



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Ciências

# **Avaliação da atividade anticancerígena de aptameros de DNA para terapia do cancro do colo do útero**

**Márcia Filipa Pinto Ribeiro**

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

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Doutora Carla Cruz

**Covilhã, outubro de 2018**



## Agradecimentos

Esta dissertação para obtenção do grau de mestre representa o culminar de mais uma etapa na minha vida académica.

Queria começar por agradecer à professora Carla Cruz por permitir a minha integração no seu grupo de investigação, por todo o apoio ao longo deste ano e pela transmissão de conhecimentos.

Aos meus pais, agradecer por toda a ajuda que me deram a ultrapassar os obstáculos diários com que me deparava, por permitirem que tudo se tornasse possível e por toda a confiança que depositam em mim diariamente. Ao meu irmão, obrigado por toda a paciência que teve para me ajudar sempre que precisava e todo o apoio que me deu ao longo desta etapa.

Gostaria de agradecer também aos alunos de doutoramento, Josué Carvalho e Tiago Santos pelo companheirismo que tiveram, ajuda e por todos os conhecimentos que me transmitiram nesta área de investigação.

Por último, queria ainda agradecer às minhas colegas de laboratório, Catarina Lopes e Francisca Antunes pelo companheirismo e entreaajuda que houve ao longo deste ano.

Um obrigado a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste projeto.

Obrigado a todos,

Márcia Filipa Pinto Ribeiro



## Resumo

O cancro do colo do útero é dos tipos de cancro mais frequentes nas mulheres e é causado por uma infeção com o vírus do papiloma humano (HPV). As terapias usadas neste tipo de patologia, tais como quimioterapia e radioterapia, não são seletivas provocando efeitos indesejados. Atualmente têm sido estudadas terapias mais seletivas, que têm como base a utilização de aptameros de G4 de DNA. Os aptameros de G4 são estruturas secundárias não canónicas de ácidos nucleicos, altamente ordenadas e que se formam a partir do enrolamento de sequências ricas em guaninas.

Neste projeto estudou-se estruturalmente o aptamero G4 AT11 e os complexos por ele formados com derivados de laranja de acridina e de fenantrolinas em termos de estabilidade, afinidade, atividade anticancerígena e localização intracelular.

Ensaio de dicroísmo circular confirmaram a formação da estrutura de G4 pelo AT11 e experiências de desnaturação térmica mostraram que os derivados de laranja de acridina  $C_8$  e  $C_8-NH_2$  promovem uma maior estabilização térmica do aptamero G4 AT11 ( $\Delta T_m > 20^\circ C$ ) seguidos dos derivados de fenantrolinas ( $\Delta T_m > 18^\circ C$ ).

Através de titulações por espectroscopia de fluorescência, obtiveram-se valores de afinidade do ligando-G4 AT11 moderados a altos, com resultados entre  $1,60 \times 10^{-6}$  e  $2,01 \times 10^{-7} M^{-1}$ .

Relativamente à atividade anticancerígena, o aptamero G4 AT11 mostrou ser mais citotóxico para células HeLa comparativamente às células NHDF; porém, os resultados mais promissores foram obtidos com os complexos ligando-G4 AT11, uma vez que os valores de viabilidade celular destes são menores nas HeLa e maiores nas NHDF quando comparados com os ligandos livres.

A nível de localização celular, os resultados mostraram que o aptamero G4 AT11 localiza-se no citoplasma, o ligando  $C_8$  parcialmente no citoplasma e nucléolo, e o complexo por estes formado apenas a nível citoplasmático (com formação a partir das 24 h).

Assim, conclui-se que a formação dos complexos aptamero G4 AT11-ligandos são uma estratégia promissora para terapia do cancro do colo do útero.

## Palavras-chave

Cancro do colo do útero, G-quadruplex, aptamero G4 AT11, nucleolina, derivados de laranja de acridina e derivados de fenantrolinas.

## Abstract

Cervical cancer is one of the most common types of cancer in women and is caused by an infection with the human papilloma virus (HPV). The therapies used in this type of pathology, such as chemotherapy and radiotherapy, are not selective causing undesirable effects to patients. More selective therapies have been investigated based on the use of G4 DNA aptamers. G4 aptamers are high ordered non-canonical secondary structures of nucleic acids which are formed from sequences rich in guanines.

In this project the structure of aptamer G4 AT11 was studied as well as the complexes formed with acridine orange derivatives and phenanthrolines in terms of stability, binding affinity, anticancer activity and intracellular localization.

Circular dichroism experiments confirmed the formation of G4 structure in AT11 and melting experiments showed that the acridine orange derivatives  $C_8$  and  $C_8-NH_2$  promote high thermal stabilization of the G4 AT11 aptamer ( $\Delta T_m$  values  $> 20^\circ C$ ) followed by the phenanthroline derivatives ( $\Delta T_m$  values  $> 18^\circ C$ ).

The binding affinity of ligand-G4 AT11 was determined by fluorescence titrations with  $K_D$  between  $1,60 \times 10^{-6}$  and  $2,01 \times 10^{-7} M^{-1}$  indicating moderate to high affinity.

Regarding anticancer activity, the G4 AT11 aptamer was shown to be more cytotoxic in HeLa cells compared to NHDF cells; however, the most promising results were obtained in the formation of ligand-G4 AT11 complexes, since cellular viability values are lower in HeLa cells and higher in NHDF cells when compared to free ligands.

At cellular localization, the results showed that the G4 AT11 aptamer is localized at cytoplasm, the acridine orange derivative  $C_8$  is localized at the cytoplasm and nucleolus and the complex formed is localized only at cytoplasm (from 24 h).

Thus, it is concluded that the formation of the complex G4 AT11-ligand is a promising strategy for therapy of cervical cancer.

## Keywords

Cervical cancer, G-quadruplex, G4 AT11 aptamer, nucleolin, acridine orange derivatives and phenanthroline derivatives.

# Índice

Agradecimentos .....	iii
Resumo .....	v
Abstract.....	vii
Lista de Figuras.....	xi
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Acrónimos.....	xix
Capítulo 1 - Introdução .....	1
1.1    Cancro do colo do útero .....	1
1.2    Aptameros .....	2
1.3    G-quadruplex.....	3
1.3.1    Aptamero AS1411 e derivados.....	5
1.4    Ligandos de G4 .....	11
Capítulo 2 - Objetivos.....	15
Capítulo 3 - Parte experimental .....	17
3.1    Síntese Química .....	17
3.1.1    Síntese de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona.....	17
3.1.2    Síntese de 3,6-dimetil-dipirido[3,2-a:2',3'-c]-fenazina (DPPZ(Me) <sub>2</sub> ) .....	19
3.1.3    Síntese de DPPZ(COH) <sub>2</sub> .....	20
3.1.4    Síntese de DPPZ(N <sub>4</sub> ) .....	21
3.1.5    Redução do DPPZ(N <sub>4</sub> ) .....	22
3.1.6    Síntese de DPPZ(N <sub>5</sub> ).....	23
3.1.7    Redução de DPPZ(N <sub>5</sub> ) .....	24
3.2    Preparação dos oligonucleótidos .....	24
3.3    Espectroscopia de dicroísmo circular.....	25
3.4    Espectroscopia de diferença térmica (TDS) .....	26
3.5    Espectroscopia de fluorescência.....	27
3.6    Ensaio de viabilidade celular .....	28
3.7    Microscopia de fluorescência confocal .....	31
Capítulo 4 - Resultados e discussão.....	33

4.1 Síntese Química .....	33
4.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular .....	37
4.3 Espectroscopia de diferença térmica (TDS) .....	42
4.4 Espectroscopia de Fluorescência.....	45
4.5 Ensaio de viabilidade celular .....	53
4.6 Microscopia de fluorescência confocal.....	66
Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas futuras.....	71
Referências .....	73
Anexos .....	79

## Lista de Figuras

Figura 1. Representação esquemática dos estadios do cancro do colo do útero desde a infeção por HPV até ao cancro (adaptado de <sup>2</sup> ). .....	2
Figura 2. Representação dos alvos dos aptameros (adaptado de <sup>8</sup> ). .....	3
Figura 3.(a) G-tétrada com ião monovalente representado no centro; (b) estrutura G4 tetramolecular (esquerda) biomolecular (centro) e unimolecular (direita);(c) diferentes topologias adquiridas pelo G4, antiparalela (primeira e segunda), topologia híbrida (terceira) e topologia paralela (quarta); (d) direção dos loops, loop em hélice (esquerda), loop lateral (centro) e loop diagonal (direita). (Adaptado de <sup>9</sup> ). .....	4
Figura 4. Estrutura G-quadruplex do AS1411 (Adaptado de <sup>23</sup> ) .....	6
Figura 5. Representação das funções da nucleolina de acordo com a sua localização intracelular (adaptado de <sup>28</sup> ). .....	6
Figura 6. Modelo inicial do mecanismo de ação do AS1411 no qual a nucleolina só seria expressa nas células cancerosas (adaptado de <sup>21</sup> ). .....	7
Figura 7. Representação do mecanismo de ação do AS1411 nas células cancerosas e nas normais (adaptado de <sup>23</sup> ). .....	8
Figura 8. Representação esquemática do mecanismo ação do AS1411 em células cancerosas na indução de morte celular por metuose (adaptado de <sup>32</sup> ). .....	9
Figura 9. Estrutura do AT11 (adaptado de <sup>16</sup> ). .....	10
Figura 10. Representação do complexo ligando-G4 através de ligação externa na superfície da G-tétrada terminal (esquerda), intercalada entre as G-tétradas (centro) e ligação nas depressões (esquerda) (adaptado de <sup>36</sup> ) .....	11
Figura 11. Estrutura química das acridinas (adaptado de <sup>39</sup> ). .....	12
Figura 12. (a) Estruturas químicas dos compostos derivados de fenantrolina; (b) [32]phen <sub>2</sub> N <sub>4</sub> ; (c) [16]phenN <sub>2</sub> (Adaptado de <sup>40</sup> ). .....	12
Figura 13. Espectro de 1H do composto 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona em DMSO deuterado .....	34

Figura 14. Espectro de $^{13}\text{C}$ do composto 2,9-dimentil-1,10-fenantrolina-5,6-diona em DMSO deuterado .....	34
Figura 15. Espectro de $^1\text{H}$ do composto $\text{DPPZ}(\text{Me})_2$ em DMSO deuterado. ....	35
Figura 16. Espectro de $^{13}\text{C}$ do composto $\text{DPPZ}(\text{Me})_2$ em DMSO deuterado .....	35
Figura 17. Espectro de $^1\text{H}$ do composto $\text{DPPZ}(\text{COH})_2$ em clorofórmio deuterado. ....	36
Figura 18. Topologia do aptamero G4 AT11 em 20 mM de tampão fosfato e 65 mM de KCl ...	38
Figura 19. Estrutura química dos derivados de fenantrolinas, (A) $\text{DPPZ}(\text{Me})_2$ , (B) $[\text{32}]\text{phen}_2\text{N}_4$ , (C) $[\text{16}]\text{phenN}_2$ .....	38
Figura 20. Estrutura química dos derivados de laranja de acridina, (a) $\text{C}_3$ , (b) $\text{C}_5$ , (c) $\text{C}_8$ e (d) $\text{C}_8\text{-NH}_2$ .....	39
Figura 21. Topologia do G4 AT11 após adição de 4 equivalentes molares de cada ligando ....	40
Figura 22. Curvas de desnaturação térmica de AT11 normalizadas na ausência e na presença de 4 equivalente molares de ligando. ....	41
Figura 23. Espectro de absorvância UV do AT11 a $20^\circ\text{C}$ e a $90^\circ\text{C}$ .....	43
Figura 24. Espectro de TDS para o G4 AT11 .....	43
Figura 25. Espectro de emissão de fluorescência de $[\text{16}]\text{phenN}_2$ com concentrações crescentes do aptamero G4 AT11 .....	46
Figura 26. Constante de dissociação aparente ajustada à equação Hill para o $[\text{16}]\text{phenN}_2$ ....	46
Figura 27. Espectro de emissão de fluorescência de $[\text{32}]\text{phen}_2\text{N}_4$ com concentrações crescentes do aptamero G4 AT11 .....	47
Figura 28. Constante de dissociação aparente ajustada à equação Hill para o $[\text{32}]\text{phen}_2\text{N}_4$ ...	47
Figura 29. Espectro de emissão de fluorescência de $\text{C}_3$ com concentrações crescentes do aptamero G4 AT11 .....	48
Figura 30. Constante de dissociação aparente ajustada à equação Hill para $\text{C}_3$ .....	48
Figura 31. Espectro de emissão de fluorescência de $\text{C}_5$ com concentrações crescentes do aptamero G4 AT11 .....	49

Figura 32. Constante de dissociação aparente ajustada à equação Hill para C <sub>5</sub> .....	49
Figura 33. Espectro de emissão de fluorescência de C <sub>8</sub> com concentrações crescentes do aptamero G4 AT11 .....	50
Figura 34. Constante de dissociação aparente ajustada à equação Hill para C <sub>8</sub> .....	50
Figura 35. Espectro de emissão de fluorescência de C <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub> com concentrações crescentes do aptamero G4 AT11 .....	51
Figura 36. Constante de dissociação aparente ajustada à equação Hill para C <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub> .....	51
Figura 37. Percentagem de viabilidade celular em HeLa e NHDF após 7 dias de incubação com 15µM de aptamero de G4 AT11 .....	53
Figura 38. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de [16]phenN <sub>2</sub> em células HeLa .....	54
Figura 39. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de [16]phenN <sub>2</sub> em células NHDF .....	54
Figura 40. IC <sub>50</sub> determinado para [16]phenN <sub>2</sub> para HeLa (esquerda) e NHDF (direita) .....	55
Figura 41. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C <sub>3</sub> em células HeLa .....	55
Figura 42. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C <sub>3</sub> em células NHDF .....	56
Figura 43. IC <sub>50</sub> determinado para C <sub>3</sub> para HeLa (esquerda) e NHDF (direita) .....	56
Figura 44. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C <sub>5</sub> em células HeLa .....	57
Figura 45. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C <sub>5</sub> em células NHDF .....	57
Figura 46. IC <sub>50</sub> determinado para C <sub>5</sub> para HeLa (esquerda) e para NHDF (direita) .....	58
Figura 47. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C <sub>8</sub> em células HeLa .....	58

Figura 48. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C <sub>8</sub> em células NHDF .....	59
Figura 49. IC <sub>50</sub> determinado para C <sub>8</sub> para HeLa (esquerda) e para NHDF (direita).....	59
Figura 50. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub> em células HeLa .....	60
Figura 51. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub> em células NHDF.....	60
Figura 52. IC <sub>50</sub> determinado para C <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub> para HeLa (esquerda) e para NHDF (direita) .....	61
Figura 53. Percentagem de viabilidade celular dos complexos aptamero G4 AT11-ligando na linha celular HeLa .....	63
Figura 54. Percentagem de viabilidade celular dos complexos aptamero G4 AT11-ligando na linha celular NHDF.....	63
Figura 55. Viabilidade celular relativa a HeLa medida através do ensaio de MTT ao fim de 7 dias de incubação. Barras representam o valor +/- SEM de viabilidade celular relativamente ao controlo (sem ligando).....	64
Figura 56. Viabilidade celular relativa a NHDF medida através do ensaio de MTT ao fim de 7 dias de incubação. Barras representam o valor +/- SEM de viabilidade celular relativamente ao controlo (sem ligando).....	64
Figura 57. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de DPPZ(Me) <sub>2</sub> em células HeLa .....	65
Figura 58. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de DPPZ(Me) <sub>2</sub> em células NHDF.....	66
Figura 59. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 0, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde.....	67
Figura 60. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 1, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde.....	67
Figura 61. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 2, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde.....	68

Figura 62. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 3, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde. ....	68
Figura 63. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 4, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde. ....	69
Figura 64. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 5, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde. ....	69
Figura 65. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 6, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde. ....	69
Figura 66. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 7, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde. ....	70



## Lista de Tabelas

Tabela 1. Equivalentes molares, concentração e volume correspondente de ligando para cada titulação.....	26
Tabela 2. Valores de referência para caracterização de topologia paralela ou antiparalela de acordo com os fatores de TDS .....	27
Tabela 3. Valores das concentrações de ligando testadas nas células HeLa para determinação de IC <sub>50</sub> .....	29
Tabela 4. Valores das concentrações de ligando testadas nos fibroblastos para determinação de IC <sub>50</sub> .....	30
Tabela 5. Valores de concentração do complexo (AT11-Ligando) nas duas linhas celulares ...	30
Tabela 6. Estabilização térmica do aptâmero G4 AT11 induzida pelos ligandos medida por ensaios de desnaturação térmica de dicroísmo circular .....	41
Tabela 7. Valores de referência para caracterização de topologia paralela ou antiparalela de acordo com os fatores de TDS .....	44
Tabela 8. Valores da variação da absorvência obtidos para aptâmero G4 AT11 .....	44
Tabela 9. Valores determinados dos fatores TDS .....	45
Tabela 10. Constantes de dissociação de equilíbrio do aptâmero G4 AT11 com os ligandos, obtidas por titulações de fluorescência dos ligandos .....	52
Tabela 11. Valores de IC <sub>50</sub> determinados para cada ligando e nas duas linhas celulares .....	61
Tabela 12. Concentrações de ligandos usados na incubação dos ligandos e formação de complexos G4 AT11-ligando.....	62



## Lista de Acrónimos

<b><math>^{13}\text{C}</math> RMN</b>	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
<b><math>^1\text{H}</math> RMN</b>	Ressonância magnética nuclear de protão
<b>CDCI<sub>3</sub></b>	Clorofórmio deuterado
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>G4</b>	G-quadruplex
<b>HeLa</b>	<i>Helacyton gartleri</i>
<b>HPV</b>	Vírus do papiloma humano
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração de composto que inibe a atividade enzimática em 50%
<b>K<sup>+</sup></b>	ião potássio
<b>mRNA</b>	RNA mensageiro
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>Na<sup>+</sup></b>	ião sódio
<b>NCL</b>	Nucleolina
<b>NHDF</b>	Fibroblastos da derme humana normais
<b>UV</b>	Ultravioleta



## Capítulo 1 - Introdução

O cancro é uma das principais causas de morbilidade e mortalidade em todo o mundo e o número de pessoas afetadas é cada vez maior.<sup>1</sup> Trata-se de uma doença caracterizada por uma proliferação descontrolada das células, que ocorre devido a alterações genéticas e epigenéticas nos processos de crescimento, diferenciação e morte celular.<sup>2</sup> As taxas de sobrevivência são relativamente baixas devido ao diagnóstico tardio e a um acesso limitado a terapias adequadas.<sup>3</sup>

Os tipos de cancro mais comuns entre as mulheres são os da mama, colo do útero, ovários, esófago e boca. Destes, o cancro do colo do útero é o segundo mais frequente nas faixas etárias dos 15 aos 44 anos.<sup>2</sup>

### 1.1 Cancro do colo do útero

O cancro do colo do útero é causado por uma infeção com o vírus do papiloma humano (HPV) e está relacionado com a incorporação do DNA viral no DNA cromossomal do hospedeiro levando a uma ativação de proto oncogenes a oncogenes, ou uma inibição de genes supressores de tumores, o que se reflete num aumento da taxa de proliferação celular que pode conduzir a uma neoplasia intra-epitelial do colo do útero.<sup>2</sup> O vírus do HPV é detetado em 99% dos tumores do colo do útero, principalmente os subtipos oncogénicos HPV 16 e 18.<sup>4</sup>

Os vários tipos de HPV, dependendo do seu potencial oncogénico, podem ser divididos em dois grandes grupos: os HPV de baixo risco, que normalmente produzem verrugas genitais benignas e lesões epiteliais transitórias e os HPV de risco elevado (essencialmente HPV 16 e HPV 18) que estão relacionados com várias doenças neoplásicas, incluindo o cancro.<sup>5</sup>

As infeções genitais adquiridas por HPV normalmente são eliminadas pelo sistema imunitário; todavia, se a eliminação não se verificar, quanto mais tempo o subtipo oncogénico de HPV estiver presente e dependendo da sua carga viral, maior a hipótese de haver desenvolvimento de uma lesão pré-cancerosa do colo do útero. Uma lesão pré-cancerosa tanto pode evoluir para cancro invasivo como pode regredir se o HPV for eliminado (figura 1).<sup>4</sup>



Figura 1. Representação esquemática dos estádios do cancro do colo do útero desde a infeção por HPV até ao cancro (adaptado de <sup>2</sup>).

Os principais tipos histológicos de tumores epiteliais no colo do útero são o carcinoma das células escamosas e o adenocarcinoma.<sup>5</sup>

O tipo de tratamento aplicado depende do tipo de cancro, estadió, tamanho e a idade do paciente. As opções de tratamento disponíveis são a cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma combinação destas.<sup>5</sup> Tratamentos com base em quimioterapia e radioterapia são eficazes na morte de células cancerosas; porém, provocam morte de células normais, o que faz com que não haja seletividade no tratamento levando ao aparecimento de efeitos secundários indesejados <sup>6,7</sup> devido à mielossupressão e cardiotoxicidade. São tratamentos que apresentam uma depuração sistémica rápida, baixa acumulação intra-tumoral e podem levar ao aparecimento de resistência aos medicamentos.<sup>6</sup>

Recentemente, as terapias usadas têm sido direcionadas para as células cancerosas através da utilização de anticorpos monoclonais de modo a que a toxicidade seja diminuída e terapêutica mais eficaz. Contudo, existem várias limitações para estas terapias, tais como, os custos de produção elevados, uma baixa internalização em tumores sólidos<sup>7</sup> e a ligação anticorpo-proteína é difícil de controlar apresentando uma correlação inconsistente na maioria das vezes.<sup>6</sup>

Os aptâmeros de ácidos nucleicos são considerados uma alternativa eficaz para os anticorpos proteicos.<sup>8,9</sup>

## 1.2 Aptâmeros

Os aptâmeros de ácidos nucleicos são moléculas de DNA ou RNA de cadeia simples geralmente com 25 a 60 bases.<sup>9</sup> Uma vez que estes oligonucleótidos se enrolam numa estrutura tridimensional única conseguem reconhecer uma ampla gama de alvos, tais como proteínas, pequenas moléculas, iões metálicos, células e organismos como vírus e bactérias (figura 2) com elevada especificidade e afinidade.<sup>7,9</sup>

Relativamente aos anticorpos, os aptameros são vantajosos devido ao seu pequeno tamanho, baixa imunogenicidade, facilidade de fabrico e de armazenamento, melhor internalização no tumor e estabilidade numa ampla gama de pH e de temperatura.<sup>9</sup>

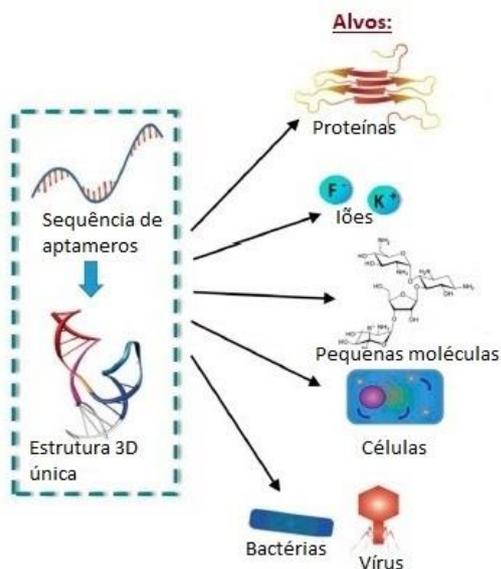


Figura 2. Representação dos alvos dos aptameros (adaptado de <sup>8</sup>).

Os aptameros podem ser internalizados nas células através de vias endocíticas, sendo elas mediadas por clatrina e por caveolina, macropinocitose ou fagocitose. A entrada celular dos aptameros é dependente dos seus recetores.<sup>10</sup>

De entre os aptameros com bioatividade significativa, muitos são oligonucleótidos ricos em guaninas, que têm a capacidade de formar uma conformação estável designada por G-quadruplex (G4) sob condições fisiológicas e reconhecer alvos muito diferentes.<sup>9</sup> Relativamente aos oligonucleótidos nativos, os G4s aumentam a resistência às nucleases e promovem a internalização celular.<sup>11</sup>

### 1.3 G-quadruplex

A nível estrutural os ácidos nucleicos são moléculas muito versáteis e como resultado o DNA pode adotar diferentes conformações.<sup>12</sup> Frequentemente o DNA é considerado como uma molécula de cadeia dupla, na qual duas cadeias auto complementares se unem entre si através do emparelhamento de bases de Watson e Crick. Contudo, certas sequências de DNA podem

formar estruturas designadas G4.<sup>13</sup> Os G4 são estruturas não canónicas e ordenadas que se formam a partir do enrolamento de sequências ricas em guaninas.<sup>14</sup> Podem ser formadas por uma (intramolecular), duas ou quatro (intermolecular) cadeias separadas de DNA (figura 3b).<sup>14,15</sup>

O G4 é constituído por dois elementos principais que são o núcleo e os *loops*.<sup>16</sup> O núcleo consiste em 4 guaninas ligadas entre si através de ligações de hidrogénio *de Hoogsteen* denominada G-tétrada (figura 3a) e os *loops* é o que liga as diferentes G-tétradas entre si.<sup>17</sup> O empilhamento de duas ou mais G-tétradas originam uma estrutura G4.<sup>9</sup>

A estabilização das estruturas G4 é dependente de iões monovalentes que se encontram no centro da G-tétrada. Estes iões coordenam os oxigénios das guaninas estabilizando as ligações de hidrogénio de cada tétada, e subsequentemente toda a estrutura. De entre os iões monovalentes, o sódio (Na<sup>+</sup>) e o potássio (K<sup>+</sup>) são os que induzem maior estabilização à estrutura,<sup>18</sup> contudo, o K<sup>+</sup> é considerado o ião mais relevante fisiologicamente devido à sua concentração intracelular elevada.<sup>15</sup>

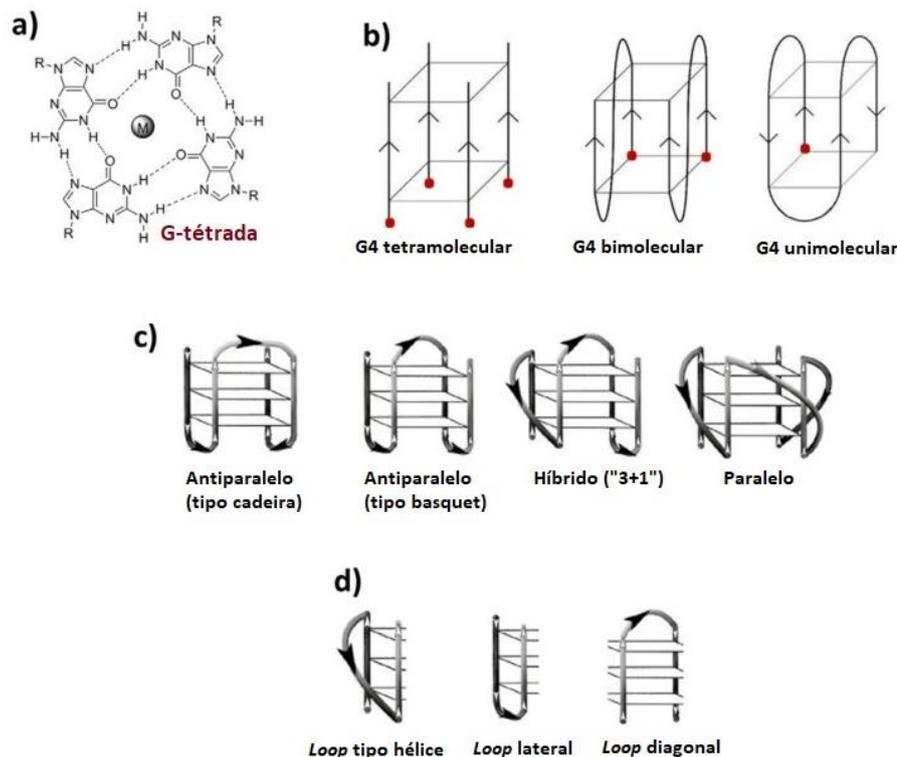


Figura 3. (a) G-tétrada com ião monovalente representado no centro; (b) estrutura G4 tetramolecular (esquerda) biomolecular (centro) e unimolecular (direita); (c) diferentes topologias adquiridas pelo G4, antiparalela (primeira e segunda), topologia híbrida (terceira) e topologia paralela (quarta); (d) direção dos loops, loop em hélice (esquerda), loop lateral (centro) e loop diagonal (direita). (Adaptado de <sup>9</sup>).

Um G4 pode apresentar diversas topologias devido a várias características do sistema, tais como o carácter inter ou intramolecular da estrutura, a direção paralela ou antiparalela das zonas ricas em guaninas na formação do G4 (figura 3c), o comprimento, a sequência, a direção dos *loops* (figura 3d), a orientação *syn* ou *anti* das ligações *N*-glicosídicas e o número consecutivo de G-tétradas formadas.<sup>9</sup>

As topologias do G4 paralela, antiparalela e híbrida podem ser determinadas e caracterizadas por espectroscopia de dicroísmo circular, nos quais a estrutura paralela apresenta uma banda negativa a 240 nm e uma positiva a 262 nm, a estrutura antiparalela exibe uma banda negativa a 262 nm e uma banda positiva a 295 nm,<sup>19</sup> e a topologia híbrida uma banda negativa a 240 nm e uma banda positiva a 289 nm com uma menos acentuada a 268 nm.<sup>20</sup>

Os aptameros de G4 são uma excelente alternativa para terapia oncológica visto que estes são termodinâmica e quimicamente mais estáveis, apresentam maior resistência à degradação de nucleases séricas, não são imunogénicos e apresentam boa internalização celular.<sup>19</sup>

Uma propriedade que distingue os oligonucleotídeos ricos em guaninas dos outros é a capacidade de exercerem os seus efeitos *in vitro* na ausência de agentes de transfeção, sugerindo que o alvo destes se encontra à superfície celular, ou que existe um mecanismo que os leve a serem rapidamente internalizados (ou ambos).<sup>21</sup>

A formação de uma estrutura G4 parece ser um fator essencial para os aptameros que apresentam atividade anti proliferativa seletiva para células cancerosas.<sup>9</sup> Neste contexto, o aptamero de G4 com maior relevância até aos dias de hoje é o AS1411, uma vez que foi o primeiro aptamero anticancerígeno a chegar a ensaios clínicos de Fase II.<sup>22</sup>

### 1.3.1 Aptamero AS1411 e derivados

O AS1411 é um oligonucleótido fosfodiéster de 26 nucleótidos rico em guaninas com a sequência 5'-GGTGGTGGTGGTTGTGGTGGTGGTGG-3', estruturado em G4 maioritariamente do tipo paralelo e apresenta elevado grau de polimorfismo em solução, exibindo pelo menos 8 isoformas diferentes de G4.<sup>23</sup>

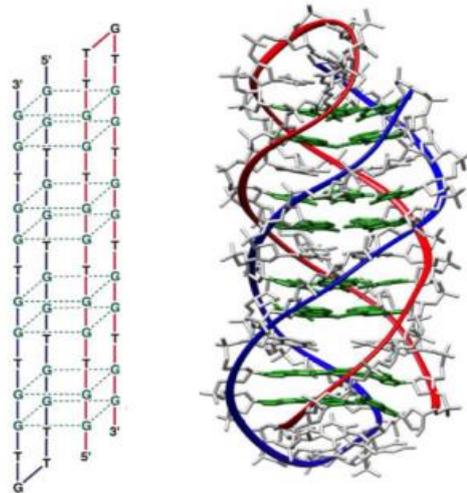


Figura 4. Estrutura G-quadruplex do AS1411 (Adaptado de <sup>23</sup>)

O AS1411 tem sido usado em terapias oncogénicas, uma vez que apresenta atividade anti proliferativa em vários tipos de células cancerosas, mas sem efeito ou com efeito mínimo para as células normais.<sup>11,24</sup> Isto deve-se ao facto de este aptamero ter elevada afinidade de ligação para uma proteína que se encontra sobreexpressa à superfície das células cancerosas, designada por nucleolina.<sup>11,25,26,27</sup>

A nucleolina é uma fosfoproteína multifuncional que está distribuída em vários compartimentos das células eucarióticas, tais como, núcleo, nucleoplasma, citoplasma e membrana celular <sup>28</sup> cujas funções principais estão relacionadas com a sobrevivência celular, crescimento e proliferação (figura 5). <sup>9,24</sup>

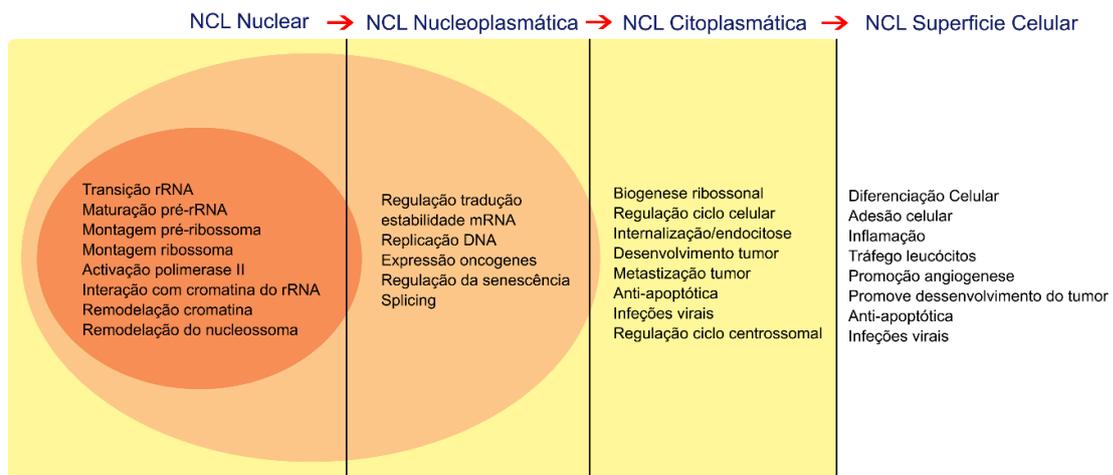


Figura 5. Representação das funções da nucleolina de acordo com a sua localização intracelular (adaptado de <sup>28</sup>).

Normalmente, a nucleolina nuclear representa mais de 90% da nucleolina total.<sup>28</sup> Em células cancerosas, as formas citoplasmáticas e de superfície celular estão elevadas, o que faz com que estejam relacionadas com a progressão do cancro.<sup>24</sup> Isso deve-se ao facto de haver uma síntese de proteínas elevada que é suportada pela nucleolina.<sup>29</sup>

O tempo de semivida da nucleolina nuclear é cerca de 8 horas, contudo, as suas formas citoplasmáticas e de superfície celular apresentam uma semivida de aproximadamente 45 min, indicando que a presença da nucleolina na superfície celular requer transcrição constante, tradução de mRNA de nucleolina e glicosilação de proteínas.<sup>30</sup> Estes processos ocorrem na proliferação de células cancerosas e células endoteliais angiogénicas mas é reduzido em células normais.<sup>23</sup>

Apesar do uso generalizado do AS1411 e sabendo que o seu alvo é a nucleolina localizada à superfície das células, o seu mecanismo de ação ainda não é totalmente conhecido.<sup>23</sup> Assim sendo, foram propostos alguns mecanismos de ação do AS1411.

Inicialmente, Bates e os seus colaboradores propuseram que o AS1411 fosse internalizado seletivamente nas células cancerosas através da sua ligação à nucleolina, e este interferia nas suas funções celulares levando as células para morte celular. Era um processo seletivo porque as células normais não expressavam nucleolina à superfície ou esta era expressa em quantidades mínimas (figura 6).<sup>21</sup>

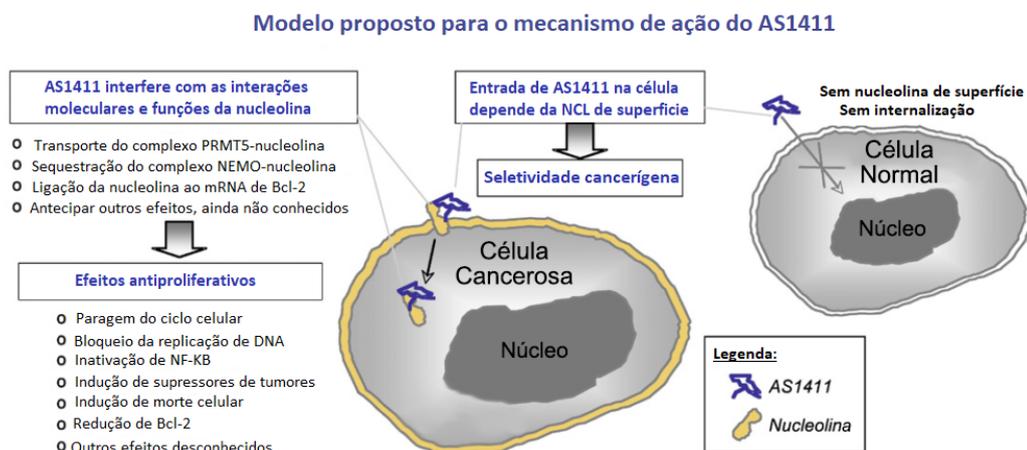


Figura 6. Modelo inicial do mecanismo de ação do AS1411 no qual a nucleolina só seria expressa nas células cancerosas (adaptado de <sup>21</sup>).

Estudos recentes confirmaram que a nucleolina desempenha um papel nos efeitos do AS1411, mas foi proposto um novo mecanismo de ação por Bates e colaboradores, no qual as células normais apresentam uma produção transitória de nucleolina não nuclear em resposta a

estímulos mitogénicos, stress ou ligação de certas moléculas à superfície celular, enquanto que nas células cancerosas este processo está alterado e há uma expressão contínua de nucleolina não nuclear explicando a sua sobreexpressão à superfície.<sup>23</sup> Neste mecanismo há uma internalização inicial de AS1411 um pouco mais alta nas células normais comparativamente às células cancerosas (processo inicial independente de nucleolina). Nas células cancerosas a internalização ocorre inicialmente por macropinocitose,<sup>23</sup> um mecanismo conduzido por actina, independente de ligando no qual as células retêm o meio envolvente e qualquer macromolécula que este contenha.<sup>31</sup> A macropinocitose não acontece nas células normais, então o AS1411 é internalizado por um processo endocítico diferente dependente de dinamina.<sup>23</sup>

Avaliando as células em diferentes tempos de incubação com o AS1411 (24-72 horas) verificou-se que o AS1411 estimula a macropinocitose nas células cancerosas. Nas células normais, o AS1411 é gradualmente eliminado por efluxo ou exocitose, alternativamente o AS1411 pode ficar sujeito a uma degradação lisossomal. Assim, a acumulação seletiva do AS1411 nas células cancerosas deve-se a um aumento da sua internalização por macropinocitose e a um aumento da sua retenção (figura 7).<sup>23</sup>

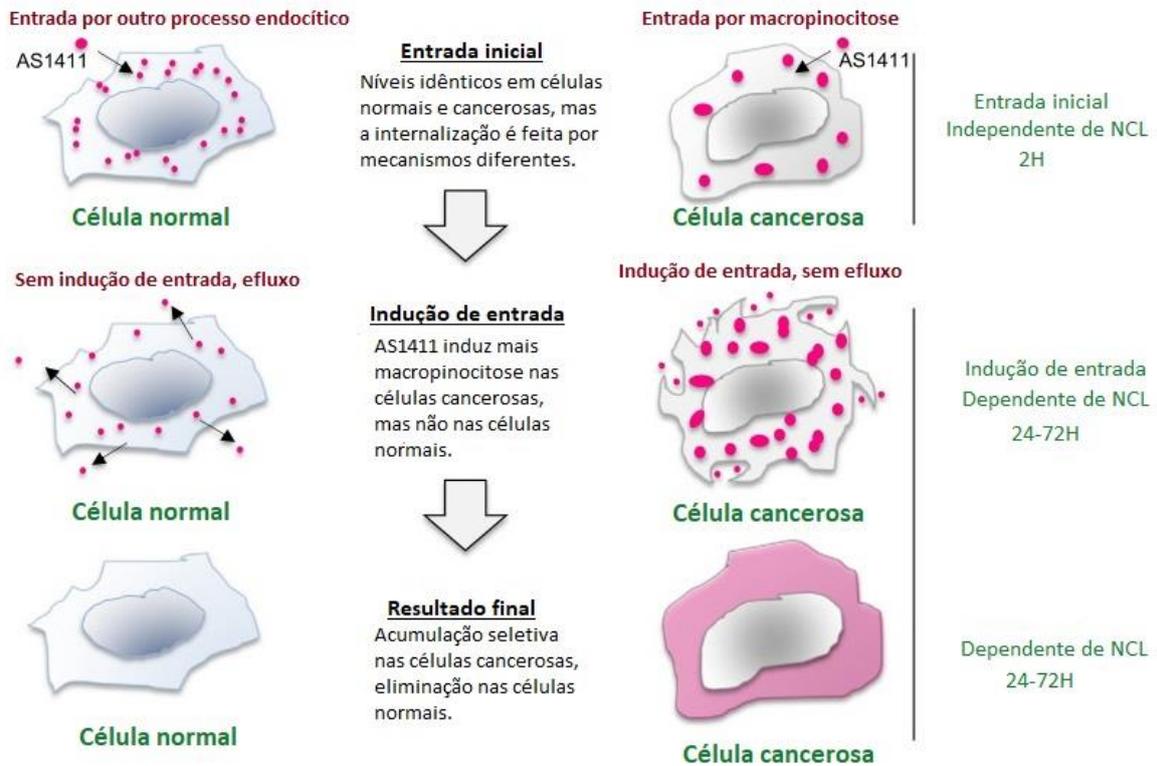


Figura 7. Representação do mecanismo de ação do AS1411 nas células cancerosas e nas normais (adaptado de <sup>23</sup>)

A macropinocitose é um processo que acontece em algumas células do sistema imunológico em resposta a fatores de crescimento, ou devido a sinalização oncogénica através da ativação da Ras, PI3K e Rac1.<sup>32</sup> Estudos recentes sugerem que a macropinocitose é essencial para suportar o crescimento neoplásico através da internalização de proteínas extracelulares. Por outro lado, a hiperestimulação da macropinocitose (devido à ativação contínua da Rac1) pode levar à morte celular através de um processo não apoptótico designado metuose.<sup>32</sup>

Metuose é um processo de morte celular devido ao acumulo excessivo de vacúolos citoplasmáticos originados pelos macropinosomas que provocam a lise da célula.<sup>33</sup>

Reyes-Reyes e colaboradores propuseram um mecanismo de ação de AS1411 no qual a Rac1 desempenhava um papel chave nos efeitos anti proliferativos deste aptamero. Neste modelo, a Rac1 era regulada negativamente pela nucleolina, o que levava a que houvesse uma ativação transitória nas células cancerosas, o que promovia o crescimento e sobrevivência da célula, angiogénese e migração celular. Contudo, quando as células cancerosas são tratadas com AS1411, este liga-se com elevada afinidade à nucleolina o que provoca uma ativação contínua da Rac1 (maior indução de macropinocitose) provocando a morte celular por metuose (figura 8).<sup>32</sup>

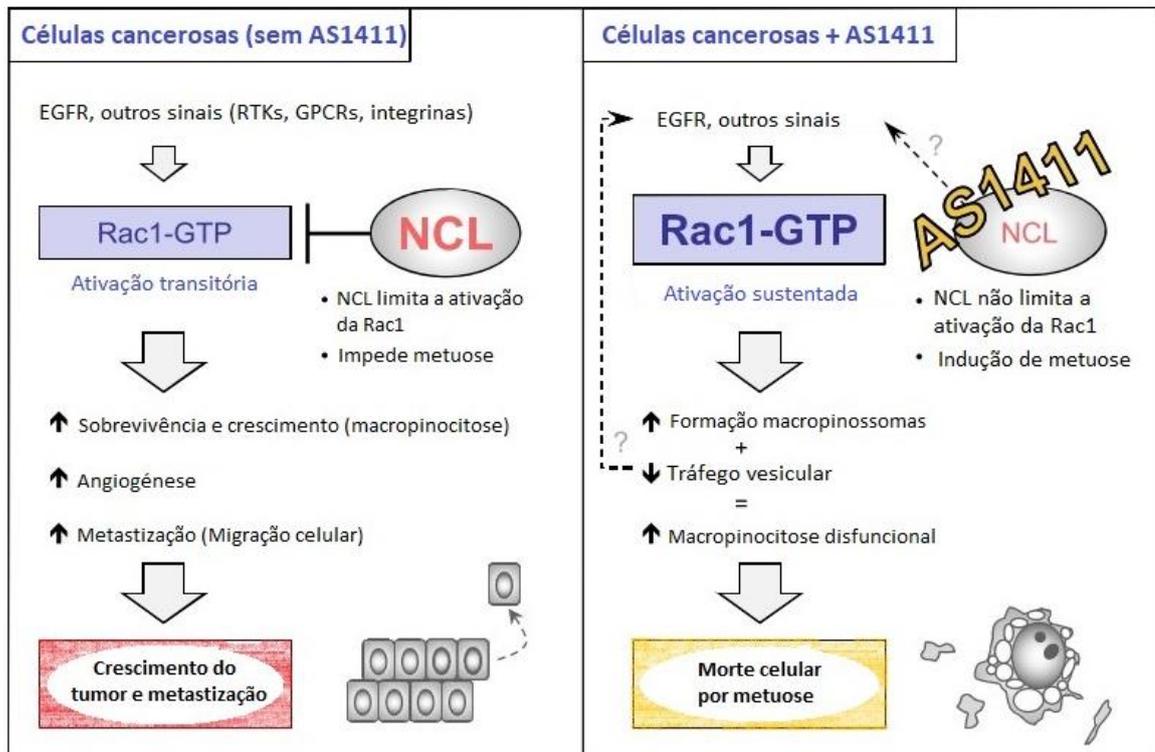


Figura 8. Representação esquemática do mecanismo ação do AS1411 em células cancerosas na indução de morte celular por metuose (adaptado de <sup>32</sup>).

Em suma, os efeitos do AS1411 estão relacionados com a sua interação com a nucleolina provocando uma inibição da proliferação celular, um arrastamento do ciclo celular na fase S e inibição da replicação do DNA.<sup>34</sup>

O primeiro aptamero de DNA a ser usado em ensaios clínicos oncológicos foi o AS1411.<sup>26</sup> Este foi usado em mais de 100 pacientes com câncros metastizados ou avançados e demonstrou um excelente perfil de segurança e evidências de atividade clínica com alguns exemplos de estabilização da doença. No entanto, a taxa geral de resposta tem sido baixa, possivelmente porque o AS1411 tem uma farmacologia abaixo do ideal, sendo rapidamente eliminado pelo organismo (após paragem da infusão, a concentração plasmática diminui rapidamente <sup>27</sup>), e tem uma potência relativamente baixa (são necessárias concentrações na gama dos micromolares para induzir morte celular em células cancerosas).<sup>35</sup> Assim, o AS1411 tem sido quimicamente modificado para que se consiga contornar estas desvantagens encontradas nos ensaios clínicos. Uma substituição na guanina da posição 10 por uma timina e a adição de uma timina às extremidades 5' e 3' origina um novo oligonucleótido derivado do AS1411 denominado AT11.<sup>34</sup>

O AT11 é um oligonucleótido derivado do AS1411 com a sequência 5'-TGGTGGTGGTTGTTGTGGTGGTGGTGGT-3', e apresenta atividade anti proliferativa semelhante ao AS1411. A estrutura do AT11 apresenta a formação de uma única conformação de G4 (diferente do polimorfismo do AS1411) em solução que consiste em duas subunidades (quatro G-tétradas) paralelas do tipo hélice (figura 9).<sup>16</sup>

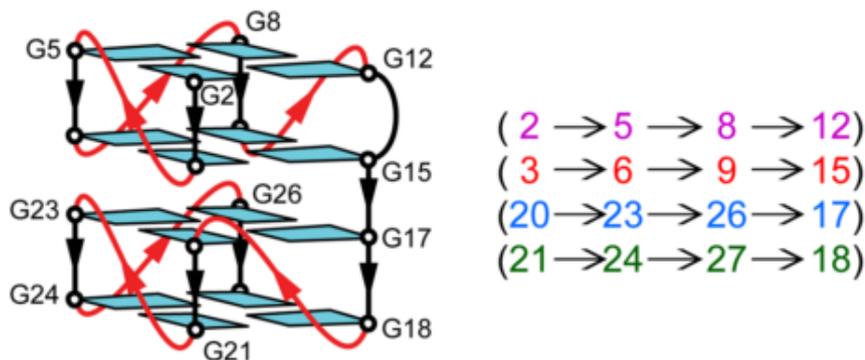


Figura 9. Estrutura do AT11 (adaptado de <sup>16</sup>)

## 1.4 Ligandos de G4

Devido à estrutura peculiar do G4 há reconhecimento específico de pequenas moléculas (ligandos) através de vários modos de ligação, de forma semelhante ao que acontece aos intercaladores de DNA de dupla hélice (figura 10).<sup>36</sup> Nos últimos anos tem havido uma projeção no estudo de ligandos que interajam de forma eficiente, seletiva e que promovam a estabilização de estruturas de G4, para que inibam o crescimento de células cancerosas, abrindo perspectivas interessantes para o desenvolvimento de fármacos anticancerígenos.<sup>14, 37</sup>

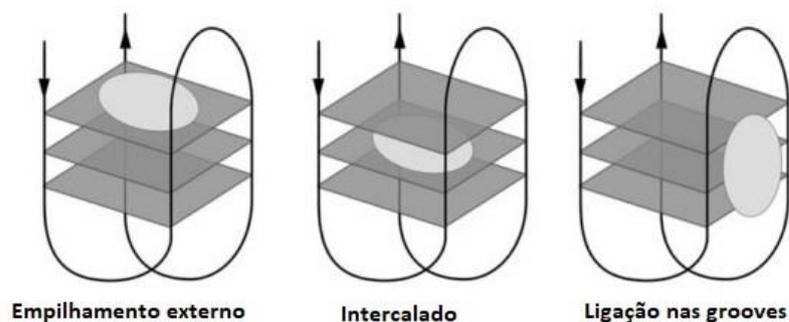


Figura 10. Representação do complexo ligando-G4 através de ligação externa na superfície da G-tétrada terminal (esquerda), intercalada entre as G-tétradas (centro) e ligação nas depressões (esquerda) (adaptado de <sup>36</sup>)

A estabilização do G4 ocorre, na maioria das vezes, através de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e interações eletrostáticas, resultando na ligação do ligando (geralmente uma molécula plana aromática) na face externa do G4.<sup>37</sup>

Algumas classes de ligandos de G4, tais como os heterocíclicos, têm demonstrado ser uma nova classe de agentes anticancerígenos.<sup>12</sup>

Diferentes famílias de ligandos têm sido sintetizadas e avaliadas, entre elas macrociclos de porfirinas, acridinas, antraquinonas, fenantrolinas, perilenos e compostos naturais como telomestatina e berberina.<sup>38</sup>

As acridinas têm sido utilizadas como ligandos de G4 devido ao anel aromático poder fazer empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com as tétradas do G4 e electroestática através do átomo de nitrogénio do anel central catiónico, apresentar fluorescência intrínseca e internalização celular (direcionado para o núcleo).<sup>38</sup>

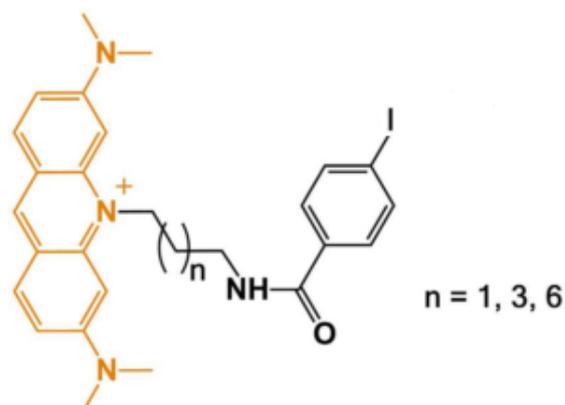


Figura 11. Estrutura química das acridinas (adaptado de <sup>39</sup>)

Também os compostos derivados de fenantrolina fornecem um sistema aromático básico para interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  que se pode ligar à G-tétrada aumentando assim a estabilidade térmica e seletividade de G4 em relação ao duplex.<sup>12</sup>

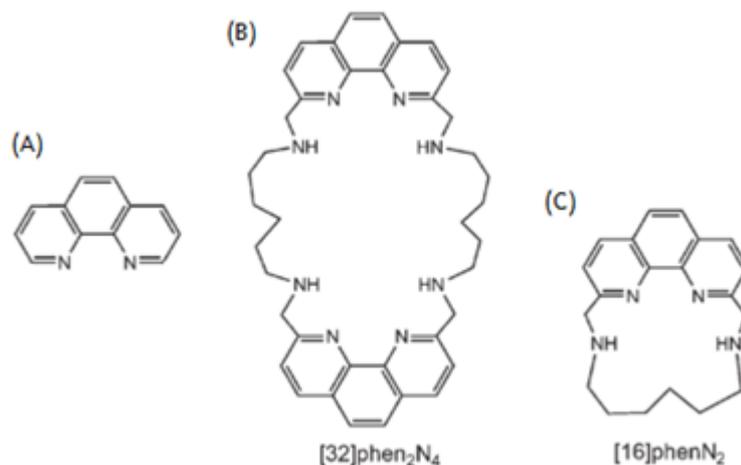


Figura 12. (a) Estruturas químicas dos compostos derivados de fenantrolina; (b) [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub>; (c) [16]phenN<sub>2</sub> (Adaptado de <sup>40</sup>)

Deste modo, neste trabalho de investigação pretende-se analisar a conformação do aptamero G4 AT11 através de técnicas biofísicas de dicroísmo circular e espectroscopia de diferença térmica, e a sua manutenção/interconversão de estrutura de G4 após adição de ligandos. Para

além da análise estrutural, neste projeto pretende-se determinar a afinidade entre cada ligando e o aptamero G4 AT11 por titulações de espectroscopia de fluorescência.

Após os ensaios biofísicos, pretende-se estudar o efeito citotóxico do aptamero G4 AT11, dos ligandos livres e do complexo por estes formado em células normais (NHDF) e cancerosas (HeLa). Pretende-se também avaliar a localização intracelular do aptamero G4 AT11, dos ligandos e do complexo G4 AT11-ligando após internalização celular e relacioná-los com os seus efeitos citotóxicos.

Com este estudo pretende-se avaliar se a utilização do aptamero G4 AT11 e dos seus complexos será uma estratégia promissora para terapia do cancro do colo do útero, permitindo assim, o avanço na investigação de terapias mais seletivas para o cancro.



## Capítulo 2 - Objetivos

Este trabalho tem como objetivo estudar derivados do G4 AS1411, nomeadamente o aptamero G4 AT11 e seus complexos com ligandos em termos de estabilidade, afinidade, localização intracelular e atividade anticancerígena.

Os objetivos específicos são:

- Sintetizar compostos derivados de fenantrolinas para interação com o aptamero G4 AT11;
- Caracterizar estruturalmente o aptamero G4 AT11 através de técnicas biofísicas tais como, dicroísmo circular e espectroscopia de diferença térmica;
- Determinar a estabilidade térmica e afinidade entre os complexos G4 AT11-ligando por dicroísmo circular e titulações por espectroscopia de fluorescência;
- Avaliação da atividade anticancerígena do aptamero G4 AT11, dos ligandos e complexos G4 AT11-ligando em linhas celulares de cancro do colo do útero (HeLa) e fibroblastos da derme humana normais (NHDF) através do ensaio do MTT;
- Localização intracelular do aptamero G4 AT11, ligando livre e complexo G4 AT11-ligando através de ensaios de microscopia de fluorescência confocal.



## Capítulo 3 - Parte experimental

### 3.1 Síntese Química

#### 3.1.1 Síntese de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona

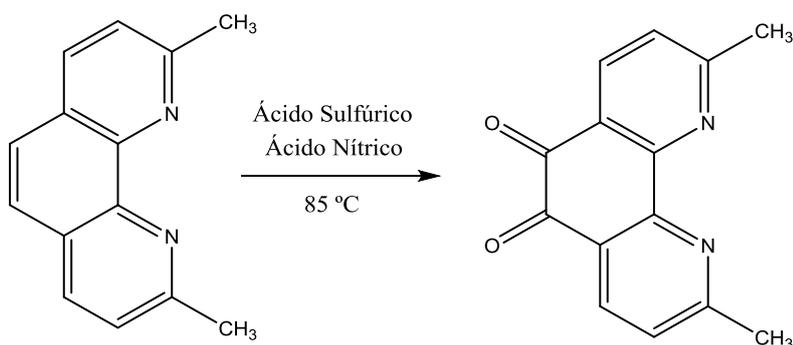
A síntese da 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona foi realizada com base no procedimento descrito por A. Garas e R. Vagg,<sup>41</sup> no qual se pesaram 2,024 g de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina num balão de fundo redondo que foi colocado em gelo até obter uma temperatura de 0 °C. Quando a temperatura desejada foi atingida adicionaram-se 2,918 g de agente oxidante, KBr, e colocou-se em agitação. Em seguida, procedeu-se à adição do primeiro solvente, ácido sulfúrico, do qual foram adicionados lentamente 38,5 mL (a solução adquiriu uma tonalidade alaranjada). Posteriormente, com o balão sob agitação e através de uma ampola de adição adicionaram-se gota a gota 19,25 mL de ácido nítrico, estando este a uma temperatura de 30°C (após adição do segundo ácido houve saída de vários vapores, a tonalidade laranja que a solução apresentava manteve-se).

Após adição de todo o solvente, o balão permaneceu durante 3 horas em agitação, a uma temperatura de 40°C. Finalizado este tempo, destapou-se o balão, ocorrendo novamente saída de vapores. Contudo, desta vez a solução apresentava-se incolor. Elevou-se a temperatura para 85°C, tapou-se o balão e permaneceu mais 2 horas em agitação. Destapou-se novamente (este já apresentava tonalidade alaranjada) e houve saída de vapores com nova perda de cor.

Retirou-se o balão do banho colocando-o à temperatura ambiente durante a noite, sendo que a agitação foi mantida durante este período.

Para se proceder à sua neutralização, colocou-se o balão em gelo até atingir os 0°C. Quando a temperatura pretendida foi atingida, começou a adicionar-se uma solução de NaOH a 8 M até se atingir um pH de aproximadamente 7. Alcançado esse valor, adicionou-se clorofórmio para se fazer uma extração líquido-líquido de clorofórmio e água. O composto encontrava-se na fase orgânica, então fez-se a recolha deste para um balão de fundo redondo ao qual foi adicionado sulfato de sódio (o suficiente para tapar o fundo do balão) com o objetivo de secar a fase orgânica, ficando assim durante 2 horas. Em seguida filtrou-se e procedeu-se à evaporação do filtrado obtendo-se o composto.

Quando o composto atingiu o ponto de secura ideal realizou-se um espectro de <sup>1</sup>H em DMSO deuterado, no qual se concluiu que o mesmo não estava puro. Assim sendo, procedeu-se a nova síntese de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona, mas com alteração de protocolo.



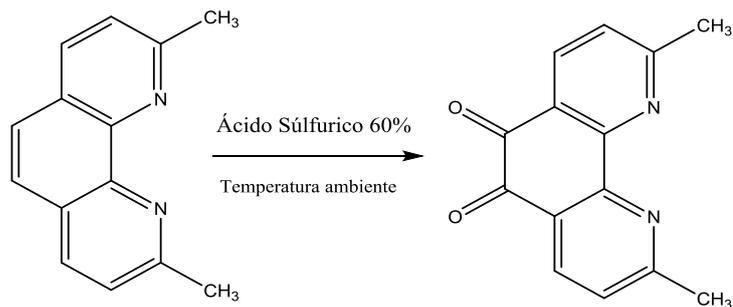
A síntese de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona passou a ser realizada de acordo com o procedimento descrito por Ren Hua Zheng e colaboradores <sup>42</sup>, no qual se pesaram 3,01 g de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina num balão de fundo redondo e adicionaram-se 34 mL de ácido sulfúrico com uma concentração final de 60%. Colocou-se sob agitação até que todo o composto se encontrasse dissolvido, e em seguida iniciou-se a adição lenta de 2,653 g de agente oxidante, KBrO<sub>3</sub>, (durante aproximadamente 1 hora). À medida que se foi adicionando KBrO<sub>3</sub>, a solução evoluiu de incolor a amarelo e posteriormente a laranja avermelhado. Terminada a adição tapou-se o balão colocando-o à temperatura ambiente e sob agitação durante 20 horas.

O balão foi colocado em gelo até atingir uma temperatura de 0°C e iniciou-se a adição de uma solução de NaOH a 8 M até pH de aproximadamente 7. Posteriormente, adicionou-se diclorometano ao balão e transferiu-se o composto para um copo, ficando sob agitação durante 1 hora. Finalizado esse período, procedeu-se a uma filtração a vácuo, onde o precipitado foi lavado diversas vezes com diclorometano com o objetivo de evitar perdas de composto. Da filtração aproveitou-se o filtrado que sofreu uma extração líquido-líquido com diclorometano e água. Uma vez que o composto se encontrava na fase orgânica, esta foi recolhida para um balão de fundo redondo e evaporada até à secura.

Ao composto seco foi adicionado metanol quente para recrystalizar e ficou a 4°C durante 3 a 4 dias. Quando todo o composto tinha precipitado realizou-se uma filtração, da qual se recolheu o precipitado. Depois de estar seco, realizou-se um espectro de RMN de <sup>1</sup>H em DMSO deuterado.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Apresenta um singuleto a 2.859 ppm (6H), 1 duplete a 7.433 ppm (2H) e um duplete a 8.381 ppm (2H).

Foram efetuadas mais sínteses com base no novo protocolo para se obter uma maior quantidade de composto.



### 3.1.2 Síntese de 3,6-dimetil-dipirido[3,2-a:2',3'-c]-fenazina (DPPZ(Me)<sub>2</sub>)

Para se proceder à síntese do 3,6-dimetil-dipirido [3,2-a:2',3'-c]-fenazina (DPPZ(Me)<sub>2</sub>) foram feitas algumas alterações ao procedimento proposto por A. Garas e R. Vagg<sup>41</sup>, no qual se pesaram 0,650 g de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona num balão de fundo redondo e onde se adicionaram 31,76 mL de etanol com uma concentração final de 99%. Colocou-se o balão sob agitação e temperatura para uma melhor dissolução do composto. Após todo o composto estar dissolvido adicionaram-se 0,290 g de *o*-fenilenodiamina, deixando em seguida a mistura sob refluxo, a uma temperatura de 100°C durante uma semana.

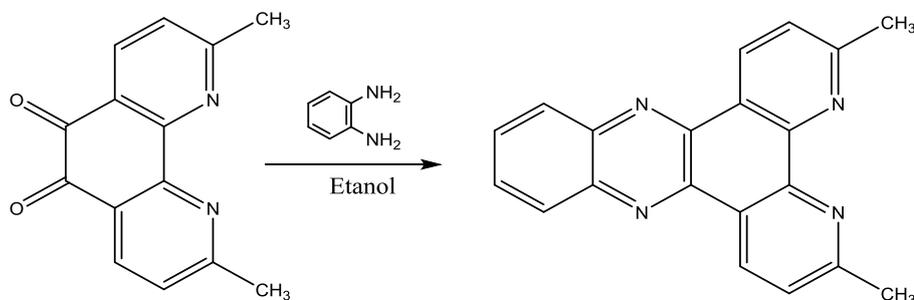
Terminado o referido período, retirou-se o balão do refluxo e deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. Atingida essa temperatura realizou-se uma filtração, na qual o precipitado foi lavado várias vezes com etanol 99%, para uma recolha máxima de composto. Da filtração recolheu-se o filtrado, sendo deixado na hotte durante 3 a 4 dias para este precipitar.

Ao fim de 4 dias o precipitado era mínimo, pelo que se evaporou o solvente no evaporador rotativo.

Recristalizou-se o composto com metanol quente, permanecendo na hotte de modo a potenciar a sua precipitação. Quando todo o composto tinha precipitado realizou-se nova filtração, recolheu-se o precipitado e deixou-se uma noite a secar. Após secagem, adquiriu-se o espectro de RMN de <sup>1</sup>H em DMSO deuterado, no qual se concluiu que o composto estava puro.

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): Apresenta um singuleto a 2.896 ppm (6H), 1 duplete a 7.839 ppm (2H), um multiplete a 8.086 ppm (2H), um multiplete a 8.411 ppm (2H) e um duplete a 9.445 ppm (2H).

Foram realizadas mais sínteses, de acordo com estas alterações de protocolo, de modo a obter maior quantidade de composto.



### 3.1.3 Síntese de DPPZ(COH)<sub>2</sub>

A síntese de DPPZ(COH)<sub>2</sub> foi realizada com base no procedimento proposto por J. Medeiros-Silva e colaboradores<sup>12</sup> no qual se pesaram 0,145 g de DPPZ(Me)<sub>2</sub> num copo e se adicionaram 12,82 mL de dioxano. A mistura foi colocada sob agitação. Como não se dissolvia totalmente, aqueceu-se a mistura a 60°C.

Num balão de fundo redondo pesaram-se 0,349 g de SeO<sub>2</sub> e adicionaram-se 100 µL de água destilada. Este foi colocado sob agitação e temperatura. Quando se encontrava quente, adicionaram-se 10 mL de dioxano e deixou-se a mistura a aquecer. Depois, através de uma ampola de adição, adicionou-se gota a gota a mistura do copo ao balão. Terminada a adição colocou-se o balão sob refluxo a 100°C durante 3 dias.

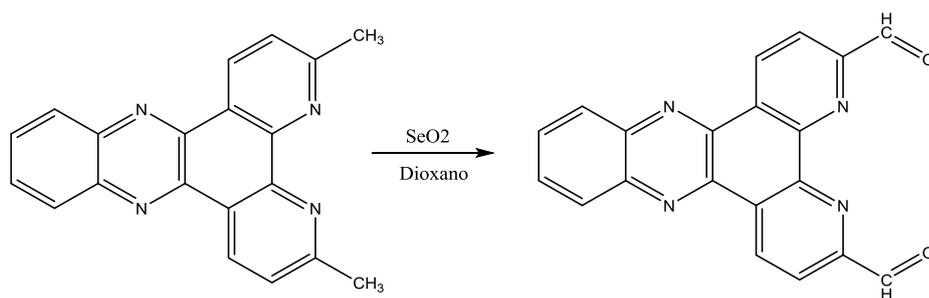
Assim que a mistura foi colocada sob refluxo apresentava-se incolor, contudo, depois ficou vermelha (indicativa da formação de álcool) e posteriormente passou a preta (indicativa da formação de aldeído).

Ao fim dos 3 dias, retirou-se o balão do refluxo e fez-se uma filtração a vácuo com celite, na qual todos os elementos tinham sido previamente aquecidos, e o precipitado foi lavado várias vezes com dioxano. Da filtração aproveitou-se o filtrado, que foi posteriormente evaporado.

O composto seco foi recristalizado com clorofórmio quente e deixado durante uma semana a 4°C de modo a precipitar. Quando o composto precipitou fez-se nova filtração, na qual se

recolheu o precipitado e após secagem adquiriu-se o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em clorofórmio deuterado, no qual se concluiu que o composto estava puro.

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): Apresenta um multipletto a 8.031 ppm (2H), um multipletto a 8.441 ppm (2H), um dupletto a 8.523 ppm (2H), um dupletto a 9.929 ppm (2H) e um singuleto a 10.605 ppm (2H).

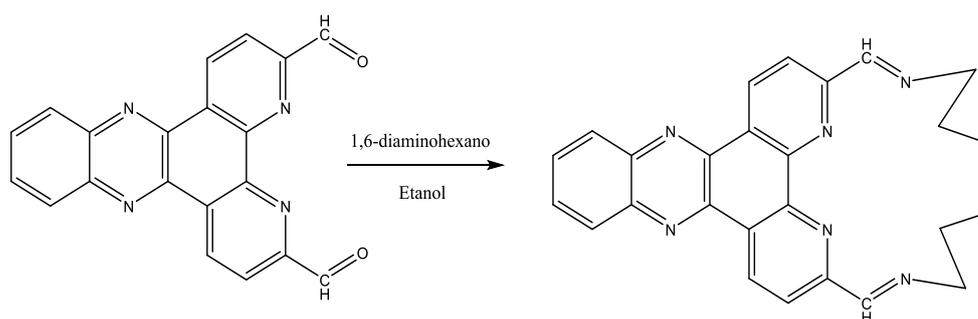


### 3.1.4 Síntese de DPPZ( $\text{N}_4$ )

Para se proceder à síntese de DPPZ( $\text{N}_4$ ) pesaram-se 0,016 g de DPPZ( $\text{COH}$ ) $_2$  num copo, adicionaram-se 6,67 mL de metanol e colocou-se sob agitação.

Num balão de fundo redondo pesaram-se 0,005 g de 1,6-diaminohexano e adicionaram-se 4,67 mL de metanol para dissolver.

O DPPZ( $\text{COH}$ ) $_2$  foi transferido para uma ampola de adição, contudo, uma vez que apareceu algum precipitado na ampola, o solvente foi decantado para outra, e essa sim, incorporada no balão de modo a adicionar gota a gota o DPPZ( $\text{COH}$ ) $_2$  à amina que se encontrava no balão, sob agitação. Após adição tapou-se o balão ficando à temperatura ambiente e sob agitação durante 3 dias. Terminado esse tempo, decantou-se o solvente, e o precipitado foi colocado na estufa. Quando este se encontrava seco, adquiriu-se o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em clorofórmio deuterado, onde se concluiu que o composto estava presente, contudo, impuro.



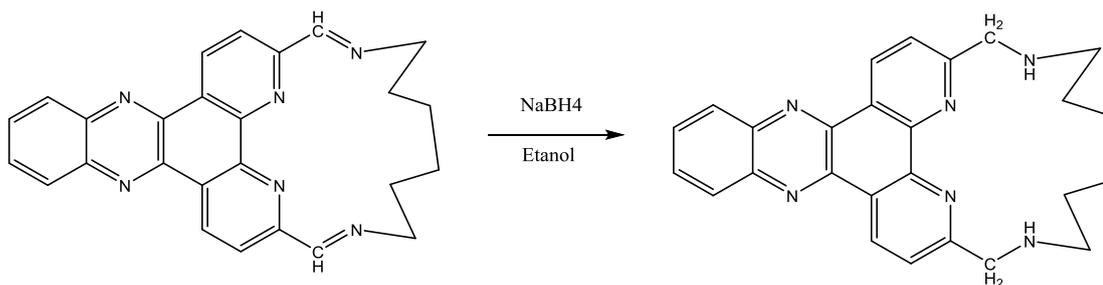
### 3.1.5 Redução do DPPZ(N<sub>4</sub>)

A redução da mistura anterior foi realizada através da adição do agente redutor, NaBH<sub>4</sub>. Para isso pesaram-se 0,005 g de DPPZ(N<sub>4</sub>) num balão de fundo redondo, ao qual se adicionaram 10 mL de etanol a 99% e colocou-se sob agitação. Gradualmente adicionou-se 0,05 g de NaBH<sub>4</sub> para que este reduzisse as duas ligações imina. Após adição, tapou-se o balão e ficou durante um dia à temperatura ambiente sob agitação.

Ao fim desse tempo a mistura reacional não apresentava precipitado pelo que foi colocada durante 2 horas sob refluxo a 100°C. No fim, retirou-se o balão do refluxo e deixou-se novamente à temperatura ambiente e com agitação durante 3 dias. Mais uma vez não apresentava precipitado pelo que se evaporou o solvente até a secura. Adicionou-se clorofórmio com o intuito de se realizar uma extração líquido-líquido com água, contudo, a maioria do composto não estava na fase orgânica e então, saturou-se a solução com NaHCO<sub>3</sub>. Continuava a obter-se o mesmo resultado, extraiu-se a fase orgânica para um balão e passou a fazer-se uma extração líquido-líquido com água e éter. Novamente, o composto não estava na fase orgânica, então fez-se nova extração líquido-líquido com água e acetato de etilo. Tal como na extração com clorofórmio recolheu-se a fase orgânica para um balão e evaporou-se até à secura, contudo, como o composto tinha ficado retido na fase aquosa (dados obtidos a partir de TLC) esta também se recolheu para um balão de fundo redondo e evaporou-se.

Após secagem, adquiriu-se o espectro de RMN de <sup>1</sup>H em água deuterada para a fase aquosa, na qual não estava presente composto, e para a fase orgânica fez-se um espectro de protão em clorofórmio deuterado, e tal como na fase aquosa, o composto não estava presente.

Visto que houve alguma dificuldade em obter DPPZ(N<sub>4</sub>) e que a síntese da sua redução não correu bem, passou a usar-se uma nova amina, N<sup>1</sup>-(2-aminoetil) etano-1,2-diamina (C<sub>4</sub>N<sub>3</sub>H<sub>13</sub>), passando a designar-se por DPPZ(N<sub>5</sub>).



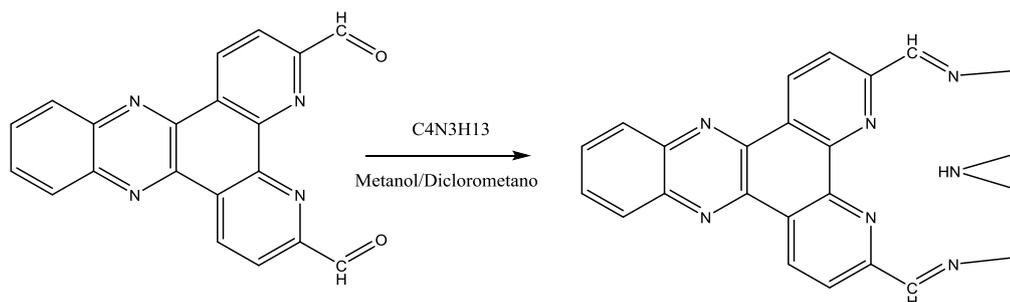
### 3.1.6 Síntese de DPPZ(N<sub>5</sub>)

Uma vez que a reação com a 1,6-diaminohexano não se obteve o composto puro, mudou-se a amina para N<sup>1</sup>-(2-aminoetil) etano-1,2-diamina (C<sub>4</sub>N<sub>3</sub>H<sub>13</sub>). Pesaram-se 0,008 g de DPPZ(COH)<sub>2</sub> num balão de fundo redondo com 20 mL de solvente, dos quais 5 mL eram de metanol e 15 mL de diclorometano (usou-se mistura de solventes para melhor dissolução de DPPZ(COH)<sub>2</sub>) e colocou-se em gelo e sob agitação.

Num copo pipetaram-se 2,6 mL de N<sup>1</sup>-(2-aminoetil) etano-1,2-diamina e dissolveram-se também numa mistura de solventes, 0,5 mL de metanol e 1,5 mL de diclorometano. Quando a mistura já se encontrava homogénea foi transferida para uma ampola de adição e adicionou-se gota a gota ao aldeído no balão. Após adição, o balão ficou a agitar à temperatura ambiente durante 1 semana.

Uma vez que a reação não apresentava precipitado concentrou-se para metade e deixou-se a 4°C durante uma noite de forma a precipitar. Mais uma vez não precipitou, então, através de evaporação rotativa evaporou-se todo o solvente, e deixou-se a secar na estufa.

Após secagem do composto, adquiriu-se o espectro de RMN de <sup>1</sup>H em clorofórmio deuterado, no qual se concluiu que o composto estava presente. Contudo, tal como acontecia com a amina anterior, 1,6-diaminohexano, também se encontrava impuro.

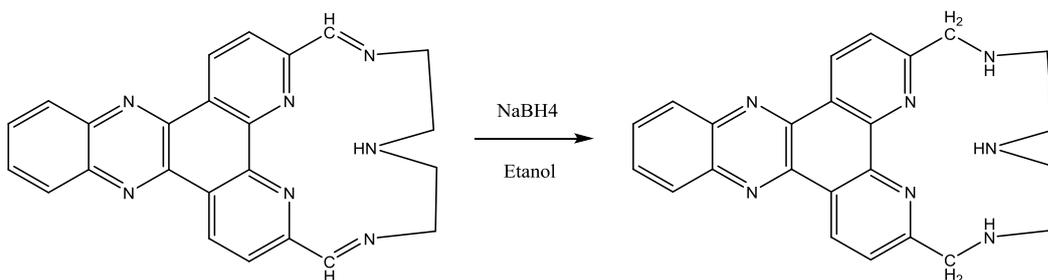


### 3.1.7 Redução de DPPZ(N<sub>5</sub>)

Para se realizar a redução do DPPZ(N<sub>5</sub>) pesaram-se 0,019 g de DPPZ(N<sub>5</sub>) num balão de fundo redondo ao qual se adicionaram 15 mL de etanol a 99% deixando sob agitação e à temperatura ambiente até se encontrar completamente dissolvido. Posteriormente adicionou-se lentamente 0,010 g de NaBH<sub>4</sub> e deixou-se à temperatura ambiente e com agitação durante 1 dia.

No fim deste tempo, a reação não apresentava precipitado pelo que se evaporou o solvente até à *secura*. Adicionou-se clorofórmio ao balão, para se fazer uma extração líquido-líquido com clorofórmio e água. Uma vez que o composto se encontrava na fase orgânica, esta foi recolhida para um balão de fundo redondo solvente evaporada até à *secura*.

Após secagem do composto na estufa, adquiriu-se o espectro de RMN de <sup>1</sup>H em clorofórmio deuterado, no qual se observou que o composto estava presente, mas impuro, uma vez que o DPPZ(N<sub>5</sub>) não se encontrava puro quando se procedeu à sua redução.



## 3.2 Preparação dos oligonucleótidos

O aptamero usado neste trabalho experimental foi adquirido à STAB VIDA (Lisboa, Portugal). A sequência em estudo denominava-se AT11: 5'-TGGTGGTGGTTGTTGTGGTGGTGGTGGT-3'. Para se proceder ao seu estudo, esta teve que ser submetida a um processo de purificação através de concentradores milipore. Estes apresentam um *design* de membrana vertical constituído por dois tubos. Durante a sua utilização, um tubo é usado para recolher o filtrado e outro para recolher a amostra (apresentam uma capacidade de recuperação de amostra de 98%). Nestes concentradores, o dispositivo de filtro é de estírol copolímero/butadieno, apresentam uma

membrana (área ativa de 1 cm<sup>2</sup>) de celulose regenerada de baixa ligação e um tubo coletor de polipropileno.

Nos concentradores adicionou-se o oligonucleótido e 2 mL de água mili-Q. Colocaram-se a centrifugar durante 30 minutos a 3500 G e a uma temperatura de 25°C. Repetiu-se este procedimento 5 vezes e por fim inverteu-se o concentrador e centrifugou-se 2 minutos a 3500 G para recolha do oligonucleótido. A partir daí preparou-se uma solução stock de 4,46 mM em água mili-Q que foi armazenada a -20°C até à sua utilização.

A concentração foi medida a 260 nm no espectrofotómetro de UV-visível (Thermo scientific™ evolution 220) com uma célula de quartzo de 10 mm, usando os coeficientes de extinção molar ( $\epsilon$ ) fornecidos pelo fabricante e o cálculo foi feito através da seguinte fórmula:

$$C = \frac{(Abs\ 260)}{\epsilon \times L} \times 1000 \quad (1)$$

Na qual L representa a largura da célula de quartzo.

Para todos os ensaios procedeu-se ao *annealing* da sequência, que consistia no seu aquecimento a 95°C durante 15 minutos seguido do seu arrefecimento em gelo durante 20 minutos.

Relativamente aos ligandos, foram usados derivados de laranja de acridina e de fenantrolinas (figuras 14 e 15), dos quais foram preparadas soluções stock em DMSO.

### 3.3 Espectroscopia de dicroísmo circular

O dicroísmo circular é uma técnica espectroscópica que permite avaliar a estrutura de ácidos nucleicos, as suas alterações conformacionais e a sua desnaturação térmica <sup>43</sup>.

Os espectros de dicroísmo circular foram adquiridos num espetropolarímetro Jasco J-815 equipado com um sistema de controlo de temperatura Peltier CDF-426S, através de uma célula de quartzo com 1 mm de caminho ótico e com uma velocidade de aquisição de 200 nm/min, num intervalo de 220 a 340 nm. Todos os espectros obtidos foram o resultado de 4 aquisições.

Para se proceder às titulações no dicroísmo circular usaram-se 10  $\mu$ M de oligonucleótido em 20 mM de tampão fosfato (10 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> a pH 7) contendo 65 mM de KCl, com o *annealing* feito previamente. Foi preparada uma solução de 1 mM em água mili-Q de todos os ligandos e o volume necessário para cada titulação foi diretamente adicionado à célula (Tabela 1). A concentração final do ligando na célula foi de 40  $\mu$ M correspondente a 4 equivalentes molares.

Tabela 1. Equivalentes molares, concentração e volume correspondente de ligando para cada titulação.

[Oligonucleótido]	[ligando] $\mu\text{M}$		V (Ligando) $\mu\text{L}$
<b>10<math>\mu\text{M}</math></b>	0 eq	0	0
	0,25 eq	2,5	0,625
	0,5 eq	5	1,25
	0,75 eq	7,5	1,875
	1 eq	10	2,5
	1,5 eq	15	3,75
	2 eq	20	5
	4 eq	40	10

Os estudos de dicroísmo circular de desnaturação térmica foram realizados numa gama de temperatura de 10 a 110°C e com uma taxa de aquecimento de 2°C/min através da monitorização da elipticidade a 261 nm. Os espectros foram adquiridos a 0; 0,5; 1; 2 e 4 equivalentes molares de ligando.

Os ligandos usados para a realização deste ensaio foram derivados de laranja de acridinas, C<sub>8</sub>, C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub>, C<sub>5</sub> e C<sub>3</sub> e derivados de fenantrolina, [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> e [16]phenN<sub>2</sub>.

Os dados obtidos foram convertidos na fração de DNA enrolada ( $\theta$ ) através da equação seguinte:

$$\theta = \frac{CD - CD_{\lambda_{\min}}}{CD_{\lambda_{\max}} - CD_{\lambda_{\min}}} \quad (2)$$

Onde CD representa a elipticidade no comprimento de onda monitorizado a cada temperatura e CD<sub>min</sub> e CD<sub>máx</sub> representam as elipticidades mais baixa e mais elevada, respetivamente. Os resultados foram tratados através do programa Origin 2017 onde foram ajustados à distribuição de Boltzmann permitindo que a temperatura de desnaturação para cada titulação fosse obtida.<sup>17</sup>

### 3.4 Espectroscopia de diferença térmica (TDS)

A espectroscopia de diferença térmica é uma técnica que permite de uma forma simples e rápida determinar a estrutura dos ácidos nucleicos através da sua absorvância UV. Os espectros de TDS de um ácido nucleico são obtidos através da subtração do espectro UV do estado enrolado ao espectro UV do estado desnaturado.<sup>44</sup>

De modo a determinar a estrutura do aptamero G4 AT11 fez-se *annealing* deste em tampão de 30 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (15 mM  $\text{k}_2\text{HPO}_4$  + 15 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) com 100 mM de KCl (pH 7,2).

Numa célula de quartzo de 10 mm adicionaram-se 500  $\mu\text{L}$  de tampão e fez-se a leitura a 20°C e a 90°C para se obter o branco. A seguir colocaram-se 397  $\mu\text{L}$  de tampão e 3  $\mu\text{L}$  de aptamero G4 AT11 e adquiriram-se novamente os espectros a 20 e a 90°C. Todos os espectros foram adquiridos num intervalo de 220 a 335 nm e com uma velocidade de aquisição de 200 nm/min.

Os dados foram tratados a partir do programa thermo insight, no qual se subtraiu o espectro de 20°C ao espectro de 90°C obtendo-se assim o espectro de TDS característico do aptamero G4 AT11. A partir do espectro de TDS, para se chegar à estrutura do ácido nucleico é necessário ter em conta dois fatores, sendo eles a  $\Delta\text{Abs}(240)/\Delta\text{Abs}(295)$  e a  $\Delta\text{Abs}(255)/\Delta\text{Abs}(295)$ .<sup>15</sup>

Tabela 2. Valores de referência para caracterização de topologia paralela ou antiparalela de acordo com os fatores de TDS

Fatores TDS	Topologia	
	Antiparalela	Paralelo
$\frac{\Delta\text{Abs}(240)}{\Delta\text{Abs}(295)}$	< 2	> 4
$\frac{\Delta\text{Abs}(255)}{\Delta\text{Abs}(295)}$	< 1,5	> 3,5

### 3.5 Espetroscopia de fluorescência

As titulações por espectroscopia de fluorescência permitiram avaliar a interação entre moléculas. Estes ensaios foram realizados de modo a determinar a constante de afinidade do ligando (molécula fluorescente)-AT11. Uma variação dependente da concentração da intensidade de fluorescência pode ser utilizada para determinar as constantes de associação/dissociação do complexo ligando-G4.<sup>40</sup>

Os espectros de fluorescência foram adquiridos no fluorímetro Horiba FluoroMax 4 à temperatura ambiente usando uma cuvete de quartzo de 10 mm.

Os ligandos usados neste ensaio foram os derivados de laranja de acridina ( $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_5$ ,  $\text{C}_8$  e  $\text{C}_8\text{-NH}_2$ ) e de fenantrolinas ([16]phenN<sub>2</sub> e [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub>). Os derivados de laranja de acridina foram

excitados a 498 nm e a fluorescência de emissão foi recolhida de 530 a 700 nm. Os derivados de fenantrolina foram excitados a 271 nm e a emissão foi recolhida entre 286 a 600 nm.

Todos os espectros de fluorescência foram obtidos através de titulações sucessivas de solução de 500  $\mu\text{M}$  de AT11 em 30 mM de tampão fosfato de potássio (15 mM de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e 15 mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) contendo 100 mM de KCl, com *annealing* previamente feito, à célula de quartzo que continha a solução de 5  $\mu\text{M}$  de ligando em 30 mM de tampão fosfato de potássio com 100 mM de KCl (pH 7,2). Para cada titulação adicionou-se o respetivo volume de oligonucleótido diretamente na cuvete, esperou-se 10 minutos para estabilizar e só depois se procedeu à aquisição.

Para todos os ligandos as *slit* de excitação e de emissão foram ajustadas para que o máximo de intensidade de fluorescência de emissão do ligando sozinho se encontrasse entre  $1,5 \times 10^6$  e  $2 \times 10^6$ .

A intensidade de fluorescência ( $\alpha$ ) para os derivados de laranja de acridina e fenantrolinas foi calculada, respetivamente, por:

$$\alpha = \frac{I - I_0}{I_{\text{máx}} - I_0} \quad (3)$$

$$\alpha = I_0 - I \quad (4)$$

Nas quais  $I$  corresponde ao valor da intensidade a cada ponto,  $I_0$  o valor da intensidade de fluorescência do ligando antes das titulações e  $I_{\text{máx}}$  o valor de intensidade de fluorescência do último equivalente adquirido. Após determinação da intensidade da fluorescência ( $\alpha$ ) os dados foram tratados através do programa Origin 2017, no qual os valores foram ajustados através da função Hill e as constantes de dissociação foram determinadas.<sup>38</sup>

### 3.6 Ensaio de viabilidade celular

Sempre que se pretende estudar uma substância é necessário proceder à avaliação da sua segurança para as células normais e o seu efeito citotóxico para as células cancerosas. Para isso procedeu-se ao ensaio da viabilidade celular do aptamero G4 AT11, dos ligandos e complexo ligando-G4 AT11 pelo ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) em células normais e cancerosas. O ensaio de MTT é um estudo colorimétrico baseado na avaliação da atividade metabólica das células.<sup>45</sup>

Para a realização deste estudo usaram-se duas linhas celulares, uma linha de cancro de colo do útero, as HeLa, e uma linha normal, os fibroblastos. As HeLa cresceram em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal de bovino e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina) e os fibroblastos em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal de bovino, 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), 0,01 M de HEPES, 0,02 M de L-glutamina e 0,001 M de piruvato de sódio.

Após confluência das células, estas foram semeadas em caixas de 48 poços. Para as HeLa a densidade celular foi de  $3 \times 10^3$  células/poço e para os fibroblastos de  $5 \times 10^4$  células/poço para um volume de 300  $\mu$ L de meio/poço e foram incubadas durante 24 e 48 horas, respetivamente, numa atmosfera controlada de 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub>. Finalizado esse período foram adicionados os ligandos em estudo com diferentes concentrações (tabela 3) e em triplicado de modo a determinar os valores de IC<sub>50</sub> de cada um nas duas linhas celulares.

Tabela 3. Valores das concentrações de ligando testadas nas células HeLa para determinação de IC<sub>50</sub>.

<u>HeLa</u>				
[C3] $\mu$ M	[C5] $\mu$ M	[C8] $\mu$ M	[C8-NH <sub>2</sub> ] $\mu$ M	[[16] phenN <sub>2</sub> ] $\mu$ M
0,01	0,01	0,01	0,01	0,1
0,1	0,05	0,025	0,1	1
0,5	0,1	0,075	0,25	5
1	0,5	0,1	0,5	10
1,25	1	0,125	1	25
1,75	2	0,25	2	50
3	3	0,5	5	100
-	-	1	-	-
-	-	2	-	-

O AS1411 apresenta efeitos na viabilidade celular ao fim de 4 a 7 dias, assim, o estudo do seu derivado G4 AT11, dos ligandos e dos complexos G4 AT11-ligandos foram realizados com uma incubação de 7 dias a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>.

Para os fibroblastos foi realizado o mesmo ensaio, contudo, as concentrações dos compostos foram diferentes (tabela 4).

Tabela 4. Valores das concentrações de ligando testadas nos fibroblastos para determinação de IC<sub>50</sub>

<b>Fibroblastos</b>				
<b>[C3] μM</b>	<b>[C5] μM</b>	<b>[C8] μM</b>	<b>[C8-NH<sub>2</sub>] μM</b>	<b>[[16] phenN<sub>2</sub>] μM</b>
0,1	0,01	0,01	0,01	5
0,5	0,1	0,1	0,1	10
1	0,5	0,25	0,5	15
1,5	1	0,5	1	25
2	2	1	2	35
3	3	2	5	50
-	5	5	10	100

Terminado o período de incubação dos compostos o meio de cada poço foi retirado e adicionou-se uma solução de MTT a 5 mg/mL (MTT dissolvido em 20% de PBS e 80% de meio DMEM incompleto para as HeLa e RPMI suplementado com 1% de soro fetal bovino para os fibroblastos) e colocou-se novamente a incubar durante 1 hora para as HeLa e 1 hora e meia para os fibroblastos. Após formação dos cristais de formazano, a solução foi aspirada e os cristais dissolvidos em 250 e 100 μL de DMSO, respetivamente. As densidades óticas foram recolhidas a 570 nm no espectrofotómetro de microplacas Bio-Rad xMark™.

A viabilidade celular foi determinada usando os poços sem compostos como controlo.

Uma vez realizado o estudo com várias concentrações para cada ligando e nas diferentes linhas foi possível proceder à determinação dos respetivos IC<sub>50</sub> e posteriormente prosseguir o ensaio para a incubação dos complexos, G4 AT11-ligandos. Em todos os ensaios a concentração de oligonucleótido foi de 15 μM.

Tabela 5. Valores de concentração do complexo (AT11-Ligando) nas duas linhas celulares

<b>[AT11]</b>	<b>Complexos HeLa (concentração ligando)</b>				
<b>15 μM</b>	AT11-C <sub>3</sub>	AT11-C <sub>5</sub>	AT11-C <sub>8</sub>	AT11-C <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	AT11- [16]phenN <sub>2</sub>
	1 μM	1 μM	0,125 μM	0,25 μM	10 μM
	<b>Complexos Fibroblastos (concentração ligando)</b>				
	AT11-C <sub>3</sub>	AT11-C <sub>5</sub>	AT11-C <sub>8</sub>	AT11-C <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	AT11- [16]phenN <sub>2</sub>
	2 μM	2 μM	1 μM	2 μM	10 μM

Após 7 dias de incubação dos complexos procedeu-se à adição da solução de MTT de acordo com o procedimento descrito anteriormente.<sup>40</sup>

### 3.7 Microscopia de fluorescência confocal

A Microscopia de fluorescência confocal é uma técnica que permite avaliar a localização intracelular de compostos fluorescentes e complexos.<sup>38</sup>

Para a realização dos ensaios de microscopia confocal usaram-se placas de cultura com fundo de vidro de 8 poços com  $3 \times 10^3$  células/poço para HeLa. Incubaram-se numa atmosfera controlada de 37 °C contendo 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 dia.

Após crescimento das células, estas foram incubadas no escuro com 10 µM de aptamero G4 AT11 marcado com CY5 e 0,5 µM do derivado de laranja de acridina C<sub>8</sub> desde o dia 0 até ao sétimo dia. No fim da incubação de cada dia, o excesso de sonda foi retirado através de duas lavagens com PBS.

Para os estudos de localização, as células foram marcadas com a sonda nuclear de 1 µM de Hoechst 33342 em PBS e incubadas durante 15 min. Antes da visualização, o excesso de sonda foi retirado através de 2 lavagens com PBS. Para visualização adicionaram-se 200 µL de PBS a cada poço.

As células foram observadas usando um microscópio Zeiss AxioObserver LSM 710 com excitação a laser a 405, 488 e 515 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 2 canais fluorescentes, tendo em conta a sobreposição espectral e o potencial entre os dois canais. As imagens foram processadas a partir do software Zeiss ZEN.<sup>38</sup>



## Capítulo 4 - Resultados e discussão

### 4.1 Síntese Química

Atualmente, várias moléculas planares heterocíclicas têm sido utilizadas como estabilizadores de estruturas de G4.<sup>46</sup> A estabilização do G4 ocorre, na maioria das vezes, através do empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e interações eletrostáticas, resultando na ligação do ligando (geralmente molécula aromática) na face externa da G-tétrada do G4 e *grooves*.<sup>37</sup>

Os grupos preferenciais dos ligandos de G4 são extensas unidades planares aromáticas propensas ao empilhamento  $\pi$ - $\pi$  com as G-tétradas, inserção de cadeias laterais protonáveis (através da adição de grupos amina) em torno do núcleo aromático para ter solubilidade em água razoável, ou seja, características hidrofóbicas e hidrofílicas.<sup>37,47</sup>

Tendo em conta estas características estruturais, têm sido estudados diferentes classes de ligandos, entre os quais os compostos derivados de 1,10-fenantrolina como ligandos de G4.<sup>46,47</sup>

Deste modo, os ligandos de G4 sintetizados ao longo deste projeto tiveram como base o composto 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina, com o intuito de se obter dois macrociclos diferentes (o DPPZ(N<sub>4</sub>) e DPPZ(N<sub>5</sub>)). Para se proceder à síntese destes compostos, teve que se otimizar várias reações de síntese de intermediários (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona, DPPZ(Me)<sub>2</sub> e DPPZ(COH)<sub>2</sub>).

A síntese do composto intermediário 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona foi realizada de acordo com o procedimento proposto por Ren Hua Zheng e colaboradores<sup>42</sup>, onde se utilizou o agente oxidante (KBrO<sub>3</sub>) e mistura de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina com ácido sulfúrico a 60%. Esta síntese foi realizada à temperatura ambiente, permitindo que se obtivesse o composto puro e com rendimento elevado (rendimento de reação de 82%).

A caracterização estrutural do composto 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona foi realizada por RMN de <sup>1</sup>H (figura 13) e <sup>13</sup>C (figura 14) em DMSO deuterado. Através da análise do espectro de <sup>1</sup>H obtido, concluiu-se que o composto se encontrava puro, apresentando um singuleto a 2,859 ppm representativos dos 6 prótons dos grupos metil (CH<sub>3</sub>) nos carbonos 15 e 16, um duplete a 7,433 ppm onde estão representados os 2 prótons dos carbonos 9 e 12 e um duplete a 8,31 ppm representativo dos 2 prótons dos carbonos 10 e 11.

Os sinais de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C estão de acordo com os descritos na literatura.

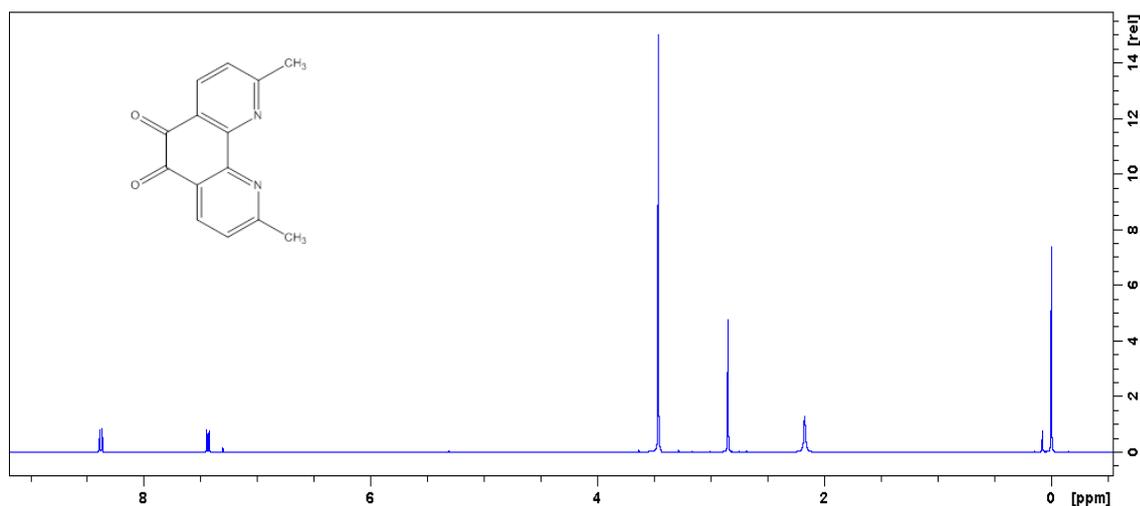


Figura 13. Espectro de  $^1\text{H}$  do composto 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona em DMSO deuterado

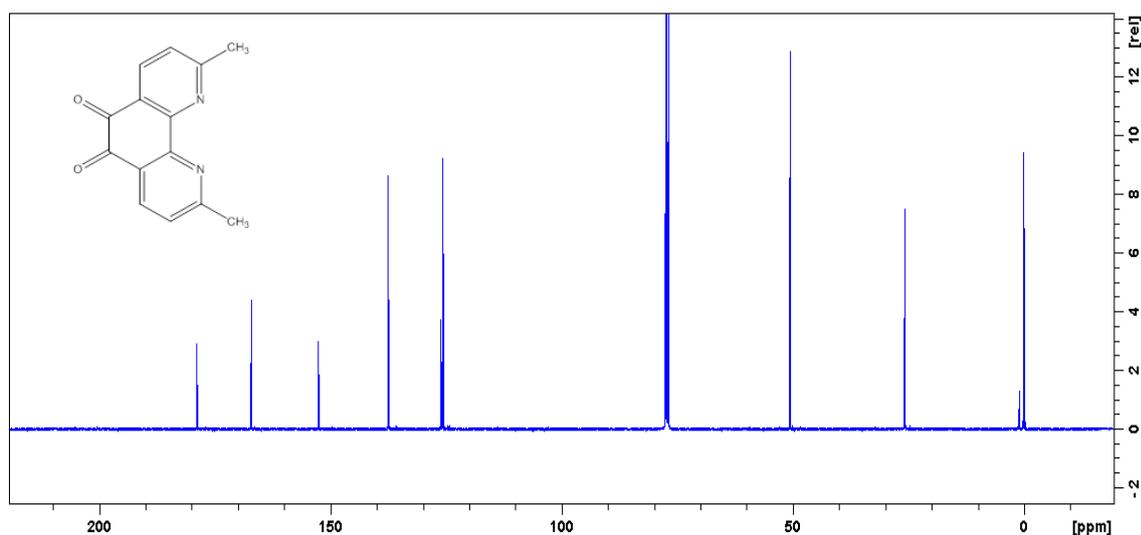


Figura 14. Espectro de  $^{13}\text{C}$  do composto 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona em DMSO deuterado

Após obtenção do composto intermediário 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona prosseguiu-se o processo reacional através da adição da amina *o*-fenilenodiamina, permitindo aumentar a superfície aromática plana do ligando para melhorar a interação com as G-tétradas do G4. Assim, procedeu-se à síntese do composto 3,6-dimetil-dipirido [3,2-*a*:2',3'-*c*]-fenzina (DPPZ(Me)<sub>2</sub>), através de alterações ao protocolo proposto por A. Garas e R. Vagg <sup>41</sup>, no qual se adicionou a amina (*o*-fenilenodiamina) a uma mistura de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina-5,6-diona com etanol a 99%. Esta síntese foi realizada em refluxo à temperatura de 100°C, permitindo que se obtivesse o composto puro, contudo, com baixo rendimento (rendimento de reação de 22%).

A caracterização estrutural do composto DPPZ(Me)<sub>2</sub> foi realizada por RMN de <sup>1</sup>H (figura 15) e <sup>13</sup>C (figura 16) em DMSO deuterado. Através da análise do espectro de <sup>1</sup>H obtido, concluiu-se que o composto se encontrava puro, apresentando um singuleto a 2,896 ppm representativos dos 6 prótons dos grupos metil (CH<sub>3</sub>) nos carbonos 15 e 16, um duplete a 7,839 ppm onde estão representados os 2 prótons dos carbonos 9 e 12, um multiplete a 8,086 ppm representativo dos 2 prótons dos carbonos 22 e 23, um multiplete a 8,411 ppm representativo dos 2 prótons dos carbonos 21 e 24 e um duplete a 9,445 ppm onde estão representados os sinais dos 2 prótons dos carbonos 10 e 11.

Os sinais de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C obtidos estão de acordo com os descritos na literatura.

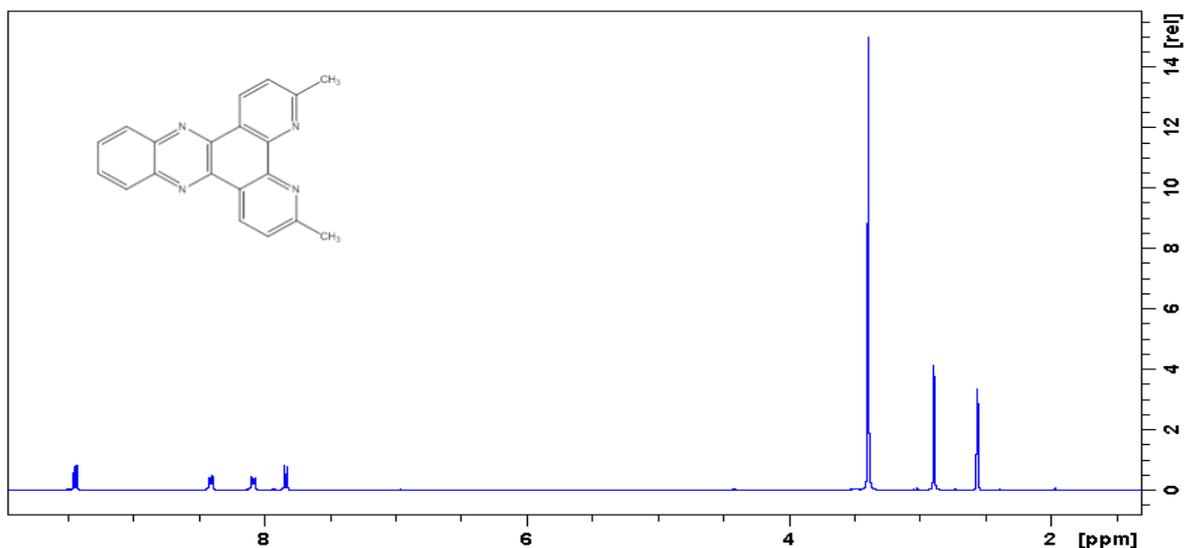


Figura 15. Espectro de <sup>1</sup>H do composto DPPZ(Me)<sub>2</sub> em DMSO deuterado.

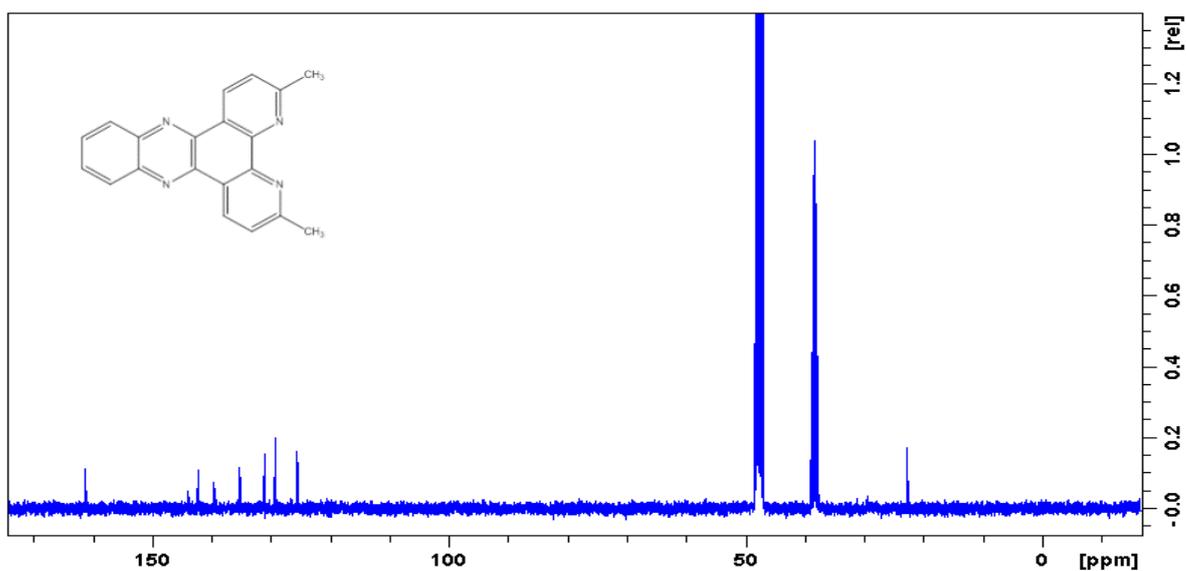


Figura 16. Espectro de <sup>13</sup>C do composto DPPZ(Me)<sub>2</sub> em DMSO deuterado

Após a adição de extensões aromáticas aos ligandos de G4 procedeu-se à adição de grupos amina para que o ligando fosse solúvel em água. Para isso teve de se sintetizar primeiro o dialdeído DPPZ(COH)<sub>2</sub>. A síntese foi realizada com base no procedimento proposto por J. Medeiros-Silva e colaboradores <sup>12</sup>, na qual se adicionou SeO<sub>2</sub> a uma mistura de do composto DPPZ(Me)<sub>2</sub> em dioxano. Esta síntese foi realizada em refluxo a 100°C, permitindo que se obtivesse o composto puro, porém, com baixo rendimento (rendimento de reação de 11,03%).

A caracterização estrutural do composto DPPZ(COH)<sub>2</sub> foi realizada por RMN de <sup>1</sup>H (figura 17) e em Clorofórmio deuterado. Através da análise do espectro de <sup>1</sup>H obtido, concluiu-se que o composto se encontrava puro, apresentando um multipletto a 8,031 ppm representativo dos 2 prótons dos carbonos 9 e 12, um multipletto a 8,441 ppm que representa os 2 prótons dos carbonos 22 e 23, um dupletto a 8,523 onde estão representados os sinais dos 2 prótons dos carbonos 21 e 24, um dupletto a 9,929 ppm que representa os 2 prótons dos carbonos 10 e 11 e um singuleto a 10,605 ppm que representa os 2 prótons dos grupos COH nos carbonos 15 e 16.

Os sinais de <sup>1</sup>H obtidos estão de acordo com os descritos na literatura.

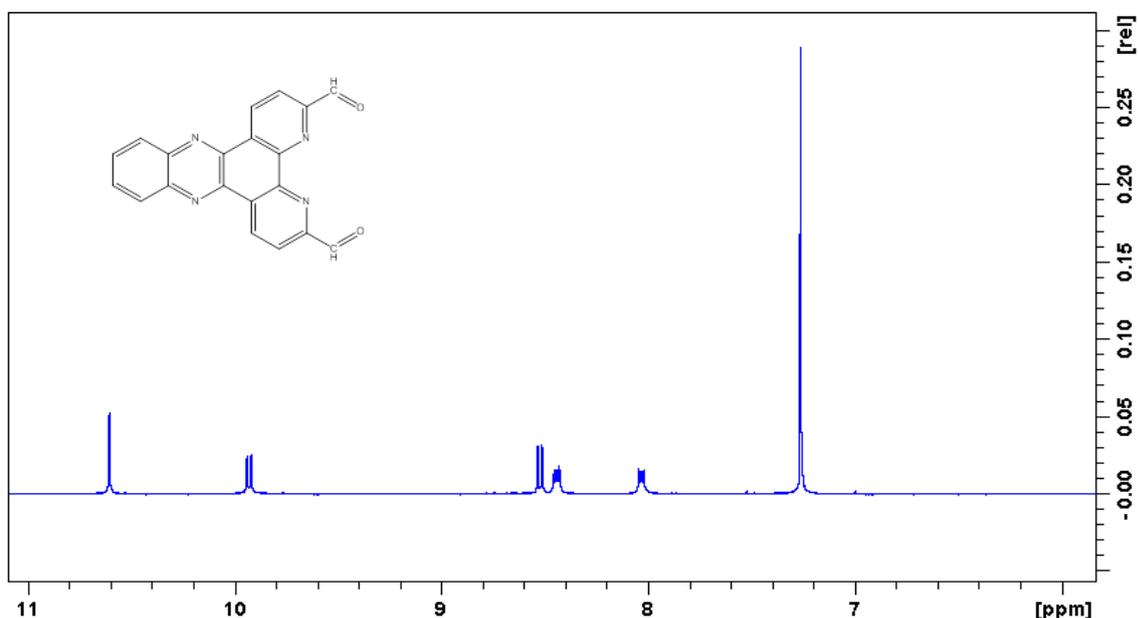


Figura 17. Espectro de <sup>1</sup>H do composto DPPZ(COH)<sub>2</sub> em clorofórmio deuterado.

Após formação do composto intermediário DPPZ(COH)<sub>2</sub>, procedeu-se à síntese dos macrociclo DPPZ(N<sub>4</sub>), que consistiu na ciclocondensação com a amina 1,6-diaminohexano em metanol, formando-se a imina cíclica designada por DPPZ(N<sub>4</sub>); contudo não se conseguiu purificar.

Posteriormente procedeu-se à síntese de outro macrociclo, DPPZ(N<sub>5</sub>), utilizando uma amina diferente, nomeadamente N<sup>1</sup>-(2-aminoetil) etano-1,2-diamina. Para a síntese deste macrociclo houve novamente uma ciclocondensação com a amina N<sup>1</sup>-(2-aminoetil) etano-1,2-diamina numa mistura de metanol e diclorometano formando-se a imina cíclica DPPZ(N<sub>5</sub>); contudo tal como aconteceu com o macrociclo anterior, este também não se conseguiu purificar.

Assim, uma vez que os macrocilcos (DPPZ(N<sub>4</sub>) e DPPZ(N<sub>5</sub>)) finais não estavam puros não se utilizaram para a avaliação biofísica e biológica com o aptamero G4 AT11. Deste modo, passaram a usar-se dois macrocilcos diferentes derivados de fenantrolinas ([32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> e [16]phenN<sub>2</sub>) e derivados de laranja de acridinas (C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>8</sub> e C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub>) uma vez que estes têm sido investigados como potenciais ligandos de G4 por possuírem uma superfície aromática plana extensa e cadeias laterais de poliaminas.

## 4.2 Espectroscopia de Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular é uma técnica que permite estudar a estrutura dos ácidos nucleicos, nomeadamente estruturas G4 e é muito útil para monitorizar alterações conformacionais.<sup>18</sup>

Os ensaios de dicroísmo circular foram realizados com o objetivo de caracterizar a topologia do aptamero G4 AT11 e estudar o efeito que os ligandos tinham na manutenção/interconversão da sua estrutura e na sua estabilização térmica. Os ligandos foram adicionados ao aptamero G4 AT11 (com *annealing* previamente feito em 20 mM de tampão fosfato e 65 mM de KCl) a diferentes rácios molares de ligando/AT11, de 0,25 até 4 equivalentes. Através da aquisição do espectro do aptamero G4 AT11 confirmou-se que este apresentava uma estrutura G4 paralela devido aos sinais de dicroísmo circular positivo a 261 nm e negativo a 240 nm (Figura 18).

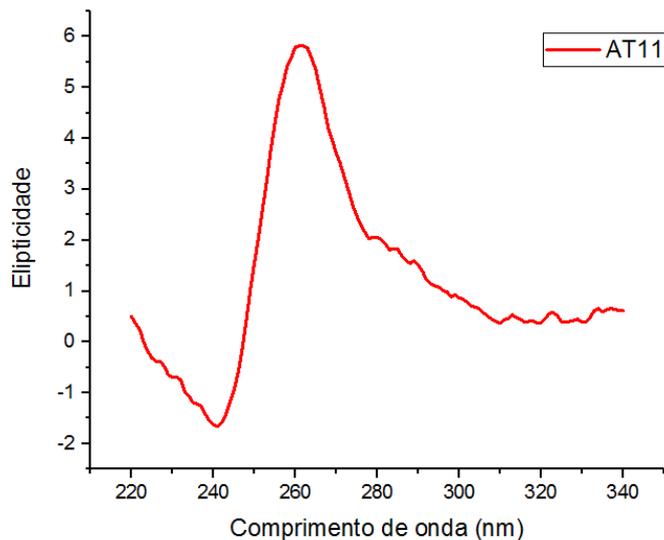


Figura 18. Topologia do aptamero G4 AT11 em 20 mM de tampão fosfato e 65 mM de KCl

Após titulações com os vários ligandos (derivados de fenantrolinas (figura 19) e de laranja de acridina (figura 20)) não se verificaram alterações conformacionais significativas nos sinais característicos do G4 paralelo, sugerindo que a ligação dos ligandos não altera a estrutura deste.

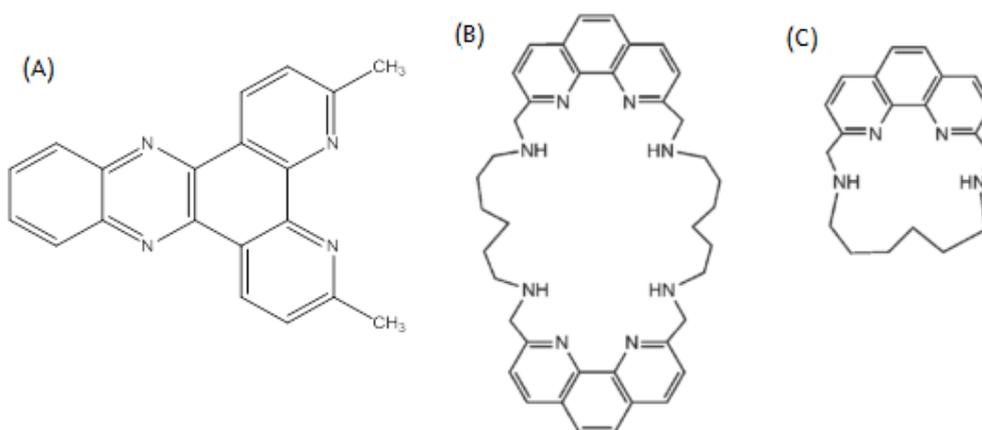


Figura 19. Estrutura química dos derivados de fenantrolinas, (A) DPPZ(Me)<sub>2</sub>, (B) [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub>, (C) [16]phenN<sub>2</sub>

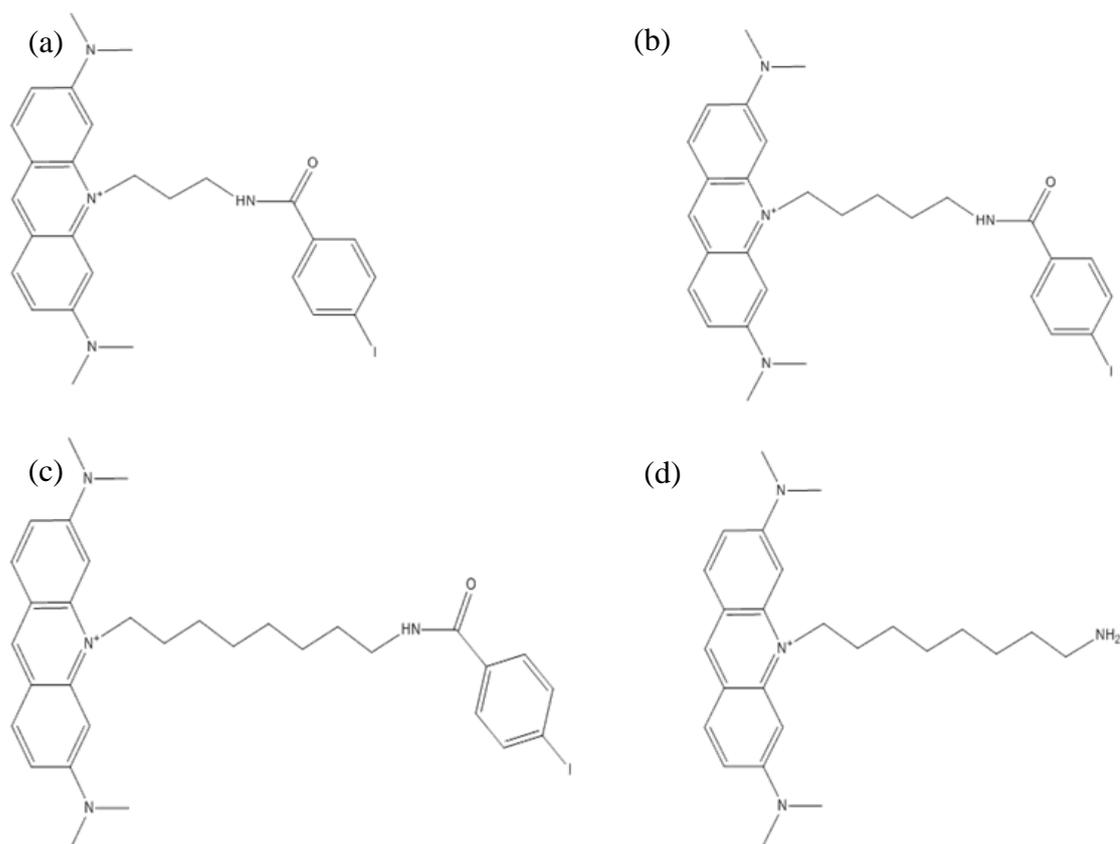


Figura 20. Estrutura química dos derivados de laranja de acridina, (a) C<sub>3</sub>, (b) C<sub>5</sub>, (c) C<sub>8</sub> e (d) C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub>

Em todos os casos verificou-se uma variação da elipticidade (um aumento, exceto no DPPZ(Me)<sub>2</sub> em que houve uma diminuição significativa da elipticidade) aquando a adição do maior equivalente molar de ligando (Figura 21), o que pode estar relacionado com a associação supramolecular do ligando ao aptamero G4 AT11.

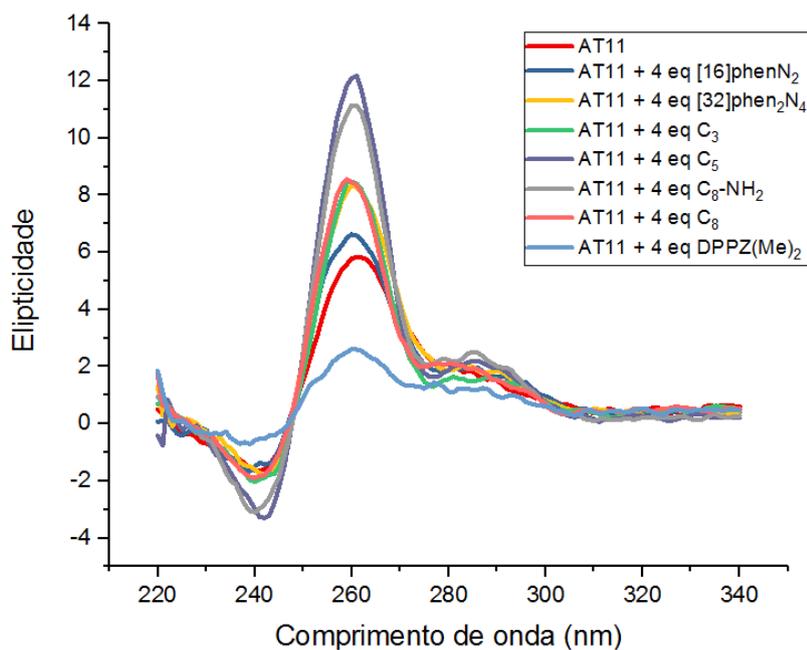


Figura 21. Topologia do G4 AT11 após adição de 4 equivalentes molares de cada ligando

Para avaliar a estabilização do aptamero G4 AT11 pelos ligandos realizaram-se ensaios de desnaturação térmica por dicroísmo circular. Estes espectros foram adquiridos na ausência e na presença de ligando e foram medidas as alterações induzidas nas temperaturas de desnaturação. A desnaturação térmica do aptamero G4 AT11 foi monitorizada no comprimento de onda de máximo de elipticidade, 261nm, em 20 mM de tampão fosfato e 65 mM KCl (pH 7,2) apresentando uma temperatura de desnaturação térmica de 39,15° C.

Após titulações com os vários ligandos, houve um aumento considerável na temperatura de desnaturação térmica do aptamero G4 AT11, cujos resultados se encontram sumarizados na tabela 6.

Tabela 6. Estabilização térmica do aptamero G4 AT11 induzida pelos ligandos medida por ensaios de desnaturação térmica de dicroísmo circular

LIGANDO	$\Delta T_m$ (°C)
	AT11
[16]phenN <sub>2</sub>	18,9
[32]phen <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	18,7
C <sub>3</sub>	13,5
C <sub>5</sub>	16,1
C <sub>8</sub>	23,9
C <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	21,0
DPPZ(Me) <sub>2</sub>	-2,8

Os resultados indicam que todos os ligandos, exceto o DPPZ(Me)<sub>2</sub> estabilizam fortemente a estrutura paralela do aptamero G4 AT11. O derivado de laranja de acridina que promoveu a maior estabilização do aptamero G4 AT11 foi o C<sub>8</sub> com um  $\Delta T_m$  de 23,9°C, e para os derivados de fenantrolinas foi o [16]phenN<sub>2</sub> com um  $\Delta T_m$  de 18,9°C.

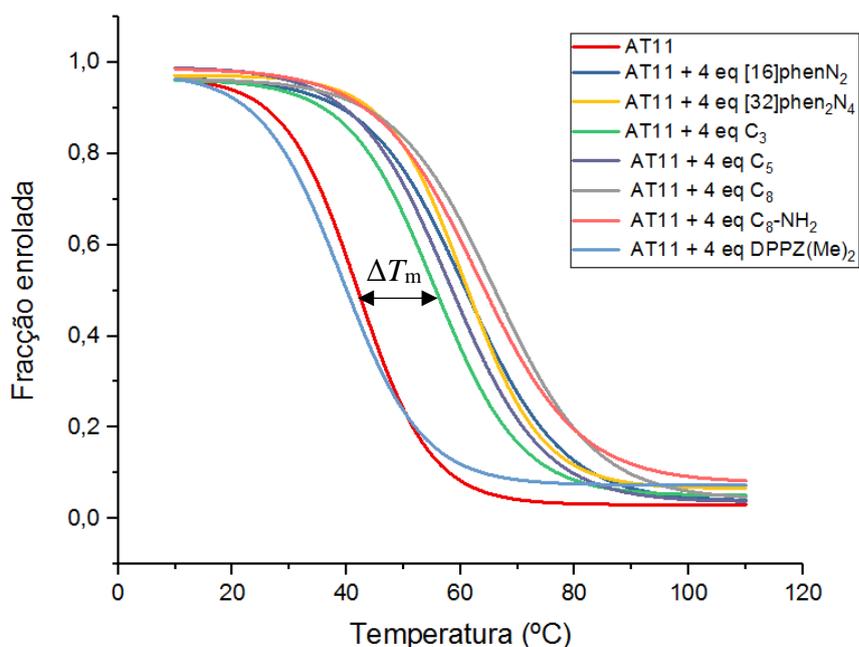


Figura 22. Curvas de desnatuação térmica de AT11 normalizadas na ausência e na presença de 4 equivalente molares de ligando.

Relativamente aos derivados de laranja de acridina, verificou-se que à medida que se aumenta a cadeia lateral de alquilamida (figura 20 (a), (b) e (c)) há um maior grau de estabilização térmica, onde o C<sub>3</sub> apresenta um  $\Delta T_m$  de 13,5°C, o C<sub>5</sub> de 16,1°C e o C<sub>8</sub> de 23,9°C, o que já tinha sido observado na estabilização de outras estruturas de G4.<sup>38</sup> O C<sub>8</sub> e o C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> apresentam o mesmo comprimento de cadeia lateral, contudo, o C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> em vez de um anel benzeno termina com um grupo -NH<sub>2</sub> (figura 20 (d)), o que não influencia muito a estabilização do aptamero G4 AT11 quando comparado com o C<sub>8</sub>, uma vez que apresenta um  $\Delta T_m$  de 21,0°C.

Para os ligandos derivados das fenantrolinas, verificou-se que diferenças estruturais influenciam a estabilidade do AT11 (comparando o [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> e [16]phenN<sub>2</sub> com o DPPZ(Me)<sub>2</sub>). O [32] Phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> é constituído por duas fenantrolinas ligadas por cadeias laterais de poliaminas enquanto o [16]phenN<sub>2</sub> apenas apresenta uma fenantrolina com a cadeia lateral de poliamina<sup>40</sup> (figura 19 (B) e (C)), mas a existência de uma ou duas fenantrolinas não afeta significativamente a estabilização visto que o [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> apresenta um  $\Delta T_m$  de 18,7°C e o [16]phenN<sub>2</sub> um  $\Delta T_m$  de 18,9°C, contudo, o DPPZ(Me)<sub>2</sub>, provoca destabilização na estrutura do aptamero G4 AT11 apresentando um  $\Delta T_m$  de -2,8°C. Neste ligando há uma fenantrolina seguida por dois anéis aromáticos, não havendo cadeia lateral de poliamina e estando os nitrogénios inseridos nos anéis (Figura 19 (A)), e por sua vez incapazes de ajudar na interação com o G4.

Estes dados indicam que tanto os derivados de fenantrolina (exceto DPPZ(Me)<sub>2</sub>) como os de laranja de acridina são bons estabilizadores do aptamero G4 AT11 uma vez que o valor de  $\Delta T_m$  mais baixo foi o do derivado de laranja de acridina C<sub>3</sub>, e mesmo assim apresenta um aumento de 13,5°C na temperatura de desnaturação térmica.

### 4.3 Espectroscopia de diferença térmica (TDS)

A diferença na absorção UV antes e depois da desnaturação térmica de um ácido nucleico fornece um espectro que é usado para distinguir diferentes classes de G4.<sup>48</sup>

De modo a estudar a topologia do aptamero G4 AT11, procederam-se a ensaios de TDS uma vez que os G4 apresentam um espectro de TDS único e pode ser usado como um método simples e altamente informativo para determinação da sua conformação.<sup>15</sup>

A figura 23 mostra os espectros de absorvância UV nas temperaturas acima (90°C) e abaixo (20°C) da temperatura de desnaturação térmica (39,15°C) determinada previamente por ensaios de dicroísmo circular. O espectro de TDS foi obtido através da subtração do espectro de 20°C (estado enrolado) ao de 90°C (estado desnaturado) (Figura 24).

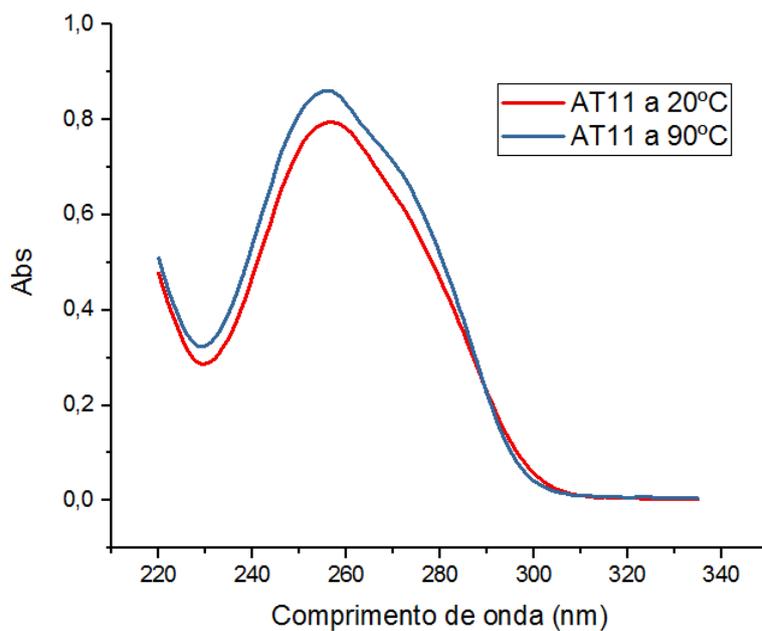


Figura 23. Espectro de absorvância UV do AT11 a 20°C e a 90°C

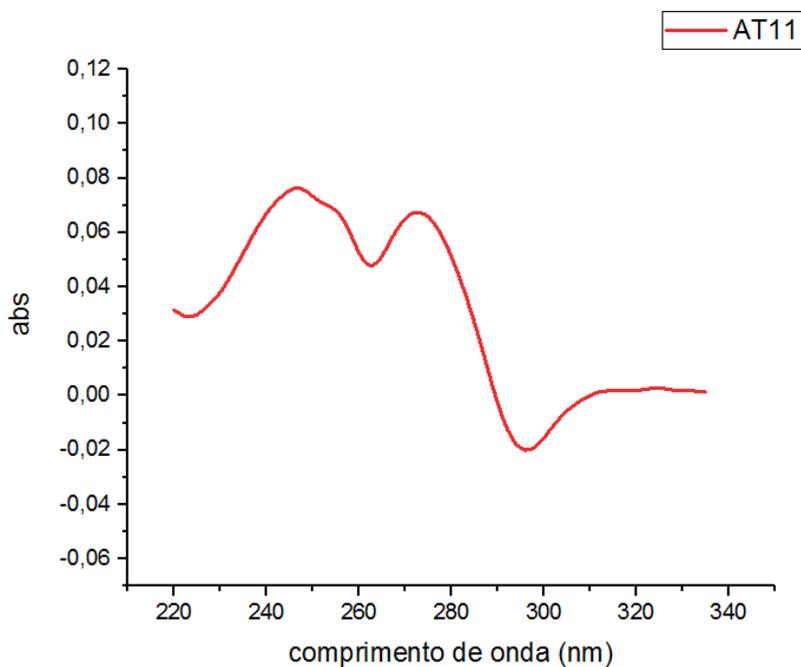


Figura 24. Espectro de TDS para o G4 AT11

Através da análise do espectro de TDS pode-se supor a formação de estrutura G4 uma vez que apresenta sinais característicos da formação de G4, ou seja, bandas positivas perto de 243 e 273 nm e banda negativa por volta dos 295 nm<sup>44,48</sup> (Figura 24). A partir do espectro de TDS, para se determinar a estrutura G4 é necessário considerar dois fatores, sendo eles  $\Delta\text{Abs}(240)/\Delta\text{Abs}(295)$  e a  $\Delta\text{Abs}(255)/\Delta\text{Abs}(295)$ , os quais dependendo dos valores podem apresentar estrutura paralela ou antiparalela de acordo com os dados da tabela 7.

Tabela 7. Valores de referência para caracterização de topologia paralela ou antiparalela de acordo com os fatores de TDS

FATORES TDS	TOPOLOGIA	
	Antiparalela	Paralela
$\frac{\Delta\text{Abs}(240)}{\Delta\text{Abs}(295)}$	< 2	> 4
$\frac{\Delta\text{Abs}(255)}{\Delta\text{Abs}(295)}$	< 1,5	> 3,5

Tabela 8. Valores da variação da absorvência obtidos para aptamero G4 AT11

$\Delta$ ABSORVÂNCIA	AT11
$\Delta$ Abs 240 nm	0,067749
$\Delta$ Abs 255 nm	0,068616
$\Delta$ Abs 295 nm	-0,02006

De acordo com os valores obtidos apresentados na tabela 8 calcularam-se os fatores de TDS para se poder determinar a topologia do aptamero G4 AT11. O fator TDS  $\Delta\text{Abs}(240)/\Delta\text{Abs}(295)$  foi de 3,37 e o  $\Delta\text{Abs}(255)/\Delta\text{Abs}(295)$  de 3,42 (Tabela 9). Os valores obtidos não permitiram concluir que se trata de uma estrutura paralela, contudo, os valores estão muito próximos dos que determinam essa topologia e de acordo com os resultados obtidos por dicroísmo circular, no qual se obteve uma banda positiva a 260 e uma negativa a 240 conclui-se que o aptamero G4 AT11 apresenta uma estrutura paralela.

Tabela 9. Valores determinados dos fatores TDS

Fatores TDS	AT11
$\frac{\Delta\text{Abs}(240)}{\Delta\text{Abs}(295)}$	3,38
$\frac{\Delta\text{Abs}(255)}{\Delta\text{Abs}(295)}$	3,42

#### 4.4 Espectroscopia de Fluorescência

Os ensaios de espectroscopia de fluorescência foram usados para determinar a afinidade entre os ligandos e o aptamero G4 AT11 através do cálculo das constantes de dissociação do ligando- G4 AT11.<sup>40</sup>

Os ligandos derivados de fenantrolinas, após excitação a 271 nm, emitem fluorescência numa banda larga entre aproximadamente 375 nm e 550 nm, apresentando um máximo de emissão de fluorescência a 467 nm para o [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> e 466 nm para o [16]phenN<sub>2</sub>. Nestes ligandos, após adição de concentrações crescentes do aptamero G4 AT11 (com *annealing* previamente feito em 30 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 100 mM de KCl) há uma diminuição acentuada da intensidade de fluorescência no espectro de emissão (Figuras 25 e 27).

As curvas das titulações foram ajustadas à equação HILL permitindo determinar as constantes de dissociação dos ligandos derivados de fenantrolinas-G4 AT11 (Figuras 26 e 28), cujos valores se encontram sumarizados na tabela 10.

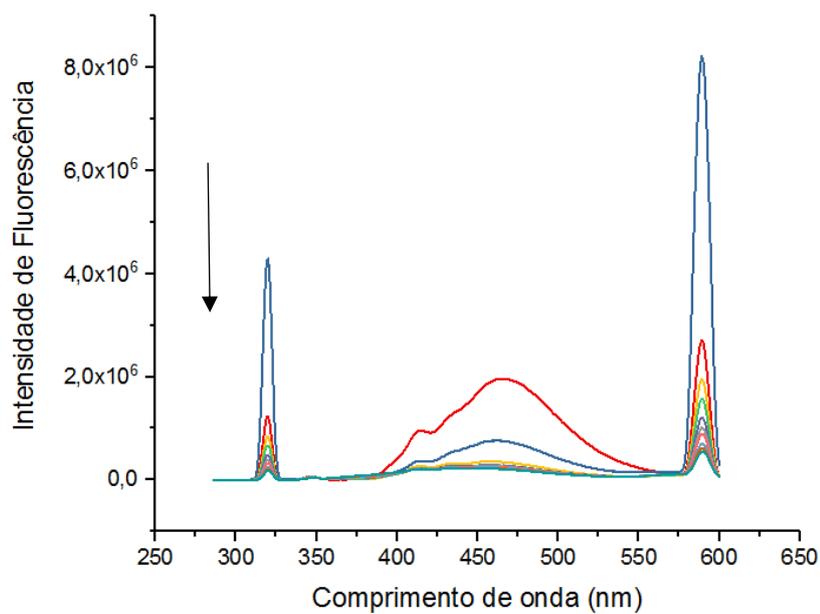


Figura 25. Espectro de emissão de fluorescência de [16]phenN<sub>2</sub> com concentrações crescentes do aptamero G4 AT11

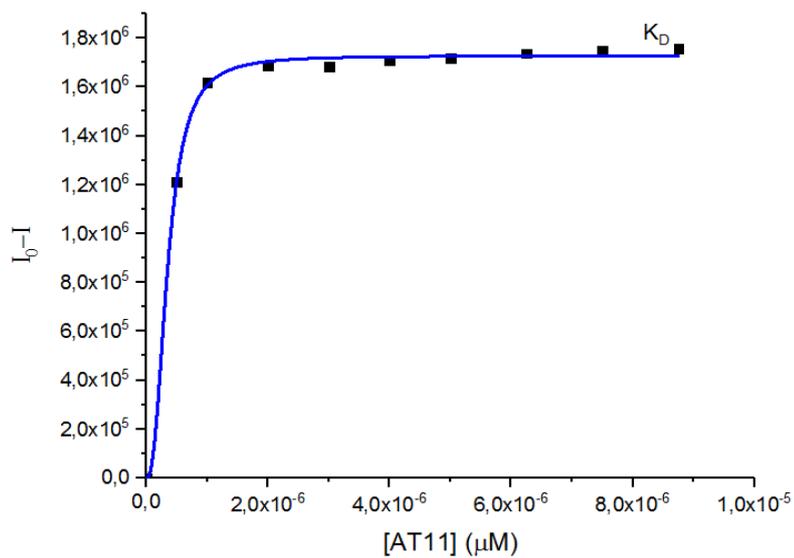


Figura 26. Constante de dissociação aparente ajustada à equação Hill para o [16]phenN<sub>2</sub>

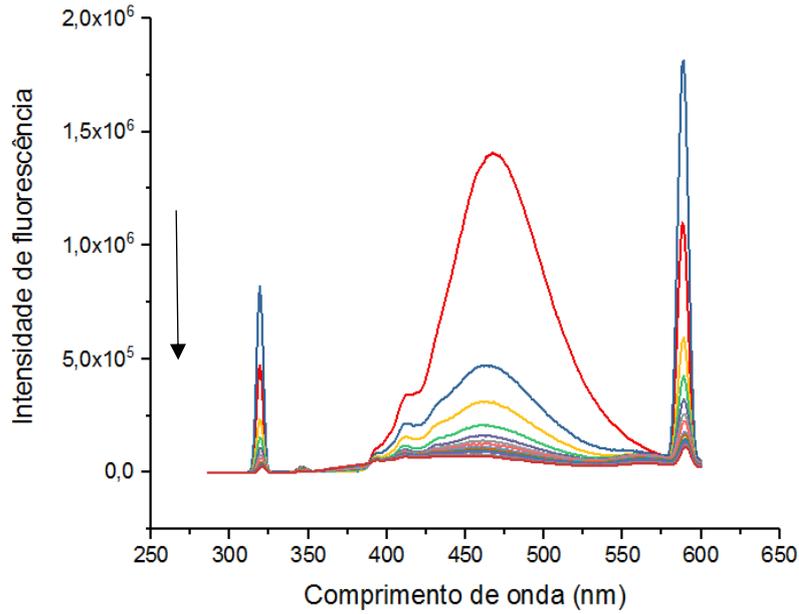


Figura 27. Espectro de emissão de fluorescência de [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> com concentrações crescentes do aptamero G4 AT11

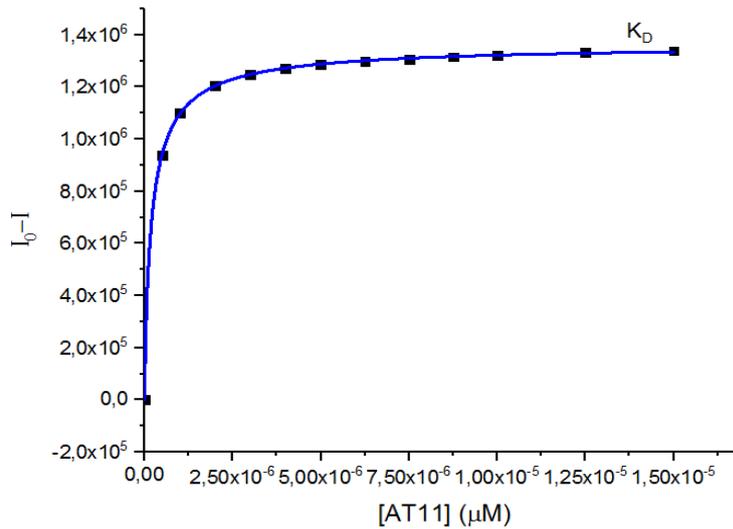


Figura 28. Constante de dissociação aparente ajustada à equação Hill para o [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub>

Os ligandos derivados de laranja de acridina, excitaram-se a 498 nm e estes emitiram fluorescência numa banda larga entre 540 nm e 640 nm, apresentando um máximo de emissão de fluorescência a 570 nm para o C<sub>3</sub>, 544 nm para o C<sub>5</sub> e 569 nm para o C<sub>8</sub> e C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub>. Nestes ligandos, ao contrário do que acontecia nos derivados de fenantrolinas, após titulações com

concentrações crescentes do aptamero G4 AT11, apresentam um aumento significativo na intensidade de fluorescência nos espectros de emissão (Figuras 29, 31, 33 e 35). Mais uma vez, as curvas das titulações foram ajustadas à equação Hill para determinação das constantes de dissociação dos ligandos derivados de laranja de acridina-G4 AT11 (Figuras 30, 32, 34 e 36). Os valores encontram-se resumidos na tabela 10.

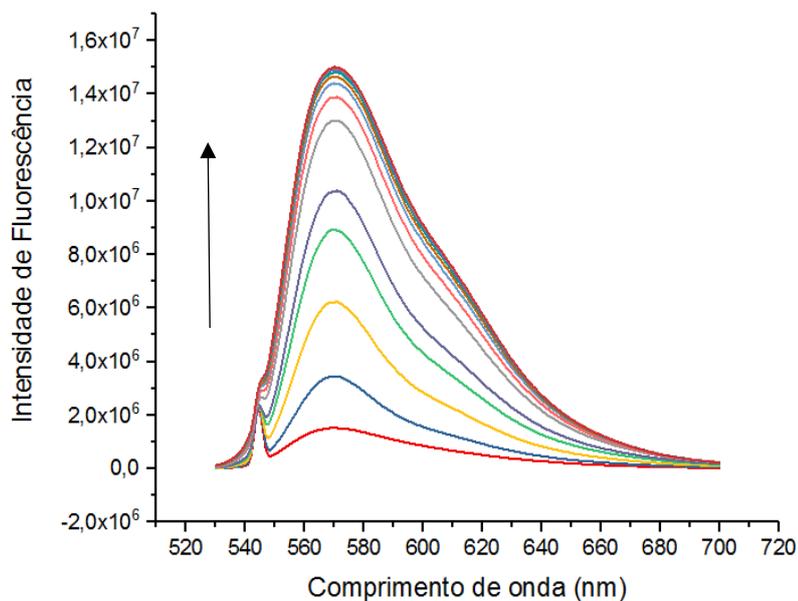


Figura 29. Espectro de emissão de fluorescência de  $C_3$  com concentrações crescentes do aptamero G4 AT11

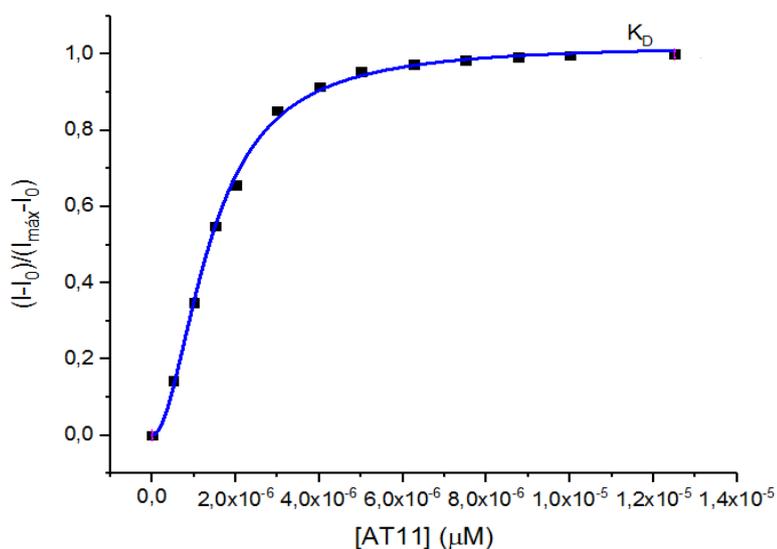


Figura 30. Constante de dissociação aparente ajustada à equação Hill para  $C_3$

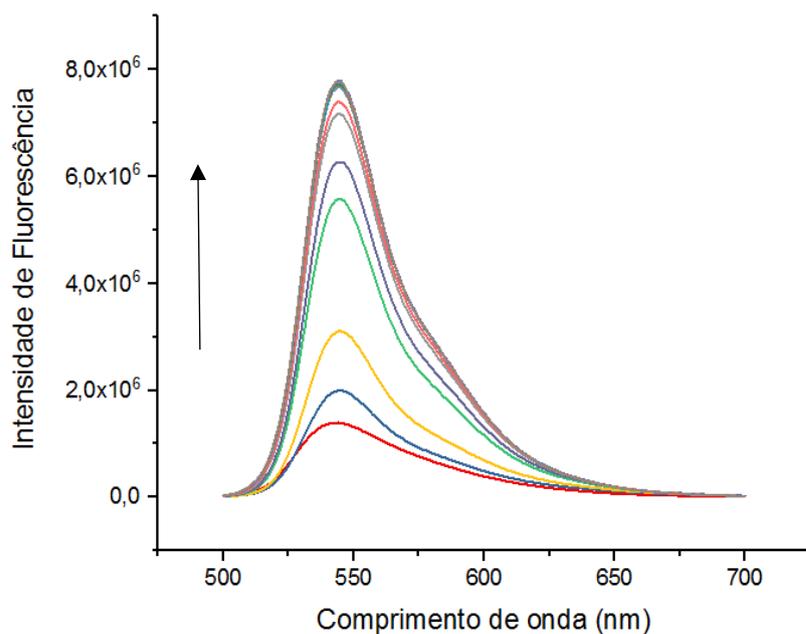


Figura 31. Espectro de emissão de fluorescência de C<sub>5</sub> com concentrações crescentes do aptamero G4 AT11

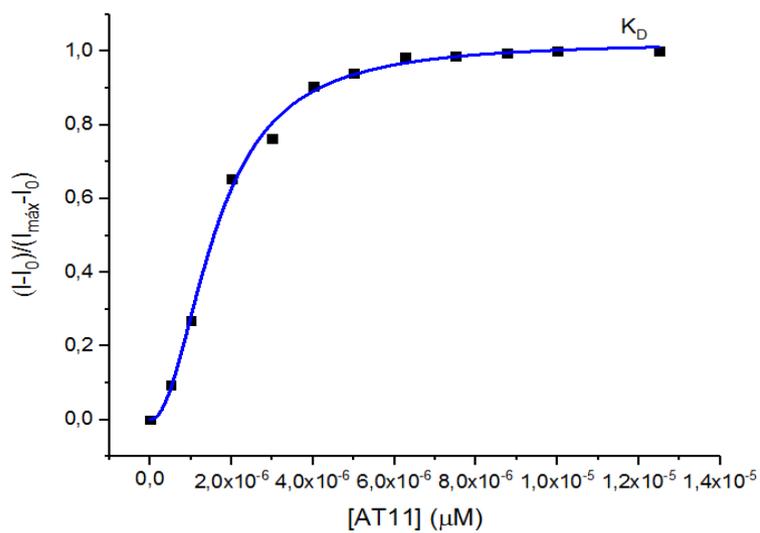


Figura 32. Constante de dissociação aparente ajustada à equação Hill para C<sub>5</sub>

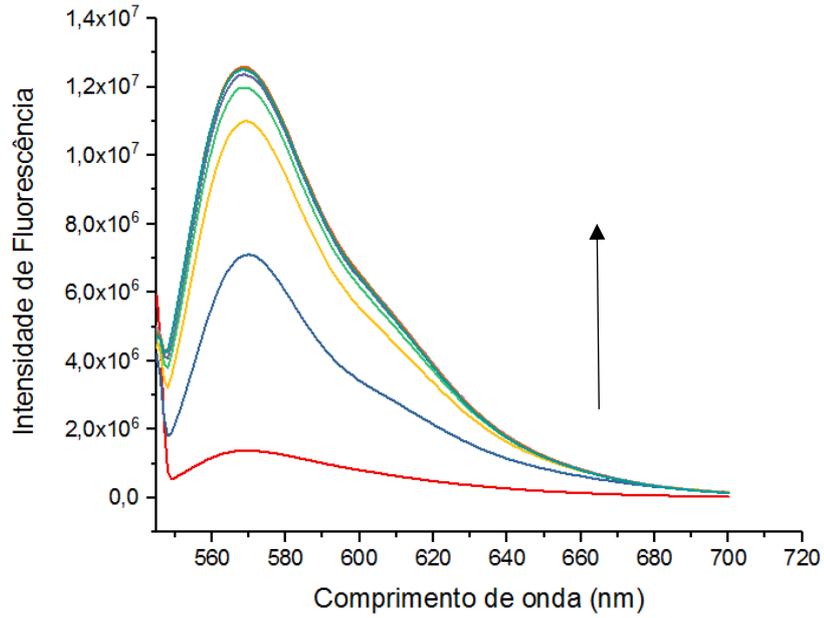


Figura 33. Espectro de emissão de fluorescência de C<sub>8</sub> com concentrações crescentes do aptamero G4 AT11

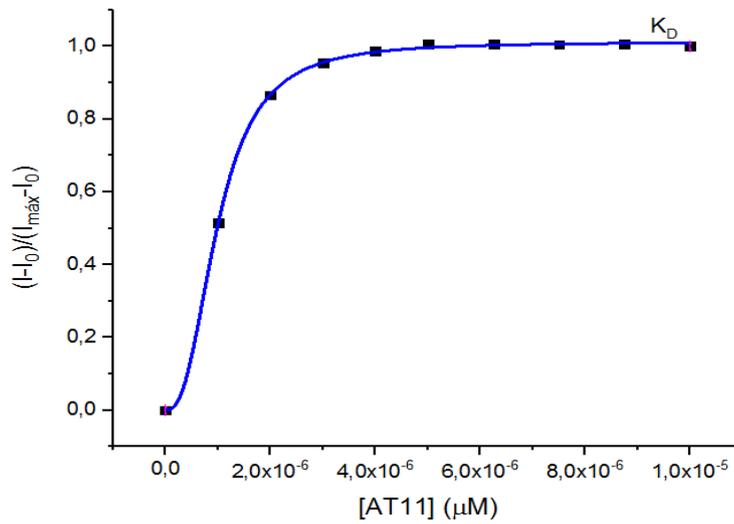


Figura 34. Constante de dissociação aparente ajustada à equação Hill para C<sub>8</sub>

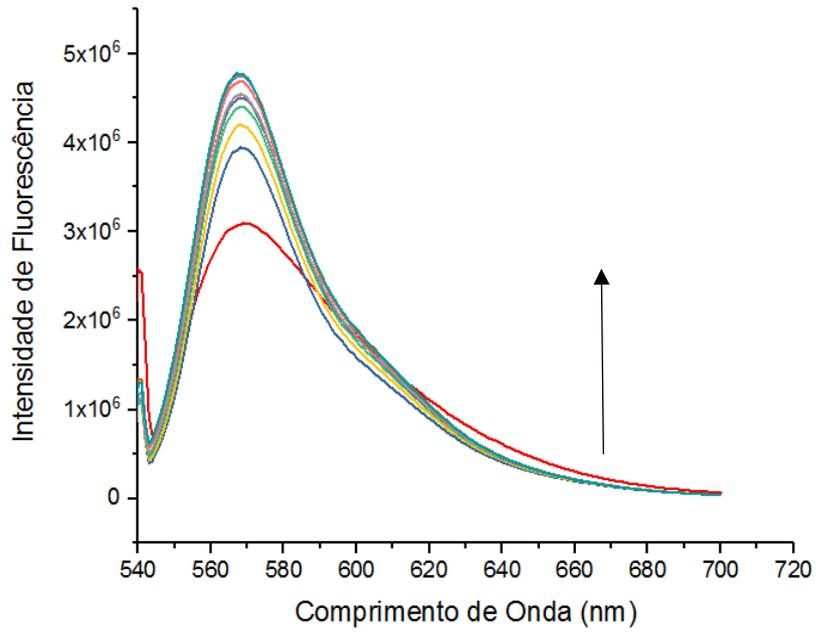


Figura 35. Espectro de emissão de fluorescência de  $C_8-NH_2$  com concentrações crescentes do aptamero G4 AT11

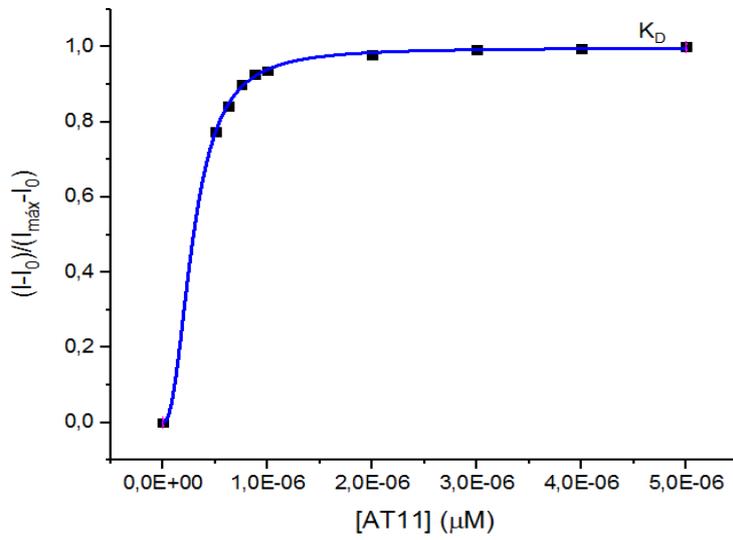


Figura 36. Constante de dissociação aparente ajustada à equação Hill para  $C_8-NH_2$

Tabela 10. Constantes de dissociação de equilíbrio do aptamero G4 AT11 com os ligandos, obtidas por titulações de fluorescência dos ligandos

LIGANDO	$K_D(M^{-1})$
	AT11
[16]phenN <sub>2</sub>	$3,53 \times 10^{-7}$
[32]phen <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	$2,01 \times 10^{-7}$
C <sub>3</sub>	$1,40 \times 10^{-6}$
C <sub>5</sub>	$1,60 \times 10^{-6}$
C <sub>8</sub>	$9,90 \times 10^{-7}$
C <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	$2,90 \times 10^{-7}$

Todos os complexos apresentam uma afinidade moderada a alta, uma vez que um valor mais baixo de  $K_D$  corresponde a uma maior afinidade do ligando pelo G4 AT11.<sup>49</sup>

Para os ligandos derivados de fenantrolinas, o ligando com maior afinidade para o aptamero G4 AT11 é o [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub>, uma vez que apresenta um valor de  $K_D$  de  $2,01 \times 10^{-7} M^{-1}$ . Relativamente aos derivados de laranja de acridina, o que apresenta uma maior afinidade é o C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> com um  $K_D$  de  $2,90 \times 10^{-7} M^{-1}$ .

Avaliando a estrutura dos ligandos com a afinidade, nota-se que para os derivados de fenantrolina, a inserção de mais uma unidade aromática no macrociclo ([32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> comparativamente ao [16]phenN<sub>2</sub>) não altera significativamente a afinidade para o aptamero G4 AT11, uma vez que o [16]phenN<sub>2</sub> também apresenta um valor de afinidade moderada alta, com um  $K_D$  de  $3,53 \times 10^{-7} M^{-1}$ . Por sua vez, os derivados de laranja de acridina, apresentam variações nas constantes de afinidade consoante a estrutura. Um aumento na cadeia lateral de alquilamida promove um aumento da constante de associação para ligando-G4 AT11. Assim, os ligandos C<sub>3</sub> e C<sub>5</sub> apresentam uma afinidade moderada, com um  $K_D$  de  $1,40 \times 10^{-6} M^{-1}$  e  $1,60 \times 10^{-6} M^{-1}$ , respetivamente, e o C<sub>8</sub> e C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> uma afinidade moderada alta, apresentando um  $K_D$  de  $9,90 \times 10^{-7} M^{-1}$  e  $2,90 \times 10^{-7} M^{-1}$ , respetivamente.

Correlacionando os resultados obtidos na espectroscopia de fluorescência com os de espectroscopia de dicroísmo circular, conclui-se que os ligandos que apresentam uma afinidade mais elevada são: [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub>, [16]phenN<sub>2</sub>, C<sub>8</sub> e C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub>, os quais, por sua vez, também apresentam uma maior estabilização térmica do aptamero G4 AT11.

## 4.5 Ensaio de viabilidade celular

De modo a avaliar o efeito do aptamero de G4 AT11, dos ligandos e complexos na proliferação celular, realizaram-se ensaios colorimétricos quantitativos baseados na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em linhas celulares do cancro do colo do útero (HeLa) e em fibroblastos da derme humana normais (NHDF). Nesta técnica, a quantidade de MTT reduzido pelas células a cristais de formazano foi quantificada espectroscopicamente a 570 nm, uma vez que é equivalente ao número de células viáveis.<sup>50</sup>

Ao contrário dos agentes quimioterápicos, o AS1411 não causa citotoxicidade imediata quando adicionado às células, em vez disso, a citotoxicidade acontece como resultado da inibição da divisão celular e a indução da morte celular ocorre apenas após exposição prolongada ao AS1411 (2 a 4 dias, dependendo da linha celular). Assim, para vários estudos foi escolhida uma exposição contínua de AS1411 durante 4 a 7 dias.<sup>21</sup> Deste modo, como o aptamero G4 AT11 é um derivado do G4 AS1411, as duas linhas celulares em estudo foram expostas a 15  $\mu$ M de aptamero G4 AT11 (figura 37) e a diferentes concentrações de ligandos durante 7 dias a 37°C e com uma percentagem de CO<sub>2</sub> de 5%.

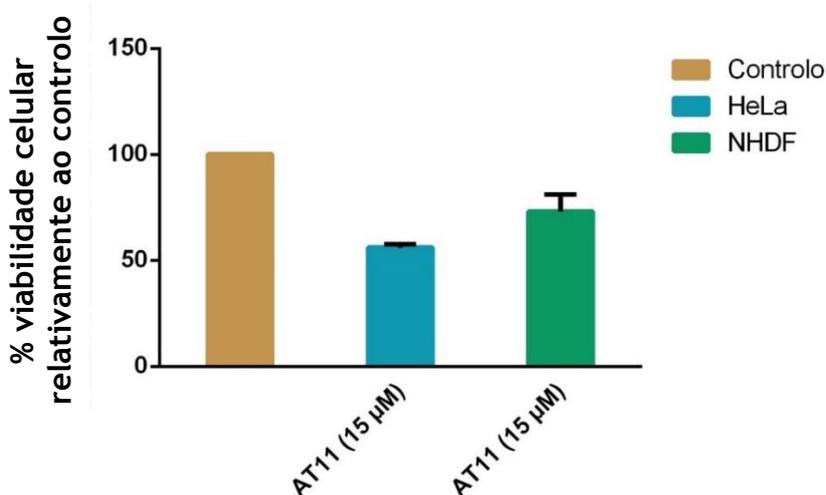


Figura 37. Percentagem de viabilidade celular em HeLa e NHDF após 7 dias de incubação com 15 $\mu$ M de aptamero de G4 AT11

Os ligandos foram estudados com diferentes concentrações de modo a determinar os valores de IC<sub>50</sub> para cada um nas duas linhas celulares (figuras 38-52), permitindo posteriormente o estudo dos complexos G4 AT11-ligandos.

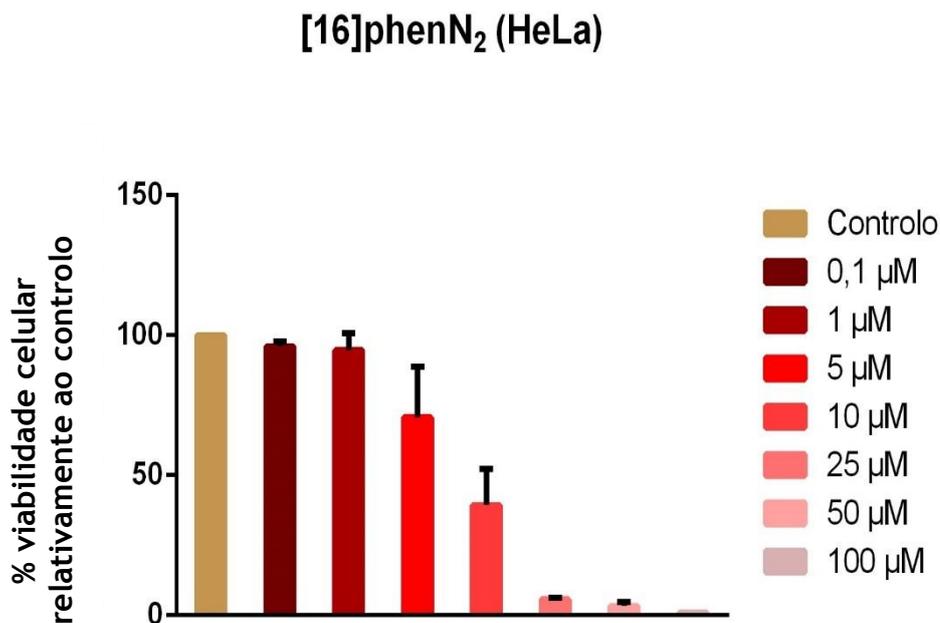


Figura 38. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de [16]phenN<sub>2</sub> em células HeLa

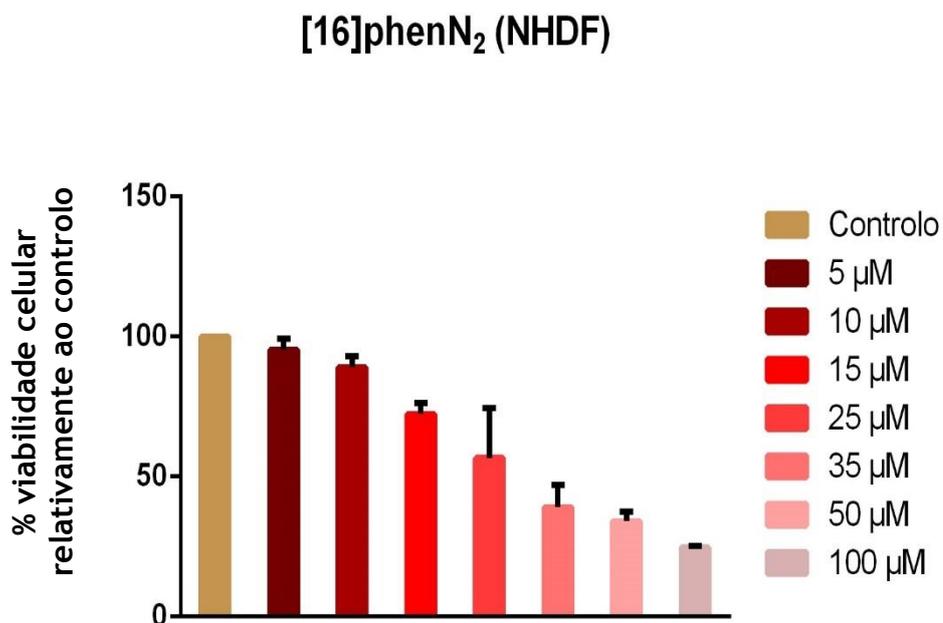


Figura 39. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de [16]phenN<sub>2</sub> em células NHDF

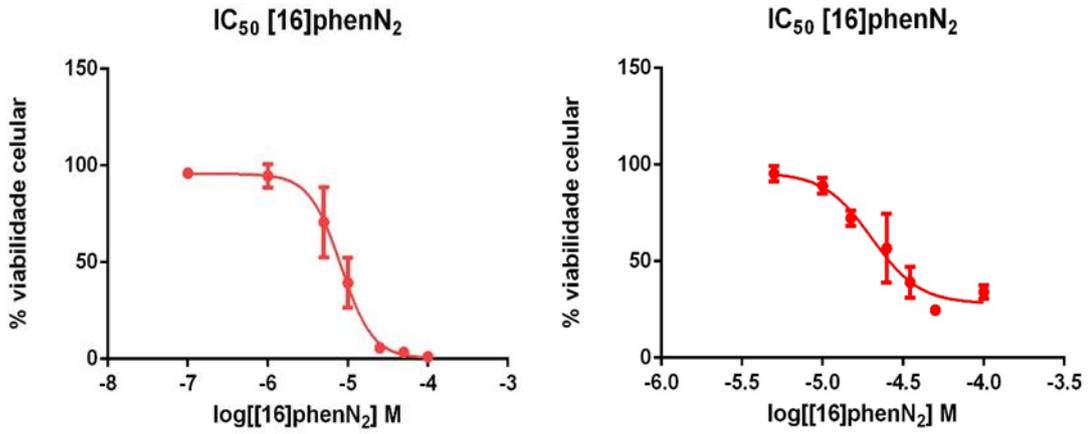


Figura 40. IC<sub>50</sub> determinado para [16]phenN<sub>2</sub> para HeLa (esquerda) e NHDF (direita)

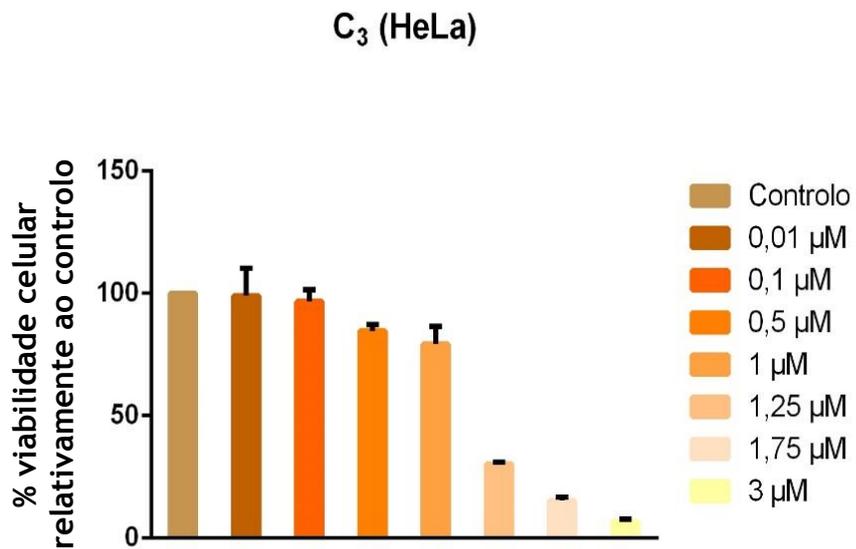


Figura 41. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C<sub>3</sub> em células HeLa

### C<sub>3</sub> (NHDF)

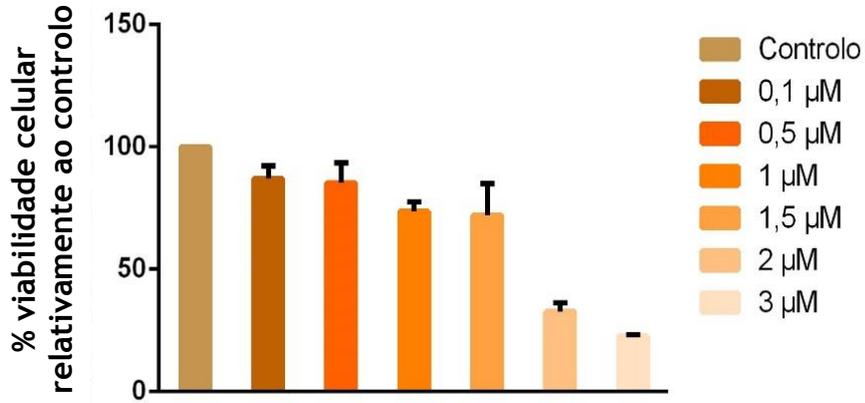


Figura 42. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C<sub>3</sub> em células NHDF

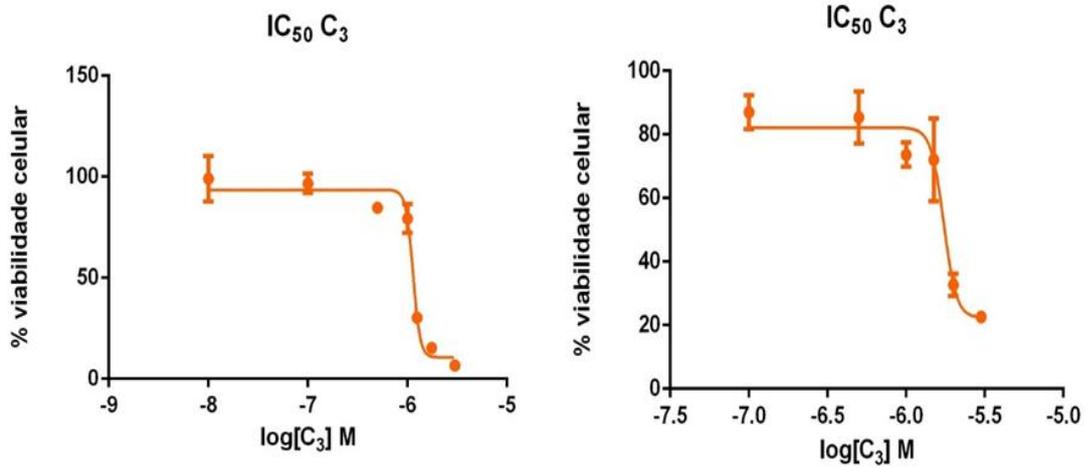


Figura 43. IC<sub>50</sub> determinado para C<sub>3</sub> para HeLa (esquerda) e NHDF (direita)

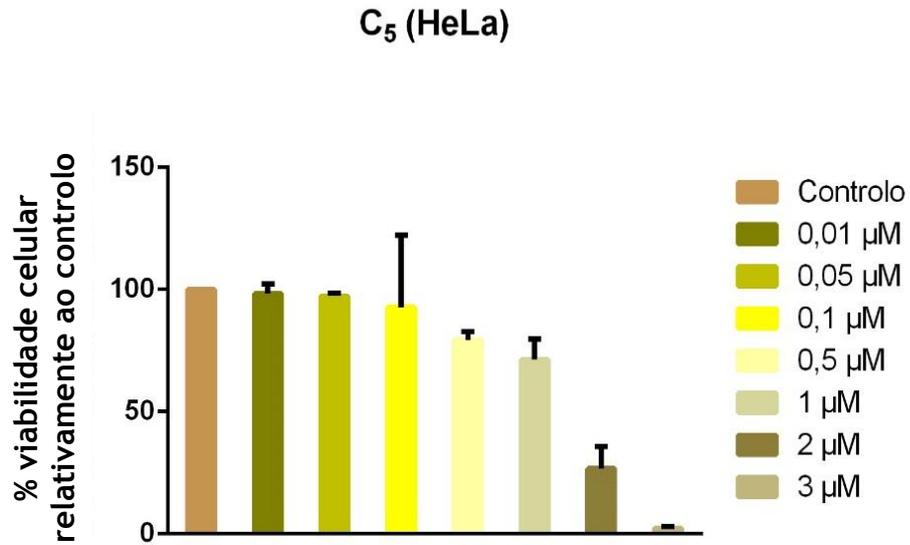


Figura 44. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C<sub>5</sub> em células HeLa

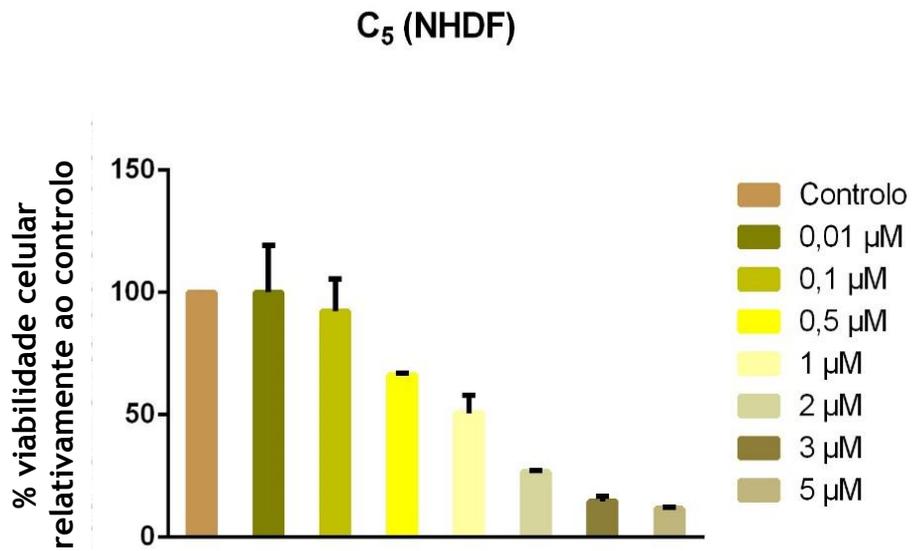


Figura 45. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C<sub>5</sub> em células NHDF

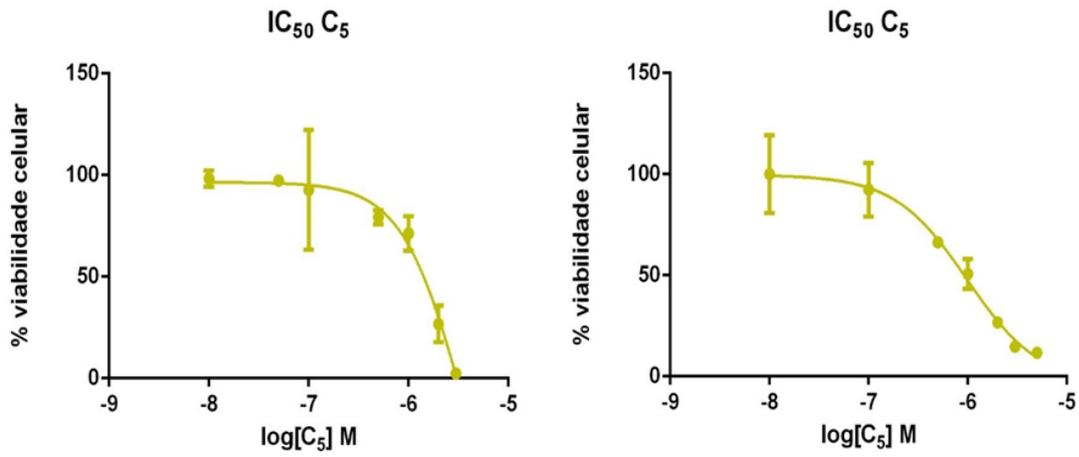


Figura 46. IC<sub>50</sub> determinado para C<sub>5</sub> para HeLa (esquerda) e para NHDF (direita)

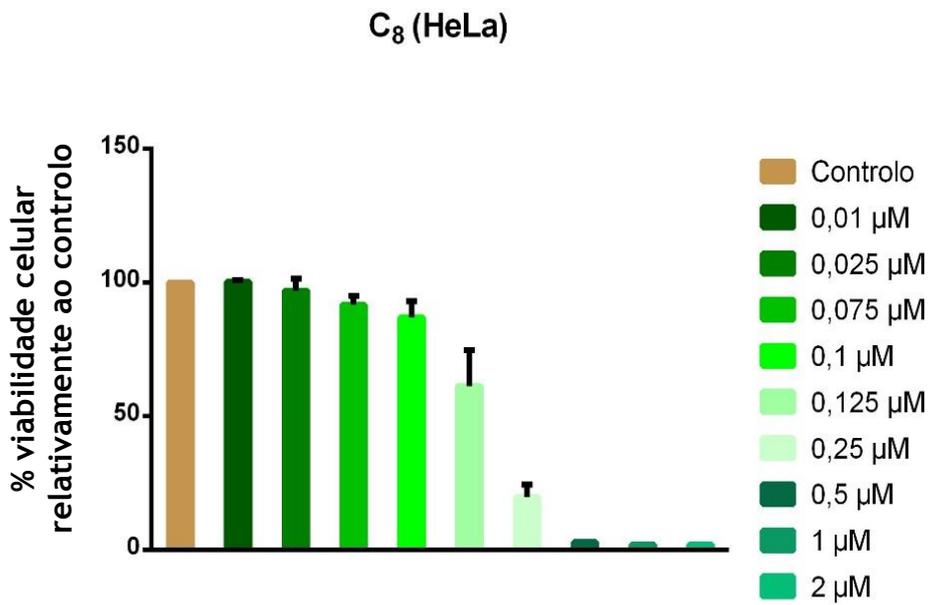


Figura 47. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C<sub>8</sub> em células HeLa

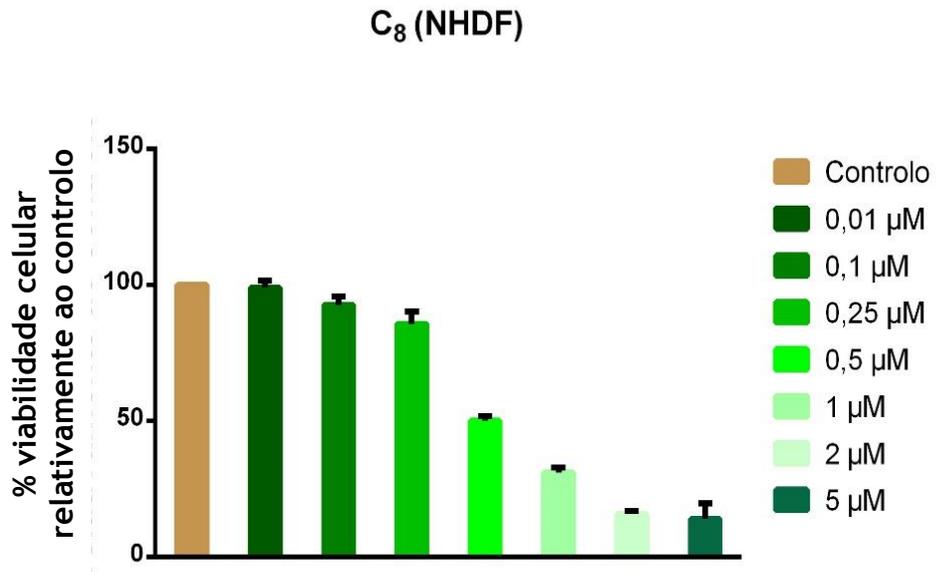


Figura 48. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C<sub>8</sub> em células NHDF

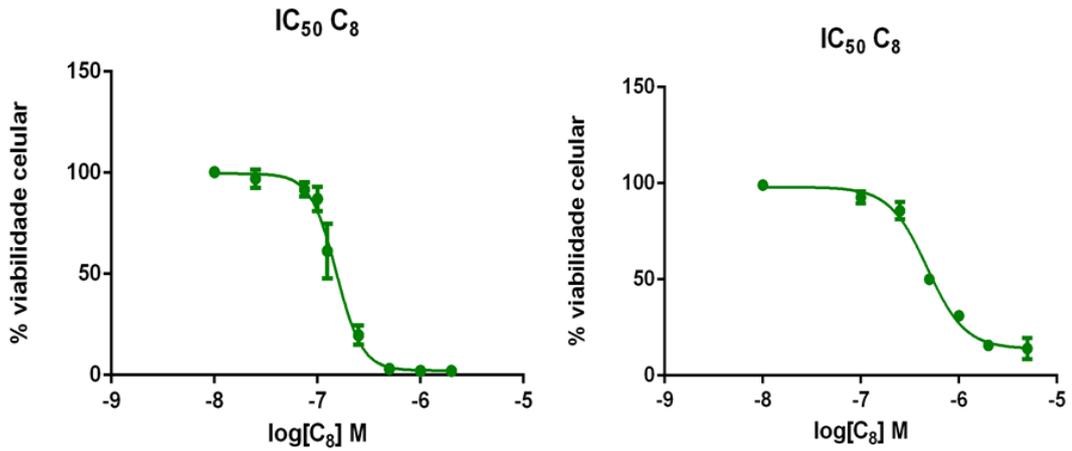


Figura 49. IC<sub>50</sub> determinado para C<sub>8</sub> para HeLa (esquerda) e para NHDF (direita)

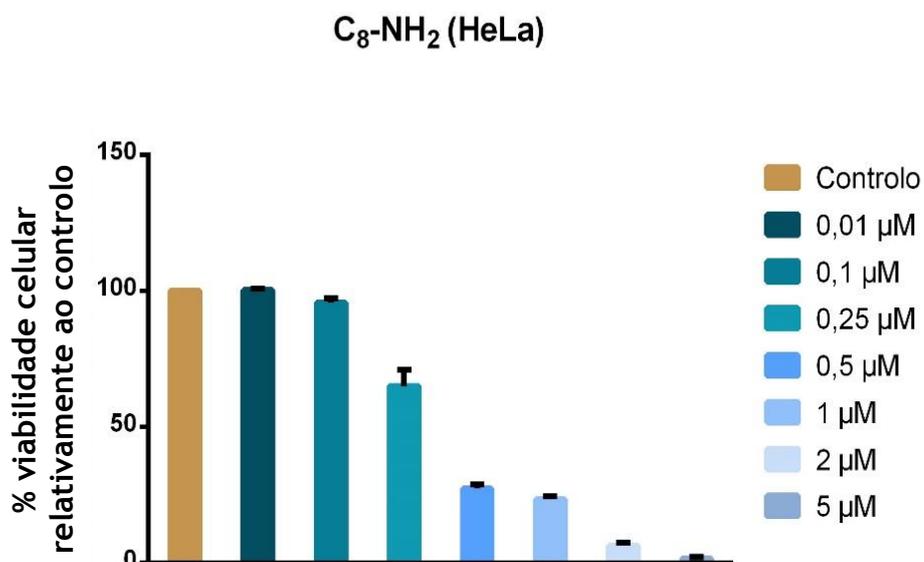


Figura 50. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> em células HeLa

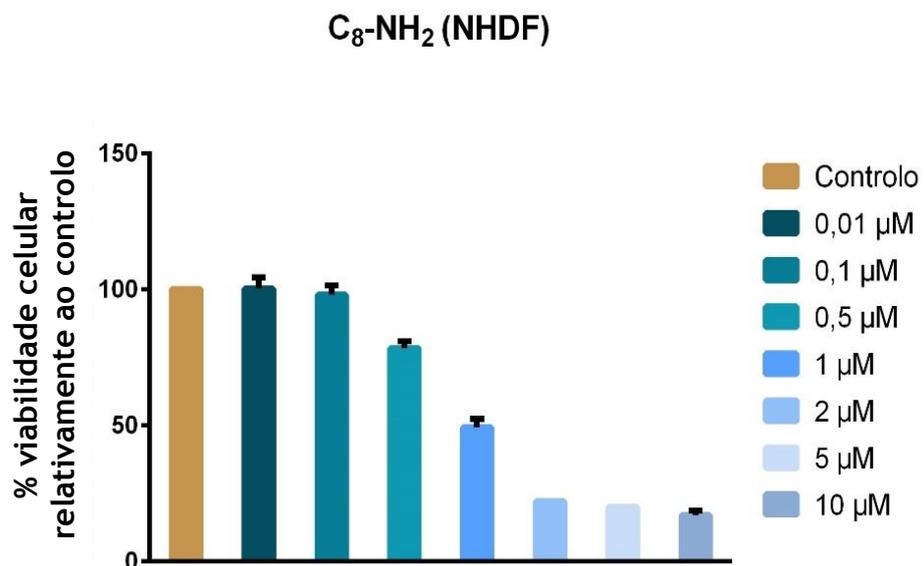


Figura 51. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> em células NHDF

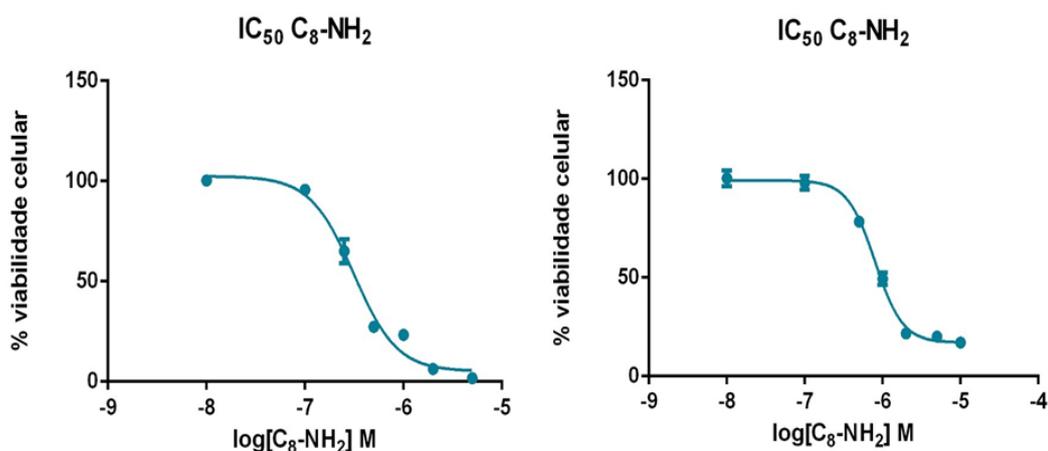


Figura 52. IC<sub>50</sub> determinado para C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> para HeLa (esquerda) e para NHDF (direita)

Os valores de IC<sub>50</sub> para o ligando derivado de fenantrolinas ([16]phenN<sub>2</sub>) e para os derivados de laranja de acridina nas duas linhas celulares encontram-se sumariados na tabela 11.

Tabela 11. Valores de IC<sub>50</sub> determinados para cada ligando e nas duas linhas celulares

LIGANDO	IC <sub>50</sub>	
	HeLa (μM)	NHDF (μM)
[16]phenN <sub>2</sub>	8,23	20,20
C <sub>3</sub>	1,14	1,73
C <sub>5</sub>	3,51	0,99
C <sub>8</sub>	0,15	0,48
C <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>	0,31	0,80

Com base nos valores determinados de IC<sub>50</sub> para as HeLa, os ligandos apresentam uma citotoxicidade elevada uma vez que os IC<sub>50</sub> estão na ordem dos micromolares (<3.6 μM para os derivados de laranja de acridina e <8.3 μM para o [16]phenN<sub>2</sub>). Os ligandos mais citotóxicos são o C<sub>8</sub> e C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> apresentando um valor de IC<sub>50</sub> de 0.15 μM e 0.31 μM, respetivamente. De acordo com estes valores, e para a formação dos complexos nesta linha celular, escolheram-se

concentrações inferiores às do IC<sub>50</sub> de modo a que a viabilidade celular do ligando livre fosse igual ou superior a 75% (tabela 12).

Para a linha celular NHDF os ligandos continuam a apresentar uma citotoxicidade elevada visto que os valores de IC<sub>50</sub> continuam na gama dos micromolares (<1.8 μM para os derivados de laranja de acridina e <20.3 μM para o [16]phenN<sub>2</sub>). Nesta linha celular, os ligandos mais citotóxicos continuam a ser o C<sub>8</sub> e C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> seguidos do C<sub>5</sub>, apresentando valores de IC<sub>50</sub> de 0.48 μM, 0.80 μM e 0.99 μM, respetivamente. De acordo com estes resultados, nesta linha celular escolheram-se concentrações superiores aos valores de IC<sub>50</sub> de modo a que a viabilidade celular do ligando fosse igual ou inferior a 50% (tabela 12).

As concentrações usadas para cada ligando nas duas linhas celulares encontram-se resumidas na tabela 12.

Tabela 12. Concentrações de ligandos usados na incubação dos ligandos e formação de complexos G4 AT11-ligando

HeLa				
[32] Phen <sub>2</sub> N <sub>4</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>
10 μM	1 μM	1 μM	0.125 μM	0.25 μM
NHDF				
[16] PhenN <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>8</sub> -NH <sub>2</sub>
10 μM	2 μM	2 μM	1 μM	2 μM

Determinadas as concentrações de ligando, procedeu-se ao estudo dos complexos aptamero G4 AT11-ligando durante 7 dias a 37 °C e com 5% de CO<sub>2</sub>. Para o aptamero G4 AT11 a concentração usada foi sempre de 15 μM. Os resultados obtidos para os complexos encontram-se expressos nas figuras 53 e 54.

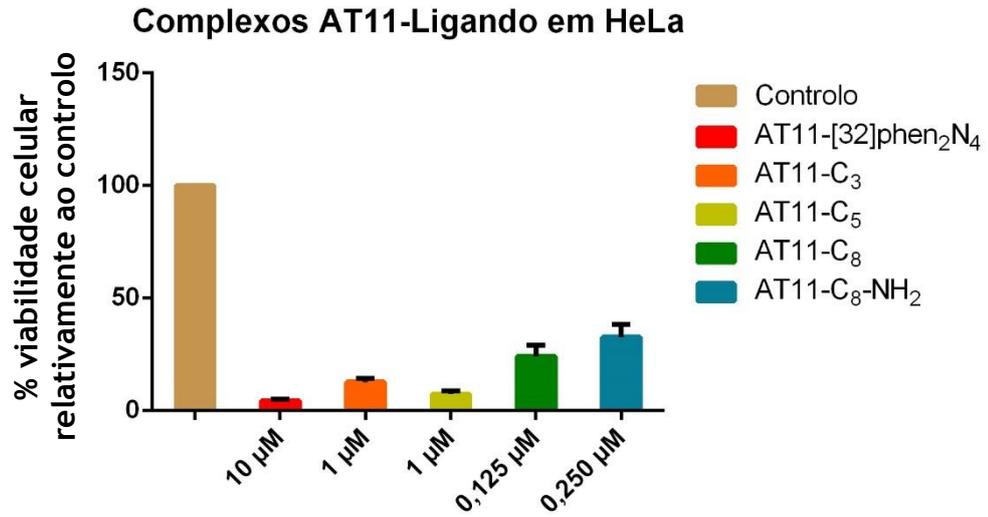


Figura 53. Percentagem de viabilidade celular dos complexos aptamero G4 AT11-ligando na linha celular HeLa

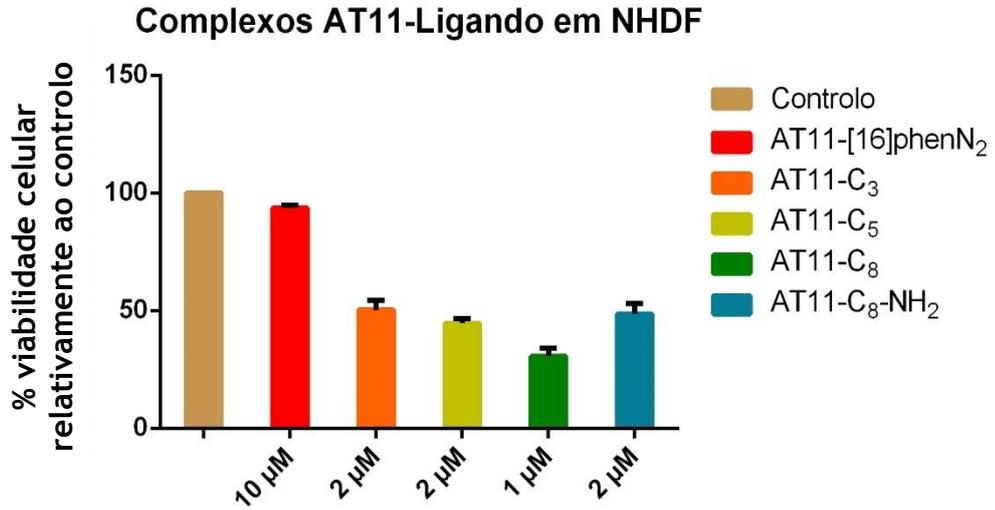


Figura 54. Percentagem de viabilidade celular dos complexos aptamero G4 AT11-ligando na linha celular NHDF

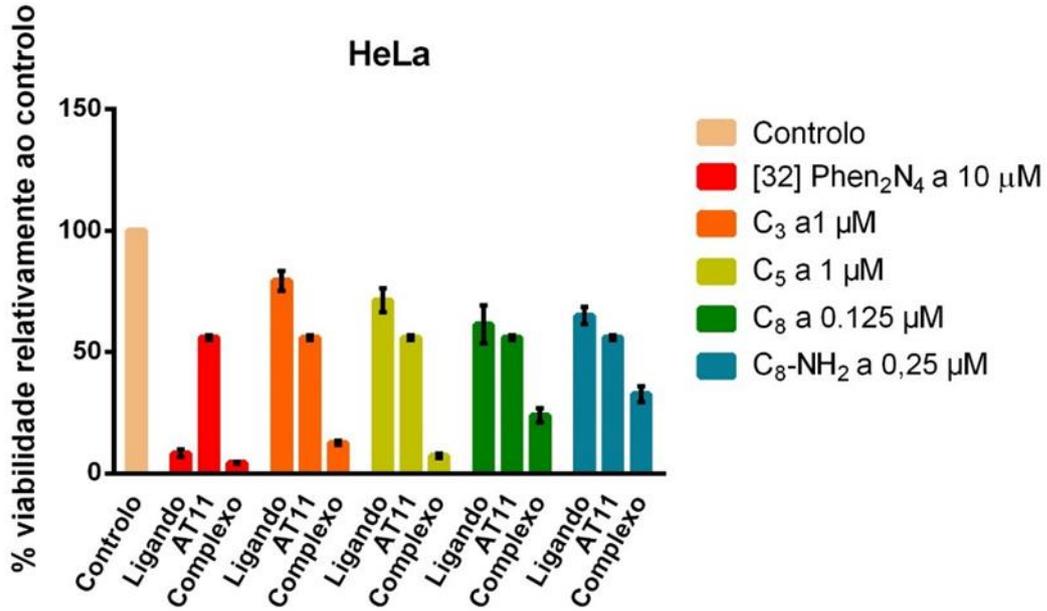


Figura 55. Viabilidade celular relativa a HeLa medida através do ensaio de MTT ao fim de 7 dias de incubação. Barras representam o valor +/- SEM de viabilidade celular relativamente ao controlo (sem ligando)

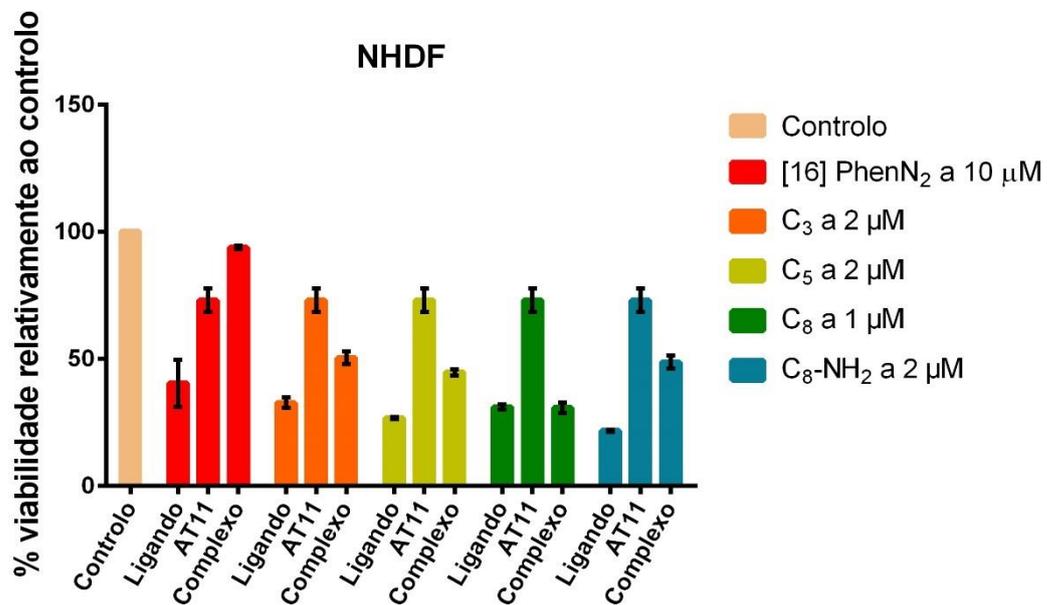


Figura 56. Viabilidade celular relativa a NHDF medida através do ensaio de MTT ao fim de 7 dias de incubação. Barras representam o valor +/- SEM de viabilidade celular relativamente ao controlo (sem ligando)

Através da análise dos resultados expressos nas figuras 55 e 56, conclui-se que nas células HeLa a formação do complexo promove uma diminuição acentuada da viabilidade celular comparativamente ao aptamero G4 AT11 e ligando livres. Nas células NHDF, tal como era pretendido, acontece o oposto, a formação do complexo aptamero G4 AT11-ligando promove um aumento da viabilidade celular relativamente ao ligando livre, contudo, apenas o complexo aptamero G4 AT11-[16]phenN<sub>2</sub> apresenta uma viabilidade celular superior à do aptamero G4 AT11 livre.

Perante os resultados obtidos para o estudo da viabilidade celular, observou-se que todos os compostos apresentavam algum efeito na proliferação celular nas duas linhas em estudo.

Relativamente aos valores de IC<sub>50</sub> para os derivados de laranja de acridina observou-se que estes variavam à medida que a cadeia lateral de alquilamida aumenta. Tal como nas outras técnicas, o aumento da cadeia lateral parece ser importante para a atividade do ligando, existindo relação entre o elevado grau de estabilização, afinidade, citotoxicidade e tamanho da cadeia lateral.<sup>38</sup>

Para além dos derivados de laranja de acridina e dos derivados de fenantrolinas estudados ao longo do trabalho, nesta técnica testou-se um composto intermediário sintetizado, DPPZ(Me)<sub>2</sub>, uma vez que os compostos finais não se encontravam puros e os seus rendimentos eram demasiado baixos. Incubou-se o DPPZ(Me)<sub>2</sub> nas duas linhas celulares de modo a avaliar a sua citotoxicidade e os resultados obtidos encontram-se expressos nas figuras 57 e 58.

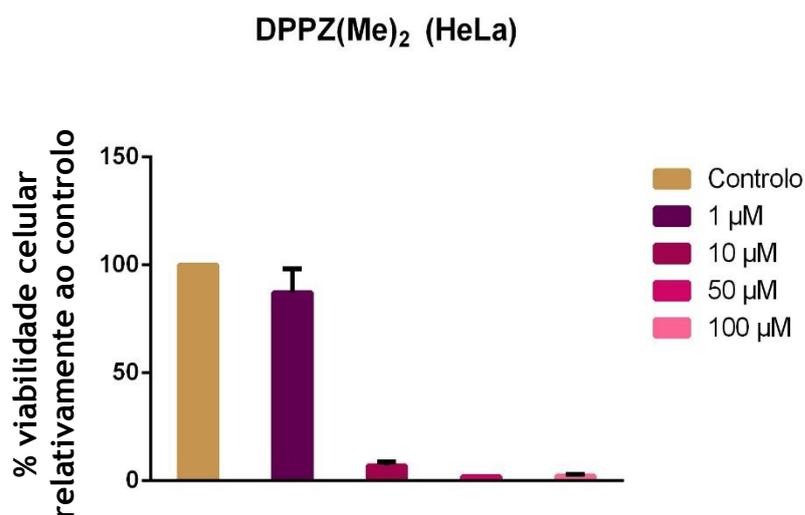


Figura 57. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de DPPZ(Me)<sub>2</sub> em células HeLa

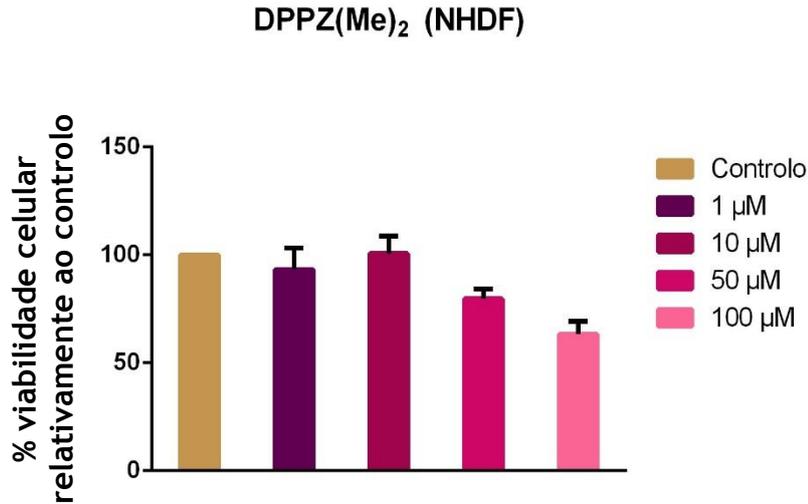


Figura 58. Percentagem de viabilidade celular para diferentes concentrações de DPPZ(Me)<sub>2</sub> em células NHDF

Relativamente aos dados obtidos, nota-se que o DPPZ(Me)<sub>2</sub> é citotóxico para as células HeLa promovendo uma morte celular acentuada quando há incubação de 10 µM deste. Nas células NHDF verifica-se o contrário, apresentando uma viabilidade celular superior a 50% após incubação com 100 µM de DPPZ(Me)<sub>2</sub> durante 7 dias.

O DPPZ(Me)<sub>2</sub> apresenta resultados de citotoxicidade promissores, porém, não se prosseguiu com o seu estudo uma vez que este promove uma destabilização no aptamero G4 AT11.

## 4.6 Microscopia de fluorescência confocal

Os ensaios de microscopia de fluorescência confocal foram realizados para avaliar a localização intracelular do aptamero G4 AT11, ligandos e a formação do complexo G4 AT11-ligando em células HeLa.

Através da fluorescência intrínseca dos derivados de laranja de acridina, usou-se a microscopia confocal de fluorescência para se avaliar a sua localização intracelular, uma vez que após excitação a 498 nm emitem fluorescência verde (500 nm).<sup>38</sup>

Depois de se incubarem as células com o aptamero G4 AT11 marcado com CY5 (emissão de fluorescência vermelha a 731 nm) e com o derivado de laranja de acridina C<sub>8</sub> avaliaram-se as

suas localizações intracelulares desde o dia de incubação (nomeado por dia 0) até ao sétimo dia.

Analisando a figura 59, observa-se que o aptamero G4 AT11 não é internalizado pelas células HeLa nas primeiras horas (figura 59 à esquerda). O derivado de laranja de acridina C<sub>8</sub>, por sua vez, é internalizado nas primeiras horas sem nenhum condicionamento por parte da célula (figura 59 à direita).

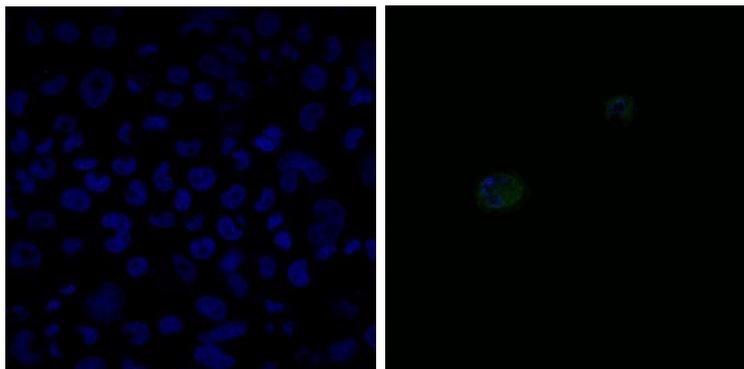


Figura 59. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 0, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde.

Ao fim de 24 horas de incubação do aptamero G4 AT11, observa-se que este foi internalizado pela célula apresentando uma localização citoplasmática (figura 60 à esquerda). Relativamente ao derivado de laranja de acridina C<sub>8</sub>, este continua a ser internalizado pela célula apresentando uma localização maioritariamente citoplasmática (figura 60 ao centro). Com 24 horas de incubação já se observa a formação de complexo G4 AT11-C<sub>8</sub> a nível citoplasmático (figura 60 à direita).

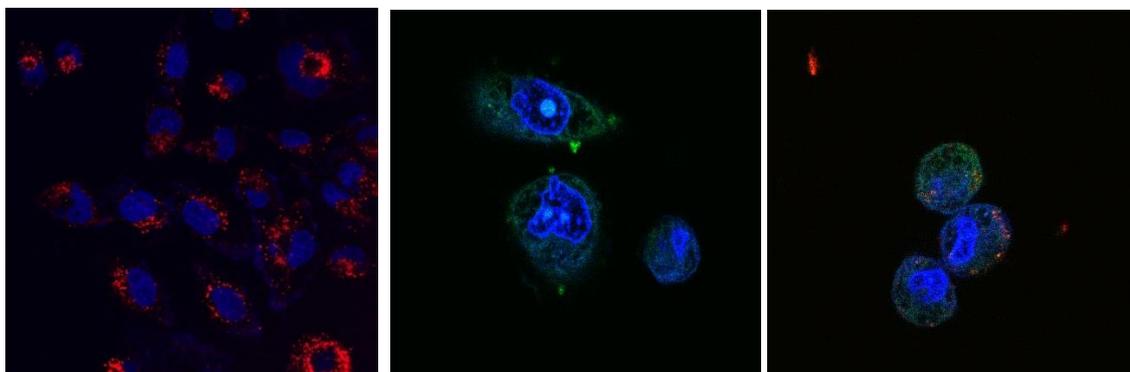


Figura 60. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 1, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde.

Após 48 horas de incubação, continua a ser visível a internalização do aptamero G4 AT11 (mantendo a sua localização citoplasmática) (figura 61 à esquerda) e do derivado de laranja de acridina C<sub>8</sub> (apresentando localização citoplasmática e nucleolar) (figura 61 ao centro). Ao fim deste período, continua a haver formação do complexo G4 AT11-C<sub>8</sub>, com manutenção da localização intracelular (figura 61 à direita).

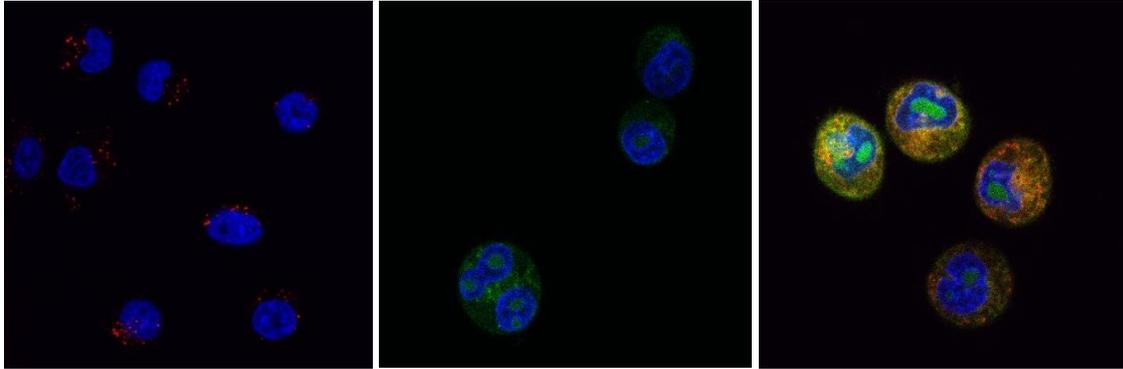


Figura 61. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 2, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde.

Os restantes dias de incubação do aptamero G4 AT11 e derivado de laranja de acridina C<sub>8</sub>, mostraram que continua a haver internalização destes, mantendo as suas localizações (aptamero G4 AT11 no citoplasma e ligando C<sub>8</sub> no citoplasma e nucléolo). Relativamente ao complexo G4 AT11-C<sub>8</sub>, observa-se que ao longo dos dias continua a formar-se no citoplasma.

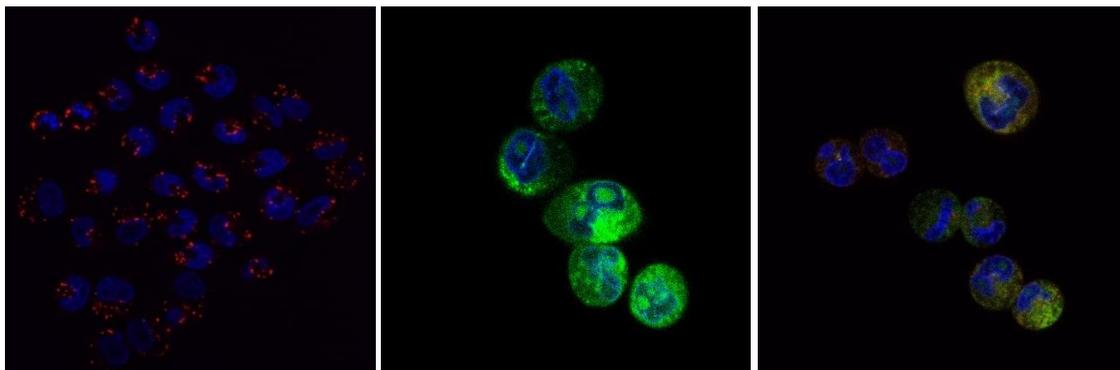


Figura 62. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 3, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde.

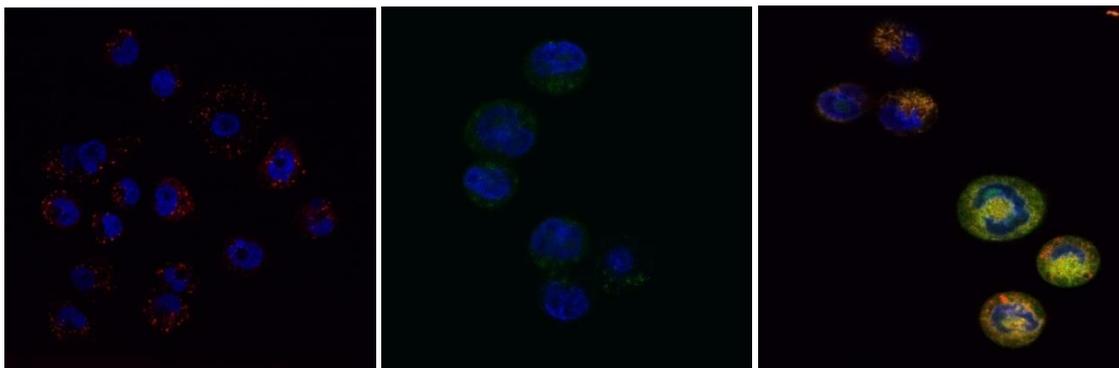


Figura 63. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 4, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde.

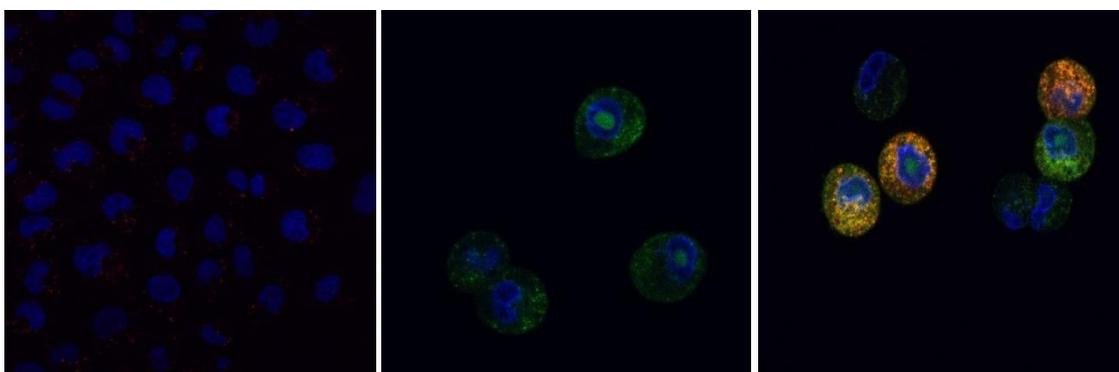


Figura 64. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 5, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde.

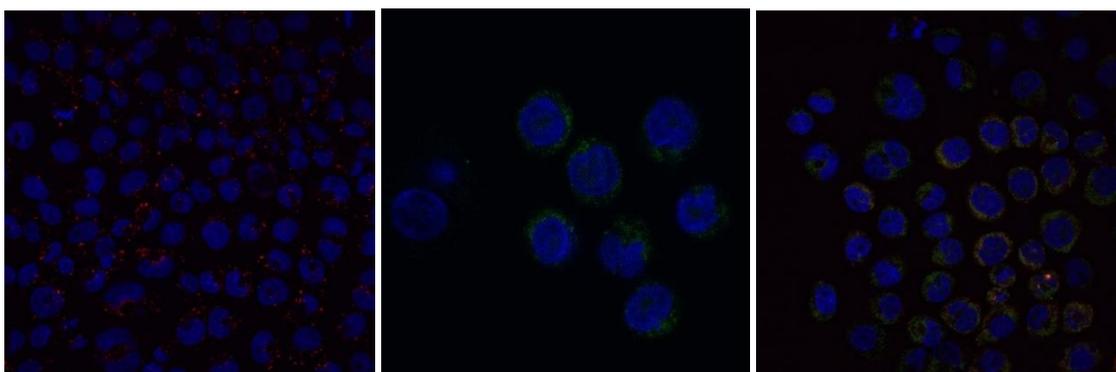


Figura 65. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 6, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde.

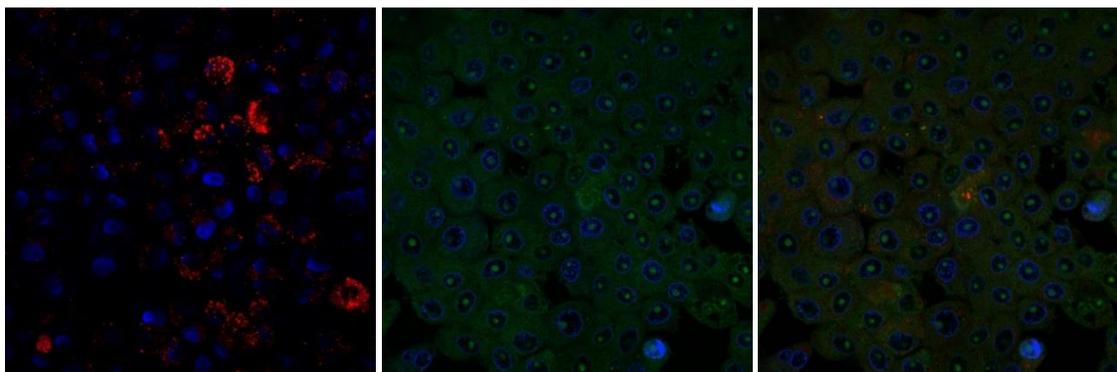


Figura 66. Imagens de microscopia confocal referentes ao dia 7, núcleos marcados com Hoechst a azul, AT11 com CY5 a vermelho e C8 a verde.

Resumindo, estes resultados demonstram que o derivado de laranja de acridina  $C_8$  é internalizado pelas células HeLa sem qualquer condicionamento por parte destas, uma vez que a partir do momento em que há incubação das células HeLa com o ligando há logo internalização. Por sua vez, o aptamero G4 AT11 só é internalizado ao fim de 24 horas.

Relativamente à formação do complexo G4 AT11- $C_8$  só se observa a partir das 24 horas, mostrando uma diminuição a partir do sexto dia, uma vez que por técnicas anteriores (ensaio da viabilidade celular) se confirmou que o complexo G4 AT11- $C_8$  é citotóxico para as células HeLa ao fim de 7 dias de incubação. Esta citotoxicidade do G4 AT11- $C_8$  e do G4 AT11 pode estar relacionada com a ligação do aptamero à nucleolina, o que pode levar a uma ativação constante da Rac1, promovendo indução de macropinocitose e por sua vez morte celular.<sup>32</sup>

## Capítulo 5 - Conclusões e Perspetivas futuras

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo, e entre os vários tipos, o cancro do colo do útero é um dos mais frequentes nas mulheres.<sup>2</sup> Deste modo torna-se necessário desenvolver novas estratégias terapêuticas.

Este trabalho consistiu no estudo do aptamero G4 AT11, ligandos e complexos G4 AT11-ligando como agentes anticancerígenos, para obtenção de uma maior eficácia e seletividade a nível terapêutico.

Uma vez que os derivados de fenantrolina têm demonstrado ser uma nova classe de agentes anti-tumorais<sup>12</sup>, os compostos propostos neste trabalho eram macrociclos derivados de fenantrolina. Contudo, a síntese não foi concluída pois não se conseguiu purificar/isolar os macrociclos puros, passando a estudar-se a como ligandos de G4 os derivados de fenantrolina [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> e [16]phenN<sub>2</sub> e os derivados de laranja de acridina C<sub>3</sub>, C<sub>5</sub>, C<sub>8</sub> e C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub>.

Os ensaios de dicroísmo circular permitiram concluir que o aptamero G4 AT11 apresenta uma topologia paralela com banda positiva a 260 nm e negativa a 240 nm, a qual é mantida após adição dos ligandos.

Através dos ensaios biofísicos de dicroísmo circular concluiu-se que os ligandos mais promissores eram os derivados de laranja de acridina C<sub>8</sub> e C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> seguidos dos derivados de fenantrolinas [16]phenN<sub>2</sub> e [32]phen<sub>2</sub>N<sub>4</sub> uma vez que os valores de  $\Delta T_m$  para estes ligandos foram de 23,9; 21,0; 18,9 e 18,7°C, respetivamente. Nos ensaios de espectroscopia de fluorescência, estes ligandos continuam a ser os mais promissores, uma vez que apresentam afinidades moderadas altas com valores de  $K_D$  de  $9,90 \times 10^{-7}$ ;  $2,90 \times 10^{-7}$ ;  $3,53 \times 10^{-7}$  e  $2,01 \times 10^{-7} M^{-1}$  respetivamente.

O estudo de proliferação celular mostrou que o aptamero G4 AT11 provoca uma diminuição da viabilidade celular mais acentuada nas células HeLa comparativamente às NHDF. Relativamente aos ligandos em estudo, os que apresentam uma maior citotoxicidade são os derivados de laranja de acridina C<sub>8</sub> e C<sub>8</sub>-NH<sub>2</sub> com valores de IC<sub>50</sub> de 0,15  $\mu M$  e 0,31  $\mu M$  respetivamente, para as células HeLa, e 0,48  $\mu M$  e 0,80  $\mu M$  respetivamente, para as células NHDF.

A formação dos complexos G4 AT11-ligandos (derivados de fenantrolina e de laranja de acridina) parecem ser uma estratégia promissora, uma vez que a formação destes nas células HeLa diminui a viabilidade celular relativamente ao ligando e G4 AT11 livres, e nas NHDF promove um aumento da viabilidade celular comparativamente ao ligando livre.

O estudo da localização intracelular mostrou que o aptamero G4 AT11 só é internalizado ao fim de 24 horas de incubação, enquanto que o ligando derivado de laranja de acridina C<sub>8</sub> é

internalizado após a sua incubação em células HeLa, demonstrando que não há nenhum condicionamento por parte da célula. O aptamero G4 AT11 localiza-se a nível citoplasmático, enquanto o ligando C<sub>8</sub> se encontra a nível citoplasmático e nucleolar. Porém, quando há formação do complexo G4 AT11-C<sub>8</sub>, este localiza-se no citoplasma, indicando que o aptamero G4 AT11 não consegue atingir o núcleo da célula, mas que promove morte celular.

O mecanismo envolvido no processo de morte celular poderá estar de acordo com o proposto por Reyes-Reyes e colaboradores para o G4 AS1411<sup>32</sup>, no qual o aptamero G4 AT11 poderá ligar-se especificamente à nucleolina, promovendo a ativação constante da Rac1 e levando a célula para morte celular através de metuose.

Assim, conclui-se que a formação dos complexos aptamero G4 AT11-ligandos (derivados de laranja de acridina e fenantrolinas) parece ser uma estratégia promissora para terapia do cancro do colo do útero.

Perante os resultados obtidos conclui-se ser necessário a realização de mais ensaios de modo a clarificar os mecanismos envolvidos. Como perspectivas futuras propõem-se as seguintes:

- Avaliar a interação nucleolina-G4 AT11 e nucleolina-G4 AT11-ligando por ensaios de SPR
- Avaliar a resistência que o G4 AT11 e os complexos G4 AT11-ligandos têm para as nucleases séricas
- Avaliar a localização intracelular do G4 AT11, do derivado de laranja de acridina C<sub>8</sub> e formação do complexo G4 AT11-C<sub>8</sub> na linha celular de fibroblastos da derme humana normais (NHDF).

A nível de síntese química, é necessário:

- Estudar as condições reacionais da síntese do DPPZ(Me)<sub>2</sub> e DPPZ(COH)<sub>2</sub> de forma a melhorar os rendimentos obtidos procedendo assim à síntese dos compostos seguintes.
- Avaliar a interação de todos os compostos intermediários e finais com o G4 AT11.

## Referências

1. Aftab S, Shah A, Nadhman A, et al. Nanomedicine: An effective tool in cancer therapy. *Int J Pharm.* 2018;540(1-2):132-149.
2. Dasari S, Wudayagiri R, Valluru L. Cervical cancer: Biomarkers for diagnosis and treatment. *Clin Chim Acta.* 2015;445:7-11.
3. Wu L, Qu X. Cancer biomarker detection: Recent achievements and challenges. *Chem Soc Rev.* 2015;44(10):2963-2997.
4. Newton CL, Mould TA. Invasive cervical cancer. *Obstet Gynaecol Reprod Med.* 2017;27(1):7-13.
5. Bava, SV; Thulasidasan AKT, et al. Cervical cancer: a comprehensive approach towards extermination. *Ann Med.* 2016;48(3):149-161.
6. Kim M, Kim DM, Kim KS, Jung W, Kim DE. Applications of cancer cell-specific aptamers in targeted delivery of anticancer therapeutic agents. *Molecules.* 2018;23(4):1-21.
7. Hori S, Herrera A, Rossi J, Zhou J. Current Advances in Aptamers for Cancer Diagnosis and Therapy. *Cancers.* 2018;10(1):1-33.
8. Musumeci D, Platella C, Riccardi C, Moccia F, Montesarchio D. Fluorescence sensing using DNA Aptamers in cancer research and clinical diagnostics. *Cancers.* 2017;9(12):1-44.
9. Platella C, Riccardi C, Montesarchio D, Roviello GN, Musumeci D. G-quadruplex-based aptamers against protein targets in therapy and diagnostics. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1861(5):1429-1447.
10. Yoon S, Rossi JJ. Aptamers: Uptake mechanisms and intracellular applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018.
11. Zhang N, Bing T, Liu X, et al. Cytotoxicity of guanine-based degradation products contributes to the antiproliferative activity of guanine-rich oligonucleotides. *Chem Sci.* 2015;6(7):3831-3838.
12. Medeiros-silva J, Guédin A, Salgado GF, et al. Phenanthroline-bis-oxazole ligands for binding and stabilization of G-quadruplexes. *Biochim Biophys Acta.* 2017:1281-1292.

13. Han H, Hurley LH. G-quadruplex DNA: A potential target for anti-cancer drug design. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(4):136-142.
14. Lin C, Yang D. Human Telomeric G-quadruplex structures and G-quadruplex-interactive compounds. *Telomeres and Telomerase: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* Vol 1587. ; 2017.
15. Carvalho J, Ferreira J, Pereira P, et al. Stabilization of novel immunoglobulin switch regions G-quadruplexes by naphthalene and quinoline-based ligands. *Tetrahedron.* 2016;72:1229-1237.
16. Do NQ, Chung WJ, Truong THA, Heddi B, Phan AT. G-quadruplex structure of an anti-proliferative DNA sequence. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(12):7487-7493.
17. Carvalho J, Nottelet P, Mergny JL, Queiroz JA, Salgado GF, Cruz C. Study of the interaction between indole-based compounds and biologically relevant G-quadruplexes. *Biochimie.* 2017;135:186-195.
18. Bagheri Z, Ranjbar B, Latifi H, Zibaii MI, Moghadam TT, Azizi A. Spectral properties and thermal stability of AS1411 G-quadruplex. *Int J Biol Macromol.* 2014.
19. Kwok CK, Merrick CJ. G-Quadruplexes: Prediction, Characterization, and Biological Application. *Trends Biotechnol.* 2017;35(10):997-1013.
20. Pagano B, Amato J, Iaccarino N, et al. Looking for efficient G-quadruplex ligands: Evidence for selective stabilizing properties and telomere damage by drug-like molecules. *ChemMedChem.* 2015;10(4):640-649.
21. Bates PJ, Laber DA, Miller DM, Thomas SD, Trent JO. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol.* 2009;86(3):151-164.
22. Choi EW, Nayak L V., Bates PJ. Cancer-selective antiproliferative activity is a general property of some G-rich oligodeoxynucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(5):1623-1635.
23. Bates PJ, Reyes-Reyes EM, Malik MT, Murphy EM, O'Toole MG, Trent JO. G-quadruplex oligonucleotide AS1411 as a cancer-targeting agent: Uses and mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1861(5):1414-1428.

24. Métifiot M, Amrane S, Mergny JL, Andreola ML. Anticancer molecule AS1411 exhibits low nanomolar antiviral activity against HIV-1. *Biochimie*. 2015;118:173-175.
25. Zhao J, Zhang P, He Z, Min QH, Abdel-Halim ES, Zhu JJ. Thermal-activated nanocarriers for the manipulation of cellular uptake and photothermal therapy on command. *Chem Commun*. 2016;52(33):5722-5725.
26. Soundararajan S, Wang L, Sridharan V, et al. Plasma Membrane Nucleolin Is a Receptor for the Anticancer Aptamer AS1411 in MV4-11 Leukemia Cells. *Mol Pharmacol*. 2009;76(5):984-991.
27. Rosenberg JE, Bambury RM, Van Allen EM, et al. A phase II trial of nucleolin-targeted DNA aptamer AS1411 in metastatic refractory renal cell carcinoma. *Invest New Drugs*. 2014;32(1):178-187.
28. Jia W, Yao Z, Zhao J, Guan Q, Gao L. New perspectives of physiological and pathological functions of nucleolin (NCL). *Life Sci*. 2017;186:1-10.
29. Gregório AC, Lacerda M, Figueiredo P, Simões S, Dias S, Moreira JN. Meeting the needs of breast cancer: A nucleolin's perspective. *Crit Rev Oncol/Hematol*. 2018;125:89-101.
30. Hovanesian AG, Soundaramourty C, El Khoury D, Nondier I, Svab J, Krust B. Surface expressed nucleolin is constantly induced in tumor cells to mediate calcium-dependent ligand internalization. *PLoS One*. 2010;5(12).
31. Reyes-reyes EM, Teng Y, Bates PJ. A new paradigm for aptamer therapeutic AS1411 action: Uptake by macropinocytosis and its stimulation by a nucleolin-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2010;70(21):8617-8629.
32. Reyes-reyes EM, Salipur FR, Shams M, Forsthoefel MK, Bates PJ. Mechanistic studies of anticancer aptamer AS1411 reveal a novel role for nucleolin in regulating Rac1 activation. *Mol Oncol*. 2015;9:1392-1405.
33. Maltese WA, Overmeyer JH. Methuosis Nonapoptotic Cell Death Associated with Vacuolization of Macropinosome and Endosome Compartments. *Am J Pathol*. 2014;184(4).
34. Fan X, Sun L, Li K, et al. The Bioactivity of D-/L-Isonucleoside- and 2'-Deoxyinosine-Incorporated Aptamer AS1411s Including DNA Replication/MicroRNA Expression. *Mol*

*Ther - Nucleic Acids*. 2017;9:218-229.

35. Malik MT, O'Toole MG, Casson LK, et al. AS1411-conjugated gold nanospheres and their potential for breast cancer therapy. *Oncotarget*. 2015;6(26).
36. Ou TM, Lu YJ, Tan JH, Huang ZS, Wong KY, Gu LQ. G-quadruplexes: Targets in anticancer drug design. *ChemMedChem*. 2008;3:690-713.
37. Monchaud D, Teulade-Fichou MP. A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands. *Org Biomol Chem*. 2008;6(4):627-636.
38. Carvalho J, Pereira E, Marquevielle J, et al. Fluorescent light-up acridine orange derivatives bind and stabilize KRAS-22RT G-quadruplex. *Biochimie*. 2018;144:144-152.
39. Pereira E, Do Quental L, Palma E, et al. Evaluation of Acridine Orange Derivatives as DNA-Targeted Radiopharmaceuticals for Auger Therapy: Influence of the Radionuclide and Distance to DNA. *Sci Rep*. 2017;7:1-16.
40. Carvalho J, Quintela T, Gueddouda NM, et al. Phenanthroline polyazamacrocycles as G-quadruplex DNA binders. *Org Biomol Chem*. 2018;16(15):2776-2786.
41. Garas AM., Vagg RS. Synthesis of some novel derivatives of 1,10-phenanthroline. *J Heterocycle Chem*. 2000;37:151-158.
42. Zheng RH, Guo HC, Jiang HJ, et al. A new and convenient synthesis of phendiones oxidated by KBrO<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at room temperature. *Chinese Chem Lett*. 2010;21(11):1270-1272.
43. Carvalho J, Queiroz JA, Cruz C. Circular dichroism of G-Quadruplex: A laboratory experiment for the study of topology and ligand binding. *J Chem Educ*. 2017;94(10):1547-1551.
44. Mergny J, Li J, Lacroix L, Amrane S, Chaires JB. Thermal difference spectra : a specific signature for nucleic acid structures. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(16):1-6.
45. Bahuguna A, Khan I, Bajpai VK, Kang SC. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. *Bangladesh J Pharmacol*. 2017;12(2):115-118.
46. Zhang H, Xiang J, Hu H, et al. Selective recognition of specific G-quadruplex vs. duplex DNA by a phenanthroline derivative. *Int J Biol Macromol*. 2015;78:149-156.

47. Gueddouda NM, Hurtado MR, Moreau S, et al. Design, Synthesis, and Evaluation of 2,9-Bis[(substituted-aminomethyl)phenyl]-1,10-phenanthroline Derivatives as G-Quadruplex Ligands. *ChemMedChem*. 2017;12(2):146-160.
48. Karsisiotis AI, Ma N, Novellino E, Spada GP, Randazzo A, Webba M. Topological Characterization of Nucleic Acid G-Quadruplexes by UV Absorption and Circular Dichroism. *Angew chemie*. 2011;50:10645-10648.
49. Nelson DL, Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 6ª ed. (Artmed, ed.). Porto Alegre; 2014.
50. Cruz C, Cairrao E, Silvestre S, Breitenfeld L, Almeida P, Queiroz JA. Targeting of mitochondria-endoplasmic reticulum by fluorescent macrocyclic compounds. *PLoS One*. 2011;6(11).



## **Anexos**



## Stabilization of modified AS1411 G-quadruplex aptamer by acridine orange derivative for cervical cancer therapy

Márcia Ribeiro<sup>1</sup>, Maria P. C. Campello<sup>2</sup>, João A. Queiroz<sup>1</sup>, António Paulo<sup>2</sup>, Carla Cruz<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>CICS-UBI – Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

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

\*e-mail: [carlacruz@fcsaude.ubi.pt](mailto:carlacruz@fcsaude.ubi.pt)

e-mail: [marcia.ribeiro@ubi.pt](mailto:marcia.ribeiro@ubi.pt)

### Introduction

G-quadruplex (G4) AS1411 aptamer has been recently employed as a drug delivery system with efficient cellular internalization compared to non-G4 DNA sequences, and it exhibits anticancer activity by interfering with nucleolin oncogenic functions. [1] Clinical trials of AS1411 have indicated that it is well tolerated with therapeutic activity but improved pharmacology and potency are required for optimal efficacy. [2]

Since G4 AS1411 aptamer has high affinity for nucleolin and it is able to enter more easily into malignant cells that can be used for diagnosis (when associated with imaging agents) and for treatment of cancer (by ligands association) [3]

The synthesized ligands used in this study are derivatives of acridine orange [4]. Acridines are a class of heterocyclic compounds that have a wide range of biological and pharmaceutical properties. [5]

In order to have greater entrance in the cell, greater stability and better pharmacological properties, AS1411 has been structurally modified to be used as therapeutic agent.

The aim of this study is to evaluate the AS1411 properties with and without modification and ligands in cancer cell lines.

### Materials and Methods

Circular dichroism is performed to evaluate the structure of the AS1411 aptamer modified and G-quadruplex maintenance/interconversion after acridine orange binding. The binding affinity of G-quadruplex AS1411 derivative aptamer with and without acridine orange ligand to nucleolin is assessed by surface plasmon resonance (SPR) biosensor

Cell viability assays are performed to evaluate the cytotoxic effect of G-quadruplex AS1411 derivative aptamer on cervical cancer cells.

### Results and Discussion

The G-quadruplex AS1411 derivative aptamer showed high stabilization with the acridine orange derivative by circular dichroism. The binding G-quadruplex AS1411 derivative aptamer with and without ligand assessed by SPR biosensor showed high affinity to nucleolin. Cytotoxic studies revealed that the ligand is cytotoxic for cervical cancer cells with IC50 around 2.4-8.9  $\mu\text{M}$ .

### Conclusions

Overall, the G-quadruplex AS1411 derivative showed high stability in the presence of acridine orange ligand. The binding AS1411 aptamer modified with and without ligand presented high affinity to nucleolin and cytotoxic studies revealed that the ligand is cytotoxic for cervical cancer. The G-quadruplex AS1411 derivative is an effective targeting agent that can be used to deliver cargoes to cancer cells.

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



## Stabilization of modified AS1411 G-quadruplex aptamer by acridine orange and phenantrolines derivatives for cervical cancer therapy.

**Márcia Ribeiro<sup>a</sup>, Josué Carvalho<sup>a</sup>, Maria P. C. Campello<sup>b</sup>, João A. Queiroz<sup>a</sup>, António Paulo<sup>b</sup>, Carla Cruz<sup>a\*</sup>.**

<sup>a</sup>CICS-UBI - Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

<sup>b</sup> Centro de Ciências e Tecnologias nucleares, Instituto superior Técnico, Universidade de Lisboa, estrada nacional 10 (km 139,7), 2695-066 Bobadela LRS, Portugal

**Email:** marcia.ribeiro@ubi.pt | **\*Email:** carlacruz@fcsaude.ubi.pt

### Introduction

G-quadruplex (G4) AS1411 aptamer is a high-order structure that occur in G-rich sequences and has been recently employed as a drug delivery system because it exhibits anticancer activity by interfering with nucleolin oncogenic functions. [1]

G4 AS1411 aptamer has high affinity for nucleolin and it is able to enter more easily into malignant cells. This can be used for diagnosis and for treatment of cancer (by ligands association) [2]

The synthesized ligands used in this study are derivatives of acridine orange [3] and phenantrolines.

The aim of this study is to evaluate the modified AS1411 properties with and without ligands in cancer cell lines, since it was shown that the AS1411 features needed to be optimized [4]

### Materials and Methods

Circular dichroism is performed to evaluate the structure of the AS1411 aptamer modified and G4 maintenance/interconversion after ligands binding

Affinity of ligand to the aptamer was measured by fluorescence

Cell viability assays are performed to evaluate the cytotoxic effect of G-quadruplex AS1411 derivative aptamer on cervical cancer cells and normal cells.

### Results and Discussion

Dicroism circular showed that the G4 AS1411 derivative aptamer has high stabilization with ligands and cytotoxic studies revealed that the ligand is cytotoxic for cervical cancer cells.

### Conclusions

Overall, the modified AS1411 G4 aptamer is an effective targeting agent that can be used to deliver ligands to cancer cells.

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

### References:

- [1] Carvalho, J., Ferreira, J., Pereira, P., Coutinho, E., Guédin, A., Nottelet, P., ... Cruz, C. (2016). *Stabilization of novel immunoglobulin switch regions G-quadruplexes by naphthalene and quinoline-based ligands*. *Tetrahedron*, 72(9), 1229–1237.
- [2] Bagheri, Z., Ranjbar, B., Latifi, H., Zibaii, M. I., Moghadam, T. T., & Azizi, A. (2015). *Spectral properties and thermal stability of AS1411 G-quadruplex*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 806–811.
- [3] Pereira, E., Quental, L., Palma, E., Oliveira, M. C., Mendes, F., Raposinho, P., ... 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*, 10, 1–16.
- [4] Bates, P. J., Reyes-Reyes, E. M., Malik, M. T., Murphy, E. 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.



5<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> July

## XIII Annual CICS-UBI Symposium

### Ligands effects on stabilization of DNA G-quadruplex aptamer

**M. Ribeiro<sup>a</sup>, J. Carvalho<sup>a</sup>, M. P. C. Campello<sup>b</sup>, J. A. Queiroz<sup>a</sup>, A. Paulo<sup>b</sup>, C. Cruz<sup>a\*</sup>**

<sup>a</sup>CICS-UBI - Centro de Investigação em Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

<sup>b</sup> Centro de Ciências e Tecnologias nucleares, Instituto superior Técnico, Universidade de Lisboa, estrada nacional 10 (km 139,7), 2695-066 Bobadela LRS, Portugal

**Email:** marcia.ribeiro@ubi.pt | **\*Email:** carlacruz@fcsaude.ubi.pt

#### ABSTRACT

Several DNA G-rich sequences can form four-stranded structures called G-quadruplexes (G4s). [1] The G4 AS1411 has been recently employed as an aptamer of nucleolin and a drug delivery system because exhibits anticancer activity by interfering with nucleolin oncogenic functions. [2]

Since G4 AS1411 aptamer has high affinity to nucleolin and is able to enter more easily into malignant cells, acting as agents for diagnosis and treatment [3]

Clinical trials of AS1411 indicated that it is well tolerated with therapeutic activity, but improved pharmacology and potency are required for optimal efficiency. [4] For this purpose, new aptamer derived by AS1411 is developed and its stabilization with ligands was evaluated by circular dichroism and fluorescence spectroscopy.

The ligands are acridine orange derivatives [5] and phenanthroline macrocycles. The cytotoxic effects and cellular uptake of complexes aptamer-ligands were evaluated in cancer cell lines versus fibroblasts

The results showed high stabilization of G4 aptamer by acridine orange ligands and cytotoxic effects in cervical cancer cells. The confocal microscopy experiments confirmed the binding of the aptamer to nucleolin and the nucleus localization of the acridine orange ligands.

Overall, the modified this aptamer is an effective targeting agent that can be used to deliver ligands into cancer cells.

**Keywords:** G-quadruplex, AS1411, nucleolin. cervical cancer

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

#### References:

- [1] Han, H., & Hurley, L. H. (2000). *G-quadruplex DNA: A potential target for anti-cancer drug design*. Trends in Pharmacological Sciences, 21(4), 136–142.
- [2] Carvalho, J., Ferreira, J., Pereira, P., Coutinho, E., Guédin, A., Nottelet, P., ... Cruz, C. (2016). *Stabilization of novel immunoglobulin switch regions G-quadruplexes by naphthalene and quinoline-based ligands*. Tetrahedron, 72(9), 1229–1237.
- [3] Bagheri, Z., Ranjbar, B., Latifi, H., Zibaii, M. I., Moghadam, T. T., & Azizi, A. (2015). Spectral properties and thermal stability of AS1411 G-quadruplex. International Journal of Biological Macromolecules, 72, 806–811.

**Preference for communication: poster**