cromossomas.

(A) Telômeros protegidos por uma “tampa”; (B) Telômeros desprotegidos. Adaptado de (Xu, 2011).

Em condições normais e em cada replicação, o comprimento dos telômeros tende a diminuir progressivamente. Este encurtamento poderá traduzir-se na perda parcial ou total da capacidade de divisão da célula, interrompendo-se a proliferação celular (limite de Hayflick), ficando o processo de renovação celular comprometido, uma vez que as células eliminadas

não são substituídas por outras. Quebras da integridade dos telômeros provocam danos no DNA, provocando anomalias no genoma, senescência celular e apoptose.

Este fenómeno é um dos mecanismos que contribui para o envelhecimento e morte celular. Em contraste, nas células cancerígenas os telômeros não sofrem encurtamento na fase de replicação devido à presença de uma transcriptase reversa (hTERT), a enzima telomerase. Esta é uma ribonucleoproteína constituída por uma proteína (a TERT - “telomerase reverse transcriptase”) e por uma molécula de RNA (chamada TERC - “telomerase RNA component”). Esta enzima sintetiza DNA por complementaridade em relação à cadeia de RNA (TERC apresenta a sequência CAAUCCCAAUC), através da adição de sequências específicas e repetitivas de DNA à extremidade 3’, originando mais DNA telomérico, assegurando desta forma a integridade do DNA cromossómico durante os ciclos repetidos de divisão celular (Cunningham *et al.*,2006) (Ruden & Puri, 2013). A atividade desta enzima é variável consoante o tipo de células. Nas células somáticas não cancerígenas, a telomerase não possui atividade detetável, mas em células cancerígenas e tumores primários de todos os tipos de cancro existem níveis de atividade elevados (Neidle, 2010). Deficiências da atividade da enzima telomerase e encurtamento dos telômeros estão associados com outras doenças, tais como colite ulcerosa e doenças cardíacas, entre outras.

Neste contexto, tem sido descrito que a inibição da atividade da telomerase previne a formação de tumores e que isto está relacionado com a estabilização das estruturas do G-quadruplex, situados na região terminal dos telômeros (Figura 4) (Xu, 2011). Isto acontece porque a estrutura do G-quadruplex tem a função de proteger os telômeros, prevenindo a degradação nucleolítica e o alongamento inapropriado realizado pela enzima telomerase (Huppert, 2010). Este facto desencadeou a investigação dos G-quadruplexes como alvos terapêuticos, sendo de interesse a sua estabilização por ligandos reversíveis, os quais poderão tornar-se potenciais novos fármacos. (Xu, 2011).

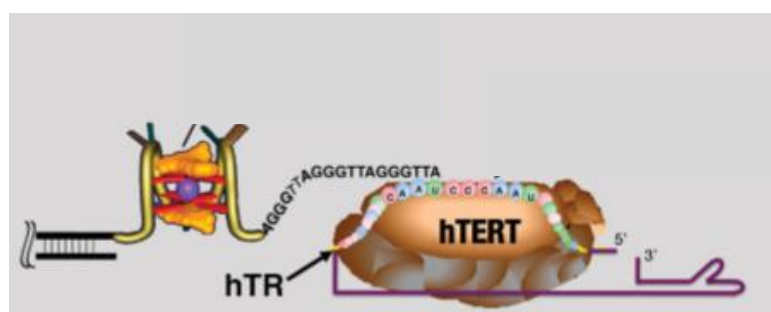


Figura 4- Mecanismo de ação da telomerase (com os seus componentes TERC e TERT). Adaptado de (Xu, 2011).

1.3.2- Regulação das estruturas do G-quadruplex na transcrição

Recentemente, foram determinadas estruturas do G-quadruplex em regiões promotoras de oncogenes tais como o *c-MYC*, *c-Kit*, *c-kras*, *bcl-2*, *VEGT*, *HIF-1*, *RET*, entre outros (Evans &

Huppert, 2010), verificando existirem aqui sequências ricas em guaninas capazes de formar estruturas G-quadruplex (Han & Hurley, 2000). São também reconhecidas por algumas proteínas específicas, denominadas de factores de transcrição, que auxiliam na regulação transcricional. Neste caso, os promotores requerem que o G-quadruplex seja formado em regiões de dsDNA (cadeia dupla de DNA) em vez de ssDNA (cadeia simples de DNA), como acontece nos telómeros (Figura 5) (Yang & Okamoto, 2010).

Nos próximos subcapítulos serão descritos apenas os oncogenes *c-MYC* e *c-Kit* (os principais oncogenes relacionados com a ativação da transcrição) e a sua relação com as estruturas do G-quadruplex.

1.3.2.1- *c-MYC*

Um dos sistemas promotores mais estudados no âmbito do G-quadruplex é a oncoproteína *c-MYC*, um factor de transcrição que tem uma função importante na proliferação celular e na indução de apoptose (Yang & Okamoto, 2010). A expressão do *c-MYC* é controlada pelo elemento de hipersensibilidade nucleasa III₁ (NHE III₁), que se encontra localizada a 27 pares de bases do promotor (Balasubramanian & Hurley, 2011), regulando cerca de 80-90% da atividade transcricional do *c-MYC* (Evans & Huppert, 2010). A sobre-expressão da proteína *c-MYC* está associada a um número significativo de tumores, entre os quais o cancro do cólon, próstata, mama, pulmão, colo do útero e em leucemias mielóides (Huppert, 2008), (Balasubramanian & Hurley, 2011).

Outros dois componentes proteicos relevantes, nucleolina e NM23-H2, encontram-se envolvidos na transcrição do gene e interagem com o promotor *c-MYC* do G-quadruplex. A primeira actua como um repressor de transcrição e está envolvida na estabilização e ligação específica ao promotor, enquanto que a segunda proteína tem o efeito contrário, comporta-se como um ativador de transcrição, destabilizando o *c-MYC* devido às ligações a cadeias simples de DNA (Chen & Yang, 2012). O tipo de estrutura encontrada mais frequentemente nos promotores do G-quadruplex são as estruturas intramoleculares com cadeias paralelas e duas sequências G₃NG₃ (Figura 5-A) (Bates *et al.*, 2007).

1.3.2.2- *c-Kit*

O proto-oncogene *c-Kit* é um recetor tirosina-cinase que exerce uma ação crucial na diferenciação e proliferação celular (Mcluckie *et al.*, 2011). Esta é uma proteína de 145-160 kDa (Bejugam *et al.*, 2010), expressa em variados tipos de cancro, afetando células mielóides e germinativas, melanócitos, células hematopoiéticas e intersticiais de Cajal (Balasubramanian & Hurley, 2011). A avaliação da expressão da proteína *c-Kit* permite diagnosticar tumores do estroma gastrointestinal (GIST), existindo já no mercado um inibidor específico da tirosina-quinase, *imatinib* (Glivec/Gleevec™, da Novartis) aplicado no tratamento destes tumores (Mcluckie *et al.*, 2011).

Existem duas sequências compostas pelo promotor *c-Kit* que formam o G-quadruplex, designadas de *c-Kit1* (ou *c-Kit87*) e *c-Kit2*, estando localizadas entre a posição -87 e -109 pares de bases e entre -140 e -160 pares de bases, respectivamente. Por RMN foi demonstrado que há formação de estruturas intermoleculares com cadeias paralelas em *c-Kit1* e estruturas intramoleculares em *c-Kit2* (Balasubramanian & Hurley, 2011), (Chen & Yang, 2012).

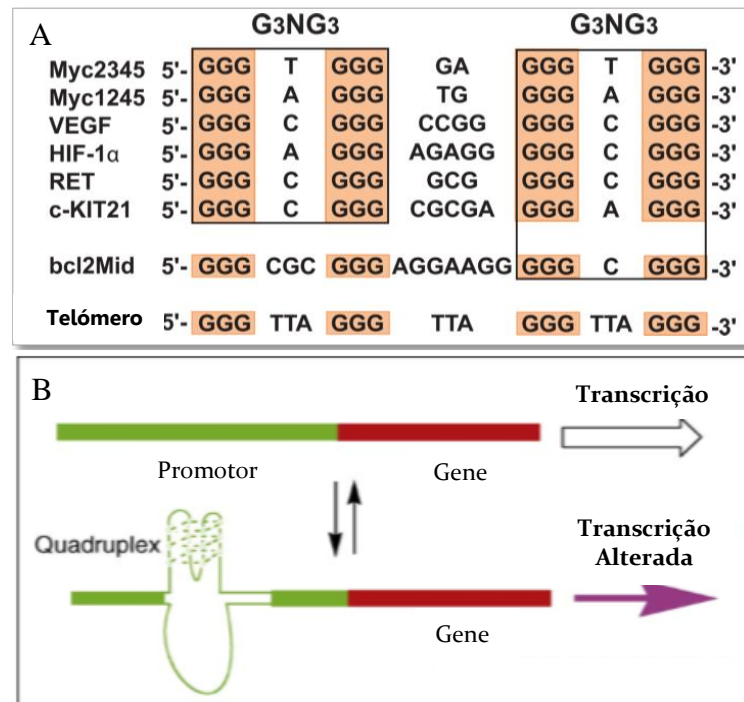


Figura 5 - (A) As sequências promotoras de genes apresentam grande diversidade de sequências em relação às sequências dos telômeros humanos que consistem em repetições em tandem de $d(\text{TTAGGG})_n$; (B) Moléculas que se ligam especificamente ao G-quadruplex podem alterar a via e a atividade da transcrição do gene em causa. Adaptado de (Chen & Yang, 2012) e (Balasubramanian & Neidle, 2009).

1.4- Métodos para estudar as estruturas do G-quadruplex

Várias interações não-covalentes são responsáveis pelas conformações tridimensionais adotadas pelos G-quadruplexes e têm um papel significativo na sua estabilidade e nas suas interações com outros ligandos. Estas interações incluem empilhamento π - π , electrostáticas, ligações de hidrogénio e de Van der Waals (dipolo induzido-dipolo induzido, forças de London).

Existem várias metodologias que permitem estudar a formação, estabilização dos G-quadruplexes, e as interações com ligandos, sendo as mais utilizadas a espectroscopia

ressonância magnética nuclear (RMN), cristalografia de Raios-X, dicroísmo circular (DC), UV-visível, transferência de energia de ressonância por fluorescência (FRET), electroforese em gel, ressonância de plasma de superfície (RPS) e espectrometria de massa (MS), entre outras (Jaumot & Gargallo, 2012). Cada metodologia permite obter informação específica, tornando-se necessário recorrer a mais do que uma técnica para obter a informação pretendida. Estas metodologias também permitem obter informação estrutural das conformações do G-quadruplex, avaliar a termodinâmica e cinética, interação com compostos, de forma a determinar os locais de ligação e seletividade dos compostos versus estruturas do G-quadruplex e dsDNA (Murat *et al.*, 2011) (Fritzsche & Spindler, 2013).

1.4.1- Espectroscopia de RMN

Esta técnica é uma das mais versáteis, permitindo obter informação estrutural e dinâmica molecular das estruturas do G-quadruplex como por exemplo determinar as interações entre ligandos e as G-tétradas, locais de ligação envolvidos, entre outras. Encontram-se já descritas algumas conformações tridimensionais adotadas por sequências dos G-quadruplexes e interações com ligandos, as quais foram estudadas por RMN. Podem ser analisadas em bases de dados de ácidos nucleicos (NDB) e de proteínas (PDB) (Huppert, 2008). Alguns exemplos encontram-se relatados na Tabela 1.

Tabela 1 - Estruturas estudadas de interações entre G-quadruplex e ligandos. Adaptado de (Murat *et al.*, 2011).

Ligando	Método	Sequência G-quadruplex	PDB
BSU-6038	Raios-X	d[GGGGTTTTGGGG] ₂	3EM2
PIPER	RMN	d[TTAGGGT] ₄	
BRACO-19	Raios-X	d[TAGGGTTAGGGT] ₂	3CE5
Distamicina A	RMN	d[TGGGGT] ₄	2JT7
MMQ1	RMN	d[GTTAGGGT] ₄	2JWQ
TMPyP4	Raios-X	d[TAGGGTTAGGG] ₂	2HRI
TMPyP4	RMN	d(TGAGGGTGGIGAGGGTGGGGAAGG)	2H5R
RHPS4	RMN	d[TTAGGGT] ₄	1NZM
BSU6039	Raios-X	d[GGGGTTTTGGGG] ₂	1L1H
Acridina	Raios-X	[UAGGGUUAGGU] ₂	3MIJ

A análise por RMN realiza-se habitualmente em solução, requerendo-se amostras concentradas (mM) devido à sua sensibilidade relativamente baixa (Evans & Huppert, 2010).

As interações entre ligandos e as estruturas do G-quadruplex podem ser determinadas por experiências bidimensionais de NOESY (*Nuclear Overhauser effect spectroscopy*) e STD (*Saturation Transfer Difference*), permitindo identificar os prótons do ligando que interagem a distâncias inferiores a 5 Å com o G-quadruplex. O enriquecimento das estruturas do G-quadruplex com ¹³C, ¹⁵N ou ³¹P permite através de correlações heteronucleares ¹³C-¹H e/¹⁵N-¹H estabelecer a sua conformação (Murat *et al.*, 2011) (Huppert, 2008).

O espectro de RMN de ^1H característico da estrutura de G-quadruplex tem sinais em regiões de campo baixo, localizados entre 8 a 13 ppm (Figura 6). Os sinais destes prótons são mais resolvidos nas estruturas intermoleculares do que para as estruturas intramoleculares (Webba da Silva, 2007).

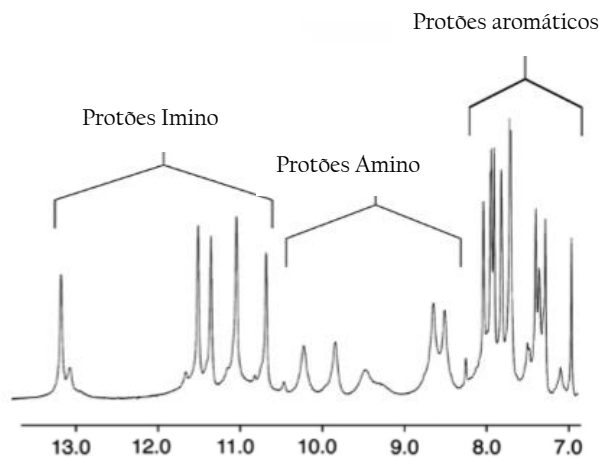


Figura 6 - Espectro de RMN de ^1H , representando os prótons imino, amino e bases da sequência $d(\text{GCGGTCGGA})_4$. Adaptado de (Webba da Silva, 2007).

1.4.2- Varrimento Diferencial de Fluorescência (DSF)

Este método baseia-se na identificação de ligandos que estabilizam o G-quadruplex através da alteração da temperatura de fusão (T_m) à qual metade da sequência de bases está desnaturada. Esta técnica utiliza fluoróforos, (Hole *et al.*, 2013) que têm afinidade com as bases do G-quadruplex. À medida que a temperatura aumenta, há alteração do estado tautomérico das bases, ionizando-as e rompendo ligações por pontes de hidrogênio havendo a desnaturação do G-quadruplex, provocando um aumento da fluorescência do fluoróforo (Figura 7). Os resultados das curvas de desnaturação térmica (“melting”) são obtidos no aparelho de PCR em tempo real, tendo como principais vantagens a baixa quantidade de amostra necessária (μM), o número de amostras por placa de PCR e o tempo relativamente curto dos ensaios (menos de 1 hora). A desnaturação do G-quadruplex e a avaliação da sua estabilidade após adição de um ligando, permite identificar de uma forma rápida se determinada molécula altera ou não a conformação do G-quadruplex (Niesen *et al.*, 2007). Este método tem vindo a ser estudado na estabilização de proteínas, e é uma futura aplicação para este trabalho, no âmbito do G-quadruplex.

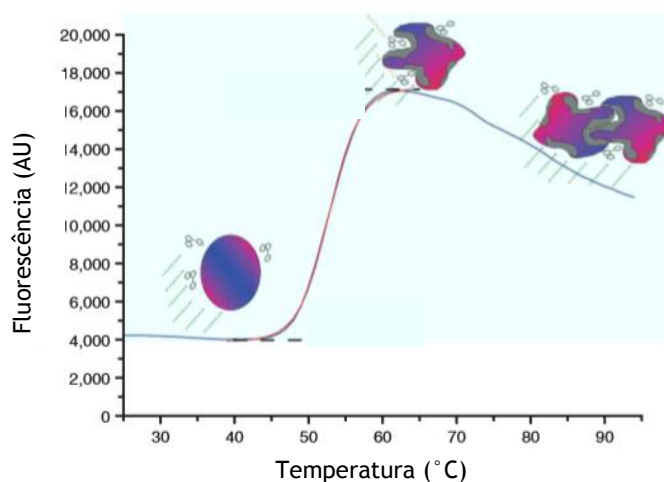


Figura 7- Gráfico representativo das transições de estados. A intensidade de fluorescência é dependente da temperatura. Adaptado de (Niesen *et al.*, 2007).

1.5- Estabilização das estruturas do G-quadruplex utilizando ligandos

A estabilização de vários quadruplexes através da formação de adutos com diversos ligandos, pode desempenhar um papel importante no controlo da expressão de determinados genes, podendo representar uma nova classe de agentes terapêuticos (Yang & Okamoto, 2010), (Han & Hurley, 2000). De facto, vários estudos confirmaram que determinados ligandos conseguem detetar e estabilizar as estruturas dos quadruplexes, funcionando como sensores e potenciais inibidores da telomerase (Fritzsche & Spindler, 2013).

A seletividade dos ligandos relativamente aos quadruplexes versus dsDNA é uma das características primordiais para estudos posteriores de deteção destas estruturas *in vitro*. (Murat *et al.*, 2011). Nos últimos anos surgiram estudos de ligandos seletivos dos quadruplexes nomeadamente, a porfirina catiónica TMPyP4, telomestatina, BOQ1, BRACO-19, Quarfloxina, e RHPS4. Alguns destes compostos são macrociclos com estruturas aromáticas, átomos doadores de electrões e policatiões capazes de se ligarem seletivamente aos quadruplexes (por empilhamento π - π com as G-tétradas, ligações de hidrogénio, entre outras) e terem um efeito no controlo da divisão celular (Bidzinska *et al.*, 2013).

Alguns destes estudos foram realizados mediante técnicas de RMN, cristalografia de raios-X e estudos computacionais. (Neidle, 2010).

1.5.1- TMPyP4

A porfirina TMPyP4, tetra(4-N-metilpiridil)porfirina (Figura 8), é, sem dúvida, a mais estudada como ligando dos quadruplexes. (Balasubramanian & Hurley, 2011) e tem sido aplicada em tratamentos de tumores mamários e da próstata, revelando levar a uma diminuição das taxas de crescimento dos tumores. Em termos de afinidade, apresenta uma constante de associação elevada (K_a de $6,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$) para estruturas do G-quadruplex (Neidle, 2010), pois o arranjo dos anéis planares favorece interações por empilhamento π - π maioritariamente com as tétradas dos quadruplexes intermoleculares (Mita *et al.*, 2006) (Tauchi *et al.*, 2006). Adicionalmente, foi demonstrado que a ligação do composto TMPyP4 ao quadruplex inibe a atividade da enzima telomerase ($IC_{50} \cong 6 \mu\text{M}$) (Murat *et al.*, 2011) e, em concentrações baixas, impede a proliferação celular (Haider *et al.*, 2011). No entanto, apresenta fraca regulação na expressão do oncogene c-MYC (Xu, 2011).

Os dois modelos propostos da ligação da porfirina, apontam para a intercalação desta com as cadeias do quadruplex e para o empilhamento da porfirina com as G-tétradas nas extremidades do quadruplex. Este modelo de empilhamento destaca-se do primeiro, por não se verificarem impedimentos estereoquímicos, permitindo a estabilização eficiente do complexo (Han & Hurley, 2000). Estes estudos foram realizados por titulações de RMN, utilizando-se a sequência telomérica d(TTAGG)_n e a porfirina TMPyP4, em tampão fosfato com cloreto de potássio, a pH=7 (Webba da Silva, 2007). A formação do complexo foi estabilizada não só por empilhamento π - π , como também por interação electrostática entre a porfirina catiónica e o quadruplex (Mita *et al.*, 2006).

Vários factores influenciam a interação deste tipo de ligandos com os quadruplexes, tais como número de cargas presente nas porfirinas, tipo e tamanho dos grupos substituintes presentes na porfirina, alterando a relação estrutura-atividade (Han & Hurley, 2000).

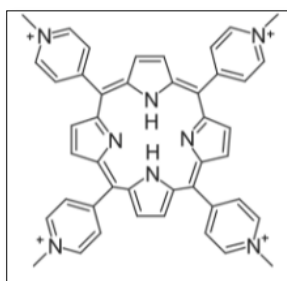


Figura 8 - Porfirina catiónica TMPyP4. Adaptado de (Chen & Yang, 2012).

1.5.2- MMQ1

O composto acíclico MMQ1, derivado de quinacridina, e o macrociclo BBQ1 (Figura 9) são ligandos que conseguem estabilizar as estruturas quadruplexes intermoleculares. O MMQ1 ($K_a = 8,6 \times 10^5 M^{-1}$) é o composto de partida da síntese do macrociclo BBQ1, tendo maior afinidade ($K_a = 1,2 \times 10^7 M^{-1}$) (Hounsou *et al.*, 2007) (Carrasco *et al.*, 2003) para o G-quadruplex do que o MMQ1. Experiências de RMN revelaram que o complexo é estabilizado por empilhamentos π - π entre o anel aromático do MMQ1 e as G-tétradas e, ao mesmo tempo, por interações electrostáticas entre as cadeias laterais do MMQ1 (carregado positivamente) e o quadruplex intermolecular. Devido ao facto dos anéis de quinacridina do macrociclo BBQ1 intercalarem as G-tétradas do quadruplex, este torna-se um ligando de grande selectividade para o G-quadruplex e um promissor agente em abordagens anticancerígenas (Xu, 2011), (Hounsou *et al.*, 2007).

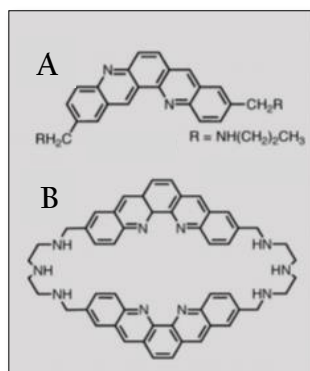


Figura 9- Estrutura dos compostos derivados de quinacridina. (A) MMQ1; (B) BBQ1. Adaptado de (Xu, 2011).

1.5.3- Telomestatina

A telomestatina é um macrociclo derivado de pentaoxazóis que estabiliza os quadruplexes intramoleculares (Figura 10) e inibe a enzima telomerase ($IC_{50} = 5 \text{ nM}$) (Murat *et al.*, 2011). Este composto tem similaridade estrutural com as estruturas dos quadruplexes, estabilizando-as mesmo na ausência de sais (Bidzinska *et al.*, 2013), e a seletividade para o G_4 -DNA é cerca de 70 vezes mais elevada relativamente ao dsDNA (Murat *et al.*, 2011). Adicionalmente, este composto apresenta uma elevada afinidade para estruturas intramoleculares de G-quadruplex (Kim *et al.*, 2002).

A telomestatina tem atividade anticancerígena na medida em que reduz o comprimento dos telómeros, promove a morte celular por apoptose, e apresenta baixa toxicidade em células não cancerígenas (Bryan & Baumann, 2011) (Bochman *et al.*, 2012). Uma das desvantagens da utilização da telomestatina são os baixos rendimentos obtidos nas reações de síntese e a pureza resultante. Contudo, derivados da telomestatina têm vindo a ser desenvolvidos e sintetizados com melhores rendimentos, devido à seletividade para com o G-quadruplex (Luedtke, 2009).

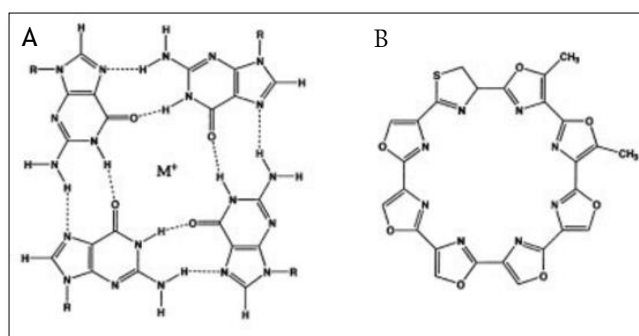


Figura 10- Estrutura molecular de (A) G-tétradas e (B) Telomestatina. Adaptado de (Kim *et al.*, 2003).

1.5.4- Calixarenos

Os derivados de calixarenos foram os compostos selecionados para este trabalho. Estas estruturas são sintetizadas por condensação de formaldeído e fenóis, em condições alcalinas (Sirit & Yilmaz, 2009). Na sua estrutura apresentam cavidades hidrofóbicas (cavidade superior) determinadas pelos substituintes do anel aromático e por cavidades hidrofílicas (cavidade inferior), definidas pelos grupos hidroxilo, ligadas entre si por cadeias metilénicas (Figura 11) (Lo & Wong, 2008). De acordo com a nomenclatura, o prefixo refere-se aos substituintes que se encontram na cavidade superior e (n) ao número de unidades repetidas do anel, representando-se calix[n]arenos com $n=4,5,6,7,8$ (Yilmaz, 2013).

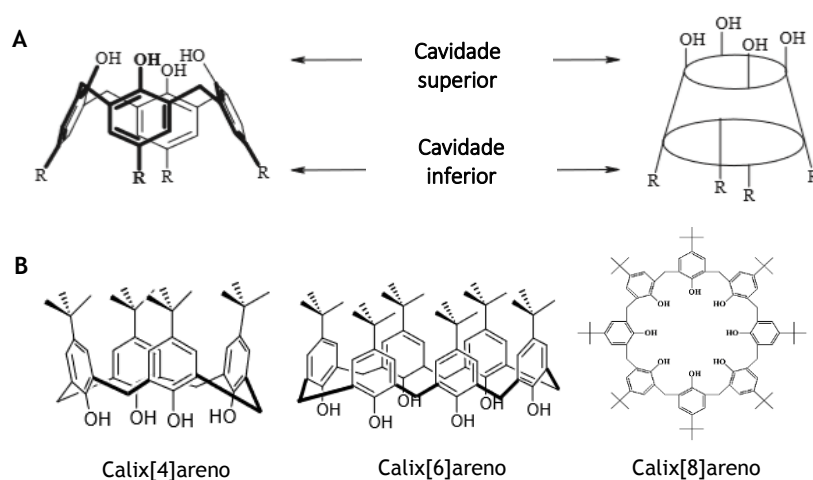


Figura 11- (A) Estrutura da molécula calixareno e suas cavidades. Adaptado de (Sirit & Yilmaz, 2009); (B) Diferentes tamanhos de calix[n]arenos.

1.5.4.1- Propriedades físico químicas e conformacionais

Os calixarenos são praticamente insolúveis em água e têm baixa solubilidade em solventes orgânicos. Para contornar este obstáculo, uma das soluções é adicionar substituintes à parte aromática do anel ou aos grupos hidroxilo (exemplos: sais, polímeros, entre outros) (Yilmaz, 2013). Relativamente ao ponto de fusão, apresentam valores elevados, normalmente superiores a 300°C, os quais são aumentados proporcionalmente com o tamanho da cavidade superior.

Os calixarenos adotam várias conformações que diferem pela posição dos grupos fenólicos, apresentando forma de “cone” (quando os substituintes têm a mesma orientação), “cone parcial” (quando uma unidade aromática é invertida em relação às outras), “1,2-alternado” e “1,3-alternado” (quando os dois anéis aromáticos estão invertidos). Para os calix[4]arenos, a conformação de cone é a mais favorável termodinamicamente, pelo efeito das ligações de hidrogénio intermoleculares existentes entre os grupos fenóis adjacentes (Figura 12) (Cragg & Wiley, 2005). A funcionalização das cavidades inferior e superior dos calix[4]arenos (álcoois,

ácidos carboxílicos, cetonas, aminas...), conseguem fixar uma dada conformação. Deste modo, a flexibilidade e a diversidade de conformações disponíveis torna estes compostos importantes em diversas aplicações (Sirit & Yilmaz, 2009).

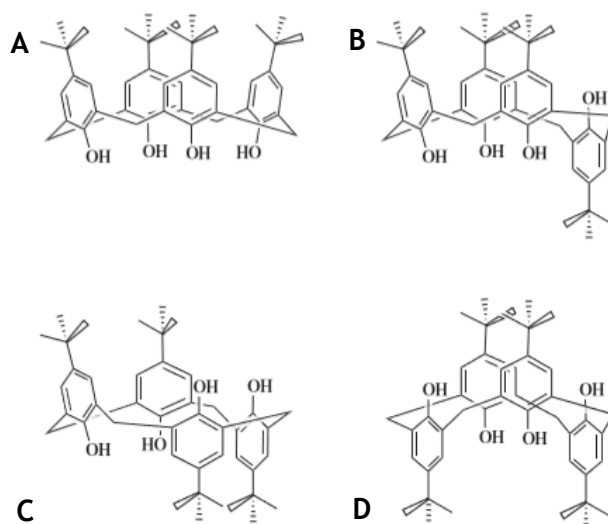


Figura 12- Conformações adotadas do calix[4]areno. (A) Cone; (B) Cone parcial; (C) 1,2-Alternado e (D) 1,3-Alternado. Adaptado de (Cragg & Wiley, 2005).

Os calixarenos são estruturas rígidas e ordenadas. A funcionalização dos calix[n]arenos na cavidade superior permite, por exemplo, a complexação seletiva com metais enquanto que modificações na cavidade inferior promovem o aumento da cavidade, facilitando a complexação de moléculas maiores, podendo funcionar, assim, como transportadores moleculares. Também podem actuar como sensores químicos e de fluorescência através da funcionalização com derivados aromáticos (benzilo, piridina, anilina) (Patra *et al.*, 2012).

Neste âmbito, a espectroscopia de RMN tem sido utilizada para caracterizar a interação e a formação de complexos de inclusão com outras moléculas, nomeadamente ácidos nucleicos (Fátima *et al.*, 2009).

Deste modo, atendendo às suas características e vantagens, neste trabalho foram sintetizados derivados de calix[4]arenos a fim de explorar a sua interação com estruturas do quadruplex.

1.6- Avaliação dos efeitos celulares dos macrociclos derivados de calixarenos

Atualmente, o cancro é considerado uma patologia prevalente na sociedade. Assim, e como já referido, o desenvolvimento de agentes anticancerígenos torna-se importante e necessário para combater esta doença. Neste contexto, existe uma necessidade de incrementar estratégias terapêuticas e entender os mecanismos no controlo da proliferação e morte celular.

Durante o ciclo celular normal, as células morrem por um processo de morte programada, designado de apoptose, o qual é caracterizado por inúmeras características como a condensação do citoplasma e núcleo, fragmentação do DNA internucleossomal e a perda da membrana plasmática (Poon *et al.*, 2010). Este mecanismo está habitualmente relacionado com a manutenção do equilíbrio interno, ou seja, da homeostase. Por outro lado, pode ser expresso como um mecanismo de defesa, face às células lesadas ou em reações imunes. Quando o processo de apoptose ocorre de uma forma indevida, pode surgir o desenvolvimento de doenças, tornando-se importante acompanhar o seu processo e avaliar possíveis abordagens terapêuticas. De facto, certos fármacos têm sido utilizados em terapias do cancro com o objetivo de levar a morte celular por apoptose (Elmore, 2007), explicando os efeitos antitumorais que certos fármacos induzem no tratamento de doenças oncológicas (Kim, 2005).

A fim de avaliar o efeito citotóxico na proliferação celular dos calixarenos (que posteriormente pode induzir a morte celular), foram realizados ensaios celulares, nomeadamente o ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), colorimétrico, onde o sal penetra com facilidade nas células viáveis (Li *et al.*, 2014) e é metabolizado por estas. No caso do presente trabalho de investigação, a toxicidade celular dos compostos foi avaliada em diferentes tipos de células: células cancerígenas humanas da próstata (LNCaP), células cancerígenas humanas da mama (MCF-7) e fibroblastos normais da derme humana (NHDF).

A avaliação do mecanismo de morte foi efetuada por citometria de fluxo através da análise e identificação de diversas populações de células alteradas com alterações morfológicas nas mesmas. Com este ensaio pode ser possível distinguir e caracterizar células viáveis, células em início de apoptose, células em apoptose tardia/necrose e células mortas (Samarghandian *et al.*, 2014). A citometria de fluxo tem vários tipos de aplicações, sendo um método vastamente estudado e utilizado em clínica, nas áreas de hematologia, oncologia, imunologia, entre outras (Santos *et al.*, 2008) (Andreeff *et al.*, 2003).

A visualização das células por microscopia de fluorescência após incubação com os ligandos, pode permitir identificar e localizar os compostos que conseguem penetrar a membrana plasmática e verificar se se localizam em certos organelos celulares, como as mitocôndrias, lisossomas, retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, que fazem parte da constituição de

uma célula e intervêm no processo de morte celular (Kim, 2005). De modo a identificar a localização do composto dentro da célula, existem vários corantes fluorescentes (LysoTracker™, ER-Tracker™, MitoTracker™, Golgi-GFP e Hoechst 33342), utilizados para monitorização e co-localizar o composto por coloração (Cruz *et al.*, 2011).

A síntese de compostos macrociclos e a posterior avaliação do seu potencial biológico reveste-se, assim, de extrema importância, nomeadamente ao nível farmacológico. A sua possível interação com o DNA, mais especificamente com a conformação de G-quadruplex e posterior estabilização, pode abrir portas a aplicações terapêuticas de notável relevância clínica na área oncológica e, por conseguinte, terem elevado interesse por parte da indústria farmacêutica, como agentes anticancerígenos.

1.7-Objetivos

O objetivo geral deste trabalho consiste em preparar e avaliar o efeito de diferentes compostos macrociclos derivados de calixareno e seus intermediários na proliferação de células cancerígenas, pretendendo-se desenvolver e caracterizar potenciais agentes anticancerígenos com ação no G-quadruplex.

1.7.1-Objetivos específicos

- Preparação e caracterização dos novos ligandos com estrutura base de calixarenos: Síntese química de compostos macrociclos e seus intermediários e sua purificação e caracterização estrutural;
- Estudo da interação dos ligandos anticancerígenos com os seus potenciais alvos biológicos: Estudos por RMN;
- Avaliação da ação antiproliferativa em células humanas (linhas celulares do cancro da mama e da próstata e numa linha celular normal da pele), pelo método MTT;
- Estudos de fluorescência e de localização celular por microscopia de fluorescência e confocal;
- Análise de morte celular por apoptose e análise da viabilidade celular por ensaios de citometria de fluxo: Estudos com marcação por Anexina V-FITC e por Iodeto de propídio.

Capítulo 2 - Materiais e Métodos

2.1 - Síntese Química

2.1.1 - Materiais

Todos os compostos comercialmente adquiridos foram utilizados nas sínteses sem qualquer purificação. O macrociclo *p-tert*-butilcalix[4]arene (95%), anidrido ftálico, cloreto de tosilo, cloreto de isoftaloilo, dicloreto de 2,6-piridinadicarbonilo, 2-(2-aminoetoxi)-etanol e hidrazina mono-hidratada foram adquiridos à Sigma Aldrich. Os sais, como carbonato de potássio (K_2CO_3) e hidróxido de sódio (NaOH), foram adquiridos à Fisher BioReagents, a 4-dimetilaminopiridina (DMAP) à FLUKA e o ácido cítrico foi adquirido à Sigma Aldrich.

Em relação aos solventes utilizados neste trabalho, o tolueno, diclorometano, éter de petróleo, acetonitrilo e metanol foram adquiridos à Fisher Chemical; o clorofórmio à VWR, o ácido clorídico (HCl) à Panreac e o etanol 99% ao Manuel Vieira & C^a.

Os solventes deuterados utilizados foram clorofórmio-99,8% e metanol- d_4 , igualmente adquiridos à Sigma Aldrich.

2.1.2- Equipamentos

As reações foram realizadas em placas de aquecimento e de agitação magnética da marca Heidolph e a evaporação de solventes orgânicos foi realizada em evaporadores rotativos da marca Büchi.

Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetros Bruker Avance III 400 MHz e 600 MHz. Os solventes usados para a obtenção dos espectros foram clorofórmio ($CDCl_3$), metanol-deuterado ($MeOD-d_4$) e como referência interna foi utilizado o tetrametilsilano (TMS).

A caracterização dos compostos, realizada por espectroscopia de RMN, referente aos espectros de 1H , está representada pela seguinte ordem: nome do solvente, desvio químico (ppm), integração, multiplicidade e atribuição da molécula. Para os espectros de ^{13}C RMN segue-se a seguinte ordem: solvente e desvio químico.

Os espetros de massa (MS) foram adquiridos na Universidade de Salamanca no Espectrómetro QSTAR XL pelo método +ES MS, representando os dados destes espectros pela massa exacta obtida ($M+NH_4/Na$).

2.1.3 - Procedimento experimental

Quando os solventes são referidos como secos, eles foram preparados através do seguinte método: ativaram-se os *peneiros moleculares*-4A (“*molecular sieves*”) numa mufla durante 24 h. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente cerca de 24 h e de seguida colocou-se os *peneiros moleculares* dentro de um frasco e adicionou-se o solvente de interesse.

A Figura 13 apresenta os passos da síntese dos derivados de calix[4]areno.

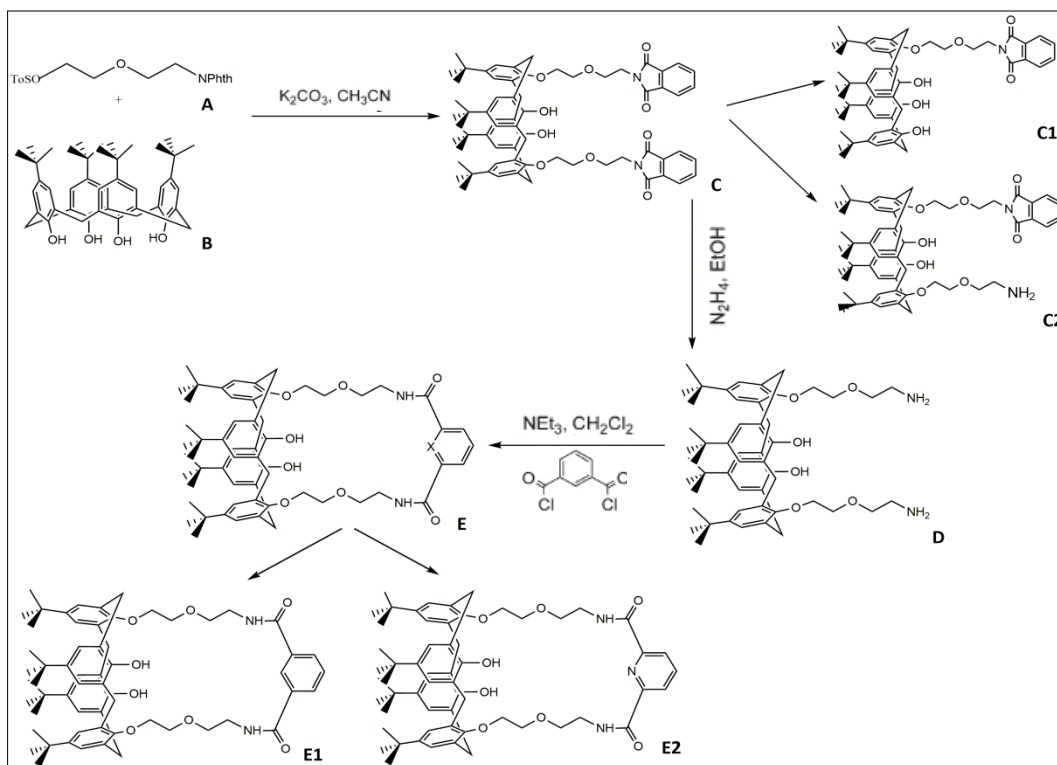
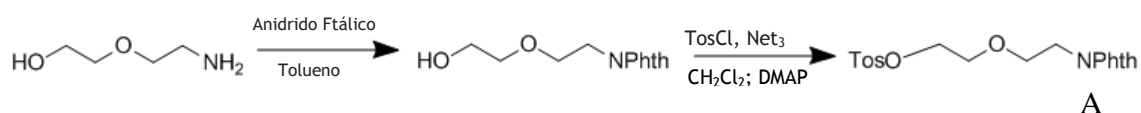


Figura 13 - Esquema da síntese geral dos derivados de calix[4]areno.

2.1.3.1- Síntese do 2-(2-(1,3-dioxoisindolina-2-il)etoxi)etilacetato de 4-metilbenzenossulfonato (composto A) (Beer *et al*, 2006)



Num balão de fundo redondo de 500 mL dissolveu-se o 2-(2-aminoetoxi)-etanol (5 mL) e anidrido ftálico (7,4 g; 0,05 mol) em tolueno (225 mL), montou-se o sistema Dean-Stark e colocou-se a mistura a agitar em refluxo durante 4 h. A água recolhida foi removida periodicamente do sistema e o controlo da reação foi realizado pelo teste da água-catalisada por esterificação ácida. Este teste consiste em retirar pequena quantidade da solução resultante do Dean-Stark para um tubo de ensaio com cloreto de cobalto e se o complexo exibir cor rosa, indica que a reação ainda não terminou. Após o término, a mistura foi deixada arrefecer, evaporou-se o solvente até à secura com o auxílio de um evaporador rotativo, obtendo-se o produto intermediário ftalimida (8,9 g, 78,7%), que foi seco numa estufa de vácuo.

O intermediário da reação foi analisado por RMN. $^1\text{H-RMN } \delta(\text{CDCl}_3, 400 \text{ MHz})$: 3,6 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$); 3,97 (2H, m, CH_2OH); 3,8 (2H, t, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}$); 4,43 (2H, t, CH_2N); 7,77 (2H, m, ArH); 7,89 (2H, m, ArH).

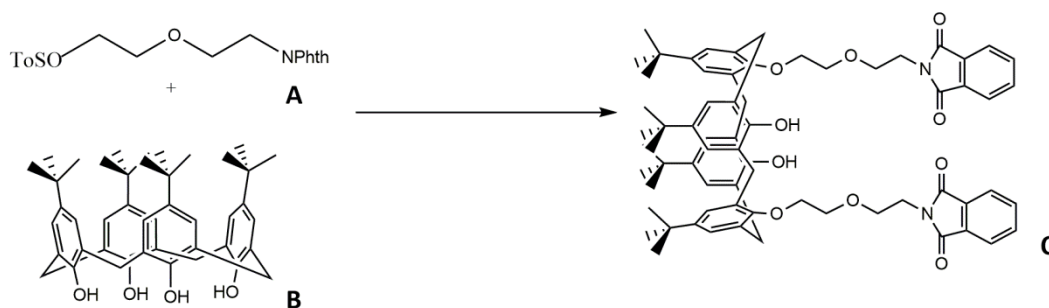
Este produto intermediário (8,9 g; 0,04 mol) foi dissolvido em diclorometano (100 mL) num balão de fundo redondo de 250 mL e realizou-se agitação magnética. De seguida, adicionou-se lentamente e pela seguinte ordem: solução de trietilamina (12,3 mL; 0,08 mol), cloreto de tosilo (7,2 g; 0,04 mol) e o catalisador DMAP-10% (0,47 g). A mistura reacional foi mantida à temperatura ambiente e sob agitação magnética durante 48 h.

Após parar a reação, adicionou-se H_2O (50 mL) à solução resultante, formando uma mistura bifásica. Esta foi neutralizada pela adição de porções de uma solução de ácido cítrico-10%, de modo a obter $\text{pH}=7$, foi agitada vigorosamente, e em seguida descartada. A fase orgânica foi lavada com H_2O (3 x 100 mL) e o solvente foi removido num evaporado rotativo, obtendo-se um produto em forma de óleo, que foi seco na estufa de vácuo.

O produto foi recristalizado com éter de petróleo (30 mL) e seco na estufa de vácuo, obtendo-se o produto final A (12,3 g; 85%).

O produto A da reação foi caracterizado por RMN. $^1\text{H-RMN } \delta(\text{CDCl}_3, 400 \text{ MHz})$: 2,34 (3H, s, CH_3); 3,70 (4H, m, CH_2OCH_2); 4,01 (2H, t, CH_2N); 4,29 (2H, t, CH_2OSO_2); 7,6 (4H, d, TosH); 7,77 (4H, m, PhthH).

2.1.3.2- Síntese do calix[4]-NPhth (composto C) (Beer *et al.*, 2006)



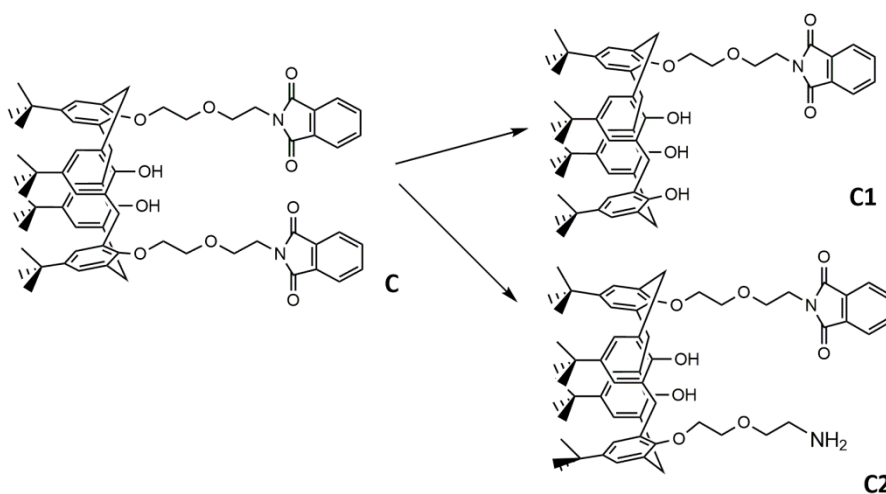
Num balão de fundo redondo de duas tubuladuras de 100 mL, dissolveu-se o *p-tert*-butilcalix[4]areno (composto B) (0,837 g; 1,29 mmol) e carbonato de potássio (0,383 g; 2,72 mmol) em acetonitrilo seco (40 mL), sob agitação magnética à temperatura ambiente, durante 30 min. De seguida, por uma ampola de adição, foi adicionado à mistura resultante, o produto final A (1,306 g; 3,33 mmol) previamente dissolvido em 20 mL de acetonitrilo seco e a solução resultante foi deixada em refluxo durante 4 dias.

Após o término da reação, a suspensão (cor amarelada) foi deixada arrefecer em gelo, observando-se a formação de precipitado branco. De seguida, a mistura foi filtrada e o solvente foi evaporado, sendo o produto seco numa estufa de vácuo. Ao produto seco obtido, foi adicionado uma solução de HCl (1M) (15 mL) e transferiu-se esta solução para uma ampola de decantação. A suspensão resultante foi extraída com diclorometano (2 x 50 mL), e em seguida os extratos foram lavados com H₂O (4 x 50 mL). A fase orgânica foi evaporada e o produto seco na estufa de vácuo.

Após a secagem, o produto foi purificado pela adição de etanol 99% (40 mL) quente, e observou-se a formação de precipitado branco, que foi posteriormente filtrado e seco, obtendo-se o produto final C (0,906 g; 70%).

O produto C da reação foi analisado por RMN. ¹H-RMN δ(CDCl₃, 600 MHz): 1,14 (s, 18H, C(CH₃)₃); 1,20 (s, 18H, C(CH₃)₃); 3,07 (4H, d, ArCH₂Ar); 3,85 (20H, m, OCH₂, NCH₂ & ArCH₂Ar); 6,98 (4H, s, calixArH); 7,3 (4H, s, calixArH); 7,65 (4H, m, PhthH); 7,79 (4H, m, PhthH); ¹³C-RMN: δ(CDCl₃, 600 MHz): 21,48; 30,9; 31,37; 33,70; 37,60; 42,17; 61,88; 68,33; 72,41; 123,12; 124,73; 125,38; 125,92; 127,80; 131,86; 133,35; 129,57; 141,04; 146,90; 149,48; 149,87; 168,46.

2.1.3.3- Síntese do calix[4]-NP e calix[4]-NP₂ (compostos C1 e C2, respetivamente)



C1: O procedimento para obtenção do composto C1 foi descrito na seção 2.1.3.2, mas neste caso misturou-se 0,16 mmol (0,106 g) de *p-tert*-butilcalix[4]arene, 0,33 mmol (0,049 g) de carbonato de potássio e 0,41 mmol (0,159 g) de composto A no volume de 30 mL de acetonitrilo. O rendimento da reação foi de 39% (55 mg do composto C1).

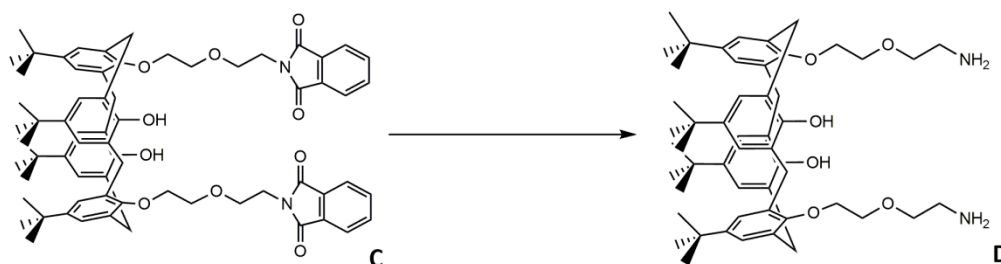
O produto intermediário C1 da reação foi analisado por RMN e espectrometria de massa. ¹H-RMN δ(CDCl₃, 600 MHz): 1,05 (s, 18H, C(CH₃)₃); 1,14 (s, 18H, C(CH₃)₃); 3,68 (4H, d, ArCH₂Ar); 3,84 (10H, m, OCH₂, NCH₂ & ArCH₂Ar); 6,98 (4H, s, calixArH); 7,61 (4H, s, calixArH); 7,65 (4H, m, PhthH); 7,79 (4H, m, PhthH); ¹³C-RMN: δ(CDCl₃, 600 MHz): 28,70; 30,36; 31,67; 33,70;

36,64; 40,94; 60,80; 67,42; 71,22; 122,43; 125,38; 126,07; 128,63; 130,95; 133,10; 136,41; 141,87; 149,48; 167,51; m/z (+ES): 866,13 ($M + NH_4^+$).

C2: O procedimento descrito na seção 2.1.3.2 é idêntico ao anterior, mas neste caso partiu-se de 1,29 mmol (0,83 g) de *p*-*tert*-butilcalix[4]arene, de 2,70 mmol (0,38 g) de carbonato de potássio, de 3,33 mmol (1,3 g) de composto **A** e usou-se um volume final de 60 mL de acetonitrilo. O rendimento da reação foi de 29% (0,332 g do composto **C2**).

O produto intermediário **C2** da reação foi analisado por RMN e espectroscopia de massa. 1H -RMN δ ($CDCl_3$, 600 MHz): 1,02 (s, 18H, $C(CH_3)_3$); 1,28 (s, 18H, $C(CH_3)_3$); 2,40 (4H, d, $ArCH_2Ar$); 2,88 (2H, *br*, NH_2); 3,03 (2H, m, CH_2NH_2); 3,22 (2H, m, $OCH_2CH_2NH_2$); 4,02 (16H m, OCH_2 , NCH_2 & $ArCH_2Ar$); 6,76 (4H, s, calixArH); 6,81 (4H, s, calixArH); 7,71 (2H, m, PhthH); 7,85 (2H, m, PhthH); ^{13}C -RMN: δ ($CDCl_3$, 600 MHz): 30,98; 31,82; 37,67; 41,97; 42,66; 61,76; 68,42; 72,26; 75,00; 123,39; 124,47; 127,85; 129,62; 132,00; 134,08; 140,84; 142,92; 146,76; 149,61; 150,14; 168,60; m/z (+ES): 953,56 (M).

2.1.3.4- Síntese do calix[4]- NH_2 (composto **D**) (Beer *et al.*, 2006)

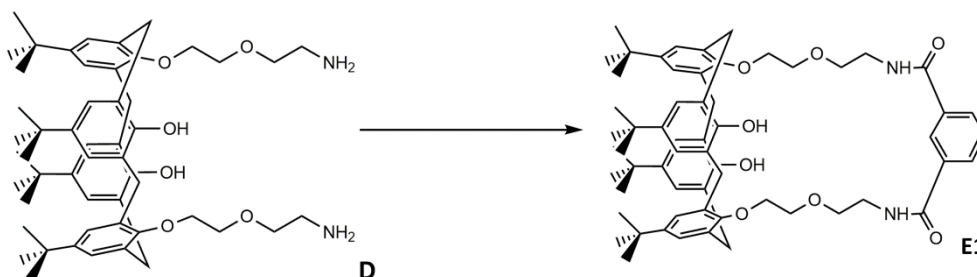


O composto **C** (0,435 g; 0,4 mmol) foi dissolvido em etanol 99% (25 mL) num balão de fundo redondo de 50 mL, com agitação e à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se a hidrazina mono-hidratada (195 μ l, excesso-10x) à solução, sendo a mistura colocada em refluxo durante 12 h. Por fim, arrefeceu-se a solução num banho de gelo, observando-se a formação de precipitado branco, sendo de seguida filtrada e a solução evaporada até à secura. Foi adicionada H_2O (50 mL) ao produto e extraiu-se com diclorometano (4 x 40 mL). O solvente foi evaporado e o composto foi seco na estufa de vácuo obtendo-se o intermediário **D** (0,156 g; 47%).

O produto **D** da reação foi analisado por RMN e espectrometria de massa. 1H -RMN δ ($MeOD-d_4$, 600 MHz): 0,98 (s, 18H, $C(CH_3)_3$); 1,14(s, 18H, $C(CH_3)_3$); 2,46 (4H, *br*, NH_2); 2,95 (4H, m, CH_2NH_2); 3,31 (4H, d, $ArCH_2Ar$); 3,60 (4H, m, $OCH_2CH_2NH_2$); 3,90 (4H, m, OCH_2CH_2O); 4,11 (4H, m, OCH_2CH_2O); 4,31 (d, 4H, $ArCH_2Ar$); 6,92 (4H, s, ArH); 7,04 (4H, s, ArH); ^{13}C -RMN:

δ (MeOD, 600 MHz): 30,23; 30,70; 33,25; 33,61; 33,98; 41,13; 69,12; 72,52; 75,19; 125,54; 126,96; 128,20; 133,70; 142,21; 143,34; 147,71; 149,66; m/z (+ES): 823,5 (M).

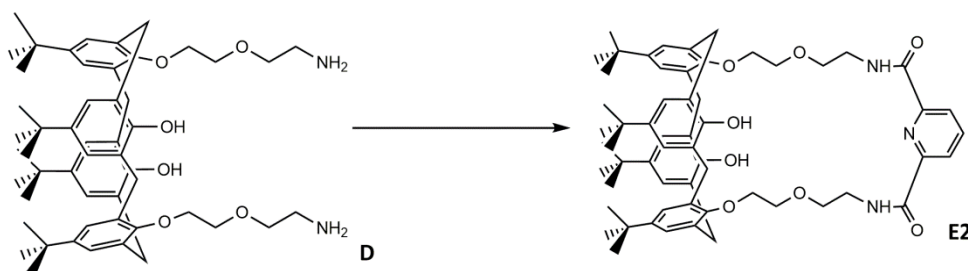
2.1.3.5- Síntese do calix[4]-Benz (composto E1) (Beer *et al.*, 2006)



O procedimento para a síntese do composto D foi o descrito nas seções anteriores (2.1.3.2 e 2.1.3.4). O composto D (0,27 g; 0,32 mmol) e o dicloreto de ácido isoftálico (0,07 g; 0,32 mmol) foram ambos dissolvidos em diclorometano (30 mL). Cada uma destas soluções foi adicionada, gota a gota, simultaneamente, à solução de trietilamina (180 μ l, 1,29 mmol) em diclorometano (40 mL), num balão de 250 mL de três tubuladuras, durante 12 h. Após a reação, a mistura resultante foi evaporada e o produto foi seco na estufa de vácuo. Após a secagem, lavou-se com solução de HCl (1 M) (5 mL), ficando a solução a pH=2, adicionou-se H₂O (10 mL) e por fim solução de NaOH (1 M) (10 mL) (pH=14). Extraíu-se a fase aquosa com diclorometano (4 x 20 mL) e de seguida a fase orgânica foi evaporada, obtendo-se um produto sólido amarelado, que foi seco na estufa de vácuo. O rendimento do produto E1 foi de 83% (0,255 g).

O produto E1 da reação foi analisado por RMN e espectrometria de massa. ¹H-RMN δ (CDCl₃, 600 MHz): 0,88 (s, 18H, C(CH₃)₃); 1,33 (s, 18H, C(CH₃)₃); 3,27 (4H, d, ArCH₂Ar); 3,84 (12H, m, AlCH₂); 4,25 (8H, m, AlCH₂ & ArCH₂Ar); 6,68 (4H, s, calixArH); 6,79 (2H, s, OH); 6,94 (4H, s, calixArH); 7,79 (1H, m, isoftálico CH); 7,93 (2H, bm, NH); 8,26 (2H, m, isoftálico CH); 9,13 (1H, m, isoftálico CH); ¹³C-RMN: δ (CDCl₃, 600 MHz): 31,05; 31,70; 40,19; 45,82; 69,35; 69,98; 75,11; 123,51; 125,67; 127,71; 131,13; 132,29; 133,54; 147,04; 149,21; 149,50; 166,97; m/z (+ES): 970,59 (M + NH₄⁺).

2.1.3.6- Síntese do calix[4]-Pyr (composto E2) (Amr, Abo-ghalia, & Abdalah, 2006)



O procedimento da síntese do composto **D** foi o descrito nas seções anteriores (2.1.3.2 e 2.1.3.4). Neste caso, o composto **D** 0,14 mmol (0,12 g) foi dissolvido em diclorometano seco (20 mL) com agitação. De seguida adicionou-se trietilamina (80 μ l, 0,6 mmol) à mistura reacional a -10°C durante 45 min. Após esta adição, juntou-se o dicloreto de 2,6-piridinadicarbonilo (0,03 g; 0,14 mmol) previamente dissolvido em diclorometano (10 mL) à mistura reacional, gota-a-gota, a -10°C durante 3 h.

Após 3 h, o balão foi colocado à temperatura ambiente durante a noite e sob agitação. O solvente foi evaporado e o sólido foi seco na estufa de vácuo. Após secagem, lavou-se com solução de HCl (1 M) (5 mL), ficando a solução a pH=2, adicionou-se H_2O (10 mL) e por fim adicionou-se solução NaOH (1 M) (10 mL), ficando a solução a pH=14. Extraíu-se a fase aquosa com diclorometano (4 x 40 mL) e de seguida evaporaram-se as frações da fase orgânica, obtendo-se um sólido amarelado, que foi seco na estufa de vácuo. O rendimento da reação foi de 90% (0,173 g).

O produto final **E2** da reação foi analisado por RMN e espectrometria de massa. ^1H -RMN $\delta(\text{CDCl}_3, 600 \text{ MHz})$: 0,90 (s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1,32 (s, 18H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 3,25 (4H, d, ArCH_2Ar); 3,88 (12H, m, AlCH_2); 4,26 (8H, m, AlCH_2 & ArCH_2Ar); 6,71 (4H, s, calixArH); 6,95 (4H, s, calixArH); 7,00 (2H, s, OH); 7,75 (1H, m, piridina CH); 8,06 (2H, bm, NH); 9,24 (2H, m, piridina CH); ^{13}C -RMN: $\delta(\text{CDCl}_3, 600 \text{ MHz})$: 30,92; 31,73; 40,07; 42,04; 69,49; 69,90; 74,65; 125,55; 127,69; 132,50; 138,35; 141,53; 148,25; 149,06; 149,70; 164,12; m/z (+ES): 971,58 ($\text{M} + \text{Na}^+$).

2.2 - Análise estrutural das estruturas do G-quadruplex

2.2.1 - Técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

2.2.1.1- Materiais

A sequência “G4”: TAG₃T₂AG₃T₂AG₃T₂AG₃, de 23 pares de bases, foi adquirida à Primm. A água deuterada (D₂O) foi adquirida à Euriso-top e o ácido trimetilsilil propiónico (TSP) foi adquirido à Armar Chemicals. Os sais cloreto de potássio (KCl) e fosfato de monopotássio (KH₂PO₄) foram adquiridos à Panreac (Estados Unidos) e à Chem-Lab (Bélgica), respectivamente.

2.2.1.2- Preparação das amostras de DNA

A amostra de DNA foi preparada na solução-tampão 10 mM KH₂PO₄ a pH=7,2 contendo 70 mM de KCl e com 10% de D₂O. A formação da estrutura do quadruplex consistiu no aquecimento da amostra a 85°C durante 15 min, arrefecimento gradual à temperatura ambiente, sendo depois colocada a 4°C. Em seguida, a conformação do quadruplex foi confirmada nos espectros de RMN de ¹H. A concentração no tubo de RMN de 3 mm foi de 0,575 mM.

2.2.1.3- Preparação dos ligandos

As soluções dos compostos (Calix-Benz, Calix-Pyr, Calix-NH₂, Calix-NP e Calix-NP₂) foram preparadas com uma concentração final de 10 mM em DMSO-*d*₆.

2.2.1.4- Preparação dos complexos G-quadruplex-ligandos

As soluções dos complexos G₄-DNA:compostos com estequiometrias (1:1) e (1:2), foram preparadas em tubos de RMN de 3 mm com percentagem final de DMSO de 20%. Foram adquiridos espectros de ¹H das misturas G₄-DNA:compostos entre T=25°C e 65°C.

2.2.1.5- Experiências de RMN

Os espectros de RMN ¹H foram adquiridos no espectrômetro Bruker AVANCE-600, operando à frequência de 600 MHz para o próton, equipado com uma criosonda QCI de 5 mm. Os espectros foram obtidos com uma largura espectral de 16 ppm, 128 scans para cada espectro, tempo de relaxação de 5 segundos, e programa de pulso com gradientes para a supressão da água.

Os espectros de RMN foram processados e analisados utilizando o *software* TOPSPIN 3.1.

2.3 - Avaliação Biológica dos macrociclos

2.3.1 - Material

2.3.1.1- Reagentes

Para os ensaios com células, o meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) e o meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) foram adquiridos à Sigma-Aldrich (Portugal). O Soro Bovino Fetal (FBS) foi adquirido à Biochrom AG (Portugal), o corante azul de triptano (0,4%) à Merck, o brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT) à Amresco, o dimetilsulfóxido (DMSO) à VWR e o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) à Panreac (Estados Unidos). A L-Glutamina, o HEPES, o piruvato de sódio, a Tripsina (0,025% em PBS/EDTA), o Antibiótico AB (Solução de estreptomicina, penicilina e anfotericina-B) e o Antibiótico SP (Solução de estreptomicina e penicilina), foram todos adquiridos à Sigma Aldrich. Foram também preparadas soluções de tampão fosfato salino (PBS) composta por 90% de água Mili-Q (Millipore) e 10% de PBS (10x) e soluções de etanol a 70%.

Relativamente aos ensaios de citometria de fluxo, o cloreto de sódio (NaCl) foi adquirido à Panreac e o cloreto de cálcio (CaCl₂) à VWR. O *kit* de deteção de apoptose é composto pelo iodeto de propídio (IP) e a Anexina-V conjugada com a fluoresceína (Anexina V-FITC) e foi adquirido à Invitrogen.

No que respeita aos ensaios de fluorescência, as sondas MitoTracker Green™, ER-Tracker™ Green e o Hoechst 33342 foram adquiridas à Invitrogen A polilisina foi adquirida à Sigma Aldrich e o tampão borato à GE Healthcare.

2.3.1.2- Equipamentos e sua função

Na realização dos ensaios celulares foram usados alguns equipamentos, tais como, câmara de fluxo laminar Vertical NuAire, de Classe II, para proceder à maior parte do trabalho experimental em condições de assepsia; estufa Nuair DHD Autoflow CO₂ Air-Jacketed a 37°C para manter a atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂, para incubação das células; centrífuga Bioblock Scientific (Sigma-3K18C) para separação das células dos meios em que se encontram, microscópios ópticos Olympus CKX 40/41 para observação e controlo do estado das células, banho de aquecimento (Fisher Scientific) para aquecer os meios de cultura, soro e tripsina e um leitor espectrofotométrico de microplacas Anthos 2020 para quantificar a absorvância dos cristais de formazano no ensaio de MTT.

Para os ensaios de fluorescência foi utilizado o microscópio invertido AxioObserver, Zeiss e nos ensaios de co-localização foi utilizado o microscópio confocal AxioObserver LSM 710, Zeiss. Por fim, foi também utilizado o citómetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson, BD).

2.3.2 - Tipo de células utilizadas no estudo e sua cultura

Na realização deste estudo, foram utilizadas três tipos de linhas celulares: células epiteliais humanas de cancro da mama sensíveis a estrogénios (MCF-7), células de adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios (LNCaP) e fibroblastos da derme humana normais (NHDF). Cada linha celular foi suplementada com o meio de cultura correspondente para a sua utilização, de modo a se criarem condições para o crescimento celular e sua diferenciação.

2.3.2.1- Células cancerígenas da mama (MCF-7)

As células MCF-7 são uma linha celular de células epiteliais, obtidas a partir de efusão pleural de uma mulher caucasiana com 69 anos que apresentava adenocarcinoma mamário metastático. Tem a designação de *Michigan Cancer Foundation-7* pela razão de estar relacionado ao Instituto onde pela primeira vez foi efetuado o seu isolamento. Estas células são caracterizadas pelo seu crescimento em monocamadas, por apresentarem receptores de estrogénios e por terem propriedades aderentes (Levenson & Jordan, 1997).

As células MCF-7 foram mantidas no meio de cultura - DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de FBS (Soro Fetal Bovino) e com 1% de antibiótico/antimicótico Ab (10,000 unidades/mL de penicilina, 10 mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina-B). Estas células foram cultivadas em frascos de cultura (T-Flasks) de 75 cm² e incubadas a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. A substituição do meio foi realizada a cada 2-3 dias e quando se atingia a confluência celular, as células foram tripsinizadas e expandidas para novos frascos de cultura. Nas experiências, as células foram utilizadas em ensaios nas passagens de 40 a 47.

2.3.2.2- Células cancerígenas da próstata (LNCaP)

As células LNCaP são uma linha celular humana do adenocarcinoma da próstata sensíveis a androgénios, isoladas a partir de uma metástase de um nódulo linfático supraclavicular extraída de um homem caucasiano com 50 anos de idade, sendo designadas por *Lymph node carcinoma of the prostate*. Estas células epiteliais são sensíveis a androgénios e apresentam características igualmente aderentes, mas o seu crescimento pode ser desenvolvido sob a forma de agregados ou como células isoladas (Horoszewicz *et al.*, 1983),(Russell & Kingsley, 2003).

As células LNCaP foram mantidas no meio de cultura designado por RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) completo, ou seja, suplementado com 10% de FBS e com 1% de antibiótico SP (10,000 unidades/mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina). Estas células foram cultivadas em frascos de cultura (T-Flasks) de 75 cm² e incubadas a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. A renovação do meio foi realizada a cada 2-3 dias e quando se atingiu a confluência celular, as células foram tripsinizadas e expandidas para novos frascos de cultura. Nas experiências, as células foram utilizadas em ensaios nas passagens de 27 a 35.

2.3.2.3- Células normais dos fibroblastos dérmicos (NHDF)

As células NHDF são fibroblastos originários da derme humana saudável de adultos e são designados por *Normal Human Dermal Fibroblasts*. Estas células são aderentes, mas não apresentam diferenciação celular completa e contêm receptores de estrogénios.

As células NHDF foram mantidas no meio de cultura RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, 2 mM de L-Glutamina, 10 mM de HEPES, 1 mM de piruvato de sódio e 1% de antibiótico/antimicótico Ab (10,000 unidades/mL de penicilina, 10mg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina-B). Estas células foram cultivadas em frascos de cultura (T-Flasks) de 75 cm² e incubadas a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. A renovação do meio foi realizada a cada 2-3 dias e quando se atingia a confluência celular, as células foram tripsinizadas e expandidas para novos frascos de cultura. Nas experiências, as células foram utilizadas em ensaios nas passagens de 9 a 12.

2.3.3 - Técnicas de cultura celular

2.3.3.1- Tripsinização

Após o cultivo das células e incubação nos T-flasks, as células cresceram e diferenciaram-se ao longo do tempo. Quando alcançaram a fase exponencial de crescimento, isto é, atingiram cerca de 80-90% da confluência celular, as células sofreram o processo de tripsinização e foram expandidas para novos frascos de cultura. A análise deste procedimento é realizada com observação ao microscópio. A técnica consiste em aspirar sob vácuo o meio de cultura no interior do frasco e fazer uma lavagem pela adição de PBS (cerca de 10 mL). De seguida aspirou-se o PBS, adicionou-se a tripsina (10 mL) e incubou-se durante 5 min, na estufa a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO₂, de modo a permitir a dissociação das células da superfície do T-flask. Para confirmar que as células já não estavam aderentes, mas sim em suspensão, observou-se ao microscópio e de seguida, neutralizou-se a tripsina através da adição de meio de cultura quente (suplementado com soro fetal bovino e antibiótico). Seguidamente, fez-se a transferência da suspensão celular resultante, previamente ressuspendida, para um falcon e centrifugou-se durante 8 min a 1000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* obtido foi ressuspendido em meio de cultura completo (volume dependente da quantidade de *pellet*). Procedeu-se depois à expansão da suspensão celular para novos frascos de cultura em meio de cultura e por fim incubaram-se para continuarem o processo de crescimento.

2.3.3.2- Contagem e sementeira de células

Este procedimento realizou-se quando se pretendeu efetuar a avaliação do efeito dos compostos em estudo na proliferação celular. Neste ensaio, foram usadas caixas de cultura celular de 48 poços, sendo que a quantidade de células a semear em cada um foi preparada

previamente. Para isso, foi necessário efetuar a contagem das células e preparar suspensões com a concentração adequada das mesmas. De acordo com o descrito na seção anterior (tripsinização), após fazer a ressuspensão do *pellet* em meio de cultura, realiza-se a contagem de células. Para o efetuar, retiraram-se 10 µl da suspensão celular para um eppendorf e adicionou-se 10 µl de solução azul de triptano. De seguida, a mistura resultante é colocada sob uma lamela numa câmara de Neubauer, para a contagem do número de células presentes nos quatro quadrantes, realizada ao microscópio. A concentração de células é determinada pela média total dos quadrantes e multiplica-se o valor por 2, ou seja, referente à diluição das células no corante (1:1), aplicando-se a fórmula de Neubauer. Após ser determinado o valor da concentração (células/mL), é calculado o volume necessário de células a retirar, para atingir a concentração celular de 2×10^4 células/mL. O volume resultante de células é seguidamente diluído no volume total de meio de cultura a semear nos poços. Em cada poço (35) foi adicionado 250 µl de suspensão celular final, menos nos poços dos zeros (primeira coluna e primeira linha), onde foi colocado apenas meio completo. As células foram incubadas por 48 h, de modo a promover o crescimento celular e a sua aderência.

2.3.3.3- Estudo do efeito dos compostos na viabilidade celular

Para o efetuar, foram preparadas soluções concentradas dos compostos Calix-Benz, Calix-Pyr, Calix-NH₂, Calix-NP e Calix-NP₂ (10 mM) em DMSO.

Posteriormente à incubação das células nos poços da microplaca durante 48 h, foram, num primeiro ensaio, adicionados os compostos na concentração 30 µM, para avaliar o seu efeito na proliferação celular. A concentração final de DMSO nos ensaios foi inferior a 1%, verificando-se que nestas condições não provoca efeito relevante na viabilidade celular. Depois da observação do estado das células ao microscópio, foi aspirado o meio de cada poço e adicionada solução dos compostos nos poços (n=5). A placa é constituída pelos poços que contém os 5 compostos (células e composto), controlo (células e meio de cultura), “zeros” (meio de cultura, sem células) e uma última coluna com meio com 1% de DMSO, de modo a analisar a sua influência nas células (Figura 14). As células foram incubadas com os compostos durante 48 h.

O efeito dos compostos na proliferação celular foi observado ao microscópio óptico.

Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
Z	C	CB	CP	NH ₂	NP ₂	NP	DMSO
Z	C						
Z	C						
Z	C						
Z	C						

Figura 14 - Esquema representativo da microplaca para o primeiro ensaio de todos os compostos numa concentração de 30 μM . (Z=Zero; C=Controlo; CB= Calix-Benz; CP=Calix-Pyr; NH₂=Calix-NH₂; NP₂=Calix-NP₂; NP=Calix-NP; DMSO= dimetilsulfóxido).

Após este ensaio, os compostos que apresentaram atividades antiproliferativas relevantes, foram selecionados para um ensaio de determinação de curvas-dose-resposta, que permitem também determinar-se o IC₅₀ (concentração de composto que inibe em 50% o crescimento celular).

Para esse efeito, foram preparadas soluções diluídas de cada composto. As concentrações foram de 0,01 μM ; 0,1 μM ; 1 μM ; 10 μM ; 50 μM e 100 μM (Figura 15). Após aspiração do meio do poço incubaram-se as células com estas soluções dos compostos durante 48 h. Neste estudo, utilizou-se uma microplaca para cada composto. Posteriormente realizou-se também o ensaio do MTT.

Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z	Z
Z	C	0,01	0,1	1	10	50	100
Z	C						
Z	C						
Z	C						
Z	C						

Figura 15 - Esquema representativo das microplacas para o segundo ensaio - Curva dose-resposta, com uma gama de diferentes concentrações. Foram realizados ensaios com n=5 para todas as concentrações (μM), zero e controlo, em células MCF-7, LNCaP e NHDF.

2.3.3.4- Ensaio de proliferação celular-MTT

A citotoxicidade dos compostos nas células foi medida pelo ensaio MTT, um ensaio colorimétrico (Mosmann, 1983). Este teste vai depender do tipo de células, da sua atividade mitocondrial e do número de células existentes. Baseia-se na redução do sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil-tetrazólio, de cor amarela e solúvel em água, a cristais de formazano, de cor azul e insolúveis em água, através da ação da succinato desidrogenase, que se encontra no interior das células viáveis (Mao *et al.*, 2012). Os cristais de formazano são acumulados nas células viáveis, apresentando impermeabilidade às membranas celulares, traduzindo assim, o parâmetro de viabilidade (Fotakis & Timbrell, 2006). O MTT é sensível à luz e, portanto é necessário ter o cuidado de manusear sem luz incidente.

Assim, após 48 h de incubação das células com os compostos, nas condições descritas anteriormente, os sobrenadantes dos poços foram aspirados e lavados com PBS. A cada um dos 40 poços (zero, controlo e compostos), adicionou-se 250 µl da solução de MTT (5 mg/mL) em PBS filtrada e dissolvida em meio de cultura incompleto. O tempo de incubação do MTT foi de 4 h, em atmosfera de 37°C com 5% de CO₂, e ausência de luz. Após o tempo de incubação observaram-se os cristais obtidos ao microscópio óptico. De seguida, aspirou-se cuidadosamente o sobrenadante dos poços, de modo a impedir a remoção de cristais, e adicionou-se 225 µl de DMSO para os solubilizar, obtendo-se uma solução roxa. Depois, transferiu-se 225 µl do conteúdo de cada poço para uma placa de 96 poços de modo a medir a absorvância a 570 nm no leitor de microplacas. A intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazano, sendo que a absorvância está relacionada com o número de células viáveis no final do ensaio. Os valores das absorvâncias dos compostos são comparados com os valores do controlo (definidos para 100%). Após leitura dos valores, as placas são descartadas no contentor vermelho (incineração).

2.3.3.5- Microscopia de fluorescência

Para realizar o ensaio com o microscópio de fluorescência, após tripsinização, as células MCF-7 e LNCaP foram incubadas em caixas de cultura revestidas com solução de polilisina em tampão borato. O procedimento para revestimento das caixas passou pela adição da polilisina, incubação durante a noite a 37°C, recolhendo-se de seguida o excesso de solução que não aderiu. Seguidamente, foram realizadas três lavagens com água estéril e esterilizadas em UV durante 10 min. Por fim, as caixas foram armazenadas a 4°C.

O crescimento das células nas placas realizou-se durante 24 h, com uma densidade celular inicial de 3×10^4 células/mL. Após esse período, as células foram incubadas com os compostos Calix-Benz, Calix-Pyr e Calix-NH₂ na concentração de 30 µM durante entre 4 h a 12 h. As imagens foram recolhidas no microscópio AxioObserver Zeiss e o *software* utilizado foi o AxioVision Rel (versão 4.8.1). O controlo consistiu apenas em meio de cultura e não apresentava fluorescência.

Os ensaios de co-localização dos compostos nas células foram realizados no microscópio confocal a laser AxioObserver LSM 710, Zeiss, com aquisição com filtros dos canais vermelhos (composto) com 561nm de laser de excitação, com 405nm de laser para o filtro azul (Hoechst 33342) e com 488nm de laser para os filtros verdes (MitoTracker GreenTM e ER-TrackerTM Green). As imagens finais foram processadas utilizando o *software* da Zeiss (LSM Image).

Para estes estudos de co-localização, as células LNCaP foram incubadas em placas revestidas com polilisina com concentração celular inicial de 3×10^4 células/mL, durante 24 hs. Após o crescimento das células, estas foram incubadas com o composto Calix-Benz numa concentração 50 μ M, durante 4 h. Os marcadores fluorescentes MitoTracker GreenTM (corante que marca as mitocôndrias), ER-TrackerTM Green (corante que marca o retículo endoplasmático) e Hoechst 33342 (corante que marca o núcleo) foram adicionados às placas dos compostos durante 30 min. As concentrações dos marcadores foram 1 μ M para MitoTracker GreenTM e ER-TrackerTM Green e 5 μ M para o Hoechst 33342.

2.3.3.6- Citometria de fluxo

A análise das células apoptóticas e da viabilidade celular foram realizadas por citometria de fluxo utilizando o *kit* de Anexina V-FITC e de Iodeto de Propídio (IP).

Nos ensaios de análise das células apoptóticas (marcação por Anexina V-FITC), que foi realizado com células MCF-7, estas foram semeadas e incubadas em caixas de cultura celular de 12 poços com uma densidade de 2×10^5 células/mL. Nos ensaios de análise da viabilidade (marcação por IP apenas), a densidade de células semeadas, em caixas de cultura celular de 6 poços, foi de 1×10^5 células/mL para células LNCaP e igualmente de 2×10^5 células/mL para células MCF-7. Em ambos os tipos de testes, após a sementeira e 24 h de crescimento celular, o composto Calix-NH₂ foi incubado com concentrações de 5 μ M e 10 μ M, durante outras 24 h. Como controlos positivos, foram utilizados a diosgenina e o tamoxifeno (ambos em concentração de 20 μ M) para células MCF-7. Como controlo negativo foram usadas células sem terem sido expostas aos compostos em estudo.

Após as 24 h de exposição aos compostos, os sobrenadantes dos poços foram aspirados e transferidos para falcons que estavam mergulhados em gelo. Os poços foram lavados com 1 mL de PBS (quente) e aspirados novamente para os falcons. As células foram tripsinizadas (400/800 μ l de tripsina) e incubadas durante 5 min de modo a promover a desagregação das células da base das caixas. Após a obtenção da suspensão de células, estas foram também transferidas para os falcons, os poços lavados novamente com 1 mL de PBS (recolha total de células) e de seguida centrifugadas durante 5 mins a 300 g. O sobrenadante foi aspirado e o sedimento lavado com 1 mL de PBS (frio) e centrifugado novamente durante 2 min a 300 g. Este passo repetiu-se duas vezes. Após a segunda lavagem e centrifugação, aspirou-se o sobrenadante e o *pellet* foi ressuscitado em 100 a 200 μ l de tampão de ligação-1x ("binding-buffer-10x": 0,1 M HEPES, pH=7,4; 1,4 M NaCl e 25 mM de CaCl₂). De seguida, transferiu-se 100 μ L da suspensão celular obtida para os tubos de cultura de citometria (5 mL) e foram adicionados os marcadores Anexina V-FITC (5 μ l) e o IP (1 μ l), de acordo com o procedimento

do fabricante do *kit*. Os tubos foram ligeiramente agitados e incubados no escuro, à temperatura ambiente durante 15 min. Após a adição de 400 µL de tampão de ligação-1x aos tubos e posterior agitação com vórtex, procedeu-se à aquisição de dados no citómetro de fluxo FACSCalibur até um total de 10,000 eventos. O *software* BD CellQuest Pro foi utilizado na aquisição e análise de dados.

Para determinar a percentagem de células em apoptose inicial foi necessário determinar e definir inicialmente quatro regiões (Anexo 1) para excluir “*debris*”. A análise da marcação por Anexina V-FITC e IP 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 (R1 a R3), conforme descrito no Anexo 1, para exclusão dos “*debris*”. Em *dot plots* apresentando apenas eventos contidos nas regiões R2 e R3, a percentagem de viabilidade corresponde à percentagem de células em R2.

2.3.4 - Análise Estatística

Os valores obtidos das absorvâncias nos ensaios MTT foram analisados e calculados, em que a percentagem da proliferação celular dos compostos a diferentes concentrações foi comparada em relação ao controlo negativo, ao qual foi descontado o zero. Os gráficos finais foram expressos em valores médios±desvio padrão. Para determinar a existência de diferenças significativas entre diferentes grupos (concentrações) foi aplicado o teste *t*-student. Essa diferença foi considerada significativa quando o $p < 0,05$. Para o cálculo do IC_{50} , referentes à atividade antiproliferativa dos compostos, os valores foram obtidos a partir das curvas concentração-resposta, por cálculos de ajustamento sigmóide.

Os gráficos dos ensaios de citometria foram igualmente expressos em valores médios±desvio padrão.

Capítulo 3 - Resultados e Discussão

3.1 - Síntese Química

Os macrociclos derivados de calixarenos desenvolvidos no presente trabalho foram sintetizados com o objetivo de serem potenciais ligandos para interagir com o G-quadruplex. De acordo com a análise da literatura sobre as características dos ligandos preferenciais na interação com o G-quadruplex (Shalaby *et al.*, 2013) (Neidle, 2010), a síntese dos calixarenos foi delineada tendo em conta a inclusão de anéis aromáticos de modo a promover o empilhamento com as G-tétradas. Após a sua síntese e caracterização, pretendeu-se avaliar a possibilidade de atuarem como ligandos do G-quadruplex, por conterem locais de ligação que se auto-associam aos grupos funcionais das guanosinas e serem assim usados como “*scaffolds*” desta ligação. Adicionalmente, também se pretendeu avaliar a atividade antiproliferativa destes compostos em células cancerígenas e em células normais humanas.

Os derivados da série de *p*-tert-butilcalix[4]areno foram preparados e obtidos por métodos de síntese, realizados basicamente em dois passos principais. Em primeiro lugar, foi tosilado o composto de partida, obtendo-se o derivado representado na Figura 16. Este procedimento de síntese consistiu na síntese da ftalimida através da adição de anidrido ftálico à amina. De seguida, o grupo hidroxilo foi protegido com o cloreto de tosilo na presença do catalizador DMAP, tendo o produto tosilado **A** sido obtido com rendimento de 85%.

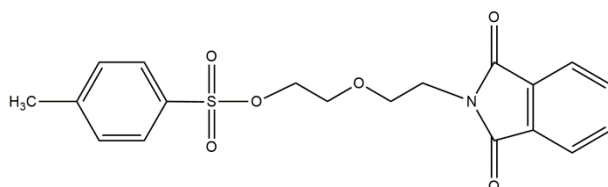


Figura 16 - Composto de partida tosilado (A).

O segundo passo de síntese conduziu à obtenção de compostos cíclicos finais, e envolveu sucessivas etapas (Figura 13). Assim, ao composto tosilado foi adicionado o *p*-tert-butilcalix[4]areno em meio básico, obtendo-se os dois intermediários Calix-NP e Calix-NP₂. De seguida, na presença de hidrazina, foi obtido o intermediário Calix-NH₂, sendo posteriormente ciclizado com diferentes cloretos de acilo (dicloreto de ácido isoftálico e dicloreto de 2,6-piridinadicarbonilo), formando-se o Calix-Benz e o Calix-Pyr, respetivamente. Esta etapa apresenta-se como uma via de síntese eficaz e simples, obtendo-se um rendimento global relativamente elevado (83/90%). Os produtos finais e intermediários obtidos nesta via sintética e que foram considerados para os estudos subseqüentes estão representados na Figura 17. Estes macrociclos obtidos contêm grupos hidroxilos com capacidade de estabilizar a cavidade superior do calixareno, devido a ligações de hidrogénio, e aos éteres formados que funcionam como estabilizadores adicionais. Os compostos sintetizados foram caracterizados

por espectrometria de massa ES-MS e espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C mono e bidimensional (2D).

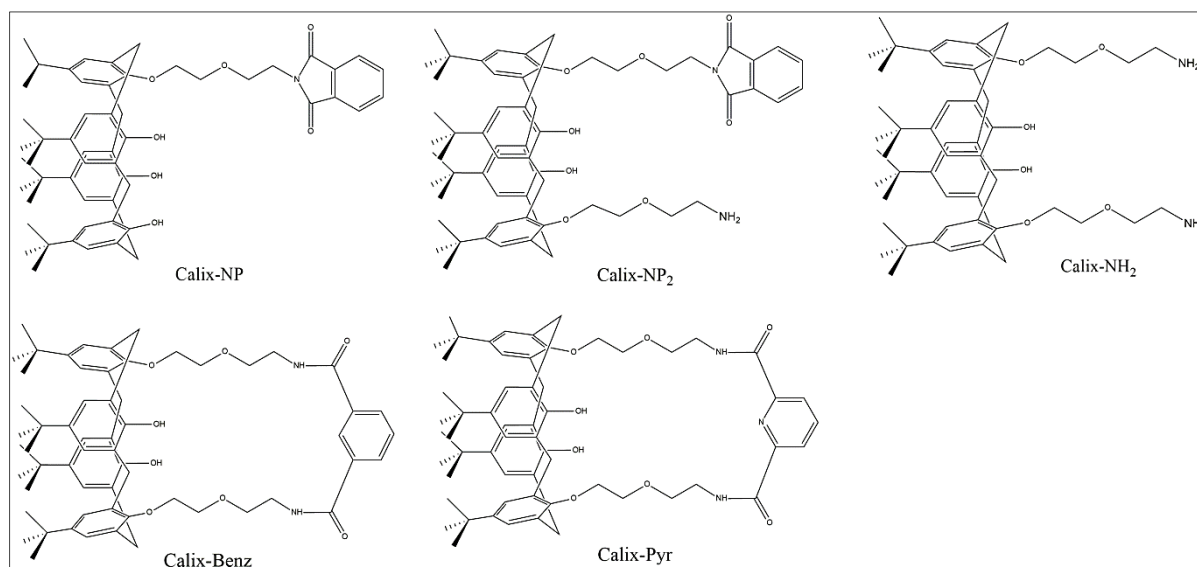


Figura 17- Compostos cíclicos sintetizados derivados de calixarenos e seus intermediários.

3.2 - Análise da interação dos ligandos com o G-quadruplex

Para a análise da interação entre estes compostos e o G-quadruplex, foram realizados estudos estruturais por espectroscopia de RMN de ^1H .

3.2.1 - Formação da estrutura G-quadruplex

Para avaliar se os derivados de calixarenos interagem com o G-quadruplex e se estabilizam esta estrutura em qualquer condição (devido ao seu estado transiente), foi necessário estudar a estabilidade da conformação do G-quadruplex utilizando-se espectroscopia de RMN de ^1H a diferentes temperaturas para o efetuar. Para isso, utilizou-se a sequência telomérica humana $[\text{d}(\text{TAGGGT})]_4$ e, após emparelhamento e formação do G-quadruplex, avaliou-se a sua desnaturação entre $T=25^\circ\text{C}$ até $T=65^\circ\text{C}$ (Figura 18).

Através da manipulação de condições, tais como, aumento da concentração de KCl em solução, temperatura e ligação dos compostos, pretendeu-se estabilizar a estrutura do G-quadruplex.

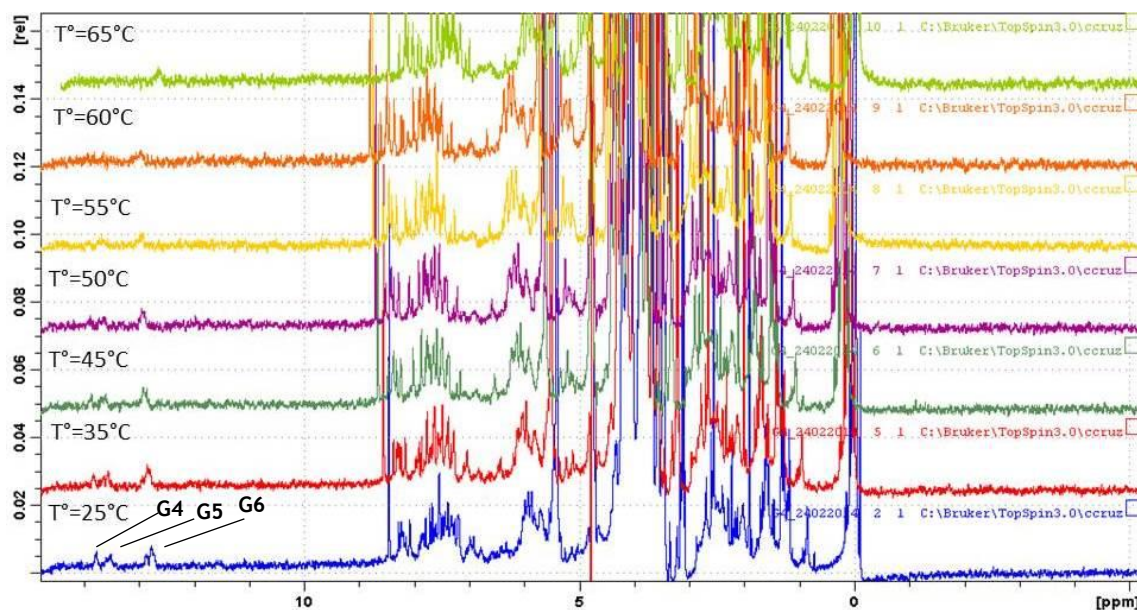


Figura 18- Espectros de RMN de ^1H do varrimento de temperaturas da sequência $[\text{d}(\text{TAGGGT})]_4$ em tampão 70 mM KCl e 10 mM KH_2PO_4 (pH=7,2).

Os dados obtidos mostram que quando $T=25^\circ\text{C}$ o espectro apresenta os sinais característicos da conformação do G-quadruplex, representado pelos prótons imino (G4, G5 e G6) em regiões de campo baixo (10-14 ppm). À medida que a temperatura aumenta, há quebra das ligações de hidrogênio, levando ao desaparecimento dos sinais dos prótons imino. Entre a temperatura

de 25°C e de 50°C, a estrutura predominante encontra-se ainda em forma de G-quadruplex, no entanto, quando se atingiu a temperatura mais alta (65°C), os sinais dos prótons imino começaram a desaparecer, indicando a desnaturação da estrutura do G-quadruplex a duplex.

3.2.2 - Interação G-quadruplex-derivados do calixareno

A interação entre o G-quadruplex e os compostos sintetizados foi estudada por titulações com RMN de ^1H . Para isso, as experiências realizaram-se adicionando os derivados de calixarenos à solução de G-quadruplex. As alterações no espectro resultantes podem ser visualizadas tendo em conta o alargamento dos sinais dos prótons, alteração ou desvio do sinal, que pode ser influenciado pela quantidade e tipo de ligando adicionado. Estas variações determinam a localização dos grupos funcionais do ligando e do G-quadruplex envolvidos na interação.

Os compostos obtidos na síntese química (Calix-Benz, Calix-Pyr, Calix-NH₂, Calix-NP e Calix-NP₂) foram, assim, adicionados ao G-quadruplex [d(TAGGGT)]₄ nas proporções de (1:1) e (2:1) composto:G-quadruplex em tampão fosfato com KCl. Contudo, após a adição dos ligandos verificou-se a precipitação imediata do G-quadruplex o que impossibilitou a continuação do estudo por espectroscopia de RMN.

A sequência do G-quadruplex necessita de estar dissolvida em tampão aquoso com KCl, de forma a permanecer nesta conformação. Contudo, os compostos provaram ser insolúveis em solução aquosa a concentrações da ordem de mM (concentração necessária para RMN), o que impossibilitou a análise pretendida. Várias otimizações foram realizadas para contornar este problema, desde alterações no pH da solução dos ligandos, à adição de DMSO à mistura. No entanto, verificou-se que com uma % de DMSO acima de 20% também destabiliza a estrutura do G-quadruplex. Presentemente, estão a ser realizados estudos para desenvolver estratégias alternativas para fazer esta análise de interação dos compostos com G-quadruplex.

3.3 - Avaliação Biológica

3.3.1- Análise da citotoxicidade dos compostos em células MCF-7, LNCaP e NHDF

A avaliação do efeito dos compostos sintetizados Calix-Benz, Calix-Pyr, Calix-NH₂, Calix-NP e Calix-NP₂ na proliferação de células de cancro da mama humana (MCF-7), da próstata humana (LNCaP) e em células normais de fibroblastos da derme humana (NHDF) foi realizada através do ensaio MTT. Inicialmente, com o objetivo de concluir genericamente acerca da citotoxicidade de todos os compostos nas diferentes linhas celulares, estas foram incubadas na presença dos compostos em concentrações de 30 µM durante 48 horas e, posteriormente, foi quantificada a absorvância a 570nm dos cristais de formazano formados no ensaio MTT. O tempo de exposição das células tratadas com os compostos foi de 48 h para todas as experiências, devido ao facto do ciclo celular nestas células ser superior a 24 h e inferior a 48 h. Deste modo torna-se possível analisar o efeito biológico dos compostos num ciclo celular completo.

Os resultados obtidos neste estudo inicial estão representados na Tabela 2.

Tabela 2- Médias das percentagens da proliferação celular em relação ao controlo nas diferentes linhas celulares, após tratamento com todos os compostos estudados em concentração de 30 µM, durante 48 h realizados pelo ensaio MTT.

% Proliferação celular relativa	MCF-7	LNCaP	NHDF
Calix-Benz	105,53	125,29	103,44
Calix-Pyr	104,96	88,60	104,79
Calix-NH ₂	<u>-0,26</u>	<u>0,99</u>	<u>8,49</u>
Calix-NP	98,83	79,38	102,52
Calix-NP ₂	93,39	<u>66,06</u>	85,36

Pela análise da Tabela 2, o composto que se destacou, apresentando valores significativos de inibição da proliferação celular em células MCF-7, LNCaP e em NHDF, foi o Calix-NH₂, exibindo efeitos citotóxicos elevados nestas condições. Em células LNCaP, o Calix-NP₂ também revelou levar a alguma diminuição relevante da proliferação celular, inibindo cerca de 34 % da viabilidade celular.

Relativamente às células NHDF, o efeito dos compostos na proliferação celular foi estudado de modo a poder-se ter alguma informação sobre a seletividade dos compostos para células tumorais em relação a células normais. O resultado deste ensaio revela que o composto Calix-NH₂ foi o único que exibiu efeitos citotóxicos marcados na viabilidade das células normais da

derme humana, diferenciando-se, contudo, das células cancerígenas levando a uma inibição menos marcada da proliferação celular.

Após análise destes resultados, os compostos com atividades antiproliferativas nas diferentes linhas celulares, foram sujeitos a experiências para determinação de curvas dose-resposta com o objetivo de se estabelecer relações dos efeitos do composto com as concentrações testadas. Neste âmbito, determinar a concentração do composto que permite inibir 50% a proliferação celular em relação à ausência do mesmo (IC_{50}), torna-se importante na concepção e desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos.

Os macrociclos (Calix-Benz e Calix-Pyr) também foram avaliados da mesma forma, apesar de não exibirem resultados citotóxicos, uma vez que se tratam de compostos objeto de estudo na interação com o G-quadruplex. O intermediário Calix-NP₂ apresentou alguns efeitos tóxicos principalmente em células LNCaP, e também foi sujeito a estudos dose-resposta.

3.3.2- Comparação da citotoxicidade dos compostos avaliados nas diferentes linhas celulares

No seguimento do estudo, a avaliação biológica dos compostos Calix-Benz, Calix-Pyr, Calix-NH₂ e Calix-NP₂ foi realizada com a incubação das células MCF-7, LNCaP e NHDF com estes compostos num intervalo de concentrações entre 0,01 μ M e 100 μ M, durante 48 h. Após este tempo de exposição, os compostos foram submetidos ao ensaio MTT e quantificou-se a absorvância a 570 nm devido à presença de formazano. Os resultados dos ensaios sobre o efeito dos compostos avaliados nas linhas celulares estão representados nas Figuras 19 a 31.

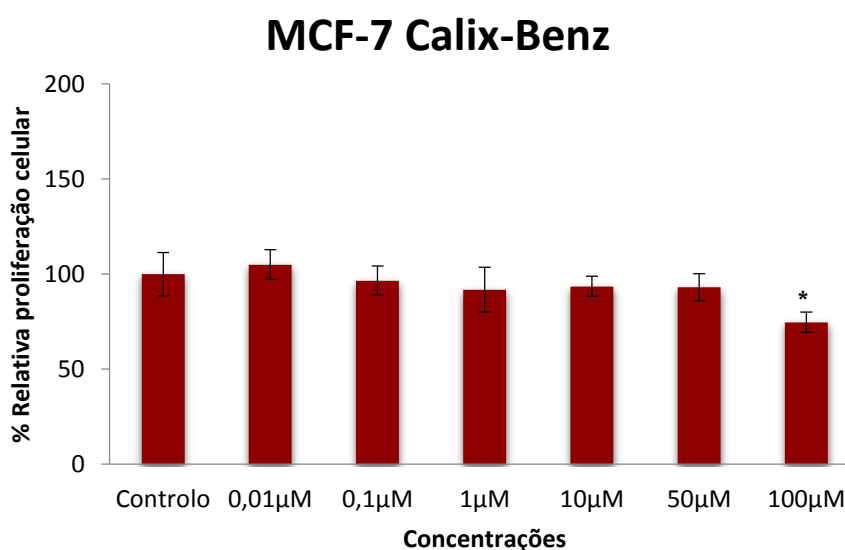


Figura 19- Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7 após o tratamento com o composto Calix-Benz, estudado em concentrações entre 0,01 μ M e 100 μ M, durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo,

as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respectivo controle (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL).

Como descrito anteriormente pelo ensaio de viabilidade celular efetuado a $30 \mu\text{M}$ dos compostos, o macrociclo Calix-Benz não apresentou efeitos antiproliferativos relevantes para células MCF-7 (Tabela 2). Pela análise da Figura 19, após o tratamento com este composto numa gama de diferentes concentrações, observou-se novamente que não houve efeitos citotóxicos marcados nas células cancerígenas da mama, para todas as doses testadas, excepto a $100 \mu\text{M}$, embora ainda se observe uma proliferação de células muito superior a 50%.

LNCaP Calix-Benz

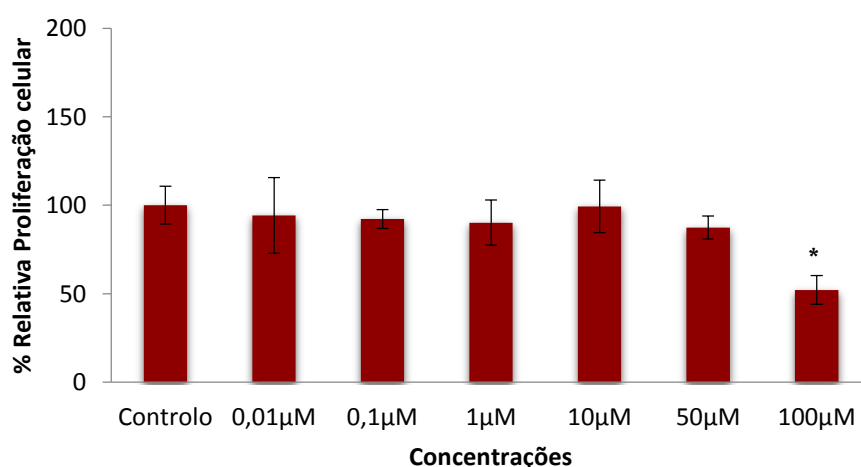


Figura 20- Gráfico da proliferação celular relativa em células LNCaP, após o tratamento com o composto Calix-Benz, estudado em concentrações entre $0,01 \mu\text{M}$ e $100 \mu\text{M}$, durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respectivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL).

Pela observação da Figura 20, mostrando o estudo dos efeitos do Calix-Benz em várias concentrações em células LNCaP, verifica-se que não houve diminuição significativa da proliferação celular, como comprovado no estudo anteriormente. Para a concentração mais elevada ($100 \mu\text{M}$) nota-se uma certa diminuição da viabilidade celular em relação ao controlo, mas ainda há uma proliferação de células superior a 50%.

Calix-Benz

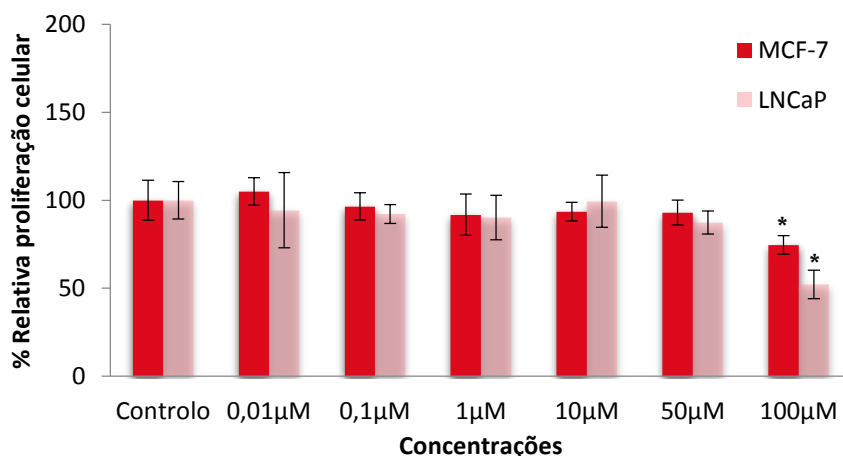


Figura 21- Gráfico da proliferação celular relativa das linhas celulares LNCaP e MCF-7 após o tratamento com o composto Calix-Benz, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração = 2×10^4 células/mL).

Na avaliação biológica geral do macrociclo Calix-Benz, verifica-se que este composto não exhibe efeitos antiproliferativos marcados, como demonstrado anteriormente (3.3.1). Adicionalmente, para todas as concentrações testadas, observam-se percentagens de proliferação celular aproximadas entre as duas linhas celulares, MCF-7 e LNCaP (Figura 21).

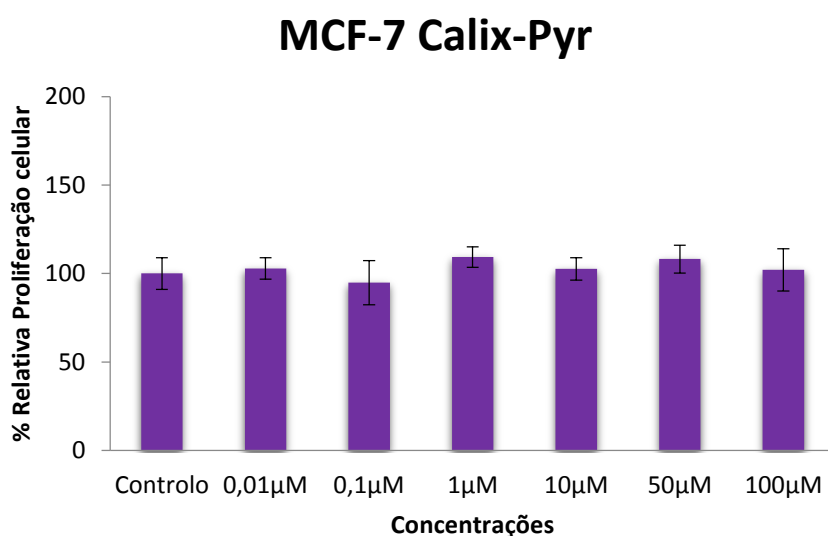


Figura 22- Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7, após o tratamento com o composto Calix-Pyr, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração = 2×10^4 células/mL).

O segundo macrociclo, Calix-Pyr, também avaliado no estudo dose-resposta, foi igualmente testado em várias concentrações. Pela análise da Figura 22, observa-se que o Calix-Pyr não demonstrou ter efeitos antiproliferativos em células MCF-7 em todas as concentrações avaliadas, como esperado após o ensaio do macrociclo a 30 μM (Tabela 2).

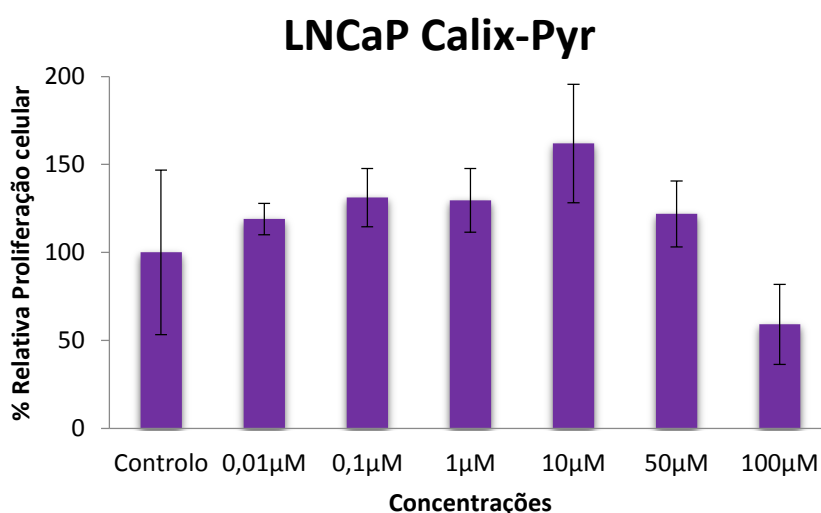


Figura 23- Gráfico da proliferação celular relativa em células LNCaP, após o tratamento com o composto Calix-Pyr, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controle, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL).

Após a incubação das células LNCaP com o macrociclo Calix-Pyr a várias concentrações, observou-se que também não houve inibição da proliferação celular (Figura 23). O elevado desvio padrão observado deveu-se à dificuldade no passo de aspiração dos cristais de formazano, pois as células não estavam completamente aderentes.

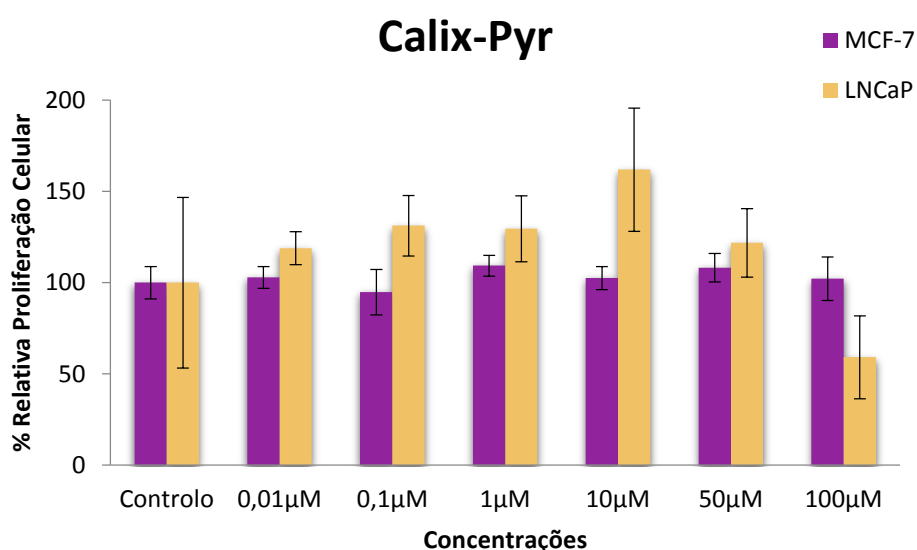


Figura 24- Gráfico da proliferação celular relativa das linhas celulares LNCaP e MCF-7 após o tratamento com o composto Calix-Pyr, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controle, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL).

Após o ensaio dose-resposta em células MCF-7 e LNCaP (Figura 24) constatou-se que o macrociclo Calix-Pyr não apresentou efeitos citotóxicos para estas linhas celulares cancerígenas, complementando o estudo anterior realizado a 30 μM (Tabela 2).

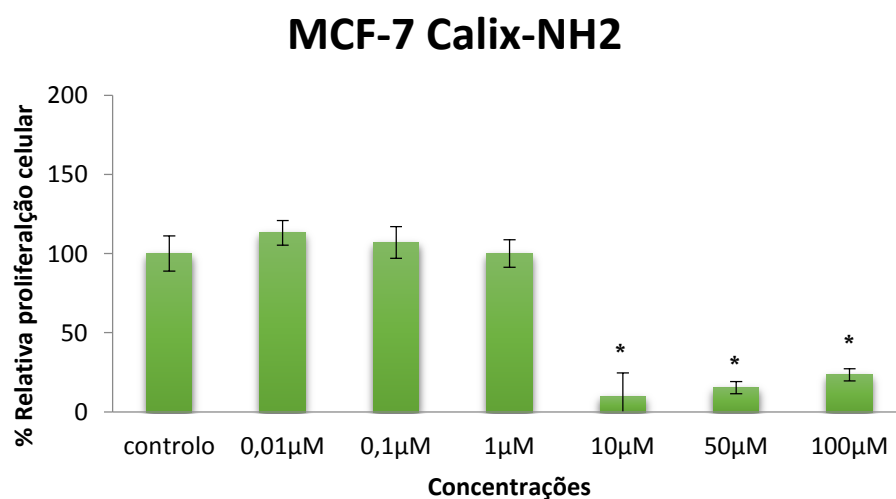


Figura 25- Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7 após o tratamento com o composto Calix-NH₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM, durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controle, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p<0,05 versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com n=5 (concentração=2x10⁴ células/mL).

Pela análise da Figura 25, verifica-se que o composto Calix-NH₂ demonstrou ter efeitos antiproliferativos marcados em células MCF-7 em várias concentrações testadas. Este resultado é evidente em concentrações de composto a partir de 10 μM, ocorrendo uma diminuição muito significativa da proliferação celular em relação ao controle.

LNCaP Calix-NH₂

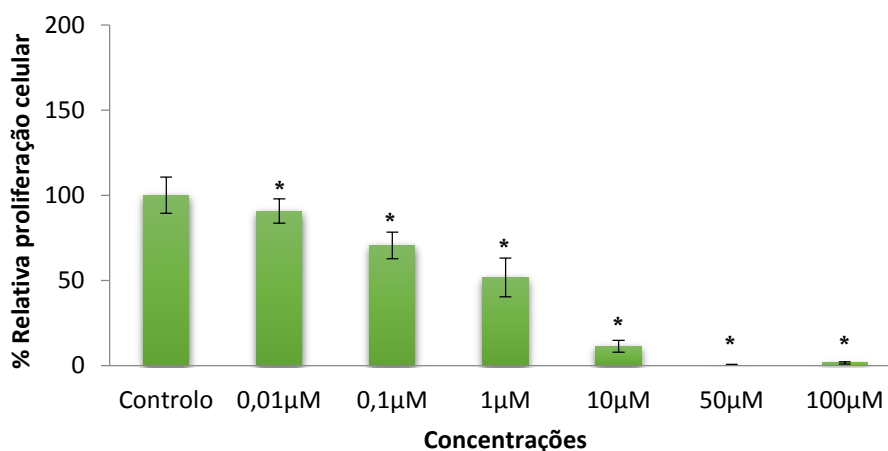


Figura 26- Gráfico da proliferação celular relativa em células LNCaP após o tratamento com o composto Calix-NH₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM, durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controle, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p<0,05 versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com n=5 (concentração=2x10⁴ células/mL).

O efeito do composto Calix-NH₂ na proliferação celular de células LNCaP está representado na Figura 26. Este gráfico mostra igualmente um efeito citotóxico marcante deste composto nesta linha celular cancerígena, ocorrendo uma inibição gradual da proliferação celular à medida que se aumenta a concentração do Calix-NH₂, proporcionando consideráveis níveis de citotoxicidade.

NHDF Calix-NH₂

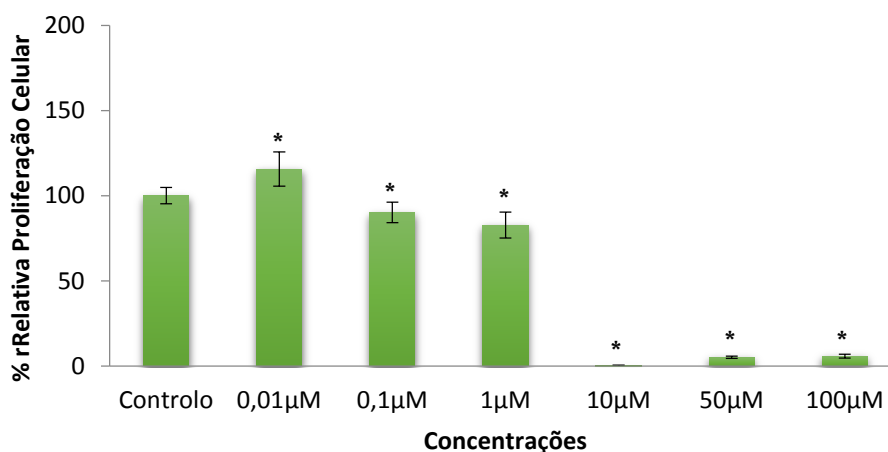


Figura 27- Gráfico da proliferação celular relativa em células NHDF após o tratamento com o composto Calix-NH₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM, durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controle, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p<0,05 versus respetivo controle (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com n=5 (concentração=2x10⁴ células/mL).

Na Figura 27, mostram-se os resultados da avaliação dos efeitos do composto Calix-NH₂ na proliferação das células normais (NHDF), pois foi o único composto que demonstrou ter ação antiproliferativa nestas células. Neste estudo constou-se existirem também valores de proliferação celular baixos para as concentrações mais elevadas, comprovando-se a baixa seletividade do composto para estas células saudáveis, nestas condições experimentais.

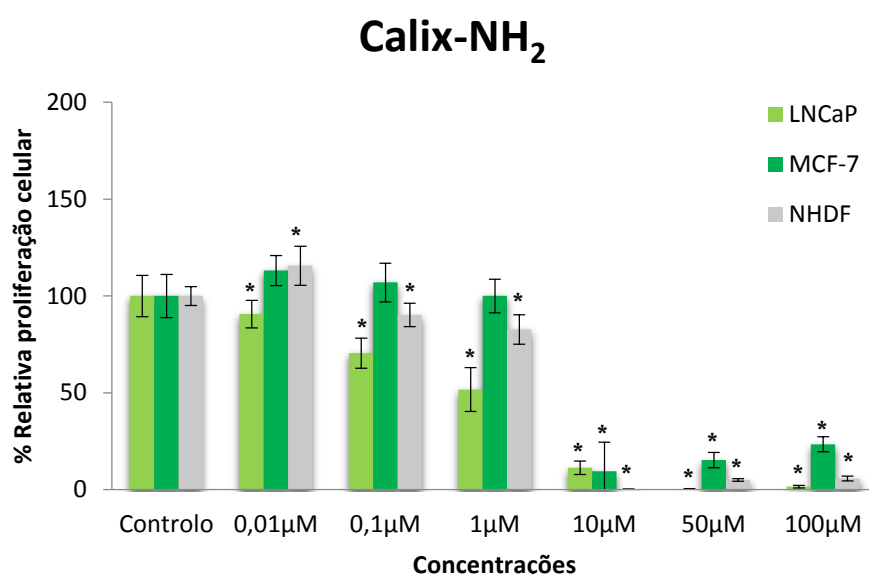


Figura 28- Gráfico da proliferação celular relativa das linhas celulares LNCaP, MCF-7 e NHDF após o tratamento com o composto Calix-NH₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM, durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controle, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p<0,05 versus respetivo controle (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com n=5 (concentração =2x10⁴ células/mL).

Como observado anteriormente, o composto derivado de calixareno - Calix-NH₂, foi o que revelou ter maior atividade antiproliferativa (Tabela 2). Pela análise do gráfico da Figura 28, verifica-se que o composto parece ter maior toxicidade em células LNCaP relativamente às MCF-7 e NHDF. Esta diferença é mais notória para baixas concentrações do mesmo (0,01 μM a 1 μM), pois para as concentrações mais elevadas (10 μM, 50 μM e 100 μM) o composto tem um efeito citotóxico maior, mas praticamente semelhante para as três linhas celulares. O valor do IC₅₀ foi calculado para este composto nos diferentes tipos de células (Tabela 3) e, mais uma vez, pode-se comprovar que o valor mais baixo ocorreu em células LNCaP (IC₅₀= 1,474 μM). Além disso, este valor foi até inferior ao valor de IC₅₀ obtido para as células NHDF, evidenciando o efeito citotóxico deste composto nesta linha celular cancerígena.

Tabela 3- Valores de IC₅₀ do composto Calix-NH₂ em linhas de células MCF-7, LNCaP e NHDF.

Composto	Linha celular	IC ₅₀	R ²
Calix-NH ₂	MCF-7	2,432	0,906
Calix-NH ₂	LNCaP	1,474	0,950
Calix-NH ₂	NHDF	2,001	0,940

No geral, os valores de IC₅₀ calculados para o Calix-NH₂ são já bastante baixos, comprovando a eficácia relevante deste composto na inibição da proliferação de células cancerígenas. Falta, contudo, uma comparação com fármacos de referência usados para tratar estes tipos de tumores, o que será um ponto a estudar futuramente.

MCF-7 Calix-NP2

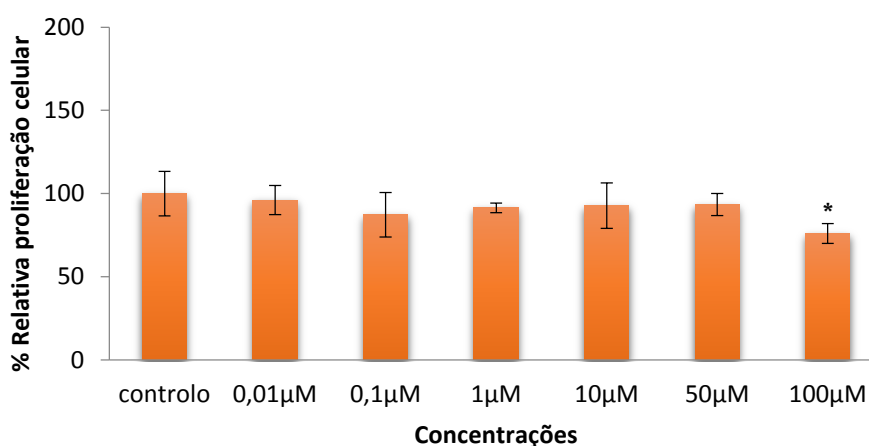


Figura 29- Gráfico da proliferação celular relativa em células MCF-7, após o tratamento com o composto Calix-NP₂, estudado em concentrações entre 0,01 µM e 100 µM, durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controle, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. *p<0,05 versus respectivo controle (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com n=5 (concentração=2x10⁴ células/mL).

Os efeitos do composto Calix-NP₂ foram também estudados em células MCF-7 em várias concentrações e os resultados são apresentados na Figura 29. Os resultados observados evidenciam que o composto atuou de forma semelhante em todas as concentrações, não exibindo atividades antiproliferativas na linha celular MCF-7.

LNCaP Calix-NP2

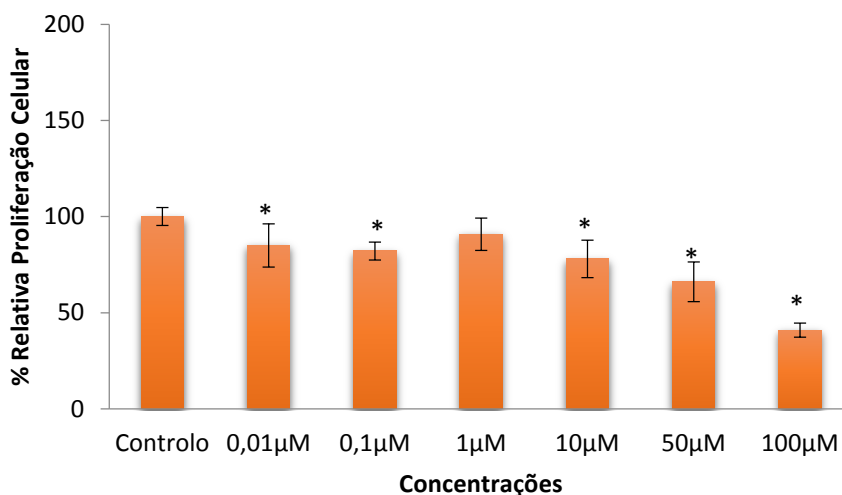


Figura 30- Gráfico da proliferação celular relativa em células LNCaP, após o tratamento com o composto Calix-NP₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL).

Pela observação da figura 30, verifica-se que o composto Calix-NP₂ não originou efeitos relevantes na viabilidade de células LNCaP entre as concentrações de 0,01 μM a 50 μM , apesar de haver alguma redução da viabilidade celular relativa. Na concentração mais elevada (100 μM), o composto inibiu, contudo, a proliferação celular cerca de 55%, evidenciando um efeito citotóxico mais marcado para esta concentração.

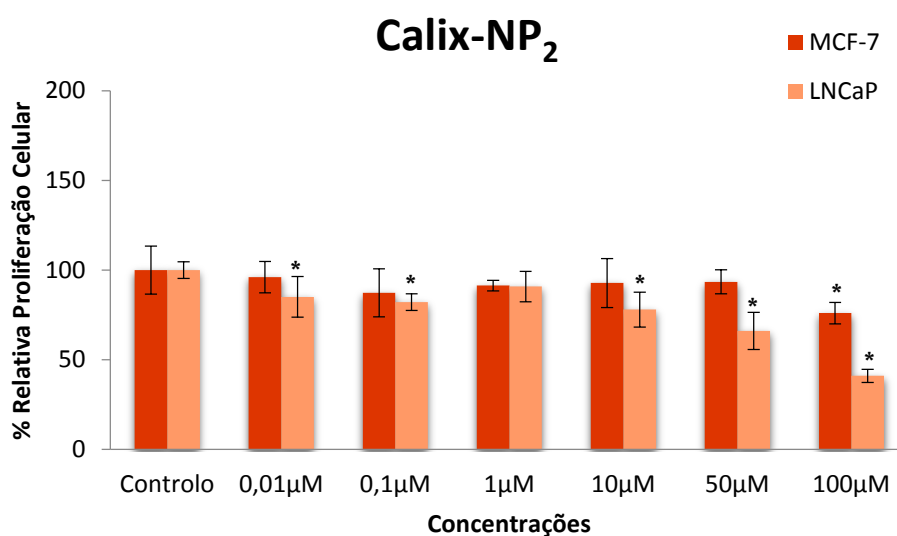


Figura 31- Gráfico da proliferação celular relativa das linhas celulares LNCaP e MCF-7 após o tratamento com o composto Calix-NP₂, estudado em concentrações entre 0,01 μM e 100 μM , durante 48 h, realizados pelo ensaio MTT (570 nm). Os dados das percentagens de proliferação celular são expressos em relação ao controlo, as barras são representadas como médias e as linhas o desvio padrão. * $p < 0,05$ versus respetivo controlo (teste *t-student*). Ensaio de uma experiência com $n=5$ (concentração= 2×10^4 células/mL).

A avaliação biológica da atividade antiproliferativa do composto Calix-NP₂ nas duas linhas celulares cancerígenas MCF-7 e LNCaP está representada na Figura 31. Estes resultados indicam que o composto não apresenta efeitos citotóxicos significativos, e que a concentração que teve maior efeito na viabilidade celular foi a de 100 μM para as células LNCaP. Pelo estudo anterior realizado (30 μM) (Tabela 2), o composto Calix-NP₂ também demonstrou inibição da proliferação celular apenas na linha celular LNCaP, pelo que estes resultados acabam por ser concordantes com os apresentados na Figura 31.

3.3.3- Microscopia de Fluorescência

O estudo para verificar se ocorria entrada dos compostos no interior das células e, em caso positivo, qual sua localização subcelular, foi efetuado por microscopia de fluorescência. O ensaio foi analisado em células MFC-7 e LNCaP expostas aos compostos Calix-Benz, Calix-Pyr e Calix-NH₂ à concentração de 30 µM. O tempo de incubação dos compostos para estudar a capacidade de entrarem na célula variou entre 4 h e 12 h, sendo posteriormente as células observadas ao microscópio em caixas de cultura.

As imagens das células tratadas com os compostos após 4 h e 12 h estão representadas nas Figuras 32, 33 e 34.

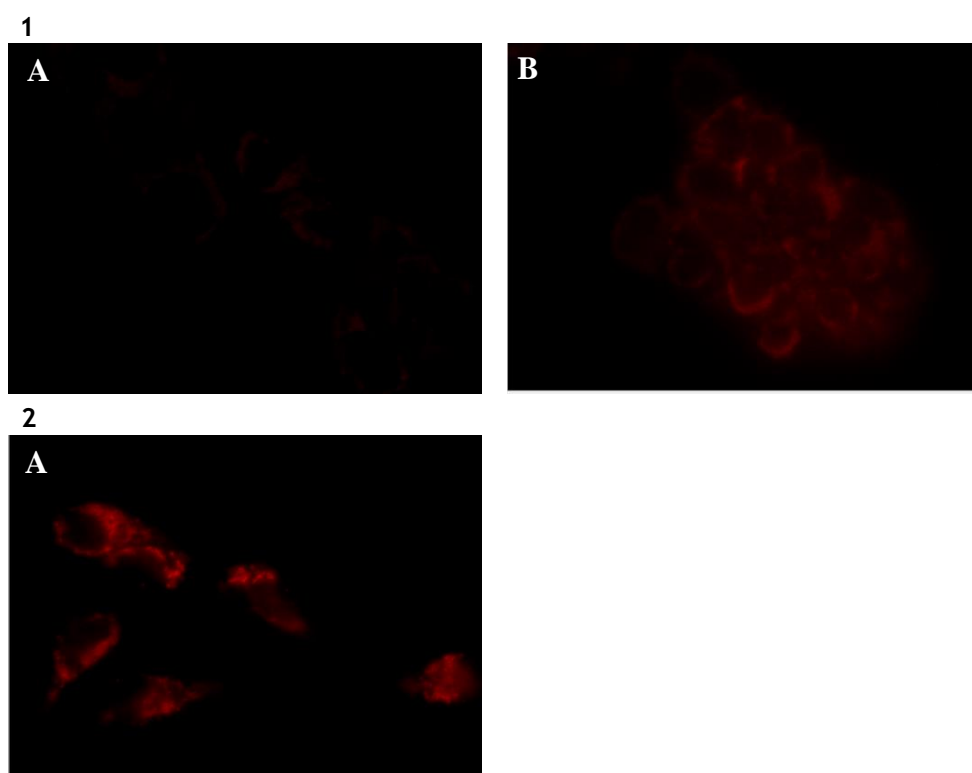


Figura 32- Imagens obtidas do microscópio de fluorescência em (1) células MCF-7 e (2) células LNCaP, expostas ao composto Calix-Benz a 30 µM durante (A) 4 horas e (B) 12 horas. (3×10^4 células/mL).

Com base nos resultados apresentados na Figura 32, observa-se que em ambas as células cancerígenas, o composto Calix-Benz atravessa a membrana celular. Na linha celular MCF-7 para o tempo de incubação do macrociclo de 4 horas, a fluorescência obtida é inferior à observada após 12 horas de incubação. Para as células LNCaP, o composto demonstrou fluorescência significativa após apenas 4 horas de incubação.

Como medida de controle, as células não incubadas com compostos foram também analisadas e não apresentaram fluorescência em ambas as linhas celulares.

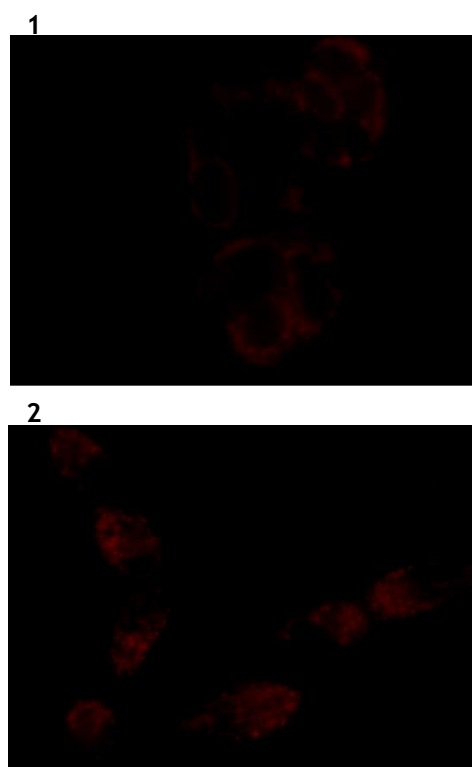


Figura 33- Imagens obtidas do microscópio de fluorescência em (1) células MCF-7 e (2) células LNCaP, expostas ao composto Calix-Pyr a 30 μM durante 4 horas. (3×10^4 células/mL).

Pela análise da Figura 33, o macrociclo Calix-Pyr também mostrou apresentar fluorescência em ambas as células, MCF-7 e LNCaP após um tempo de incubação de 4 horas.

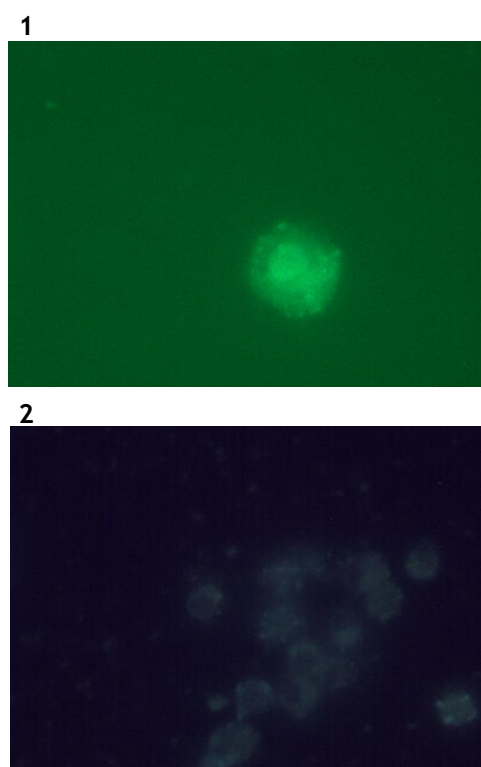


Figura 34- Imagens obtidas do microscópio de fluorescência em (1) células MCF-7 e (2) células LNCaP, expostas ao composto Calix-NH₂ a 30 μM durante 12 horas. (3×10^4 células/mL).

De acordo com a Figura 34, observa-se não existir fluorescência nas células MCF-7 e LNCaP após 4 horas de incubação com 30 μM do composto Calix-NH₂. Este resultado pode ser explicado pela indução de morte celular provocada por este composto, anteriormente analisada nos ensaios MTT, não se podendo concluir que este composto não tenha fluorescência. Por outro lado, relativamente aos macrociclos (Calix-Benz e Calix-Pyr), estes não revelaram sinais de citotoxicidade nos ensaios de MTT.

Após comprovar que os compostos entram nas células, de modo a identificar a sua localização celular preferencial, experiências de co-localização foram igualmente realizadas, utilizando o microscópio confocal. Nesta análise foram utilizadas sondas fluorescentes comerciais que marcam especificamente organelos celulares, de modo a localizar os compostos no interior da célula. As imagens adquiridas no microscópio confocal foram analisadas em filtros de canais vermelhos (fluorescência dos compostos em estudo), em filtros azuis (para a sonda do núcleo-Hoechst 33342) e em filtros verdes (para sondas da mitocôndria-MitoTracker Green™ e do retículo endoplasmático-ER-Tracker™ Green). As imagens de co-localização do composto Calix-Benz em células LNCaP estão representadas nas Figuras 35, 36 e 37.

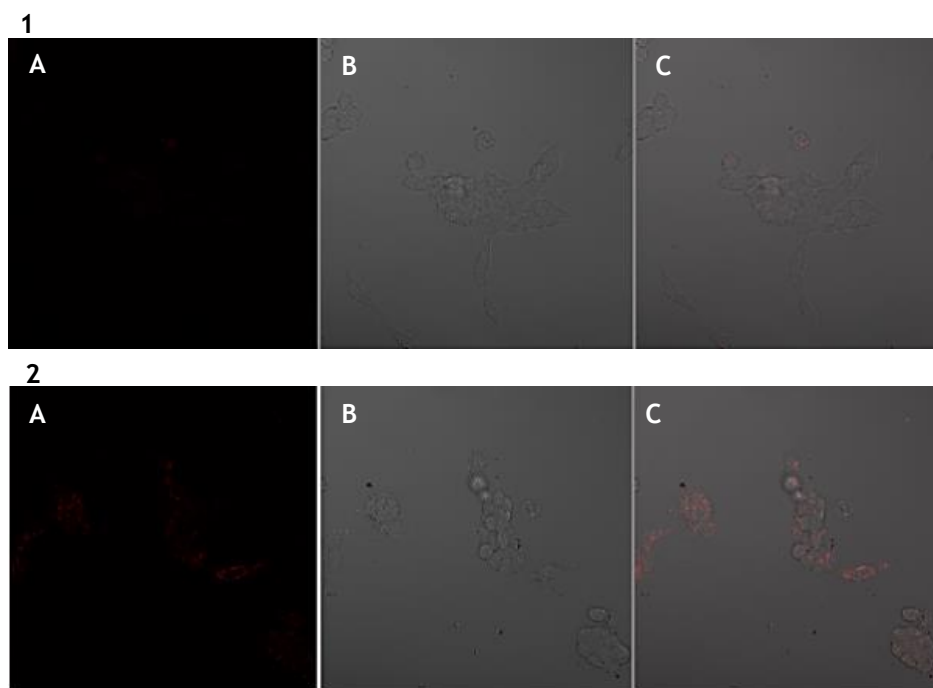


Figura 35 - Imagens de fluorescência obtidas no microscópio confocal do controlo (1) e do composto Calix-Benz a 50 μM durante 4 h de incubação (2), em células LNCaP (3×10^4 células/mL). (A)= canais vermelhos; (B)=zona do visível e (C)=sobreposição de A e B.

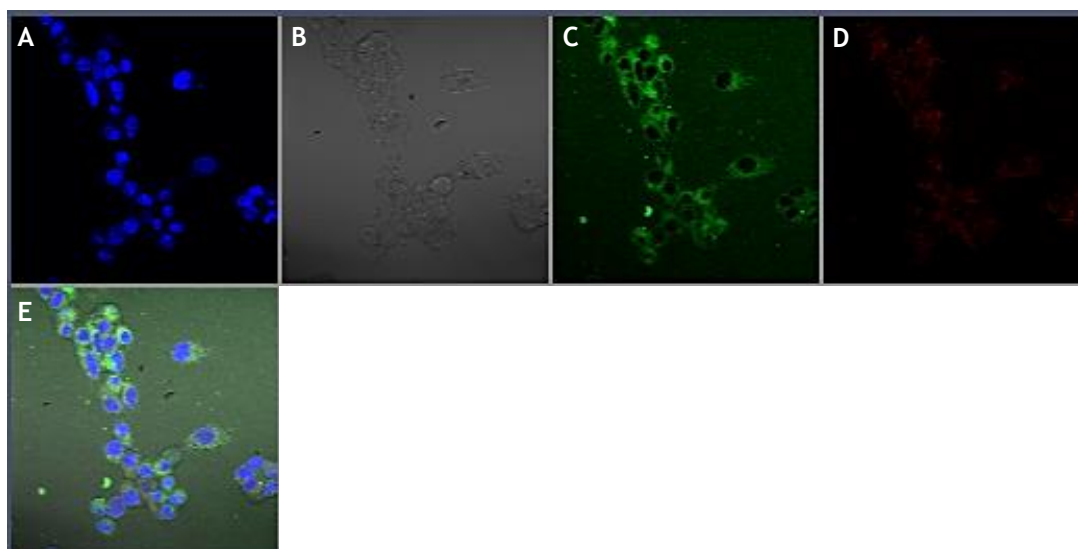


Figura 36 - Imagens de fluorescência obtidas no microscópio confocal sobre a distribuição do Calix-Benz a 50 μM durante 4 h de incubação em células LNCaP em marcadores fluorescentes. Incubação com o ER-Tracker™ Green (1 μM) e Hoechst 33342 (5 μM) durante 30 min. (A)= canais azuis; (B)=zona do visível; (C)= canais verdes; (D)= canais vermelhos e (E)= sobreposição de todos os canais anteriores.

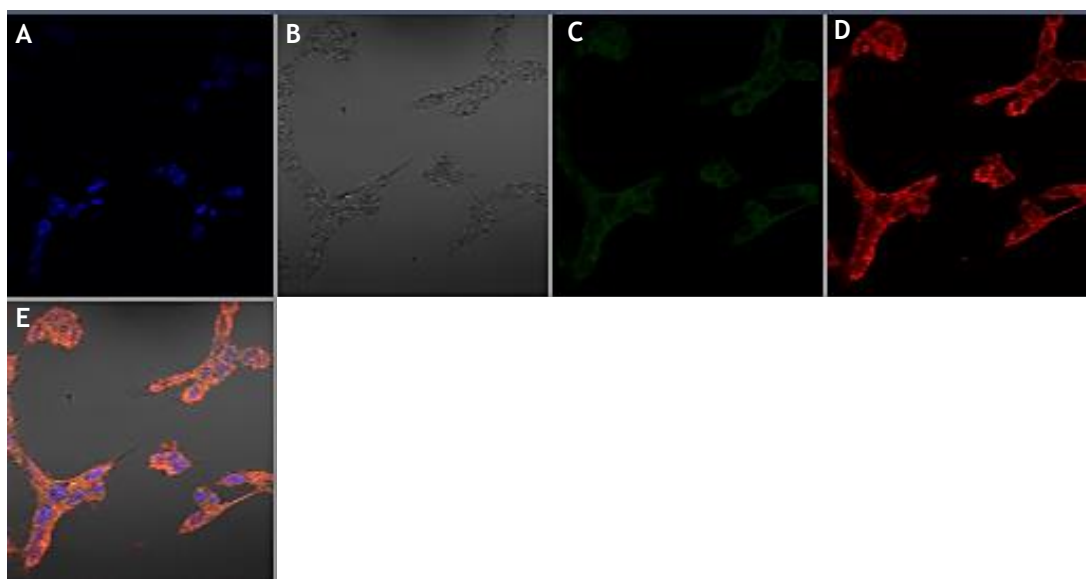


Figura 37 - Imagens de fluorescência obtidas no microscópio confocal sobre a distribuição do Calix-Benz a 50 μM durante 4 h de incubação em células LNCaP em marcadores fluorescentes. (1) Incubação com o MitoTracker Green™ (1 μM) e Hoechst 33342 (5 μM) durante 30 min. (A)= canais azuis; (B)=zona do visível; (C)= canais verdes; (D)= canais vermelhos e (E)= sobreposição de todos os canais anteriores.

Neste estudo, foram ainda obtidas inicialmente as imagens do controlo (sem composto), comprovando-se a ausência de fluorescência e as imagens com o Calix-Benz (Figura 35), confirmando a fluorescência vermelha do macrociclo.

Como conclusão geral, verificou-se a ausência de fluorescência do Calix-Benz no núcleo, mas os estudos com marcações da mitocôndria e retículo endoplasmático também não foram ainda conclusivos (Figuras 36 e 37).

3.3.4- Citometria de fluxo

A fim de avaliar a possível morte celular por apoptose e viabilidade das células MCF-7 expostas ao tratamento com o composto Calix-NH₂ (composto que exibiu atividade antiproliferativa), recorreu-se à técnica de citometria de fluxo, após marcação por Anexina V-FITC e iodeto de propídio (IP).

A citometria de fluxo permite discriminar, célula a célula, subpopulações celulares com base no seu estado fisiológico ou metabólico. A diferenciação das subpopulações existentes numa determinada população de células tem por base a utilização de sondas fluorescentes que vão marcar as células de acordo com as suas funcionalidades. Para a análise da distribuição das células em apoptose foram definidas regiões (quadrantes), correspondendo a células viáveis (marcação duplamente negativa), células mortas (positivas para Anexina V-FITC e IP) e células em início de apoptose (positivas para Anexina V-FITC, negativas para o IP). A apoptose é caracterizada por alterações morfológicas, incluindo a perda da assimetria da distribuição de fosfolípidos da membrana, condensação citoplasmática, formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA. A perda da assimetria é caracterizada pela exposição da fosfatidilserina (reconhecida pela Anexina-V), que passa da camada interna da membrana celular para a camada externa, tornando-se disponível para a sua ligação com a Anexina-V. Este marcador requer frequentemente a combinação com outros corantes, como o IP, que é uma molécula que penetra nas células e intercala o DNA apenas quando a membrana se encontra permeável, após a morte das células, traduzindo-se num marcador de exclusão de viabilidade celular. Deste modo, é possível distinguir células em apoptose inicial de células em apoptose tardia/necróticas.

3.3.4.1- Marcação por Anexina V-FITC (apoptose inicial)

Os resultados obtidos por citometria dos compostos por marcação pela Anexina V-FITC, estão representados na Figura 38 e na Tabela 4. Na Figura 38 apresentam-se *dot plots* representativos da distribuição da população de células controlo (não tratadas - Figura 38, A), após a adição do composto Calix-NH₂ com concentrações de 5 µM e 10 µM (Figura 38, B e C, respetivamente) e dos compostos diosgenina e tamoxifeno (Figura 38, D e E, respetivamente), ambos com concentração de 20 µM, após um período de 24 h de exposição.

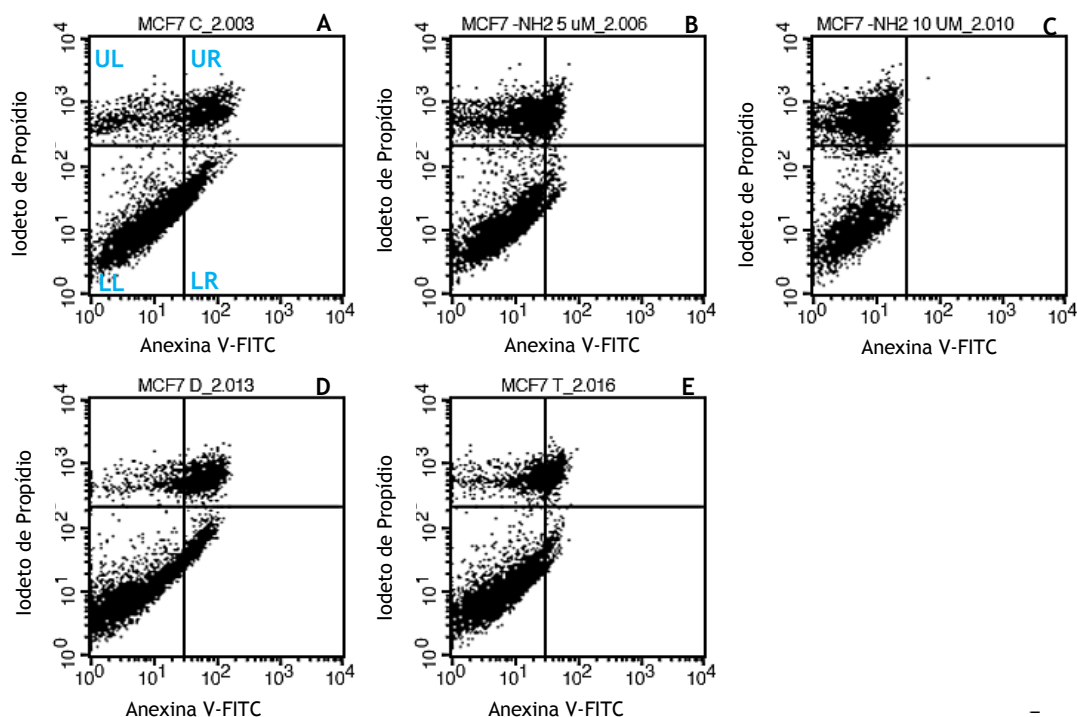


Figura 38 - “Dot plots” da análise da fluorescência da Anexina V-FITC e do Iodeto de Propídio em combinação um com o outro em células MCF-7 tratadas com o composto Calix-NH₂ (B e C), Diosgenina (D) e Tamoxifeno (E) durante 24 h, por citometria de fluxo. (UL=Células positivas para IP-mortas/indefenido; UR= Células positivas para Anexina V-FITC e IP- mortas; LL= Células viáveis; LR= Células positivas para Anexina V-FITC e negativas para IP - em apoptose inicial).

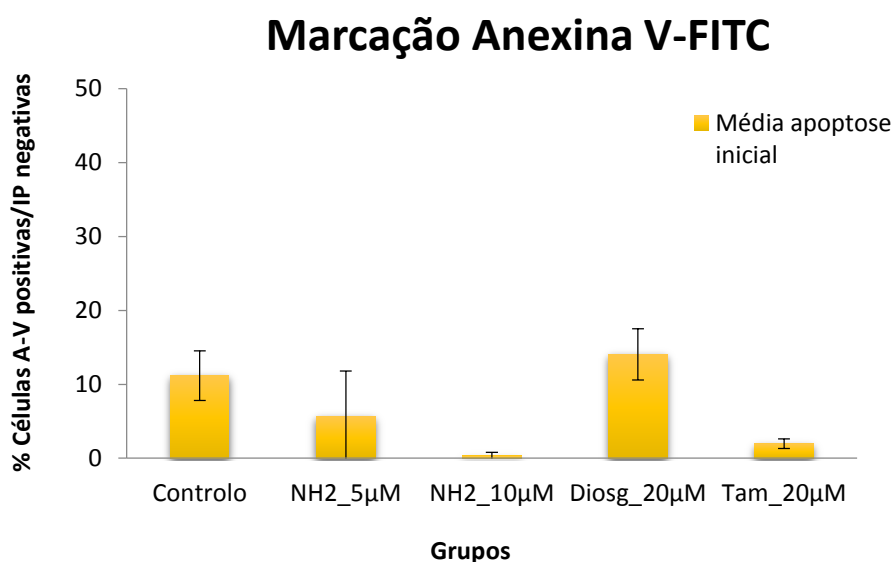
Tabela 4- Distribuição percentual dos eventos por quadrantes nos dot plots da Figura 38. (UL=Células positivas para IP- mortas/indefenido; UR= Células positivas para Anexina V-FITC e IP- mortas; LL= Células viáveis; LR= Células positivas para Anexina V-FITC e negativas para IP - em apoptose inicial).

Dot plots	Grupo	% UL	% UR	% LL	% LR	Eventos
A	Controlo	8,37	15,95	65,4	<u>10,28</u>	9341
B	Calix-NH ₂ [5 μM]	33,16	11,75	51,95	<u>3,15</u>	8582
C	Calix-NH ₂ [10 μM]	58,54	0,03	41,43	<u>0</u>	7777
D	Diosgenina [20 μM]	5,33	25,9	54,44	<u>14,33</u>	9225
E	Tamoxifeno [20 μM]	16,82	17,9	63	<u>2,28</u>	9084

Comparativamente ao controlo (ausência de qualquer tratamento), observou-se que o número de células positivas para a marcação por Anexina V-FITC nas células tratadas com diosgenina, aumentou ligeiramente (de 11,18 % para 14,05 %, Figura 39). Contrariamente, nas células tratadas com tamoxifeno a percentagem de células no quadrante LR (apoptose inicial) diminuiu (de 11,18 % para 1,97 %). Após o tratamento das células com o composto Calix-NH₂, observa-se uma diminuição gradual de células viáveis (LL) em concentrações de 5 μM e 10 μM, respetivamente. Contudo, e de forma semelhante ao observado nas células tratadas com

tamoxifeno, registou-se ausência de marcação por Anexina V-FITC (% mais baixas) (Figura 39), sugerindo que estes compostos não sofrem morte celular por apoptose.

No tratamento com o composto em estudo (Calix-NH₂), foi difícil de caracterizar o tipo de morte celular com a Anexina V-FITC, pois surgiram apenas células em estado viáveis e células mortas/indefenidas (positivas para o IP), sem qualquer marcação apenas por Anexina V-FITC, o que é atípico, embora tenha sido semelhante ao observado nas células tratadas com tamoxifeno. Além disto, observou-se uma grande variabilidade entre as repetições de cada grupo, como comprova o valor do desvio padrão apresentado. Estas observações podem, em parte, dever-se ao facto de se tratar de uma linha de células aderente, que impõe o uso de tripsina, que se sabe poder interferir com o ensaio. De facto, este método é mais adequado ao estudo da apoptose em células em suspensão, como linfócitos (Normanton *et al.*, 2014). Posto isto, seria pertinente realizar mais ensaios e tentar estudar a morte por apoptose deste composto através de outro método (como por exemplo pela deteção da caspase 3 ativada) (Mohankumar *et al.*, 2014).



Figuras 39 - Análise da apoptose inicial em células MCF-7 tratadas com o composto Calix-NH₂ (NH₂), diosgenina (Diosg) e tamoxifeno (Tam) durante 24 h.

3.3.4.2- Marcação por Iodeto de Propídio (IP) (viabilidade celular)

A avaliação do efeito do composto Calix-NH₂ na viabilidade celular foi realizada utilizando simplesmente a marcação por IP. Este tipo de análise, recorrendo ao uso do IP, tem sido apresentado como sendo um método rápido e simples, pois as células que sofreram danos são marcadas facilmente de vermelho pelo IP, sendo posteriormente identificadas.

Os resultados obtidos por citometria de fluxo com IP em células MCF-7 e LNCaP estão representados nos gráficos das Figuras 40 e 41, respetivamente.

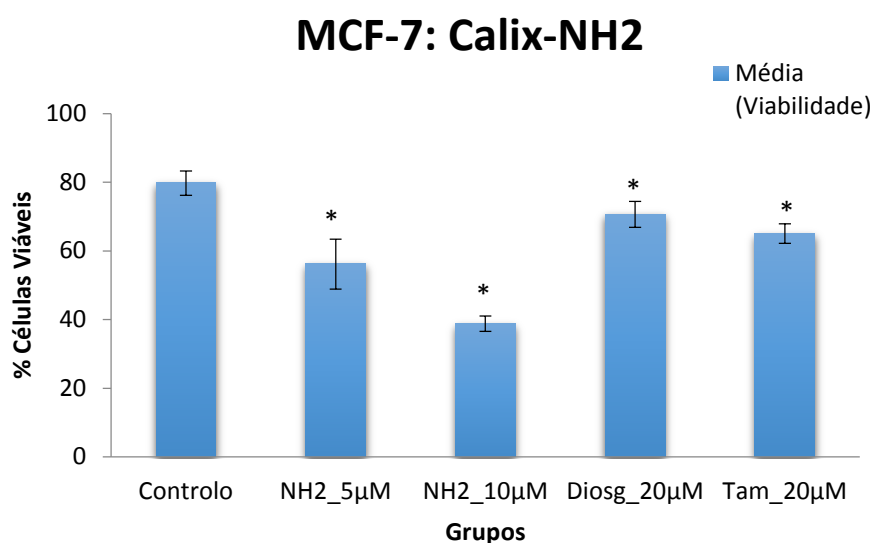


Figura 40 - Análise da viabilidade celular em células MCF-7 tratadas com o composto Calix-NH₂ (NH₂), diosgenina (Diosg) e tamoxifeno (Tam) durante 24 h (n=3, 1 experiência representativa); *p<0,05 em relação ao controlo.

Na realização deste ensaio, as células MCF-7 foram igualmente tratadas com o composto Calix-NH₂ a concentrações de 5 µM e 10 µM e à diosgenina e ao tamoxifeno com concentração de 20 µM. A diosgenina e o tamoxifeno são descritos como dois compostos estudados e aplicados no tratamento desta linha celular (Patel *et al.*, 2012) (Haque *et al.*, 2012). Pela análise da Figura 40, observa-se que a incubação com o composto Calix-NH₂ a 5 µM e 10 µM provocou uma maior diminuição da percentagem de células viáveis do que os fármacos conhecidos, comparativamente ao controlo (sem tratamento) e que parece depender da concentração de Calix-NH₂. Como resultado deste ensaio, o composto sintetizado Calix-NH₂ provou ter uma ação de indução de morte celular superior aos compostos de referência (diosgenina e tamoxifeno), o que sugere que possa ser considerado na concepção de novos agentes anticancerígenos (como por exemplo em cancro da mama).

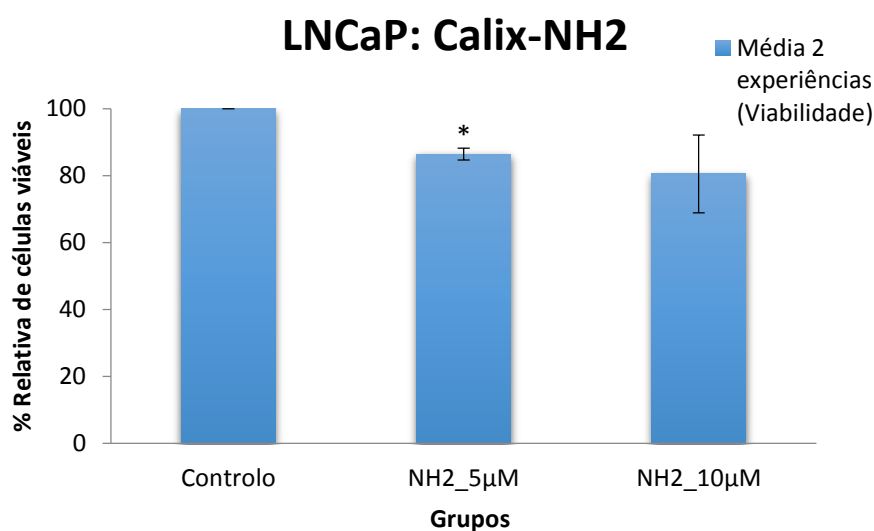


Figura 41- Análise da viabilidade celular em células LNCaP tratadas com o composto Calix-NH₂ (NH₂), 24 h; Combinação de duas experiências (n>5, 2 experiências independentes); *p<0,05 em relação ao controle.

Relativamente ao ensaio com as células LNCaP com o composto Calix-NH₂, os resultados da análise de viabilidade encontram-se na Figura 41. A incubação com o composto Calix-NH₂ a 5 µM e 10 µM demonstrou alguma inibição da viabilidade celular (cerca de 15%) em comparação com o controle, não sendo, contudo, significativa a diferença de valores apresentados entre as duas concentrações do composto. No entanto, há diferença estatística entre os efeitos observados na exposição ao composto Calix-NH₂ a 5 µM em relação ao controle.

Os resultados dos ensaios realizados nas duas linhas celulares demonstram que o composto Calix-NH₂ apresenta resultados mais significativos de morte celular em células MCF-7 comparativamente ao observado para as células LNCaP. De certa forma, este resultado sugere que o efeito tóxico poderá ser mais significativo em determinadas células do que em outras, o que aumenta a perspectiva de aplicação terapêutica.

Os valores obtidos dos ensaios de viabilidade celular estão de acordo com os ensaios de proliferação celular realizados pelo método do MTT, relativamente ao efeito citotóxico do composto Calix-NH₂ (contudo, com diferentes efeitos nos tipos de células) (Figuras 25 e 26).

Capítulo 4 - Conclusão

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de novos compostos químicos derivados de calixarenos com ação no G-quadruplex e que pudessem ter interesse como agentes anticancerígenos.

A síntese dos derivados de calixarenos teve como base o *p*-tert-butilticalix[4]areno, devido à sua estrutura pré-organizada, contendo locais de ligação que se podem ligar às guaninas existentes na estrutura do G-quadruplex. A caracterização dos compostos foi efetuada por RMN e espectrometria de massa. Relativamente aos estudos de interação entre os compostos e as sequências de DNA, foram realizadas por experiências de RMN. Estes estudos não foram conclusivos devido à insolubilidade dos compostos em solução aquosa. Deste modo, foi apenas estudada a formação e a estabilidade da estrutura de G-quadruplex por RMN de ^1H a diferentes temperaturas. Neste âmbito, os dados mostraram que entre a temperatura de 25 °C e 50 °C a estrutura do G-quadruplex é predominante, no entanto, após atingir a temperatura de 65 °C, a estrutura encontra-se na forma de duplex.

A ação antiproliferativa dos derivados de calixarenos foi avaliada em células cancerígenas humanas da mama e próstata (MCF-7 e LNCaP, respetivamente) e em células normais da derme humana (NHDF) pelo ensaio de viabilidade celular MTT. Tendo em conta a análise dos estudos dose-resposta dos compostos, foi determinado o IC_{50} para o composto que demonstrou efeitos citotóxicos, o Calix-NH₂, observando-se um valor de IC_{50} de 1,474 μM para as células cancerígenas da próstata. Contudo, este composto não apresentou seletividade marcada para as células saudáveis. Os macrociclos, por serem objeto de estudo na interação com o G-quadruplex, foram também avaliados biologicamente, mas não exibiram atividades antiproliferativas relevantes nas diferentes linhas celulares e nas condições experimentais seguidas.

Por microscopia de fluorescência, concluiu-se que os macrociclos (Calix-Benz e Calix-Pyr) apresentam fluorescência e por ensaios de localização celular observou-se que o Calix-Benz não apresentou fluorescência no núcleo da célula. Por fim, com estudos de citometria de fluxo com marcação por Anexina V-FITC e iodeto de propídio, verificou-se que o Calix-NH₂ parece não originar morte celular por apoptose, pois há ausência de marcação por Anexina V-FITC. Relativamente aos ensaios de viabilidade celular com o iodeto de propídio, como já confirmado pelos ensaios de MTT, o composto Calix-NH₂ apresentou elevada inibição da viabilidade celular, mais evidente em células MCF-7 comparativamente às LNCaP. O composto demonstrou ainda atividades citotóxicas superiores à de compostos de referência (tamoxifeno e diosgenina).

Através deste estudo, foi possível observar o interesse biológico de compostos derivados de calixarenos sendo de todo o interesse continuarem a ser explorados, quer alargando os estudos de atividade farmacológica, quer mediante a síntese de análogos para análises de

relação estrutura-atividade, especialmente para aumentar a seletividade e potência dos seus efeitos.

Capítulo 5 - Perspetivas Futuras

Como perspectivas de desenvolvimento futuro deste trabalho, são de considerar e incluir-se os seguintes pontos:

- Desenvolver sinteticamente calixarenos semelhantes ao composto Calix-NH₂, pois foi o ligando que exibiu atividade antiproliferativa em células cancerígenas.
- Estudar a interação dos derivados de calixarenos com o G-quadruplex por outros métodos biofísicos tais como *FRET-melting* (transferência de energia de ressonância por fluorescência) e DSF (Varrimento Diferencial de Fluorescência).
- Repetição das experiências de fluorescência utilizando o microscópio confocal, de forma a concluir acerca da localização dos compostos nas células.
- Alargar o estudo da viabilidade celular a outras linhas celulares.
- Comparar a atividade antiproliferativa dos calixarenos em células cancerígenas com outros inibidores clássicos descritos.
- Otimizar os estudos por citometria de fluxo e utilizar outras linhas celulares, de modo a poder clarificar-se os ensaios de marcação por Anexina V-FITC.
- Avaliar a morte celular por apoptose dos calixarenos, como por exemplo, pela deteção da caspase 3 ativada.

Capítulo 6 - Bibliografia

Ahmed, A., Ali, S., Sarkar, F.H. (2014). Advances in Androgen Receptor Targeted Therapy for Prostate Cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 229(3).

Amr, A. E. E., Abo-ghalia, M., & Abdalah, M. M. (2006). Synthesis of Novel Macrocyclic Peptido-calix[4]arenes and Peptido-pyridines as Precursors for Potential Molecular Metallacages, Chemosensors and Biologically Active Candidates. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung Tübingen*, 61b, 1335 -1345.

Andreeff, M., Goodrich, D.W., Pardee, A.B. *Cancer Medicine*, 6th edition. BC Decker, 2003.

Balasubramanian, S., & Hurley, L. H. (2011). Targeting G-quadruplexes in gene promoters : a novel anticancer strategy?. *Nature Reviews Drug Discovery*, 10(4), 261-275.

Balasubramanian, S., & Neidle, S. (2009). G-quadruplex nucleic acids as therapeutic targets. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(3), 345-53.

Bates, P., Mergny, J.L., & Yang, D. (2007). Quartets in G-major. The First International Meeting on Quadruplex DNA. *EMBO Reports*, 8(11), 1003-10.

Beer, P. D., Lankshear, M. D., Cowley, A. R. (2006). Cooperative AND receptor for ion-pairs. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, (6), 612-4.

Bejugam, M., Gunaratnam, M., Müller, S., Sanders, D. a, Sewitz, S., Fletcher, J. A., Neidle, S., Balasubramanian, S. (2010). Targeting the c-Kit Promoter G-quadruplexes with 6-Substituted Indenoisoquinolines. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 1(7), 306-10.

Bidzinska, J., Cimino-Reale, G., Zaffaroni, N., & Folini, M. (2013). G-quadruplex structures in the human genome as novel therapeutic targets. *Molecules*, 18(10), 12368-95.

Bochman, M. L., Paeschke, K., & Zakian, V. a. (2012). DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures. *Nature Reviews. Genetics*, 13(11), 770-80.

Bryan, T. M., & Baumann, P. (2011). G-quadruplexes: from guanine gels to chemotherapeutics. *Molecular Biotechnology*, 49(2), 198-208.

Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K., & Neidle, S. (2006). Quadruplex DNA: sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Research*, 34(19), 5402-15.

Carrasco, C., Teulade-Fichou, M-P., Guittat, L., Bailly, C., Alberti, P., Mergny, J., David, A., Lehn, J-M., Wilson, W.D. (2003). Selective Recognition of G-Quadruplex Telomeric DNA by a Bis (quinacridine) Macrocyclic. *Journal of the American Chemical Society*, 125, 4732-4740.

Chen, Y., & Yang, D. (2012). Sequence, Stability, Structure of G-Quadruplexes and Their Drug Interactions. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry* (520), 1-26.

Cragg, P. J., & Wiley, J. (2005). *A Practical Guide to Supramolecular Chemistry*.

Cruz, C., Cairrao, E., Silvestre, S., Breitenfeld, L., Almeida, P., & Queiroz, J. a. (2011). Targeting of mitochondria-endoplasmic reticulum by fluorescent macrocyclic compounds. *PLoS One*, 6(11), e27078.

Cunningham, A.P., Love, W.K., Zhang, R.W., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O. (2006). Telomerase Inhibition in Cancer Therapeutics: Molecular-Based Approaches. *Current Medicinal Chemistry Journal*, 13(24): 2875-2888.

Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Journal of Toxicologic Pathology*, 35(4), 495-516.

Evans, A. C., & Huppert, J. L. (2010). Seven essential questions on G-quadruplexes. *Biomolecular Concepts*, 1, 197-213.

Fa-fu, Y., Zhi-sheng, H., Hong-yu, G. U. O., Bi-qiong, H., & Xiao-yi, Z. (2010). Synthesis and Complexation Properties of Novel Chiral Calix[4]-1,3-aza-crown and Calix[4] arene Hydrazone Derivative. *Chemical Research in Chinese Universities*, 26(4), 546-549.

Fátima, A., Fernandes, S. A., & Sabino, A. A. (2009). Calixarenes as new platforms for drug design. *Current Drug Discovery Technologies*, 6(2), 151-70.

Fotakis, G., & Timbrell, J. a. (2006). In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*, 160(2), 171-7.

Fritzsche, W., Spindler, L. *Guanine Quartets - Structure and Application*. RSC publishing, 2013.

Gatti, R., Belletti, S., Orlandini, G., Bussolati, O., Dall'Asta, V., & Gazzola, G. C. (1998). Comparison of Annexin V and Calcein-AM as Early Vital Markers of Apoptosis in Adherent Cells by Confocal Laser Microscopy. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 46(8), 895-900.

Gavathiotis, E., & Searle, M. S. (2003). Structure of the parallel-stranded DNA quadruplex d(TTAGGGT)₄ containing the human telomeric repeat: evidence for A-tetrad formation from NMR and molecular dynamics simulations. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 1(10), 1650-6.

Haider, S. M., Neidle, S., & Parkinson, G. N. (2011). A structural analysis of G-quadruplex/ligand interactions. *Biochimie*, 93(8), 1239-51.

Han, H., & Hurley, L. H. (2000). G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. *Trends in Pharmacological Sciences*, 21(4), 136-42.

Haque, R., Ahmed, S. A., Fisher, A., Avila, C. C., Shi, J., Guo, A., Craig Cheetham, T. and Schottinger, J. E. (2012). Effectiveness of aromatase inhibitors and tamoxifen in reducing subsequent breast cancer. *Cancer Medicine*, 1: 318-327.

Hole, A. J., Baumli, S., Shao, H., Shi, S., Huang, S., Pepper, C., Noble, M. E. (2013). Comparative structural and functional studies of 4-(thiazol-5-yl)-2-(phenylamino)pyrimidine-5-carbonitrile CDK9 inhibitors suggest the basis for isotype selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(3), 660-70.

Horoszewicz, J. S., Leong, S. S., Kawinski, E., Karr, J.P., Rosenthal H., Chu, T.M., Mirand, E.A., Murphy, G. P. (1983). LNCaP Model of Human Prostatic Carcinoma. *Cancer Research*, 1809-1818.

Hounsou, C., Guittat, L., Monchard, D., Jourdan, M., Saettel, N., Mergny, J.-L., & Teulade-Fichou, M.-P. (2007). G-quadruplex recognition by quinacridines: a SAR, NMR, and biological study. *ChemMedChem*, 2(5), 655-666.

Huppert, J. L. (2008). Four-stranded nucleic acids: structure, function and targeting of G-quadruplexes. *Chemical Society Reviews*, 37(7), 1375-84.

- Huppert, J. L. (2010). Structure, location and interactions of G-quadruplexes. *The FEBS Journal*, 277(17), 3452-8.
- Jaumot, J., & Gargallo, R. (2012). “ Experimental Methods for Studying the Interactions between G-Quadruplex Structures and Ligands ” Experimental Methods for Studing the Interactions between G-Quadruplex Structures and Ligands Joaquim Jaumot * and Raimundo Gargallo. *Current Pharmaceutical Design*.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *Cancer Journal for Clinicians*, 61(2), 69-90.
- Kim, M., Gleason-guzman, M., Izbicka, E., Nishioka, D., & Hurley, L. H. (2003). The Different Biological Effects of Telomestatin and TMPyP4 Can Be Attributed to Their Selectivity for Interaction with Intramolecular or Intermolecular G-Quadruplex. *Cancer Research*, 63, 3247-3256.
- Kim, M.-Y., Vankayalapati, H., Shin-Ya, K., Wierzba, K., & Hurley, L. H. (2002). Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex. *Journal of the American Chemical Society*, 124(10), 2098-9.
- Kim, R. (2005). Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer*, 103(8), 1551-60.
- Levenson, A. S., & Jordan, V. C. (1997). MCF-7: The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Cancer Research*, 3071-3078.
- Li, J.-G., She, M.-R., Lu, C.-Y., Wei, S.-S., Xia, P.-F., Lu, Z.-S., & Peng, Q. (2014). Manumycin induces apoptosis in prostate cancer cells. *Oncotargets and Therapy*, 7, 771-7.
- Lo, P. K., & Wong, M. S. (2008). Extended Calix[4]arene-Based Receptors for Molecular Recognition and Sensing. *Sensors*, 8(9), 5313-5335.
- LPCC. Liga Portuguesa Contra o Cancro, 2014, Consultado a 15 de Setembro de 2014.
- Luedtke, N. W. (2009). Targeting G-Quadruplex DNA with Small Molecules. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 63(3), 134-139.
- Mao, W., Chen, X., Yang, T., Yin, Y., Ge, M., Luo, M., Qian, X. (2012). A rapid fluorescent screening method for cellular sensitivity to anti-cancer compound. *Cytotechnology*, 64(4), 451-7.
- Mcluckie, K. I. E., Waller, Z. A. E., Sanders, D. A., & Alves, D. (2011). G-Quadruplex-Binding Benzo[a]phenoxazines Down-Regulate c- KIT Expression in Human Gastric Carcinoma Cells, *Journal of the American Chemical Society*, 133(8), 2658-2663.
- Mita, H., Ohyama, T., Tanaka, Y., & Yamamoto, Y. (2006). Formation of a Complex of 5,10,15,20-Tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)-21H,23H-porphyrin with G-Quadruplex DNA. *Biochemistry*, 45(22).
- Mohankumar, K., Pajaniradje, S., Sridharan S., Singh, V.K., Ronsard, L., Banerjea, A.C., Benson, C.S., Coumar, M.S., Rajagopalan, R. (2014). Mechanism of apoptotic induction in human breast cancer cell, MCF-7, by an analog of curcumin in comparison with curcumin - an in vitro and in silico approach. *Chemico-Biological Interactions*, 210: 51-63.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.

- Mufudza, C., Sorofa, W., Chiyaka, E.T. (2012). Assessing the Effects of Estrogen on the Dynamics of Breast Cancer. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*.
- Murat, P., Singh, Y., & Defrancq, E. (2011). Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand interactions. *Chemical Society Reviews*, 40(11), 5293-307 e referências aí citadas.
- Neidle, S. (2010). Human telomeric G-quadruplex: the current status of telomeric G-quadruplexes as therapeutic targets in human cancer. *The FEBS Journal*, 277(5), 1118-25.
- Niesen, F. H., Berglund, H., & Vedadi, M. (2007). The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols*, 2(9), 2212-21.
- Normanton, M., Alvarenga, H., Hamerschlak, N., Ribeiro, A., Kondo, A., Rizzo, L.V., Marti, L.C. (2014). Interleukin 7 Plays a Role in T Lymphocyte Apoptosis Inhibition Driven by Mesenchymal Stem Cell without Favoring Proliferation and Cytokines Secretion. *PLOS ONE*, 9, 9.
- Obrecht, D., Robinson, J. a, Bernardini, F., Bisang, C., DeMarco, S. J., Moehle, K., & Gombert, F. O. (2009). Recent progress in the discovery of macrocyclic compounds as potential anti-infective therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*, 16(1), 42-65.
- OMS. Organização Mundial de Saúde, 2014, Consultado a 15 de Setembro de 2014.
- Patel, K., Gadewar, M., Tahilyani, V. and Patel, D. K. (2012). A review on pharmacological and analytical aspects of diosgenin: a concise report. *Natural Products and Bioprospecting*, 2: 46-52.
- Patra, S., Maity, D., Gunupuru, R., Agnihotri, P., & Paul, P. (2012). Calixarenes : Versatile molecules as molecular sensors for ion. *Journal of Chemical Sciences*, 124(6), 1287-1299.
- Poon, I. K. H., Hulett, M. D., & Parish, C. R. (2010). Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death and Differentiation*, 17(3), 381-97.
- Ruden, M., & Puri, N. (2013). Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treatment Reviews*, 39(5), 444-56.
- Russell, P. J., & Kingsley, E. a. (2003). Human prostate cancer cell lines. *Methods in Molecular Medicine*, 81(12), 21-39.
- Samarghandian, S., Hadjzadeh, M.-A.-R., Afshari, J. T., & Hosseini, M. (2014). Antiproliferative activity and induction of apoptotic by ethanolic extract of *Alpinia galanga* rhizome in human breast carcinoma cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 14(1), 192.
- Santos, A., Sarmiento-Ribeiro, A., Pedroso de Lima, M., Simões, S., & Moreira, J. N. (2008). Simultaneous Evaluation of Viability and Bcl-2 in Small-Cell Lung Cancer. *Cytometry Part A*, 73A, 1165-1172.
- Sattin, G., Artese, A., Nadai, M., Costa, G., Parrotta, L., Alcaro, S., ... Richter, S. N. (2013). Conformation and stability of intramolecular telomeric G-quadruplexes: sequence effects in the loops. *PLoS One*, 8(12), e84113.
- Shalaby, T., Fiaschetti, G., Nagasawa, K., Shin-ya, K., Baumgartner, M., Grotzer, M. (2013). G-Quadruplexes as Potential Therapeutic Targets for Embryonal Tumors. *Molecules*, 18: 12500-12537.

- Siegel, R., Ma, J., Zou, Z., Jemal, A. (2014). Cancer statistics, 2014. *Cancer Journal for Clinicians*, 64(5), 364.
- Sirit, A., & Yilmaz, M. (2009). Chiral Calixarenes. *Turkish Journal of Chemistry*, 33, 159-200.
- Smith, R.A., Manassaram-Baptiste, D., Brooks, D., Cokkinides, V., Doroshenk, M., Saslow, D., Wender, R.C., Brawley, O.W. (2014). Cancer screening in the United States, 2014: A review of current American Cancer Society guidelines and current issues in cancer screening. *Cancer Journal for Clinicians*, 64(1), 30-51.
- Tauchi, T., Shin-ya, K., Sashida, G., Sumi, M., Okabe, S., Ohyashiki, J.H., Ohyashiki, K. (2006). Telomerase inhibition with a novel G-quadruplex-interactive agent, telomestatin: *in vitro* and *in vivo* studies in acute leukemia. *Oncogene*, 25, 5719-5725.
- Webba da Silva, M. (2007). NMR methods for studying quadruplex nucleic acids. *Methods (San Diego, Calif.)*, 43(4), 264-277.
- Xu, Y. (2011). Chemistry in human telomere biology: structure, function and targeting of telomere DNA/RNA. *Chemical Society Reviews*, 40(5), 2719-40.
- Xu, Y., Suzuki, Y., Ito, K., & Komiyama, M. (2010). Telomeric repeat-containing RNA structure in living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(33), 14579-84.
- Yang, D., & Okamoto, K. (2010). Structural insights into G-Quadruplexes: towards new anticancer drugs. *Future Medicinal Chemistry*, 2(4), 619-646.
- Yi, E., Lam, N., Beraldi, D., Tannahill, D., Balasubramanian, S., & Way, R. (2013). G-Quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA. *Nature Communications*, 4, 1796.
- Yilmaz, M. (2013). Calixarene-Based Receptors for Molecular Recognition. *Turkish Journal of Chemistry*, 558-585.
- Zhou, J., Ding, D., Wang, M., Cong, Y-S. (2014). Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology reports*, 47(1): 8-14.

Anexos

Anexo 1

Foram definidas diferentes regiões para analisar as células apoptóticas e a viabilidade celular. Esta análise foi realizada em gráficos de contorno, um tipo de gráfico de densidade, que discrimina a existência de maior número de pontos.

Assim, delineou-se uma região denominada de R1, com base no gráfico de complexidade vs tamanho, com o objetivo de excluir, em parte, restos celulares (“*debris*”) existentes na população de eventos adquiridos. Com base no gráfico de tamanho vs iodeto de propídio, foi efetuada uma segunda análise em que se criaram 2 regiões, R2 e R3, criando-se um “*gate*” que é a união das regiões, de modo a excluir o máximo de fragmentos celulares sem DNA. Por fim, foi feita uma análise tendo em conta o tamanho vs Anexina V-FITC, para auxiliar o posicionamento dos quadrantes (mostrados na Figura 38).

Os gráficos foram adquiridos com 10,000 eventos em R1 e analisados com um menor número devido à exclusão dos restos celulares no “*gate*” união de R2 com R3.

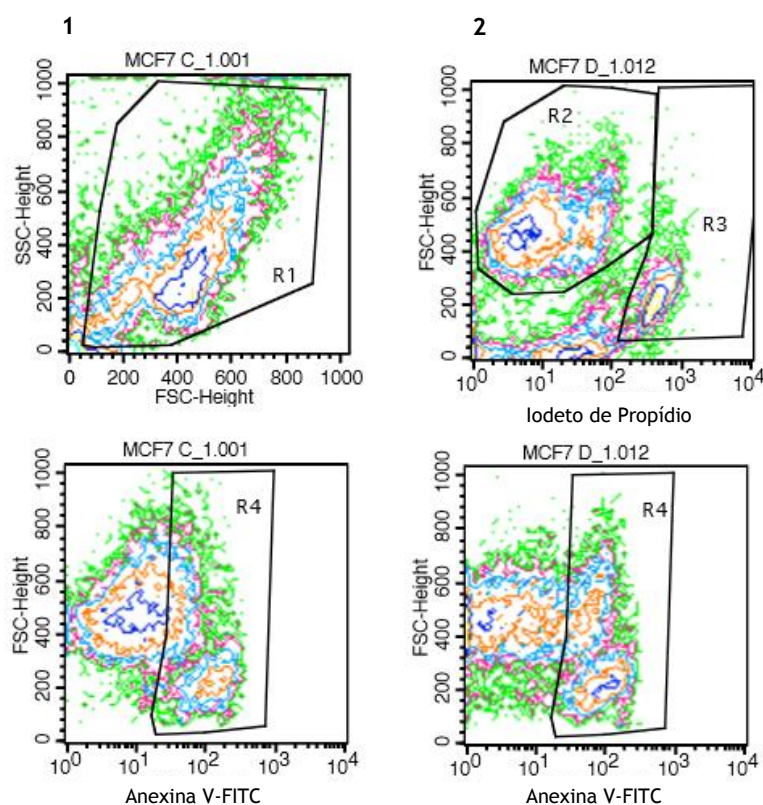


Figura 42 - Regiões geométricas marcadas em R1, R2, R3 e R4 com base nas diferentes propriedades dos parâmetros analisados. (1= Controlo; 2- Diosgenina).

