



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Nanosistema de entrega de fármacos para tratamento de infeções por HPV

Ana Catarina Gonçalves Lopes

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

Orientador: Prof. Doutora Carla Cruz

Covilhã, outubro de 2018

Dedicatória

Aos meus pais, por tudo.

“Tudo o que a vida nos pode dar é um certo conhecimento dela que chega tarde demais. Não esqueço esta frase de Conrad. Não esqueço nada, nem o romancista francês moribundo que rabiscou num papelinho: Não me sacudam que estou cheio de lágrimas de modo que não quero sacudir ninguém. A nossa vida é feita igualmente de tanta coisa boa. Até no horror há coisas boas às vezes: um sorriso, por exemplo. O que há de melhor que um sorriso? O que há de melhor que um amigo? O que há melhor que ler? Ou que o céu de Lisboa em junho? Ou uma criança a dormir? É um privilégio imenso estar vivo, uma grande honra a que temos de ser fiéis... Agora estou aqui sentado a escrever isto. A escrever isto. No meu paízinho. Na minha terra encantada, cheia de sol, dizia António Nobre. No único sítio em que quero viver.”

António Lobo Antunes, Crónica publicada na VISÃO de 26 de abril.

“O velho que imagino que serei é o velho que gostaria de ser. Se morrer antes, não chegarei a velho - esse ou outro. Pode também acontecer que chegue a velho mas que, por motivos invisíveis desde aqui, não consiga ou não possa ser exatamente esse velho. Então, a sua única existência será a minha ideia. De modo semelhante, a criança que fui é a criança que acredito que fui. Se a criança que sou capaz de recordar não coincidir com a que realmente fui, então essa criança não existiu realmente. A sua única existência é a minha ideia. E, no entanto, ambos estão aqui - velho imaginado e criança recordada. E também eu estou aqui, entre eles - para onde me dirijo, de onde venho. A imperfeição com que recordo e com que imagino não me permite afirmações infalíveis. A única certeza é de que estou em movimento.”

José Luís Peixoto, *in* O Caminho Imperfeito.

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Carla Cruz, pela oportunidade de desenvolver a minha dissertação de mestrado neste grupo, pelo acompanhamento e esforço constante e incansável, por todas as oportunidades, pela exigência, desafios e motivação diária.

Aos meus colegas de grupo, em especial ao Josué e ao Tiago pelos conselhos, pela disponibilidade e pela ajuda demonstrada. E à Francisca e à Márcia, que mais do que colegas foram companheiras desta aventura. O caminho nem sempre foi fácil, mas a partilha de sorrisos e lágrimas fez com que fosse possível chegar à meta.

Aos meus pais, por acreditarem em mim e por me permitirem viver e sonhar. Por suportarem a distância e a ausência, não só física, mas também emocional. Sei o quão pode ser difícil amar uma pessoa exigente e obstinada como eu e ainda assim de vocês sempre tive todo o amor e compreensão do mundo. Obrigada pelos valores e pela educação, pela noção de bondade e integridade, tão escassas no mundo de hoje.

À minha irmã, simplesmente por estares presente ao longo deste ano e seres quem és, porque houve uma altura em que pensámos que não seria possível tamanha dádiva que é termos quem amamos connosco. Por todas as batalhas travadas lado a lado. Por seres uma lutadora, pelas confidências, por também tu suportares quando me isolo e distancio. Amo-te muito.

Ao meu cunhado, pelas discussões profissionais e por seres o meu engenheiro electrotécnico de emergência, sem ti e os teus serviços informáticos isto teria sido muito mais difícil. Pelas motivações constantes e todas as ajudas possíveis e imaginárias que mais ninguém daria com a leveza de coração com que tu dás. Sem seres de sangue, és um irmão que a vida me deu.

À Catarina por seres a prova que do longe se faz perto, tenho a certeza que por mais que os nossos caminhos sigam rumos diferentes, voltarão sempre a cruzar-se. Por me tirares da rotina quando mais ninguém o fez, por me levares para a luz quando toda eu sou trevas e por todas as qualidades que vês em mim, quando eu só vejo defeitos. Pela preocupação demonstrada, pelas palavras de incentivo, pela paciência. Por todas as músicas trocadas e pelos receios e peripécias partilhadas ao pôr-do-sol.

À Ana, porque o universo conspira sempre a nosso favor e dá-nos sempre o quê ou quem precisamos para continuarmos de armas e bagagens e abraçarmos o que somos. Por todas as conversas, devaneios e confidências que só contigo eram possíveis. Pelos avisos e toda a ajuda, também tu foste uma peça importante do puzzle.

Aos meus colegas de casa, sobretudo pela paciência quando eu fui só e apenas um aglomerado de mau humor e ansiedade. Em especial à Alexandra, pelas boleias constantes, pelas compras quando o tempo escasseava e pelos momentos de descontração. Somos muito diferentes, mas tenho a certeza que amizades como a tua são raras. E ao João e à Daniela, pessoas boas que caminharam comigo ao longo de todos estes anos. Fomos todos juntos uma família bonita, nada apagará isso da minha memória e coração.

Aos meus amigos no geral, aos que trouxe no coração quando cheguei à Covilhã e têm sobrevivido ao tempo e à distância e aos que a Covilhã me deu, pessoas tão especiais, o meu coração termina esta jornada cheio de amor. Por todos os cafés adiados, por todas as chamadas recusadas, por todas as mensagens que ficaram por enviar, por todas as desculpas esfarrapadas. Obrigada a vós por, ainda assim, me dardes sempre uma palavra de incentivo. Em breve o meu tempo também será vosso.

Ao Kiko e ao Gribouille, por sem palavras expressarem toda a saudade e carinho do mundo.

A todos e a cada um em especial,

O meu sincero obrigada.

Resumo

Sequências de oligonucleótidos de DNA e RNA ricas em guaninas podem associar-se inter ou intramolecularmente para formar estruturas de quatro cadeias que se designam G-quadruplex (G4). Vários oligodesoxinucleótidos de G4 têm sido alvo de estudo como potenciais agentes diagnóstico e terapêuticos funcionando como aptameros, pois têm interação específica com proteínas alvo que podem encontrar-se à superfície das células. Entre estes alvos está a nucleolina (NCL), proteína multifuncional sobreexpressa à superfície das células cancerosas, sendo por isso um alvo para o desenvolvimento estratégias para o diagnóstico e terapia do cancro.

Entre os diversos aptameros G4 destaca-se o AS1411, que é um aptamero que se liga à NCL e inibe o crescimento de células cancerosas sem afetar as células normais, tendo sido alvo de ensaios clínicos humanos de fases 1 e 2. O seu comportamento seletivo tem sido de particular interesse nos últimos anos para a entrega de agentes terapêuticos ou de imagem em células cancerosas; pelo que a procura de novas estratégias com vista a melhoria das propriedades deste aptamero G4 é um foco de estudo crescente. As modificações químicas no G4 AS1411 e a formação dos conjugados com ligandos de G4, constituem uma estratégia promissora para explorar o seu potencial terapêutico e constituem a base para a formação e otimização de nanosistemas conjugados aptamero-ligando.

Neste trabalho são reportados ensaios biofísicos e *in vitro* de derivados de fenantrolina e derivados de laranja de acridina usados para estabilizar um derivado do AS1411, designado AT11-L0. Também é proposta a síntese de novos ligandos derivados de fenantrolina.

Relativamente aos ensaios biofísicos, a espectroscopia de discoísmo circular (CD) confirmou a existência de uma estrutura G4 paralela para o AT11-L0 em tampão 65 mM KCl + 20 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 . As experiências de CD-*melting* demonstraram que os ligandos que provocaram maior estabilização térmica da estrutura do G4 AT11-L0 foram os derivados de laranja de acridina C_8-NH_2 e o C_8 , com $\Delta T_m = 26,6$ °C e 23,9 °C, respetivamente a 4 equivalentes molares. As titulações de fluorescência indicaram valores de K_D entre 10^{-6} - 10^{-7} (M^{-1}) para os ligandos derivados de laranja de acridina e de fenantrolina, indicativos de ligandos de G4 com afinidade média a elevada. Sendo que, os ligandos com maior afinidade para o AT11-L0 foram o derivado de laranja de acridina C_8-NH_2 ($K_D = 3,2 \times 10^{-7}$ (M^{-1})) e o derivado de fenantrolina [32]phen₂N₄ ($K_D = 2,7 \times 10^{-7}$ (M^{-1})).

Já os ensaios *in vitro* foram levados a cabo em células HeLa vs NHDF. Foram realizados ensaios de citotoxicidade (MTT) para determinar o IC_{50} dos ligandos C_8-NH_2 , C_8 , C_5 , C_3 e [16]phenN₂ e posteriormente para avaliar a citotoxicidade dos conjugados AT11-L0- C_8 , AT11-

L0-C₈-NH₂, AT11-L0-C₅, AT11-L0-C₃. Os ligandos demonstraram ser citotóxicos para ambas as linhas celulares, com valores de IC₅₀ entre 0,15 µM e 3,51 µM. Os nanosistemas conjugados aptamero-ligando demonstraram ser citotóxicos e seletivos para células HeLa. Foram ainda levados a cabo estudo de colocalização em células HeLa com o conjugado AT11-L0 - C₈, através de microscopia de fluorescência confocal. Verificou-se localização preferencial dos ligandos no nucléolo das células HeLa, a internalização do aptamero AT11-L0, bem como a formação do conjugado aptamero-ligando e a sua internalização nas células.

No geral, estes resultados demonstraram ser promissores para o desenvolvimento de futuros nanosistemas envolvendo aptameros G4 derivados do AS1411, conjugados com ligandos de G4 derivados de laranja de acridina e de fenantrolina.

Palavras-chave

G-quadruplex, aptameros, AS1411, AT11-L0, ligandos, derivados de laranja de acridina e fenantrolina, nanosistemas.

Abstract

Guanine-rich DNA and RNA sequences may associate intermolecularly or intramolecularly to form four-chain structures, designated G-quadruplex (G4). Several oligodeoxynucleotides with this intrinsic capacity have been studied as potential diagnostic and therapeutic agents working as aptamers, since they have specific interaction with target proteins that may be expressed on the surface of cells. Among these targets there is nucleolin (NCL), a multifunctional protein that overexpresses the surface of cancer cells and it is a target for the development of strategies for cancer diagnosis and therapy.

Among all the G4 aptamers there is AS1411, which is an anti-NCL aptamer that inhibits the growth of cancer cells without affecting normal cells and it was reached human clinical trials phases 1 and 2. Its tumour-selective behavior has been of interest in recent years for delivery of imaging or therapeutic agents in cancer cells; therefore, the search for new strategies to improve this G4 aptamer properties is a focus of growing study. The chemical modifications in G4 AS1411 and its conjugation with G4 ligands constitute a promising strategy to exploit its therapeutic potential and constitute the basis for aptamer-ligand conjugated nanosystems formulation and optimization.

In this work biophysical and *in vitro* studies of phenanthroline derivatives and orange acridine derivatives used to stabilize an AS1411 derivative, designated AT11-L0, are reported. The synthesis of new ligands derived from phenanthrolines is also proposed.

In biophysical assays, circular dichroism spectroscopy (CD) confirmed the existence of a G4 parallel structure to AT11-L0 in 65 mM KCl + 20 mM K₂HPO₄ / KH₂PO₄ buffer. CD-melting experiments demonstrated that the ligands that caused the greatest thermal stabilization of the structure of G4 AT11-L0 were the acridine orange derivatives C₈-NH₂ and C₈, with $\Delta T_m = 26.6^\circ\text{C}$ and 23.9°C , respectively in presence of 4 molar equivalents. Fluorescence titrations indicated K_D values between 10^{-6} - 10^{-7} (M⁻¹) for both acridine orange and phenanthroline derivatives, which is indicative of medium to high affinity G4 ligands. The ligands with the highest affinity for AT11-L0 were the acridine orange derivative C₈-NH₂ ($K_D = 3.2 \times 10^{-7}$ (M⁻¹)) and the phenanthroline derivative [32]phen₂N₄ ($K_D = 2.7 \times 10^{-7}$ (M⁻¹)).

In vitro assays were performed on HeLa vs NHDF cells. Cytotoxicity assays (MTT) were performed to determine the IC₅₀ of C₈-NH₂, C₈, C₅, C₃ and [16]phenN₂ ligands and thereafter to evaluate the cytotoxicity of the conjugates AT11-L0 - C₈, AT11-L0 - C₈-NH₂, AT11-L0 - C₅, AT11-L0 - C₃. Ligands were shown to be cytotoxic to both cell lines, with IC₅₀ values between 0.15 μM and 3.51 μM . Aptamer-ligand conjugated nanosystems have been shown to be cytotoxic and selective for HeLa cells. A colocalization study in HeLa cells with the AT11-L0 - C₈ conjugate was carried out by confocal fluorescence microscopy. Preferred localization of the ligand in the

HeLa cell nucleolus, the internalization of the AT11-L0 aptamer, as well as the formation of the aptamer-ligand conjugate and its internalization into the cells were evidenced.

Overall, these results have been shown to be promising for the development of future nanosystems involving G4 aptamers derived from AS1411, conjugated to G4 ligands which are acridine orange and phenanthroline derivatives.

Keywords

G-quadruplex, aptamer, AS1411, AT11-L0, ligands, acridine orange and phenanthroline derivatives, nanosystems.

Índice

Capítulo 1	1
Introdução.....	1
1.1. Entrega de fármacos mediada por aptameros para terapia anticancerígena direcionada	2
1.2. Aptameros de G-quadruplex.....	6
1.2.1. Terapias direcionadas mediadas por aptameros de G4.....	8
1.2.2. Métodos experimentais para o estudo de aptameros de G-quadruplex.....	9
1.3. Aptamero de G4: AS1411	10
1.3.1. Mecanismo de direcionamento do AS1411 para o alvo nucleolina	11
1.3.2. Estudos Clínicos do aptamero de G4 AS1411	14
1.3.3. Derivados do aptamero G4 AS1411	15
1.3.4. Conjugados AS1411 e derivados - ligados (nanosistemas)	15
1.3.5. Ligandos derivados de laranja de acridina.....	17
1.3.6. Ligandos derivados de fenantrolina	18
Capítulo 2	21
Objetivos	21
Capítulo 3	23
Materiais e Métodos	23
3.1. Síntese dos ligandos de G4.....	23
3.1.1. Síntese de 2,9 - dimetil - 1,10 - fenantrolina - 5,6 - diona (C ₁₄ H ₁₀ N ₂ O ₂)	23
3.1.2. Síntese de 7,10 - dimetilpirazino [2,3-f] [1,10] fenantrolina (DiPyPhen(Me) ₂) (C ₁₆ H ₁₂ N ₄)	25
3.1.3. Síntese do 7,10 - dimetilpirazino [2,3-f] [1,10] fenantrolina - 3,6 - dicarboxaldeído (DiPyPhen(COH) ₂) (C ₁₆ H ₈ N ₄ O ₂)	27
3.1.4. Síntese do 7,10 - dimetilpirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinaciclo - 2,11 - dieno (DiPyPhenN ₄) (C ₂₂ H ₂₀ N ₆)	29
3.1.4.1. Redução do composto 7,10 - dimetilpirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinaciclo - 2,11 - dieno (DiPyPhenN ₄)	30
3.1.5. Síntese do 3,6,9-triaza - (7,10) - pirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinaciclodecaféno - 2,9 - dieno. (DiPyPhenN ₅) (C ₂₁ H ₂₀ N ₈).....	31
3.1.5.1. Redução do 3,6,9-triaza - (7,10) - pirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinaciclodecaféno - 2,9 - dieno. (DiPyPhenN ₅).....	31

3.2.	Preparação do aptamero, ligandos e nanosistemas.....	32
3.3.	Ensaio Biofísicos	34
3.3.1.	Espectroscopia de diferença térmica (TDS)	34
3.3.2.	Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	35
3.3.3.	Espectroscopia de fluorescência.....	36
3.4.	Ensaio <i>in vitro</i>	37
3.4.1.	Ensaio de Viabilidade Celular	38
3.4.2.	Microscopia de Fluorescência Confocal	40
Capítulo 4.....	43
Resultados e Discussão	43
4.1.	Síntese de ligandos de G4	43
4.2.	Ensaio Biofísicos	45
4.2.1.	Espectroscopia de diferença térmica (TDS)	45
4.2.2.	Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	46
4.2.3.	Espectroscopia de fluorescência.....	51
4.3.	Ensaio <i>in vitro</i>	55
4.3.1.	Ensaio de Viabilidade Celular	55
4.3.2.	Microscopia de Fluorescência Confocal	59
Capítulo 5.....	63
Conclusões e Perspetivas Futuras.....	63
Capítulo 6.....	67
Referências Bibliográficas.....	67
Anexo I:.....	73
Anexo II:	75
Comunicação na forma de painel	75
Anexo III	76
Comunicação na forma de painel	76
Anexo IV	77
Comunicação na forma de painel	77

Lista de Figuras

Figura 1. Princípio básico do processo SELEX. A seleção começa a partir da construção de uma biblioteca inicial de oligonucleótidos, que é diretamente conduzida ao processo de seleção. Após a remoção de aptameros ligados não especificamente, um conjunto de oligonucleótidos é incubado com o alvo. Sequências não ligadas são removidas; os oligonucleótidos ligados ao alvo são recolhidos e encaminhados para amplificação por PCR. Após várias repetições de seleção, as etapas de clonagem e sequenciamento são realizadas, seguidas pela avaliação da afinidade dos aptameros enriquecidos para o alvo. Adaptado de Darmostuk e colaboradores (Darmostuk <i>et al.</i> , 2015).	5
Figura 2. Estrutura do quarteto-G e do G4. Adaptado de Xiong e colaboradores (Xiong <i>et al.</i> , 2015).	6
Figura 3. Representação esquemática das topologias G4. (a) Quarteto de guanina estabilizado por oito ligações de hidrogénio de Hoogsteen e um catião monovalente central (M). (b) Topologia G4 antiparalela intramolecular com dois quartetos, sulcos largos e estreitos e <i>loops</i> laterais. (c) Topologia G4 paralela intramolecular com dois quartetos, sulcos médios e <i>loops</i> de hélice. (d) Topologia G4 antiparalela dimérica com dois quartetos, sulcos largos e estreitos e <i>loops</i> diagonais. (e) Topologia tetramolecular G4 paralela com três quartetos, sulcos médios e sem <i>loops</i> . Adaptado de Métifiot e colaboradores (Métifiot <i>et al.</i> , 2014).	7
Figura 4. Exemplo de estratégias de entrega de aptameros G4. (A) Conjugado aptamero - anticorpo. (B) Conjugado polímero-aptamero com PEG e um ligando. (C) Conjugado aptamero - ligando de carboidrato triantenário, (D) Nanopartícula lipídica com PEG (E) Nanopartícula de ouro com revestimento de aptamero denso. (F) Nanoestrutura de DNA com aptamero e ligando. Adaptado de Juliano (Juliano, 2018).	9
Figura 5. Modelo para o mecanismo de acumulação seletiva do G4 AS1411 em células cancerosas. O G4 AS1411 é eficientemente absorvido em células cancerosas e normais nos primeiros momentos, mas por diferentes vias endocíticas. Posteriormente, o G4 AS1411 induz mais macropinocitose em células cancerosas, mas não em células normais. Estes efeitos são dependentes da NCL e resultam na seletividade do G4 AS1411 nas células cancerosas em comparação com as células normais. Adaptado de Bates e colaboradores (Bates <i>et al.</i> , 2017).	14
Figura 6. Exemplos do modo de ligação de pequenas moléculas (ligandos) com G4. Adaptado de Xiong e colaboradores (Xiong <i>et al.</i> , 2015).	16
Figura 7. Estrutura química dos ligandos de G4 derivados de laranja de acridina C ₃ , C ₅ e C ₈ (da esquerda para a direita), estudados por Carvalho e colaboradores (Carvalho <i>et al.</i> , 2017). ..	18
Figura 8. Estrutura química dos ligandos G4 derivados de fenantrolina [32]phen ₂ N ₄ , [30]phen ₂ N ₆ , [34]phen ₂ N ₆ e [16]phenN ₂ - (da esquerda para a direita), estudados por Carvalho e colaboradores (Carvalho <i>et al.</i> , 2017).	19

Figura 9. Síntese da 2,9 - dimetil - 1,10 - fenantrolina - 5,6 - diona, segundo Che e colaboradores (Che <i>et al.</i> , 2006).	23
Figura 10. Síntese da 2,9 - dimetil - 1,10 - fenantrolina - 5,6 - diona, segundo Zheng e colaboradores (Zheng <i>et al.</i> , 2010).....	24
Figura 11. Procedimento da síntese da 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona: (da esquerda para a direita) solução em agitação na placa após adição do KBrO ₃ ; extração líquido-líquido com água-diclorometano; evaporação do composto; recristalização em metanol aquecido; composto final.	25
Figura 12. Síntese de 7,10 - dimetilpirazino [2,3-f] [1,10] fenantrolina, segundo Garas e colaboradores (Garas e Vagg, 2000).....	25
Figura 13. Procedimento final da síntese do DiPyPhen(Me) ₂ : (da esquerda para a direita) solução em refluxo; a solução mudou de cor no final do tempo de refluxo, de vermelho para amarelo torrado; formação de cristais durante o processo de recristalização; composto final.	27
Figura 14. Síntese do 7,10 - dimetilpirazino [2,3-f] [1,10] fenantrolina - 3,6 - dicarboxaldeido.	27
Figura 15. Procedimento final da síntese do DiPyPhen(COH) ₂ : (da esquerda para a direita) adição do SeO ₂ com água; dissolução do DiPyPhen(Me) ₂ em dioxano; aspeto do filtrado após filtração a vácuo; aspeto do composto após evaporação; composto final.	29
Figura 16. Síntese do 7,10 - dimetilpirazino [2,3-f] [1,10] fenantrolinaciclo - 2,11 - dieno. .	29
Figura 17. Redução do 7,10 - dimetilpirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinaciclo - 2,11 - dieno.	30
Figura 18. Síntese do 3,6,9-triaza - (7,10) - pirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinaciclodecafenno - 2,9 - dieno, segundo Baudoin e colaboradores (Baudoin <i>et al.</i> , 1997).....	31
Figura 19. Redução do 3,6,9-triaza - (7,10) - pirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinaciclodecafenno - 2,9 - dieno, segundo Baudoin e colaboradores (Baudoin <i>et al.</i> , 1997).....	31
Figura 20. Estruturas químicas dos ligandos em estudo: (em cima, da esquerda para a direita) C ₈ , C ₈ -NH ₂ , C ₅ , C ₃ , (em baixo, da esquerda para a direita) [16]phenN ₂ , [32]phen ₂ N ₄ , DiPyPhen(Me) ₂ , PhenDC3.	33
Figura 21. Estrutura química da à 1,10-fenantrolina-5,6-diona.	43
Figura 22. Estrutura química dos ligandos G4 (A) DiPyPhenN ₄ e (B) DiPyPhenN ₅	44
Figura 23. Espectro de TDS resultante da subtração do espectro a 90 °C ao espectro a 20 °C. ..	45
Figura 24. Espectro de CD representativo da estrutura paralela do G4 AT11-L0 (10 µM) em 65 mM de KCl + 20 mM de KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄	46
Figura 25. Curvas de CD- <i>melting</i> do aptamero G4 AT11-L0 (10 µM, 65 mM KCl + 20 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄), com os ligandos (A) [16]phenN ₂ ; (B) [32]phen ₂ N ₄ ; (C) C ₈ ; (D)C ₈ -NH ₂ ; (E) C ₃ ; (F) C ₅ ; (G) DiPyPhen(Me) ₂ e (H) PhenDC3 titulados a 0,5; 1; 2 e 4 equivalentes molares. O ajuste da curva de Boltzmann dos pontos de dados é mostrado. A temperatura é definida pelo sistema Peltier.	48
Figura 26. Curvas de CD- <i>melting</i> do aptamero G4 AT11-L0 (10µM, 65 mM KCl + 20 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄), na ausência e presença de 4 equivalentes molares dos ligandos estudados. O	

ajuste da curva de Boltzmann dos pontos de dados é mostrado. A temperatura corresponde à temperatura definida pelo sistema Peltier..... 50

Figura 27. Titulações de fluorescência dos ligandos (A) [16]phenN₂; (B) [32]phen₂N₄; (C) C₈; (D) C₈-NH₂; (E) C₃; (F) C₅ (5µM, 100 mM KCl + 30 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄), com uma concentração crescente de AT11-L0 (concentrações 0 - 10 µM]. A seta identifica o sentido da variação de fluorescência ao longo da adição dos vários equivalentes. Apresentam-se também os gráficos da K_D obtidos pelas equações estipuladas para cada família de ligando, como uma função da concentração de G4 AT11-L0 (M⁻¹). 54

Figura 28. Curvas de IC₅₀ determinadas através de ensaio de MTT após uma semana de incubação com os ligandos (A) C₈; (B) C₈-NH₂; (C) C₃; (D) C₅ (E) [16]phenN₂ em células HeLa (esquerda) vs NHDF (direita). Os gráficos foram obtidos através do programa GraphPad Prism 8. 57

Figura 29. Viabilidade celular relativa às células HeLa determinada pelo ensaio MTT após 7 dias de incubação com os conjugados em estudo. 58

Figura 30. Viabilidade celular relativa às células NHDF determinada pelo ensaio MTT após 7 dias de incubação com os conjugados em estudo. 59

Figura 31. Imagens de microscopia confocal de células HeLa tratadas ao longo de 7 dias com o ligando C₈ (0,5 µM) (marcação a verde) e o aptamero AT11-L0 (1 µM) marcado com o fluoróforo Cy5 (vermelho). A sonda nuclear usada foi o Hoechst 33342 (azul). A barra de escala está a 10 µM. A formação do conjugado aptamero-ligando é evidenciada pelo aparecimento de amarelo. 61

Figura 32. Espectros de CD do AT11-L0 (10µM) (65 mM KCl), com os ligandos (A) [16]PhenN₂; (B) [32]Phen₂N₄; (C) C₈; (D)C₈-NH₂; (E) C₃; (F) C₅; (G) DiPyPhen(Me)₂ e (H) PhenDC3 titulados a 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 e 4 equivalentes molares. 74

Lista de Tabelas

Tabela 1. Atribuição dos desvios químicos para o DiPyPhen(Me) ₂ em CD ₃ OD.....	26
Tabela 2. Atribuição dos desvios químicos para o DiPyPhenN ₄ em CDCl ₃	30
Tabela 3. Concentrações usadas nos ligandos C ₈ , C ₈ -NH ₂ , C ₅ , C ₃ e [16]phenN ₂ , para determinação do IC ₅₀ em células HeLa, através de ensaio de MTT.	39
Tabela 4. Concentrações usadas nos ligandos C ₈ , C ₈ -NH ₂ , C ₅ , C ₃ e [16]phenN ₂ , para determinação do IC ₅₀ em células NHDF, através de ensaio de MTT.	39
Tabela 5. Nanosistemas conjugados usados no ensaio de MTT em células HeLa, com a respectiva concentração de cada ligando C ₈ , C ₈ -NH ₂ , C ₅ e C ₃	40
Tabela 6. Nanosistemas conjugados usados no ensaio de MTT em células NHDF, com a respectiva concentração de cada ligando C ₈ , C ₈ -NH ₂ , C ₅ e C ₃	40
Tabela 7. Estabilização térmica (ΔT_m) induzida pelos ligandos em estudo a 4 equivalentes molares medida por experiências de CD- <i>melting</i>	50
Tabela 8. Valores de K _D (M ⁻¹) determinados para o G4 AT11-L0 (100 mM de KCl + 30 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ ; 0 - 25 μ M) com os ligandos (5 μ M) em estudo obtido a partir de ensaios de espectroscopia de fluorescência, com tempo de equilíbrio de 10 min.	52
Tabela 9. Valores calculados de IC ₅₀ a partir do ensaio do MTT com os ligandos C ₈ , C ₈ -NH ₂ , C ₃ e C ₅ derivados de laranja de acridina e o ligando [16]phenN ₂ nas linhas celulares Hela e NHDF.	56
Tabela 10. Valores de percentagem de viabilidade celular obtida para os nanosistemas conjugados AT11-L0 (15 μ M) + C ₈ (0,125 μ M), AT11-L0 (15 μ M) + C ₈ -NH ₂ (0,250 μ M); AT11-L0 (15 μ M) + C ₃ (1 μ M); AT11-L0 (15 μ M) + C ₅ (1 μ M) incubados em células HeLa durante 7 dias.	58
Tabela 11. Valores da percentagem de viabilidade celular obtida para os nanosistemas conjugados AT11-L0 (15 μ M) + C ₈ (1 μ M), AT11-L0 (15 μ M) + C ₈ -NH ₂ (2 μ M); AT11-L0 (15 μ M) + C ₃ (2 μ M); AT11-L0 (15 μ M) + C ₅ (2 μ M) incubados em células NHDF durante 7 dias.	59

Lista de Acrónimos

HPV	Vírus do papiloma humano
IFP	Pressão de Fluido Intersticial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
Estrutura 3D	Estrutura tridimensional
K_D	Constante de Dissociação
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i>
G4	G-quadruplex
MRI	Imagiologia de Ressonância Magnética
Quarteto-G	Quarteto de G-quadruplex
Tétrada-G	Tétrada de G-quadruplex
HIV	Virus da imunodeficiência humana
NPs	nanopartículas
PET	Tomografia por emissão de positrões
SPECT	Tomografia computadorizada de emissão de um único fóton
SPR	Ressonância plasmônica de superfície
NCL	Nucleolina
CD	Dicroísmo Circular
FRET	Transferência Ressonante de energia por fluorescência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TDS	Espetro de diferença térmica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RBD	Domínio de ligação ao RNA
rRNA	RNA ribossômico
mRNA	RNA mensageiro
Arg	Arginina
Gli	glicina
T_m	Temperatura de <i>melting</i>
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy</i>
NMWL	Peso molecular nominal limite
NHDF	Fibroblastos humanos dérmicos normais
HeLa	Células cervicais humanas cancerosas
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
FBS	Soro fetal bovino
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
C _γ 5	Cianina 5
DAPI	4,5-diamidino-2-fenilindole
FITC	Isotiocianato de fluoresceína

Capítulo 1

Introdução

O cancro é atualmente uma das principais causas globais de mortalidade, ultrapassado apenas por doenças cardiovasculares, sendo que o número de indivíduos afetados por este tipo de patologia tem aumentado a um ritmo alarmante (Pérez-Herrero *et al.*, 2015; Hassanpour *et al.*, 2017; Aftab *et al.*, 2018).

É uma doença que envolve a divisão descontrolada de células, imortalidade replicativa e resistência à morte celular de modo que, as células cancerosas crescem dando origem a uma massa celular anormal chamada tumor, exceto nos casos de cancro hematológico, em que as células replicam-se espalhando-se pelo sangue, sistemas linfáticos e medula óssea. A sua incidência apresenta grandes diferenças a nível tecidual, resultado de uma série de mutações nos genes que alteram as funções celulares, sobretudo devido à formação de oncogenes e, por outro lado, à falta de genes supressores de tumor desencadeantes de uma divisão descontrolada de células. Essa variedade é um grande desafio para o seu diagnóstico e tratamento específicos. Na origem das mutações está uma série de motivos, entre eles compostos químicos, fatores ambientais, radiação, mas também vírus e bactérias (Pérez-Herrero *et al.*, 2015; Hassanpour *et al.*, 2017).

Os tipos de cancro mais incidentes no homem são o da próstata, pulmão e brônquios, colorretal e bexiga urinária; enquanto que na mulher a prevalência de cancro é mais alta na mama, também pulmão e brônquios, colorretal, e ainda colo do útero e tiroide (Hassanpour *et al.*, 2017). Destacar o cancro do cólo do útero que, em todo o mundo, é a quarta razão mais comum para a mortalidade por cancro na mulher, sendo mais de 90% dos casos provocados por infecções pelo vírus do papiloma humano (HPV). Existem diversos tipos de HPV que podem aumentar as chances de desenvolver este tipo de cancro e também determinar a agressividade da doença. Para além disso, estes carcinomas dividem-se em quatro tipos de acordo com o grau de invasão dos tecidos uterinos, sendo que mulheres cujo tumor é descoberto nos estadios mais avançados - III e IV - têm uma taxa de sobrevivência que varia apenas entre 15% e 40% (Deverakonda *et al.*, 2016).

A abordagem terapêutica convencional contra o cancro do cólo do útero inclui cirurgia (histerectomia), radioterapia e quimioterapia, que podem causar sérios efeitos colaterais devido à sua toxicidade não específica associada (Sun *et al.*, 2014; Xiang *et al.*, 2015). Para além disso, o sucesso da quimioterapia depende da entrega bem-sucedida nos tecidos tumorais,

em detrimento dos tecidos normais. A entrega de uma dose inadequada às células cancerosas é responsável, não só pelo aumento da resistência do tumor aos fármacos, como também à recorrência do tumor devido à persistência de células tumorais residuais (Pérez-Herrero *et al.*, 2015; Xiang *et al.*, 2015; Deverakonda *et al.*, 2016).

Os fatores envolvidos na entrega e metabolismo de um fármaco quimioterápico ao tumor são: (1) a angiogênese tumoral, que é caracterizada pela superprodução não controlada de novos vasos sanguíneos que não possuem tamanho e densidade normais, prejudicando a perfusão de fluídos e o transporte dos fármacos antitumorais, o que por sua vez compromete a eficácia do tratamento e contribui para a ocorrência de metástases e/ou recorrência do tumor; (2) pressão de fluido intersticial (IFP) elevada, o que diminui as funções vasculares e capilares e limita a exposição, distribuição e absorção de fármacos por células tumorais, resultando na falha na terapia anticancerígena, associada a uma drenagem linfática baixa; (3) matriz extracelular e estrutura intersticial densas, constituindo também uma barreira contra um transporte eficaz de fármacos antitumorais; (4) densidade celular do tumor elevada, que promove também a IFP e contribui para a compressão dos vasos sanguíneos, diminuindo a eficácia do transporte dos fármacos antitumorais e, ainda, (5) o ambiente tumoral ácido, uma vez que a chegada de nutrientes às células está comprometida assim como o transporte de oxigênio. As células tumorais em meio a pH ácido são mais difíceis de eliminar, promovendo a ineficácia dos fármacos antitumorais (Xiang *et al.*, 2015).

Por conseguinte, as terapias convencionais enfrentam sérias limitações associadas à baixa seletividade dos fármacos para com o tecido afetado, à eliminação sistêmica rápida, à baixa acumulação intratumoral e à resistência por parte do tumor, que levam a efeitos adversos devido à mielossupressão e à cardiotoxicidade (Kim *et al.*, 2018). Além de que a entrega não específica e sistêmica dos fármacos leva à sua rápida eliminação sendo necessária a administração da dose tolerável mais alta, o que não é viável do ponto de vista econômico e geralmente promove a alta toxicidade (Xiang *et al.*, 2015; Bahrami *et al.*, 2017).

1.1. Entrega de fármacos mediada por aptâmeros para terapia anticancerígena direcionada

Tendo em conta os fatores suprarreferidos, o objetivo principal da investigação que se faz a nível de terapias contra o cancro é melhorar as taxas de resposta ao tratamento e a sobrevivência global dos pacientes, ultrapassando esses fatores limitantes. Para atingir esse objetivo tem-se verificado que é necessário um sistema de direcionamento de terapias antitumorais que atuem preferencial e seletivamente nas células cancerosas (Pérez-Herrero *et al.*, 2015; Xiang *et al.*, 2015; Aftab *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018).

Para contornar estas dificuldades, a administração direcionada de agentes anticancerígenos diretamente às células cancerosas é uma estratégia altamente almejada para tratar tumores

malignos sem afetar as células normais, tendo em vista, por um lado, a redução do potencial citotóxico em tecidos normais e, por outro, o aumento do índice terapêutico, surgindo assim o conceito de terapia direcionada ou terapia-alvo (Hori *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2018). Este tipo de terapia pretende discriminar as pequenas diferenças entre células normais e cancerosas sendo, por isso, mais eficaz que outros tratamentos convencionais e exibindo menos efeitos adversos (Pérez-Herrero *et al.*, 2015; Bahrami *et al.*, 2017).

Entre as diferentes abordagens a ter em consideração a nível desta terapia direcionada para células cancerosas há que ter em conta diferenças fundamentais na organização de vasculaturas entre os tecidos normais e tumorais, para obter a acumulação preferencial dos fármacos antitumorais de tamanho nanométrico nos tumores. Assim sendo, pretende-se dirigir os fármacos, com a ajuda de transportadores específicos, para células tumorais e promover a sua subsequente entrada celular através da endocitose mediada por recetores (Xiang *et al.*, 2015).

Os agentes de diagnóstico e quimioterápicos podem ser ligados a biomoléculas de reconhecimento específicas para o tumor tais como anticorpos, péptidos e aptameros, através da ligação covalente ou supramolecular, promovendo a sua entrega celular (Xiang *et al.*, 2015; Mokhtarzadeh *et al.*, 2016); esta abordagem promove o aumento da acumulação, internalização e retenção específica de fármacos em tumores através das interações mediadas por moléculas transportadoras específicas, aumentando assim a eficácia terapêutica. No entanto, a seleção de alvos específicos, bem como do tipo de molécula é fundamental para minimizar os efeitos colaterais e maximizar as respostas apropriadas contra as células cancerosas (Pérez-Herrero *et al.*, 2015; Xiang *et al.*, 2015; Aftab *et al.*, 2018).

Entre estas diversas biomoléculas, destacar os aptameros, como sendo os alvos de interesse neste estudo, uma vez que podem funcionar como agentes de direcionamento podendo conduzir moléculas de interesse terapêutico para o local de ação específico e, portanto, restringir a biodistribuição e eliminar efeitos adversos, pelo que, até à data, uma vasta gama de moléculas foi funcionalizada com aptameros para entrega direcionada (Mokhtarzadeh *et al.*, 2016).

Aptameros de ácidos nucleicos são moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples, geralmente com um comprimento entre 25 a 60 pares de bases, que se dobram em estruturas tridimensionais (3D) específicas. Possuem constantes de dissociação (K_D) geralmente na gama do pico a nanomolar e são extremamente estáveis à desnaturação térmica, podendo ligar-se a uma variedade de alvos, como proteínas, iões metálicos, vírus, bactérias e células inteiras, com alta afinidade e especificidade (Sun *et al.*, 2014; Xiang *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2016; Kwok e Merrick, 2017; Platella *et al.*, 2017).

De facto, apesar dos anticorpos serem as moléculas mais utilizadas devido à sua alta especificidade e ampla disponibilidade, recentemente os aptameros emergiram como uma alternativa atrativa, sendo até conhecidos como anticorpos químicos. Está, inclusive, descrito que a libertação eficaz de fármacos para tumores pode ser conseguida utilizando aptameros direcionados para alvos específicos do ambiente tumoral, nomeadamente, proteínas alvo, mas também fatores de transcrição e fatores de crescimento, através de reconhecimento estrutural, numa ligação análoga à anticorpo-antigénio (Rosenberg *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2014; Xiang *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018). Este direcionamento orientado por aptameros é uma das grandes vantagens que permite o aumento da entrega de agentes terapêuticos para tumores, bem como uma redução na toxicidade e efeitos colaterais, minimizando a exposição de tecidos normais ao agente terapêutico. Sendo que, um dos grandes desafios atuais é precisamente identificar aptameros que liguem especificamente aos vários marcadores expressos pelas células cancerosas (Xiang *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2018).

Cada aptamero pode adotar um subconjunto de estruturas definidas pela combinação de emparelhamento de bases, ligações eletrostáticas, pontes de hidrogénio e interações intramoleculares não canónicas e possuem um *fold*ing tridimensional característico. Esta complexidade estrutural resulta em uma alta probabilidade de selecionar um aptamero que possa interagir com alta afinidade e especificamente com o alvo de interesse (Xiang *et al.*, 2015; Platella *et al.*, 2017). Os aptameros ligam-se aos seus alvos através da complementaridade formando um complexo aptamero-alvo. Por exemplo, podem ligar-se a uma proteína alvo e modular as suas funções interferindo na interação proteica com os seus parceiros naturais (Xiang *et al.*, 2015).

A utilização dos aptameros enquanto agentes terapêuticos deve-se ainda ao aumento da captação celular, dado que podem penetrar no tumor muito mais eficientemente devido ao reduzido tamanho cerca de 20 - 25 vezes em comparação com uma vasta maioria de anticorpos monoclonais, à não-imunogenicidade e aos baixos custos de produção, ultrapassando as limitações impostas pelos anticorpos usados habitualmente (Sun *et al.*, 2014; Xiang *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2016; Kwok e Merrick, 2017; Platella *et al.*, 2017). Para além de que, tal como os anticorpos, os aptameros entram nas células via endocitose, através da ligação a alvos específicos à sua superfície, mas com a vantagem de uma vez selecionados, poderem ser sintetizados quimicamente em vez de serem produzidos em animais ou células cultivadas de mamíferos, simplificando assim a sua produção, reprodutibilidade e qualidade terapêutica; o que representa uma vantagem fundamental para o desenvolvimento comercial (Sun *et al.*, 2014; Xiang *et al.*, 2015). Para além disso, permitem uma seleção do *design* e modificações apropriadas para que seja possível obter a farmacocinética e perfil de biodistribuição específico para aplicações clínicas (Do *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018), recorrendo a modificações químicas para melhorar o diagnóstico e terapêutica (Sun *et al.*, 2014; Darmostuk *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2016; Kwok e Merrick, 2017; Hori *et al.*, 2018).

Os aptameros de interesse são identificados e selecionados a partir de *pools* de oligonucleótidos de sequência aleatória, através de um processo *in vitro* designado SELEX, sigla do inglês “*Systematic evolution of ligands by exponential enrichment*”, que consiste num conjunto essencial de três etapas (ver figura 1): (1) ligação ou captura, em que um aptamero selecionado aleatoriamente a partir de uma biblioteca é incubado com a molécula alvo desejada em condições pré-definidas; (2) particionamento, em que os aptameros ligados ao alvo são separados dos não ligados; (3) amplificação, que consiste na amplificação de uma *pool* rica nos aptameros selecionados. Durante esses processos, os melhores aptameros para o alvo selecionado são enriquecidos, sendo a complexidade da biblioteca inicial diminuída (Sun *et al.*, 2014; Darmostuk *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2016; Platella *et al.*, 2017).

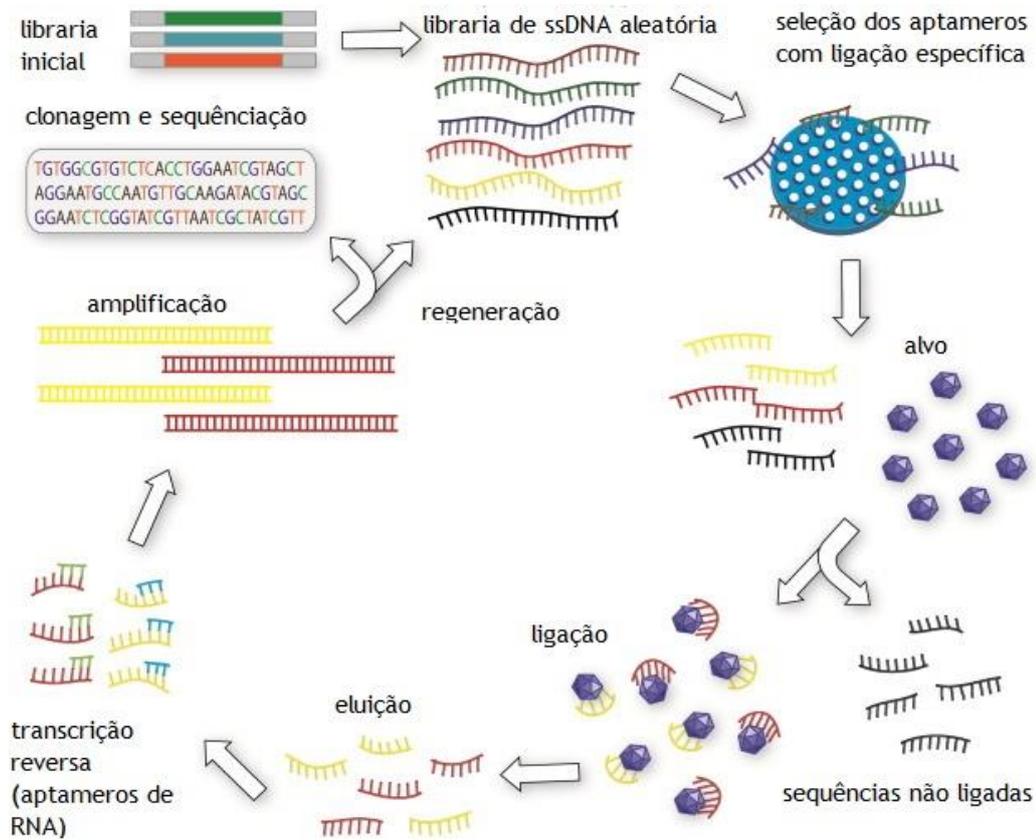


Figura 1. Princípio básico do processo SELEX. A seleção começa a partir da construção de uma biblioteca inicial de oligonucleótidos, que é diretamente conduzida ao processo de seleção. Após a remoção de aptameros ligados não especificamente, um conjunto de oligonucleótidos é incubado com o alvo. Sequências não ligadas são removidas; os oligonucleótidos ligados ao alvo são recolhidos e encaminhados para amplificação por PCR. Após várias repetições de seleção, as etapas de clonagem e sequenciamento são realizadas, seguidas pela avaliação da afinidade dos aptameros enriquecidos para o alvo. Adaptado de Darmostuk e colaboradores (Darmostuk *et al.*, 2015).

1.2. Aptameros de G-quadruplex

Entre os vários aptameros de ácidos nucleicos com putativo interesse, destacam-se os ricos em guanina, que formam conformações de G-quadruplex (G4) em condições fisiológicas (Bates *et al.*, 2009; Do *et al.*, 2017; Platella *et al.*, 2017).

O G4 é uma estrutura não-canônica tipicamente adotada por oligonucleótidos ricos em guanina, consistindo em dois elementos principais: núcleos e *loops*. A unidade central é um quarteto de guanina (quarteto-G), também designado téttrade de guanina (téttrade-G), isto é, um arranjo plano cíclico de quatro guaninas ligadas através de ligações de hidrogênio do tipo *Hoogsteen*, tal como exemplifica a figura 2. Os núcleos correspondem a camadas empilhadas de quartetos-G, que gera um motivo G4 estabilizado por catiões posicionados na cavidade central da estrutura; enquanto os *loops* são sequências de ligação entre núcleos (Métifiot *et al.*, 2014; Xiong *et al.*, 2015; Do *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2017; Platella *et al.*, 2017).

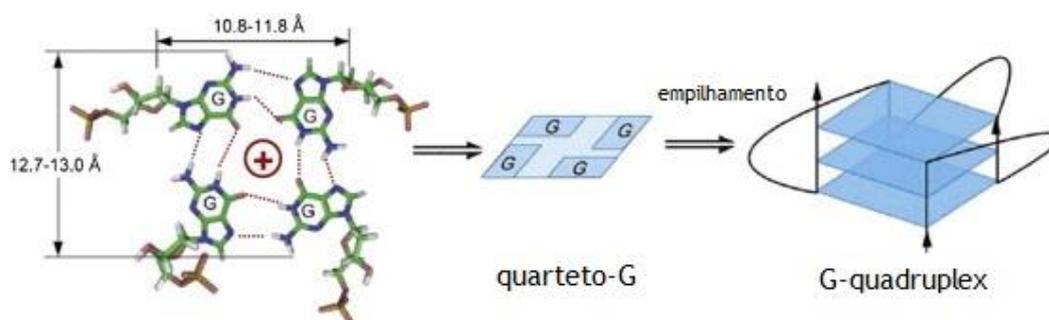


Figura 2. Estrutura do quarteto-G e do G4. Adaptado de Xiong e colaboradores (Xiong *et al.*, 2015).

Como se pode verificar na figura 3, as guaninas podem adotar uma conformação de ângulo de ligação glicosídica *syn* ou *anti*. Conseqüentemente, cada um dos quartetos-G que formam o núcleo da estrutura pode ser ligado na mesma direção ou em direções opostas em relação aos seus dois vizinhos através dos *loops*, formando conformações paralelas, antiparalelas ou híbridas. Dependendo dessas orientações, os blocos de guanina formados delimitam quatro sulcos com carga negativa de tamanhos diferentes: estreito, médio ou largo (Métifiot *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2017).

As estruturas de G4 podem, ainda, ser formadas não apenas intramolecularmente dentro de sequências de ácido nucleico de cadeia simples, mas também intermolecularmente a partir de duas ou mais cadeias individuais. Para estruturas intramoleculares os quartetos-G pertencem ao mesmo oligonucleótido e estão ligados por regiões designadas *linkers*, sendo que nestes casos os *loops* podem adotar três configurações diferentes: lateral, diagonal ou em hélice. Já estruturas de G4 intermoleculares são constituídas por quartetos-G pertencentes a duas ou quatro cadeias diferentes, apresentado na figura 3. Nestes casos, os blocos de guaninas também podem ser interrompidos por um a sete nucleótidos não G, que resultam em protuberâncias

que se originam do núcleo G4 e que se designam *bulges* (também observável na figura 3.(e)) (Murat e Balasubramanian, 2011; Peduto *et al.*, 2011, Métifiot *et al.*, 2014; Cao *et al.*, 2017).

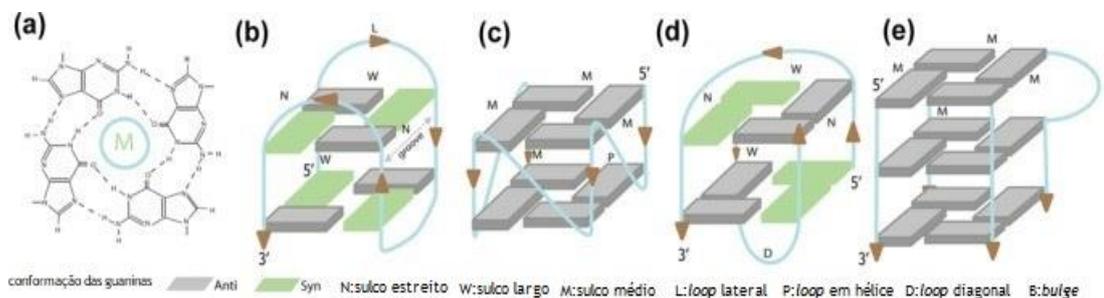


Figura 3. Representação esquemática das topologias G4. (a) Quarteto de guanina estabilizado por oito ligações de hidrogênio de *Hoogsteen* e um cátion monovalente central (M). (b) Topologia G4 antiparalela intramolecular com dois quartetos, sulcos largos e estreitos e *loops* laterais. (c) Topologia G4 paralela intramolecular com dois quartetos, sulcos médios e *loops* de hélice. (d) Topologia G4 antiparalela dimérica com dois quartetos, sulcos largos e estreitos e *loops* diagonais. (e) Topologia tetramolecular G4 paralela com três quartetos, sulcos médios e sem *loops*. Adaptado de Métifiot e colaboradores (Métifiot *et al.*, 2014).

Deste modo, uma das características exibidas pelas estruturas de G4 é o seu elevado polimorfismo (Do *et al.*, 2017), sendo este dependente de vários fatores, entre eles: (1) o caráter intramolecular ou intermolecular do sistema; (2) o tipo de sequência oligonucleotídica: DNA, RNA ou híbrido; (3) a orientação paralela, antiparalela ou híbrida dos quartetos ricos em guanina na montagem do G4; (4) o comprimento, a sequência e a direção dos *loops* diagonais, laterais ou em hélice; (5) a orientação *syn* ou *anti* das guaninas em torno das ligações N-glicosídicas; (6) o ambiente em solução, isto é, a presença de determinados íons como o K^+ , Na^+ , Sr^{2+} , Cu^{2+} e a presença de ligandos que contribuem para a sua estabilidade (Xiong *et al.*, 2015; Do *et al.*, 2017; Platella *et al.*, 2017; Che *et al.*, 2018).

Adicionalmente, verificou-se que muitas das sequências em G4 existem naturalmente nos cromossomas e têm sido associadas a reguladores de processos biológicos, incluindo a replicação, transcrição e tradução do DNA, prevalecendo em telómeros e promotores associados ao desenvolvimento cancerígeno, o que se tem verificado de extrema importância, uma vez que a compreensão dos princípios de como o G4 medeia a expressão génica nas células, pode também ser um ponto de partida para o desenvolvimento de novas aplicações biológicas (Li *et al.*, 2009; Sidibe *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2017; Kwok e Merrick, 2017).

Os aptameros de G4 demonstraram ainda ser eficazes para uma diversidade de alvos, como trombinas, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e células cancerosas (Do *et al.*, 2017); sendo que, no que diz respeito a este último ponto, tem sido demonstrado que os aptameros de G4 conseguem inibir o crescimento de células cancerosas sem afetar as restantes (Malik *et al.*, 2015). Devido à seletividade que estes demonstraram possuir para células cancerosas têm sido efetuados inúmeros estudos no sentido de compreender os mecanismos relacionados com o seu modo de atuação, uma vez que, devido à sua capacidade de se ligarem e inibirem certas proteínas celulares envolvidas na carcinogénese e progressão tumoral podem ser considerados

promissores agentes de terapia direcionada específica contra as células cancerosas (Malik *et al.*, 2015; Platella *et al.*, 2017; Ogloblina *et al.*, 2018).

1.2.1. Terapias direcionadas mediadas por aptameros de G4

Os aptameros de G4 apresentam, no entanto, algumas desvantagens, nomeadamente, são naturalmente suscetíveis à degradação por exo e/ou endonucleases, levando a uma meia-vida circulatória *in vivo* reduzida e ainda, a possibilidade de uma internalização ineficiente nas células e a remoção rápida de aptamero da circulação por filtração renal, já que a maioria tem um tamanho menor que o limiar de filtração renal de 40 kDa, o que diminui ainda mais o tempo de meia-vida do aptamero. Para alcançar o tempo de meia-vida desejado no soro terá de haver um aprimoramento da síntese dos mesmos e o desenvolvimento de novas estratégias (Bates *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2015).

Deste modo, têm sido inúmeras as novas estratégias desenvolvidas nomeadamente no que toca ao desenvolvimento de nanosistemas de entrega de fármacos especificamente para células cancerosas envolvendo este tipo de aptameros, sendo este um campo promissor na biomedicina que se traduz em inúmeras aplicações práticas (Li *et al.*, 2012).

Existem diversas abordagens para o uso de aptameros tais como: (1) Nanosistemas conjugados aptameros - ligandos, que permitem a associação covalente ou não-covalente (supramolecular) de aptameros a potenciais moléculas terapêuticas ou/e com capacidade de estabilização do G4 ou até fármacos quimioterápicos já existentes aumentando a sua eficácia ao direcioná-los para os tecidos-alvo (os quais serão aprofundados posteriormente); (2) Terapia génica mediada por aptameros; (3) Imunoterapia mediada por aptameros, dado que estes podem mimetizar anticorpos proteicos para executar funções de imunoterapia; (4) Formulações com nanopartículas (NPs) - aptameros, uma vez que as NPs podem aumentar o tempo de meia-vida e a quantidade de fármaco transportado pelo aptamero, além das suas características comuns, como biocompatibilidade para aplicações clínicas e tamanho e forma uniformes para uma biodistribuição eficaz (Sun *et al.*, 2014; Malik *et al.*, 2015; Xiang *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2017; Juliano, 2018; Kim *et al.*, 2018).

Os aptameros de G4 podem também ser conjugados com moléculas fluorescentes, agentes de contraste para ressonância magnética de imagem (MRI), radioisótopos para tomografia por emissão de positrões (PET) e tomografia computadorizada de emissão de um único fóton (SPECT), para a deteção do tumor primário e metástases, mas também para deteção de infecções virais e bacterianas agudas. Estes conjugados podem ser também utilizados como biomarcadores tumorais, funcionando como agentes de diagnóstico e teragnóstico, dado que são agentes de direcionamento específicos promissores com aplicação comprovada na imagiologia e terapia. Podem ainda constituir sistemas multicomponentes de deteção de proteínas em *Western blot*, cromatografia, ensaios de ressonância plasmónica de superfície

(SPR), *microarrays* e biosensores (Sun *et al.*, 2014; Darmostuk *et al.*, 2015; Xiang *et al.*, 2015; Xiong *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2016; Kwok e Merrick, 2017; Platella *et al.*, 2017; Hori *et al.*, 2018).

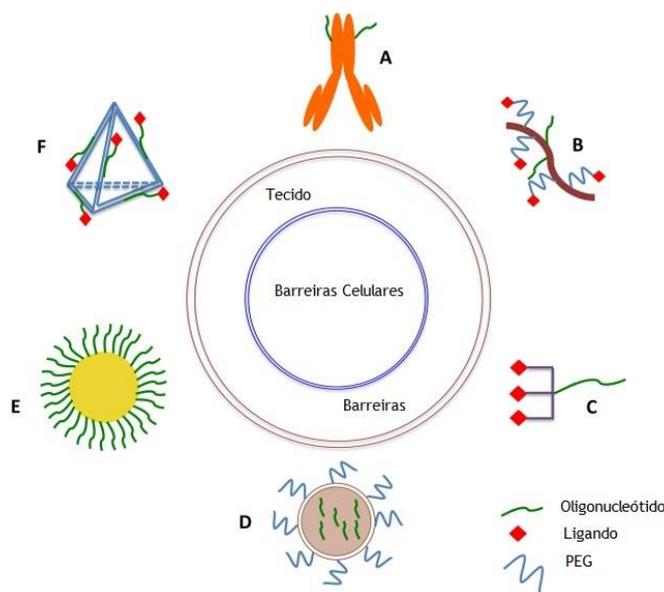


Figura 4. Exemplo de estratégias de entrega de aptameros G4. (A) Conjugado aptamero - anticorpo. (B) Conjugado polímero-aptamero com PEG e um ligando. (C) Conjugado aptamero - ligando de carboidrato triantenário, (D) Nanopartícula lipídica com PEG (E) Nanopartícula de ouro com revestimento de aptamero denso. (F) Nanoestrutura de DNA com aptamero e ligando. Adaptado de Juliano (Juliano, 2018).

Em suma, estudos mostraram que o efeito terapêutico da combinação de aptameros de G4 com ligandos, nanopartículas, moléculas fluorescentes entre outras constituem diferentes nanosistemas de libertação de fármacos que contribuem para a melhoria dos efeitos terapêuticos e para a redução das reações adversas, abordagem que se tem revelado de enorme valor no tratamento anticancerígeno. Estes nanosistemas como ferramentas de terapia anticancerígena direcionada destacam-se pela sua alta capacidade de carga, distribuição preferencial e aprimorada, sensibilidade ao ambiente tumoral e versatilidade na conjugação com diferentes moléculas (Mokhtarzadeh *et al.*, 2016).

1.2.2. Métodos experimentais para o estudo de aptameros de G-quadruplex

Vários métodos experimentais foram desenvolvidos para elucidação estrutural dos aptameros de G4 e complexos. Estes métodos podem ser definidos em duas classes essenciais: métodos biofísicos e biológicos, também designados bioquímicos ou *in vitro* (Murat e Balasubramanian, 2011; Kwok e Merrick, 2017).

Alguns dos métodos biofísicos mais comuns que permitem estudar estruturalmente aptameros de G4 são: espectroscopia de dicroísmo circular (CD), no qual os espectros apresentam sinais positivos e/ou negativos em comprimentos de onda específicos sendo que, a topologia paralela de G4 possui sinais de CD negativos e positivos a 240 e 262 nm,

respetivamente; enquanto a topologia antiparalela é caracterizada pelo aparecimento de sinais a 262 e 295 nm, respetivamente; *CD-melting*, *UV/VIS-melting* e transferência ressonância de energia por fluorescência (FRET), que permitem estudar a termoestabilidade de estruturas de G4, de forma isolada ou na presença de outras moléculas; ressonância magnética nuclear (RMN), uma vez que estas estruturas possuem desvios químicos característicos correspondentes aos prótons imino (10.5-12.0 ppm) e ainda, espectroscopia de diferença térmica (TDS) que permite identificar a formação da estrutura de G4. Algoritmos *in silico* também se encontram disponíveis para prever a formação de G4 em sequências de ácidos nucleicos e ainda a sua estabilização quando usados conjugados com ligandos (Murat e Balasubramanian, 2011; Xiong *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2017; Kwok e Merrick, 2017; Carvalho *et al.*, 2018).

Os métodos *in vitro* utilizados para o estudo de aptameros de G4 são: ensaios de viabilidade celular em diversas linhas celulares; ensaios de colocalização com recurso a microscopia de fluorescência confocal, para o estudo de direcionamento no interior das células; a reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite estudar a estabilidade do G4 com outras moléculas e também o ensaio de degradação em soro (SDA). Também existem modelos de animais para o estudo da citotoxicidade e biodistribuição (Malik *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2018).

1.3. Aptamero de G4: AS1411

O aptamero de G4 designado inicialmente por AGRO100 e posteriormente por AS1411 é um oligodesoxinucleotido fosfodiéster sintético, rico em guaninas, de 26 nucleótidos com a sequência 5'- GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG -3' e que foi inicialmente reportado por Bates e colaboradores, tendo, desde então, sido alvo de estudo enquanto potencial agente terapêutico com propriedades principalmente anticancerígenas (Fan *et al.*, 2016; Bates *et al.*, 2017; Do *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2018).

Os efeitos do AS1411 incluem a inibição da proliferação celular e a indução da morte celular em vários tipos de células cancerosas, tendo efeitos mínimos nas células normais (Bates *et al.*, 2017; Do *et al.*, 2017). Nomeadamente, estudos realizados com o AS1411 em linhas celulares humanas de carcinoma da próstata (DU145) e do pulmão (A549) reportaram que o IC₅₀ do AS1411 se encontra no intervalo de concentração de 2 µM. E também que, uma incubação de 7 dias com o AS1411 a 10 µM induzia mais de 60% de morte em três linhas celulares diferentes de leucemias e duas de linfoma. Um estudo de biodistribuição e atividade antitumoral *in vivo* em modelos de ratinhos permitiu observar a acumulação do AS1411 no tumor (Ireson e Kelland, 2006; Ashrafuzzaman *et al.*, 2014).

O AS1411 também está a ser amplamente usado como aptamero de direcionamento para o tumor, uma vez que pode direcionar uma variedade de moléculas ou nanomateriais especificamente para tecidos tumorais e para o interior das células cancerosas (Malik *et al.*,

2015; Reyes-reyes *et al.*, 2015). Em suma, há uma forte evidência de que o AS1411 é um agente de direcionamento eficaz para entregar fármacos nas células cancerosas. Além disso, pode haver várias vantagens em usar o aptamero de G4 AS1411 em comparação com estratégias alternativas, incluindo: (1) possui um tamanho inferior ao dos anticorpos monoclonais, o que facilita a ligação de outras moléculas a este aptamero sem comprometer a sua capacidade de acesso ao tumor; (2) facilidade de produção e estabilidade após armazenamento relativamente aos anticorpos; (3) tem ação anticancerígena em diversos tumores; (4) não é imunogénico e provou ter segurança clínica em ensaios em humanos, como se irá abordar *à posteriori* (Reyes-reyes *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2017).

Devido ao seu potencial terapêutico, este aptamero G4 tem sido alvo de vários estudos com objetivo de melhorar a sua estabilidade e propriedades biológicas, principalmente através de modificações químicas; tendo como principais objetivos promover a resistência às nucleases do soro e a melhoria da afinidade (Fan *et al.*, 2016, Bates *et al.*, 2017) . No entanto, identificar as estruturas biologicamente relevantes do AS1411 tem-se demonstrado um problema não resolvido e é especialmente desafiante pelo facto desta sequência exibir elevado polimorfismo estrutural em solução, como é característico das estruturas G4. De facto, o AS1411 pode formar uma variedade de monómeros e dímeros de estruturas G4 *ex vivo* em tampões fisiológicos sendo que, as evidências sugerem que o tipo de quadruplex formado *in vivo* pelo AS1411 pode ser influenciado por uma série de fatores, como a ligação de proteínas e a localização celular (Bates *et al.*, 2017).

Consequentemente, ainda não se conseguiu perceber de que forma a estrutura do AS1411 está relacionada com a sua atividade biológica; sabendo-se que a formação do G4 é necessária, ainda que não suficiente para os seus efeitos antiproliferativos sendo que, a atividade antiproliferativa seletiva para células cancerosas e a sua internalização celular eficientes são propriedades de oligonucleótidos ricos em guaninas como referido anteriormente (Bates *et al.*, 2017).

1.3.1. Mecanismo de direcionamento do AS1411 para o alvo nucleolina

Determinou-se que o principal alvo do G4 AS1411 é a nucleolina (NCL), uma proteína ubíqua e multifuncional que se encontra essencialmente na matriz nuclear da maioria das células, mas também no citoplasma e membrana celular e que participa na biogénese dos ribossomas e desempenha papéis essenciais na sobrevivência, crescimento e proliferação celular (Malik *et al.*, 2015; Do *et al.*, 2017; Jia *et al.*, 2017; Platella *et al.*, 2017).

A multifuncionalidade da NCL resulta sobretudo dos três domínios que a constituem: domínio N-terminal, domínio central e domínio C-terminal. O domínio N-terminal contém regiões ácidas (ricas em ácido glutâmico e aspártico), que são os locais de fosforilação de múltiplas proteínas que controlam o ciclo celular e participa na transcrição de rRNA regulando-

a ao interagir com a cromatina. O domínio central contém quatro motivos de reconhecimento e ligação de RNA (RBDs), sendo que durante a transcrição de pré-RNA ribossômico (pré-rRNA), a NCL atua como uma chaperona ajudando o pré-rRNA a dobrar corretamente; para além disso este domínio está envolvido em vários processos biológicos como o empacotamento de RNA, *splicing* de pré-mRNA e estabilização de RNA mensageiro (mRNA). O domínio C-terminal é o mais externo e é rico em arginina (Arg) e resíduos de glicina (Gli), contendo muitas repetições de Arg-Gli-Gli que intercalam com aminoácidos aromáticos; este domínio interage com ácidos nucleicos, sendo também considerado um domínio de interação de proteínas, está envolvido na importação nuclear de proteínas ribossômicas e também no controlo de entrada de vírus (Jia *et al.*, 2017).

Em células cancerosas a NCL pode ser sobreexpressa no citoplasma e à superfície das mesmas e os níveis estão diretamente associados à proliferação deste tipo de células, uma vez que é extremamente elevada em células que se dividem rapidamente, desempenhando papéis importantes na transformação maligna e na progressão do cancro (Reyes-Reyes *et al.*, 2010; Rosenberg *et al.*, 2014; Reyes-Reyes *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2016). A NCL encontrada à superfície das células cancerosas medeia a absorção de vários fatores de crescimento que contribuem para o crescimento das células cancerosas; já a NCL citoplasmática aumenta os níveis de mRNAs que contribuem para a sobrevivência celular. Portanto, ambas as formas não nucleares são encontradas preferencialmente em células cancerosas - tendo funções que ajudam estas células a sobreviver, mas que são dispensáveis em células normais (Reyes-Reyes *et al.*, 2010; Malik *et al.*, 2015; Reyes-Reyes *et al.*, 2015; Jia *et al.*, 2017). Foi demonstrado que a expressão de NCL regula significativamente vários tecidos tumorais, como gliomas, cancro tiroideio, mamário, pulmão, gástrico, carcinoma hepatocelular, pancreático, colorretal, renal, próstata, colo do útero e melanomas, uma vez que regula várias vias de sinalização envolvidas na temorigénese (Jia *et al.*, 2017).

No entanto, ao encontrar-se presente em grandes quantidades na superfície das células cancerosas, pode funcionar como recetor para inúmeras moléculas e, não só mediar a internalização celular, mas também mediar a sinalização das várias moléculas através da membrana plasmática, tornando este tipo de células alvos altamente seletivos no processo cancerígeno (Reyes-Reyes *et al.*, 2010; Reyes-Reyes, *et al.*, 2017). Consequentemente, algumas moléculas com capacidade de ligação à NCL, sejam elas aptameros, anticorpos ou péptidos, tal como o aptamero AS1411, acumulam-se seletivamente em células cancerosas e podem provocar a sua morte, sem prejudicar as restantes células (Reyes-Reyes *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Malik *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2017). Assim, a NCL é um alvo útil para o desenvolvimento de ferramentas de imagem para o diagnóstico de cancro e para a libertação direcionada de fármacos quimioterápicos, que podem atingir a superfície das células tumorais e inibir os comportamentos malignos das mesmas sem afetar as restantes (Bates *et al.*, 2009; Jia *et al.*, 2017).

Atualmente o modelo prevalente que explica a internalização do AS1411 em células cancerosas indica que, no processo cancerígeno a NCL é deslocada para o citoplasma e superfície das células através de uma via secretória não convencional, como resposta a estímulos mitogénicos sendo que, o aptamero liga-se ao domínio externo da NCL, formando um complexo aptamero-NCL que é depois absorvido por este tipo de células, através de um processo dependente de actina e cálcio. O complexo internalizado aptamero-NCL inibe a replicação do DNA, resultando em acumulação de células na fase S e em citotoxicidade contra as células cancerosas. No entanto, o tempo de meia vida da NCL não nuclear é muito pequeno, de apenas 45 minutos, quando comparado ao da nucleolina nuclear (cerca de 8 horas), pelo que requer uma transcrição constante, que ocorre abundantemente nas células cancerosas em proliferação, mas não tanto em células não malignas. Acrescentando-se o facto da expressão desta proteína ser muito superior na presença de stress celular. Posto isto, a hipótese atual, inicialmente sugerida por Bates e colaboradores, defende que as células normais induzem a produção transitória de NCL não nuclear em resposta a estímulos pontuais mitogénicos ou ao stress, ou devido à ligação de certas moléculas à superfície celular; enquanto que as células cancerosas expressam constantemente a forma não nuclear, favorecendo a entrada do aptamero neste tipo de células (Bates *et al.*, 2009; Reyes-Reyes *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014; Reyes-Reyes *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2017; Platella *et al.*, 2017).

Também se procurou perceber qual a forma de endocitose que potencia a internalização do AS1411 nas células, tendo-se descoberto que a absorção inicial ocorre por macropinocitose (mecanismo induzido pela actina, que permite às células absorverem o meio circundante e as macromoléculas que este contém); sendo este processo precisamente estimulado pelo AS1411 em células cancerosas, em contraste com o que acontece em células normais e promovendo a seletividade deste aptamero G4. A macropinocitose é, assim, o processo de excelência, para absorção de aptameros, DNA, RNA e várias nanopartículas (Reyes-Reyes *et al.*, 2010; Reyes-reyes *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2017). Acrescentar ainda que a hiperestimulação da macropinocitose pode fornecer um método útil para eliminar seletivamente as células cancerosas, pois pode induzir uma nova forma de morte celular não-apoptótica, que tem sido referida como *methuosis*, morte por macropinocitose ou vacuolização catastrófica (ver figura 5) (Reyes-Reyes *et al.*, 2015).

A segunda fase de absorção do AS1411 ocorre mais tardiamente, numa fase de maior internalização do aptamero G4, em que se supõe que há uma supressão do transporte mediado pela NCL, fazendo com que o aptamero G4 fique acumulado no interior das células cancerosas (Reyes-Reyes *et al.*, 2010; Reyes-Reyes *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2017).

Apesar dos mecanismos mediados diretamente pela NCL serem os mais aceites e explorados pela comunidade científica para explicar a citotoxicidade do AS1411, existem outros mecanismos associados a este que também estarão envolvidos nestes processos, nomeadamente a hiperativação da Rac1 (GTPase promotora da macropinocitose e *methuosis*) provocada por

este aptamero e mecanismos associados à inibição da replicação do DNA (Reyes-Reyes *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2017).

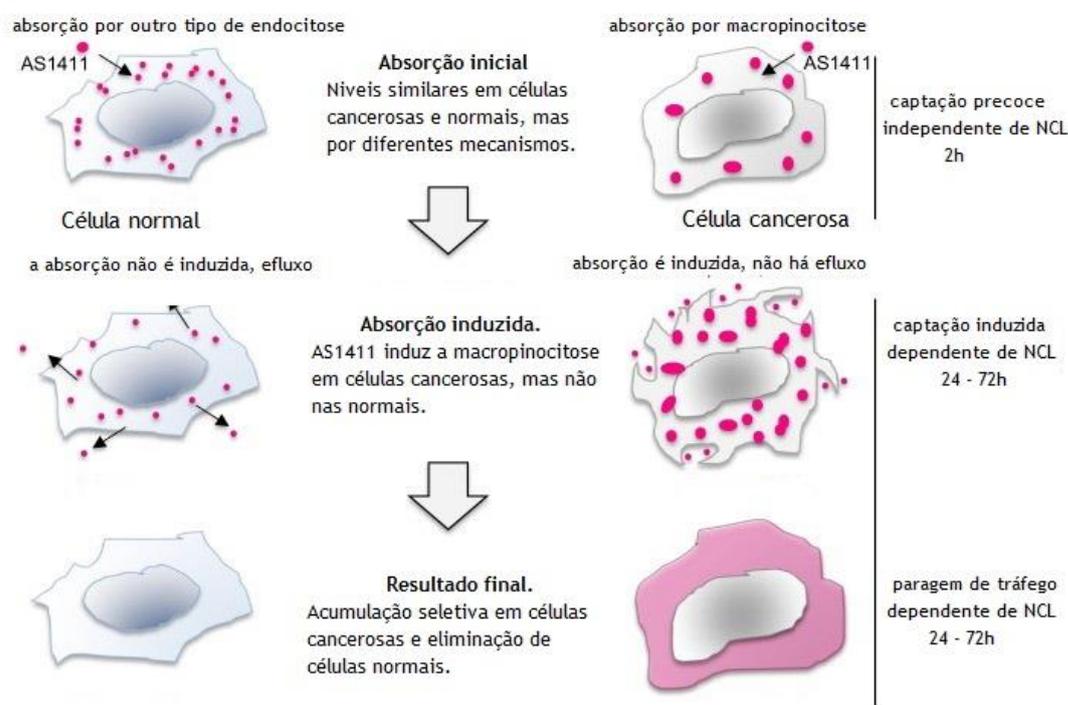


Figura 5. Modelo para o mecanismo de acumulação seletiva do G4 AS1411 em células cancerosas. O G4 AS1411 é eficientemente absorvido em células cancerosas e normais nos primeiros momentos, mas por diferentes vias endocíticas. Posteriormente, o G4 AS1411 induz mais macropinocitose em células cancerosas, mas não em células normais. Estes efeitos são dependentes da NCL e resultam na seletividade do G4 AS1411 nas células cancerosas em comparação com as células normais. Adaptado de Bates e colaboradores (Bates *et al.*, 2017).

1.3.2. Estudos Clínicos do aptamero de G4 AS1411

Devido à eficácia demonstrada pelo aptamero de G4 AS1411 na atuação em diversas células cancerosas, são de referenciar já estudos clínicos de Fase I e II levados a cabo em carcinomas renais e leucemias mieloides em estados extremamente avançados e até com situações de metástases, em que ficou evidenciada a atividade clínica do AS1411, com evidências de estabilização da progressão da doença e com um bom perfil de segurança (Li *et al.*, 2012; Rosenberg *et al.*, 2014; Malik *et al.*, 2015; Reyes-Reyes *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2017; Do *et al.*, 2017; Platella *et al.*, 2017). De facto, o AS1411 foi o primeiro aptamero de G4 a ser testado em humanos para tratamento anticancerígeno (Ashrafuzzaman *et al.*, 2014).

Apesar disto, também é de salientar que a taxa global de resposta nestes estudos clínicos foi baixa, possivelmente porque o AS1411 é rapidamente eliminado do organismo, tendo uma potência relativamente baixa, pelo que são necessárias concentrações da ordem do micromolar para induzir a morte celular (Li *et al.*, 2012; Rosenberg *et al.*, 2014; Malik *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2017; Do *et al.*, 2017; Platella *et al.*, 2017). Ou seja, o potencial clínico do AS1411 é devido ao seu excelente perfil de segurança e capacidade de induzir respostas duráveis em

potenciais quimioterápicos ou sondas de diagnóstico, a sua entrega via conjugação com G4 pode ser uma solução para ultrapassar a resistência a estes quimioterápicos. A formação dos nanosistemas com o AS1411 e derivados pode facilitar a passagem da barreira hematoencefálica e reduzir a toxicidade associada em tecidos normais que são, frequentemente, gravemente afetados. Pelo que, o design e síntese de novos ligandos capazes de se ligar e estabilizar a estruturas de G4 pode constituir uma nova abordagem terapêutica (Corvinius *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2015; Bates *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017).

Adicionalmente, também foi demonstrado que os ligandos que estabilizam as estruturas de G4 contribuem para a diminuição do comprimento dos telómeros, reprimem as transcrições de certos oncogenes e suprimem a tradução do RNA (Li *et al.*, 2009; Sidibe *et al.*, 2012; Xiong *et al.*, 2015; Negrutka *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2018).

A estabilização de estruturas de G4 resulta de um balanço de interações intermoleculares, incluindo eletrostática, empilhamento de bases, interação hidrofóbica, ligação de hidrogénio e forças de Van der Waals. Sendo que, o modo de interação de pequenas moléculas com G4 segue determinados princípios (ver figura 6): (1) ligandos com um sistema aromático planar estendido facilitam o empilhamento π - π ; (2) podem interagir com os sulcos e *loops*, sendo que, substituintes catiónicos usualmente possuem afinidades de ligação mais fortes com o esqueleto de fosfato aniônico; (3) podem interagir com o centro eletrostático negativo do G4 por interação eletrostática com o centro catiónico do núcleo aromático. Estes princípios devem ser sempre considerados de modo a melhorar a seletividade e a capacidade de ligação dos ligandos (Corvinius *et al.*, 2009, Li *et al.*, 2009; Murat e Balasubramanian, 2011; Larsen *et al.*, 2012; Xiong *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2018; Che *et al.*, 2018; Podlipnik *et al.*, 2018).

A existência de cadeias de aminas alifáticas promove a interação com os sulcos e *loops*, através de pontes de hidrogénio e interações eletrostáticas que podem contribuir para a solubilidade do ligando em água, aumentar o potencial do ligando com capacidade de ligação ao sulco/loop e aumentar a seletividade dos ligandos para G4. (Larsen *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2016; Carvalho *et al.*, 2017).



Figura 6. Exemplos do modo de ligação de pequenas moléculas (ligandos) com G4. Adaptado de Xiong e colaboradores (Xiong *et al.*, 2015).

Assim, os ligandos de G4 descritos na literatura são formados por sistemas aromáticos extensos como por exemplo macrociclos de porfirina, derivados de telomestatina e ainda moléculas poliaromáticas como derivados de acridina e fenantrolina (ambas constituem o maior ponto de interesse deste trabalho), mas também derivados de quinolona e quinona, que ligam a estruturas G4 com constantes de dissociação entre 10^{-5} e 10^{-8} (M^{-1}) e provaram ser uma nova classe de agentes anticancerígenos (Carvalho *et al.*, 2017; Das *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2018; Podlipnik *et al.*, 2018).

Destacar um grupo de ligandos de G4, que se encontra disponível comercialmente, altamente potente, da família de compostos bisquinolínicos com um núcleo central de dicarboxamida que pode ser de piridina designado por piridostatina. Outros exemplos são: 1,8-naftiridina - 3AQN e 6AQN e ainda 1,10-fenantrolina - PhenDC3 e PhenDC6, que possuem uma alta seletividade e afinidade para o G4 em detrimento do duplex e também atividade antiproliferativa demonstrada, bem como uma ligação preferencial às regiões teloméricas dos cromossomos humanos (De Cian *et al.*, 2007; Larsen *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2017).

Apesar das estruturas planares favorecerem a ligação a G4, Li e colaboradores sintetizaram ligandos com estruturas não planares, designados peimina e peiminina, que também demonstraram maior afinidade para DNA G4 em detrimento do duplex. Consequentemente, os resultados indicaram que as estruturas planares são importantes, ainda que não sejam essenciais para os ligandos G4, podendo representar uma nova classe de agentes direcionados para os telómeros como potenciais fármacos antitumorais (Li *et al.*, 2009).

1.3.5. Ligandos derivados de laranja de acridina

Os derivados de laranja de acridina têm sido utilizados como ligandos de G4. São alcaloides que podem ser encontrados naturalmente como produtos de síntese de plantas da família *Rutaceae*, demonstraram exibir atividade contra parasitas da malária, e alguns deles foram já testados contra linhas de células tumorais; em parte devido à estrutura planar dos anéis, que lhes confere a capacidade de se intercalar no DNA e interferir com vários processos metabólicos, tanto em células procarióticas como em eucarióticas (Xiong *et al.*, 2015).

Um derivado de acridina alvo de inúmeros estudos é o BRACO-19, que tem demonstrado contribuir para a diminuição do crescimento e senescência em diversas linhas celulares tumorais humanas em condições subcitotóxicas. Tendo também demonstrado atividade *in vivo* contra um xenoinxerto de tumor humano em que o agente citotóxico taxol foi usado para produzir a regressão tumoral e o BRACO-19, administrado após o enfraquecimento, foi capaz de suprimir o recrescimento do tumor (Burger *et al.*, 2005).

Negrutska e colaboradores reportaram acridinas di e trissubstituídas que demonstraram ter valores de $IC_{50} = 2,6 \mu M$, ou seja, citotoxicidade a doses micromolares relativamente pequenas (Negrutska *et al.*, 2016).

Harrison e colaboradores também sintetizaram uma série de acridinas dissubstituídas para melhorar a afinidade do G4. Verificaram que a introdução de uma cadeia lateral aumenta o caráter de carga positiva do núcleo, o que por sua vez aumenta a interação eletrostática com o centro do G4, que é negativamente polarizado sendo que, demonstraram possuir citotoxicidade a doses igualmente pequenas (Harrison *et al.*, 1999; Xiong *et al.*, 2015).

Carvalho e colaboradores avaliaram derivados de laranja de acridina, designados por C₃, C₅ e C₈, como ligandos da estrutura G4 do oncogene KRAS-22RT, cuja estrutura química é demonstrada na figura 7. Diversos estudos biofísicos, de citotoxicidade e colocalização foram realizados e concluíram que estes ligandos são citotóxicos em células cancerosas HeLa, colocalizam o nucléolo das células cancerosas e são fluorescentes, podendo ser utilizados como potenciais sondas para a marcação de G4 no ambiente celular. No entanto sugeriram a introdução de funcionalidades adicionais da cadeia lateral ou o aumento do tamanho da porção aromática a fim de aumentar a seletividade em relação ao G4 versus duplex e em células não malignas (Carvalho *et al.*, 2017).

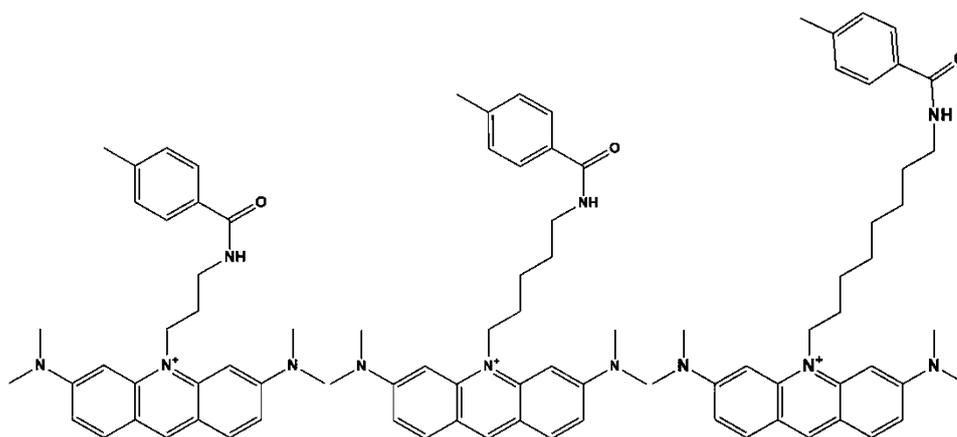


Figura 7. Estrutura química dos ligandos de G4 derivados de laranja de acridina C₃, C₅ e C₈ (da esquerda para a direita), estudados por Carvalho e colaboradores (Carvalho *et al.*, 2017).

1.3.6. Ligandos derivados de fenantrolina

Várias estruturas contendo como base a 1,10-fenantrolina têm sido desenvolvidas como ligandos de G4. Os anéis aromáticos estendidos da 1,10-fenantrolina potenciam o empilhamento π - π com os quartetos do G4 e estudos anteriores reportaram resultados promissores na estabilização de G4, em que ligandos à base de derivados de fenantrolina demonstraram elevada afinidade e estabilização térmica (Xiong *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2018).

Carvalho e colaboradores estudaram um conjunto de macrociclos derivados de fenantrolina - [16]phenN₂, [30]phen₂N₆, [32]phen₂N₄ e [34]phen₂N₆ - exemplificados na figura 8, como ligandos de estruturas de G4 através de ensaios biofísicos, de citotoxicidade e PCR stop,

sendo que se destacaram os resultados obtidos para o [32]phen₂N₄ e [16]phenN₂ (Carvalho *et al.*, 2017).

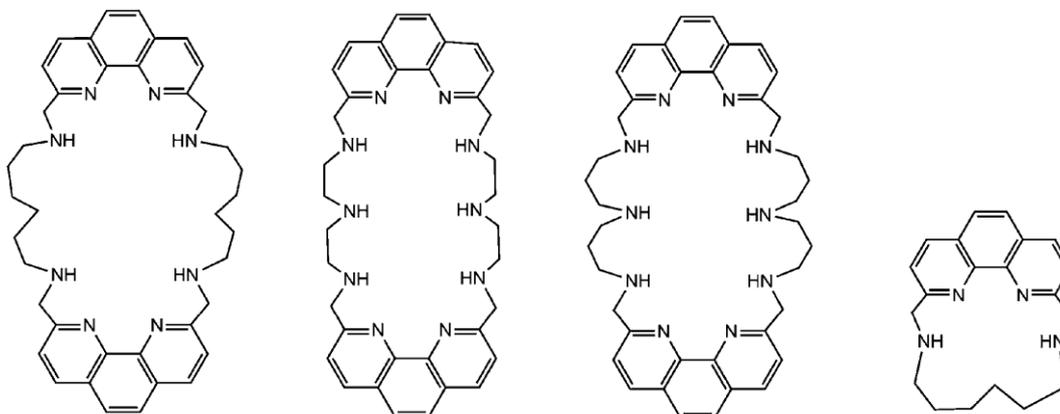


Figura 8. Estrutura química dos ligandos G4 derivados de fenantrolina [32]phen₂N₄, [30]phen₂N₆, [34]phen₂N₆ e [16]phenN₂ - (da esquerda para a direita), estudados por Carvalho e colaboradores (Carvalho *et al.*, 2017).

Apesar de muitas destas moléculas serem seletivas para G4 em detrimento do duplex, o *design* de ligandos específicos para determinadas estruturas G4 continua um desafio (Das *et al.*, 2017). Deste modo, e apesar de resultados promissores a nível celular, poucos atingiram ensaios clínicos. As razões são complexas, incluindo dificuldades inerentes ao processo de descoberta de fármacos, dificuldades na tradução de dados *in vitro* para dados *in vivo* e a toxicidade secundária destas pequenas moléculas devido à sua fraca seletividade, ou interações não específicas com o DNA duplex. Assim, a conceção e desenvolvimento de novos ligandos estabilizadores de G4 específicos é um desafio contínuo e necessário (Xiong *et al.*, 2015; Carvalho *et al.* 2017; Carvalho *et al.*, 2018).

Em suma, os desafios futuros que se mantêm a nível do *design* de novos ligandos de G4 mais eficazes e promissores incluem: (1) maior compreensão das funções biológicas de G4 em células cancerosas, bem como em células normais somáticas; (2) desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos válidos para avaliar os efeitos *in vivo* dos potenciais ligandos; (3) desenvolvimento de compostos altamente seletivos e específicos para as várias classes de G4 existentes que, por sua vez, poderão atuar em alvos diferentes (Xiong *et al.*, 2015). Um ligando promissor deve ligar-se ao G4 com forte potência e seletividade em detrimento do duplex e outras estruturas de ácido nucleico *in vitro*. Enquanto *in vivo*, devem conseguir interferir nos eventos biológicos envolvidos no G4, como a manutenção dos telómeros e a expressão génica (Che *et al.*, 2018).

Deste modo, neste trabalho de investigação iniciou-se a síntese, que não foi concluída, de novos derivados de fenantrolina para serem utilizados como ligandos de G4. E ainda, o desenvolvimento e avaliação de novos conjugados aptamero G4-ligando que podem servir de base para o desenvolvimento de nanossistemas de entrega de fármacos. Para o desenvolvimento dos nanossistemas conjugados foram selecionados ligandos derivados das classes suprarreferidas, laranja de acridina e fenantrolina, nomeadamente os ligandos C₈, C₈-NH₂, C₅ e

C₃ derivados de laranja de acridina e o [16]PhenN₂ e [32]Phen₂N₄ derivados de fenantrolina. Os conjugados foram preparados utilizando a estratégia supramolecular com o aptamero AT11-L0.

Foram realizados estudos biofísicos e *in vitro* de modo a avaliar o potencial destes conjugados enquanto nanossistemas de entrega de fármacos em células cancerosas. Os estudos biofísicos incluíram estudos de espectroscopia de CD e CD-*melting*, espectroscopia de fluorescência e TDS. Sendo que, os ligandos estudados foram C₈, C₈-NH₂, C₅, C₃, [16]PhenN₂ e [32]Phen₂N₄. Também o ligando sintetizado DiPyPhen(Me)₂ e o ligando comercial PhenDC3 foram estudados como ligandos do G4 AT11-L0. Também foram realizados estudos de citotoxicidade (MTT) em células HeLa e NHDF envolvendo os ligandos C₈, C₈-NH₂, C₅, C₃ e [16]PhenN₂ para determinação do IC₅₀ dos mesmos. E posteriormente, estudos de citotoxicidade dos conjugados AT11-L0 - C₈, AT11-L0 - C₈-NH₂, AT11-L0 - C₅, AT11-L0 - C₃ para avaliar a citotoxicidade e seletividade dos conjugados em células HeLa vs NHDF. Foi ainda realizado um ensaio de colocalização por microscopia de fluorescência confocal com o conjugado AT11-L0 - C₈ ao longo de 7 dias em células HeLa.

Capítulo 2

Objetivos

O objetivo principal deste trabalho de investigação foi o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas baseadas em aptameros de G4 conjugados com ligandos via não covalente, de forma a estabilizarem estas estruturas e atuarem como potenciais anticancerígenos com danos mínimos para as células saudáveis.

O derivado do aptamero G4 AS1411, designado por AT11-L0 foi seleccionado e conjugou-se com ligandos macrocíclicos derivados de fenantrolina e derivados de laranja de acridina, originando os nanosistemas que foram posteriormente avaliados em termos de afinidade, estabilidade e potencial anticancerígeno para o cancro do colo do útero.

Os objetivos específicos foram:

- Sintetizar novos ligandos de G4 derivados de fenantrolina;
- Avaliar a estrutura G4 do aptamero AT11-L0 através de ensaios biofísicos de espectroscopia de diferença térmica e espectroscopia de dicroísmo circular;
- Sintetizar o nanosistema conjugado aptamero G4 AT11-L0 com compostos macrocíclicos derivados de fenantrolina e derivados de laranja de acridina. Avaliar a formação/estabilidade e afinidade das supermoléculas através de ensaios biofísicos: espectroscopia de dicroísmo circular e espectroscopia de fluorescência;
- Avaliar a citotoxicidade e ação antiproliferativa dos compostos macrocíclicos de fenantrolina e derivados de laranja de acridina, através de ensaios de MTT para determinação do IC₅₀, em células HeLa vs NHDF;
- Avaliar a citotoxicidade das supermoléculas através de ensaios de MTT em células HeLa vs NHDF;
- Avaliar a internalização do aptamero G4 AT11-L0, de um derivado de laranja de acridina (C₈) e a formação e colocalização da supermolécula AT11-L0 - C₈ através de microscopia de fluorescência confocal, em células HeLa.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1. Síntese dos ligandos de G4

Os derivados de 1,10 - fenantrolina têm sido comumente usados devido às suas propriedades estruturais e químicas extremamente versáteis, nomeadamente a capacidade de intercalar moléculas de DNA, sendo que, para este propósito, têm sido desenvolvidos ligandos com superfícies aromáticas extensas para ligação ao G4. Destaca-se a oxidação que permite a obtenção da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fenodiona), que pode ser posteriormente adicionada a poliaminas alifáticas, potenciando a afinidade com o G4 (Garas e Vagg, 2000; Zheng *et al.*, 2010). Por este motivo, propôs-se a síntese de derivados de fenantrolina, tendo como ponto de partida a estrutura da 2,9 - dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona, para atuarem como ligandos de G4.

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

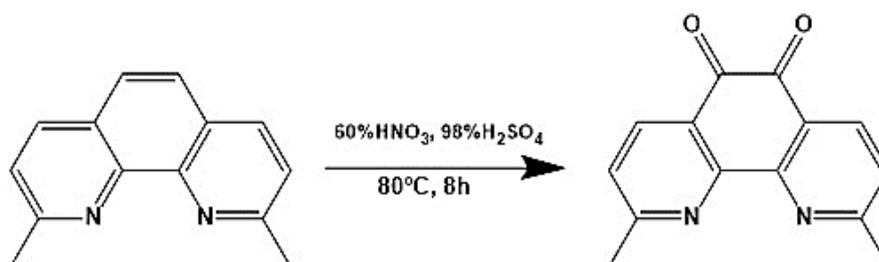


Figura 9. Síntese da 2,9 - dimetil - 1,10 - fenantrolina - 5,6 - diona, segundo Che e colaboradores (Che *et al.*, 2006).

O protocolo utilizado inicialmente para a síntese do composto 2,9 - dimetil - 1,10 - fenantrolina - 5,6 - diona foi baseado no artigo de Che e colaboradores (Che *et al.*, 2006).

Pesou-se 2,98 g de brometo de potássio (KBr) e 2,024 g de neocuproine (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina, (C₁₄H₁₂N₂)) e transferiu-se para um balão de fundo redondo mergulhado num banho de gelo e sal de modo a atingir a temperatura de 0 °C. Após 30 minutos em agitação, adicionou-se lentamente 38,5 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado. Após a adição do ácido sulfúrico, retirou-se o banho de gelo e adicionou-se gota a gota 19,25 mL de ácido nítrico (HNO₃) 60% a 30 °C. Após a adição do ácido nítrico verificou-se que a solução ficou cor de laranja. Deixou-se em agitação a 40 °C durante 3 horas com o condensador de refluxo, após as quais se aqueceu até aos 80 °C durante 1 hora. Ao fim deste tempo, retirou-se o condensador para libertar os gases (até perder a cor laranja). Voltou a fechar-se e a manteve-se a 85 °C

durante mais 2 horas, ao fim das quais se abriu novamente para libertar gases e perder a cor, processo que demorou cerca de 30 minutos. Esta mistura, foi então, deixada à temperatura ambiente mais 10 minutos para um arrefecimento gradual e depois colocada em banho de gelo para se proceder à neutralização. Neutralizou-se com uma solução aquosa saturada de hidróxido de sódio (NaOH) que foi adicionada gradualmente até pH=7.

Após a neutralização, procedeu-se a uma extração líquido - líquido com clorofórmio - água, no final da qual se obteve a fase orgânica de coloração amarela. De modo a secar a fase orgânica adicionou-se sulfato de sódio (Na_2SO_4) até preencher o fundo do balão e deixou-se à temperatura ambiente durante 2 horas. Procedeu-se, então, a uma filtração a vácuo e evaporou-se o clorofórmio no evaporador rotativo. O resíduo resultante foi recristalizado com metanol aquecido, decantado e secado na estufa. Obteve-se o produto final impuro e em quantidades apenas vestigiais.

Deste modo, a síntese do composto 2,9 - dimetil - 1,10 - fenantrolina - 5,6 - diona foi realizada seguindo um novo protocolo, de acordo com Zheng e colaboradores, que desenvolveram um método de síntese mais eficiente do que os relatados anteriormente na literatura, uma vez que são necessárias temperaturas inferiores e menores volumes de ácidos sulfúrico e nítrico (Zheng *et al.*, 2010).

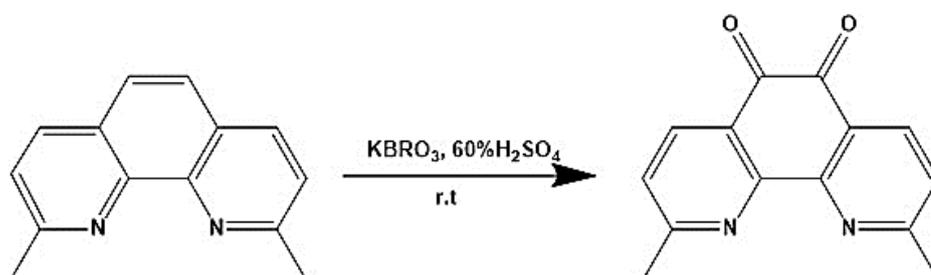


Figura 10. Síntese da 2,9 - dimetil - 1,10 - fenantrolina - 5,6 - diona, segundo Zheng e colaboradores (Zheng *et al.*, 2010).

Pesou-se 3,01 g de neocuproine num balão de fundo redondo, ao qual se adicionou 34 mL de H_2SO_4 a 60% e colocou-se numa placa de agitação até dissolver. Foi adicionado gradualmente (ao longo de 1h30) 2,711 g de bromato de potássio (KBrO_3). Ao longo das adições observou-se uma mudança de cor gradual da solução de amarelo pálido até laranja intenso. Após adição, deixou-se a solução em agitação durante 20 horas, e no final colocou-se num banho de gelo e sal à temperatura de 0 °C, a qual se neutralizou com uma solução de NaOH (8 M). Após a neutralização, transferiu-se a solução para um copo ao qual foi adicionado diclorometano (CH_2Cl_2), que se manteve em agitação durante cerca de 1 hora, após a qual se efetuou uma filtração a vácuo. O filtrado resultante foi extraído com água-diclorometano. Efetuaram-se três extrações. Evaporou-se as fases orgânicas e recristalizou-se com metanol aquecido, obtendo-se como produto final agulhas amarelas, numa massa total de 2,41 g. O

rendimento da síntese foi de 80%. ^1H RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 8,32(d,2H) 7,58(d,2H), 2,74(s,6H).

Este foi o protocolo de síntese utilizado para a obtenção de mais composto.



Figura 11. Procedimento da síntese da 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona: (da esquerda para a direita) solução em agitação na placa após adição do KBrO_3 ; extração líquido-líquido com água-diclorometano; evaporação do composto; recristalização em metanol aquecido; composto final.

3.1.2. Síntese de 7,10 - dimetilpirazino [2,3-f] [1,10] fenantrolina ($\text{DiPyPhen}(\text{Me})_2$) ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_4$)

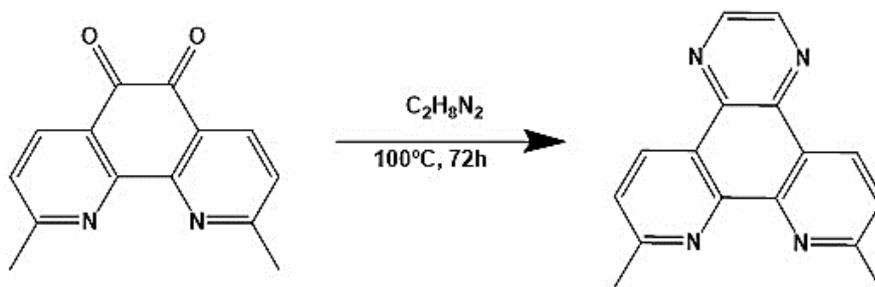


Figura 12. Síntese de 7,10 - dimetilpirazino [2,3-f] [1,10] fenantrolina, segundo Garas e colaboradores (Garas e Vagg, 2000).

A síntese da 7,10 - dimetilpirazino - 1,10 - fenantrolina foi realizada com base no protocolo de Garas e Vagg (Garas e Vagg, 2000). Pesou-se 0,100 g de 2,9 - dimetil - 1,10 - fenantrolina - 5,6 - diona sintetizada anteriormente à qual se adicionou 20 mL de etanol absoluto num balão de fundo redondo. A esta solução, adicionaram-se 30 μL de etilendiamina ($\text{C}_2\text{H}_4(\text{NH}_2)_2$) e deixou-se em refluxo, a 100 $^\circ\text{C}$ durante 2 noites. Após este tempo, a solução adquiriu cor laranja e foi retirada do refluxo, tendo ficado à temperatura ambiente e sob agitação mais 3 noites. Realizou-se, então, uma filtração a vácuo tendo-se aproveitado quer o filtrado, quer o precipitado. O primeiro foi recristalizado com metanol aquecido, enquanto que o segundo foi evaporado no evaporador rotativo e recristalizado com etanol aquecido.

Foram adquiridos os espectros de RMN de ^1H de ambos os compostos, os quais encontravam-se impuros.

Inicialmente, pesou-se 0,300 g de 7,10 - dimetilpirazino - 1,10 - fenantrolina tendo-se ajustado as quantidades de etanol absoluto adicionado para 16 mL. A esta solução adicionou-se 90 µL de etilenodiamina, tendo-se estipulado um tempo de refluxo mínimo de 3 noites. Retirou-se do refluxo e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo, tendo-se procedido à recristalização com etanol. Formaram-se cristais muito finos, cor de laranja. Procedeu-se a uma filtração e fizeram-se lavagens sucessivas com etanol. Adquiriu-se espectro de RMN de ¹H tendo-se verificado que o composto não se encontrava puro.

Repetiu-se a síntese deste composto com otimizações no que diz respeito à sua purificação. Deste modo, pesou-se 0,500 g de 2,9 - dimetil - 1,10 - fenantrolina - 5,6 - diona à qual se adicionou 27 mL de etanol absoluto num balão de fundo redondo. Colocou-se em agitação até dissolver. Posteriormente adicionou-se 150 µL de etilenodiamina e deixou-se em refluxo a aproximadamente 100 °C, durante 5 noites. Retirou-se a solução do refluxo, tendo-se deixado à temperatura ambiente até evaporação do solvente.

No final obteve-se cristais amarelos escuros, numa massa total de 0,478 g. Adquiriram-se os espectros de RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135° e ainda os espectros de correlação HMBC e HSQC assim como o espectro de massa, os quais mostraram que o composto se encontrava puro. O rendimento da síntese foi superior a 95%. ¹H RMN (400 MHz, CD₃OD): δ= 9,18(d,2H), 8,87(s,2H), 7,64(d,2H), 2,86(s, 6H); ¹³C RMN (400MHz, CD₃OD) δ= 161,23; 145,74; 144,26; 139,43; 133,06; 124,48; 124,08; 23,37. DEPT 135° (400MHz, CDCl₃) δ= 161,23(C); 145,74(C); 144,26(CH); 139,43(C); 133,06(CH); 124,48(C); 124,08(CH); 23,37(CH₃). ms: m/z: 261,11 (M⁺+1), 260,11 (M⁺).

Tabela 1. Atribuição dos desvios químicos para o DiPyPhen(Me)₂ em CD₃OD.

¹ H	MUTIPLICIDADE	HSQC (¹³ C) (- DEPT-135)	HMBC (- DEPT-135)
9,18	Dupleto(1H)	133,06 (CH)	138,43 (C); 145,74(C); 161,23(C)
8,87	Singleto(1H)	144,26 (CH)	139,43(C); 144,26(CH)
7,64	Dupleto(1H)	124,48 (CH)	161,23(C); 124,23(C); 23,37(CH ₃)
2,86	Singleto(3H)	23,37 (CH ₃)	124,48(CH); 151,23(C)

Este protocolo de síntese foi utilizado sempre que necessário para obtenção de mais composto.



Figura 13. Procedimento final da síntese do DiPyPhen(Me)₂: (da esquerda para a direita) solução em refluxo; a solução mudou de cor no final do tempo de refluxo, de vermelho para amarelo torrado; formação de cristais durante o processo de recristalização; composto final.

3.1.3. Síntese do 7,10 - dimetilpirazino [2,3-f] [1,10] fenantrolina - 3,6 - dicarboxaldeído (DiPyPhen(COH)₂) (C₁₆H₈N₄O₂)

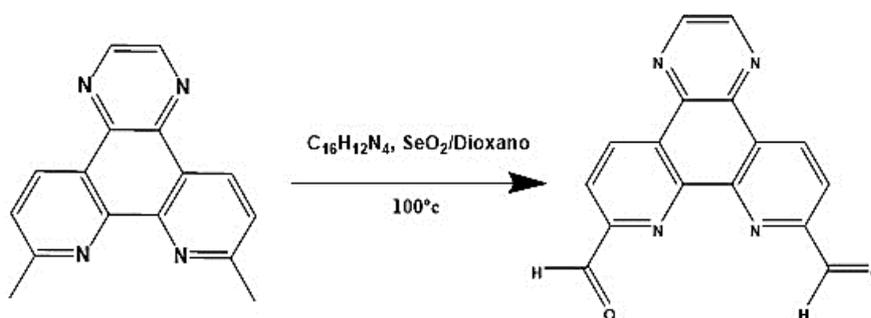


Figura 14. Síntese do 7,10 - dimetilpirazino [2,3-f] [1,10] fenantrolina - 3,6 - dicarboxaldeído.

A síntese do 7,10 - pirazino [1,10] fenantrolina - 3,6 - dicarboxaldeído foi feita com base na síntese de Medeiros-Silva e colaboradores (Medeiros-Silva *et al.*, 2017).

Pesou-se 0,145 g de DiPyPhen(Me)₂ num copo e colocou-se na placa de agitação a dissolver em 10,5 mL de dioxano. Entretanto, pesou-se 0,286 g de dióxido de selênio (SeO₂) num balão de fundo redondo e adicionou-se 100 µL de água destilada, tendo-se colocado posteriormente em agitação e aquecimento num banho de parafina. Após dissolução, adicionou-se 5 mL de dioxano. A este balão adicionou-se gradualmente o DiPyPhen(Me)₂ previamente dissolvido, tendo-se verificado o aparecimento de cor vermelha. Deixou-se em refluxo durante 1 noite, tendo a mistura precipitado preto nas paredes do balão. Parou-se o refluxo e efetuou-se, de imediato, uma filtração a vácuo quente, com celite. Desta filtração resultou um filtrado com um tom amarelo fluorescente, que foi transferido para um balão e evaporado até à secura. Tendo o composto ficado com um tom muito avermelhado, indicativo da presença de selênio. Deste modo, lavou-se o precipitado com clorofórmio quente tendo-se formado um precipitado muito fino avermelhado, filtrou-se e descartou-se o sólido vermelho. Foram realizadas mais 2 lavagens. Evaporou-se a mistura em clorofórmio e deixou-se a secar na estufa durante uma noite.

Posteriormente recristalizou-se com etanol absoluto de forma a tentar precipitar o composto pretendido e eliminar a maior quantidade de selênio possível, no entanto voltou a obter-se um pó muito fino avermelhado. Filtrou-se, evaporou-se e deixou-se na estufa a secar. Adquiriu-se o espectro de RMN de ^1H que comprovou que o composto não estava puro.

Devido à presença de impurezas no composto final anteriormente obtido, optou-se por uma nova síntese do $\text{DiPyPhen}(\text{COH})_2$, tendo-se partido de 0,500 g de $\text{DiPyPhen}(\text{Me})_2$. Seguiu-se o protocolo descrito anteriormente. No entanto, tentou-se otimizar a purificação do composto. Após filtração a quente e evaporação do solvente, recristalizou-se o sólido com tetrahidrofurano. No entanto e apesar de haver composto formado, o espectro de RMN de ^1H continuou a demonstrar a presença de impurezas.

Realizou-se uma nova tentativa de síntese deste composto seguindo o protocolo anterior, e pesou-se 0.500 g de $\text{DiPyPhen}(\text{Me})_2$ e alterou-se o solvente utilizado na recristalização que foi o etanol absoluto quente e deixou-se uma semana a precipitar. No final da semana, obteve-se uma maior quantidade precipitado, tendo-se efetuado então uma filtração. Aproveitou-se quer o precipitado, quer o filtrado, tendo este último sido evaporado e seco. Adquiriu-se o espectro de RMN de ^1H de ambas as frações. Concluiu-se que havia composto quer no precipitado (muito impuro) quer no filtrado, no entanto a presença de selênio continuou a ser significativa.

Deste modo, alterou-se as proporções utilizadas dos reagentes de partida de modo a reduzir a quantidade de selênio.

Pesou-se 0,430 g de $\text{DiPyPhen}(\text{Me})_2$ e foi dissolvido num copo com 16,5 mL de dioxano. Pesou-se 0,36 g de SeO_2 num balão de fundo redondo - correspondendo a uma proporção exata de $1_{\text{DiPyPhen}(\text{Me})_2}:2_{\text{SeO}_2}$ - e adicionaram-se 100 μL de água destilada, tendo-se colocado posteriormente em agitação e aquecimento num banho de parafina. Adicionou-se 10 mL de dioxano, de modo a perfazer um volume final de 17,5 mL. De seguida, adicionou-se o $\text{DiPyPhen}(\text{Me})_2$ previamente dissolvido lentamente, tendo-se verificado o aparecimento de cor vermelha.

Aumentou-se o tempo de refluxo para 5 noites, tendo esta solução passado a preto. Retirou-se então do refluxo e efetuou-se, de imediato, uma filtração a quente e utilizou-se o sistema de vácuo, com celite. Desta filtração resultou um filtrado com cor amarela fluorescente, o qual foi evaporado. Após secagem apresentou cor amarela. Recristalizou-se com clorofórmio aquecido, e deixou-se a precipitar durante sete dias. No final deste tempo observou-se a formação de um precipitado branco, o qual foi filtrado.

Adquiriu-se o espectro de RMN de ^1H o qual mostrou que o composto estava puro. Obteve-se 0,125 g de $\text{DiPyPhen}(\text{COH})_2$. O rendimento foi de 30%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 10,50(s,2H), 9,70(d,2H), 8,50(d,2H), 9,12(s, 2H).

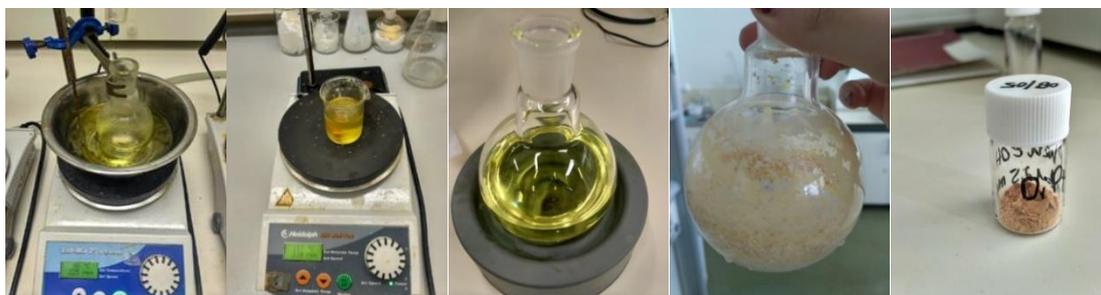


Figura 15. Procedimento final da síntese do $\text{DiPyPhen}(\text{COH})_2$: (da esquerda para a direita) adição do SeO_2 com água; dissolução do $\text{DiPyPhen}(\text{Me})_2$ em dioxano; aspeto do filtrado após filtração a vácuo; aspeto do composto após evaporação; composto final.

3.1.4. Síntese do 7,10 - dimetilpirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinaciclo - 2,11 - dieno (DiPyPhenN_4) ($\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{N}_6$)

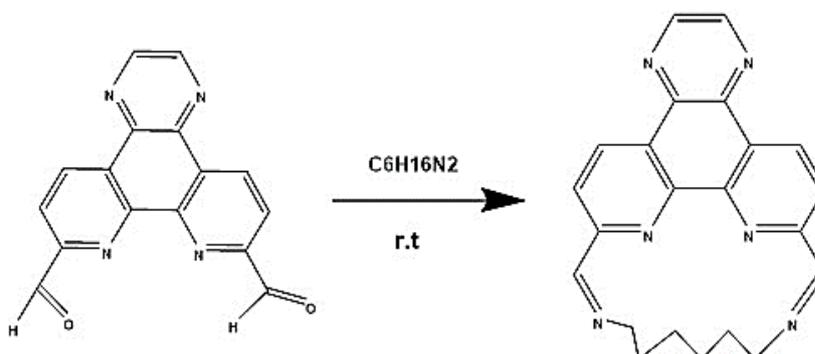


Figura 16. Síntese do 7,10 - dimetilpirazino [2,3-f] [1,10] fenantrolinaciclo - 2,11 - dieno.

Dissolveu-se 0,024 g de $\text{DiPyPhen}(\text{COH})_2$ em 10 mL de metanol à temperatura ambiente e colocou-se em agitação. Num balão de fundo redondo, dissolveu-se 0,018 g de 1,6-diaminohexano ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$) em 7 mL de metanol e colocou-se em agitação.

Com uma ampola de adição, adicionou-se o composto $\text{DiPyPhen}(\text{COH})_2$, gota a gota. No final, a solução ficou ligeiramente turva, tendo-se deixado em agitação à temperatura ambiente durante 1 noite. Terminado o tempo, retirou-se da agitação e deixou-se a precipitar a 4 °C, tendo havido formação de um precipitado esbranquiçado. Procedeu-se à filtração e deixou-se o filtrado a secar na estufa. Adquiriu-se espectro de RMN de ^1H , o qual mostrou a existência de composto puro. Obteve-se 0,0024 g de DiPyPhenN_4 . O rendimento foi de 10%. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3): δ 9,54(d,2H), 9,00(s,2H), 8,91(s,2H), 8,56(d, 2H), 3,72(m,4H), 2,01(m,6H).

Optou-se por se realizar nova síntese de DiPyPhenN_4 com ajuste de proporções dos reagentes de partida: $1_{\text{DiPyPhen}(\text{COH})_2} = 1_{1,6\text{-diaminohexano}}$. Deste modo, pesou-se 0,040 g de

DiPyPhen(COH)₂ e dissolveu-se em 15,66 mL de metanol. Num balão de fundo redondo, dissolveu-se 0,015 g de 1,6-diaminohexano em 5,8 mL de metanol. Procedeu-se à adição do DiPyPhen(COH)₂ gota a gota e estendeu-se o tempo de agitação a 4 noites, após as quais se deixou a precipitar a 4 °C. Verificou-se a formação do precipitado esbranquiçado como anteriormente, o qual foi filtrado e seco.

Adquiriu-se os espectros de RMN de ¹H, ¹³C, DEPT 135° e ainda os espectros de correlação HMBC e HSQC assim como o espectro de massa, os quais mostraram os sinais do composto puro. Obteve-se 0,006 g de composto, sendo que o rendimento foi 15%. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 9,54(d,2H), 9,00(s,2H), 8,90(s,2H), 8,56(d, 2H), 3,77(m,4H), 2,09(m,6H). ¹³C RMN (400MHz, CDCl₃) δ 162,54; 156,75; 147,00; 144,87; 140,62; 134,00; 127,92; 121,24; 61,36; 30,15; 29,70; 27,22 ppm. DEPT 135° (400MHz, CDCl₃) δ= 162,54(CH); 156,75(C); 147,00(C); 144,87(CH); 140,62(C); 134,00(CH); 127,92(C); 121,24(CH); 61,36(CH₂); 30,15(CH₂); 29,70(CH₂); 27,22(CH₂). ms: m/z: 261,11 (M⁺+1), 260,11 (M⁺).

Tabela 2. Atribuição dos desvios químicos para o DiPyPhenN₄ em CDCl₃.

¹ H	MULTIPLICIDADE	HSQC (¹³ C) (- DEPT-135)	HMBC (- DEPT-135)
9,54	Dupleto(1H)	134,00 (CH)	140,2 (C); 144,87(CH); 156,75(C)
9,00	Singleto(1H)	144,87 (CH)	140,62(CH); 147,00(C)
8,91	Singleto(1H)	162,54 (CH)	156,75(C);121,24(CH)); 61,36(CH ₂)
8,56	Dupleto(1H)	121,24 (CH)	134,00(CH); 127,92(C)
3,85	_____	_____	162,54 Schiff base

3.1.4.1.Redução do composto 7,10 - dimetilpirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinacido - 2,11 - dieno (DiPyPhenN₄)

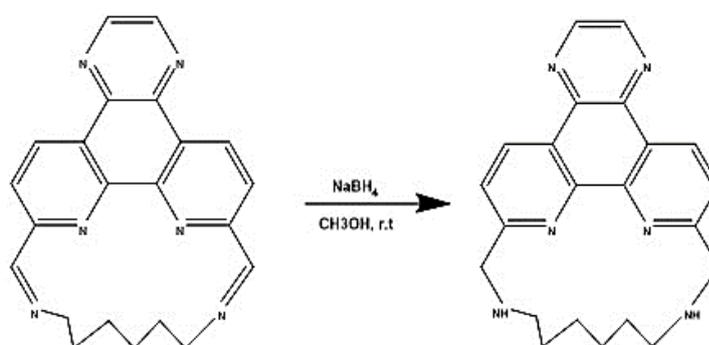


Figura 17. Redução do 7,10 - dimetilpirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinacido - 2,11 - dieno.

Dissolveu-se 0,0024 g de DiPyPhenN₄ em 3mL de etanol absoluto. Adicionou-se 0,012 g de borohidreto de sódio (NaBH₄) gradualmente, tendo-se deixado em agitação durante 2 noites à temperatura ambiente. Procedeu-se a uma extração clorofórmio - água, tendo-se evaporado

as fases orgânicas, do qual resultou um óleo castanho que ficou a secar na estufa. Fez-se um espectro de RMN de ^1H que comprovou a existência de composto impuro.

De modo a promover a precipitação do composto, este foi dissolvido em 2 mL de etanol e adicionado ácido clorídrico (HCl) concentrado até pH 2-3. Não houve formação de precipitado e não se conseguiu purificar o composto final.

3.1.5. Síntese do 3,6,9-triaza - (7,10) - pirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinaciclodecafenno - 2,9 - dieno. (DiPyPhenN₅) (C₂₁H₂₀N₈)

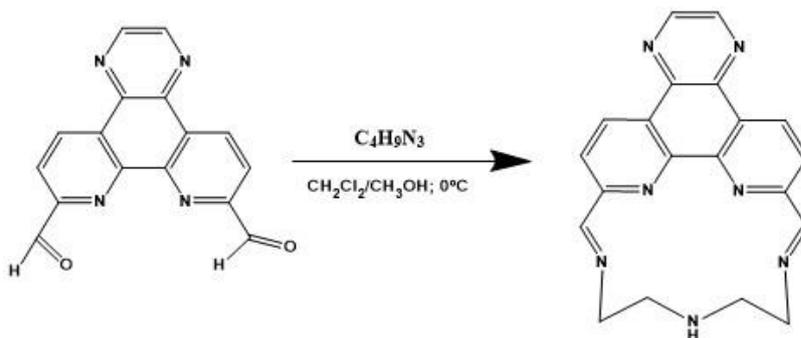


Figura 18. Síntese do 3,6,9-triaza - (7,10) - pirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinaciclodecafenno - 2,9 - dieno, segundo Baudoin e colaboradores (Baudoin *et al.*, 1997).

A síntese do DiPyPhenN₅ foi realizada com base na síntese de Baudoin e colaboradores (Baudoin *et al.*, 1997).

Pesou-se 0,037 g de DiPyPhen(COH)₂ e dissolveu-se em 7,5 mL de clorofórmio e 2,5 mL de metanol, perfazendo um volume total de 10 mL. Simultaneamente, a dietilenotriamina (0,0132 g) foi dissolvida em 14 mL de metanol, a qual foi adicionada gota a gota ao DiPyPhen(COH)₂ sob agitação e num banho de gelo. Deixou-se agitar durante 5 noites. Não houve formação de precipitado, pelo que se evaporou e deixou-se a secar na estufa.

Adquiriu-se o espectro de RMN de ^1H o qual mostrou que o composto estava impuro.

3.1.5.1. Redução do 3,6,9-triaza - (7,10) - pirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinaciclodecafenno - 2,9 - dieno. (DiPyPhenN₅)

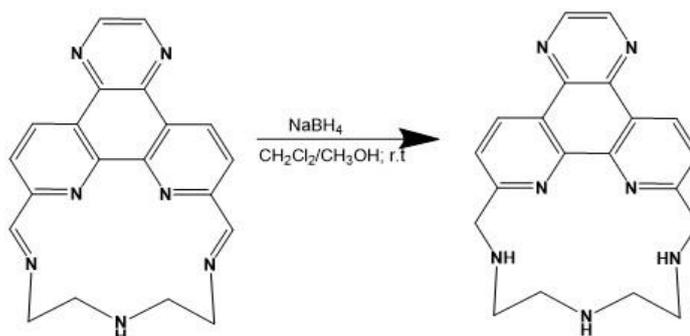


Figura 19. Redução do 3,6,9-triaza - (7,10) - pirazino [2, 3-f] [1,10] fenantrolinaciclodecafenno - 2,9 - dieno, segundo Baudoin e colaboradores (Baudoin *et al.*, 1997).

Decidiu avançar-se para a redução do DiPyPhenN₅, ainda segundo o protocolo do artigo Baudoin e colaboradores (Baudoin *et al.*, 1997).

Dissolveu-se o DiPyPhenN₅ em 15 mL de etanol absoluto. Adicionou-se 2 g de NaBH₄ lentamente e deixou-se em agitação durante 1 noite à temperatura ambiente. No dia seguinte, não havia precipitado e evaporou-se a solução. Fez-se uma extração líquido-líquido com clorofórmio-água, evaporou-se as fases orgânicas e o sólido resultante ficou a secar na estufa. A caracterização por RMN não foi conclusiva acerca da formação do composto reduzido, pois a quantidade no tubo de RMN era vestigial.

3.2. Preparação do aptamero, ligandos e nanosistemas

O oligonucleótido em estudo foi obtido da STAB VIDA. A sequência do aptamero utilizada foi: 5' - TGGTGGTGGTTGTTGGGTGGTGGTGGT - 3' e foi designada por AT11-L0, derivado do aptamero G4 AS1411. O aptamero AT11-L0 foi purificado adicionando 2 mL de água milli-Q num concentrador Millipore Ultracel YM-3, 7500 G, NMWL=3000 e centrifugou-se a 3500 G durante 30 minutos. Foram realizadas 5 lavagens.

Após purificação, a concentração do stock do AT11-L0 foi determinada pela leitura da absorvância em triplicado no espectrofotómetro Thermo Scientific evolution 201 UV/vis. O cálculo da concentração foi determinado pela Lei de Lambert-Beer.

Informação do AT11-L0:

$$\epsilon = 256100$$

$$n = 20,1 \text{ nmol}$$

Ressuspendeu-se o aptamero AT11-L0 em 100 µL de água milli-Q e procedeu-se à leitura das absorvâncias entre 200 e 400 nm, com um tempo de integração de 0,10 segundos, intervalo de dados de 1 nm, velocidade de varredura de 600 nm e um tempo estimado de 23 segundos. Pela leitura de absorvância e, através da Lei de Lambert-Beer, determinou-se que o stock de AT11-L0 tem uma concentração de $0,358 \times 10^{-3} \text{ M}$. A solução do AT11-L0 foi guardada a -20 °C.

As condições de *annealing* do AT11-L0 de modo favorecer o G4 foi: dissolução numa solução tampão adequada a cada ensaio, 15 minutos de aquecimento, seguidos de 20 minutos de arrefecimento em banho de gelo. Após *annealing* os stocks de AT11-L0 foram guardados a 4°C.

Quanto aos ligandos em estudo, foram utilizados os derivados de laranja de acridina e fenantrolina. A síntese dos derivados de laranja de acridina foi descrita no artigo de Pereira e colaboradores (Pereira *et al.*, 2017). Sendo que, os quatro ligandos derivados de laranja de acridina partilham a mesma base à qual foram adicionadas 3 (C₃), 5 (C₅), 8 (C₈) unidades de

metileno e ainda 8 unidades de metileno e um grupo NH_2 ($\text{C}_8\text{-NH}_2$). Enquanto que a síntese dos derivados de fenantrolina foi descrito por C. Cruz e colaboradores (Cruz *et al.*, 2011). Em ambos os ligandos $[\text{16}]_{\text{phen}}\text{N}_2$ e $[\text{32}]_{\text{phen}_2}\text{N}_4$ a base é a 1,10-fenantrolina ciclizada com poliaminas, sendo que o $[\text{32}]_{\text{phen}_2}\text{N}_4$ tem a particularidade possuir duas bases de 1,10-fenantrolina.

As soluções dos ligandos em estudo foram preparadas em DMSO nas seguintes concentrações: C_8 (10,8 mM); $\text{C}_8\text{-NH}_2$ (10 mM); C_5 (5,3 mM); C_3 (8,3 mM); $[\text{16}]_{\text{phen}}\text{N}_2$ (10 mM); $[\text{32}]_{\text{phen}_2}\text{N}_4$ (10 mM). A partir destas soluções foram preparadas as diluições necessárias, sempre em água Milli-Q. Para além destes ligandos foi ainda usado o ligando comercial de G4, PhenDC3 (10 mM) e, ainda, o DiPyPhen(Me)₂ (10 mM), proveniente da síntese anteriormente descrita (ver secção 3.1.2).

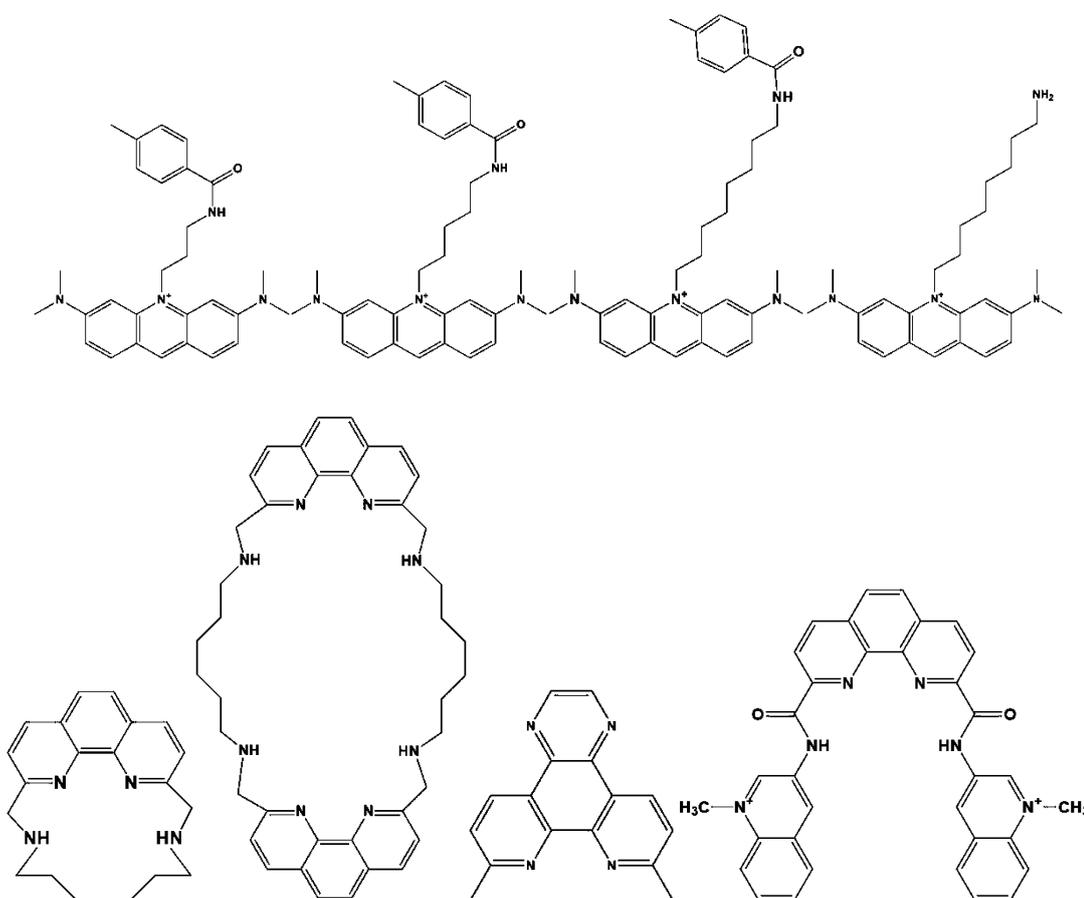


Figura 20. Estruturas químicas dos ligandos em estudo: (em cima, da esquerda para a direita) C_8 , $\text{C}_8\text{-NH}_2$, C_5 , C_3 , (em baixo, da esquerda para a direita) $[\text{16}]_{\text{phen}}\text{N}_2$, $[\text{32}]_{\text{phen}_2}\text{N}_4$, DiPyPhen(Me)₂, PhenDC3.

3.3. Ensaios Biofísicos

3.3.1. Espectroscopia de diferença térmica (TDS)

O ensaio de TDS permitiu a caracterização estrutural rápida do aptamero AT11-L0 em solução, sendo complementar à espectroscopia de dicroísmo circular. O espectro de TDS é obtido através da leitura de absorvância no ultravioleta do AT11-L0 no seus estados enrolado e desenrolado (após desnaturação), numa gama de temperaturas dentro do seu intervalo de temperatura de melting (T_m) e reflete o empilhamento de bases que ocorrem na estrutura, uma vez que o aquecimento da sequência leva a alterações na sua absorvância no ultravioleta, que refletem a mudança conformacional do AT11-L0 em solução (Karsisiotis *et al.*, 2011; Mergny *et al.*, 2005).

O ensaio de TDS foi realizado no espectrofotómetro Thermo Scientific evolution 201 UV/visible. O espectro foi adquirido usando uma solução de AT11-L0 a 2,5 μM com tampão 70 mM KCl + 30 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, entre 220 nm a 335 nm, a 200 nm/min. O branco foi realizado com 400 μL de tampão. A célula usada foi de quartzo com 1 cm.

Pipetou-se 2 μL de AT11-L0 e 398 μL de tampão (para um volume final de 400 μL) para um eppendorf e procedeu-se ao *annealing* nas condições estipuladas (ver secção 3.2). Após o *annealing* foi adquirido o espectro a 20°C. Desnaturou-se o AT11-L0 a 90°C, durante 5 min e, após desnaturação, obteve-se o espectro a 90°C. Os resultados foram tratados com recurso ao programa Thermoinsight.

A diferença entre os dois espectros permitiu obter o valor de TDS, que nos fornece informação sobre a estrutura paralela ou antiparalela do AT11-L0 a partir dos seguintes rácios:

$$\frac{\Delta A_{240\text{nm}}}{\Delta A_{295\text{nm}}} > 4 \text{ paralelo (1);}$$

$$\frac{\Delta A_{240\text{nm}}}{\Delta A_{295\text{nm}}} < 2 \text{ antiparalelo (2);}$$

$$\frac{\Delta A_{255\text{nm}}}{\Delta A_{295\text{nm}}} > 3,5 \text{ paralelo (3);}$$

$$\frac{\Delta A_{255\text{nm}}}{\Delta A_{295\text{nm}}} < 1,5 \text{ antiparalelo (4);}$$

3.3.2. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

O CD é o fenómeno detetado quando uma amostra ótica ativa interage com a luz polarizada no plano, composta de componentes polarizados circularmente à direita e à esquerda, e mede a diferença na absorvância da luz polarizada circularmente à esquerda e circularmente à direita depois de passar pela amostra. O registo do CD a diferentes comprimentos de onda permite obter um espectro, que é fortemente indicativo do conteúdo da estrutura secundária de macromoléculas e, entre elas, estruturas G4 (Oommen *et al.*, 2017). Assim sendo, a espectroscopia de CD tem vindo a ser amplamente utilizada na análise estrutural, deteção de alterações conformacionais e estudos de desnaturação térmica (*CD-melting*) de ácidos nucleicos; nomeadamente, é uma técnica biofísica que tem sido utilizada para estudar a topologia de estruturas de guanina do G4 (Carvalho *et al.*, 2017).

De modo a estudar a estabilização do AT11-L0 na presença e ausência dos ligandos derivados de laranja de acridina e fenantrolina realizaram-se ensaios de CD tendo por base protocolos otimizados e publicados (Carvalho *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2018).

O AT11-L0 foi dissolvido na solução tampão de 65 mM KCl + 20 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 e realizado o *annealing* nas condições definidas anteriormente (ver secção 3.2). A concentração na célula de CD foi 10 μ M.

Os ligandos utilizados foram: [16]phenN₂, [32]phen₂N₄, C₈, C₈-NH₂, C₅ e C₃. Foram diluídos em água Milli-Q a partir das soluções iniciais, de modo a obterem-se soluções à concentração final de 1 mM. Foi também utilizado o ligando de G4 comercial designado por PhenDC3 e o ligando sintetizado na secção 3.1.2 designado por DiPyPhen(Me)₂. As titulações consistiram na adição do volume necessário de ligando em cada equivalente molar (0; 0,25; 0,50; 0,75; 1; 1,50; 2 e 4) diretamente na célula de quartzo de 1 mm contendo 10 μ M de AT11-L0, sendo que aos 0; 0,5; 1; 2 e 4 equivalentes foram também adquiridos os espectros de *CD-melting*.

Os espectros de CD foram obtidos a 25 °C no espectropolarímetro Jasco J-815 com uma célula de quartzo de 1 mm contendo um volume final de 250 μ L. Os espectros foram adquiridos entre 220 e 340 nm, com velocidade de varrimento de 200 nm/min, largura de banda de 1 nm, tempo de resposta de 1 segundo, com varrimento contínuo e 4 acumulações.

No caso das experiências de *CD-melting*, o AT11-L0 na presença e ausência de ligandos foi aquecido num intervalo de temperatura entre 20 °C e 110 °C, temperatura estabelecida pelo sistema de Peltier, com uma rampa de aquecimento de 2 °C/minuto e monitorização de elipticidade medida segundo o pico máximo detetado para cada ligando aos 0 equivalentes.

Os dados obtidos foram convertidos em frações de enrolamento usando a seguinte equação:

$$\theta = \frac{CD - CD_{\lambda}^{\min}}{CD_{\lambda}^{\max} - CD_{\lambda}^{\min}} \quad (5)$$

Em que CD é a elipticidade do comprimento de onda monitorizado a cada temperatura e CD^{\min} e CD^{\max} são a menor e maior elipticidade registadas, respetivamente. Os dados foram ajustados a uma distribuição de Boltzmann (com recurso ao programa OriginPro 8 e as T_m determinadas).

3.3.3. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência é uma técnica que permite estudar interações e afinidade entre moléculas, nomeadamente entre estruturas de G4 e ligandos. Através de titulações espectrofluorimétricas, é possível calcular a K_D de equilíbrio utilizando reduzidas quantidades de aptamero e ligandos (μM). Esta técnica é baseada na emissão de um fóton após o relaxamento para o estado fundamental de um singlete excitado eletronicamente após a absorção de um fóton pelo fluoróforo. Ou seja, a amostra é excitada a um determinado comprimento de onda e emite radiação em um comprimento de onda diferente, sendo que, o espectro de emissão fornece informações para análises qualitativas e quantitativas (Giancola e Pagano, 2017).

Como os ligandos derivados de laranja de acridina e fenantrolina são fluorescentes, a afinidade com o aptamero AT11-L0 foi determinada por monitoramento das propriedades espectroscópicas dessas moléculas na presença ou ausência de AT11-L0, tendo como base protocolos otimizados e publicados (Carvalho *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2018).

Os espectros de fluorescência foram adquiridos no fluorímetro Horiba FluoroMax4 equipado com um sistema de controlo de temperatura, usando uma célula de quartzo com um comprimento de percurso de 1 cm. Os ligandos foram excitados a comprimentos de onda previamente determinados pelo espectro de absorção. Assim: o [16]phenN₂ e o [32]phen₂N₄ (derivados de fenantrolina) foram excitados a 271 nm e o espectro de emissão foi adquirido entre 285 e 600 nm; enquanto que os derivados de laranja de acridina C₈, C₈-NH₂, C₅ e C₃ foram excitados a 498 nm e a emissão de fluorescência foi adquirida entre 530 e 700 nm. Todos ligandos foram usados à concentração de 5 μM em tampão contendo 70 mM de KCl e 30 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH=7, a 25 °C. A concentração de AT11-L0 usado para as titulações foi de 500 μM dissolvido na mesma solução tampão e sujeito a *annealing* nas condições suprarreferidas na secção 3.2.

As titulações consistiram na adição do volume necessário de AT11-L0 em cada equivalente molar: 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,25; 1,50; 1,75; 2 para todos os ligandos, à exceção

do C₈-NH₂ ao qual foram acrescentados os equivalentes intermédios 0,125; 0,150; 0,175 diretamente na célula de quartzo de 1 cm contendo 5 μM de cada ligando, com um intervalo de tempo de equilíbrio entre cada equivalente de 10 min.

Os dados foram convertidos em fração de ligandos ligados utilizando as seguintes equações para (6) laranja de acridina ou (7) fenantrolina:

$$\alpha = \frac{I - I_{\lambda}^{livre}}{I_{\lambda}^{ligado} - I_{\lambda}^{livre}} \quad (6)$$

$$\beta = I - I_{\lambda}^{ligado} \quad (7)$$

Em que I é a intensidade de fluorescência a cada equivalente de AT11-L0 - ligando no comprimento de onda definido e o I_{livre} e I_{ligado} são as intensidades de fluorescência do ligando livre (ou seja, aos 0 equivalentes) e totalmente ligado (ou seja, aos equivalentes finais), respetivamente.

Os pontos foram ajustados para uma função sigmoideal no caso dos derivados de laranja de acridina e hiperbólica no caso dos derivados de fenantrolina, com recurso ao programa OriginPro 8. Os valores de K_D foram determinados a partir do seguinte modelo, e de acordo com a família de ligandos, (8) derivados de laranja de acridina ou (9) derivados de fenantrolina:

$$\alpha = \frac{[DNA]^h}{K_D + [DNA]^h} \quad (8)$$

$$\beta = \frac{[DNA]}{K_D + [DNA]} \quad (9)$$

Onde α e β é a fração do ligando ligado para cada classe de ligando, [DNA] é a concentração do AT11-L0 e h é a constante Hill, que descreve a cooperatividade da ligação do ligando.

3.4. Ensaios *in vitro*

Os ensaios *in vitro* descritos nesta secção foram realizados em fibroblastos dérmicos humanos normais (NHDF) e células cervicais humanas cancerosas (HeLa).

As células HeLa cresceram em meio DMEM (do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de antibiótico/antimicótico. No caso das células NHDF cresceram em meio RPMI (do inglês *Roswell Park Memorial Institute*) suplementado com 0,02 M de L-glutamina, 0,001 M de piruvato de sódio, 10% de FBS e 1% de antibiótico/antimicótico. As culturas foram mantidas a 37 °C numa atmosfera humidificada, contendo 5% de CO₂.

3.4.1. Ensaio de Viabilidade Celular

Neste ensaio as células com metabolismo ativo, consideradas células viáveis, convertem o reagente brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) que possui cor amarela, num produto designado E,Z- 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-1,3-dipenil formazano de cor roxa, enquanto que as células não viáveis não são capazes de realizar essa conversão. A coloração roxa é utilizada como um quantificador de viabilidade das células, através da quantificação de formazano a 540 nm. Deste modo, maior intensidade da cor roxa indica maior viabilidade celular e menor intensidade da cor indica um número reduzido de células viáveis e, portanto, uma citotoxicidade superior é esperada (Bahuguna *et al.*, 2017). Os ensaios de viabilidade celular ocorreram com base em protocolos otimizados e publicados (Carvalho *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2018).

Em todos os ensaios de MTT, após o período de incubação, foi preparada uma solução de MTT. Esta solução consiste na dissolução do composto MTT a uma concentração de 5 mg/mL em PBS. A esta solução foi adicionado o respetivo meio incompleto de acordo com a linhagem de células (DMEM sem soro para as HeLa e RPMI com 1% de soro para os fibroblastos), numa proporção de 80% de meio para 20% de PBS.

As células foram semeadas em placas de 48 poços a uma densidade de 5×10^3 células/poço, tendo as HeLa ficado a incubar 24 h e as NHDF 48 h, nos respetivos meios de crescimento (ver secção 3.4), de modo a promover adesão ao fundo dos poços.

Os ensaios de MTT foram divididos em duas fases distintas. Numa primeira fase foram testados os ligandos derivados de laranja de acridina C_8 , C_8-NH_2 , C_5 e C_3 e ainda o ligando [16]phen N_2 . Não se testou o ligando [32]phen $_2N_4$ por não haver stock suficiente disponível. Após adesão, as células HeLa e NHDF foram incubadas com diferentes concentrações dos ligandos, durante 7 dias a 37 °C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO_2 , de modo a determinar o IC_{50} dos compostos com recurso ao programa GraphPad Prism 6. Foram realizados triplicados, tendo sido usado um controlo de células (sem ligando) e um controlo de DMSO. O meio antigo foi substituído pela solução de MTT contendo meio fresco. As caixas foram cobertas com papel de alumínio e incubadas a 37 °C durante 1 h. Após este tempo a solução de MTT foi finalmente removida, os cristais de formazano dissolvidos em 250 μ L de DMSO e a absorvância foi lida no leitor de microplacas Bio-Rad xMark™ a 570 nm. Os resultados foram tratados com recurso ao GraphPad Prism 6.

Tabela 3. Concentrações usadas nos ligandos C₈, C₈-NH₂, C₅, C₃ e [16]phenN₂, para determinação do IC₅₀ em células HeLa, através de ensaio de MTT.

Ligandos	Concentrações usadas (µM)									
C ₈	0,01	0,025	0,075	0,1	0,125	0,25	0,5	1	1,25	2
C ₈ -NH ₂	0,01	0,1	0,25	0,5	1	2	5			
C ₅	0,01	0,1	0,5	1	1,25	1,75	3			
C ₃	0,01	0,05	0,1	0,5	1	2	3			
[16]phenN ₂	0,1	1	5	10	25	50	100			

Tabela 4. Concentrações usadas nos ligandos C₈, C₈-NH₂, C₅, C₃ e [16]phenN₂, para determinação do IC₅₀ em células NHDF, através de ensaio de MTT.

Ligandos	Concentrações usadas (µM)							
C ₈	0,01	0,1	0,25	0,5	1	2	5	
C ₈ -NH ₂	0,01	0,1	0,5	1	2	5	10	
C ₅	0,01	0,1	0,5	1	2	3	5	
C ₃	0,01	0,05	0,1	0,5	1	2	3	
[16]phenN ₂	5	10	15	25	35	50	100	

Após determinados os IC₅₀ dos ligandos, foram testados os conjugados AT11-L0 - ligando, com os ligandos C₈, C₈-NH₂, C₅ e C₃ em células HeLa e NHDF, em que foi testada a concentração mais adequada de cada ligando com base nos resultados obtidos anteriormente. A concentração do AT11-L0 foi fixada a 0,15 µM. Antes de cada incubação o AT11-L0 foi sujeito a *annealing* nas condições previamente estabelecidas (ver secção 3.2) em tampão contendo 70 mM de KCl + 30 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH=7 a 25 °C.

A abordagem foi igual à anterior: após adesão, células HeLa e NHDF foram incubadas com os conjugados nas devidas concentrações, durante 7 dias. No final verificou-se diferenças entre usar o AT11-L0 e os ligandos livres, em vez dos conjugados. Foram realizados triplicados, e utilizados controlos de células sem conjugado, um com DMSO, um com ligando e um com AT11-L0. O meio antigo foi então substituído pela solução de MTT contendo meio fresco. As caixas foram cobertas com papel de alumínio e incubadas a 37°C durante 1 h. Após este tempo a solução de MTT foi finalmente removida, os cristais de formazano dissolvidos em 250 µL de DMSO e a absorvância foi lida no leitor de microplacas Bio-Rad xMark™ a 570 nm. Os resultados foram tratados com recurso ao GraphPad Prism 6.

Tabela 5. Nanosistemas conjugados usados no ensaio de MTT em células HeLa, com a respetiva concentração de cada ligando C₈, C₈-NH₂, C₅ e C₃.

Conjugado	Concentração de ligando (μM)
AT11-L0 - C ₈	0,125
AT11-L0 - C ₈ -NH ₂	0,25
AT11-L0 - C ₅	1
AT11-L0 - C ₃	1

Tabela 6. Nanosistemas conjugados usados no ensaio de MTT em células NHDF, com a respetiva concentração de cada ligando C₈, C₈-NH₂, C₅ e C₃.

Conjugado	Concentração de ligando (μM)
AT11-L0 - C ₈	0,1
AT11-L0 - C ₈ -NH ₂	2
AT11-L0 - C ₅	2
AT11-L0 - C ₃	2

3.4.2. Microscopia de Fluorescência Confocal

Realizou-se os ensaios de microscopia de fluorescência confocal de modo a estudar a colocalização do aptamero AT11-L0, ligando e conjugado AT11-L0 - ligando durante 7 dias em células HeLa, de forma a verificar possíveis diferenças na localização celular.

Para este ensaio foi usado um stock do aptamero AT11-L0 ligado a um fluoróforo que lhe confere marcação no vermelho, designado por Cianina 5 (Cy5). À semelhança do que está descrito anteriormente, este stock também foi preparado através da ressuspensão com 100 μL de água Milli-Q para leitura de absorvância entre 200 e 400 nm, com um tempo de integração de 0,10 s, intervalo de dados de 1 nm, velocidade de varredura de 600 nm e um tempo estimado de 23 s.

Através das leituras de absorvância e, através da Lei de Lambert-Beer, determinou-se que o stock de AT11-L0 tem uma concentração de $0,127 \times 10^3$ M. Esta solução stock do AT11-L0 foi guardada a -20 °C. Aquando da realização do ensaio, o AT11-L0 foi sujeito a *annealing* nas condições previamente estabelecidas (ver secção 3.2) em tampão contendo 70 mM de KCl + 30 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH=7 a 25 °C.

Como o ensaio foi realizado ao longo de 7 dias, as células HeLa foram cultivadas em 7 placas de cultura com fundo de vidro contendo poli-D-lisina a uma densidade de 5×10^3 células/poço (uma placa por dia), em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico/antimicótico. Foram colocadas a aderir durante 24 h a 37 °C numa

atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. Após a adesão, as células foram incubadas no escuro com o conjugado escolhido AT11-L0 (1 μM) + ligando C8 (0,5 μM). Foram ainda preparados controlos de aptamero G4 AT11-L0 (1 μM) e Hoescht (1 μM). O volume final em cada poço foi 250 μL. As diferentes placas foram protegidas da luz com papel de alumínio e deixadas a incubar 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. A cada dia uma placa foi retirada da incubação, tratada e analisada no microscópio de fluorescência confocal, até perfazer o total dos 7 dias.

O tratamento da amostra para análise no microscópio foi efetuado da seguinte forma: aspirou-se o excesso de sonda e efetuaram-se duas lavagens com 300 μL de PBS previamente aquecido. Após as lavagens, preparou-se a solução contendo a sonda nuclear Hoechst 33342 em PBS (1 μM). As células foram então tratadas com esta solução, que ficou a incubar a 37 °C durante 15 min. Antes da visualização, o excesso de sonda foi lavado duas vezes com PBS. As células foram observadas no microscópio Zeiss AxioObserver LSM710 com excitação a laser de 405, 488 e 514 nm para os canais de 4,6-diamidino-2-fenilindole (DAPI), isotiocianato de fluoresceína (FITC) e rodamina, respetivamente. Bandas de emissão apropriadas foram selecionadas para os dois canais fluorescentes, levando em conta a sobreposição espectral. As imagens foram processadas com recurso ao programa Zeiss Zen.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Síntese de ligandos de G4

Foi proposta a síntese de novos derivados de fenantrolina com o objetivo de serem potenciais ligandos para interagir com aptameros G4, nomeadamente o G4 AT11-L0. A síntese destes derivados foi delineada tendo em conta: (1) a obtenção de uma superfície aromática mais extensa que facilita o empilhamento π - π e (2) a ciclização com cadeias extensas de aminas alifáticas que promovem a interação com os sulcos e *loops* do G4.

Em primeiro lugar, foi realizada a oxidação do 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina com brometo de potássio e ácido sulfúrico 60% como oxidante, que deu origem à 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fenodiona). O procedimento foi otimizado, tendo-se obtido o composto final com um rendimento da síntese de 80% (ver secção 3.1.1). Foi seguido o método de Zheng e colaboradores, que tem algumas vantagens comparado com os métodos anteriores: baixa temperatura de reação; quantidade quase igual dos reagentes e evita o uso de uma mistura altamente concentrada de ácido sulfúrico e ácido nítrico (Zheng *et al.*, 2010).

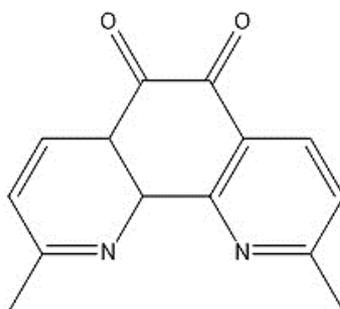


Figura 21. Estrutura química da 1,10-fenantrolina-5,6-diona.

Seguidamente obteve-se o DiPyPhen(Me)₂ através da condensação da 1,10-fenantrolina-5,6-diona (fenodiona) com etilenodiamina em etanol. O rendimento foi superior a 95% (ver secção 3.1.2). Deste modo, houve a inclusão de um anel de piperazina na estrutura da 1,10-fenantrolina, promovendo-se o aumento da superfície aromática disponível.

Posteriormente, este composto intermediário pôde, então, ser ciclizado com várias poliaminas. Para isso, foi necessário a formação do aldeído através da oxidação do DiPyPhen(Me)₂ com dióxido de selénio. Formou-se o DiPyPhen(COH)₂ e o rendimento da reação foi 30% (ver secção 3.1.3). A principal dificuldade na obtenção deste composto foi a eliminação

do selênio, o que diminuiu o rendimento da reação e impossibilitou a obtenção de mais composto puro para iniciar as reações seguintes.

A partir do $\text{DiPyPhen}(\text{COH})_2$ chegou-se aos dois compostos finais: DiPyPhenN_4 e DiPyPhenN_5 . Estes compostos para além da base planar extensa, foram ciclizados com poliaminas para promover a interação com o aptamero G4 AT11-L0.

O DiPyPhenN_4 foi obtido pela adição de diaminohexano ao $\text{DiPyPhen}(\text{COH})_2$, tendo-se obtido o composto puro com um rendimento de 15%. No entanto, este composto demonstrou ser insolúvel em vários solventes incluindo DMSO, pelo que se optou pela sua redução com borohidreto de sódio, sem que se tenha conseguido purificar o composto. Para obtenção do DiPyPhenN_5 , o $\text{DiPyPhen}(\text{COH})_2$ foi sujeito a uma ciclocondensação com dietilenotriamina, seguido de redução com borohidreto de sódio, no entanto sem que se tivesse conseguido purificar o composto final.

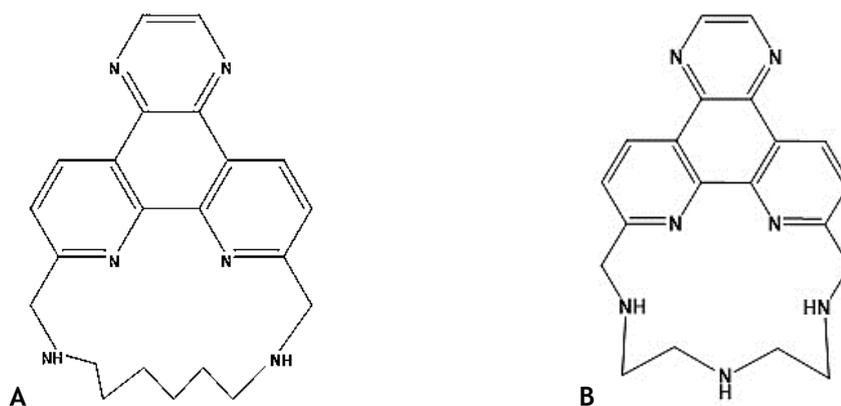


Figura 22. Estrutura química dos ligandos G4 (A) DiPyPhenN_4 e (B) DiPyPhenN_5 .

4.2. Ensaio Biofísicos

4.2.1. Espectroscopia de diferença térmica (TDS)

Como descrito anteriormente (ver secção 3.3.1), foi obtido o espectro de TDS em tampão 70 mM KCl + 30 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 , com base na diferença entre o espectro obtido a 90 °C e o obtido a 20 °C. O cálculo do valor absoluto do fator de TDS, através dos rácios $(\Delta_{240nm})/(\Delta_{295nm})$ e $(\Delta_{255nm})/(\Delta_{295nm})$ permitiu obter informação sobre a estrutura do aptamero de G4 AT11-L0.

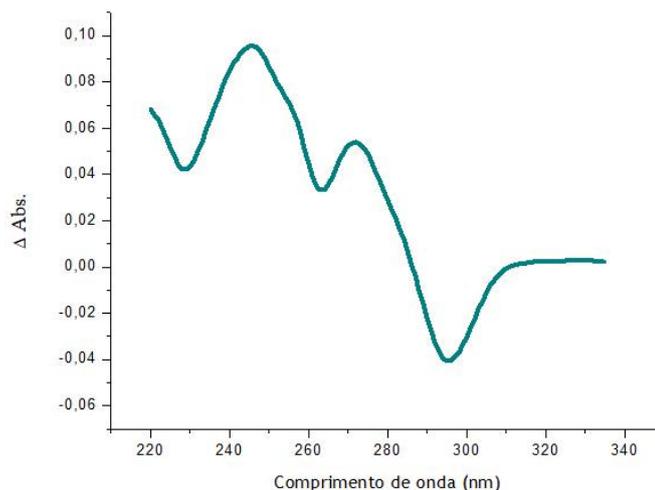


Figura 23. Espectro de TDS resultante da subtração do espectro a 90 °C ao espectro a 20 °C.

Através da análise do espectro de TDS (Fig. 23) pode-se assumir a existência de uma conformação G4, porque possui picos positivos em torno de 243 e 273 nm e um pico mínimo negativo a 295 nm.

Assim sendo, para o G4 AT11-L0:

- $\frac{\Delta A_{240nm}}{\Delta A_{295nm}} = |-2,09|$, valor compreendido entre 2 e 4
- $\frac{\Delta A_{255nm}}{\Delta A_{295nm}} = |-1,20|$, valor inferior a 1,5

Ou seja, para $(\Delta_{240nm})/(\Delta_{295nm})$ o valor do fator de TDS obtido foi de 2,09; estando no intervalo entre 2 e 4, mas muito próximo de 2. No entanto, o fator de TDS obtido para o rácio $(\Delta_{255nm})/(\Delta_{295nm})$ foi igual a 1,20 que é inferior a 1,5, indicativo da topologia antiparalela.

Apesar de parecer haver uma tendência do AT11-L0 para formar uma topologia antiparalela na presença de 70 mM de KCl, estes resultados são inconclusivos quanto à estrutura do aptamero.

4.2.2. Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

As experiências de CD permitiram estudar o efeito dos ligandos na conformação do aptamero de G4 AT11-L0 (10 μM) em tampão de 65 mM KCl + 20 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (ver secção 3.3.2). Nestas condições, aos 0 equivalentes o AT11-L0 apresentou os picos característicos da topologia paralela perto de 260 e 240 nm, como evidenciado na figura 24, sendo que após a adição de 4 equivalentes de cada um dos ligandos estudados C_8 , $\text{C}_8\text{-NH}_2$, C_5 , C_3 , [16]phen N_2 , [32]phen N_4 , DiPyPhen(Me) $_2$ e PhendC3 não se verificaram alterações significativas na topologia do G4 AT11-L0. De ressaltar que apesar destes resultados não estarem em total acordo com os obtidos anteriormente através do espectro de TDS (ver secção 4.2.1), as estruturas de G4 são, por norma, extremamente sensíveis à concentração e ao tipo de sal presentes no tampão, nomeadamente a presença de iões K^+ , Na^+ e Li^+ .

O mesmo já tinha sido reportado por Carvalho e colaboradores para os ligandos [16]phen N_2 e [32]phen N_4 quando estudados com a estrutura G4 do c-MYC (10 μM), o que sugere que estes ligandos não provocam alterações significativas na estrutura G4 (Carvalho et al., 2018). Também Carvalho e colaboradores num outro estudo com os derivados de laranja de acridina C_8 , C_5 e C_3 verificaram que os ligandos ligam-se à topologia paralela do c-MYC, sem alterar a sua topologia (Carvalho et al., 2017).

Referir, ainda, que o espectro obtido apresenta um perfil semelhante aos obtidos por Do e colaboradores para os aptameros G4 AS1411 e G4 AT11, em 70 mM de KCl + 20 mM de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$, o que significa que as modificações químicas presentes nos *linkers* do AT11-L0 não produziram alterações significativas na sua topologia relativamente aos aptameros G4 AS1411 e AT11 (Do et al., 2017).

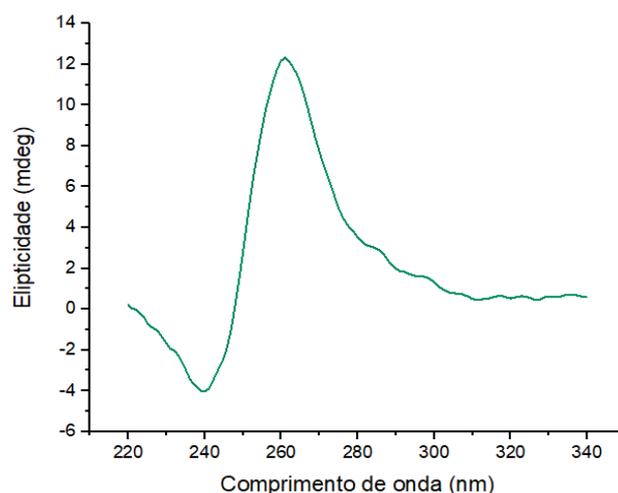


Figura 24. Espectro de CD representativo da estrutura paralela do G4 AT11-L0 (10 μM) em 65 mM de KCl + 20 mM de $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$.

Quanto aos ensaios de *CD-melting* foram realizados com o aptamero de G4 AT11-L0 (10 μM) também em tampão de 65 mM KCl + 20 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ aos 0; 0,5; 1; 2 e 4 equivalentes molares de cada ligando: $\text{C}_8\text{-NH}_2$, C_8 , C_5 , C_3 , [32]phen $_2\text{N}_4$, [16]phen N_2 e ainda DiPyPhen(Me) $_2$ e PhenDC3 (ver secção 3.3.2), permitindo avaliar a estabilização térmica induzida pelos ligandos. Calculou-se a ΔT_m para todos os ligandos em estudo após adição de 4 equivalentes molares de cada ligando (correspondentes a 40 μM de ligando titulado).

A temperatura do aptamero nas condições definidas, aos 0 equivalentes, foi sempre de aproximadamente 51 °C. Esta T_m para este aptamero já havia sido reportada por Do e colaboradores, ainda que através de experiências de *UV-melting*, em que o aptamero foi preparado a uma concentração de 5 μM em tampão com 70 mM de KCl + 20 mM de $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$; Do e colaboradores concluíram que a supressão de timinas no *linker* do AT11 que dá origem ao AT11-L0 representa um aumento de cerca de 8 °C (Do *et al.*, 2017).

Relativamente aos ligandos derivados de laranja de acridina houve uma variação considerável da ΔT_m aos 4 equivalentes para o C_8 (23,9 °C) e $\text{C}_8\text{-NH}_2$ (26,6 °C), enquanto o C_5 apenas promoveu a estabilização de 7,7 °C e o C_3 de 4,2 °C, sendo este último o ligando com menor valor de estabilização térmica (ver figura 25. (C), (D), (E) e (F)). Isto está relacionado com o comprimento da cadeia de alquilamida, dado que quanto menor o seu comprimento, menor é a estabilização induzida pelo ligando e vice-versa. Além de que, a substituição do grupo iodobenzeno pelo NH_2 presente no $\text{C}_8\text{-NH}_2$ também parece favorecer a estabilidade do G4 AT11-L0 por este ligando, em detrimento dos restantes. Deste modo o potencial decrescente de termoestabilização destes ligandos é: $\text{C}_8\text{-NH}_2 > \text{C}_8 > \text{C}_5 > \text{C}_3$.

Relativamente aos derivados de fenantrolina, o ligando com melhor estabilização térmica foi o [32]phen $_2\text{N}_4$, com um ΔT_m igual a 15,16 °C; ainda assim próximo do valor obtido para o ligando [16]phen N_2 (12,55 °C), (ver figura 25 (A) e (B)). Apesar do [32]phen $_2\text{N}_4$ possuir duas cadeias laterais hexil a ligar duas bases planares constituídas por 1,10-fenantrolina não tem uma diferença significativa em relação ao [16]phen N_2 que possui apenas uma base planar 1,10-fenantrolina com uma cadeia hexil, o que poderá estar associado ao facto deste último ter uma maior facilidade em aceder aos quartetos-G.

O ligando proveniente da síntese descrita na secção 3.1.2, DiPyPhen(Me) $_2$ não estabilizou o aptamero de G4 AT11-L0 (cerca de 1,0 °C). Isto sugere que cadeias de poliamina carregadas positivamente a pH fisiológico são necessárias para promover interações electrostáticas adicionais com o aptamero G4 AT11-L0. O ligando comercial PhenDC3 demonstrou uma estabilização superior a 30 °C para 4 equivalentes, devido aos braços com anéis de bisquinolina ligados à base de 1,10-fenantrolina, o que proporciona o empilhamento $\pi\text{-}\pi$.

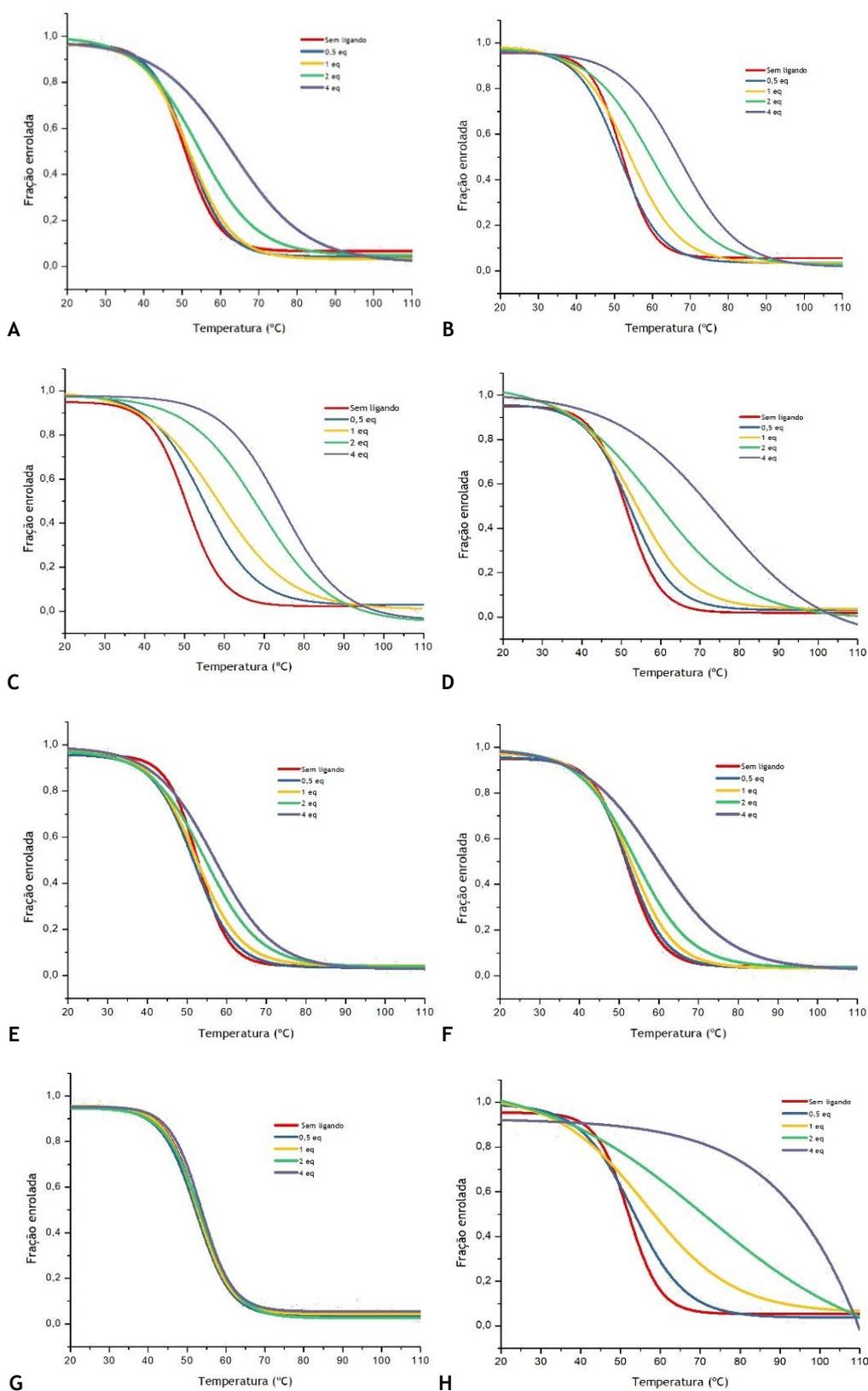


Figura 25. Curvas de CD-melting do aptamero G4 AT11-L0 (10 μM, 65 mM KCl + 20 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄), com os ligandos (A) [16]phenN₂; (B) [32]phen₂N₄; (C) C₈; (D) C₈-NH₂; (E) C₃; (F) C₅; (G) DiPyPhen(Me)₂ e (H) PhenDC3 titulados a 0,5; 1; 2 e 4 equivalentes molares. O ajuste da curva de Boltzmann dos pontos de dados é mostrado. A temperatura é definida pelo sistema Peltier.

Os valores de ΔT_m de todos os ligandos estudados encontram-se sumariados na tabela 7, com as respetivas curvas de *melting* a 4 equivalentes representadas na figura 26. Em suma, de todos os ligandos estudados, o ligando que apresentou maior potencial de estabilização térmica, através de CD-*melting*, para o aptamero G4 AT11-L0 foi o C₈-NH₂ ($\Delta T_m = 26,6$ °C). Já o ligando DiPyPhen(Me)₂ não apresentou capacidade de estabilização térmica ($\Delta T_m = 1$ °C), uma vez que não possui cadeias de poliamina necessárias para promover interações electrostáticas adicionais com o aptamero G4 AT11-L0.

Os valores obtidos para os ligandos [16]phenN₂ e [32]phen₂N₄ a 4 equivalentes são semelhantes aos reportados por Carvalho e colaboradores para a estrutura G4 do oncogene c-MYC (10 µM, 100 mM LiCl), com topologia paralela. O tampão usado foi 30 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄. A ΔT_m para o ligando [16]phenN₂ foi 19,3 °C e a para o [32]phen₂N₄ foi 15,1 °C, a 5 equivalentes. Sendo que, o ligando que evidenciou maior estabilização da estrutura G4 do c-MYC foi o [16]phenN₂, contrariamente ao reportado neste trabalho para o G4 AT11-L0, em que o [32]phen₂N₄ apresenta ΔT_m ligeiramente superior (Carvalho *et al.*, 2018).

Também, ambos os ligandos obtiveram melhores resultados do que ligandos semelhantes derivados de fenantrolina reportados por Carvalho e colaboradores, como é o caso do [30]phen₂N₆ ($\Delta T_m = 13,8$ °C) e [34]phen₂N₆ ($\Delta T_m = 5,9$ °C), titulados a 5 equivalentes com o oncogene c-MYC (10 µM, 100 mM LiCl). O ligando [30]phen₂N₆ é composto por duas bases de 1,10-fenantrolina ligadas por poliaminas com cadeias etil, enquanto que o [34]Phen₂N₆ é composto por duas bases de 1,10-fenantrolina ligadas por poliaminas com cadeias propil, contrariamente ao [16]phenN₂ e [32]phen₂N₄, ambos constituídos por cadeias hexil. Sendo que, o número de grupos metileno consecutivos das cadeias de poliamina carregadas positivamente que separam as bases de 1,10-fenantrolina é importante para a estabilização, porque proporcionam interações adicionais com os *loops* e sulcos da estrutura G4, nomeadamente através de interações eletrostáticas com o esqueleto de fosfato do aptamero G4 (Carvalho *et al.*, 2018).

Num outro estudo, Medeiros-Silva e colaboradores sintetizaram e estudaram ligandos tendo como ponto de partida a estrutura de 1,10-fenantrolina combinada com grupos bisoxazole, designados Phen-1 e Phen-2. A termoestabilidade destes ligandos foi estudada em ensaios de CD-*melting* com as estruturas G4 paralela do c-MYC (5 µM, 100 mM de LiCl + 30 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄) e DNA G4 telomérico híbrido 22AG (10 µM, 10 mM KCl + 30 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄). Quando titulados com o G4 c-MYC, os valores de ΔT_m do Phen-1 e Phen-2 foram 4,3 °C a 7 equivalentes e 31,1 °C a 10 equivalentes, respetivamente. Quando titulados com o G4 22AG os valores foram 4,1 °C a 7 equivalentes e 15,1 °C a 10 equivalentes, respetivamente. O ligando Phen-2 é o ligando que apresentou maior estabilização térmica em ambas as estruturas de G4. Os valores de ΔT_m são semelhantes aos reportados neste trabalho para os ligandos [32]phen₂N₄, C₈ e C₈-NH₂ (Medeiros-Silva *et al.*, 2017).

Também Carvalho e colaboradores, estudaram as estruturas G4 c-MYC (10 μM , 100 mM LiCl) e G4 KRAS-22RT (10 μM , 50 mM KCl), com os derivados de laranja de acridina C₃, C₅ e C₈. O tampão usado foi 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄. Os valores de ΔT_m para o C₃, C₅ e C₈ foram 18,5 °C; 22,0 °C; 40,7 °C respectivamente quando tituladas com G4 c-MYC e 17,8 °C; 29,0 °C e 40,7 °C respectivamente quando titulados com o G4 KRAS-22RT, para 2 equivalentes molares. Em ambos os casos, os valores de ΔT_m reportados por Carvalho e colaboradores demonstraram maior estabilização da estrutura pelo ligando C₈, seguido do C₅ e só depois o C₃ tal como o apresentado neste trabalho (Carvalho *et al.*, 2017).

Vários fatores que influenciam a determinação do ΔT_m , nomeadamente a concentração de aptamero usado, a topologia do aptamero, o intervalo de concentrações dos ligandos em estudo, o tampão usado assim como a concentração de cada íão presente no tampão. Por exemplo, Amato e colaboradores estudaram um ligando derivado da diidropirimidina-4-ona a 4 equivalentes tendo reportado valores de ΔT_m iguais a 4,5 °C quando titulado com o G4 c-kit1 (10 μM , 100 μM KCl) e >15 °C quando titulado com o G4 c-MYC (10 μM , 20 μM de KCl), demonstrando como o mesmo ligando pode ter comportamentos muito diferentes em estruturas G4 diferentes e em tampões diferentes (Amato *et al.*, 2017).

Tabela 7. Estabilização térmica (ΔT_m) induzida pelos ligandos em estudo a 4 equivalentes molares medida por experiências de CD-melting.

Ligando	ΔT_m (°C)
C ₈	23,9 \pm 0,2
C ₈ -NH ₂	26,6 \pm 0,3
C ₃	4,2 \pm 0,1
C ₅	7,7 \pm 0,2
[16]phenN ₂	12,6 \pm 0,2
[32]phen ₂ N ₄	15,2 \pm 0,2
DiPyPhen(Me) ₂	1,0 \pm 0,1
PhenDC3	>30

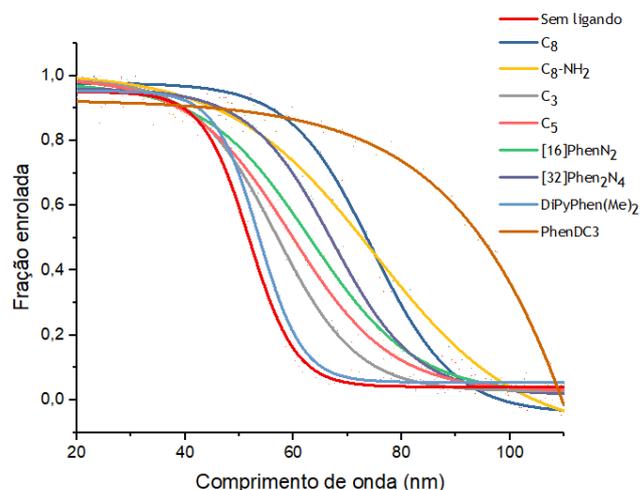


Figura 26. Curvas de CD-melting do aptamero G4 AT11-L0 (10 μM , 65 mM KCl + 20 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄), na ausência e presença de 4 equivalentes molares dos ligandos estudados. O ajuste da curva de Boltzmann dos pontos de dados é mostrado. A temperatura corresponde à temperatura definida pelo sistema Peltier.

4.2.3. Espectroscopia de fluorescência

A espectroscopia de fluorescência foi utilizada para determinar a afinidade entre os ligandos e o aptamero G4 AT11-L0, a partir da variação de intensidade de fluorescência dependente da concentração do aptamero em estudo. Isto permitiu a obtenção de valores de K_D dos ligandos [16]phenN₂, [32]phen₂N₄, C₈, C₈-NH₂, C₃ e C₅. Não foram estudados os ligandos PhenDC3 e DiPyPhen(Me)₂ pois não têm fluorescência detetável. Os ligandos foram titulados com o aptamero G4 AT11-L0 a 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1; 1,25; 1,50; 1,75; 2 equivalentes molares correspondente ao intervalo de concentrações entre 0 μM e 10 μM de AT11-L0 (ver secção 3.3.3).

Após a adição de concentrações crescentes de G4 AT11-L0 a ambos os ligandos [16]phenN₂ e [32]phen₂N₄ derivados de fenantrolina, estes exibiram uma diminuição da intensidade de fluorescência (ver figura 27 (A) e (B)); enquanto que os derivados de laranja de acridina C₈, C₈-NH₂, C₃ e C₅ exibiram um aumento da intensidade de fluorescência (ver figura 27 (C), (D), (E) e (F)). As curvas de titulação foram ajustadas de acordo com as equações 8 e 9 da secção 3.3.3, tendo sido determinados os valores de K_D resumidos na tabela 8.

Como se pode observar na tabela 8, os valores de K_D determinados encontram-se no intervalo de 10⁻⁶ e 10⁻⁷ (M⁻¹), que são típicos de ligandos de G4 com afinidade moderada a elevada.

Estes resultados mostraram ainda que o ligando derivado de fenantrolina com maior afinidade para o G4 AT11-L0 é o [32]phen₂N₄, $K_D = 2,7 \times 10^{-7}$ (M⁻¹) ligeiramente inferior ao do [16]phenN₂ de $5,1 \times 10^{-7}$ (M⁻¹). Ou seja, a ordem decrescente da afinidade para o AT11-L0 é: [32]phen₂N₄ > [16]phenN₂.

Relativamente aos ligandos derivados de laranja de acridina, o ligando com maior afinidade para o G4 AT11-L0 foi o C₈-NH₂, $K_D = 3,2 \times 10^{-7}$ (M⁻¹), seguido do C₈ ($6,9 \times 10^{-7}$ (M⁻¹)), C₃ ($7,7 \times 10^{-7}$ (M⁻¹)) e, por fim, o C₅ ($1,0 \times 10^{-6}$ (M⁻¹)). Deste modo, a ordem decrescente de afinidade para o G4 AT11-L0 é: C₈-NH₂ > C₈ > C₃ > C₅. Um aumento no comprimento da cadeia alquilamida parece promover a plasticidade do ligando, aumentando a interação entre os ligandos e a estrutura G4.

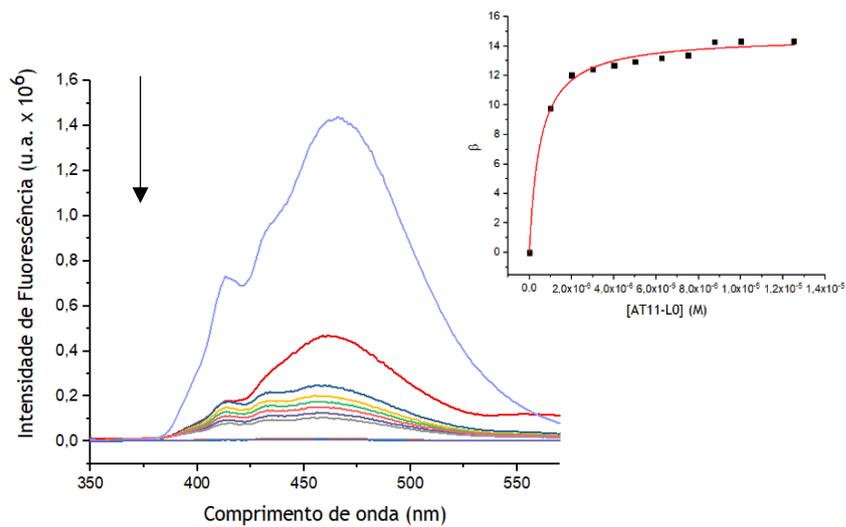
Em suma, entre todos os ligandos estudados por espectroscopia de fluorescência, o ligando com maior afinidade foi o [32]phen₂N₄ seguido do C₈-NH₂ e do C₈, enquanto que o ligando que demonstrou menor afinidade foi o C₅, ainda assim, com valores relativamente próximos uns dos outros. Estes resultados correlacionam-se em parte com os resultados de estabilização térmica reportados anteriormente através de CD-*melting* (ver secção 4.2.2), em que os ligandos que demonstraram maior ΔT_m foram os ligandos C₈-NH₂, C₈ e [32]phen₂N₄.

Os valores obtidos para os ligandos [16]phenN₂ e [32]phen₂N₄ são semelhantes aos reportados por Carvalho e colaboradores a 5 μM, com o G4 c-MYC (titulado no intervalo de concentrações: 0 μM - 25 μM em 100 mM de KCl + 30 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄), em que o valor de K_D foi 7,1x10⁻⁶ (M⁻¹) para o [16]phenN₂ e 7,7x10⁻⁶ (M⁻¹) para o [32]phen₂N₄ (Carvalho *et al.*, 2018).

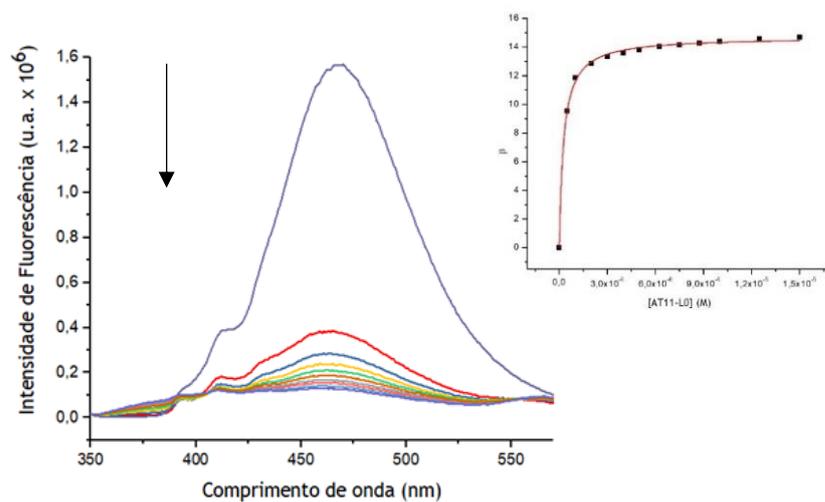
Também Carvalho e colaboradores, estudaram as estruturas de G4 c-MYC e KRAS-22RT com os derivados de laranja de acridina C₃, C₅ e C₈. O KRAS-22RT foi estudado em 50 mM KCl + 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, num intervalo de concentrações 0,5 μM - 10 μM. Os valores de K_D para o ligandos derivados de laranja de acridina C₃, C₅ e C₈ foram 5,5x10⁻⁷ (M⁻¹); 5,1x10⁻⁷ (M⁻¹) e 4,4x10⁻⁷ (M⁻¹), respetivamente. O c-MYC foi estudado em 100 mM de KCl + 10 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, num intervalo de concentrações 0.1 μM - 2,5 μM. Neste caso, os valores de K_D para os ligandos C₃, C₅ e C₈ foram 1,8x10⁻⁷ (M⁻¹); 2,7x10⁻⁷ (M⁻¹); 7,4x10⁻⁷ (M⁻¹), respetivamente. Ou seja, os valores reportados são similares aos determinados neste trabalho, na ordem dos 10⁻⁷ (M⁻¹). Enquanto que no caso do c-MYC o ligando com maior afinidade foi o C₃, no caso do KRAS-22RT foi o C₈ (Carvalho *et al.*, 2017).

Tabela 8. Valores de K_D (M⁻¹) determinados para o G4 AT11-L0 (100 mM de KCl + 30 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄; 0 - 25 μM) com os ligandos (5 μM) em estudo obtido a partir de ensaios de espectroscopia de fluorescência, com tempo de equilíbrio de 10 min.

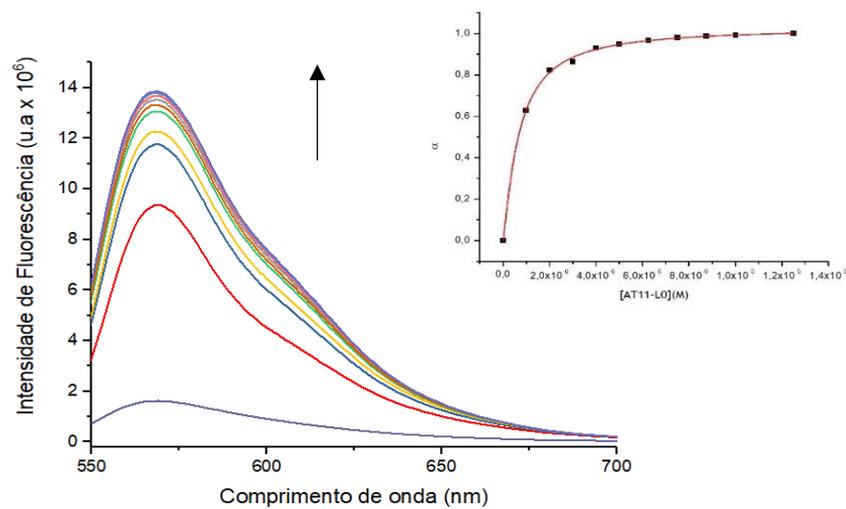
Ligando	K _D (M ⁻¹)
C ₈	6,9 × 10 ⁻⁷
C ₈ -NH ₂	3,2 × 10 ⁻⁷
C ₃	7,7 × 10 ⁻⁷
C ₅	1,0 × 10 ⁻⁶
[16]phenN ₂	5,1 × 10 ⁻⁷
[32]phen ₂ N ₄	2,7 × 10 ⁻⁷



A



B



C

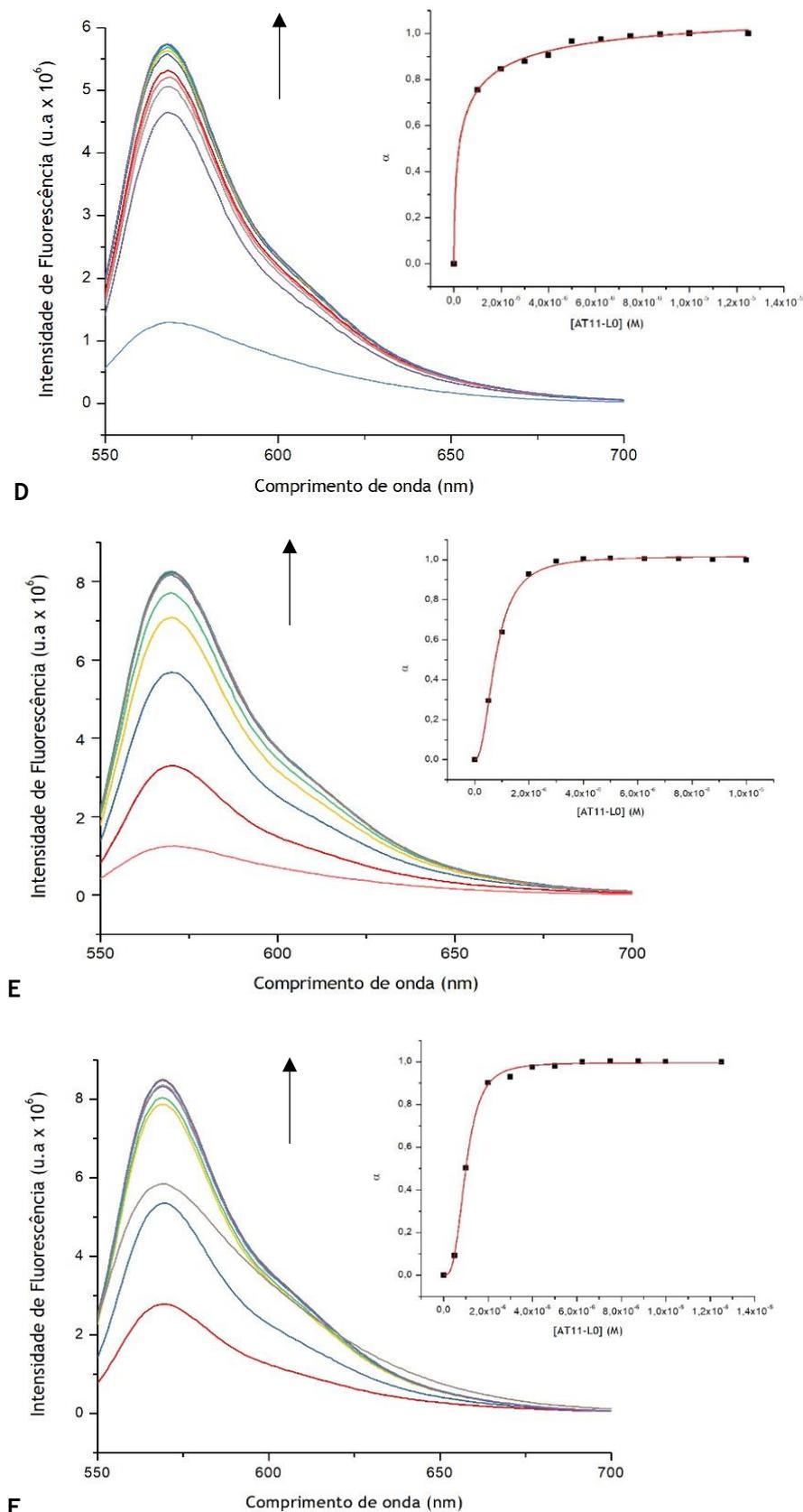


Figura 27. Titulações de fluorescência dos ligandos (A) [16]phenN₂; (B) [32]phen₂N₄; (C) C₈; (D) C₈-NH₂; (E) C₃; (F) C₅ (5 μ M, 100 mM KCl + 30 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄), com uma concentração crescente de AT11-L0 (concentrações 0 - 10 μ M). A seta identifica o sentido da variação de fluorescência ao longo da adição dos vários equivalentes. Apresentam-se também os gráficos da K_D obtidos pelas equações estipuladas para cada família de ligando, como uma função da concentração de G4 AT11-L0 (M⁻¹).

4.3. Ensaios *in vitro*

4.3.1. Ensaio de Viabilidade Celular

O efeito dos ligandos [16]phenN₂; C₈; C₈-NH₂; C₃ e C₅ na viabilidade celular foi avaliado por ensaios de MTT realizados ao fim de 7 dias de incubação, utilizando uma linha de células HeLa vs NHDF (ver secção 3.4.1). O tempo de incubação foi 7 dias porque posteriormente os ligandos foram avaliados conjugados com o derivado do AS1411, AT11-L0. Sendo que, são necessários pelo menos 4 dias de exposição ao G4 AS1411 para este provocar morte celular, sendo que apenas ao fim de 7 dias há morte celular substancial (>60%) (Ashrafuzzaman *et al.*, 2014). Os resultados são apresentados na tabela 9 e figura 28.

Todos os ligandos demonstraram inibir significativamente o crescimento de células cancerosas HeLa a baixas concentrações, sendo que o ligando que apresentou maior potencial citotóxico e antiproliferativo foi o C₈ (IC₅₀ = 0,15 µM), seguido do C₈-NH₂ (IC₅₀ = 0,31 µM). Os ligandos C₃ e C₅ apresentaram IC₅₀ = 3,51 µM e IC₅₀ = 1,14 µM, respetivamente. O [16]phenN₂ possui o valor de IC₅₀ mais elevado (8,2 µM).

Foram determinados em estudos prévios os IC₅₀ dos compostos derivados de laranja de acridina C₈, C₅ e C₃ em HeLa, após incubação durante 24 h, tendo sido obtido para cada um deles valores de IC₅₀ iguais a 0,9 µM; 2,4 µM e 5,3 µM respetivamente. Estes valores estão em concordância com os apresentados neste trabalho e comprovam que apesar dos ligandos referidos terem potencial citotóxico nas primeiras 24 h, continuam a atuar ao longo de 7 dias (Carvalho *et al.*, 2017).

Em relação às células NHDF, cujos resultados também estão sumariados na tabela 9, os resultados são semelhantes aos obtidos para as células cancerosas, havendo um ligeiro aumento do IC₅₀, mas evidenciando que não houve seletividade dos ligandos para células HeLa em detrimento de NHDF. Há a necessidade de proceder a melhorias para tornar estes ligandos mais seletivos para células cancerosas, nomeadamente a introdução de cadeias laterais mais extensas ou o aumento do tamanho da porção aromática.

Existem vários estudos sobre o efeito de ligandos de G4 no crescimento de linhas de células cancerosas, através de ensaios de MTT. Larsen e colaboradores estudaram derivados de fenantrolina tetrasubstituídos em células HeLa (5 x 10³ células/poço). Após 3 dias de incubação o intervalo de valores de IC₅₀ determinado foi 25 µM - 100 µM. Estes valores são superiores aos reportados neste trabalho para os derivados de laranja de acridina e para o derivado de fenantrolina [16]phenN₂ (Larsen *et al.*, 2012).

Corry e colaboradores estudaram derivados de piperazina em células HeLa (3 x 10³ células/poço), com um período de incubação de 24 h. Os valores de IC₅₀ obtidos através do ensaio de MTT estabeleceram um intervalo de 1,4 µM - 2,4 µM. Estes valores são equiparáveis

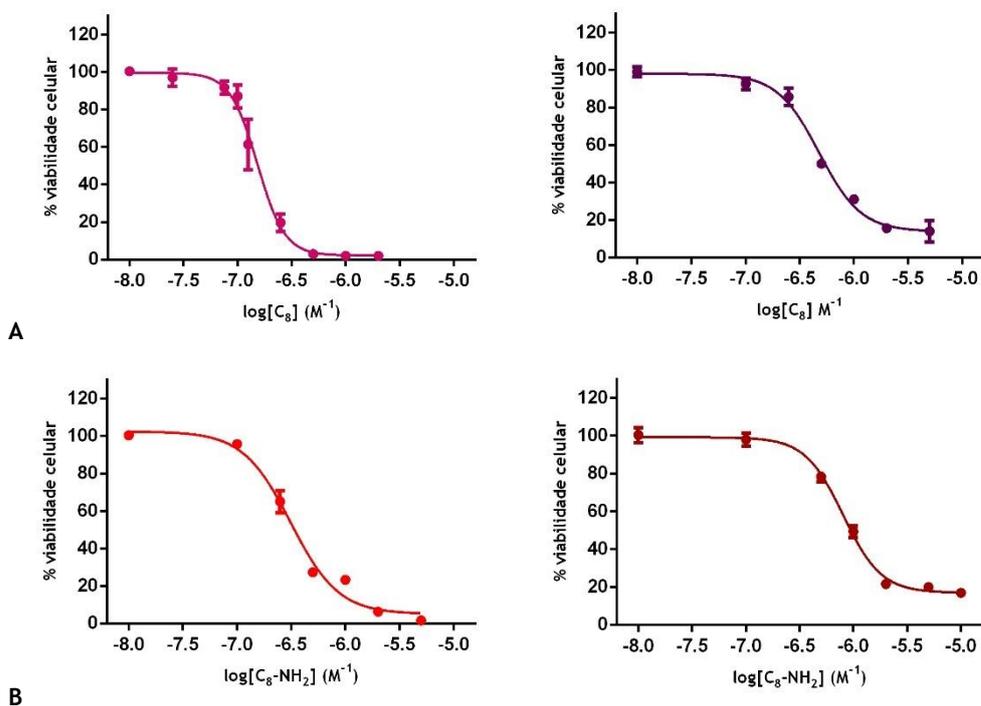
aos obtidos para os derivados de laranja de acridina C_8 , C_8-NH_2 e C_5 também em células HeLa neste trabalho (Corry *et al.*, 2011).

Hounson e colaboradores estudaram derivados de quinacridina, em células de carcinoma epidermoide (A431). Ao fim de 4 dias de incubação o intervalo do IC_{50} foi $0,4 \mu M - 5 \mu M$, sendo equiparável ao apresentado neste trabalho para os derivados de laranja de acridina ao fim de 7 dias em HeLa ($0,15 \mu M - 3,51 \mu M$) (Hounsou *et al.*, 2007).

Ou seja, os valores de IC_{50} calculados neste trabalho demonstram que os ligandos estudados têm potencial citotóxico e antiproliferativo equiparável ou superior a outras classes de ligandos, como outros derivados de fenantrolina e derivados de piperazina e quinacridina.

Tabela 9. Valores calculados de IC_{50} a partir do ensaio do MTT com os ligandos C_8 , C_8-NH_2 , C_3 e C_5 derivados de laranja de acridina e o ligando [16]phen N_2 nas linhas celulares HeLa e NHDF.

	IC_{50} HeLa (μM)	IC_{50} NHDF (μM)
C_8	0,15	0,48
C_8-NH_2	0,31	0,80
C_3	3,51	1,73
C_5	1,14	0,99
[16]phen N_2	8,2	20



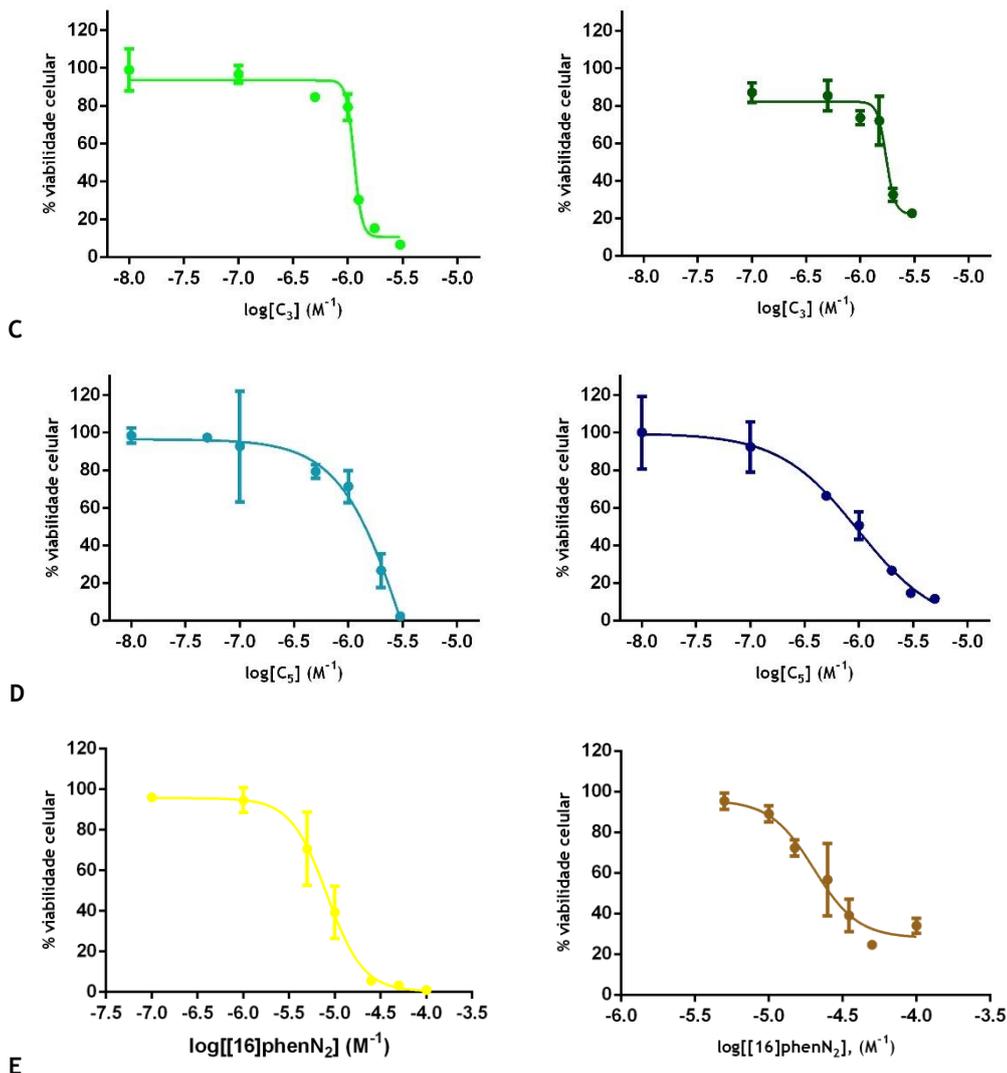


Figura 28. Curvas de IC₅₀ determinadas através de ensaio de MTT após uma semana de incubação com os ligandos (A) C₈; (B) C₈-NH₂; (C) C₃; (D) C₅ (E) [16]phenN₂ em células HeLa (esquerda) vs NHDF (direita). Os gráficos foram obtidos através do programa GraphPad Prism 8.

De acordo com os resultados obtidos para os valores de IC₅₀ realizaram-se os ensaios de MTT com os nanosistemas conjugados aptamero-ligando. Os ligandos selecionados foram C₈; C₈-NH₂, C₅ e C₃. Na linha de células HeLa foram selecionadas concentrações dos ligandos abaixo do valor de IC₅₀ de modo a verificar se para uma concentração de ligando cuja citotoxicidade é inferior a 50% há alteração significativa da percentagem de viabilidade celular quando usado conjugado com o aptamero. Enquanto que, na linha de células NHDF foram selecionadas concentrações acima dos valores de IC₅₀ dos ligandos de forma a avaliar o potencial do conjugado aptamero-ligando. O aptamero G4 AT11-L0 foi sempre usado a 15 μM, tal como descrito na secção 3.4.1. A esta concentração observou-se um valor de 52% de viabilidade celular em HeLa e 68% em NHDF.

Os resultados obtidos em células HeLa encontram-se sumariados na figura 29 e as percentagens de viabilidade celular para cada conjugado na tabela 10. Todos os conjugados apresentados na figura 29 diminuem a viabilidade celular comparativamente com o aptamero

e ligandos livres. Concluiu-se que o nanosistema conjugado que mais promoveu diminuição da viabilidade celular relativamente ao controlo foi o AT11-L0 - C₅ (10%), seguido do AT11-L0 - C₃ (12%), do AT11-L0 - C₈-NH₂ (24%) e do AT11-L0 - C₈ (32%).

Tabela 10. Valores de percentagem de viabilidade celular obtida para os nanosistemas conjugados AT11-L0 (15 μM) + C₈ (0,125 μM), AT11-L0 (15 μM) + C₈-NH₂ (0,250 μM); AT11-L0 (15 μM) + C₃ (1 μM); AT11-L0 (15 μM) + C₅ (1 μM) incubados em células HeLa durante 7 dias.

	%viabilidade HeLa
AT11-L0	52
AT11-L0 + C ₈ (0,125 μM)	32
AT11-L0 + C ₈ -NH ₂ (0,25 μM)	24
AT11-L0 + C ₃ (1 μM)	12
AT11-L0 + C ₅ (1 μM)	10

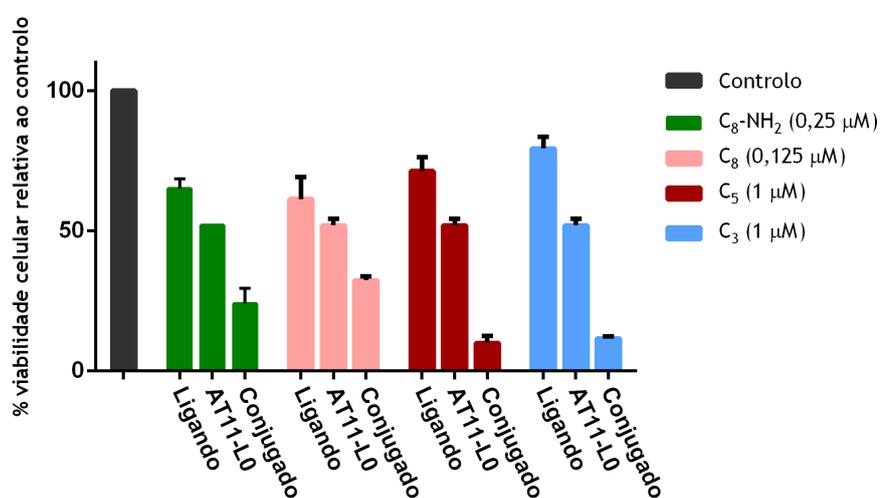


Figura 29. Viabilidade celular relativa às células HeLa determinada pelo ensaio MTT após 7 dias de incubação com os conjugados em estudo.

Os resultados obtidos de viabilidade celular nas células NHDF encontram-se sumariados na figura 30 e as percentagens determinadas para cada nanosistema apresentam-se sumariadas na tabela 11. Analisando o gráfico da figura 30, os conjugados AT11-L0 - C₈-NH₂ (77%), AT11-L0 - C₃ (68%) e AT11-L0 - C₅ (65%) promoveram o aumento da viabilidade celular em relação ao aptamero e ligandos livres, com o conjugado AT11-L0 - C₈-NH₂ a demonstrar ser o mais seletivo relativamente ao controlo. Referir que em todos eles, o ligando à concentração escolhida apresentava valores de viabilidade inferior a 50% - C₈-NH₂ (22%); C₃ (33%) e C₅ (26%) -, tendo os conjugados apresentado valores de viabilidade celular superiores a 50%. O conjugado AT11-L0 - C₈ (45%) promoveu o aumento de viabilidade celular relativamente ao ligando, mas não em relação ao aptamero livre. Como perspetiva futura, torna-se importante otimizar a seletividade destes nanosistemas em células não cancerosas NHDF. Nomeadamente através da modificação química dos ligandos com alteração das cadeias laterais ou o aumento do tamanho da porção aromática e/ou modificações estruturais no aptamero G4.

Tabela 11. Valores da percentagem de viabilidade celular obtida para os nanossistemas conjugados AT11-L0 (15 μM) + C₈ (1 μM), AT11-L0 (15 μM) + C₈-NH₂ (2 μM); AT11-L0 (15 μM) + C₃ (2 μM); AT11-L0 (15 μM) + C₅ (2 μM) incubados em células NHDF durante 7 dias.

	%viabilidade NHDF
AT11-L0	68
AT11-L0 + C ₈ (1 μM)	45
AT11-L0 + C ₈ -NH ₂ (2 μM)	77
AT11-L0 + C ₃ (2 μM)	68
AT11-L0 + C ₅ (2 μM)	69

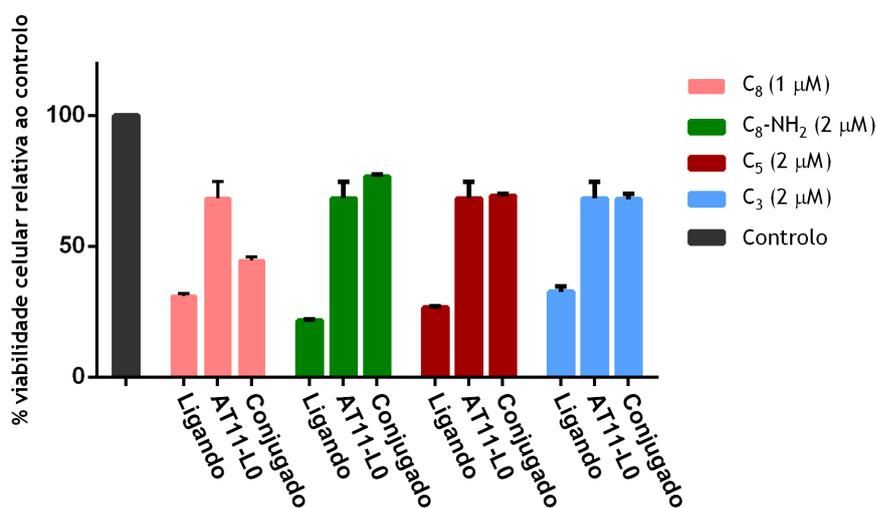


Figura 30. Viabilidade celular relativa às células NHDF determinada pelo ensaio MTT após 7 dias de incubação com os conjugados em estudo.

4.3.2. Microscopia de Fluorescência Confocal

Os ensaios de microscopia de fluorescência confocal foram realizados em células HeLa (5×10^3 células/poço) e permitiu avaliar a localização do ligando e aptamero dentro da célula, bem como verificar a formação e colocalização do nanossistema AT11-L0 (1 μM) + ligando C8 (0,5 μM) (ver secção 3.4.2). O núcleo das células foi identificado com Hoechst 33342 (marcação no azul, com $\lambda_{\text{excitação}} = 405 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 427 \text{ nm}$).

Através da realização deste ensaio foi possível verificar que o ligando C₈ (marcação no verde, com $\lambda_{\text{excitação}} = 488 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 500 \text{ nm}$) tem uma tendência para localizar o nucléolo, encontrando-se também disperso no núcleo e citoplasma. O mesmo já tinha sido reportado por Carvalho e colaboradores não só para o C₈, como também para o C₃ e C₅ (Carvalho *et al.*, 2017). Esta distribuição é visível desde o dia 1 (24 h após a incubação) até ao dia 7.

Quanto ao aptamero G4 AT11-L0 (marcação no vermelho proveniente do fluoróforo C_Y5, com $\lambda_{\text{excitação}} = 633 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 731 \text{ nm}$) encontra-se localizado no citoplasma das células, não sendo internalizado pelo núcleo. No dia 1 já se verifica internalização do AT11-L0 no citoplasma das células, mas a partir do dia 3 (72 h após incubação) torna-se mais evidente essa internalização. Isto está de acordo com o descrito na literatura para o G4 AS1411: 24 h a 72 h após incubação com o aptamero G4, a macropinocitose é induzida pelo aptamero G4 em células que sobreexpressam a NCL no citoplasma e à sua superfície, levando à acumulação do aptamero G4 no citoplasma das células (Bates *et al.*, 2017).

Através deste ensaio de colocalização também foi possível verificar a formação do nanosistema G4 AT11-L0 - C₈ através da cor amarela exibida desde o 1º dia. Nos dias 3 a 5 é mais visível a localização do nanosistema internalizado no citoplasma. A sobreexpressão da NCL no citoplasma e à superfície das células cancerosas induz a internalização do AT11-L0, que por sua vez estimula a macropinocitose, o que permite a internalização do complexo ligando - aptamero G4 - NCL.

Para além disso verificou-se que, quer o G4 AT11-L0 livre, quer conjugado com o ligando parece aglomerar-se em vacúolos no interior da célula. O mesmo foi observado por Reyes-Reyes e colaboradores para o AS1411, que através do uso de um marcador de macropinocitose (dextrano) comprovaram ser macropinosomas, indicando a ocorrência de macropinocitose. Referir ainda que as células HeLa demonstraram uma morfologia atípica, que pode ser devida à hiperestimulação da macropinocitose induzida pelo aptamero G4, o que leva à vacuolização, núcleos irregulares e células inchadas durante a morte celular (Reyes-reyes *et al.*, 2010).

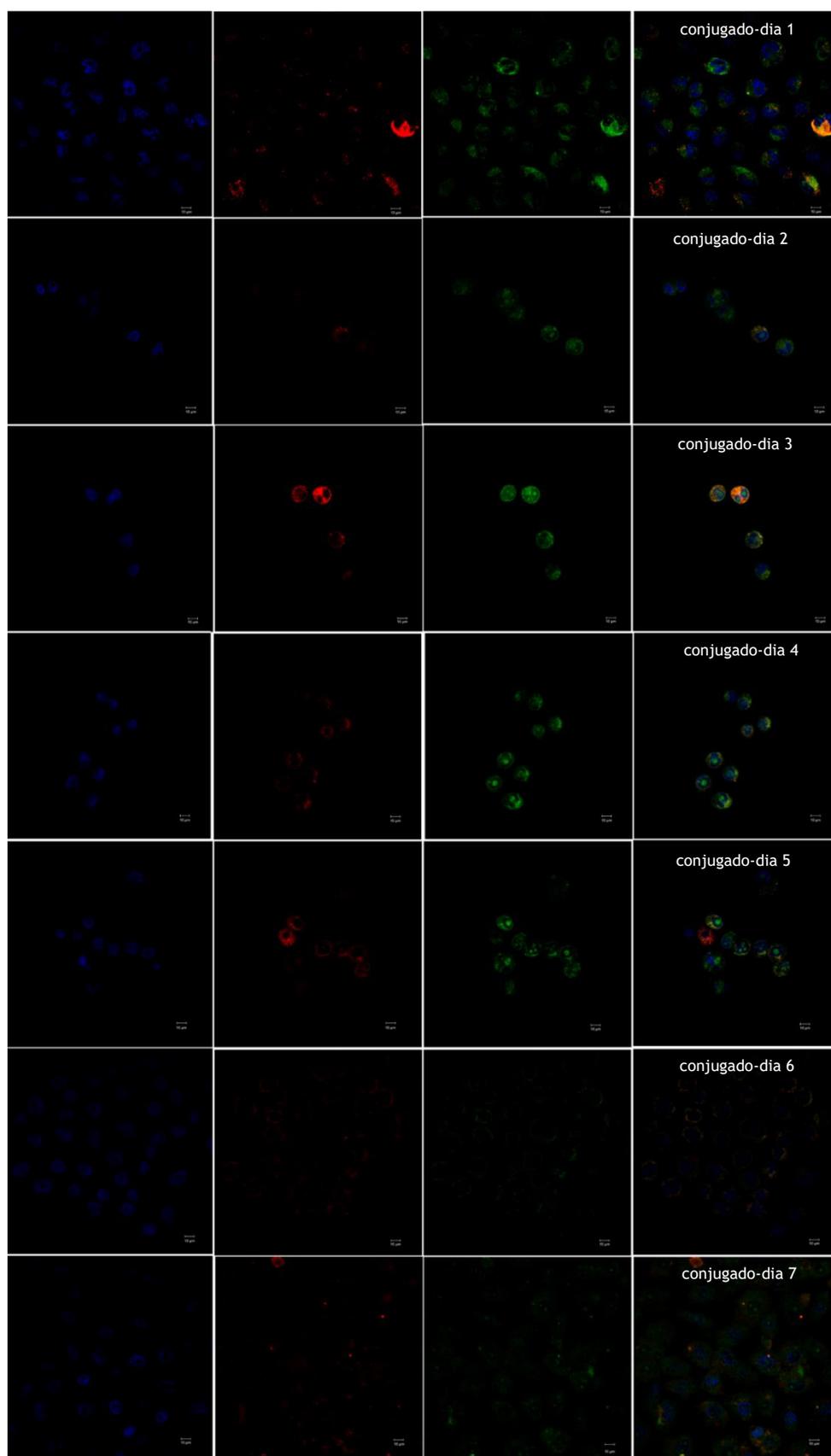


Figura 31. Imagens de microscopia confocal de células HeLa tratadas ao longo de 7 dias com o ligando C_8 ($0,5 \mu\text{M}$) (marcação a verde) e o aptamero AT11-L0 ($1 \mu\text{M}$) marcado com o fluoróforo Cy5 (vermelho). A sonda nuclear usada foi o Hoechst 33342 (azul). A barra de escala está a $10 \mu\text{m}$. A formação do conjugado aptamero-ligando é evidenciada pelo aparecimento de amarelo.

Capítulo 5

Conclusões e Perspetivas Futuras

A procura por novas abordagens terapêuticas anticancerígenas direcionadas é um foco da investigação em ciências da saúde na atualidade. O objetivo é aumentar a taxa de sucesso deste tipo de terapias ao direcioná-las para os tecidos lesados, sem afetar os tecidos não lesados. Deste modo, pretende-se uma diminuição drástica dos sintomas (por exemplo, cardiocitotoxicidade e mielossupressão) associados aos tratamentos convencionais como a quimioterapia e a radioterapia. A aplicação da nanotecnologia nos cuidados de saúde e, em particular, na terapia contra o cancro surge como uma das soluções mais convincentes para os problemas enfrentados pelas indústrias biotecnológica e farmacêutica.

O presente trabalho teve como finalidade o desenvolvimento de nanosistemas de entrega de fármacos baseados em aptameros G4 e a sua ligação à NCL. A ação anticancerígena, não imunogenicidade, facilidade de produção e estabilidade após armazenamento, assim como o tamanho reduzido que facilita a ligação a ligandos fluorescentes são características dos aptameros G4 que os tornam promissores para o desenvolvimento de nanosistemas.

Os ensaios biofísicos evidenciaram uma estrutura de G4 paralela para o AT11-L0 em tampão 65 mM KCl + 20 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 . Demonstrou-se, ainda, que os ligandos derivados de laranja de acridina e os derivados de fenantrolina são promissores na estabilização do aptamero G4 AT11-L0. O C_8-NH_2 foi o ligando que mais se destacou nestes estudos, com $\Delta T_m = 26,6$ °C e $K_D = 3,2 \times 10^{-7}$ (M^{-1}), seguido dos ligandos C_8 ($\Delta T_m = 23,9$ °C e $K_D = 6,9 \times 10^{-7}$ (M^{-1})) e [32]phen₂N₄ ($\Delta T_m = 15,2$ °C e $K_D = 2,7 \times 10^{-7}$ (M^{-1})). Apenas o ligando comercial, PhenDC3 promoveu uma maior estabilização do aptamero G4 AT11-L0 por CD-melting ($\Delta T_m > 30$ °C)

A determinação dos valores de IC_{50} pelo ensaio do MTT evidenciou que o ligando C_8 apresentou um menor valor ($IC_{50} = 0,15$ μM), seguido do C_8-NH_2 ($IC_{50} = 0,31$ μM) nas células HeLa, sendo estes os ligandos com maior potencial citotóxico e antiproliferativo. Estes resultados são promissores relativamente aos reportados na literatura para outros derivados de fenantrolina, acridina e piperazina. No entanto, os ligandos não apresentaram seletividade para HeLa em detrimento de NHDF.

Relativamente ao ensaio de viabilidade dos conjugados AT11-L0 - C_8 , AT11-L0 - C_8-NH_2 , AT11-L0 - C_3 e AT11-L0 - C_5 em células HeLa, estes demonstraram elevada citotoxicidade, sendo que o conjugado AT11-L0 - C_5 apresentou menor viabilidade celular (10%). Na linha de células NHDF, todos os conjugados aumentaram a viabilidade celular relativamente ao aptamero e

ligando livres, à exceção do conjugado AT11-L0 - C₈, que apenas aumentou a viabilidade celular relativamente ao ligando. O conjugado AT11-L0 - C₈-NH₂, foi o que apresentou maior viabilidade celular (77%) relativamente ao controlo, pelo que demonstrou ser o conjugado mais seletivo.

Por fim, nos ensaios de microscopia de fluorescência confocal observou-se a autofluorescência do derivado de laranja de acridina C₈. Para além disso, observou-se a internalização do C₈ nas células cancerosas, nomeadamente a nível do núcleo e nucléolo. O ensaio de microscopia de fluorescência confocal permitiu também observar a internalização crescente do AT11-L0 em células HeLa ao longo de 7 dias confirmando-se a formação do nanosistema aptamero-ligando a nível celular e a sua internalização crescente, pelo aparecimento de amarelo. A internalização através de vacúolos, designados macropinosomas constituiu uma evidência da ocorrência de macropinocitose hiperestimulada pelo aptamero G4 e dependente de NCL.

Sumariamente, os resultados demonstraram que os ligandos derivados de fenantrolina e de laranja de acridina possuem elevada afinidade e estabilização do aptamero G4 AT11-L0. Estes ligandos são citotóxicos e tem efeito antiproliferativo em linhas de células HeLa e NHDF. Os conjugados AT11-L0 - ligando estudados evidenciaram citotoxicidade e seletividade em HeLa em detrimento de NHDF. Deste modo, a síntese de novos conjugados aptamero-ligando, é uma abordagem promissora para o tratamento anticancerígeno direcionado. Sendo ponto de partida para o desenvolvimento de nanosistemas envolvendo G4, não só do ponto de vista da terapia como do diagnóstico e teragnóstico.

Em geral, os resultados desta dissertação constituem fundamentos promissores para o futuro desenvolvimento de novos nanosistemas para uma terapia direcionada contra o cancro sustentada e eficaz.

Como perspetivas futuras destacam-se:

- Sintetizar novos derivados da 1,10-fenantrolina como ligandos de G4. A adição de novas cadeias de poliaminas pode ser uma estratégia promissora, uma vez que estas contribuem para a interação com os sulcos e *loops* através de interações eletrostáticas e ligações covalentes.
- Sintetizar novos derivados de laranja de acridina semelhantes ao C₈-NH₂, através da adição de novas cadeias de alquilamida e substituição do grupo iodobenzene pode constituir uma boa estratégia no desenvolvimento de novos ligandos de G4.
- Purificar os ligandos DiPyPhenN₄ e DiPyPhenN₅ (provenientes da síntese descrita na secção 3.1.4 e 3.1.5), que possuem características promissoras como uma base planar mais extensa ligada a poliaminas com cadeias extensas com vários grupos metileno.

- Estudar a afinidade entre os ligandos e o aptamero G4 AT11-L0, assim como entre os conjugados e a NCL, por SPR. Deste modo será possível correlacionar a estabilização determinada pelos ensaios biofísicos e a internalização celular, mediada pela NCL e que se reflete no potencial citotóxico e seletividade dos conjugados.
- Estudar a interação entre os ligandos derivados de laranja de acridina e fenantrolina e o aptamero G4 AT11-L0 por outros ensaios biofísicos, como FRET-*melting*.
- Desenvolver sondas de G4 com ligandos derivados de laranja de acridina, uma vez que estes ligandos demonstraram autofluorescência e uma boa afinidade e capacidade de termoestabilização para o G4 AT11-L0. O uso destes ligandos poderá ser uma boa abordagem a nível de teragnóstico.
- Sintetizar nanosistemas aptamero - ligando - NPs. A ligação do conjugado aptamero G4-ligando a NPs de ouro pode aumentar a citotoxicidade e seletividade para células cancerosas em detrimento de células não cancerosas.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

- Aftab, S., Shah, A., Nadhman, A., Kurbanoglu, S., Aysıl Ozkan, S., Dionysiou, D. D., Shukla, S. S., Aminabhavi, T. M. (2018). Nanomedicine: An effective tool in cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, **540**(1-2): 132-149.
- Amato, J., Pagano, A., Cosconati, S., Amendola, G., Fotticchia, I., Iaccarino, N., Marinello, J., De Magis, A., Capranico, G., Novellino, E., Pagano, B., Randazzo, A. (2017). Discovery of the first dual G-triplex / G-quadruplex stabilizing compound: a new opportunity in the targeting of G-rich DNA structures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1861**(5): 1271-1280.
- Ashrafuzzaman, M. (2014). Aptamers as Both Drugs and Drug-Carriers, *BioMed Research International*, **2014**: 1-21.
- Bahrami, B., Hojjat-Farsangi, M., Mohammadi, H., Anvari, E., Ghalamfarsa, G., Yousefi, M., Jadidi-Niaragh, F. (2017). Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunology Letters*, **190**: 64-83.
- Bahuguna, A., Khan, I., Bajpai, V. K., Kang, S. C. (2017). MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, **12**(2): 115-118.
- Bates, P. J., Laber, D. A., Miller, D. M., Thomas, S. D., Trent, J. O. (2009). Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, **86**(3): 151-164.
- Bates, P. J., Reyes-reyes, E. M., Malik, M. T., Emily, M., O'Toole, M. G., Trent, J. O. (2017). G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, **1861**(5): 1414-1428.
- Baudoin, O., Teulade-Fichou, M-P., Vigneron, J. P., Lehn, J-M. (1997). Cyclobisintercaland Macrocycles: Synthesis and Physicochemical Properties of Macrocyclic Polyamines Containing Two Crescent-Shaped Dibenzophenanthroline Subunits. *Journal of Organic Chemistry*, **62**(16): 5458-5470.
- Burger, A. M., Dai, F., Schultes, C. M., Reszka, A. P., Moore, M. J., Double, J. A., Neidle, S. (2005). The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth,

- consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Research*, **65**(4): 1489-1496.
- Cao, Q., Li, Y., Freisinger, E., Qin, P. Z., Sigel, K. O. R., Mao, Z-W. (2017). G-quadruplex DNA targeted metal complexes acting as potential anticancer drugs. *Inorganic chemistry frontiers*, **4**: 10-32.
- Carvalho, J., Nottelet, P., Mergny, J-L., Queiroz, J. A., Salgado, G. F., Cruz, C. (2017). Study of the interaction between indole-based compounds and biologically relevant G-quadruplexes *Biochimie*, **135**: 186-195.
- Carvalho, J., Pereira, E., Marquevielle, J., Campello, M. P. C., Mergny, J-L., Paulo, A., Salgado, G.F., Queiroz, J. A., Cruz, C. (2017). Fluorescent light-up acridine orange derivatives bind and stabilize KRAS-22RT G-quadruplex. *Biochimie*, **144**: 144-152.
- Carvalho, J., Queiroz, J. A., Cruz, C. (2017). Circular dichroism of G-Quadruplex: A laboratory experiment for the study of topology and ligand binding. *Journal of Chemical Education*, **94**(10): 1547-1551.
- Carvalho, J., Quintela, T., Gueddouda, N. M., Bourdoncle, A., Mergny, J-L., Salgado, G. F., Queiroz, J.A., Cruz, C. (2018). Phenanthroline polyazamacrocycles as G-quadruplex DNA binders. *Organic and Biomolecular Chemistry*, **16**(15): 2776-2786.
- Che, G., Li, W., Kong, Z., Su, Z., Chu, B., Li, B., Zhang, Z., Hu, Z., Chi, H. (2006). Hydrothermal Syntheses of Some Derivatives of Tetraazatriphenylene. *Synthetic Communications*, **36**(17): 2519-2524.
- Che, T., Wang, Y-Q., Huang Z-L., Tan, J-H., Huang, Z-S., Chen, S-B. (2018). Natural Alkaloids and Heterocycles as G-Quadruplex Ligands and Potential Anticancer Agents. *Molecules*, **23**: e493.
- 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): e270786.
- Darmostuk, M., Rimpelova, S., Gbelcova, H., Ruml, T. (2015). Current approaches in SELEX : An update to aptamer selection technology. *Biotechnology Advances*, **33**(6): 1141-1161.
- Deverakonda, A., Gupta, N. (2016). Diagnosis and Treatment of Cervical Cancer : A Review. *J Nurs Health Science*, **2**(3): 1-11.
- Das, R. N., Chevret, E., Desplat, V., Rubio, S., Mergny, J., Guillon, J. (2017). Design , Synthesis

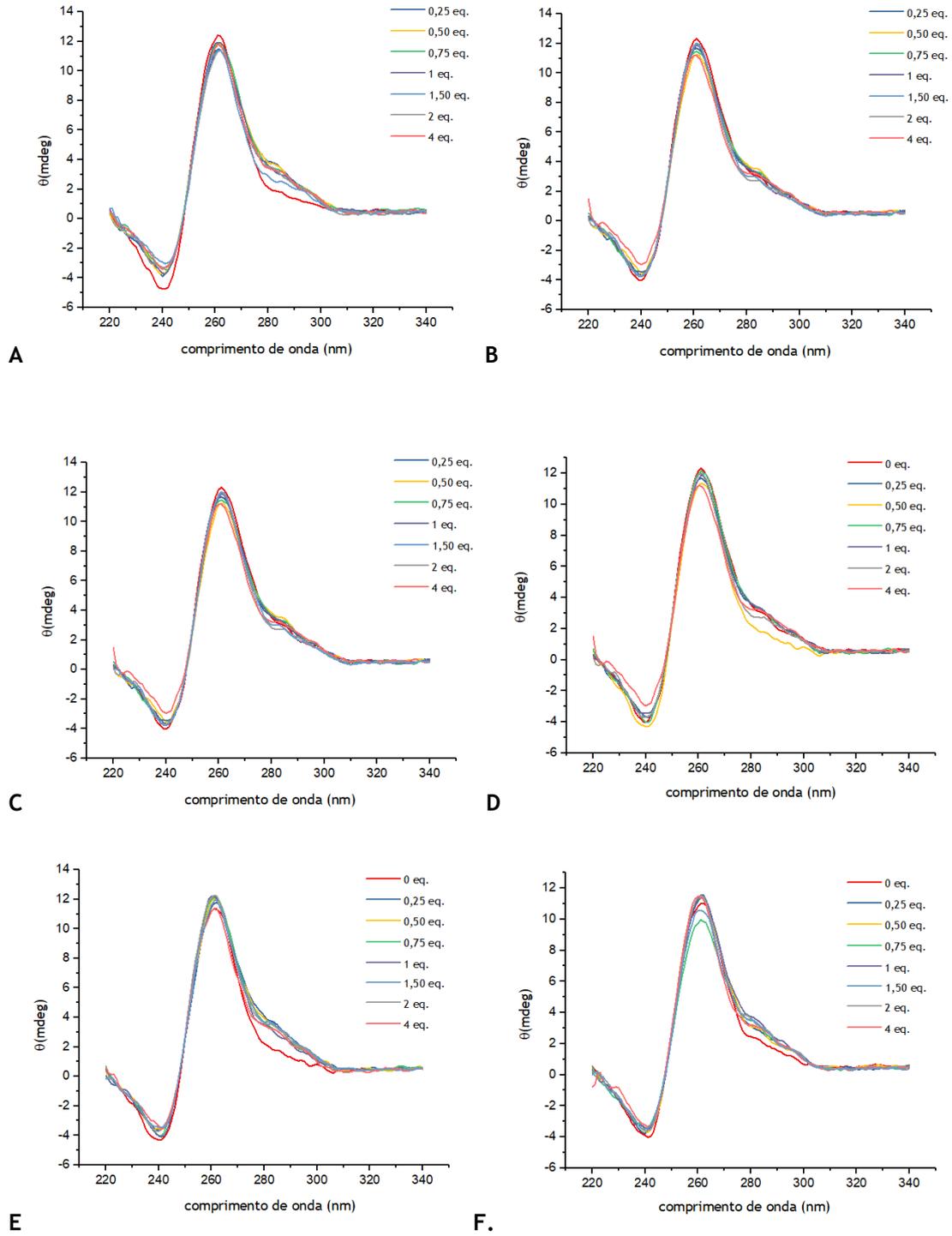
and Biological Evaluation of New Substituted Diquinoliny-Pyridine Ligands as Anticancer Agents by Targeting G-Quadruplex. *Molecules*, **23**(1): 81.

- Do, N. Q., Chung, W. J., Hong, T., Truong, A., Heddi, B., Truong, T. H. A., Phan, A. T. (2017). G-quadruplex structure of an anti-proliferative DNA sequence. *Nucleic Acids Research*, **7**(12), 1-7.
- Fan, X., Sun, L., Wu, Y., Zhang, L., Yang, Z. (2016). Bioactivity of 2'-deoxyinosine-incorporated aptamer AS1411. *Scientific Reports*, **6**: 1-12.
- Garas, A. M. S., Vagg, R. S. (2000). Synthesis of Some Novel Derivatives of 1,10-Phenanthroline. *J. Heterocyclic Chem*, **37**: 151-158.
- Giancola, C., Pagano, B. (2017). Energetics of Ligand Binding to G-Quadruplexes. *Topics in current chemistry* **330**: 211-42.
- Hassanpour, S. H., Dehghani, M. (2017). Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice*, **4**(4): 127-129.
- Hounsou, C., Guittat, L., Monchaud, 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.
- Jia, W., Yao, Z., Zhao, J., Guan, Q., Gao, L. (2017). New perspectives of physiological and pathological functions of nucleolin (NCL). *Life Sciences*, **186**: 1-10.
- Juliano, R. L. (2018). The delivery of therapeutic oligonucleotides, *Nucleic Acids Research*, **44**(14): 6518-6548.
- Karsisiotis, A. I., Hessari, N. M. A., Novellino, E., Spada, G. P., Randazzo, A., Webba Da Silva, M. (2011). Topological characterization of nucleic acid G-quadruplexes by UV absorption and circular dichroism. *Angewandte Chemie - International Edition*, **50**(45): 10645-10648.
- Kim, M., Kim, D-M., Kim, K. S., Jung, W., Kim, D-E. (2018). Applications of cancer cell-specific aptamers in targeted delivery of anticancer therapeutic agents. *Molecules*, **23**(4): 1-20.
- Kwok, C. K., Merrick, C. J. (2017). G-Quadruplexes: Prediction, Characterization, and Biological Application. *Trends in Biotechnology*, **35**(10): 997-1013.
- Larsen, A. F., Nielsen, M. C., Ulven, T. (2012). Tetrasubstituted phenanthrolines as highly potent, water-soluble, and selective G-quadruplex ligands. *Chemistry - A European Journal*, **18**(35): 10892-10902.

- Li, Q., Xiang, J., Li, X., Chen, L., Xu, X., Tang, Y., Zhou, Q., Li, L., Zhang, H., Sun, H., Guan, A., Yang, Q., Yang, S., Xu, G. (2009). Stabilizing parallel G-quadruplex DNA by a new class of ligands: Two non-planar alkaloids through interaction in lateral grooves. *Biochimie*, **91**(7): 811-819.
- Li, Z., Liu, Z., Yin, M., Yang, X., Yuan, Q., Ren, J., Qu, X. (2012). Aptamer-capped multifunctional mesoporous strontium hydroxyapatite nanovehicle for cancer-cell-responsive drug delivery and imaging. *Biomacromolecules*, **13**(12): 4257-4263.
- Malik, M. T., O'toole, M. G., Casson, L. K., Thomas, S. D., Bardi, G. T., Reyes-Reyes, E. M., Ng, C. K., Kang, K. A., Bates, P. J. (2015). AS1411-conjugated gold nanospheres and their potential for breast cancer therapy. *Oncotarget*, **6**(26): 22270-22281.
- Medeiros-silva, J., Guédin, A., Salgado, G. F., Mergny, J., Queiroz, J. A., Cabrita, E. J., Cruz, C. (2017). Phenanthroline-bis-oxazole ligands for binding and stabilization of G-quadruplexes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1861**(5): 1281-1292.
- Mergny, J. L., Li, J., Lacroix, L., Amrane, S., Chaires, J. B. (2005). Thermal difference spectra: A specific signature for nucleic acid structures. *Nucleic Acids Research*, **33**(16): 1-6.
- Métifiot, M., Amrane, S., Litvak, S., Andreola, M-L. (2014). G-quadruplexes in viruses: function and potential therapeutic applications. *Nucleic Acids Research*, **42**(20): 12352-12366.
- Mokhtarzadeh, A., Tabarzad, M., Ranjbari, J., de la Guardia, M., Hejazi, M., Ramezani, M. (2016). Aptamers as smart ligands for nano-carriers targeting. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, **82**: 316-327.
- Murat, P., Singh, Y., DeFrancq, E. (2011). Methods for investigating G-quadruplex DNA / ligand interactions, *Chem. Soc. Rev.*, **40**: 5293-5307.
- Negrutska, V. V., Saraieva, I. V., Kostina, V. G., Alexeeva, I. V., Lysenko, N. A., Dubey, I. Y. (2016). Telomerase inhibition by new di- and trisubstituted acridine derivatives, *Biopolymers and Cell*, **32**(6): 468-471.
- Peduto, A., Pagano, B., Petronzi, C., Massa, A., Esposito, V., Virgilio, A., Paduano, F., Trapasso, F., Fiorito, F., Florio, S., Giancola, C., Galeone, A., Filosa, R. (2011). Design, synthesis, biophysical and biological studies of trisubstituted naphthalimides as G-quadruplex ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **19**(21): 6419-6429.
- Pereira, E., Quental, L., Palma, E., Oliveira, M. C., Mendes, F., Raposinho, P., Correia, I., Lavrado, J., Di Maria, S., Belchior, A., Vaz, P., Santos, I., Paulo, A. (2017). Evaluation of Acridine Orange Derivatives as DNA-Targeted Radiopharmaceuticals for Auger Therapy:

- Influence of the Radionuclide and Distance to DNA. *Scientific Reports*, **7**: 1-16.
- Pérez-Herrero, E., Fernández-Medarde, A. (2015). Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **93**: 52-79.
- Platella, C., Riccardi, C., Montesarchio, D., Roviello, G. N., Musumeci, D. (2017). G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, **1861**(5): 1429-1447.
- Reyes-reyes, E. M., Salipur, F. R., Shams, M., Matthew K. F., Bates, P. J. (2015). Mechanistic studies of anticancer aptamer AS1411 reveal a novel role for nucleolin in regulating Rac1 activation. *Molecular Oncology*, **9**: 1392-1405.
- Reyes-reyes, E. M., Teng, Y., Bates, P. J. (2010). A New Paradigm for Aptamer Therapeutic AS1411 Action : Uptake by Macropinocytosis and Its Stimulation by a Nucleolin-Dependent Mechanism. *Cancer Research*, **70**(21): 8617-8630.
- Sidibe, A., Hamon, F., Largy, E., Gomez, D., Teulade-fichou, M., Trentesaux, C., Riou, J. (2012). Biochimie Effects of a halogenated G-quadruplex ligand from the pyridine dicarboxamide series on the terminal sequence of XpYp telomere in HT1080 cells. *Biochimie*, **94**(12): 2559-2568.
- Sun, H., Zhu, X., Lu, P. Y., Rosato, R. R., Tan, W., Zu, Y. (2014). Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy. *Molecular Therapy*, **3**: e182.
- Xiang, D., Shigdar, S., Qiao, G., Wang, T., Kouzani, A. Z., Zhou, S-F., Kong, L., Li, Y., Pu, C., Duan, W. (2015). Nucleic acid aptamer-guided cancer therapeutics and diagnostics: The next generation of cancer medicine. *Theranostics*, **5**(1): 23-42.
- Xiong, Y., Huang, Z., Tan, J. (2015). Targeting G-quadruplex nucleic acids with heterocyclic alkaloids and their derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **97**: 538-551.
- Zheng, R. H., Guo, H. C., Jiang, H. J., Xu, K. H., Liu, B. B., Sun, W. L., Shen, Z. Q. (2010). A new and convenient synthesis of phendiones oxidated by KBrO₃/H₂SO₄ at room temperature. *Chinese Chemical Letters*, **21**(11): 1270-1272.

Anexo I:



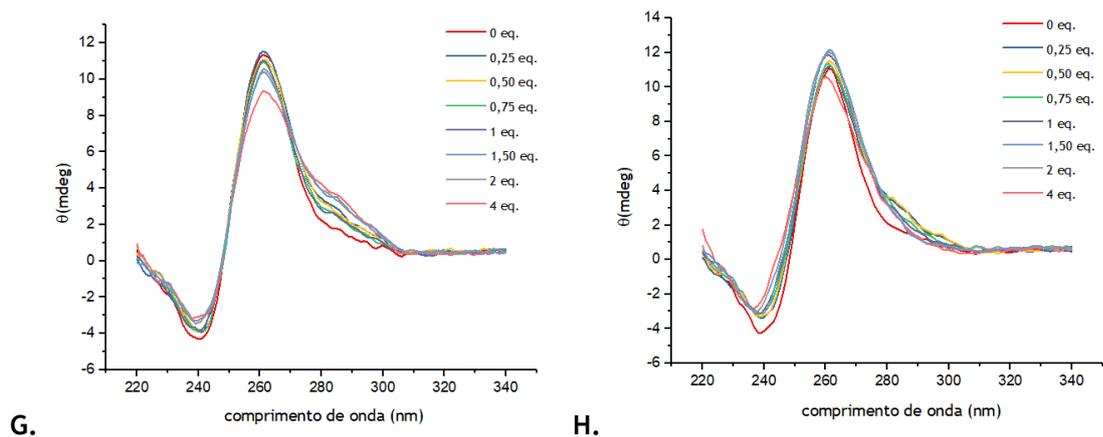


Figura 32. Espectros de CD do AT11-L0 (10 μ M) (65 mM KCl), com os ligandos (A) [16]PhenN₂; (B) [32]Phen₂N₄; (C) C₈; (D)C₈-NH₂; (E) C₃; (F) C₅; (G) DiPyPhen(Me)₂ e (H) PhenDC3 titulados a 0; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2 e 4 equivalentes molares.

Anexo II:

Comunicação na forma de painel

**Nanosystem based on AS1411 G-quadruplex derivative for
cancer therapy**

Ana Catarina Lopes, João A. Queiroz, C. Cruz

*(XII Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery, Universidade de Coimbra,
2018)*

Anexo III

Comunicação na forma de painel

Development of drug delivery systems based on G-quadruplex aptamers

**Ana Catarina Lopes, Josué Carvalho, Maria P. C. Campello, João A.
Queiroz, António Paulo, Carla Cruz**

*(VI ENEQUI - Encontro Nacional de Estudantes de Química Universidade da Beira Interior,
2018)*

Anexo IV

Comunicação na forma de painel

Drug delivery G-quadruplex aptamer for cervical cancer therapy

A.C. Lopes, J. Carvalho, M. P. C. Campello, J. A. Queiroz, A. Paulo, C. Cruz

(XIII Annual CICS-UBI Symposium, Universidade da Beira Interior, 2018)