



Universidade de Aveiro
2018

Departamento de Química

**Susana Pinho de
Almeida**

**Estudos de interação de porfirinas e
ftalocianinas catiónicas com ADN**



**Susana Pinho de
Almeida**

**Estudos de interação de porfirinas e
ftalocianinas catiónicas com ADN**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Doutora Catarina Isabel Vicente Ramos, Investigadora de Pós-Doutoramento do Departamento Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria da Graça de Pinho Morgado Silva Neves, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

“Feliz o homem que atinge a sabedoria; feliz aquele que
adquire inteligência”

Bíblia Sagrada

o júri

presidente

Prof. Doutor Brian James Goodfellow
Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

orientador

Prof. Doutora Maria da Graça de Pinho Morgado Silva Neves
Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

arguente

Prof. Doutora Carla Patrícia Alves Freire Madeira Cruz
Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Ciências da Saúde da
Universidade da Beira Interior

agradecimentos

A realização deste trabalho não seria possível sem o apoio e auxílio que recebi por parte de algumas pessoas na qual quero deixar aqui o meu agradecimento.

Em primeiro lugar à minha orientadora, a Doutora Catarina Ramos, pelo incansável apoio, acompanhamento e paciência ao longo de todo o processo de desenvolvimento desta dissertação. Um igual obrigado à minha coorientadora, a Professora Doutora Graça Neves.

À Professora Doutora Amparo Faustino pelo apoio científico e aos membros do grupo de Química Orgânica, Doutora Ana Peixoto, Doutor Leandro Lourenço e Doutor Nuno Moura, pelas moléculas cedidas que possibilitaram este estudo.

Aos meus pais e ao meu irmão, que estiveram sempre comigo. Durante todo o meu período académico sempre me deram apoio e conforto nos momentos mais difíceis. Sem eles nunca teria chegado até aqui.

Um especial obrigado ao meu marido por entrar comigo nesta aventura. Por partilhar comigo as minhas lágrimas e as minhas vitórias ao longo deste projeto. Pelo seu apoio incondicional.

palavras-chave

Porfirinas, Ftalocianinas, G-quadruplex, DNA, Métodos Espectroscópicos, Afinidade e Seletividade, Inibição da telomerase

resumo

A telomerase é a enzima responsável pela proliferação descontrolada de células tumorais. A estabilização, por ligandos, das estruturas de G-quadruplexes de ADN tem vindo a ser apontada como uma estratégia promissora na inibição da telomerase em terapias de cancro. Neste trabalho foram estudadas várias porfirinas e ftalocianinas catiónicas como potenciais ligandos estabilizadores de G-quadruplexes de ADN.

Selecionou-se, como padrão, uma das porfirinas mais estudadas nesta área de investigação, a *meso*-tetraquis(N-metilpiridínio-4-il)porfirina (TMPyP), que apresenta como forte limitação a sua baixa seletividade para G-quadruplexes. Os estudos de afinidade e seletividade dos ligandos selecionados recorrendo a técnicas de espectroscopia de ultravioleta-visível mostraram que, quer a coordenação do núcleo da porfirina TMPyP com o ião metálico zinco(II) quer a presença de unidades de piridina cationizadas nas posições beta pirrólicas contribuem fortemente para o aumento da seletividade destes ligandos para G-quadruplexes.

Relativamente à serie de ftalocianinas selecionadas foi possível concluir que a existência de um equilíbrio entre o número e posição das cargas positivas na estrutura destes ligandos é fundamental para a existência de seletividade para estruturas de G-quadruplexes.

Os resultados dos estudos anteriores foram ainda corroborados recorrendo a técnicas espectroscópicas de fluorescência. Para os ligandos mais promissores foram também feitos estudos preliminares sobre as alterações conformacionais induzidas pela presença dos ligandos nas estruturas dos G-quadruplexes, usando o dicroísmo circular. Neste trabalho foi também desenvolvido um método de screening competitivo que permite avaliar a afinidade e seletividade para G-quadruplexes de novos ligandos de uma forma rápida e económica. O desenvolvimento deste método envolveu uma grande componente de otimização de condições experimentais, sendo a sua utilização possível em espectrofotómetros convencionais ou em espectrofotómetros com leitor de placas.

keywords

Porphyrins, Phthalocyanines, G-quadruplex, DNA, Spectroscopic methods, Affinity, Selectivity, Telomerase inhibition

abstract

Telomerase is an enzyme responsible for the unlimited proliferation of cancer cells and the stabilization of DNA (deoxyribonucleic acid) G-Quadruplex structures has been pointed out as a promising strategy for telomerase inhibition in cancer therapies. In this work, several cationic porphyrins and phthalocyanines were studied as potential DNA G-Quadruplexes stabilizing ligands.

One of the most studied porphyrins in this field of research, the *meso*-tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin (TMPyP) presents, as a strong limitation, low selectivity for G-Quadruplexes. In these studies, TMPyP was selected as the standard. The studies of affinity and selectivity of selected ligands, using ultraviolet-visible spectroscopy techniques, have shown that either the coordination of the porphyrin TMPyP core with the zinc(II) metal ion or the presence of pyridine units cationized in the *beta* pyrrolic positions strongly contribute to increase the selectivity of these ligands to G-quadruplexes.

With respect to the series of the selected phthalocyanines, it was possible to conclude that the existence of a balance between the number and position of the positive charges in the structure of these ligands is crucial for the existence of selectivity for G-quadruplex structures. Two of the studied phthalocyanines showed high selectivity and affinity to G-quadruplex structures, thus being identified as promising ligands in telomerase inhibition.

The results of previous studies were further corroborated using spectroscopic fluorescence techniques. For the most promising ligands, preliminary studies of conformational changes induced by the presence of ligands in G-Quadruplexes structures were also performed, using circular dichroism.

In this work, a competitive screening method that allows the evaluation of the affinity and selectivity of new ligands for G-quadruplexes, in a fast and economic way, was developed. The development of this methodology involved a large component of experimental conditions optimization, its application being proposed for conventional spectrophotometers or plate reader spectrophotometers.

Índice Geral

| | |
|--|-------------|
| <i>Índice de figuras</i> | <i>XIII</i> |
| <i>Índice de tabelas</i> | <i>XVI</i> |
| <i>Lista de abreviaturas</i> | <i>XVII</i> |
| Preâmbulo | 1 |
| Capítulo 1. Introdução | 3 |
| 1.1. Os telómeros e a importância da telomerase | 5 |
| 1.2. G-quadruplexes | 7 |
| 1.3. Ligandos estabilizadores de G-quadruplexes | 13 |
| 1.3.1. <i>Porfirinas: considerações gerais e atuação como agentes terapêuticos</i> | <i>14</i> |
| 1.3.2. <i>Ftalocianinas: considerações gerais e sua atuação como agentes terapêuticos</i> | <i>18</i> |
| 1.4. Métodos para estudar interações G-quadruplex/ligando | 22 |
| 1.5. Objetivos do trabalho | 26 |
| Capítulo 2. Resultados e Discussão | 27 |
| 2.1. Estudos das interações entre os ligandos catiónicos baseados em porfirinas e ftalocianinas por UV-Vis | 32 |
| 2.1.1. <i>Porfirinas</i> | <i>33</i> |
| 2.1.1.1. TMPyP | 33 |
| 2.1.1.2. ZnTMPyP | 35 |
| 2.1.1.3. β -TMPyP | 36 |
| 2.1.1.4. TPPyP | 38 |
| 2.1.1.5. β -TPPyP | 40 |
| 2.1.1.6. TSPyP | 41 |
| 2.1.2. <i>Ftalocianinas</i> | <i>44</i> |
| 2.1.2.1. ZnPc(NOPyMe) ₈ | 45 |
| 2.1.2.2. ZnPc(SPyMe) ₈ | 46 |
| 2.1.2.3. ZnPc(SPyMe) ₄ | 48 |
| 2.1.2.4. ZnPc(NOPyMe) ₄ | 49 |

| | |
|--|------------|
| 2.2. <i>Screening</i> competitivo entre ligandos para diferentes sequências de ADN | 55 |
| 2.2.1. <i>Validação do método de screening competitivo</i> | 59 |
| 2.2.2. <i>Otimização das condições experimentais</i> | 69 |
| 2.3. Avaliação da capacidade de estabilização e seletividade dos ligandos por <i>G-quadruplex Fluorescent Intercalator Displacement</i> , G4-FID | 73 |
| 2.3.1. <i>Otimização de condições experimentais</i> | 73 |
| 2.3.2. <i>Análise por FID dos diferentes ligandos</i> | 76 |
| 2.4. Avaliação do efeito dos ligandos na estrutura dos oligonucleótidos – estudos por dicroísmo circular | 81 |
| 2.4.1. <i>Porfirinas</i> | 83 |
| 2.4.2. <i>Ftalocianinas</i> | 85 |
| 2.5. Avaliação da capacidade de estabilização dos ligandos por estudos de <i>CD-melting</i> | 88 |
| Capítulo 3. Conclusões | 91 |
| Capítulo 4. Procedimentos experimentais | 95 |
| 4.1. Considerações gerais | 97 |
| 4.1.1. <i>Preparação do tampão fosfato (PBS)</i> | 97 |
| 4.1.2. <i>Preparação dos oligonucleótidos de ADN</i> | 97 |
| 4.1.3. <i>Preparação das soluções de porfirina e ftalocianinas catiónicas</i> | 98 |
| 4.2. Técnicas | 99 |
| 4.2.1. <i>Titulações espectrofotométricas de UV-vis</i> | 99 |
| 4.2.2. <i>Competições espectrofotométricas de UV-vis</i> | 99 |
| 4.2.3. <i>G4-FID</i> | 100 |
| 4.2.4. <i>Dicroísmo circular, CD</i> | 101 |
| 4.2.5. <i>CD-melting</i> | 101 |
| Bibliografia | 103 |
| Anexos | 111 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Esquema representativo do encurtamento gradual de um único cromossoma. | 6 |
| Figura 2 - Mecanismo de ação da telomerase. | 6 |
| Figura 3 - Hairpin de ADN | 8 |
| Figura 4 - Estruturas de ADN de ordem superior | 8 |
| Figura 5 – Formação do quarteto de guanina na presença de catião estabilizador | 9 |
| Figura 6 - Estrutura de um G-quadruplex intramolecular. | 9 |
| Figura 7 - Topologias possíveis dos G-quadruplexes | 11 |
| Figura 8 - Exemplos de loops externos e laterais em G-quadruplexes | 12 |
| Figura 9 - Macrociclo tetrapirrólico presente em porfirinas e respetiva numeração de acordo com a nomenclatura IUPAC..... | 15 |
| Figura 10 - Estruturas de macrociclos tetrapirrólicos de ocorrência natural: (a) grupo heme; (b) clorofila a | 15 |
| Figura 11 - Espectro de absorção de UV-Vis característico de uma porfirina | 16 |
| Figura 12 - Estrutura de ligandos de G-quadruplex: a) TMPyP4; b) Porphirina pentacatiónica coordenada com Mn(III). | 18 |
| Figura 13 - Núcleo das ftalocianinas e respetiva numeração segundo a IUPAC | 19 |
| Figura 14 - Espectro de absorção de UV-Vis característico de uma ftalocianina..... | 20 |
| Figura 15 - Complexo de zinco(II) da isopropilguanidínio-ftalocianina | 21 |
| Figura 16 - Representação das principais etapas do método de G4-FID | 25 |
| Figura 17 – Estrutura das porfirinas estudadas neste trabalho | 30 |
| Figura 18 – Estrutura das ftalocianinas estudadas neste trabalho | 30 |
| Figura 19 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de TMPyP. | 34 |
| Figura 20 – Espectros absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de ZnTMPyP..... | 35 |
| Figura 21 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de β -TMPyP..... | 37 |
| Figura 22 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de TPPyP..... | 39 |
| Figura 23 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de β -TPPyP..... | 40 |
| Figura 24 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de TSPyP..... | 42 |

| | |
|---|----|
| Figura 25 – Batocromismo (A) e Hipocromismo/Hipercromismo (B) obtido no final das titulações das várias porfirinas com as diferentes sequências de ADN | 43 |
| Figura 26 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de ZnPc(NOPyMe) ₈ | 45 |
| Figura 27 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de ZnPc(SPyMe) ₈ | 47 |
| Figura 28 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de ZnPc(SPyMe) ₄ | 48 |
| Figura 29 – Espectros de absorção UV-vis (a) da titulação de uma solução 2 μ M de ZnPc(NOPyMe) ₄ (b) de uma solução 2 μ M de ZnPc(NOPyMe) ₄ em DMSO..... | 50 |
| Figura 30 – Batocromismo obtido no final das titulações das várias ftalocianinas com as diferentes sequências de ADN. | 51 |
| Figura 31 – Hipocromismo e hipercromismo obtido no final das titulações das várias ftalocianinas com as diferentes sequências de ADN..... | 52 |
| Figura 32 - Estudo de agregação das ftalocianinas (a) ZnPc(NOPyMe) ₄ ; (b) ZnPc(NOPyMe) ₈ ; (c) ZnPc(SPyMe) ₄ ; (d) ZnPc(SPyMe) ₈ | 53 |
| Figura 33 - Espectros de absorção UV-vis da competição TMPyP/ZnPc(NOPyMe) ₈ | 55 |
| Figura 34 - Espectros de absorção: (a) de uma porfirina e de uma ftalocianina e da mistura porfirina + ftalocianina; (b) de duas porfirinas antes e após serem misturadas. | 56 |
| Figura 35 - Espectros de absorção UV-vis da competição TMPyP/ZnPc(NOPyMe) ₈ sem e com adição de (a) 5GC; (b) AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ ; (c) PBS..... | 58 |
| Figura 36 - Espectros de absorção UV-vis da competição TMPyP/ZnPc(NOPyMe) ₈ | 59 |
| Figura 37 - Espectros de absorção UV-vis resultantes de screening competitivo entre TMPyP/ZnPc(NOPyMe) ₈ e espectros de absorção UV-vis das titulações individuais de cada ligando | 61 |
| Figura 38 - Espectros de absorção UV-vis da competição porfirina/ZnPc(NOPyMe) ₈ e espectros de absorção UV-vis das titulações individuais de cada ligando. | 63 |
| Figura 39 - Espectros de absorção UV-vis da competição ZnTMPyP/ZnPc(NOPyMe) ₈ e espectros de absorção UV-vis das titulações individuais de cada ligando, na zona de absorção da porfirina..... | 64 |
| Figura 40 - Espectros de absorção UV-vis da competição β -TMPyP/ZnPc(NOPyMe) ₈ e TPPyP/ZnPc(NOPyMe) ₈ e espectros de absorção UV-vis das titulações individuais de cada ligando, na zona de absorção da porfirina. | 65 |
| Figura 41 - Estrutura das porfirinas MnTMPyP, CuTMPyP, TTMAPP, ZnTTMAPP .. | 66 |

| | |
|---|----|
| Figura 42 - Espectros de absorção UV-vis da competição (a) MnTMPyP / ZnPc(NOPyMe) ₈ , (b) CuTMPyP/ZnPc(NOPyMe) ₈ , (c) TTMAPP/ZnPc(NOPyMe) ₈ e (d) ZnTTMAPP/ZnPc(NOPyMe) ₈ | 67 |
| Figura 43 - Espectros de absorção UV-vis da competição β-TMPyP/ZnPc(SPyMe) ₄ | 69 |
| Figura 44 - Espectros de absorção UV-vis de TTMAPP/ZnPc(NOPyMe) ₈ com 5GC e AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ | 70 |
| Figura 45 - Espectros de absorção UV-vis da competição ZnTMPyP/ZnPc(NOPyMe) ₈ sem e com 5GC ou AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ (a) espectrofotômetro convencional, (b) espectrofotômetro com leitor de placas | 71 |
| Figura 46 - Placa de leitura para screening competitivo entre uma ftalocianina (F), seis porfirinas (P1-P6) na presença de seis oligonucleótidos diferentes (O1-O6)..... | 72 |
| Figura 47 – Otimização de condições experimentais do FID..... | 74 |
| Figura 48 - Otimização de condições experimentais do FID..... | 75 |
| Figura 49 - Fluorescência do complexo TO + oligonucleótido com o aumento de concentração de TMPyP | 76 |
| Figura 50 - Percentagem de deslocamento de TO do 5GC, T ₂ G ₅ T e AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ com o aumento da concentração de TMPyP..... | 77 |
| Figura 51 - Percentagem de deslocamento de TO do 5GC, T ₂ G ₅ T e AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ com o aumento da concentração das diferentes porfirinas ZnTMPyP, β-TMPyP e TPPyP..... | 78 |
| Figura 52 - Percentagem de deslocamento de TO dos oligonucleótidos 5GC, T ₂ G ₅ T e AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ com o aumento da concentração de ZnPc(SPyMe) ₈ , ZnPc(NOPyMe) ₈ e ZnPc(SPyMe) ₄ | 79 |
| Figura 53 - Espectro de CD típico das conformações de G-quadruplexes paralelos, antiparalelas e híbridos..... | 81 |
| Figura 54 - Espectro de CD obtido para AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ em tampão fosfato..... | 82 |
| Figura 55 - Espectro de CD obtido para 5GC em tampão fosfato..... | 83 |
| Figura 56 - Espectros de CD obtidos para AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ com as diferentes porfirinas.... | 84 |
| Figura 57 - Espectros de CD obtidos para 5GC com as diferentes porfirinas..... | 85 |
| Figura 58 - Espectros de CD obtidos para AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ com as diferentes ftalocianinas..... | 86 |
| Figura 59 - Espectros de CD obtidos para 5GC com as diferentes ftalocianinas..... | 87 |
| Figura 60 - Curvas CD-melting para AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ na ausência e na presença dos diferentes ligandos na proporção 1:1 | 89 |

Índice de tabelas

| | |
|---|-----|
| Tabela 1 – Técnicas utilizados para estudar as interações G-quadruplex/ligando..... | 23 |
| Tabela 2 - Resultados obtidos nas titulações da TMPyP com os diferentes oligonucleótidos | 34 |
| Tabela 3 - Resultados obtidos nas titulações da ZnTMPyP com os diferentes oligonucleótidos | 36 |
| Tabela 4 - Resultados obtidos nas titulações de β -TMPyP com os diferentes oligonucleótidos. | 37 |
| Tabela 5 - Resultados obtidos nas titulações da TPPyP com os diferentes oligonucleótidos | 39 |
| Tabela 6 - Resultados nas titulações de β -TPPyP com os diferentes oligonucleótidos. . | 40 |
| Tabela 7 - Resultados obtidos nas titulações da TSPyP com os diferentes oligonucleótidos | 42 |
| Tabela 8 - Resultados obtidos nas titulações da ZnPc(NOPyMe) ₈ com os diferentes oligonucleótidos | 46 |
| Tabela 9 - Resultados obtidos nas titulações ZnPc(SPyMe) ₈ com os diferentes oligonucleótidos | 47 |
| Tabela 10 - Resultados obtidos nas titulações ZnPc(SPyMe) ₄ com os diferentes oligonucleótidos | 49 |
| Tabela 11 – Desvios batocrômicos (em nm) obtidos para titulações individuais e em competição de TMPyP e ZnPc(NOPyMe) ₈ na proporção de 1:2..... | 61 |
| Tabela 12 - Batocromismo obtidos para titulações individuais e em competição de ZnTMPyP, β -TMPyP, TPPyP e ZnPc(NOPyMe) ₈ na proporção de 1:2..... | 64 |
| Tabela 13 - Batocromismo obtidos para titulações em competição de TMPyP ZnTMPyP e TPPyP com ZnPc(SPyMe) ₄ na proporção de 1:2 | 68 |
| Tabela 14 - Valores de DC50 obtidos com os vários oligonucleótidos estudados | 78 |
| Tabela 15 - T _m (°C) obtidas para AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ sozinho e com os respetivos ligandos .. | 88 |
| Tabela 16 - Oligonucleótidos utilizados e respetivas topologias e concentrações..... | 97 |
| Tabela 17 - Coeficientes de extinção molar dos ligandos obtidos nos máximos de absorção..... | 98 |
| Tabela 18 – Fluorescências máximas obtidas nos controlos realizados com TO, 5GC e TMPyP | 101 |

Lista de abreviaturas

| | |
|----------------|---|
| A | Adenina |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| C | Citosina |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| FRET | do inglês <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> |
| G | Guanina |
| G4-FID | do inglês <i>G-quadruplex Fluorescent Intercalator Displacement</i> |
| ITC | Calorimetria de titulação isotérmica |
| PCR | do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| SPR | Ressonância plasmónica de superfície |
| T | Timina |
| TERC | do inglês <i>Telomerase ARN component</i> |
| TERT | do inglês <i>Telomerase reverse transcriptase</i> |
| T _m | do inglês <i>Temperature of melting</i> |
| TO | do inglês <i>Thiazole Orange</i> |
| TRAP | do inglês <i>Telomere Repeat Amplification Protocol</i> |
| U | uracilo |
| UV-Vis | ultravioleta-visível |

Preâmbulo

O cancro é um conjunto de doenças somáticas, caracterizado pela proliferação descontrolada das células e é responsável por milhões de mortes em todo mundo. Apesar dos avanços constantes na medicina, esta doença continua a ser um grave problema de saúde pública estando em segundo lugar na lista das principais causas de morte em todo o mundo.¹

A quimioterapia e a radioterapia são tratamentos bem-sucedidos em alguns tipos de cancro. No entanto, este tipo de abordagem tem algumas desvantagens, nomeadamente o desenvolvimento de multirresistência por parte de células cancerígenas e os efeitos secundários resultantes da falta de seletividade dos fármacos anticancerígenos. Assim, torna-se crucial o desenvolvimento de novos fármacos que apresentem uma maior seletividade para as células tumorais, diminuindo os efeitos secundários das terapias associadas e aumentando a taxa de sucesso de tratamento desta doença.

Durante as últimas décadas, vários estudos têm sido realizados usando novas abordagens de investigação com o intuito de desenvolver novas estratégias terapêuticas para o tratamento do cancro.² Uma destas abordagens envolve o estudo dos telómeros, que são estruturas existentes nas extremidades dos cromossomas que têm como principais funções manter a estabilidade da estrutura do cromossoma e assegurar que a informação genética é perfeitamente copiada quando a célula se duplica.³

Outros estudos indicaram que ao longo de sucessivas divisões celulares o tamanho dos telómeros vai diminuindo progressivamente, e que células com telómeros curtos, que se encontram numa situação limite de mutação, são eliminadas, ficando o processo de renovação celular comprometido, uma vez que as células eliminadas não são substituídas por outras.⁴⁻⁷

A investigação envolvendo os telómeros intensificou-se, tendo sido mais tarde descrito não só que o tamanho dos telómeros vai diminuindo, a cada divisão celular, mas também que a manutenção do seu comprimento desempenha um papel crucial na imortalidade das células tumorais.⁸ Em 1985 E. Blackburn e C. Greider⁸ descreveram que algumas células, como é o caso das células tumorais, têm a capacidade de impedir o encurtamento dos telómeros através da expressão de uma enzima, a telomerase. O estudo e descoberta do mecanismo pelo qual esta enzima acrescenta ácido desoxirribonucleico (ADN) às extremidades dos cromossomas valeram aos três cientistas americanos, Elizabeth H. Blackburn, Carol Greider e Jack W. Szostak, o Prémio Nobel de Medicina em 2009.⁹

Tendo por base estas descobertas, têm vindo a ser desenhadas e estudadas novas moléculas com características promissoras para inibição da telomerase e consequente interrupção na proliferação descontrolada das células cancerígenas.

Assim, nas próximas secções serão abordados alguns conceitos relacionados com este tema, bem como sobre duas classes de macrociclos, as porfirinas e as ftalocianinas, cuja utilização como potenciais fármacos têm vindo a despertar um interesse crescente na comunidade científica.

Capítulo 1.
Introdução

1. Introdução

1.1. Os telómeros e a importância da telomerase

As extremidades dos cromossomas são constituídas por sequências de nucleotídeos repetidas, centenas ou milhares de vezes. Nos humanos esta sequência é constituída por timina (T), adenina (A) e guanina (G) na sequência TTAGGG. Estas regiões repetitivas na extremidade dos cromossomas são designadas por telómeros e foram descobertas, em 1938, por Muller.¹⁰ Como já foi anteriormente referido, os telómeros protegem as regiões internas dos cromossomas mantendo a sua estabilidade e asseguram que toda a informação genética é perfeitamente copiada quando a célula é duplicada. Para além disso, estes impedem a junção de extremidades entre cromossomas consecutivos.³

Para que a duplicação do ADN possa ser iniciada é necessária a introdução de um *primer* de ácido ribonucleico (ARN) para que, a partir deste, o processo de replicação se desenvolva. Numa das cadeias do ADN esse *primer* nunca é adicionado na região telomérica e assim, esta nunca é duplicada. Em 1972 J. Watson designou este fenómeno como *end-replication problem*.^{11,12}

Mais tarde, Olovnikov, identificando o mesmo problema, foi mais longe afirmando que este resultaria num encurtamento gradual dos telómeros a cada ciclo de replicação (figura 1).¹³ O encurtamento de telómeros foi relacionado ao envelhecimento celular e a perda progressiva dos telómeros pode explicar a razão pela qual as células somente se podem dividir um determinado número de vezes.^{13,14}

A telomerase, enzima responsável pela manutenção do tamanho dos telómeros, é constituída por uma proteína, a *telomerase reverse transcriptase* (TERT), e por uma molécula de ARN chamada *telomerase ARN component* (TERC).¹⁵ Esta enzima sintetiza ADN por complementaridade em relação a uma cadeia de ARN.^{8,15}

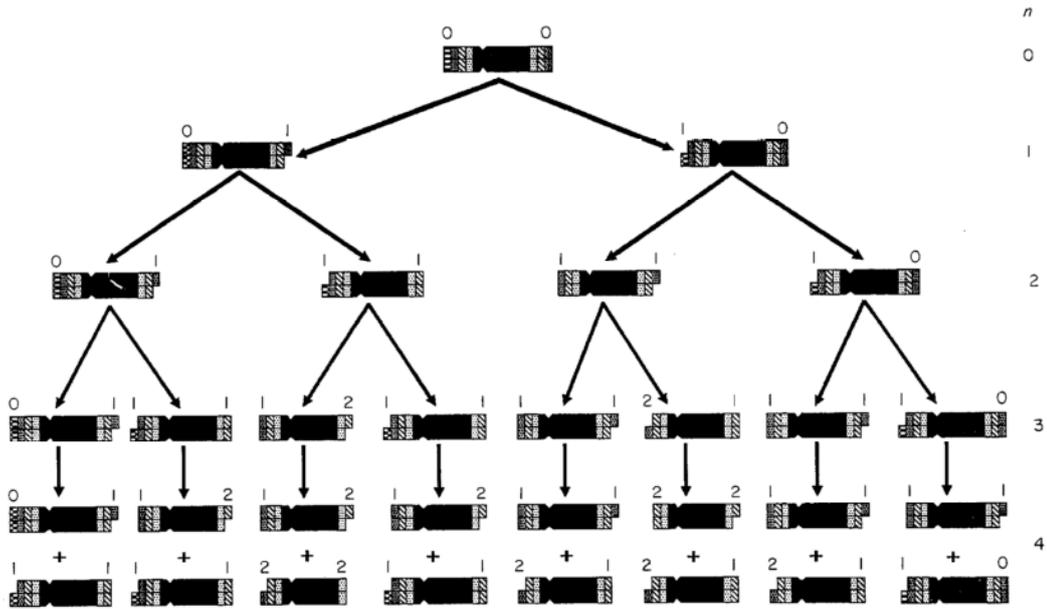


Figura 1 - Esquema representativo do encurtamento gradual de um único cromossoma. A numeração representa o número de eliminações que ocorreram nesse telômero.¹²

A TERC é constituída por citosina (C) adenina (A) e uracilo (U) e apresenta a sequência CAAUCCCAAUC, que funciona como molde para a telomerase sintetizar, por complementaridade, o ADN necessário. Desta forma, segmentos de material genético perdido durante a mitose podem ser substituídos, uma vez que a sequência TTAGGG, ou T₂AG₃, é adicionada repetidamente à extremidade 3' da cadeia (figura 2).¹⁵

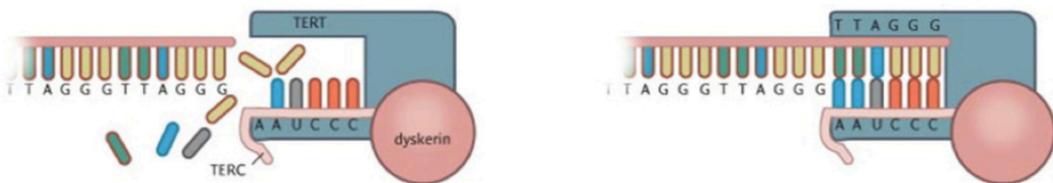


Figura 2 - Mecanismo de ação da telomerase. A telomerase ativada estabilizada pela dyskerina.¹⁶

A atividade da telomerase varia consoante o tipo de células.^{17,18} As células somáticas não cancerosas, que não estão diretamente envolvidas na reprodução, sofrem encurtamento dos seus telômeros sempre que ocorre divisão celular. Este encurtamento acontece uma vez que a telomerase tem muito baixa atividade neste tipo de células, levando assim ao envelhecimento e morte celular.

Em células estaminais e germinativas a telomerase está ativa e, por isso, não ocorre o encurtamento dos telômeros nem morte celular. Em células neoplásicas ou cancerosas, a

telomerase tem um elevado nível de atividade justificando a sua multiplicação de forma descontrolada.¹⁷ À semelhança das células somáticas não cancerosas, também as células cancerosas sofrem encurtamento dos telómeros na ausência da telomerase, conduzindo à interrupção do ciclo celular (senescência) ou à morte celular por apoptose. Assim, a repressão ou regulação rigorosa da telomerase em humanos pode funcionar como supressor de tumores.¹⁹⁻²¹

As principais vantagens de utilizar a telomerase como alvo, em comparação com outros alvos em processos oncológicos, incluem para além da sua especificidade para células cancerígenas, a sua relativa universalidade e originalidade.²⁰ A telomerase surge sobre expressa em cerca de 80-90% dos tumores sendo essencial para a manutenção a longo prazo dos telómeros das células cancerígenas que, por sua vez, são fundamentais para a sobrevivência das mesmas.¹⁹⁻²² Nenhum outro gene associado a processos oncológicos está tão amplamente expresso em tumores.²⁰ Além disso, a baixa expressão desta enzima em tecidos normais não só confere um certo grau de especificidade a fármacos que têm como alvo a telomerase mas também reduz a probabilidade de citotoxicidade acrescida em células de tecidos normais.^{2,19,20} Por último, a telomerase é codificada por genes não-redundantes (únicos) diminuindo assim a propensão, por parte dos tumores, a desenvolver resistência às terapias com base na telomerase.^{20,23} Assim, a procura e desenvolvimento de fármacos anticancerígenos que atuem ao nível da inibição da telomerase podem ter uma ampla janela terapêutica e poderá tornar possível o controlo da proliferação descontrolada característica de células cancerígenas.

Em seguida será feita referência aos G-quadruplexes, estruturas que se podem encontrar nas regiões teloméricas e que estão também envolvidas na abordagem aqui apresentada de inibição da telomerase.

1.2. G-quadruplexes

A principal estrutura secundária do ADN é a dupla-hélice descoberta por Watson e Crick em 1953.²⁴ Contudo, por ser uma molécula bastante maleável, o ADN pode adotar uma variedade de outras conformações. Quando sequências dentro de uma única cadeia de ADN são complementares umas às outras pode haver emparelhamento entre elas, através de pontes de hidrogénio. Este emparelhamento produz regiões bifilamentares dando origem a

outras estruturas secundárias. Um exemplo muito comum deste tipo de estruturas são os *hairpins* (figura 3), nome devido à sua estrutura ser semelhante a um gancho de cabelo.²⁵

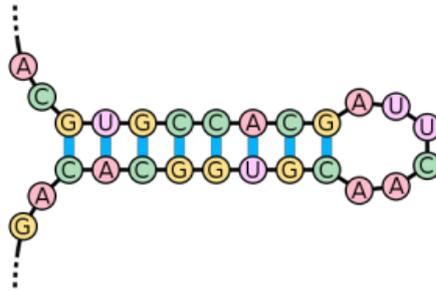


Figura 3 - Hairpin de ADN²⁶

O ADN pode também formar triplexes e quadruplexes (figura 4). No primeiro caso três cadeias unem-se entre si, por exemplo quando uma guanina se liga a uma citosina do par de bases G-C, formando o trio G-C-G.²⁷⁻²⁹ No caso dos quadruplexes, quatro cadeias de ADN unem-se entre si também por pontes de hidrogénio. Estas estruturas são mais raras e ocorrem em cadeias com apreciáveis quantidades de guanina como é o caso dos telómeros de células eucariotas.³

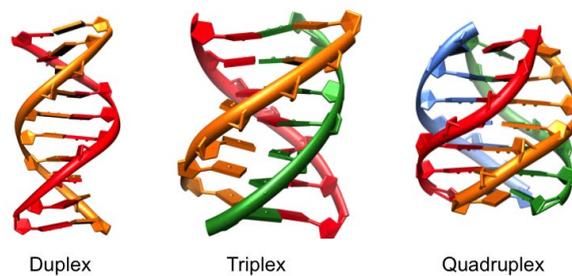


Figura 4 - Estruturas de ADN de ordem superior (adaptado de 30)

Sequências de ácidos nucleicos ricas em guaninas podem formar G-quadruplexes se quatro guaninas, da mesma cadeia ou de cadeias diferentes, se ligarem entre si por pontes de hidrogénio do tipo Hoogsteen, e formarem um quarteto de guanina (figura 5). Estes quartetos de guanina, também chamados tétradas de guanina, podem interagir entre si através de interações π - π e formar arranjos empilhados conhecidos como G-quadruplex (figura 6).³¹⁻³³ Os G-quadruplexes foram descritos pela primeira vez, por Gellert, como sequências ricas em bases de guanina que poderiam ser organizadas de forma tetramérica e estas foram observadas por cristalografia por difração de raios X.³⁴

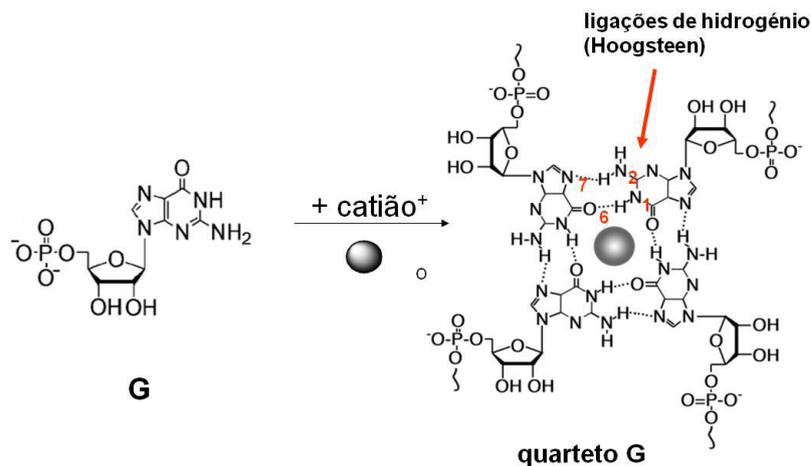


Figura 5 – Formação do quarteto de guanina na presença de catião estabilizador³⁵

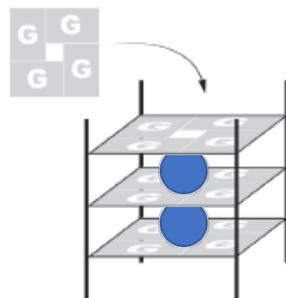


Figura 6 - Estrutura de um G-quadruplex intramolecular. Quarteto de guanina e G-quadruplex resultante do empilhamento de três quartetos de guanina na presença de catiões estabilizadores. (adaptado de 36)

São dois os fatores principais que contribuem para a estabilização da estrutura dos G-quadruplexes, as ligações de Hoogsteen e a presença de catiões. As oito ligações de Hoogsteen presentes num quarteto de guanina são estabelecidas entre os prótons dos grupos NH e NH₂ de uma base (posições 1,2) e os átomos de oxigênio e de azoto da outra (posições 6,7), ajudando a estabilizar a estrutura (figura 5).^{32,34} A presença de catiões, geralmente monovalentes, como por exemplo K⁺, Na⁺ e NH₄⁺, intercalados entre os quartetos de guanina é também importante para a estabilização dos G-quadruplexes. Estes catiões mantêm-se entre dois quartetos de guanina através de interações catião-dipolo com oito guaninas. Essas interações diminuem a repulsão eletrostática dos átomos de oxigênio centrais, aumentando a força das pontes de hidrogênio e estabilizando o empilhamento dos quartetos de guanina.^{32,37,38}

A estabilização conferida pela presença de íons depende dos íons monovalentes presentes e do seu poder de estabilização, tendo sido estabelecida a seguinte ordem de estabilização: $K^+ > NH_4^+ > Rb^+ \sim Na^+ > Cs^+ > Li^+$.³⁸ O raio iônico do potássio e a sua elevada concentração intracelular justificam o seu maior poder estabilizador e também a sua ampla utilização quando se pretende induzir a formação de G-quadruplexes em solução.³⁹⁻⁴²

Apesar da formação de G-quadruplexes resultar sempre do empilhamento de quartetos de guanina estes podem apresentar características diferentes no que diz respeito à estequiometria das cadeias, à presença ou não de *loops* e ao tipo de catiões metálicos a eles coordenados.

Dependendo do número de cadeias envolvidas na sua formação, os G-quadruplexes podem apresentar diferentes topologias, sendo designados como intramoleculares se, na sua formação, está envolvida uma única cadeia de ADN longa, ou como intermoleculares se são formados por associação de várias cadeias de ADN. Dependendo também do número de cadeias envolvidas, os G-quadruplexes podem ser unimoleculares, bimoleculares ou tetramoleculares quando na sua formação estão envolvidas uma, duas ou quatro cadeias de ADN, respetivamente.^{33,38,43,44}

Exemplos destas estruturas são o ADN telomérico humano, formado pela sequência TTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG (representada de forma simplificada como $(T_2AG_3)_4$), que forma G-quadruplexes intramoleculares unimoleculares^{42,44} e as sequências GGGGTTTTGGGG e TTGGGGGT (representada de forma simplificada como $G_4T_4G_4$ e T_2G_5T , respetivamente) que dão origem a G-quadruplexes intermoleculares bimolecular⁴¹ e tetramolecular,⁴⁵ respetivamente.

A direção das cadeias é também uma característica importante e é responsável pela existência de diferentes tipos de conformações, descritas como paralelas, antiparalelas ou mistas (figura 7). No caso de conformações antiparalelas, duas das cadeias encontram-se numa direção e as outras duas em direção oposta. Nas conformações paralelas a cadeia ou cadeias que as formam têm todas a mesma direção. Para que tal seja possível em estruturas uni e bimoleculares é essencial a presença de *loops* que revertam a orientação da cadeia. Nos G-quadruplexes com conformação mista, também chamados de G-quadruplexes híbridos, a progressão da cadeia ou cadeias é feita sempre no mesmo sentido, com exceção de um dos lados.^{38,43,44}

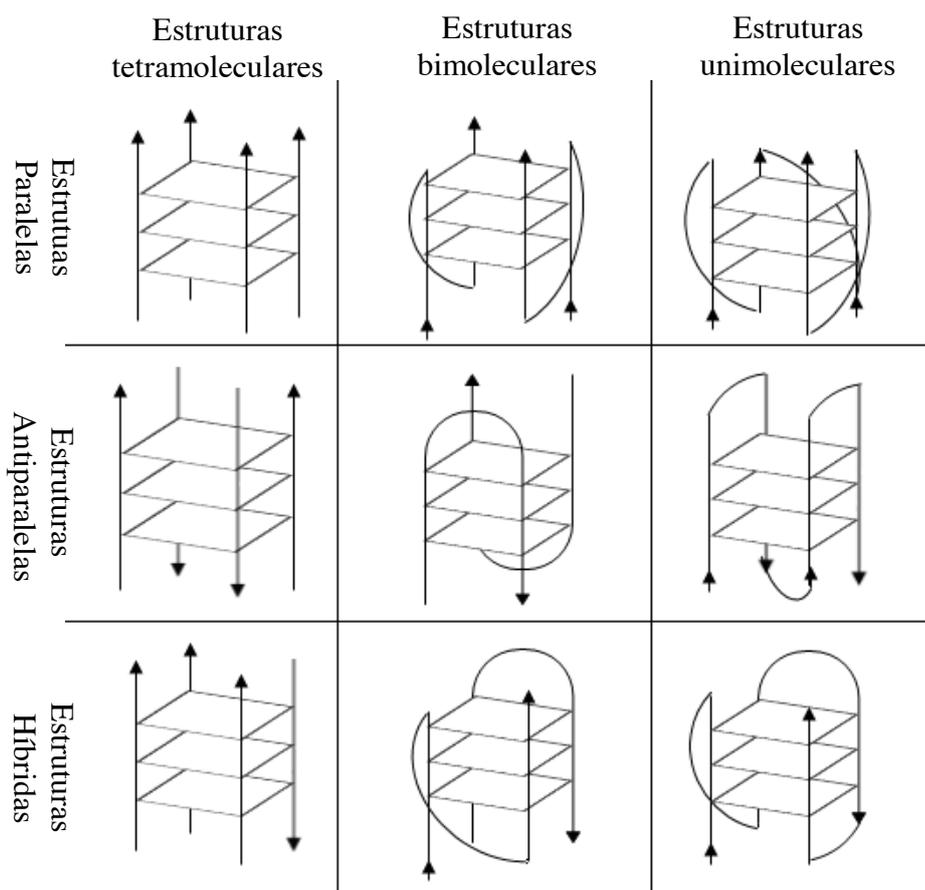


Figura 7 - Topologias possíveis dos G-quadruplexes

Como foi referido anteriormente, as estruturas dos G-quadruplexes podem conter *loops* assumindo a sequência e tamanho destes um papel importante na determinação da topologia dos quadruplexes. Os *loops* podem ser externos ou laterais (figura 8) e são formados por bases de cadeia simples que não estão envolvidas na formação dos quartetos de guanina, podendo eles próprios, interagir ou formar ligações de hidrogénio com outras moléculas.⁴⁴

Os G-quadruplexes intramoleculares apresentam, geralmente, três *loops* de forma a ser possível a formação dos quartetos de guanina a partir de uma única cadeia e os G-quadruplexes bimoleculares apresentam apenas dois. No caso dos G-quadruplexes tetramoleculares a presença de *loops* não é relevante para a sua formação.^{38,44}

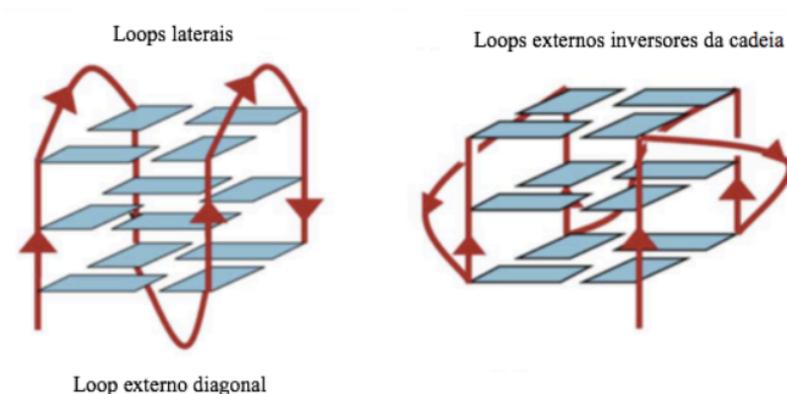


Figura 8 - Exemplos de *loops* externos e laterais em G-quadruplexes (adaptado de 44)

A conformação mais simples de um G-quadruplex é aquela que contém quatro cadeias curtas e simples de ADN contendo guaninas que se auto-associaram para formar um G-quadruplex intermolecular, como é exemplo a sequência TGGGGT, ou TG₄T. Contudo, a partir de uma mesma sequência, a topologia do G-quadruplex pode variar, dependendo das características de coordenação com o catião metálico isto é, a presença de catiões diferentes pode dar origem a diferentes conformações.^{38,44,46} Por exemplo, a sequência de ADN telomérico humano, (T₂AG₃)₄, em solução de sódio forma uma estrutura com topologia antiparalela com um *loop* externo diagonal e dois *loops* laterais, denominada de estruturas “tipo cesto” ou *basket*. Por outro lado, o complexo de potássio com a mesma sequência tem estruturas variáveis e complicadas, incluindo estrutura antiparalela “tipo cesto” ou “tipo cadeira”, estrutura cristalográfica paralela “tipo hélice” e estrutura do “tipo misto” com uma hélice e dois *loops* laterais.^{47,48}

Blackburn descreveu a presença de sequências repetitivas ricas em guanina, localizadas no telómero, capazes de formar estruturas estáveis e complexas, os G-quadruplexes,³ que constituem formas de ADN de ordem superior particularmente relevantes em áreas do genoma, como os telómeros. A estabilização de G-quadruplexes nos telómeros é de extrema importância uma vez que esta estabilização poderá inibir a atividade da telomerase, que, como já referido, se encontra sobre-expressa numa vasta gama de células cancerígenas.⁴⁹ Pequenas moléculas que estabilizam a estrutura G-quadruplex dos telómeros podem inibir a atividade da telomerase pois bloqueiam o substrato de telómeros isto é, o ADN de cadeia simples, em estrutura do tipo quadruplex.⁵⁰

A presença de G-quadruplexes está também relacionada com a regulação da expressão genética pois estas estruturas estão também presentes na região promotora de

diversos oncogenes, tais como c-MYC, KRAS e c-Kit.^{33,43,51} Em 2006, S. Cogoi e L. Xodo provaram que a formação de G-quadruplex na região promotora destes oncogenes está diretamente ligada ao bloqueio da ação da ADN polimerase e, conseqüentemente, à paragem da “maquinaria” de transcrição destes genes.⁵² Tal como nos telómeros a estrutura em quadruplex impede a ligação da telomerase ao ADN, a formação de quadruplexes em regiões promotoras de oncogenes impede a ligação da ADN polimerase a estas regiões, pois tanto a telomerase como a ADN polimerase apenas desempenham as suas funções quando o ADN se encontra como cadeia simples.^{50,52}

Uma vez que a telomerase e estes oncogenes estão relacionados com o ciclo e proliferação celular a sua inibição, por estabilização dos G-quadruplexes por parte de ligandos, induz interrupção do ciclo celular, culminando em morte celular por apoptose.^{19,38,53,54}

A formação de G-quadruplexes *in vivo* tem gerado controvérsia retirando valor a estratégias baseadas na sua estabilização. Contudo, em 2013, um estudo realizado em Cambridge, utilizando um anticorpo especificamente desenhado para detetar G-quadruplexes, demonstrou pela primeira vez a sua presença em células humanas, validando possíveis terapêuticas usando ligandos estabilizadores de G-quadruplexes.³³ Assim, a estabilização dos G-quadruplexes por ligandos específicos, de modo a inibir a atividade da telomerase e como consequência a capacidade proliferativa das células cancerosas, mostra-se uma terapêutica promissora para o controlo da proliferação descontrolada observada em células tumorais e conseqüentemente no combate ao cancro.

Usando a diversidade estrutural dos G-quadruplexes podem ser desenhados e sintetizados ligandos que estabilizem seletivamente os G-quadruplexes formados nas regiões teloméricas humanas reduzindo assim os efeitos secundários para as células normais.

1.3. Ligandos estabilizadores de G-quadruplexes

Ao longo dos anos, os G-quadruplexes têm-se tornado alvos moleculares cada vez mais atrativos e, foi demonstrado que catiões monovalentes simples, como o K^+ ou o Na^+ podem induzir e estabilizar os G-quadruplexes.⁵⁵⁻⁵⁷ Inspirados nestas pequenas moléculas, um elevado número de estudos foi realizado, com o objetivo de desenvolver ligandos capazes de estabilizar estas estruturas de ADN, inibir a atividade enzimática da telomerase em células tumorais e assim impedir a sua proliferação.^{38,47,58,59}

Para que um ligando seja eficiente na estabilização dos G-quadruplexes e consequente inibição da telomerase este deve reunir um conjunto de propriedades essenciais tais como alta afinidade para os G-quadruplexes ($k \geq 10^6 \text{ M}^{-1}$), alta seletividade para os G-quadruplexes em relação ao ADN de cadeia dupla e boa solubilidade em meio aquoso.⁶⁰ Moléculas que reúnam este conjunto de características tornam-se promissoras e potenciais estabilizadores de G-quadruplexes. As interações entre um ligando e os G-quadruplexes poderão ocorrer no quarteto de guaninas terminal, entre os quartetos, nos *loops* ou no canal central do G-quadruplex.^{38,60}

Estudos anteriores demonstraram que complexos metálicos interagem fortemente com os G-quadruplexes uma vez que originam interações π - π mais fortes.³⁸ Estes complexos metálicos têm demonstrado uma maior seletividade em relação a compostos sem metais na sua constituição, aumentando assim o seu interesse molecular nesta área de estudo.⁶¹ Também os ligandos catiónicos demonstraram ter uma maior afinidade e seletividade para G-quadruplexes quando comparados com ligandos neutros ou aniônicos.⁶¹⁻⁶³ A localização da carga no ligando mostrou também ser um fator relevante.⁶⁴

Neste trabalho, serão analisados dois tipos de moléculas que têm dado origem a resultados bastante promissores na estabilização de G-quadruplexes: as porfirinas^{58,65-70} e as ftalocianinas.^{62,63,71-74} Serão em seguida apresentadas as características estruturais destes dois tipos de macrociclos, bem como alguns estudos já realizados usando estas famílias de compostos.

1.3.1. Porphirinas: considerações gerais e atuação como agentes terapêuticos

O nome "porfirina" vem da palavra grega *πορφύρα* que significa púrpura.⁷⁵ As porfirinas são macrociclos aromáticos constituídas por quatro unidades de tipo pirrol ligadas por quatro pontes metálicas (figura 9). O anel aromático da porfirina apresenta um total de 22 eletrões π no sistema conjugado. Em resultado deste sistema conjugado estas moléculas possuem tipicamente bandas de absorção muito intensas na região visível.

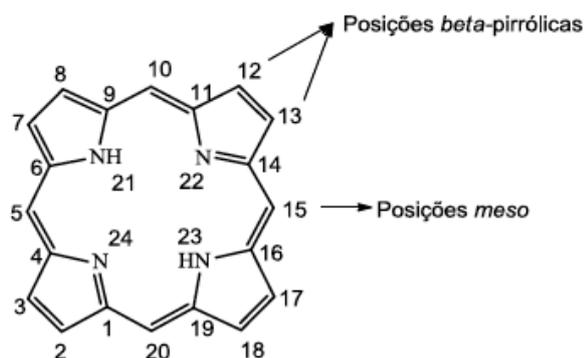


Figura 9 - Macrosciclo tetrapirrólico presente em porfirinas e respectiva numeração de acordo com a nomenclatura IUPAC³⁵

Estas moléculas orgânicas e análogos encontram-se naturalmente nos organismos vivos, sendo os seus representantes mais comuns o grupo heme^{76,77} (figura 10a) e a clorofila a⁷⁸ (figura 10b). O grupo heme encontra-se em várias hemoproteínas como a hemoglobina, a mioglobina, catálases e citocromos que estão envolvidas em importantes funções vitais do organismo. Por exemplo, a hemoglobina e a mioglobina são responsáveis pelo transporte e armazenamento de oxigénio e os citocromos estão relacionados com o transporte de elétrons.⁷⁶ Por sua vez, a clorofila a é um elemento essencial para a fotossíntese nas plantas, uma vez que esta tem a capacidade de captar energia luminosa e transmiti-la a moléculas vizinhas na forma de energia química.⁷⁸ As porfirinas estão portanto relacionadas com inúmeras funções biológicas vitais, assumindo grande importância molecular.

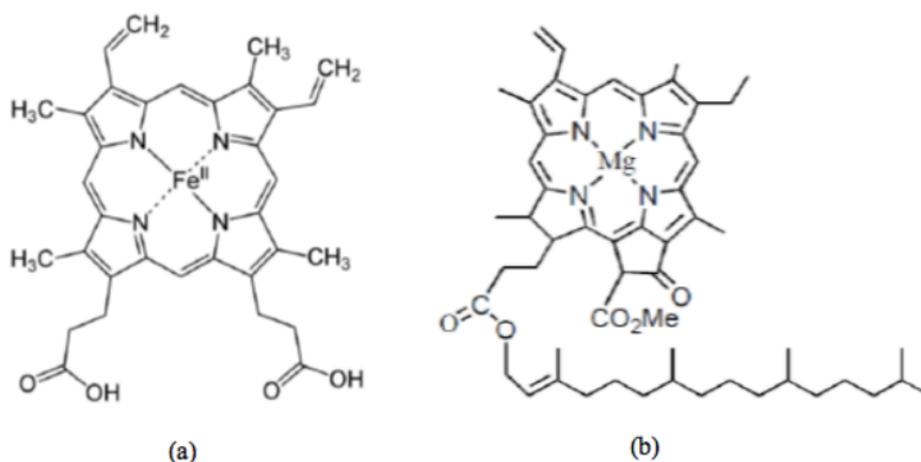


Figura 10 - Estruturas de macrociclos tetrapirrólicos de ocorrência natural: (a) grupo heme; (b) clorofila a³⁵

O primeiro sistema de nomenclatura para as porfirinas foi criado por H. Fischer, no entanto, o sistema de nomenclatura atualmente mais usado segue a proposta da IUPAC. Nesta, todos os átomos presentes no macrociclo são identificados por números tendo-se convencionado que os hidrogénios ligados aos átomos de azoto estão localizados nas posições 21 e 23. Da nomenclatura de H. Fischer, alguns termos como a indicação das posições 5,10,15 e 20 por posições *meso* e as posições externas dos pirróis (e.g. 7,8) por posições *beta-pirrólicas* são ainda vulgarmente utilizados por investigadores que trabalham nesta área (figura 9).⁷⁹

Os espectros de absorção de ultravioleta-visível característicos das porfirinas apresentam uma banda principal de absorção entre os 390 e os 425 nm, designada por banda Soret e quatro outras bandas, menos intensas, designadas por bandas Q (figura 11). Do mesmo modo, porfirinas complexadas com metais, as metaloporfirinas, apresentam também espectros de UV-vis característicos, os quais diferem dos anteriores por apresentarem apenas duas bandas Q, designadas por bandas α e β .

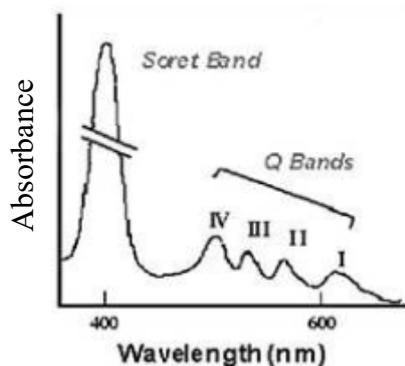


Figura 11 - Espectro de absorção de UV-vis característico de uma porfirina

Estes espectros podem sofrer alterações nomeadamente desvios batocrómicos, hipocrómicos ou hiperocrómicos, que estão muitas vezes relacionadas com o seu auto-empilhamento (agregação) ou com a interação com outros compostos, por exemplo estabelecendo com eles ligações do tipo π - π .

Na terapia fotodinâmica do cancro, as porfirinas têm alcançado um crescente interesse científico em grande parte devido à sua capacidade de acumulação preferencial em tecidos tumorais e à sua capacidade, após irradiação com luz branca, de gerar espécies citotóxicas de oxigénio, nomeadamente oxigénio singuleto. A conjugação destes dois fatores conduz à irradiação das células tumorais de uma forma selectiva.⁸⁰

Com base no arranjo planar dos anéis aromáticos da porfirina alguns pesquisadores propuseram que estes compostos se ligam aos G-quadruplexes por meio de empilhamento

nos seus quartetos. Foram então propostos dois modelos de ligação G-quadruplex/porfirina distintos, um modelo, baseado em dados de fotocaptção, prevê que as moléculas de porfirina se empilhem externamente nos quartetos de guanina localizados nas extremidades de G-quadruplex,⁸¹ o outro modelo propõe, com base em modelos moleculares e medidas estequiométricas, que as moléculas de porfirina intercalam entre dois quartetos de guanina.⁶⁷ Embora os dados de espectroscopia e os estudos de modelos moleculares apoiem os dois modelos, os dados de fotocapacidade fornecem a melhor evidência experimental para o modelo de empilhamento externo.^{81,82}

A *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina (TMPyP4) (figura 12a) foi uma das primeiras moléculas sintéticas a ser estudada como ligando estabilizador de G-quadruplexes.⁸² Esta exerce vários efeitos nas células, como por exemplo, a inibição da helicase RecQ,⁸³ a diminuição dos níveis de c-MYC e a inibição da telomerase.⁶⁸ Apesar disso, a TMPyP4 tem demonstrado ser pouco seletiva para G-quadruplexes uma vez que também exhibe uma considerável capacidade para se ligar a ADN de cadeia dupla.^{74,84} A sua baixa seletividade pode dar origem a citotoxicidade em linha celulares não cancerígenas traduzindo-se em efeitos secundários não desejados.⁸⁵ Este problema pode ser contornado modificando a molécula de modo a aumentar a sua seletividade,⁸⁶ sendo este um dos objetivos propostos para este trabalho.

Como já foi referido, compostos contendo metais apresentam uma maior interação com os G-quadruplexes e são, portanto, mais seletivos para G-quadruplexes. Assim, a complexação da TMPyP4 com metais parece ser uma possibilidade para aumentar a sua seletividade. Por exemplo, num estudo envolvendo uma porfirina pentacatiónica complexada com Mn(III) (Figura 12b) foi demonstrado que esta porfirina exibia alta afinidade e excelente seletividade para G-quadruplexes. No complexo observado entre a porfirina e o G-quadruplex telomérico humano, formado a partir da sequência (AG₃TT)₃AG₃, o anel da porfirina mostrou estar empilhado no quarteto de guaninas terminal enquanto os quatro substituintes interagem com os sulcos.⁸⁶

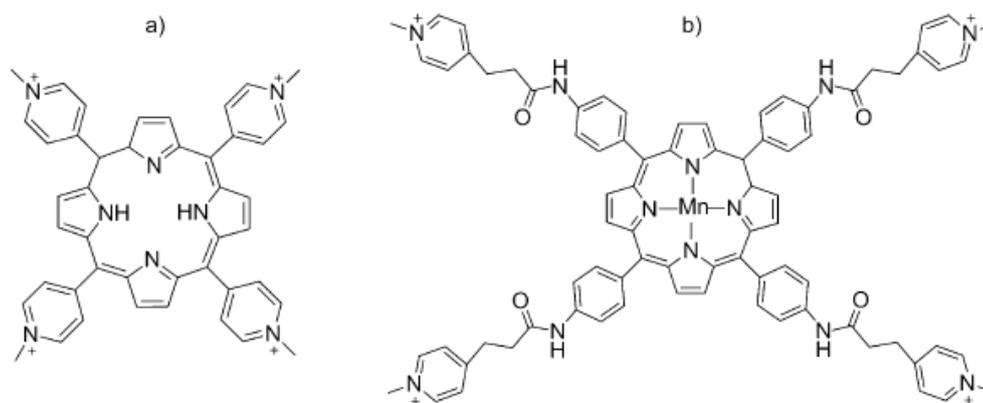


Figura 12 - Estrutura de ligandos de G-quadruplex: a) TMPyP4; b) Porfirina pentacatiónica coordenada com Mn(III).⁶⁰

Apesar da baixa seletividade, a TMPyP4 apresenta propriedades inibitórias notáveis:⁸⁷ prejudica significativamente o crescimento de células K562 (associadas à leucemia)⁸⁵ e de células de retinoblastoma,⁸⁸ causando inibição da telomerase, em ambos os casos. Também induz o encurtamento dos telómeros em células de osteossarcomas levando a apoptose⁸⁹ e mostra inestimável inibição do crescimento numa cultura de células de mieloma.⁹⁰ Em outro estudo, a TMPyP4 também aumentou a suscetibilidade ao tratamento de radiação num xenoinxerto de cancro cervical⁹¹ e num xenoinxerto de melanoma.⁹² Em conjunto, esses estudos sugerem que o composto tem propriedades inibidoras promissoras e que potencialmente podem ser aperfeiçoado para uso posterior em aplicações clínicas.⁸⁷

Mais de 150 análogos de porfirina foram testados usando *cell-free telomerase assay* e *DNA synthesis arrest assay*, no entanto apenas alguns desses compostos exibiram uma boa interação com G-quadruplex.⁸² Estudos de relação estrutura-atividade mostraram que os fatores mais importantes e que determinam a interação entre os ligandos e os G-quadruplexes são o número de cargas, o comprimento da cadeia lateral e a possibilidade de estabelecer interações por ligação de hidrogénio.⁸²

1.3.2. Ftalocianinas: considerações gerais e sua atuação como agentes terapêuticos

Tal como as porfirinas as ftalocianinas são macrociclos aromáticos e apresentam quatro subunidades de isoindol (pirrol fundido com um núcleo benzénico) ligadas entre si por átomos de nitrogénio (figura 13). As ftalocianinas foram referidas pela primeira vez em

1907 por Braun e Tcherniac.⁹³ Na época foi dada pouca atenção a esta família de compostos, contudo, ao longo dos anos os estudos de investigação e a sua utilização na indústria têm provado a importância destes compostos na criação de novos materiais com as mais diversas aplicações, desde sensores químicos, à utilização em equipamentos para emissão de luz e como fotossensibilizadores para a terapia fotodinâmica no tratamento do cancro.⁹⁴⁻⁹⁶

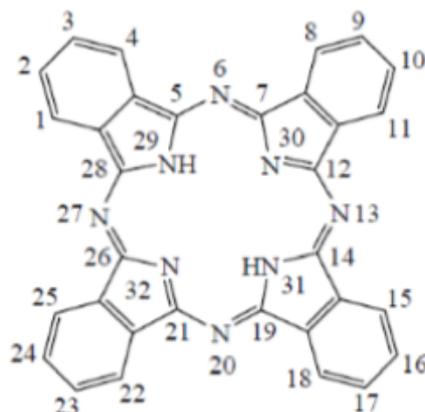


Figura 13 - Núcleo das ftalocianinas e respetiva numeração segundo a IUPAC⁹⁷

As ftalocianinas receberam uma nomenclatura particular definida pela IUPAC em 1979. Todos os seus átomos são numerados com exceção dos átomos de carbono que ligam os anéis pirrólicos aos anéis benzénicos (figura 13). Desta forma é possível saber facilmente se temos grupos substituintes na molécula, quantos grupos são e onde se localizam.⁹⁷

As ftalocianinas apresentam uma grande estabilidade química devido a sua aromaticidade. E, tal como vimos anteriormente para a porfirinas, as ftalocianinas apresentam um espectro de absorção de UV-Vis característico (figura 14). A primeira banda de absorção, que ocorre entre 300 e 400 nm, chamada de banda B (conhecida vulgarmente como banda Soret nas porfirinas), apresenta uma elevada importância uma vez que é influenciada pelos substituintes ou pela presença de um metal no interior da ftalocianina. Para além da banda B, observamos também duas bandas Q entre os 650 e os 750 nm. Quando uma ftalocianina se encontra ligada a um metal apenas é visível uma banda Q no seu espectro. Esta banda é originada por transferências eletrónicas entre os grupos pirrólicos e os anéis benzénicos.

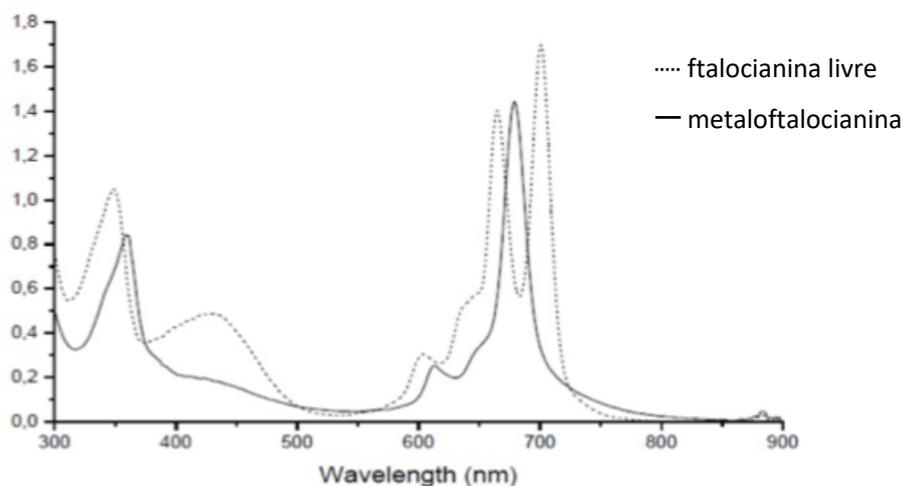


Figura 14 - Espectro de absorção de UV-Vis característico de uma ftalocianina.⁹⁷

As ftalocianinas têm um forte sinal de absorção na região vermelha dos espectros óticos ($\lambda_{\text{max}} \approx 670 \text{ nm}$, $\epsilon \approx 10^5 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) onde a luz penetra mais profundamente nos tecidos em relação à absorção mais fraca das porfirinas ($\lambda_{\text{max}} \approx 610 \text{ nm}$, $\epsilon \approx 5 \times 10^3 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Essa absorção pode ser ajustada tanto pela química de coordenação quanto pelas propriedades redox do metal presente na cavidade central e pelo número e tipo de substituintes na periferia do macrociclo.^{93,98,99} Estas moléculas têm ainda a capacidade de se ligar a diversos metais através da substituição de prótons do interior do macrociclo, podendo assim originar metaloftalocianinas.⁹³

São em menor número os estudos que envolvem ftalocianinas e G-quadruplexes tendo como objetivo a inibição da proliferação das células tumorais, quando comparados com a mesma abordagem usando porfirinas. São dois os motivos que justificam este facto, a complexidade do processo de purificação destes compostos¹⁰⁰ e a baixa solubilidade que as ftalocianinas apresentam na maior parte dos solventes orgânicos, uma vez que, por serem altamente planares, apresentam tendência para sofrer empilhamento e apresentar baixa solubilidade.^{93,101,102} Assim, novas vias para a síntese de ftalocianinas estão sob investigação para resolver os problemas de purificação e torná-las mais solúveis em água e menos propensas a agregação.^{101,102}

Alguns metais, quando ligados às ftalocianinas, aumentam a sua solubilidade uma vez que devido ao tamanho e à carga do ião metálico a sua presença enfraquece a interação intermolecular diminuindo assim os processos de agregação.^{96,103,104} A conjugação destas com unidades de hidratos de carbono também aumenta a sua solubilidade em água.¹⁰¹

Estudos realizados com metalofalocianinas mostraram que o seu sistema aromático mais alargado, comparativamente com o das porfirinas, com átomos de azoto nas posições *meso* conferem uma vantagem espacial e eletrónica para empilhar com os quartetos de guaninas dos G-quadruplex. De facto, complexos de Zn^{II} e Ni^{II} de ftalocianinas catiónicas apresentaram maior afinidade para o G-quadruplex telomérico humano quando comparados com a afinidade observada para complexos de porfirina.^{62,63} Verificou-se ainda que o aumento do número de cargas positivas aumentou a afinidade para o quadruplex e a inibição da telomerase e portanto que estes compostos têm a capacidade de induzir a formação de quadruplexes e de interconverter uma conformação em outra.

Foi estudada a seletividade *in vitro* do complexo de zinco de uma ftalocianina modificada com grupos isopropilguanidínio (Figura 15) para várias sequências de ADN ricas em G, incluindo uma sequência do promotor do oncogene c-MYC, uma sequência dos telómeros humanos e uma sequência do promotor de oncogene de KRAS.^{71,72} Os resultados mostraram que este composto apresenta uma elevada seletividade para G-quadruplexes. A adição deste composto (em doses não citotóxicas) em células conhecidas por sobre-expressar quer c-MYC quer KRAS resultou numa diminuição significativa da expressão do oncogene correspondente.

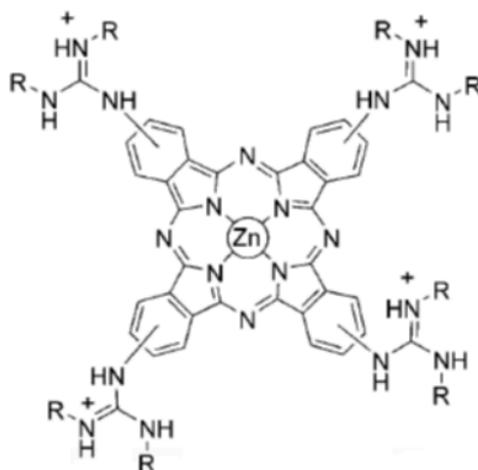


Figura 15 - Complexo de zinco(II) da isopropilguanidínio-ftalocianina⁷²

Tanto as porfirinas como as ftalocianinas apresentam importantes características estruturais que as tornam promissores ligandos de G-quadruplexes, o que está patente no número de trabalhos já publicados envolvendo estas famílias de compostos. As porfirinas têm demonstrado, no geral, bons resultados de afinidade para G-quadruplexes inibindo a telomerase e oncogenes relevantes das células tumorais, contudo, são ainda pouco seletivas para os G-quadruplexes. Por outro lado, as ftalocianinas parecem apresentar uma melhor

seletividade para os G-quadruplexes, em comparação com as porfirinas, porém a sua baixa solubilidade e tendência para agregar pode representar uma grande desvantagem. Como já referido, a presença de metais e cargas positivas nos ligandos parece também aumentar a afinidade e/ou seletividade destes. É por isso essencial a realização de mais estudos de modo a perceber o potencial de novas moléculas para estabilizar os G-quadruplexes e avaliar a sua afinidade e seletividade para estruturas do tipo G-quadruplex.

1.4. Métodos para estudar interações G-quadruplex/ligando

O principal desafio no *design* destes ligandos é serem seletivos para estruturas do tipo quadruplex em presença de grandes quantidades de ADN em cadeia dupla, sendo que os métodos usados para investigar essas interações devem ser capazes de detetar e medir a seletividade do ligando para G-quadruplex *versus* ADN de cadeia dupla ou outras estruturas secundárias.

Pelo facto de os quadruplexes apresentarem elevado grau de polimorfismo estrutural é importante determinar não só os locais de ligação mas também o seu modo de interação. Cada técnica tem as suas próprias vantagens e desvantagens e é, em geral, necessário combinar mais do que um método para obter informações completas sobre as características das interações G-quadruplex/ligando.³⁸

Uma grande variedade de técnicas tem sido usada para estudar as interações de diversos compostos com os G-quadruplexes. Estas variam desde métodos simples, usados para avaliação de propriedades como por exemplo a afinidade do ligando ao G-quadruplex, até métodos mais sofisticados utilizados para a obtenção de dados cinéticos, termodinâmicos, estequiométricos e conformacionais em estudos de relação estrutural-atividade.

Na tabela 1 encontram-se descritas as diferentes técnicas instrumentais que podem ser usadas para estudar interações entre G-quadruplexes e ligandos. Para cada método, é fornecido um breve enquadramento da sua utilização bem como algumas vantagens e desvantagens do método.

Tabela 1 – Técnicas utilizados para estudar as interações G-quadruplex/ligando

| | <i>Utilização prática</i> | <i>Vantagens e Desvantagens</i> |
|--|---|---|
| <i>Espetroscopia UV/visível</i> | Estudo da estabilidade dos G-quadruplex e das suas interações com ligandos. ⁶⁹ | Simples, requer pouca quantidade de material. ⁶⁹ |
| <i>Dicroísmo circular</i> | Método direto para monitorização de mudanças conformacionais na estrutura do ADN induzidas por modificações do ambiente, como pH, temperatura, concentrações ou a adição de agentes de aglomeração. Fornece informações sobre os locais de ligação. ³⁹ | Requer pequenas quantidades de material; Não permite determinar inequivocamente o tipo de conformação adotada pelo quadruplex ³⁹ |
| <i>Espetroscopia de fluorescência</i> | Estudo da afinidade e seletividade de ligandos para G-quadruplexes. ¹⁰⁵ | Alta sensibilidade, grande escala de concentração linear e seletividade ¹⁰⁵ |
| <i>Medições da temperatura de desnaturação (melting point)</i> | Avaliação do grau de estabilização de um G-quadruplex. Muito usado para estudar a seletividade do ligando para G-quadruplex <i>versus</i> ADN duplex. ³⁸ | Requer pouca quantidade de material; não permite medições precisas das constantes de afinidade. ³⁸ |
| <i>Ressonância magnética nuclear</i> | Monitorização de interação dos ligandos com os G-quadruplex e elucidação da estrutura do complexo ADN-ligando. ⁴³ | Possibilita a deteção de várias espécies em equilíbrio e determinação de populações relativas. ⁴³ |
| <i>Espetrometria de massa</i> | Uma das técnicas mais comuns para estudar as interações não covalentes entre ácidos nucleicos e ligandos. ⁴³ | Requer pequena quantidade de material. Permite identificar e determinar as massas de moléculas e complexos. ⁴³ |
| <i>Ressonância de plasmónica de superfície (SPR)</i> | Técnica ótica que fornece informações quantitativas sobre a afinidade entre o ligando e o ADN permitindo determinar a estequiometria, força e cinética da interação. ⁷⁰ | Possibilita a comparação de forma rápida e fácil da ligação de vários ligandos diferentes com diferentes quadruplexes. ⁷⁰ |
| <i>Calorimetria de titulação isotérmica (ITC)</i> | Avaliação de parâmetros termodinâmicos, tais como entalpia e entropia, e determinação de constantes de afinidade e estequiometrias de ligação. ⁷⁰ | Mede diretamente parâmetros termodinâmicos. ⁷⁰ |

| | | |
|------------------------------------|--|---|
| <i>Ensaio bioquímicos in vitro</i> | Estudo da inibição da atividade da enzima telomerase através da avaliação da extensão dos produtos do PCR. ³⁸ | A maioria baseia-se em reações de PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>). ³⁸ |
|------------------------------------|--|---|

As técnicas mais comuns para estudar a afinidade e a seletividade de ligandos para estruturas do tipo G-quadruplex são as técnicas de espectroscopia ótica, nomeadamente a espectroscopia de absorção molecular UV-visível e a espectroscopia de fluorescência. Estes métodos são simples, rápidos, requerem pequenas quantidades de material e são de fácil acesso uma vez que os espectrômetros utilizados se encontram rotineiramente disponíveis nos laboratórios.

A espectroscopia de absorção molecular UV-visível segue o princípio de que as moléculas usadas como ligandos apresentam uma banda de absorção característica na região do visível. Quando ocorre interação entre o ligando e o G-quadruplex (ou ADN de cadeia dupla) ocorre um deslocamento desta banda característica. A magnitude deste deslocamento é indicativa da força de ligação entre o ADN e o ligando, sendo que, quanto maior o deslocamento maior a força de ligação. Experiências envolvendo titulação do ADN com o ligando (ou vice-versa) permitem obter informações quantitativas, como estequiometrias e constantes de ligação. Existem vários exemplos recentes em que as interações entre o ligando, porfirina ou ftalocianina, e o G-quadruplex são estudadas através de uma titulação por espectroscopia de absorção molecular UV-visível.^{65,66,69,70,72}

A espectroscopia de fluorescência apresenta várias vantagens, em relação a outras técnicas, nomeadamente a sua alta sensibilidade, grande escala de concentração linear e seletividade. Para estudar as interações ligando/G-quadruplex, existem várias abordagens diferentes usando espectroscopia de fluorescência, estando entre as mais conhecidas o *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET) e o *G-quadruplex Fluorescent Intercalator Displacement* (G4-FID). Uma vez que o G4-FID foi um dos métodos usados no decorrer deste trabalho este será descrito de forma mais pormenorizada.

Este método baseia-se na perda de fluorescência do ligando laranja de tiazole, (TO do inglês *Thiazole Orange*) que se encontra ligado ao G-quadruplex, ao ser substituído por um ligando num processo de competição pela ligação ao G-quadruplex (figura 16). O TO tem muito baixa intensidade de fluorescência quando está livre, no entanto, esta aumenta por um fator de cerca de 1000 quando este está ligado ao G-quadruplex. Assim, uma diminuição

da intensidade de fluorescência é indicativa da substituição do TO pelo ligando no G-quadruplex, esta substituição revela a afinidade do ligando para o quadruplex.

O G4-FID pode também fornecer informações sobre a seletividade do ligando para o G-quadruplex. Este processo é repetido usando diferentes concentrações do ligando e com diferentes conformações de ácido nucleico para determinar a afinidade aparente e a seletividade do ligando para os quadruplexes nas suas diferentes conformações.¹⁰⁵ Esta técnica foi utilizada por outros autores para estudar a afinidade e seletividade de vários tipos de ligandos,^{19,59,105,106} incluindo porfirinas¹⁰⁷ e ftalocianinas.⁷³

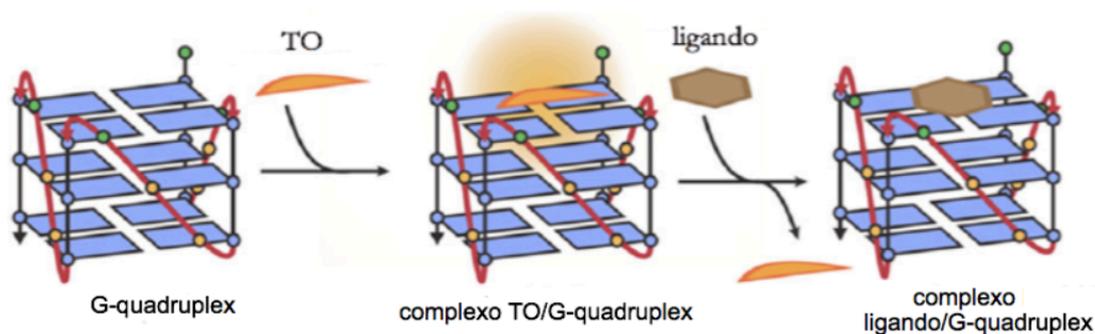


Figura 16 - Representação das principais etapas do método de G4-FID: ligação do ADN (quadruplex ou duplex) ao TO, complexo fluorescente e substituição da sonda fluorescente do ADN pelo ligando. (adaptado de 106)

Se se pretender estudar a topologia e a estrutura do complexo G-quadruplex/ligando são utilizadas outro tipo de técnicas nomeadamente o dicroísmo circular, a ressonância magnética nuclear ou espectrometria de massa.⁴³ Para determinar parâmetros de interação termodinâmicos e cinéticos, cruciais para a compreensão da força motriz para a formação do complexo ligando/quadruplex, a calorimetria de titulação isotérmica (ITC) e a ressonância plasmônica de superfície (SPR) são normalmente as técnicas eleitas.^{38,70}

Além dos métodos instrumentais referidos anteriormente, alguns ensaios bioquímicos *in vitro* foram desenvolvidos para avaliar a capacidade de um ligando inibir a telomerase *in vitro* através da estabilização dos G-quadruplex formados pela sequência telomérica humana. Grande parte destes ensaios bioquímicos tem por base reações de *Polymerase Chain Reaction* (PCR), onde são replicadas sequências específicas de ADN milhares ou milhões de vezes.³⁸ Um dos ensaios mais conhecidos é o *Telomere Repeat Amplification Protocol* (TRAP) onde a atividade enzimática da telomerase é medida sendo esta diretamente proporcional à quantidade de resíduos TTAGGG presente.¹⁰⁸

1.5. Objetivos do trabalho

Os principais objetivos deste trabalho são:

- Estudar as interações de uma série de porfirinas e ftalocianinas catiónicas com estruturas de ADN na configuração de G-quadruplexes e em cadeia dupla recorrendo a técnicas de espectroscopia UV/visível;
- Selecionar os ligandos com maior capacidade de reconhecer e estabilizar no núcleo celular, o ADN na configuração de quadruplex na presença de uma grande quantidade de ADN de cadeia dupla e confirmar essa apetência recorrendo à técnica espectroscopia de fluorescência (G4-FID) e de determinação da temperatura de desnaturação (T_m);
- Verificar por dicroísmo circular as alterações conformacionais nas estruturas de ADN após interação com os ligandos mais promissores;
- Tirar conclusões sobre as características estruturais que determinado ligando deve conter de modo a reconhecer preferencialmente o ADN na configuração de quadruplex na presença de uma grande quantidade de ADN de cadeia dupla de modo a inibir a atividade da enzima telomerase e assim, controlar a proliferação de células cancerosas.

Capítulo 2.
Resultados e Discussão

2. Resultados e Discussão

Com foi referido anteriormente, o principal objetivo do trabalho desenvolvido foi estudar a seletividade de uma série de porfirinas e ftalocianinas catiónicas para estruturas de ADN na configuração de G-quadruplexes e em cadeia dupla e avaliar a respetiva estabilidade dos adutos formados.

As estruturas das porfirinas e das ftalocianinas selecionadas para este estudo encontram-se apresentadas respetivamente nas figuras 17 e 18 e todos estes derivados apresentam como elemento comum unidades de piridina quaternizadas e portanto responsáveis pela presença de cargas positivas no macrociclo. No anexo 1 podem ser consultados os nomes dos ligandos correspondentes às abreviaturas usadas ao longo do trabalho.

Entre as seis porfirinas estudadas encontra-se a *meso*-tetraquis(*N*-metilpiridínio-4-il)porfirina, reconhecida na literatura com TMPyP4 e seguidamente identificada apenas como **TMPyP**, que foi selecionada como referência. Nesta seleção foi tida em conta a sua boa afinidade para os G-quadruplexes embora, como já foi referido, com baixa seletividade e o número de estudos já publicados que permitiram assim validar todos os ensaios realizados.^{84,86}

Esta porfirina que se apresenta na forma de base-livre e substituída nas quatro posições *meso* por quatro piridinas quaternizadas por grupos metilo serviu de base para a seleção das outras porfirinas usadas neste estudo (figura 17) as quais possuem alterações estruturais introduzidas com o objetivo de melhorar a sua afinidade e seletividade para os G-quadruplexes. As principais diferenças estruturais são:

- para a ZnTMPyP a presença do ião metálico zinco(II) no núcleo da porfirina;
- para a β -TMPyP a localização das quatro unidades de piridina quaternizadas com grupos metilo nas posições *beta*-pirrólicas;
- para as TPPyP e β -TPPyP o comprimento do grupo alquilo ligado às unidades de piridina quando comparado com as porfirinas homólogas TMPyP e β -TMPyP (pentilo *versus* metilo);
- para a TSPyP a presença de um espaçador (C₆F₄S) entre o núcleo de porfirina e as quatro unidades de piridina quaternizadas com grupos metilo.

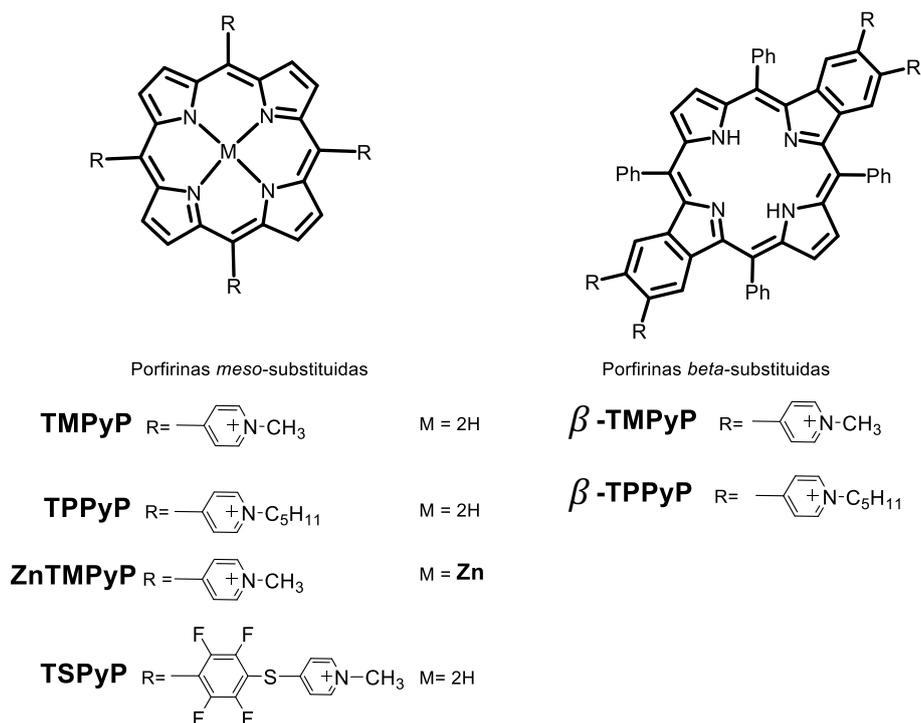


Figura 17 – Estrutura das porfirinas estudadas neste trabalho

No que diz respeito às ftalocianinas estudadas $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$, $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$, $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_4$ e $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_4$, (figura 18) também estas apresentam características estruturais distintas variando entre si:

- no número de cargas presentes na sua estrutura - quatro ou oito;
- na posição dessas cargas no anel do grupo substituinte - mais ou menos periféricas;
- na presença de átomos de azoto ou de enxofre a fazer a ligação entre os substituintes catiónicos e o núcleo de ftalocianina.

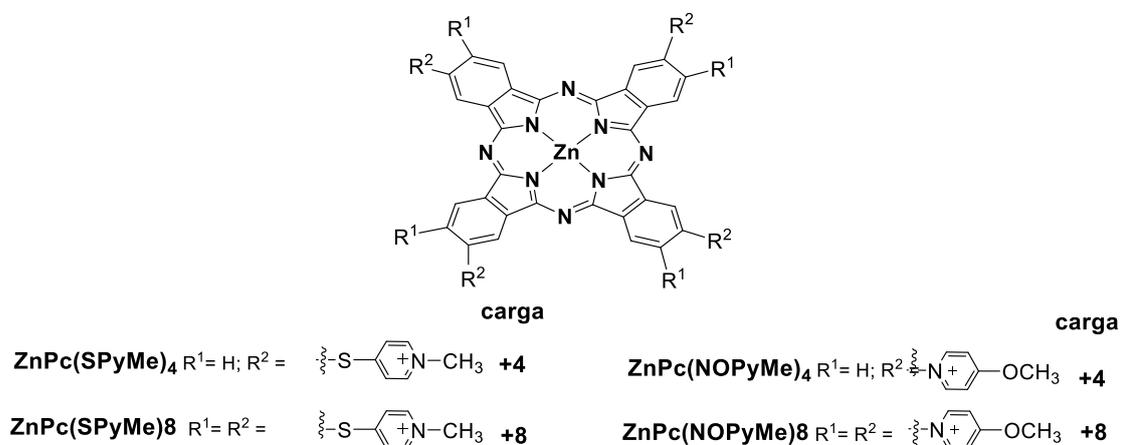


Figura 18 – Estrutura das ftalocianinas estudadas neste trabalho

A capacidade desta série de derivados interagir com estruturas de ADN foi avaliada na presença de uma sequência de ADN de cadeia dupla (5GC) e de quatro G-quadruplexes com as seguintes topologias: dois tetramoleculares (T_2G_5T , TAG_3T_2A), um bimolecular ($G_4T_4G_4$) e um unimolecular ($AG_3(T_2AG_3)_3$). Nestes estudos os resultados obtidos são comparados com os obtidos, nas mesmas condições experimentais, para a TMPyP.

2.1. Estudos das interações entre os ligandos catiónicos baseados em porfirinas e ftalocianinas por UV-Vis

Devido às excelentes propriedades óticas das porfirinas e das ftalocianinas, as suas interações ao ADN podem ser avaliadas recorrendo a titulações monitoradas por espectroscopia de UV-Vis. Usando esta técnica foi efetuado um estudo comparativo dos ligandos selecionados de modo a avaliar quais apresentavam maior afinidade para os G-quadruplexes. Para isso foram realizadas, com cada ligando, seis titulações distintas:

- quatro com os G-quadruplexes com as diferentes topologias referidas, as tetramoleculares T₂G₅T e TAG₃T₂A, a bimolecular G₄T₄G₄ e a unimolecular AG₃(T₂AG₃)₃ (reconhecida na literatura com 22AG);
- uma com a sequência de ADN de cadeia dupla 5GC;
- uma titulação com o tampão fosfato (PBS).

Para cada titulação foi analisado o batocromismo (desvio para comprimentos de onda maiores (*red shift*)) e o hipocromismo/hipercromismo (diminuição/aumento da intensidade dessas mesmas bandas) resultantes da interação. Este desvio da banda característica do ligando, banda Soret no caso das porfirinas e segunda banda Q no caso das ftalocianinas, quando titulado com quantidades crescentes de ADN resulta da interação do ligando com as bases do ADN sendo que, quanto maior o desvio observado maior a força da interação.^{65,66,69,70} A análise conjunta do desvio e decréscimo/aumento sugere ainda o tipo de ligação que pode estar a ocorrer. Em todas as titulações efetuadas foi tido em conta o hipocromismo conferido pelo tampão, sendo que, todos os resultados relativos ao hipocromismo/hipercromismo apresentados neste relatório foram corrigidos.

Como já foi referido anteriormente, a TMPyP já foi amplamente estudada e é descrita como sendo uma molécula que apresenta uma boa afinidade para os G-quadruplexes, porém é pouco seletiva.^{84,86} Esta falta de seletividade por parte de TMPyP justifica a procura de moléculas alternativas mais seletivas, de modo a diminuir os efeitos secundários associados ao seu uso na formulação de fármacos e em contexto clínico.

Em seguida serão apresentados e discutidos os resultados das várias titulações com cada série de ligandos.

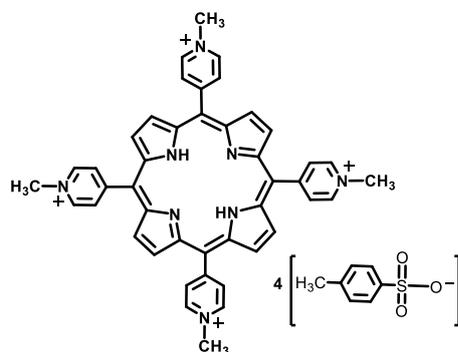
2.1.1. Porfirinas

Os estudos de titulação com as várias sequências de ADN foram iniciados com a porfirina de referência TMPyP, e foram então estendidos às outras porfirinas selecionadas: ZnTMPyP, β -TMPyP, TPPyP, β -TPPyP e TSPyP.

Para não sobrecarregar a apresentação dos resultados optou-se por apresentar para todas as porfirinas apenas os espectros obtidos nas titulações com 5GC (cadeia dupla), T₂G₅T e AG₃(T₂AG₃)₃ (G-quadruplexes tetramolecular e unimolecular, respetivamente). Os espectros obtidos com os restantes oligonucleótidos e com o tampão fosfato podem ser consultados nos anexos 2 a 7.

Os valores de batocromismo e hipocromismo/hipercromismo observados para todas as sequências de ADN estudadas são apresentados em forma de tabela e, com o intuito de facilitar a interpretação e análise dos resultados, entre parênteses são também apresentados os resultados obtidos para a TMPyP. A estrutura de cada porfirina que está a ser discutida é também apresentada e a azul está identificada a característica estrutural que varia em relação à TMPyP.

2.1.1.1. TMPyP



Estrutura da TMPyP

Os espectros de absorção obtidos para a TMPyP (concentração inicial de 2 μ M) quando titulada com quantidades crescentes de 5GC, T₂G₅T e AG₃(T₂AG₃)₃ encontram-se apresentados na figura 19 e as alterações finais observadas nos espectros de absorção para todas as sequências encontram-se compiladas na tabela 2 (ver os restantes espectros no anexo 2).

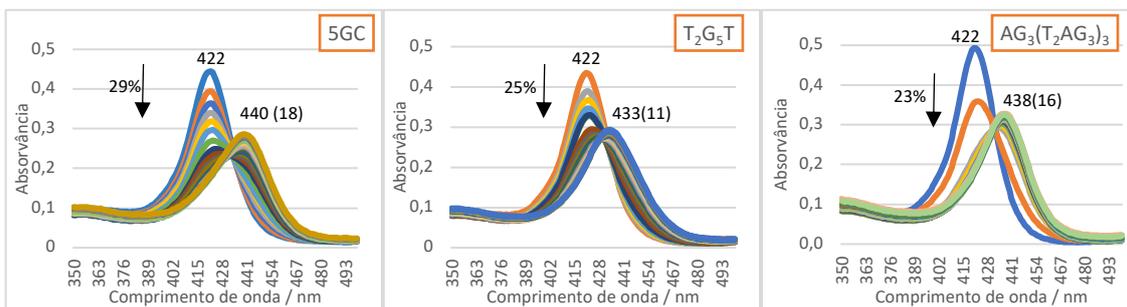


Figura 19 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de TMPyP com volumes crescentes de 5GC, T₂G₅T e AG₃(T₂AG₃)₃ em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

A interação de TMPyP com a sequência de cadeia dupla 5GC resultou num hipocromismo de 29% acompanhado por um batocromismo de 18 nm. Nas titulações com os G-quadruplexes foi observado um hipocromismo que variou entre 21 e 27% e um desvio na banda Soret da TMPyP entre os 11 e os 16 nm. Em qualquer uma das titulações foi possível identificar a presença de um ponto isobéstico, isto é o comprimento de onda ao qual a percentagem de porfirina livre iguala a percentagem de porfirina em interação com o ADN.

Tabela 2 - Resultados obtidos nas titulações da TMPyP com os diferentes oligonucleótidos

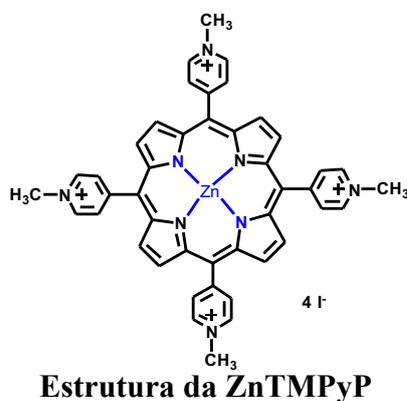
| | ϵ | Máximo da Soret/nm | Hipocromismo (%) | Batocromismo (nm) |
|--|------------|--------------------|------------------|-------------------|
| <i>Tampão</i> | 226000 | 422 | 9 | 0 |
| <i>5GC</i> | | | 29 | 18 |
| <i>T₂G₅T</i> | | | 25 | 11 |
| <i>TAG₃T₂A</i> | | | 21 | 13 |
| <i>G₄T₄G₄</i> | | | 27 | 13 |
| <i>AG₃(T₂AG₃)₃</i> | | | 23 | 16 |

Estes resultados estão de acordo com a literatura, mostrando que a TMPyP apresenta uma boa interação com os G-quadruplexes, porém é pouco seletiva para estas estruturas uma vez que apresenta resultados semelhantes para a cadeia dupla.^{69,70}

Assim, é importante encontrar moléculas com boa afinidade para o ADN tal como a TMPyP, porém mais seletivas para G-quadruplexes. Os estudos realizados com os restantes

ligandos estão em consonância com este interesse e são também comparados com os resultados obtidos para a porfirina TMPyP.

2.1.1.2. ZnTMPyP



Os resultados finais obtidos nas titulações do complexo de zinco, ZnTMPyP, (concentração inicial de 2 μM) com as várias seqüências de ADN encontram-se apresentados a tabela 3, e na figura 20 mostram-se os espectros de absorção resultantes da titulação do complexo com quantidades crescentes de 5GC, T₂G₅T e AG₃(T₂AG₃)₃ (ver os restantes espectros no anexo 3).

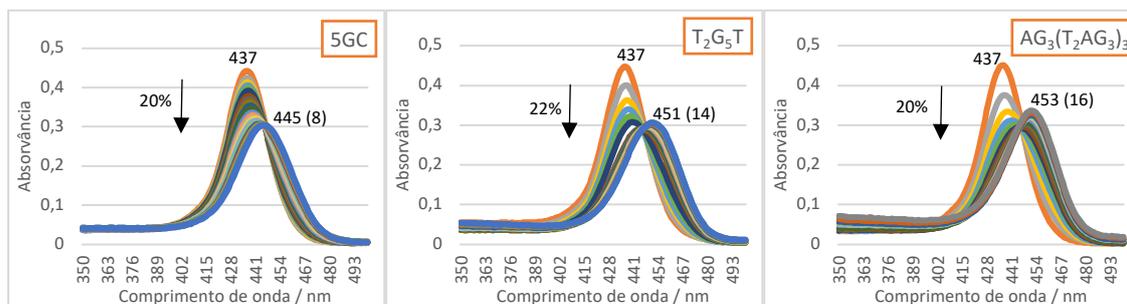


Figura 20 – Espectros absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μM de ZnTMPyP com volumes crescentes de 5GC, T₂G₅T e AG₃(T₂AG₃)₃ em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

Tabela 3 - Resultados obtidos nas titulações da ZnTMPyP com os diferentes oligonucleótidos

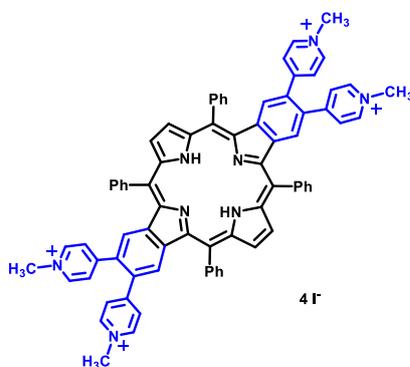
| | ϵ | Máximo da Soret/nm | Hipocromismo (%) | Batocromismo (nm) |
|--|------------|--------------------|------------------|-------------------|
| <i>Tampão</i> | 225000 | 437 | 9 (9) | 0 (0) |
| <i>5GC</i> | | | 20 (29) | 8 (18) |
| <i>T₂G₅T</i> | | | 22 (25) | 14 (11) |
| <i>TAG₃T₂A</i> | | | 9 (21) | 15 (13) |
| <i>G₄T₄G₄</i> | | | 15 (27) | 12 (13) |
| <i>AG₃(T₂AG₃)₃</i> | | | 13 (23) | 15 (16) |

(entre parenteses - valores relativos a TMPyP)

Estes estudos mostram que a interação de ZnTMPyP com a sequência de cadeia dupla 5GC resultou num hipocromismo de 20% acompanhado por um batocromismo de 8 nm. Para os diferentes G-quadruplexes os valores de hipocromismo variaram entre 9 e 22% e o desvio da banda Soret máximo observado foi de 15 nm. Em todas as titulações com os G-quadruplexes foi identificado um ponto isosbético.

Estes resultados mostram que, tal como a TMPyP, a ZnTMPyP apresenta boa interação com qualquer um dos G-quadruplexes, sendo esta bastante superior à observada para o ADN de cadeia dupla (5GC). Estes resultados apontam para que a presença do ião metálico zinco(II) aumenta consideravelmente a seletividade da TMPyP para os G-quadruplexes tornando esta molécula uma boa candidata para a inibição da telomerase. Estes resultados estão de acordo com a literatura, onde é referido que compostos metálicos apresentam no geral uma interação superior com os G-quadruplexes, sendo mais seletivos para G-quadruplexes do que para o ADN de cadeia dupla.⁶¹

2.1.1.3. β -TMPyP



Estrutura da β -TMPyP

As alterações observadas nos espectros de absorção da porfirina β -TMPyP (porfirina com os grupos metilpiridínio nas posições *beta*-pirrólicas) quando esta foi titulada com quantidades crescentes de 5GC, T₂G₅T e AG₃(T₂AG₃)₃ estão apresentadas na figura 21 e com os restantes oligonucleótidos no anexo 4.

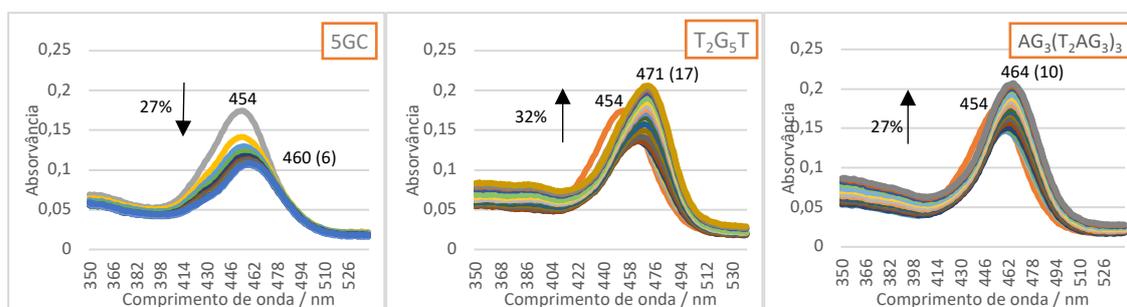


Figura 21 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de β -TMPyP com volumes crescentes de 5GC, T₂G₅T e AG₃(T₂AG₃)₃ em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

Na tabela 4 encontram-se os resultados obtidos com todos os oligonucleótidos no final dessas titulações. Neste caso observou-se hipocromismo com tampão e com 5GC, que foi aqui representado pelo sinal menos (-), para distinguir do hiperromismo para as restantes titulações que foi representado pelo sinal mais (+).

Tabela 4 - Resultados obtidos nas titulações de β -TMPyP com os diferentes oligonucleótidos.

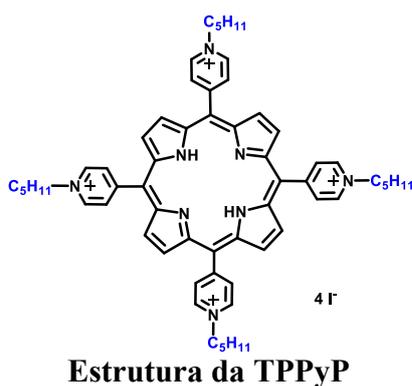
| | ϵ | Máximo da Soret/nm | Hipo/Hiper cromismo (%) | Batocromismo (nm) |
|--|------------|--------------------|-------------------------|-------------------|
| <i>Tampão</i> | 85350 | 454 | -19 (-9) | 0 (0) |
| <i>5GC</i> | | | -27 (-29) | 6 (18) |
| <i>T₂G₅T</i> | | | +32 (-25) | 17 (11) |
| <i>TAG₃T₂A</i> | | | +22 (-21) | 18 (13) |
| <i>G₄T₄G₄</i> | | | +27 (-27) | 13 (13) |
| <i>AG₃(T₂AG₃)₃</i> | | | +27 (-23) | 10 (16) |

(entre parenteses - valores relativos a TMPyP)

A interação da β -TMPyP com a sequência de cadeia dupla 5GC resultou num hipocromismo de 27% acompanhado por um batocromismo de 6 nm. Com os G-quadruplexes observou-se um hiperromismo que variou entre os 22 e os 32% e um batocromismo da banda Soret que variou entre os 10 e os 18 nm.

Estes resultados indicam que, em comparação com TMPyP, se verifica uma maior seletividade desta porfirina para os G-quadruplexes do que para a sequência de cadeia dupla, em especial para os G-quadruplexes tetramoleculares T₂G₅T e TAG₃T₂A. Contudo, o ideal seria uma seletividade superior para o G-quadruplex unimolecular, neste caso AG₃(T₂AG₃)₃, uma vez que a topologia dos G-quadruplexes formados nos telómeros é unimolecular. Pode afirmar-se que, nas condições experimentais usadas, a alteração na porfirina dos substituintes da posição *meso* para a posição *beta* melhora a seletividade para os G-quadruplexes. O facto de na interação desta porfirina com os G-quadruplexes se verificar hipercromismo confirma também que ocorre uma forte interação entre a porfirina e estas estruturas de ADN.

2.1.1.4. TPPyP



No caso da porfirina TPPyP, que possui as quatro unidades de piridina quaternizadas com grupos pentilo, os resultados da titulação com os diferentes oligonucleótidos (ver figura 22, anexo 5 e tabela 5) permitem concluir que o seu comportamento é semelhante ao da TMPyP, mostrando boa interação com o ADN, tanto de cadeia dupla como na forma de G-quadruplex. No entanto, neste caso verificou-se um ligeiro aumento na seletividade para a estrutura do ADN em cadeia dupla.

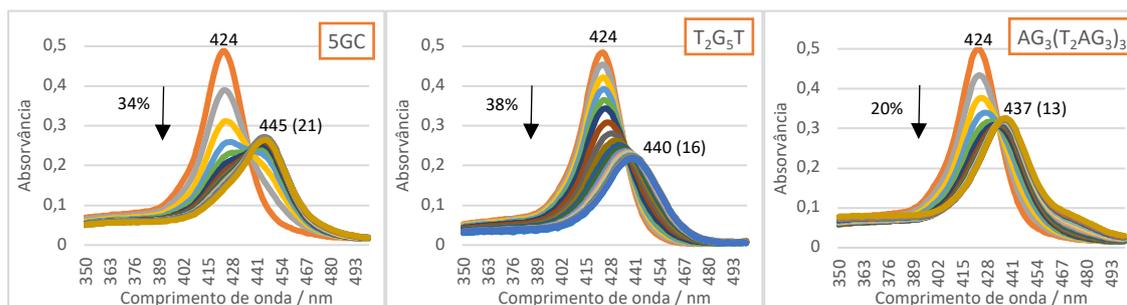


Figura 22 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de TPPyP com volumes crescentes de 5GC, T₂G₅T e AG₃(T₂AG₃)₃ em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

Tabela 5 - Resultados obtidos nas titulações da TPPyP com os diferentes oligonucleótidos

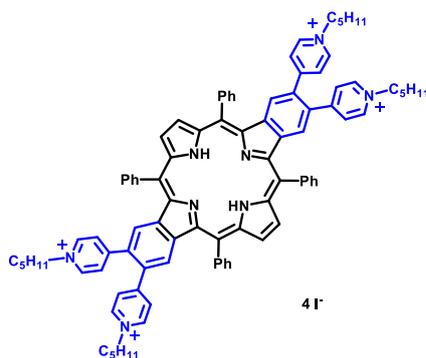
| | ϵ | Máximo da Soret/nm | Hipocromismo (%) | Batocromismo (nm) |
|--|------------|--------------------|------------------|-------------------|
| <i>Tampão</i> | 244445 | 424 | 13 (9) | 0 (0) |
| <i>5GC</i> | | | 34 (29) | 21 (18) |
| <i>T₂G₅T</i> | | | 38 (25) | 16 (11) |
| <i>TAG₃T₂A</i> | | | 13 (21) | 12 (13) |
| <i>G₄T₄G₄</i> | | | 21 (27) | 11 (13) |
| <i>AG₃(T₂AG₃)₃</i> | | | 20 (23) | 13 (16) |

(entre parenteses - valores relativos a TMPyP)

De facto, da interação da porfirina TPPyP com a sequência de cadeia dupla 5GC resultou um hipocromismo de 34% acompanhado de um batocromismo de 21 nm. Com os G-quadruplexes observou-se hipocromismo que variou entre os 13 e os 38% e um batocromismo da banda Soret que variou entre os 11 e os 16 nm. Um ponto isobéptico foi observado em todos os casos.

Como a grande diferença estrutural entre a TPPyP e a TMPyP tem a ver com o tamanho da cadeia alifática dos grupos substituintes ligados às unidades de piridina (pentilo *versus* metilo), os resultados obtidos apontam para que, nas condições experimentais usadas, o aumento do tamanho desses substituintes contribua para um pequeno aumento da seletividade para estruturas de ADN de cadeia dupla, como se verificou no caso do oligonucleótido estudado, 5GC.

2.1.1.5. β -TPPyP



Estrutura da β -TPPyP

No caso da porfirina β -TPPyP, que tem grupos pentilpiridínio nas posições *beta*-pirrólicas, as titulações apenas foram realizadas na presença de 5GC, e das topologias G-quadruplexes T_2G_5T , TAG_3T_2A e $G_4T_4G_4$ (figura 23, anexo 6 e tabela 6). Neste caso observou-se hipocromismo, representado na tabela 6 pelo sinal menos (-), com tampão e hipercromismo, representado na tabela 6 pelo sinal mais (+), para as restantes titulações.

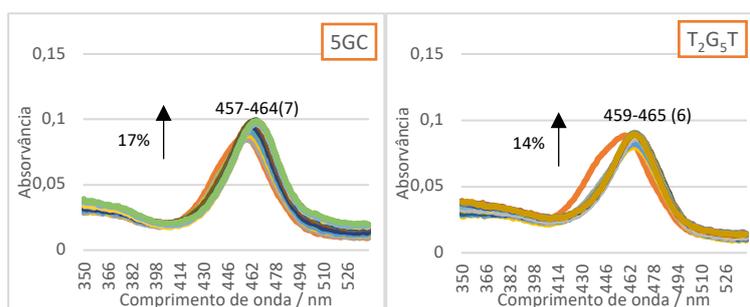


Figura 23 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de β -TPPyP com volumes crescentes de 5GC e T_2G_5T em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

Tabela 6 - Resultados nas titulações de β -TPPyP com os diferentes oligonucleótidos.

| | ϵ | Máximo da Soret/nm | Hipo/Hipercromismo (%) | Batocromismo (nm) |
|--|------------|--------------------|------------------------|-------------------|
| <i>Tampão</i> | 39680 | 459 | -9 (-9) | 1 (0) |
| <i>5GC</i> | | | +17 (-29) | 7 (18) |
| <i>T₂G₅T</i> | | | +14 (-25) | 6 (11) |
| <i>TAG₃T₂A</i> | | | +14 (-21) | 7 (13) |
| <i>G₄T₄G₄</i> | | | +24 (-27) | 5 (13) |

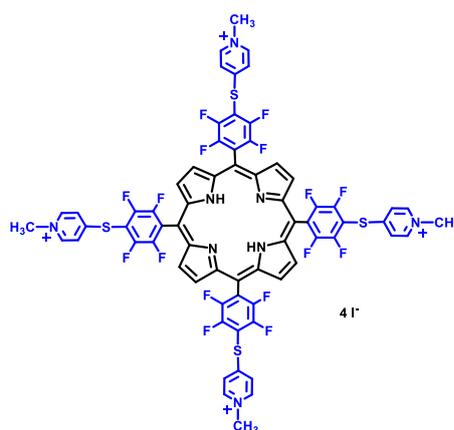
(entre parenteses - valores relativos a *TMPyP*)

Os resultados mostram que a interação de β -TPPyP com a sequência de cadeia dupla 5GC deu origem a 17% de hipercromismo acompanhado de 7 nm de batocromismo. Para todos os G-quadruplexes estudados observou-se também hipercromismo que variou entre 14 e 24% acompanhados de desvios no máximo da banda Soret entre 5 e 7 nm.

Como já foi referido, esta molécula apresenta duas grandes diferenças em relação à TMPyP: a localização dos grupos piridínio nas posições *beta* em vez de *meso* e a substituição dos grupos metilo por grupos pentilo. É interessante notar que nas experiências com a β -TMPyP, que difere da TMPyP na posição dos grupos substituintes catiónicos (*beta versus meso*) ocorreu uma alteração sendo observado hipercromismo, e não hipocromismo, com aumento de seletividade deste ligando para G-quadruplexes. Por outro lado, os resultados obtidos para a TPPyP, onde a única diferença para a TMPyP é a substituição dos grupos substituintes metilo por grupos pentilo, mostraram um aumento considerável da seletividade deste ligando para 5GC. Nas titulações com a β -TPPyP, que apresenta as duas características mencionadas, observou-se também uma mudança de hipocromismo para hipercromismo, contudo não se observou uma seletividade para nenhuma das sequências de ADN estudadas. Para além disso, a interação desta molécula com as cadeias de ADN parece também diminuir quando combinadas estas duas características estruturais.

Não foi realizado a titulação desta porfirina com $AG_3(T_2AG_3)_3$ uma vez que os resultados com os restantes G-quadruplexes não foram promissores.

2.1.1.6. TSPyP



Estrutura da TSPyP

As alterações observadas nos espectros de absorção quando a porfirina TSPyP, a qual apresenta as unidades de metilpiridínio separadas do núcleo de porfirínico pelo espaçador

(C₆F₄S), foi titulada com quantidades crescentes de tampão fosfato, 5GC, T₂G₅T (figura 24) e TAG₃T₂A (anexo 7) sugerem a ocorrência de fenómenos de agregação.

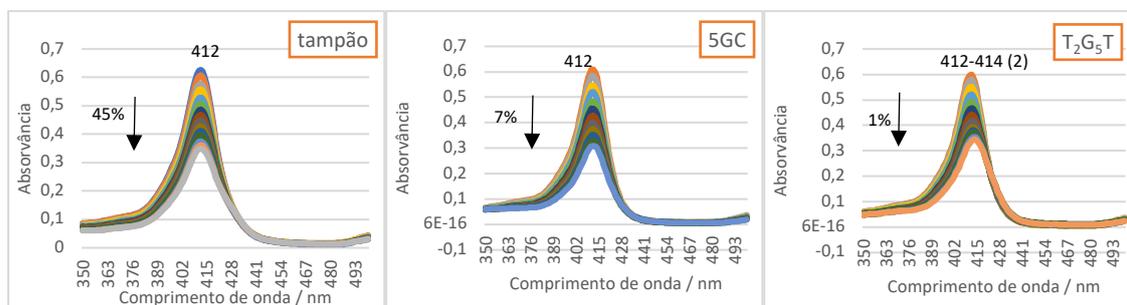


Figura 24 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de TSPyP com volumes crescentes de tampão e os oligonucleótidos 5GC e T₂G₅T em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

Na tabela 7 estão resumidos os resultados obtidos no final dessas titulações. Como se pode verificar, a banda Soret da TSPyP na titulação com tampão sofreu elevado hipocromismo (45%) que pode ser justificado pela tendência desta porfirina sofrer agregação na presença de tampão PBS.

Tabela 7 - Resultados obtidos nas titulações da TSPyP com os diferentes oligonucleótidos

| | ϵ | Máximo da Soret/nm | Hipocromismo (%) | Batocromismo (nm) |
|--------------------------------------|------------|--------------------|------------------|-------------------|
| <i>Tampão</i> | 316228 | 412 | 45 (9) | 0 (0) |
| <i>5GC</i> | | | 7 (29) | 0 (18) |
| <i>T₂G₅T</i> | | | 1 (25) | 2 (11) |
| <i>TAG₃T₂A</i> | | | 4 (21) | 4 (13) |

(entre parenteses - valores relativos a TMPyP)

A interação de TSPyP com a sequência de cadeia dupla 5GC resultou em 7% de hipocromismo e um batocromismo nulo. Com os G-quadruplexes foram observados máximos de 4% de hipocromismo e de 4 nm de batocromismo. Os baixos valores de hipocromismo e batocromismo observados para os diferentes oligonucleótidos estudados, quer de cadeia dupla, 5GC, quer G-quadruplexes, sugerem também que esta porfirina apresenta uma reduzida interação com ADN. Este facto pode dever-se aos fenómenos de

agregação da porfirina com o tampão, impedindo assim a sua interação com as sequências de ADN.

Assim, a presença de espaçadores (C_6F_4S) a separar as unidades metilpiridínio do núcleo de porfírico parece contribuir fortemente para a ocorrência de fenómenos de agregação no tampão utilizado impedindo assim a sua interação com o ADN.

Nas figuras 25 é apresentada uma análise global das várias alterações observadas nos espectros de absorção de UV-Vis no que se refere ao batocromismo (A) e ao hipocromismo/hipercromismo (B) observados quando as porfirinas e os diferentes oligonucleótidos se encontram na proporção de 1:2, proporção correspondente ao final da maioria das titulações realizadas. Dados os resultados pouco promissores das porfirinas β -TPPyP e TSPyP, estes não são apresentados.

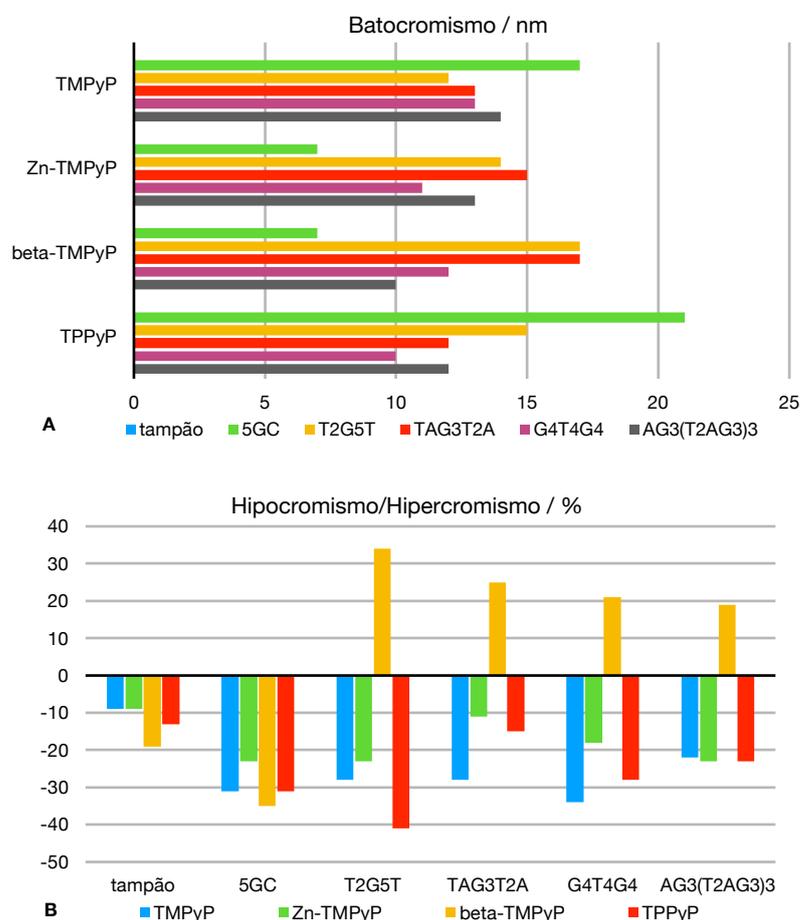


Figura 25 – Batocromismo (A) e Hipocromismo/Hipercromismo (B) obtido no final das titulações das várias porfirinas com as diferentes sequências de ADN

A análise das figuras anteriores permite concluir que, nas condições experimentais utilizadas:

- o íon metálico zinco(II) aumenta a seletividade de TMPyP para as estruturas de G-quadruplex;

- a presença de grupos metilpiridínio nas posições *beta* pirrólicas é relevante para a seletividade do ligando. O facto de se verificar hipercromismo apenas para esta porfirina (figura 25B) aponta para que ocorra uma interação mais forte entre esta porfirina e estruturas do tipo G-quadruplexes;

- o aumento do tamanho da cadeia alifática nas unidades de piridina parece aumentar significativamente a seletividade para o ADN de cadeia dupla;

- a presença de átomos de enxofre e de flúor na estrutura do ligando parecem contribuir para a ocorrência de fenómenos de agregação com o tampão impedindo assim a sua interação com as sequências de ADN.

De modo a confirmar os resultados promissores obtidos com os ligandos ZnTMPyP, β -TMPyP estas moléculas foram também estudadas recorrendo a outras técnicas, nomeadamente FID e experiências de *melting* (ver pontos 2.3 e 2.5 respetivamente). Pelo facto de a TPPyP ter mostrado seletividade para a estrutura em cadeia dupla, este ligando foi também estudado por estas técnicas como potencial controlo negativo.

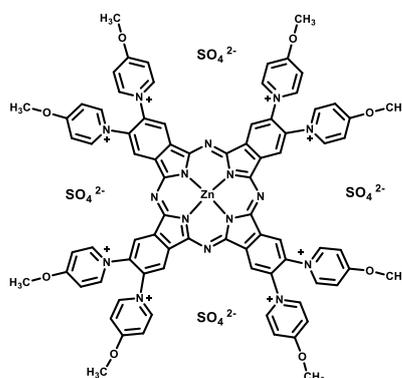
2.1.2. Ftalocianinas

Tal como no caso das porfirinas também se recorreu a titulações monitorizadas por espectroscopia de UV-Vis para estudar as interações entre as ftalocianinas ZnPc(NOPyMe)₈, ZnPc(SPyMe)₈, ZnPc(NOPyMe)₄ e ZnPc(SPyMe)₄ (Figura 18) e as várias sequências de ADN selecionadas.

Também aqui, os resultados finais das titulações, no que diz respeito ao batocromismo e hipocromismo/hipercromismo são apresentados em forma de tabela, estando entre parênteses os resultados obtidos para a TMPyP, de modo a facilitar a comparação. Tal como aconteceu nos estudos anteriores são apenas apresentados os espectros obtidos nas titulações com 5GC (cadeia dupla), T₂G₅T e AG₃(T₂AG₃)₃ (G-quadruplexes tetramolecular e unimolecular, respetivamente) podendo os espectros obtidos nas titulações com os outros oligonucleótidos, TAG₃T₂A e G₄T₄G₄, e com o tampão PBS ser consultados nos anexos 8-10. Nestes estudos, apenas se observou hipocromismo nas titulações efetuadas

com tampão enquanto para as restantes titulações se observou hiper Cromismo; estas alterações serão representadas nas tabelas pelos sinais menos (-) e mais (+), respetivamente.

2.1.2.1. $ZnPc(NOPyMe)_8$



Estrutura da $ZnPc(NOPyMe)_8$

A figura 26 mostra as alterações nos espectros de absorção da ftalocianina $ZnPc(NOPyMe)_8$ com oito cargas periféricas, quando esta foi titulada com quantidades crescentes de 5GC, T_2G_5T e $AG_3(T_2AG_3)_3$. Os espectros resultantes das titulações com PBS, TAG_3T_2A e $G_4T_4G_4$ e podem ser consultados no anexo 8.

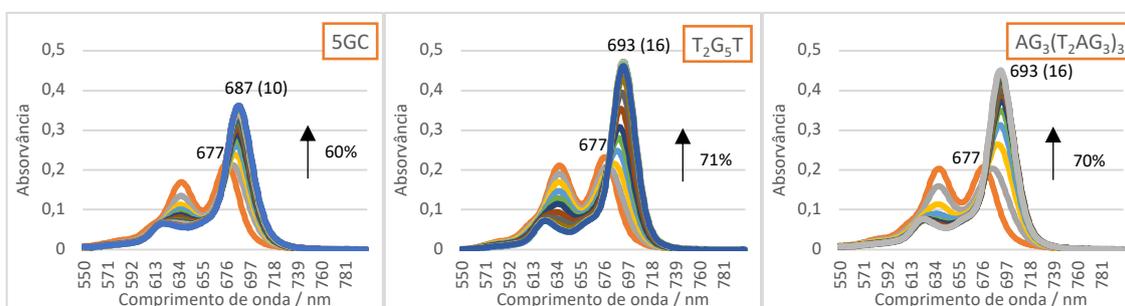


Figura 26 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μ M de $ZnPc(NOPyMe)_8$ com volumes crescentes de 5GC, T_2G_5T e $AG_3(T_2AG_3)_3$ em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

Os resultados obtidos no final dessas titulações (ver tabela 8) mostram que a interação de $ZnPc(NOPyMe)_8$ com a sequência de cadeia dupla 5GC produziu 69% de hiper Cromismo em simultâneo com um batocromismo de 10 nm. Com os G-quadruplexes foi também observado hiper Cromismo que variou entre 65% e 71% acompanhado de um desvio de cerca de 16 nm da segunda banda Q da ftalocianina.

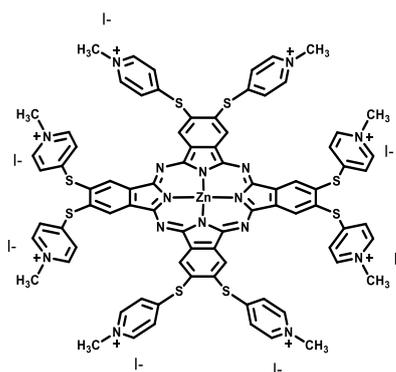
Tabela 8 - Resultados obtidos nas titulações da $ZnPc(NOPyMe)_8$ com os diferentes oligonucleótidos

| | ϵ | Máximo da banda Q/nm | Hipo/Hiper cromismo (%) | Batocromismo |
|--|------------|----------------------|-------------------------|--------------|
| <i>Tampão</i> | 106299 | 677 | -22 (-9) | 0 (0) |
| <i>5GC</i> | | | +60 (-29) | 10 (18) |
| <i>T₂G₅T</i> | | | +71 (-25) | 16 (11) |
| <i>TAG₃T₂A</i> | | | +69 (-21) | 15 (13) |
| <i>G₄T₄G₄</i> | | | +65 (-27) | 15 (13) |
| <i>AG₃(T₂AG₃)₃</i> | | | +70 (-23) | 16 (16) |

(entre parenteses - valores relativos a TMPyP)

Estes resultados revelaram uma boa interação da ftalocianina $ZnPc(NOPyMe)_8$ com o ADN com seletividade para os G-quadruplexes, não apresentando preferência para nenhuma das topologias de G-quadruplex estudadas. Esta ftalocianina apresenta oito cargas positivas, enquanto as porfirinas estudadas, incluindo a TMPyP, apresentam apenas quatro cargas positivas. Assim, e corroborando o que é referido na literatura, a presença de um maior número de cargas positivas nas estruturas dos ligandos parece aumentar a sua afinidade e seletividade para estruturas do tipo G-quadruplex devido ao maior do número de interações eletrostáticas que conduzem a uma maior estabilização.⁶¹⁻⁶³

2.1.2.2. $ZnPc(SPyMe)_8$



Estrutura da $ZnPc(SPyMe)_8$

Os resultados obtidos na titulação da $ZnPc(SPyMe)_8$ com os diferentes oligonucleótidos (figura 27, anexo 9 e tabela 9) mostram que esta ftalocianina, também com oito cargas, interage fortemente com as estruturas de ADN estudadas.

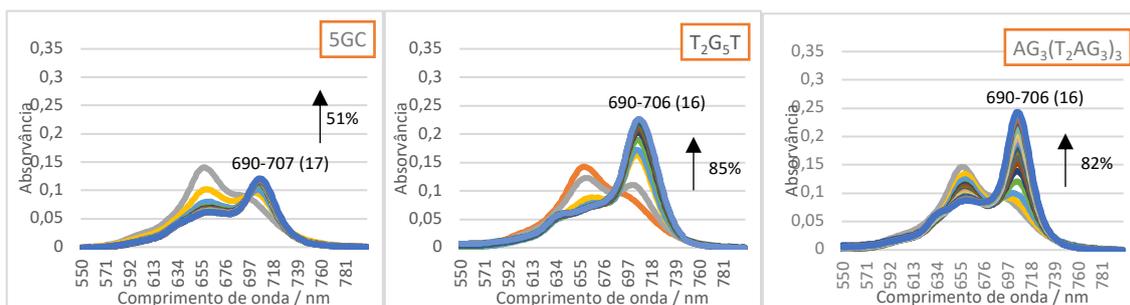


Figura 27 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μM de $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$ com volumes crescentes de 5GC, $\text{T}_2\text{G}_5\text{T}$ e $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$ em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

Tabela 9 - Resultados obtidos nas titulações $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$ com os diferentes oligonucleótidos

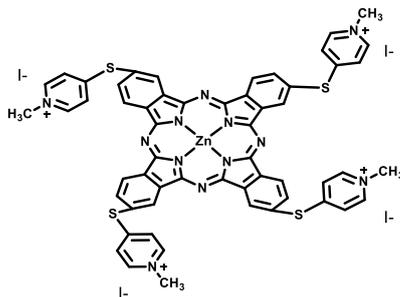
| | ϵ | Máximo da banda Q/nm | Hipo/Hipercromismo (%) | Batocromismo |
|--|------------|----------------------|------------------------|--------------|
| <i>Tampão</i> | 70808 | 658 | -22 (-9) | 0 (0) |
| <i>5GC</i> | | | +51 (-29) | 17 (18) |
| <i>T₂G₅T</i> | | | +85 (-25) | 16 (11) |
| <i>TAG₃T₂A</i> | | | +94 (-21) | 16 (13) |
| <i>G₄T₄G₄</i> | | | +79 (-27) | 17 (13) |
| <i>AG₃(T₂AG₃)₃</i> | | | +82 (-23) | 16 (16) |

(entre parenteses - valores relativos a *TMPyP*)

Da interação de $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$ com a sequência de cadeia dupla 5GC resultou um hipercromismo de 51% e um batocromismo de 17 nm. Para os G-quadruplexes ocorreu um hipercromismo acentuado, que variou entre 79 e 94% de e um desvio da segunda banda Q de 16 e 17 nm.

Tendo em conta apenas os valores de batocromismo (desvio para comprimentos de onda maiores) obtidos, esta ftalocianina interagiu fortemente com todas as cadeias de ADN, contudo, não se mostrou seletiva uma vez que foram obtidos desvios semelhantes, 16 a 17 nm, para todas as sequências de oligonucleótidos testadas. Assim, pode afirmar-se que esta ftalocianina parece apresentar uma maior afinidade para G-quadruplexes do que a *TMPyP* mas, tal como observado para a porfirina, não é seletiva para as estruturas de G-quadruplex. Esta elevada interação com as diversas estruturas de ADN, pode justificar-se, tal como no caso do ligando anterior pelo elevado número de cargas positivas presentes que conduzem a uma maior interação eletrostática com as cargas negativas do ADN. No entanto, a maior exposição dessas cargas na periferia do macrociclo serão responsáveis pela não seletividade desta molécula para as estruturas G-quadruplexes.

2.1.2.3. ZnPc(SPyMe)₄



Estrutura da ZnPc(SPyMe)₄

As alterações observadas nos espectros de absorção da ftalocianina tetracatiônica ZnPc(SPyMe)₄ quando esta foi titulada com quantidades crescentes de 5GC, T₂G₅T e AG₃(T₂AG₃)₃ estão apresentadas na figura 28 e no anexo 10 quando foi titulada com os restantes oligonucleótidos.

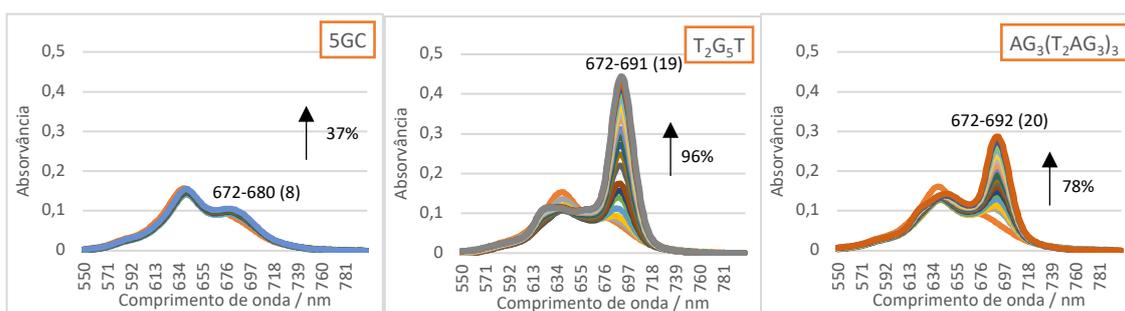


Figura 28 – Espectros de absorção UV-vis obtidos na titulação de uma solução 2 μM de ZnPc(SPyMe)₄ com volumes crescentes de 5GC, T₂G₅T e AG₃(T₂AG₃)₃ em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

A análise dos espectros anteriores e da tabela 10, onde estão compilados os resultados obtidos no final dessas titulações com esta ftalocianina tetracatiônica, mostra que a interação desta ftalocianina com a sequência de cadeia dupla 5GC resultou um hiperromismo de 37% acompanhado por um batocromismo de 8 nm. No caso dos G-quadruplexes verificaram-se alterações acentuados nos espectros, quer a nível de hiperromismo, que variou entre os 78 e os 99%, quer a nível de batocromismo uma vez que a segunda banda Q sofreu desvios que variaram entre os 18 e os 20 nm.

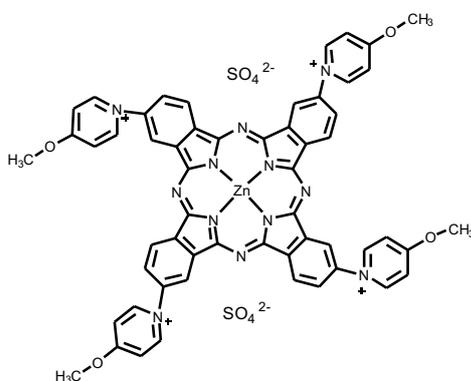
Tabela 10 - Resultados obtidos nas titulações $ZnPc(SPyMe)_4$ com os diferentes oligonucleótidos

| | ϵ | Máximo da banda Q/nm | Hipo/Hipercromismo (%) | Batocromismo |
|--|------------|----------------------|------------------------|--------------|
| <i>Tampão</i> | 78217 | 638 | -20 (-9) | 0 (0) |
| <i>5GC</i> | | | +37 (-29) | 8 (18) |
| <i>T₂G₅T</i> | | | +96 (-25) | 19 (11) |
| <i>TAG₃T₂A</i> | | | +99 (-21) | 18 (13) |
| <i>G₄T₄G₄</i> | | | +90 (-27) | 19 (13) |
| <i>AG₃(T₂AG₃)₃</i> | | | +78 (-23) | 20 (16) |

(entre parenteses - valores relativos a TMPyP)

Estes resultados apontam que a $ZnPc(SPyMe)_4$ é uma molécula promissora para inibição da telomerase uma vez que apresenta valores superiores, tanto de hipercromismo como de batocromismo, para as sequências de G-quadruplexes do que para a sequência de cadeia dupla 5GC. Os elevados valores de hipercromismo observados mostram também que a interação é forte.

2.1.2.4. $ZnPc(NOPyMe)_4$



Estrutura da $ZnPc(NOPyMe)_4$

Os resultados obtidos com a ftalocianina tetracatiónica, $ZnPc(NOPyMe)_4$ apontaram para que esta molécula em PBS se encontra fortemente agregada. De facto, as alterações no espectro de absorção de $ZnPc(NOPyMe)_4$ durante a titulação com quantidades crescentes do quadruplex T_2G_5T (Figura 29a) deram origem a 90% de hipercromismo juntamente com um batocromismo de apenas 1 nm da segunda banda Q.

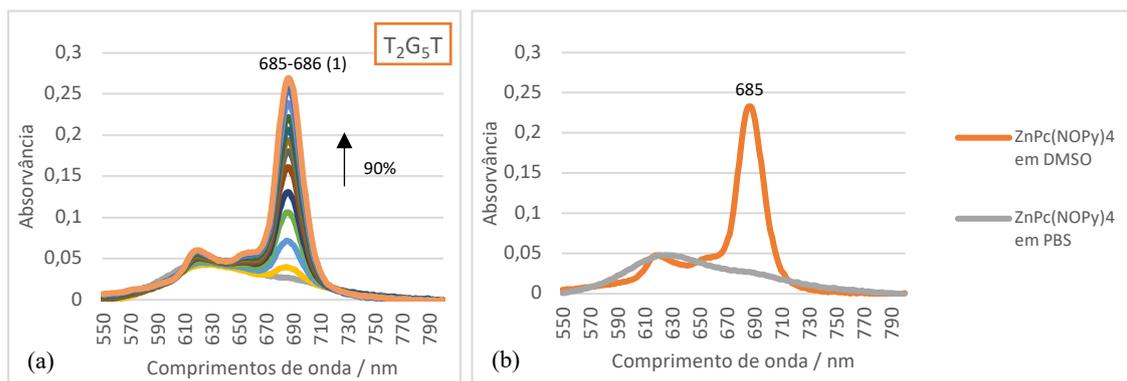


Figura 29 – Espectros de absorção UV-vis (a) da titulação de uma solução 2 μM de $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_4$ com volumes crescentes de $\text{T}_2\text{G}_5\text{T}$ com concentração de 25 μM ; (b) de uma solução 2 μM de $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_4$ em DMSO e em tampão fosfato.

Para melhor compreender estes resultados uma vez que, para as moléculas anteriores, a valores de hipercromismo acentuados estavam também associados valores de batocromismo acentuados, foi obtido o espectro desta ftalocianina em dimetilsulfóxido (DMSO), solvente que garante a sua completa solubilidade (figura 29b). O espectro obtido é semelhante ao espectro obtido no final da titulação da $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_4$ com $\text{T}_2\text{G}_5\text{T}$ (figura 29a). Assim, foi possível concluir que o elevado hipercromismo observado não corresponde à interação de $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_4$ com este G-quadruplex, mas provavelmente a fenômenos de desagregação deste ligando aquando a adição de G-quadruplex.¹⁰⁹ Como o espectro obtido quando o ligando não está agregado, é igual ao espectro obtido no final da titulação com oligonucleótido pode-se concluir que não há interação ligando-oligonucleótido. Devido a esta agregação e conseqüente inibição da interação com o ADN não foram realizadas as restantes titulações.

Ao fazer a análise global (figura 30 e 31) dos resultados obtidos com as quatro ftalocianinas estudadas é possível tirar algumas conclusões sobre duas características estruturais que podem estar relacionadas com a afinidade e seletividade destes ligandos para G-quadruplexes: o número de cargas positivas e o posicionamento das mesmas.

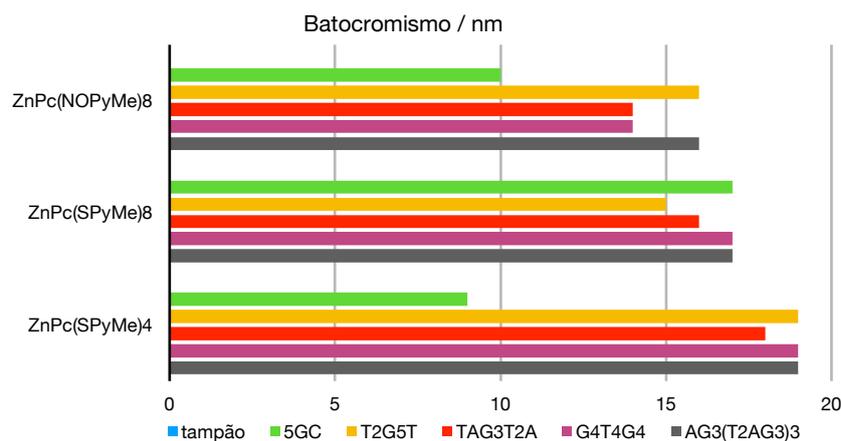


Figura 30 – Batocromismo obtido no final das titulações das várias ftalocianinas com as diferentes sequências de ADN.

As ftalocianinas $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$ e $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$ apresentam oito cargas positivas enquanto $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_4$ e $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_4$ apresentam apenas quatro cargas positivas. Por sua vez, as cargas de $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$ e $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_4$ estão localizadas na periferia dos ligandos, portanto mais expostas quando comparadas com as cargas das ftalocianinas $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$ e $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_4$ que se encontram menos expostas a possíveis interações.

Comparando as ftalocianinas $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$ e $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$, que apresentam o mesmo número de cargas, mas em posições diferentes, verifica-se que, nas condições experimentais usadas, ambas apresentam uma boa interação com ADN no entanto, no caso da ($\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$) onde as cargas se encontram menos periféricas, a seletividade para o G-quadruplex parece aumentar. Este facto poderá ser explicado pelo elevado número de cargas presentes nestas duas ftalocianinas. No caso da $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$, poderá ocorrer facilmente interação com qualquer das estruturas de ADN estudadas promovida provavelmente por uma elevada atração eletrostática entre as várias cargas positivas expostas da ftalocianina e as cargas negativas das estruturas de ADN.

Por outro lado, comparando $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$ e $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_4$, que diferem entre si apenas no número de cargas estando estas, nos dois casos, localizadas nas extremidades da molécula, verifica-se que ambas apresentam uma boa interação com ADN, porém, o ligando com menor número de cargas, $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_4$ apresentou maior seletividade para G-quadruplex.

É importante ter em conta que as diversas estruturas de ADN as quais são carregadas negativamente são estabilizadas por interações electrostáticas, quando próximas de

ligandos carregados positivamente. No caso do ADN de cadeia dupla, as suas cargas estão expostas, no entanto no caso dos G-quadruplex estas cargas podem estar mais ou menos expostas dependendo da sua topologia.¹¹⁰ Os resultados obtidos apontam para que seja necessária a existência de um equilíbrio entre o número de cargas do ligando e a sua posição de modo a que a estabilização, em especial dos G-quadruplexes, ocorra de uma forma efetiva.

A elevada agregação observada para a ftalocianina $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_4$ impossibilitou a comparação desta com a sua análoga $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$ que seria muito útil uma vez que poderia confirmar o comportamento observado para as duas moléculas anteriores, também estas variando apenas no seu número de cargas.

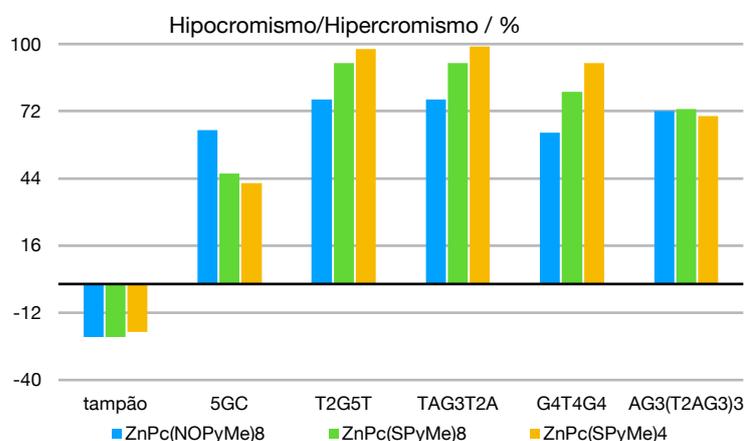


Figura 31 – Hipocromismo e hiperchromismo obtido no final das titulações das várias ftalocianinas com as diferentes seqüências de ADN.

De modo a perceber as elevadas percentagens de hiperchromismo obtidas para qualquer uma das ftalocianinas (ver figura 31), foram comparados os espectros obtidos com cada ftalocianina em DMSO, em PBS e os espectros obtidos no final das titulações com G-quadruplex e com PBS (figura 32).

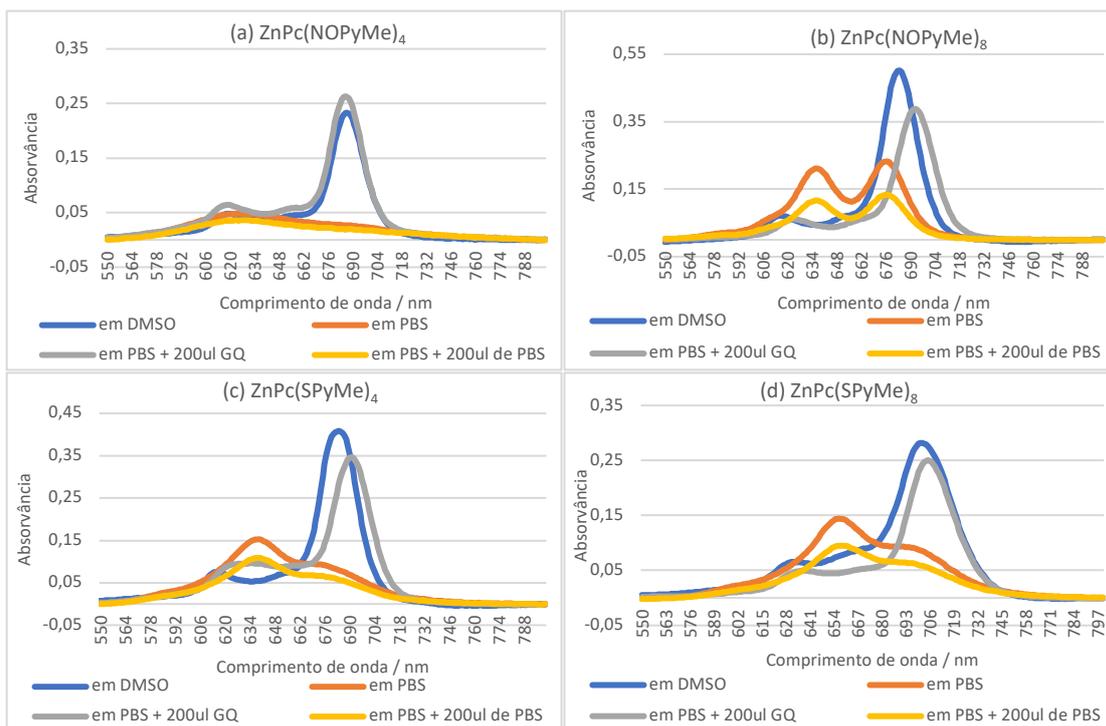


Figura 32 - Estudo de agregação das ftalocianinas (a) ZnPc(NOPyMe)₄; (b) ZnPc(NOPyMe)₈; (c) ZnPc(SPyMe)₄; (d) ZnPc(SPyMe)₈

Ao comparar os espectros das ftalocianinas em PBS com os espectros das ftalocianinas em DMSO, é possível verificar que de facto, todas as ftalocianinas estudadas apresentam agregação quando preparadas em PBS. Tal como discutido anteriormente, o espectro em DMSO da ftalocianina ZnPc(NOPyMe)₄ é semelhante ao espectro obtido no final da titulação com oligonucleótido (traços azul e cinza, figura 32a). Conclui-se que o elevado hiperromismo observado não correspondia à interação de ZnPc(NOPyMe)₄ com o G-quadruplex, mas a fenómenos de desagregação deste ligando quando é adicionado o G-quadruplex à solução.

Analisando os espectros obtidos para as restantes ftalocianinas, verificou-se que a adição de G-quadruplex não promove apenas fenómenos de desagregação, revelados pela semelhança observada entre os espectros obtidos em DMSO (traços azuis) e os espectros obtidos no final das titulações com G-quadruplex (traços cinzas), mas também a interação deste oligonucleótido com a ftalocianina.¹¹¹ O batocromismo existente entre os espectros obtidos no final das titulações com G-quadruplex e os espectros obtidos em DMSO, comprova essa interação.

Conclui-se assim que as elevadas percentagens de hipercromismo obtidas devem-se a fenómenos de desagregação. A adição de oligonucleótido a soluções de $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_4$, em PBS, promove a desagregação desta ftalocianina, mas não ocorre interação desta com o G-quadruplex. No entanto, para as ftalocianinas $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$, $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_4$ e $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$ a adição de oligonucleótido promove a desagregação e ocorrem também interações oligonucleótido/ligando.

2.2. Screening competitivo entre ligandos para diferentes sequências de ADN

Como foi possível verificar pelos estudos anteriores, a análise dos espectros de absorção UV-vis obtidos por titulação de ligandos com ADN permite estudar interações ligando-oligonucleótido. Esta técnica é vantajosa pois é simples de realizar, apresenta baixo consumo de reagentes e os espectros obtidos são de fácil interpretação. Contudo, a realização destes ensaios requer o dispêndio de um tempo considerável.

Assim, desenvolveu-se um método com o qual será possível verificar rapidamente, e em simultâneo, a apetência de dois ligandos distintos para uma determinada sequência de ADN recorrendo à titulação de misturas de ligandos. A este método deu-se o nome de *screening* competitivo. A metodologia consiste na mistura de dois ligandos, com a mesma concentração, seguida de titulação com uma quantidade específica de um oligonucleótido selecionado, ADN de cadeia dupla ou G-quadruplexes. Como resultado da adição do oligonucleótido, se ocorrer interação deste com os ligandos presentes em solução serão observadas alterações nas bandas de absorção dos ligandos. Esta abordagem encontra-se exemplificada na figura 33 para os ligandos TMPyP e ZnPc(NOPyMe)₈ e para o oligonucleótido AG₃(T₂AG₃)₃.

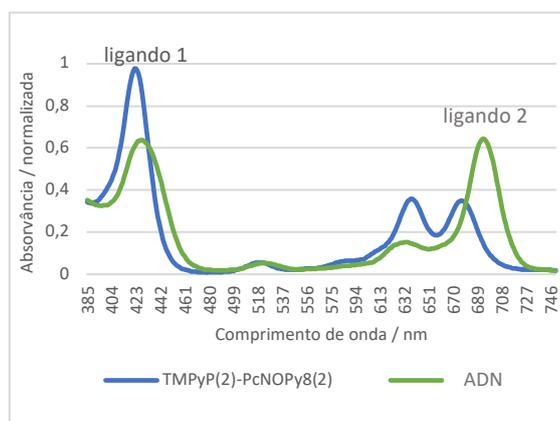


Figura 33 - Espectros de absorção UV-vis da competição TMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈
Traço azul- mistura de TMPyP e ZnPc(NOPyMe)₈ ; Traço verde - final da titulação com
AG₃(T₂AG₃)₃

Neste exemplo é apresentado o espectro final obtido após adição de uma quantidade determinada de ADN (traço verde) e são bastante perceptíveis as alterações ocorridas no espectro inicial da mistura de ligandos (traço azul). A interação produzirá maiores alterações

nas bandas características do ligando para o qual o oligonucleótido apresenta maior afinidade e seletividade, assim, analisando a figura anterior facilmente se conclui que a estrutura de ADN adicionada tem uma maior afinidade para o ligando 2.

Usando este modelo será então possível avaliar a apetência dos dois ligandos estudados para uma determinada sequência de ADN, tornando possível uma pré-seleção de ligandos (*screening*) mais rápida e mais económica. No entanto, para que a aplicação deste método possa ser correta e conclusiva é fundamental garantir que não há interação entre os ligandos e que os seus espectros de absorção não são sobreponíveis.

Como forma de justificar a importância dos espectros de absorção dos dois ligandos não serem sobreponíveis, são apresentados na figura 34 como exemplo os espectros de dois ligandos, onde após mistura não ocorre sobreposição (a) e onde é observada sobreposição (b).

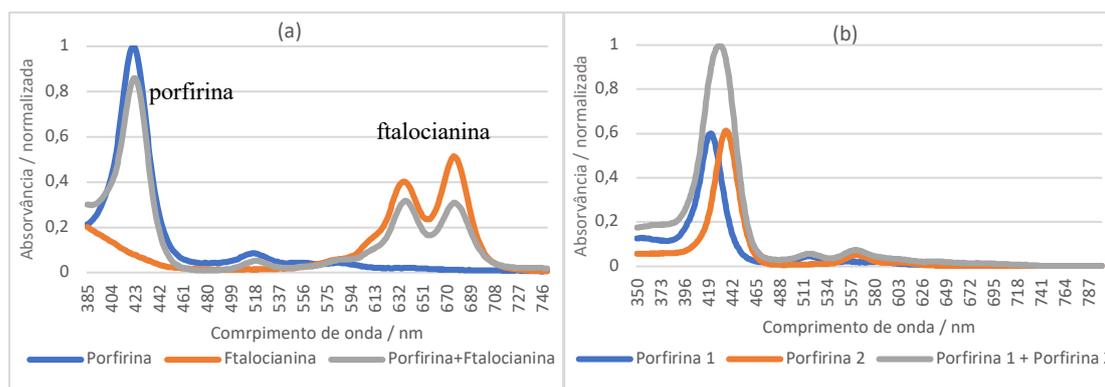


Figura 34 - Espectros de absorção: (a) de uma porfirina e de uma ftalocianina e da mistura porfirina + ftalocianina ; (b) de duas porfirinas antes e após serem misturadas.

Como se pode verificar nas figuras anteriores cada um dos ligandos apresenta um espectro de absorção característico, com um máximo de absorção distinto. Porém, nos espectros apresentados na figura 34b os máximos de absorção ocorrem a comprimentos de onda muito próximos. Como consequência da proximidade existente nos dois máximos de absorção, quando as duas porfirinas são misturadas, é observado um novo sinal, alargado, resultado da sobreposição dos dois sinais. A formação deste sinal torna inviável a realização do método de *screening* competitivo proposto uma vez que, ao titular a mistura com o oligonucleótido, não será possível reconhecer com qual dos ligandos este interage.

No capítulo anterior mostrou-se que os máximos de absorção das bandas características das ftalocianinas $ZnPc(NOPyMe)_8$ e $ZnPc(SPyMe)_4$ se localizam numa zona bem distinta das das porfirinas (ver exemplo da figura 34a). Assim, neste trabalho as competições foram realizadas entre porfirinas e ftalocianinas.

Inicialmente foi preparada uma solução contendo uma mistura da porfirina TMPyP e ftalocianina $ZnPc(NOPyMe)_8$, ambas com concentração de $2\mu M$ e o espectro de absorção resultante foi analisado. A esta solução foram feitas três adições de ADN de cadeia dupla 5GC ou de G-quadruplex unimolecular, $AG_3(T_2AG_3)_3$, de modo a obter as proporções:

- dois de mistura porfirina/ftalocianina para um de oligonucleótido (2:1);
- um de mistura porfirina/ftalocianina para um de oligonucleótido (1:1);
- um de mistura porfirina/ftalocianina para dois de oligonucleótido (1:2)

Procedeu-se também à adição de tampão PBS nas mesmas proporções para avaliar a influência do tampão na interação e proceder às respetivas correções.

Na figura 35 encontram-se as alterações observadas no espectro de absorção da mistura de TMPyP/ $ZnPc(NOPyMe)_8$ quando foi adicionado o ADN de cadeia dupla 5GC (figura 35a) e o G-quadruplex $AG_3(T_2AG_3)_3$, identificado nas legendas apenas como UNI, (figura 35b) nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2 e o PBS (figura 35c) nos volumes correspondentes.

Para as duas sequências de ADN, as proporções 2:1 e 1:1 deram origem a pequenas alterações no espectro inicial da mistura. No entanto, na proporção 1:2 (um de mistura porfirina/ftalocianina para dois de oligonucleótido) torna-se perceptível a afinidade e seletividade dos ligandos. A titulação com PBS não provocou alterações em nenhuma das proporções usadas. Com estas experiências foi possível concluir que, nas condições experimentais usadas, a proporção 1:2 seria a adequada pois tornava possível observar alterações conclusivas nos espectros de absorção obtidos.

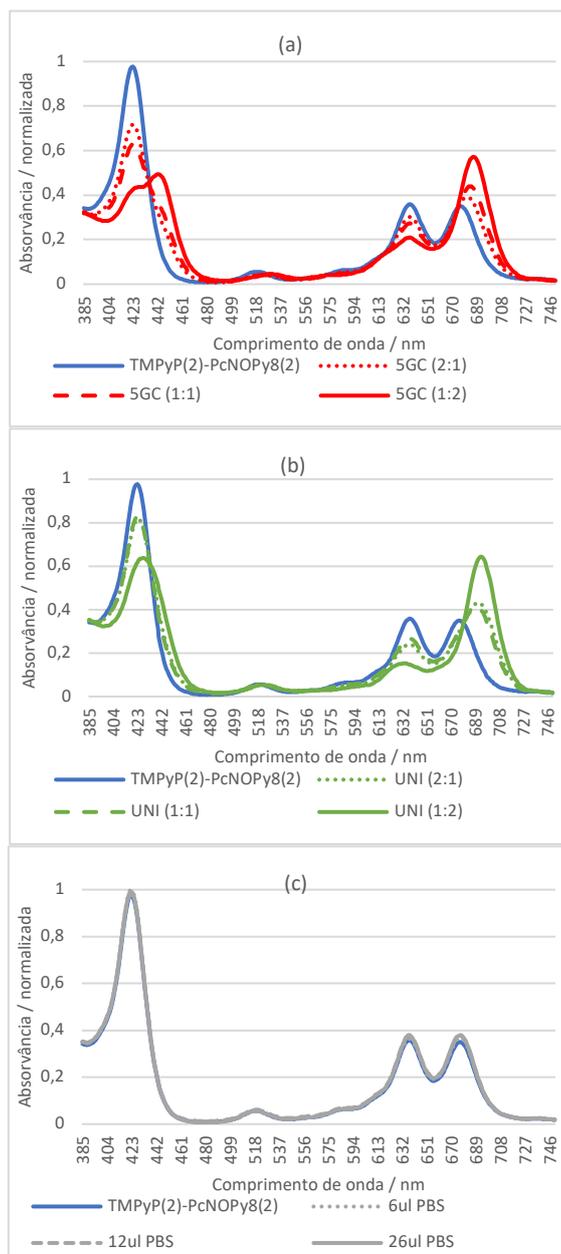


Figura 35 - Espectros de absorção UV-vis da competição TMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈ sem e com adição de (a) 5GC; (b) AG₃(T₂AG₃)₃; (c) PBS nas proporções 2:1, 1:1 e 1:2 em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

Uma vez que a condição fundamental para o funcionamento do método proposto foi garantida e a quantidade de oligonucleótido ideal a adicionar em cada processo de competição foi encontrada, estendeu-se o método a outros ligandos e a análise dos resultados obtidos será em seguida apresentada.

2.2.1. Validação do método de *screening* competitivo

Com o objetivo de verificar se, recorrendo ao modelo de *screening* competitivo proposto, era possível avaliar a afinidade e seletividade de ligandos de um modo mais rápido e mais económico e com resultados análogos aos obtidos no ponto anterior, fez-se um *screening* competitivo entre as ftalocianinas $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$ e $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_4$ e as várias porfirinas anteriormente estudadas efetuando adições de oligonucleótido de cadeia dupla 5GC e com o G-quadruplex unimolecular $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$. Nos gráficos apresentadas, como forma de simplificar as legendas, a cadeia dupla 5GC e o G-quadruplex unimolecular são apenas identificados por 5GC e UNI, respetivamente.

Na figura 36 são apresentadas as alterações observadas no espectro de absorção da mistura de $\text{TMPyP}/\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$ com ADN de cadeia dupla 5GC, com o G-quadruplex unimolecular $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$ e com tampão todos na proporção 1:2, correspondente a adições de 26 μl .

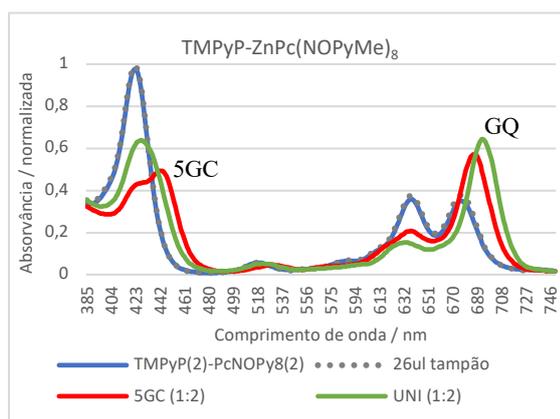


Figura 36 - Espectros de absorção UV-vis da competição $\text{TMPyP}/\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$.

Traço azul - TMPyP ($2\mu\text{M}$) + $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$ ($2\mu\text{M}$); **Traço cinza** – com adição de PBS;

Traço vermelho – com adição de 5GC **Traço verde** – com adição de $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$

Ao comparar os desvios batocrómico e hipocrómico na zona de absorção da porfirina ($\sim 420\text{ nm}$) pode verificar-se facilmente que o espectro que apresenta maiores desvios, comparativamente ao espectro inicial da mistura dos ligandos (traço azul) corresponde ao da titulação com o ADN de cadeia dupla 5GC, isto é o traço vermelho. Por outro lado, ao analisar a zona de absorção da ftalocianina ($\sim 680\text{ nm}$) verifica-se que o espectro que apresenta maiores desvios corresponde ao da titulação com o G-quadruplex, isto é, ao traço verde.

Assim, usando o modelo de *screening* competitivo porfirina/ftalocianina proposto foi possível concluir que:

- quando à mistura inicial de TMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈ é adicionado 5GC na proporção 1:2, ocorre um maior desvio na banda da porfirina, de 21nm, do que na segunda banda Q da ftalocianina, onde o desvio observado foi de 10 nm.

- a adição de G-quadruplex unimolecular, AG₃(T₂AG₃)₃, na mesma proporção, resulta num maior desvio nas bandas Q da ftalocianina, de 17 nm, do que da banda Soret, da porfirina, onde o desvio foi de apenas 6 nm, sugerindo uma maior afinidade por parte da ftalocianina para o G-quadruplex.

- ao titular a mistura inicial de TMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈ com tampão PBS o espectro manteve-se inalterado demonstrando assim que não interage nem com a porfirina nem com a ftalocianina.

Este modelo de competição permitiu, fazendo apenas três titulações distintas, uma com o tampão, uma com o ADN de cadeia dupla e a terceira com o G-quadruplex e através de uma análise simples e rápida, concluir que nenhum dos ligandos interage com o tampão utilizado, a TMPyP é mais seletiva para 5GC do que a ftalocianina ZnPc(NOPyMe)₈ e que a ZnPc(NOPyMe)₈ apresenta uma maior afinidade e seletividade para AG₃(T₂AG₃)₃ do que a TMPyP.

De modo a validar estes resultados, estes foram comparados com os obtidos nas titulações individuais de cada ligando (figura 37 e tabela 11). Na figura 37 os espectros de titulações individuais são apresentados com traços descontínuos em contraste com os traços contínuos dos espectros da competição (já analisados na figura 36). Os espectros obtidos nas titulações individuais da TMPyP com 5GC estão representados pelo traço vermelho descontínuo e os da TMPyP com AG₃(T₂AG₃)₃ pelo traço verde descontínuo. Os espectros dos dois ligandos na concentração usada nas experiências anteriores (2 μM) é também apresentado: TMPyP (traço azul descontínuo) e ZnPc(NOPyMe)₈ (traço amarelo descontínuo).

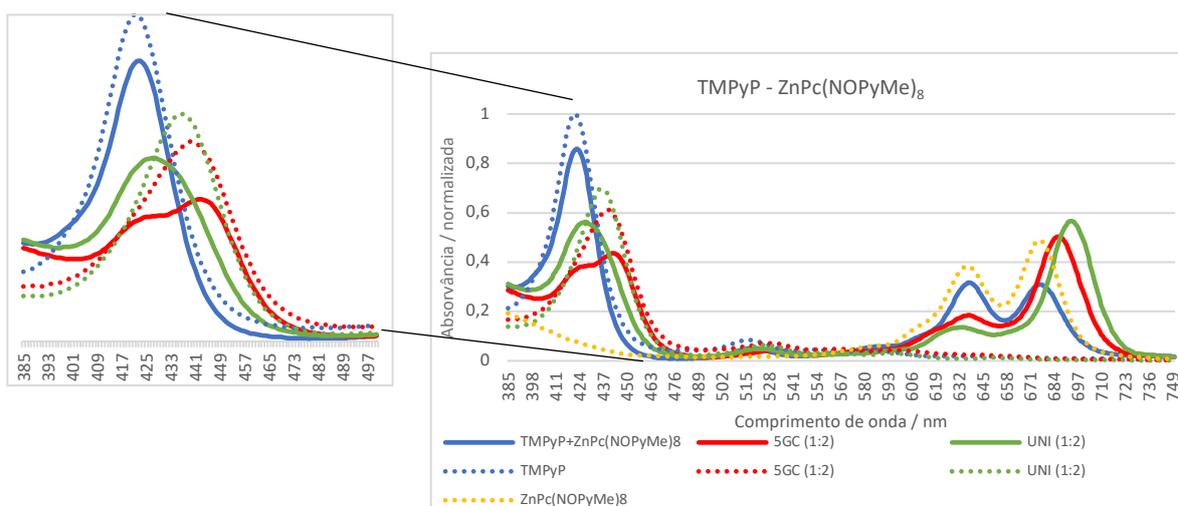


Figura 37 - Espectros de absorção UV-vis resultantes de *screening* competitivo entre TMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈ (traços contínuos) e espectros de absorção UV-vis das titulações individuais de cada ligando (traços descontínuos)

Apesar do ligeiro hipocromismo observado entre os espectros de competição e os respectivos espectros das titulações individuais, os resultados obtidos para as competições estão de acordo com as titulações individuais dos respectivos ligandos com os oligonucleótidos estudados:

- TMPyP é mais seletiva para 5GC do que para AG₃(T₂AG₃)₃;
- ZnPc(NOPyMe)₈ apresenta maior interação com AG₃(T₂AG₃)₃ do que com 5GC (ver tabela 11).

Na tabela 11 são apresentados os valores dos desvios batocrômicos observados nas diferentes titulações apresentadas na figura anterior.

Tabela 11 – Desvios batocrômicos (em nm) obtidos para titulações individuais e em competição de TMPyP e ZnPc(NOPyMe)₈ na proporção de 1:2

| Titulação | TMPyP | | ZnPc(NOPyMe) ₈ | |
|------------|-------|--|---------------------------|--|
| | 5GC | AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ | 5GC | AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ |
| individual | 17 | 14 | 10 | 16 |
| competição | 21 | 6 | 10 | 17 |

É interessante notar que a TMPyP quando titulada com $AG_3(T_2AG_3)_3$ em competição apresentou um valor de desvio batocrômico bastante inferior, menos de metade, ao observado na sua titulação individual. Em competição, a sequência de G-quadruplex unimolecular tende a interagir com a ftalocianina e não com a porfirina, diminuindo por isso o batocromismo observado na banda correspondente à porfirina. É também visível um aumento do batocromismo, embora não tão acentuado, na banda da TMPyP quando titulada com 5GC em competição. Estes dois fatores comprovam a grande interação de $ZnPc(NO\text{PyMe})_8$ com $AG_3(T_2AG_3)_3$ e realçam alguma seletividade de TMPyP para 5GC.

Assim, usando este modelo de competição, foi possível efetuando apenas adições de volumes definidos e pequenos de ADN, obter os mesmos resultados que num sistema de titulações convencional com todos os gastos e custos associados.

A comparação anterior permitiu validar as conclusões tiradas com a análise por *screening* competitivo e este sistema foi então aplicado às porfirinas ZnTMPyP, β -TMPyP e TPPyP em competição com a ftalocianina $ZnPc(NO\text{PyMe})_8$ com as mesmas estruturas de ADN, 5GC e G-quadruplex unimolecular $AG_3(T_2AG_3)_3$ e nas condições apuradas. De modo a simplificar a análise dos resultados obtidos estes serão também apresentados comparativamente com as respetivas titulações individuais.

Na figura 38 encontram-se os espectros de absorção obtidos nesse *screening* quando a mistura de ligandos foi titulada com ADN de cadeia dupla (5GC) e com o G-quadruplex unimolecular $AG_3(T_2AG_3)_3$; os espectros de absorção correspondentes às titulações individuais estão apresentados por traços descontínuos. Para todos os pares de ligandos testados foi também efetuada a titulação com tampão, no entanto, como não se verificaram quaisquer alterações nos espectros resultantes, estes são omissos das figuras.

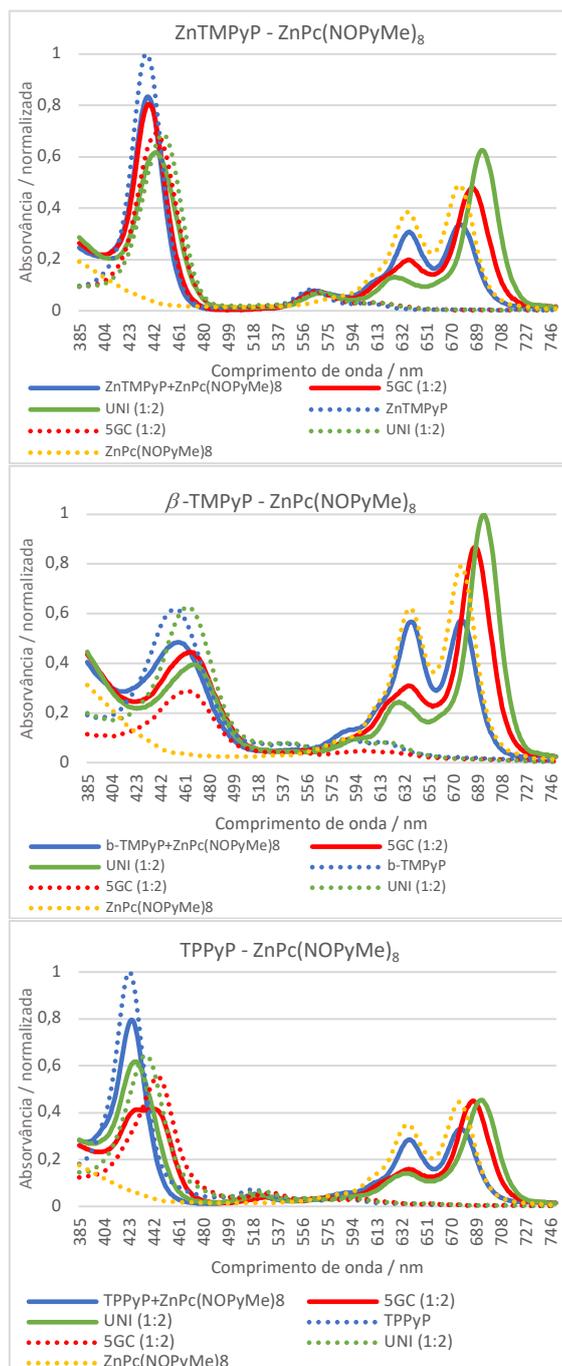


Figura 38 - Espectros de absorção UV-vis da competição porfirina/ZnPc(NOPyMe)₈ (traços contínuos) e espectros de absorção UV-vis das titulações individuais de cada ligando (traços descontínuos).

Ao analisar os espectros de competição (traços contínuos), da figura 38a, que se refere ao par ZnTMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈, pode verificar-se facilmente que o espectro que apresenta maiores desvios corresponde ao da titulação com o G-quadruplex, isto é, ao traço verde

contínuo. O mesmo pode ser observado se for analisada a zona de absorção da porfirina, 420 nm, (ver figura 39) onde ao comparar os desvios batocrômico e hipocrômico se verifica que a maior interação ocorre também com o G-quadruplex (traço verde).

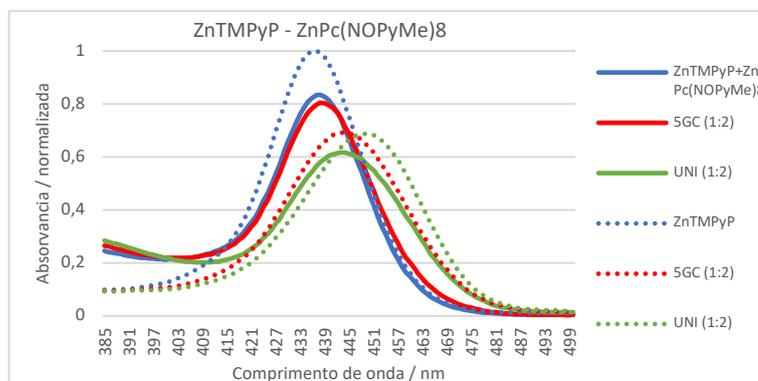


Figura 39 - Espectros de absorção UV-vis da competição ZnTMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈ (traços contínuos) e espectros de absorção UV-vis das titulações individuais de cada ligando (traços descontínuos), na zona de absorção da porfirina.

Neste caso, este *screening* de competição permite concluir, e confirmar, que:

- a porfirina ZnTMPyP é mais seletiva para o quadruplex AG₃(T₂AG₃)₃ do que para o ADN de cadeia dupla, 5GC. Contudo, em comparação com a ftalocianina ZnPc(NOPyMe)₈, esta é mais seletiva para AG₃(T₂AG₃)₃ do que a porfirina.

Tal como esperado, o comportamento da ftalocianina ZnPc(NOPyMe)₈ é igual ao observado na sua titulação individual com os dois oligonucleótidos sugerindo uma maior afinidade e seletividade para AG₃(T₂AG₃)₃. Também a ZnTMPyP apresentou maior afinidade e seletividade para AG₃(T₂AG₃)₃ (ver gráfico 38 traços descontínuos e tabela 12). Apesar da diminuição de batocromismo observada por ZnTMPyP em competição estes resultados estão de acordo com as titulações individuais apresentadas no subcapítulo anterior permitindo assim validar o método.

Tabela 12 - Batocromismo obtidos para titulações individuais e em competição de ZnTMPyP, β-TMPyP, TPPyP e ZnPc(NOPyMe)₈ na proporção de 1:2

| Titulação | ZnTMPyP | | β-TMPyP | | TPPyP | | ZnPc(NOPyMe) ₈ | |
|------------|---------|--|---------|--|-------|--|---------------------------|--|
| | 5GC | AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ | 5GC | AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ | 5GC | AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ | 5GC | AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ |
| individual | 7 | 12 | 8 | 10 | 21 | 12 | 10 | 16 |
| competição | 1 | 8 | 10 | 14 | 19 | 5 | 10 | 17 |

Da análise dos desvios observados nos dois espectros restantes, na zona dos 400-480 nm (ver figura 40), é possível concluir de uma forma rápida e inequívoca que no caso da porfirina β -TMPyP existe uma maior seletividade para o G-quadruplex, uma vez que o maior desvio é observado para o G-quadruplex (traço verde contínuo). Da mesma forma, se conclui que, no caso da porfirina TPPyP, existe uma clara seletividade para o ADN de cadeia dupla 5GC (traço vermelho contínuo). Também, nestes dois casos, se verificou que a aplicação deste *screening* competitivo reproduz o comportamento dos compostos isoladamente (gráfico 40 traços descontínuos e tabela 12). É de notar que os resultados observados para a TPPyP em competição salientam a sua seletividade para ADN de cadeia dupla.

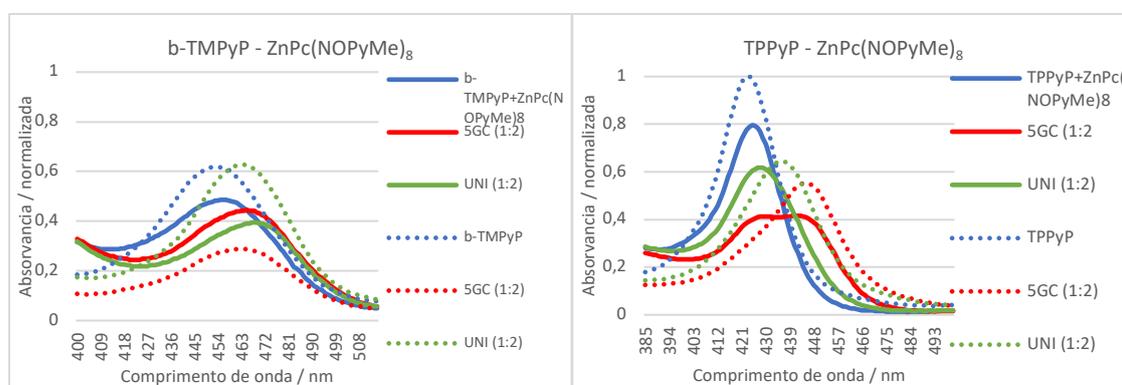


Figura 40 - Espectros de absorção UV-vis da competição β -TMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈ e TPPyP/ZnPc(NOPyMe)₈ (traços contínuos) e espectros de absorção UV-vis das titulações individuais de cada ligando (traços descontínuos), na zona de absorção da porfirina.

Após a validação do método de *screening* competitivo descrito para as porfirinas TMPyP, ZnTMPyP, β -TMPyP, TPPyP este foi estendido para a mesma ftalocianina a outras quatro porfirinas MnTMPyP, CuTMPyP, TTMAPP, ZnTTMAPP (figura 41).

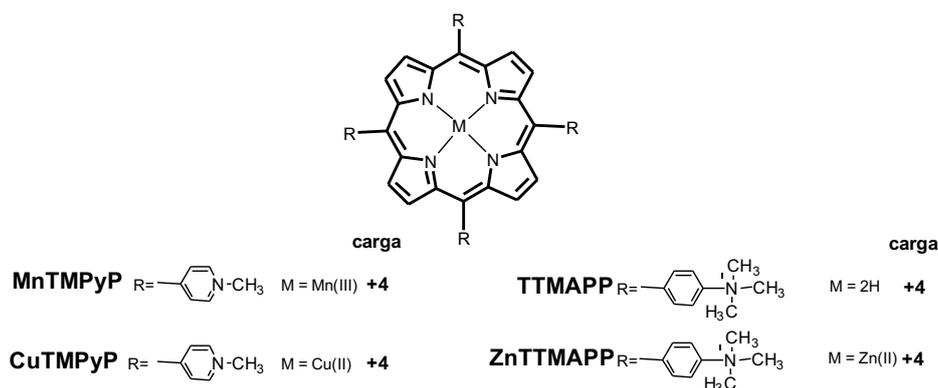


Figura 41 - Estrutura das porfirinas MnTMPyP, CuTMPyP, TTMAPP, ZnTTMAPP

Na figura 42 são apresentados os espectros obtidos em competição para as porfirinas selecionadas. O método foi aplicado em todas os casos considerando os dois ligandos na mesma concentração, 2 μM , e adições de ADN necessárias à obtenção das proporções 1:2, conforme anteriormente referido.

Na figura 42a encontram-se os espectros de absorção do par de ligandos MnTMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈ após adição de tampão, de 5GC e do G-quadruplex AG₃(T₂AG₃)₃. Conclui-se que a MnTMPyP não interage com o tampão e que este não apresenta qualquer afinidade para as cadeias de ADN estudadas. Os resultados de competição obtidos para a mistura MnTMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈ permitem assim validar o método apresentado, uma vez que permitem provar que a presença da ftalocianina não tem influência no comportamento da porfirina na presença das diversas estruturas de ADN.

Uma rápida análise de todos gráficos da figura 42 permite concluir que nenhuma destas porfirinas parece ter grande afinidade para qualquer das estruturas de ADN estudadas. Assim, estas porfirinas podem ser excluídas para a realização de outros testes. De notar que a realização de todas estas titulações a nível individual levariam aos mesmos resultados, mas, levando muito mais tempo e mais recursos, com todos os seus custos associados.

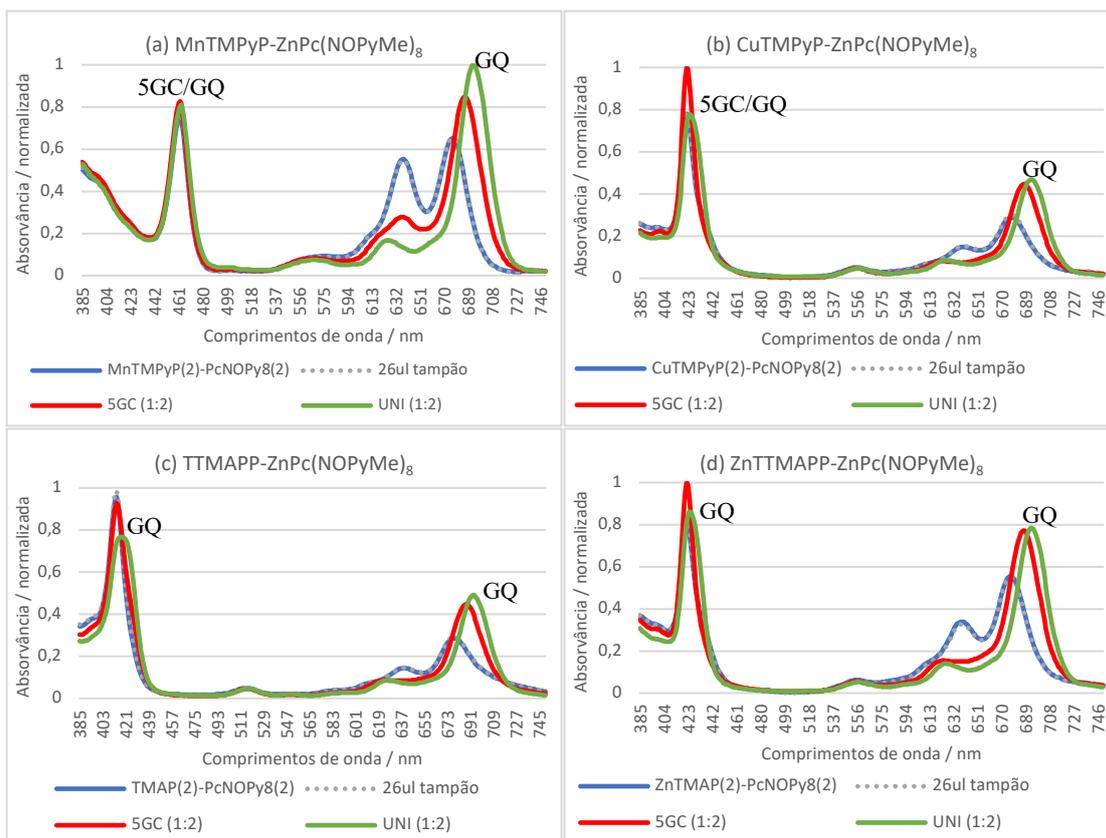


Figura 42 - Espectros de absorção UV-vis da competição
(a) MnTMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈, (b) CuTMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈,
(c) TTMAPP/ZnPc(NOPyMe)₈ e (d) ZnTTMAPP/ZnPc(NOPyMe)₈.

Traço azul - mistura porfirina/ftalocianina; **Traço cinza** – com adição de PBS; **Traço vermelho** – com adição de 5GC; **Traço verde** – com adição de AG₃(T₂AG₃)₃

Através deste *screening* de porfirinas usando estudos de competição com a ftalocianinas ZnPc(NOPyMe)₈ foi possível concluir que:

- a TPPyP foi a porfirina que apresentou melhor seletividade para 5GC;
- a β-TMPyP foi a porfirina que apresentou maiores interações com AG₃(T₂AG₃)₃, contudo esta não é melhor do que a seletividade observada com a ftalocianina;
- a TMPyP apresenta boa interação com ambas as estruturas de ADN, mas não é seletiva para AG₃(T₂AG₃)₃;
- as porfirinas MnTMPyP, CuTMPyP, TTMAPP e ZnTTMAPP demonstraram alterações pouco significativas quer para o ADN de cadeia dupla, quer para o G-quadruplex e foram portanto excluídas como candidatas a estudos futuros nesta área;

- comprovou-se que a $ZnPc(NOPyMe)_8$ apresenta elevada seletividade para o G-quadruplex $AG_3(T_2AG_3)_3$;

- Não foi identificado nenhum ligando, dentro dos estudados, com maior seletividade para G-quadruplexes que a ftalocianina $ZnPc(NOPyMe)_8$.

A comparação das titulações individuais e as titulações em competição permitiu uma vez mais validar este método uma vez que todas as conclusões tiradas nas titulações individuais foram confirmadas, com a grande vantagem de ser mais rápido e económico.

Uma vez que esta ftalocianina $ZnPc(SPyMe)_4$ apresentou também uma elevada interação e seletividade para $AG_3(T_2AG_3)_3$, e como forma de comprovar a validade do método com outro ligando, foi aplicado o método de *screening* competitivo às mesmas porfirinas mas desta vez em competição com a ftalocianina $ZnPc(SPyMe)_4$. Todos os espetros de competições obtidos são apresentados nos anexos 2 a 4. Na tabela 13 são apresentados os resultados de batocromismo obtidos nestas competições.

**Tabela 13 - Batocromismo obtidos para titulações em competição de TMPyP
ZnTMPyP e TPPyP com $ZnPc(SPyMe)_4$ na proporção de 1:2**

| | TMPyP | | ZnTMPyP | | TPPyP | | $ZnPc(SPyMe)_4$ | |
|------------|-------|-------------------|---------|-------------------|-------|-------------------|-----------------|-------------------|
| Titulação | 5GC | $AG_3(T_2AG_3)_3$ | 5GC | $AG_3(T_2AG_3)_3$ | 5GC | $AG_3(T_2AG_3)_3$ | 5GC | $AG_3(T_2AG_3)_3$ |
| competição | 22 | 14 | 3 | 7 | 20 | 8 | 7-9 | 19-20 |

Analisando os resultados obtidos podemos concluir que:

- TPPyP é o ligando que apresenta maior seletividade para 5GC;
 - $ZnPc(SPyMe)_4$ é o ligando que apresenta maior seletividade para $AG_3(T_2AG_3)_3$;
 - a seletividade da ftalocianina para $AG_3(T_2AG_3)_3$ é superior à observada para as porfirinas testadas;

- a TMPyP apresenta boa interação com ambas as estruturas de ADN, mas não é seletiva para $AG_3(T_2AG_3)_3$.

Mais uma vez foi possível de maneira rápida e económica perceber a apetência de um conjunto de porfirinas para dois oligonucleótidos distintos.

A competição entre a β -TMPyP e a ZnPc(SPyMe)₄ não foi possível uma vez que estes ligandos apresentaram uma ligeira sobreposição de bandas e possível interação (figura 43).

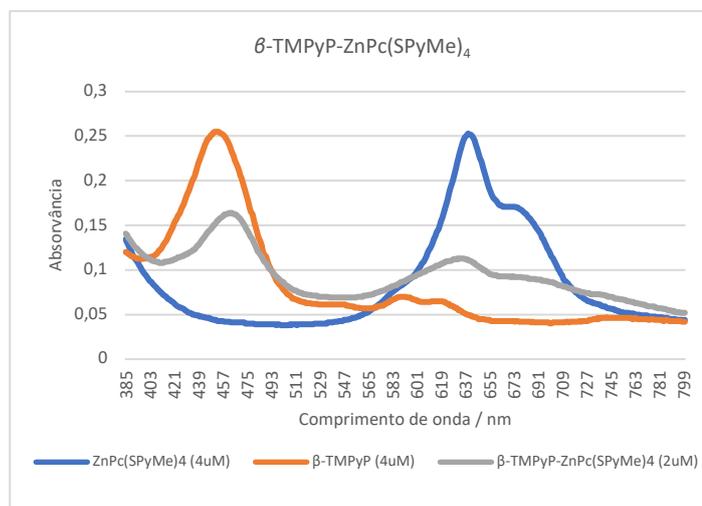


Figura 43 - Espectros de absorção UV-vis da competição β -TMPyP/ZnPc(SPyMe)₄. As bandas Q da β -TMPyP estão sobrepostas com as bandas Q da ZnPc(SPyMe)₄.

Este método de *screening* competitivo ligando-ligando mostrou ser um método válido, viável, rápido e simples de executar e interpretar permitindo um *screening* rápido e económico de um vasto conjunto de pares porfirina/ftalocianina, ou quaisquer outros ligandos que apresentem o seu espectro de absorção em zonas distintas. Para *screening* de porfirinas, as ftalocianinas mostraram ser bons candidatos. Usando este método de *screening* competitivo podem seleccionar-se os ligandos e testar a sua afinidade e/ou seletividade para diferentes estruturas de ADN.

2.2.2. Otimização das condições experimentais

Ao longo do desenvolvimento do método, foi também analisada a influência do tempo de interação nos resultados obtidos com este modelo de *screening* por competição e, para tal, para além da medição inicial efetuada logo após a adição do oligonucleótido, a interação foi acompanhada ao longo do tempo, tendo sido feitas várias medições. Na maioria das competições não foram observadas alterações ao longo do tempo, confirmando que as porfirinas correspondentes são bastante estáveis e apresentam afinidade para os oligonucleótidos estudados. Os únicos casos que demonstraram ligeiras alterações ao longo do tempo foram as competições com as porfirinas CuTMPyP, TTMAPP e ZnTTMAPP.

Na figura 44 encontram-se as alterações observadas no espectro de absorção da mistura de TTMAPP com $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$ quando titulada com 5GC e com $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$, logo após a adição destes oligonucleótidos, passado cinco horas e passadas quarenta e oito horas da adição destes oligonucleótidos.

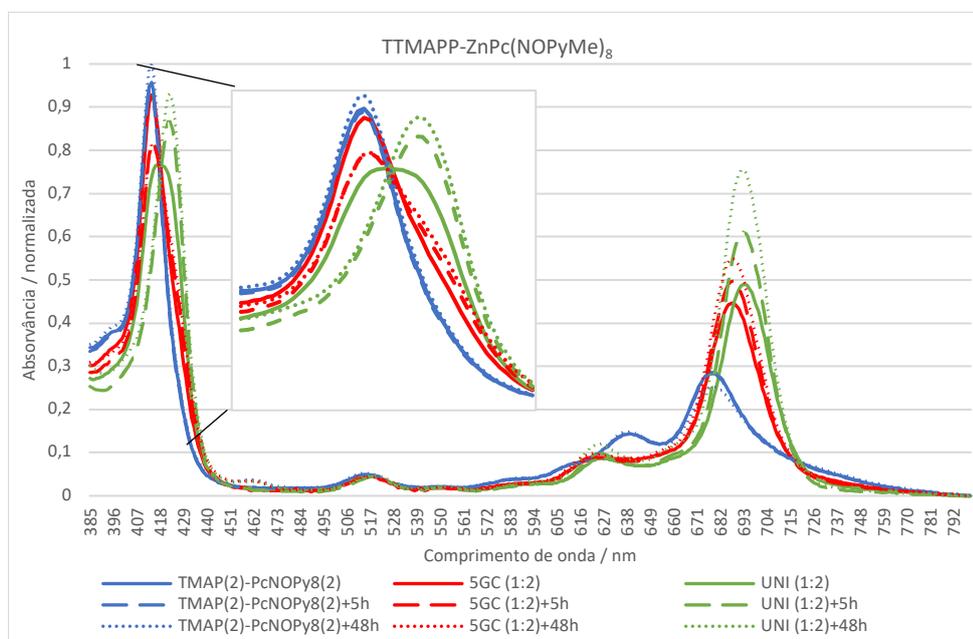


Figura 44 - Espectros de absorção UV-vis de TTMAPP/ $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$ com 5GC e $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$ logo após adição dos oligonucleótidos (traços contínuos), 5 horas após adição dos oligonucleótidos (traços tracejados) e 48 horas após adição dos oligonucleótidos (traços pontilhados).

Como pode ser observado na figura anterior, a mistura de TTMAPP com $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$ não apresenta alterações significativas com o passar do tempo (traços azuis), demonstrando uma boa estabilidade destes ligandos. Contudo, ao adicionar à mistura 5GC ou $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$, observamos alterações nos seus espectros ao longo do tempo. Passado cinco horas da adição de qualquer um destes oligonucleótidos (traços tracejados) observou-se um aumento do batocromismo, indicando que a interação ainda não estava completa. O espectro obtido passadas quarenta e oito horas, mostrou alterações não muito significativas quando comparado com o espectro obtido após cinco horas de interação, tendo-se verificado apenas um aumento pouco significativo do hiper Cromismo desta banda no caso do G-quadruplex unimolecular $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$ não acompanhado de desvio batocrômico. Resultados semelhantes foram observados com as porfirinas CuTMPyP e ZnTTMAPP

permitindo concluir que a obtenção dos espectros após cinco horas de interação é suficiente para perceber as alterações finais dos processos de competição.

Uma outra grande vantagem deste método é a possibilidade de ser realizado em qualquer laboratório usando um simples espectrofotômetro ou então, otimizando ainda mais o tempo despendido e as quantidades de reagentes usadas, recorrendo a um espectrofotômetro com leitor de placas.

Este novo método foi também testado usando um espectrofotômetro com leitor de placas e foi possível confirmar a semelhança dos resultados obtidos nos dois espectrofotômetros para o par ZnTMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈ (figura 45 e anexo 11).

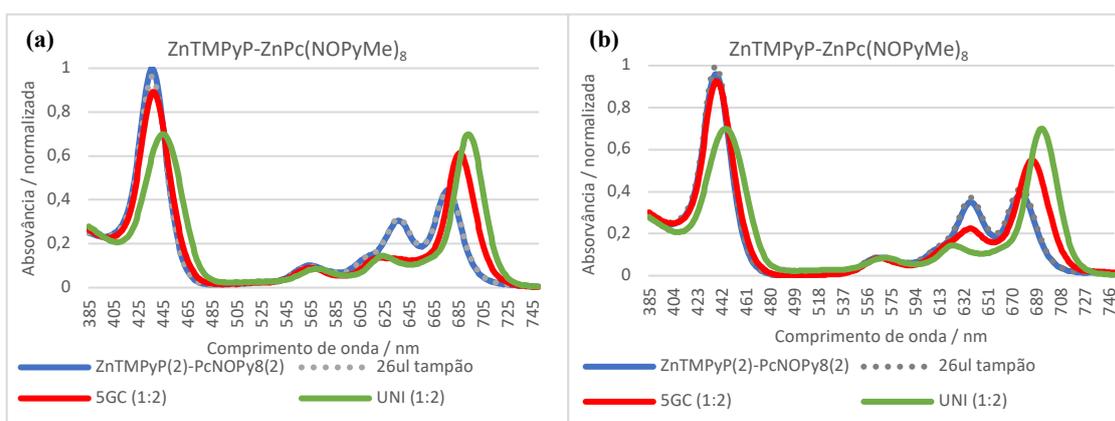


Figura 45 - Espectros de absorção UV-vis da competição

ZnTMPyP/ZnPc(NOPyMe)₈ sem e com 5GC ou AG₃(T₂AG₃)₃ (a) espectrofotômetro convencional, (b) espectrofotômetro com leitor de placas

Assim o protocolo de *screening* competitivo foi adaptado ao espectrofotômetro com leitor de placas permitindo analisar simultaneamente a afinidade de várias porfirinas para várias estruturas de ADN, na presença da mesma ftalocianina como padrão. A organização proposta a utilizar no leitor de placas é apresentada na figura 46.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---|----------|
| A | F+P1 | F+P2 | F+P3 | F+P4 | F+P5 | F+P6 | | PBS |
| B | + PBS | | F (2uM) |
| C | + O1 | | P1 (2uM) |
| D | + O2 | | P2 (2uM) |
| E | + O3 | | P3 (2uM) |
| F | + O4 | | P4 (2uM) |
| G | + O5 | | P5 (2uM) |
| H | + O6 | | P6 (2uM) |

Figura 46 - Placa de leitura para *screening* competitivo entre uma ftalocianina (F), seis porfirinas (P1-P6) na presença de seis oligonucleótidos diferentes (O1-O6). Dos poços B1 ao H6 deve adicionar-se a mistura porfirina/ftalocianina o respetivo oligonucleótido (ou PBS) na proporção de 1:2. A coluna 8 representa os controlos necessários.

Primeiramente é necessário a preparação dos ligandos com concentração de 4 μM . De seguida, em todos os poços da coluna 1, adiciona-se 150 μL de porfirina 1 (4 μM) e 150 μL de ftalocianina (a 4 μM) de modo a que a concentração final de cada ligando seja de 2 μM para um volume final de 300 μL . A estes poços contendo a mistura a estudar adiciona-se 26 μL do oligonucleótido (a 50 μM) / PBS de modo que a proporção final seja de 1:2, tal como representado na figura 46. O processo é repetido nas colunas 2 a 6 alterando apenas a porfirina a analisar. É também essencial a realização dos controlos: medição individual de cada ligando a 2 μM e do PBS (coluna 8).

Este protocolo permite assim a rápida realização de *screening* competitivo, através da análise da apetência de seis pares de ligandos distintos para seis oligonucleótidos com diferentes estruturas de ADN, em simultâneo.

2.3. Avaliação da capacidade de estabilização e seletividade dos ligandos por *G-quadruplex Fluorescent Intercalator Displacement*, G4-FID

Como já foi referido na introdução, uma outra técnica que permite estudar a afinidade e a seletividade de ligandos para estruturas do tipo G-quadruplex baseia-se na perda de fluorescência de um intercalador ligado a uma sequência de ADN quando esta sequência se desassocia deste para se ligar a um outro ligando para o qual tem mais afinidade. Nesta abordagem designada por FID, o intercalador usado neste trabalho foi o laranja de tiazole (TO). Este intercalador é particularmente interessante porque quando livre em solução apresenta uma fluorescência quase nula, mas esta aumenta exponencialmente quando ligado ao ADN. Além disso, o TO por si só não apresenta seletividade para diversas estruturas de ADN, por exemplo ADN duplex ou quadruplex.^{105,112} Estas características permitem assim estudar o deslocamento competitivo deste intercalador, percebendo a seletividade de ligandos para determinadas sequências de ADN.

2.3.1. Otimização de condições experimentais

Tendo por base a literatura^{106,113} numa primeira fase foram otimizadas as concentrações e proporções ideais de TO, ligando e oligonucleótidos a utilizar. Foi também otimizado o tempo de agitação necessário para preparar a solução de TO com o oligonucleótido e foi avaliado, entre outras variáveis, a sua estabilidade ao longo do tempo. Estas otimizações foram realizadas num fluorímetro convencional e posteriormente adaptadas para um leitor de placas de modo a acelerar a recolha de dados.

Nas figuras 47 e 48 encontram-se os gráficos de fluorescência obtidos na otimização de algumas das variáveis. Inicialmente foi analisada a fluorescência da solução de TO+oligonucleótido, com concentração de TO de 0,35 μM e de oligonucleótido de 0,1 μM , contudo esta solução apresentou uma intensidade de fluorescência muito baixa. De modo a aumentar a intensidade foram analisadas várias condições experimentais. Foi observado que a agitação da solução TO+oligonucleótido antes da sua medição e o aumento de *slits* de 5 em 5 para de 10 em 10, aumenta muito significativamente a sua fluorescência (figuras 47a, 47b).

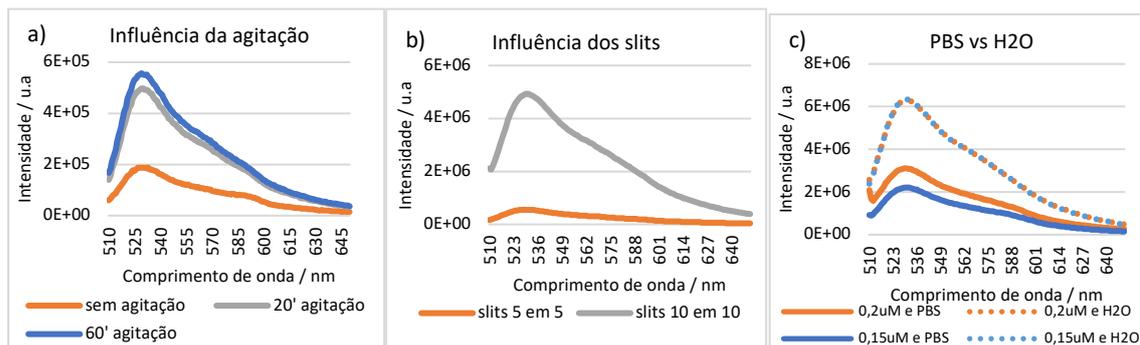


Figura 47 – Otimização de condições experimentais do FID. a) Influência da agitação da solução mãe de TO+oligonucleótido; b) Influência dos slits; c) Influência do PBS usado na solução mãe TO+oligonucleótido.

Um outro parâmetro analisado foi a influência do PBS na intensidade da fluorescência da solução TO+oligonucleótido uma vez que esta solução era inicialmente preparada em PBS. Percebemos que quando esta solução era preparada em água mili-Q a intensidade da fluorescência aumentava consideravelmente (figura 47c). Assim, a solução TO+oligonucleótido passou a ser preparada usando água mili-Q em vez de PBS.

Foi ainda realizado um outro estudo de modo a seleccionar a concentração ideal de TO (figura 48a). A concentração de oligonucleótido foi mantida a 0,1 μ M, e foi analisada a fluorescência nas concentrações de 0,35 μ M, 0,25 μ M, 0,2 μ M e 0,15 μ M de TO. Este estudo permitiu concluir que a concentração de TO para a qual a solução TO+oligonucleótido apresentou maior intensidade de fluorescência foi de 0,2 μ M. Foi também analisada a influência da agitação da solução TO+oligonucleótido numa placa de agitação durante tempo prolongado ou num vortex por 10 minutos e não se verificaram alterações significativas na fluorescência para as mesmas concentrações (traços azuis e traços amarelos da figura 48a) assim, foi estabelecida uma agitação no vortex por 10 minutos.

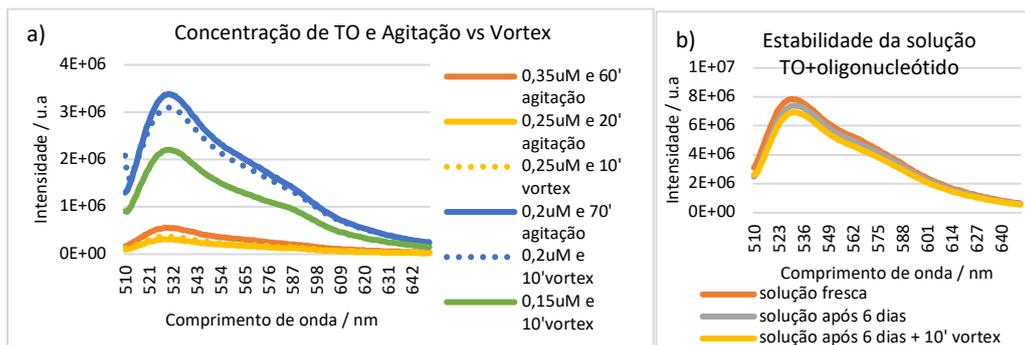


Figura 48 - Otimização de condições experimentais do FID. a) Concentração ideal de TO e influência da agitação numa placa de agitação ou num vortex; b) Estabilidade da solução mãe de TO+oligonucleótido após 6 dias.

Por último foi estudada a estabilidade da solução TO+oligonucleótido. Após a preparação de uma solução *stock*, a sua intensidade de fluorescência foi analisada e a solução foi armazenada à temperatura ambiente durante seis dias (figura 48b). No sexto dia procedeu-se a uma nova análise desta solução observando-se que a sua intensidade manteve-se estável, não sendo necessário uma nova agitação. Este resultado permitiu preparar a solução TO+oligonucleótido antecipadamente ao dia da experiência.

Com esta técnica foram apenas analisadas as porfirinas e ftalocianinas que apresentaram, nas titulações espectroscópicas UV-vis, afinidade para as sequências de ADN nomeadamente TMPyP, ZnTMPyP, β -TMPyP, TPPyP, ZnPc(NOPyMe)₈, ZnPc(SPyMe)₈ e ZnPc(SPyMe)₄. Para cada ligando foi calculada a percentagem de deslocamento de TO usando os oligonucleótidos de cadeia dupla (5GC), o G-quadruplex unimolecular (AG₃(T₂AG₃)₃) e o G-quadruplex tetramolecular (T₂G₅T). A percentagem de deslocamento de TO foi calculada considerando como máximo, ou seja 100%, a intensidade da fluorescência do TO quando se encontra ligado à sequência de ADN.

Ao adicionar um dos ligandos à solução contendo a mistura fluorescente de TO/ADN, a dissociação do TO da estrutura de ADN traduz-se numa diminuição da sua fluorescência (figura 16). Quanto maior a deslocamento/dissociação do TO, provocada pela presença do ligando, maior é a perda de fluorescência observada.

A análise da relação entre a concentração de ligando e a percentagem de deslocamento do TO permite-nos perceber para qual dos oligonucleótido é necessária menor concentração de ligando para dissociar 50% do TO (DC50). Quanto menor for a concentração de ligando necessária, maior é a capacidade deste para dissociar o

oligonucleótido do TO, ou seja, maior é a seletividade do ligando para o oligonucleótido em questão. O ligando que apresenta maior seletividade para um determinado oligonucleótido é aquele que necessita de menor concentração para dissociar este do TO.

Na figura 49 encontram-se os espectros de fluorescência obtidos quando foram adicionadas soluções de concentração entre 0 μM e 0,25 μM de TMPyP a duas soluções distintas, uma contendo a mistura TO/5GC e a outra contendo TO/ $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$. Através destes espectros torna-se perceptível o descrito no parágrafo anterior. A intensidade da fluorescência vai diminuindo com o aumento de concentração de TMPyP pois este ligando leva à dissociação do TO do oligonucleótido.

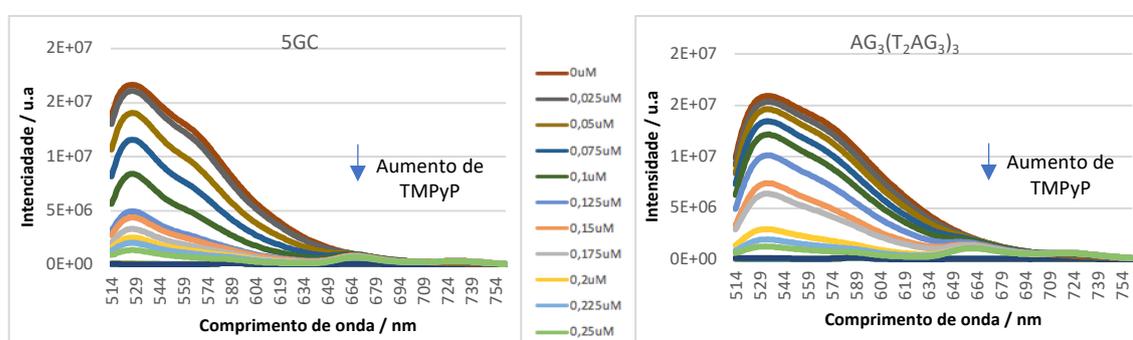


Figura 49 - Fluorescência do complexo TO + oligonucleótido com o aumento de concentração de TMPyP

Como se pode verificar, o aumento da concentração de porfirina TMPyP resulta na diminuição da fluorescência da mistura TO/ADN. A análise e comparação dos dois gráficos anteriores permite também concluir que, considerando que o máximo de fluorescência para as duas misturas TO/5GC e TO/ $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$ é semelhante, é necessária uma concentração de TMPyP semelhante para diminuir em 50% a fluorescência de qualquer das misturas, mostrando portanto a não seletividade desta porfirina e validando a otimização efetuada para este método.

2.3.2. Análise por FID dos diferentes ligandos

Como foi referido anteriormente, para cada ligando estudado foi calculada a percentagem de deslocamento de TO usando os oligonucleótidos de cadeia dupla 5GC, o G-quadruplex unimolecular $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$, identificado apenas como UNI, e o G-quadruplex tetramolecular $\text{T}_2\text{G}_5\text{T}$ (identificado como TT).

Assim para completar o estudo com a TMPyP, na figura 50 encontram-se as percentagens de deslocamento do TO em função da concentração de TMPyP obtidas para os três oligonucleótidos testados.

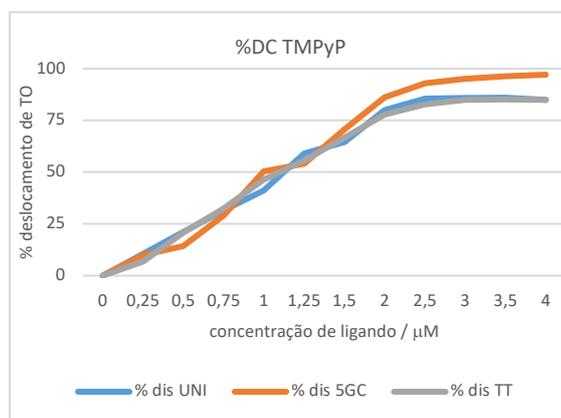


Figura 50 - Percentagem de deslocamento de TO do 5GC (traço laranja), T₂G₅T (traço cinza) e AG₃(T₂AG₃)₃ (traço azul) com o aumento da concentração de TMPyP.

A análise do gráfico anterior e dos valores de DC50 obtidos (tabela 14) mostram que é necessária uma concentração semelhante de TMPyP para dissociar 50% de TO quando este está ligado ao ADN de cadeia dupla 5GC (0,94 μM) ou quando está ligado ao G-quadruplexes T₂G₅T (1,17 μM) e AG₃(T₂AG₃)₃ (1,07 μM). Estes resultados confirmam que esta porfirina interage facilmente com estruturas de ADN pois uma baixa concentração desta porfirina dissocia 50% do TO quer dos G-quadruplexes quer da sequência de cadeia dupla. O DC50 ligeiramente mais reduzido observado no caso para 5GC confirma a não seletividade da TMPyP para AG₃(T₂AG₃)₃. Estes resultados suportam as conclusões tiradas nas titulações com este ligando e estão de acordo com a literatura.¹⁰⁷

Tal como no subcapítulo anterior, os restantes ligandos serão analisados comparativamente com a TMPyP e todos os valores obtidos estão sumariados na tabela seguinte.

Tabela 14 - Valores de DC50 obtidos com os vários oligonucleótidos estudados

| | DC50 (μM) | | |
|---------------------------|------------------------|---------------------------------|--|
| | 5GC | T ₂ G ₅ T | AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ |
| TMPyP | 0,94 | 1,17 | 1,07 |
| ZnTMPyP | 1,81 | 1,08 | 0,97 |
| β -TMPyP | 2,13 | 1,53 | 1,20 |
| TPPyP | 0,89 | 0,96 | 1,00 |
| ZnPc(NOPyMe) ₈ | 1,30 | 1,08 | 1,04 |
| ZnPc(SPyMe) ₈ | 1,93 | 1,84 | 1,95 |
| ZnPc(SPyMe) ₄ | 1,59 | 1,14 | 1,17 |

Na figura 51 encontram-se as percentagens de deslocamento do TO obtidas com o aumento de concentração das porfirinas ZnTMPyP, β -TMPyP e TPPyP para os oligonucleótidos 5GC, T₂G₅T e AG₃(T₂AG₃)₃.

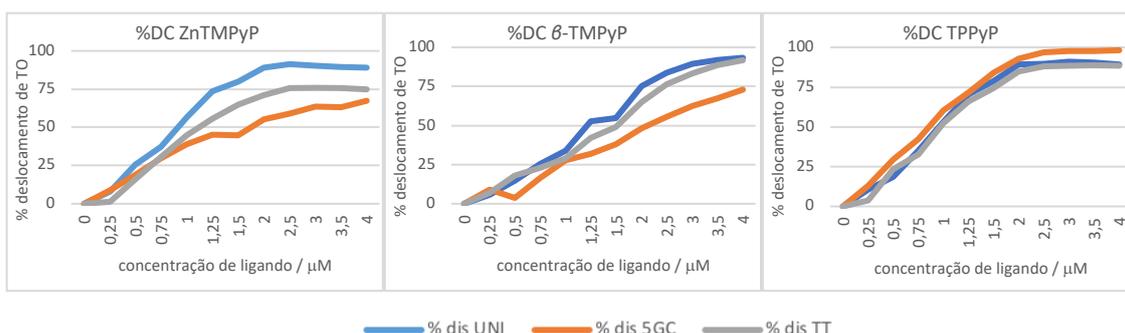


Figura 51 - Percentagem de deslocamento de TO do 5GC (traço laranja), T₂G₅T (traço cinza) e AG₃(T₂AG₃)₃ (traço azul) com o aumento da concentração das diferentes porfirinas ZnTMPyP, β -TMPyP e TPPyP.

Comparando os gráficos das três porfirinas conclui-se que a ZnTMPyP é aquela que apresenta um DC50 para o G-quadruplex menor, de 0,97 μM , sendo portanto a mais seletiva para a cadeia de ADN unimolecular. Por seu lado a TPPyP foi aquela que apresentou um DC50 para cadeia dupla menor, de 0,89 μM mostrando portanto ser a mais seletiva para ADN de cadeia dupla. No caso da porfirina β -TMPyP os resultados obtidos confirmam que é mais seletiva para os G-quadruplex do que para o ADN de cadeia dupla, no entanto esta apresentou valores mais elevados de DC50 do que as outras porfirinas, ou seja, foram necessárias maiores concentrações de β -TMPyP para dissociar 50% do TO.

A mesma análise foi efetuada para as ftalocianinas $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$, $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$ e $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_4$ tendo sido também possível obter os valores do DC50 com os três oligonucleótidos selecionados 5GC, $\text{T}_2\text{G}_5\text{T}$ e $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$. Os valores obtidos encontram-se também na tabela 14. Na figura 52 são apresentados os gráficos comparativos dos valores de DC50 obtidos em função da concentração de ftalocianina.

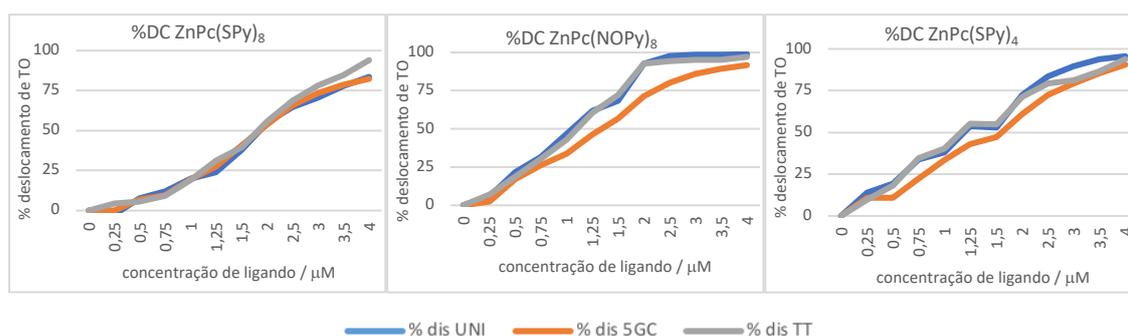


Figura 52 - Percentagem de deslocamento de TO dos oligonucleótidos 5GC (traço laranja), $\text{T}_2\text{G}_5\text{T}$ (traço cinza) e $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$ (traço azul) com o aumento da concentração de $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$, $\text{ZnPc}(\text{NOPyMe})_8$ e $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_4$.

A comparação dos resultados obtidos para cada uma das três ftalocianinas mostrou que a $\text{ZnPc}(\text{SPyMe})_8$ apresenta valores de DC50 idênticos para todos os oligonucleótidos estudados (próximos de $1,9 \mu\text{M}$) mostrando não ser seletiva para nenhuma das cadeias de ADN, o que está de acordo com os resultados obtidos nas titulações por UV-Vis. Relativamente às outras duas ftalocianinas, ambas apresentam valor de DC50 menores para as cadeias G-quadruplexes do que para a cadeia dupla, ou seja, ambas apresentam seletividade para os G-quadruplexes, o que está também de acordo com os resultados anteriores.

Com este método foi possível obter a concentração necessária de cada um dos ligandos selecionados para deslocar 50% de TO (DC50). Comparando os resultados obtidos para os diferentes ligandos com os obtidos para a TMPyP nas condições experimentais usadas, foi possível concluir que:

- a porfirina ZnTMPyP mostrou ser, dentro das moléculas estudadas, a mais seletiva para o G-quadruplex unimolecular $\text{AG}_3(\text{T}_2\text{AG}_3)_3$. Esta foi também a molécula que apresentou um valor de DC50 menor para este quadruplex, sendo este valor metade do obtido para o ADN de cadeia dupla, ou seja, $\text{DC50}(5\text{GC}) = 2 \times \text{DC50}(\text{G-quadruplex})$;

- os ligandos TPPyP e ZnPc(NOPyMe)₈ apresentaram um DC50 para AG₃(T₂AG₃)₃ idêntico ao obtido para TMPyP mas, como referido anteriormente e era esperado, a TPPyP mostrou ser mais seletiva para 5GC;

- a porfirina β-TMPyP e a ftalocianina ZnPc(SPyMe)₄ apresentaram valores de DC50 para AG₃(T₂AG₃)₃ ligeiramente superiores aos obtidos para a TMPyP, no entanto os valores de DC50 obtidos para o ADN de cadeia dupla 5GC foram consideravelmente superiores, ou seja, estes ligandos mostraram ter baixa afinidade para a estrutura de cadeia dupla 5GC;

- a porfirina TPPyP é, dentro das moléculas estudadas, a mais seletiva para o ADN de cadeia dupla, 5GC e foi o único ligando que apresentou um DC50 menor do que a TMPyP para o oligonucleótido 5GC.

Estas conclusões estão de acordo e confirmam os resultados obtidos com as titulações descritas anteriormente.

2.4. Avaliação do efeito dos ligandos na estrutura dos oligonucleótidos – estudos por dicroísmo circular

A técnica de dicroísmo circular (CD) é muito útil para a caracterização da formação de polimorfismos de ADN, nomeadamente dos G-quadruplexes.^{39,114} Já foram descritos vários espectros característicos de diferentes G-quadruplexes, espectros esses baseados na orientação das cadeias de ADN e, portanto, no diferente empilhamento dos resíduos de guanina.^{39,115,116}

As bases de guanina de um G-quadruplex com conformação paralela, isto é que contém as quatro cadeias no mesmo sentido, têm a mesma conformação *anti* glicosídica e os seus espectros de CD característicos apresentam uma banda positiva a 260 nm e uma pequena banda negativa a 240 nm (figura 53, traço preto). Em contraste, as guaninas de um G-quadruplex com conformação antiparalela, contendo duas cadeias para um sentido e outras duas para o sentido oposto, têm alternância das conformações *anti* e *syn* glicosídicas ao longo da cadeia de ADN, exibindo no seu espectro de CD característico uma banda positiva a 295 nm e outras duas bandas menores, uma negativa a 265 nm e outra positiva a 245 nm (figura 53, traço vermelho).^{39,116,117} Um G-quadruplex tipo híbrido bem definido (contendo três cadeias para um sentido e um para o sentido oposto), exibe um espectro de CD distinto contendo uma forte banda positiva em torno dos 290 nm com um ombro em torno dos 270 nm e uma banda negativa menor a 240 nm (figura 53, traço azul).^{117,118} Considerando estes espectros característicos de cada topologia, a análise dos espectros de CD dos G-quadruplexes usados neste trabalho permite não só confirmar a presença de ADN em forma de G-quadruplexes como avaliar a conformação que este se encontra.

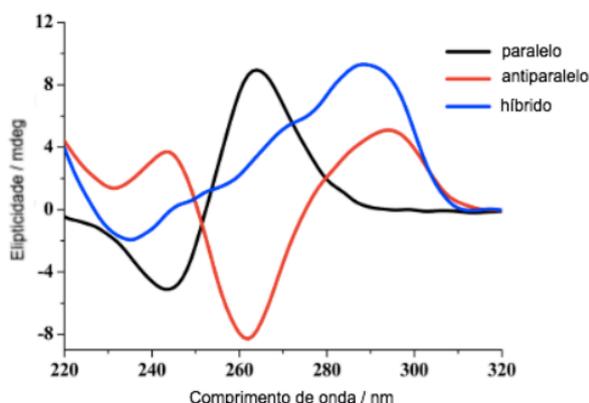


Figura 53 - Espectro de CD típico das conformações de G-quadruplexes paralelos, antiparalelos e híbridos (adaptado de 117).

Na figura 54 encontra-se o espectro de CD obtido nestes estudos para o oligonucleótido estudado $AG_3(T_2AG_3)_3$. É possível observar uma banda positiva em torno dos 295 nm, um pequeno ombro a 250 nm uma banda negativa em torno dos 235 nm. De acordo com a literatura, este espectro de CD pode ser considerado como um espectro resultante da soma de múltiplas conformações de G-quadruplexes, tais como G-quadruplexes de conformação híbrida e G-quadruplexes de conformação paralela do “tipo cesto”.^{118,119}

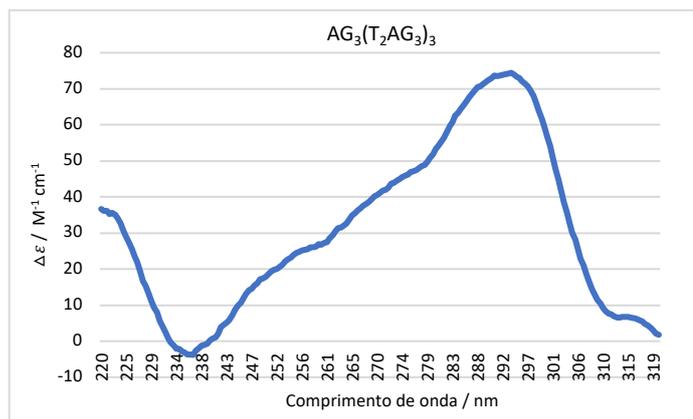


Figura 54 - Espectro de CD obtido para $AG_3(T_2AG_3)_3$ em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

Tal como para os G-quadruplexes, é possível, através de espectros de CD, estudar a conformação de cadeias duplas de ADN, podendo estas estar na conformação A, B ou Z, embora a conformação B seja a mais comum. A análise de moléculas de ADN por dicroísmo circular permite também estudar a proporção de citosina-guanina presente na molécula de ADN, bem como avaliar a existência de *hairpins*. A grande maioria dos espectros de CD de ADN de cadeia dupla caracteriza-se por uma ou mais bandas positivas entre os 260 e os 280nm e uma banda negativa em torno dos 245 nm.¹¹⁴ Na figura 55 encontra-se o espectro de CD obtido para a cadeia dupla 5GC. Podemos concluir e comprovar que, tal como esperado, o 5GC utilizado ao longo deste trabalho encontra-se em forma de duplex.

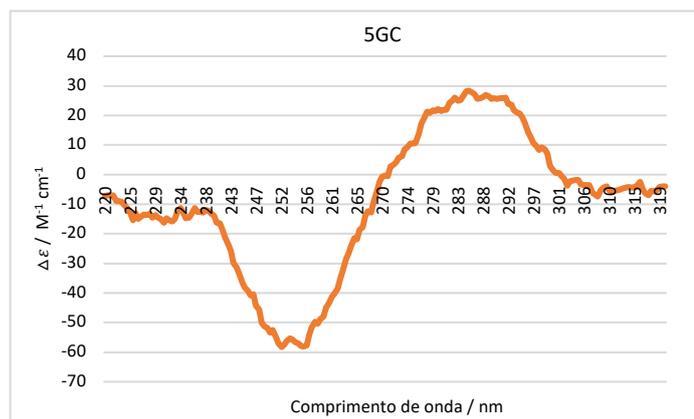


Figura 55 - Espectro de CD obtido para 5GC em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

A obtenção e análise de espectros de CD de misturas de ADN (de cadeia dupla ou em forma de G-quadruplex) e ligandos permite avaliar as alterações conformacionais no ADN induzidas pela presença do ligando.

Neste trabalho e com o objetivo de perceber se os ligandos selecionados alteram a conformação dos oligonucleótidos estudados aumentando ou não a sua estabilidade, foram analisados os espectros de CD dos oligonucleótidos $AG_3(T_2AG_3)_3$ e 5GC com as porfirinas TMPyP, ZnTMPyP, β -TMPyP e TPPyP e com as ftalocianinas ZnPc(SPyMe)₄ e ZnPc(NOPyMe)₈.

2.4.1. Porphirinas

Na figura 56 são apresentados os espectros de CD obtidos para o quadruplex unimolecular, $AG_3(T_2AG_3)_3$, quando misturado com as porfirinas TMPyP, ZnTMPyP, β -TMPyP e TPPyP.

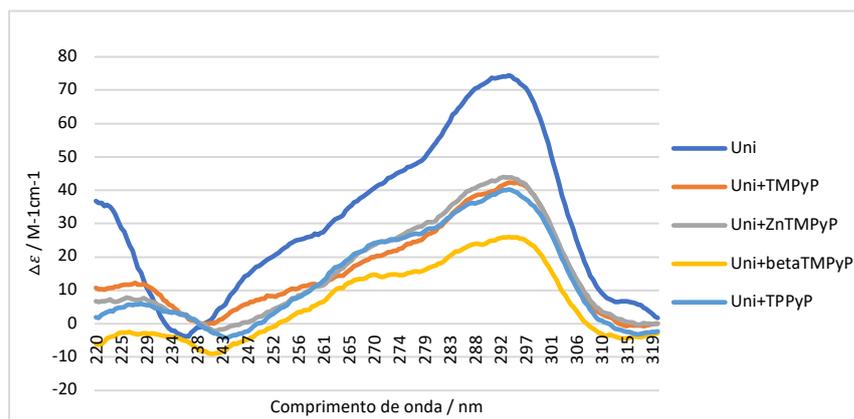


Figura 56 - Espectros de CD obtidos para $AG_3(T_2AG_3)_3$ com as diferentes porfirinas em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

Como foi referido anteriormente, as bandas observadas para o G-quadruplex indicam que este se encontra numa mistura de conformações híbridas e paralelas.

Na presença de qualquer uma das porfirinas a banda positiva a 295 nm manteve-se, havendo um desvio da banda negativa de 235 nm para 240 nm, no caso da TMPyP, β -TMPyP e ZnTMPyP e para 245 nm no caso da TTPyP. Também é visível o desvio do ombro de 255 nm para 270 nm para todas as porfirinas exceto para a TMPyP. Estas bandas, positiva a 295 nm, negativa a 240 nm e o ombro a 270 nm, são característicos de G-quadruplexes híbridos. Assim, podemos afirmar que quando este G-quadruplex unimolecular interage com qualquer uma destas porfirinas tende a preferir a sua conformação híbrida.

Na figura 57 observa-se os espectros de CD obtidos para 5GC quando misturado com as porfirinas TMPyP, ZnTMPyP, β -TMPyP e TTPyP. Para todas porfirinas, os espectros obtidos foram idênticos ao espectro obtido apenas com 5GC. Estes resultados revelam que a interação destas porfirinas com o ADN de cadeia dupla não altera a sua conformação.

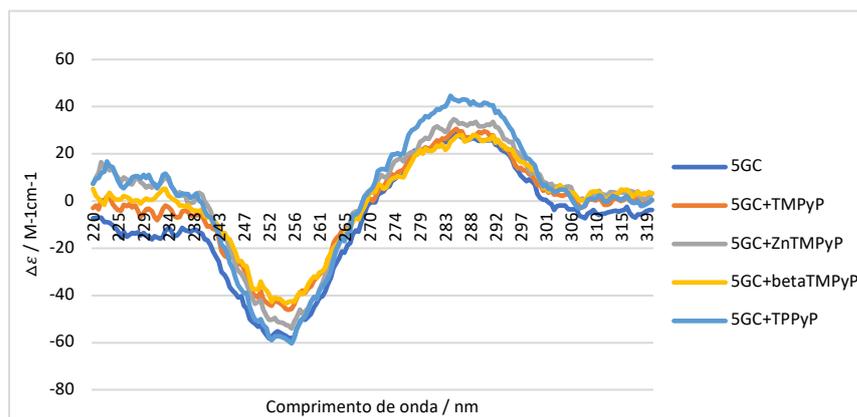


Figura 57 - Espectros de CD obtidos para 5GC com as diferentes porfirinas em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

Podemos concluir que o oligonucleótido $AG_3(T_2AG_3)_3$ encontra-se em diferentes conformações tais como do tipo híbrido e do tipo “cesto”, contudo, ao interagir com as porfirinas tende a preferir a conformação de tipo híbrido. Já a interação da cadeia dupla 5GC com as porfirinas não originou alteração na sua conformação.

2.4.2. Ftalocianinas

Na figura 58 podem observar-se os espectros de CD obtidos para $AG_3(T_2AG_3)_3$ quando misturado com as ftalocianinas $ZnPc(SPyMe)_4$ e $ZnPc(NOPyMe)_8$. A interação de $AG_3(T_2AG_3)_3$ com $ZnPc(SPyMe)_4$ (traço laranja) originou algumas alterações no espectro de CD comparativamente ao espectro obtido para o oligonucleótido sozinho (traço azul). A grande banda positiva a 295 nm é mantida, contudo um pequeno ombro em torno dos 268 nm torna-se mais evidente, desaparecendo o ombro a 250 nm, e a banda negativa a 235 nm desvia-se para os 245 nm. Tal como referido anteriormente, os G-quadruplexes híbridos apresentam as mesmas bandas agora observadas aquando da interação de $AG_3(T_2AG_3)_3$ com $ZnPc(SPyMe)_4$. Podemos assim afirmar que esta interação leva a que este oligonucleótido unimolecular assumira preferencialmente a conformação híbrida.

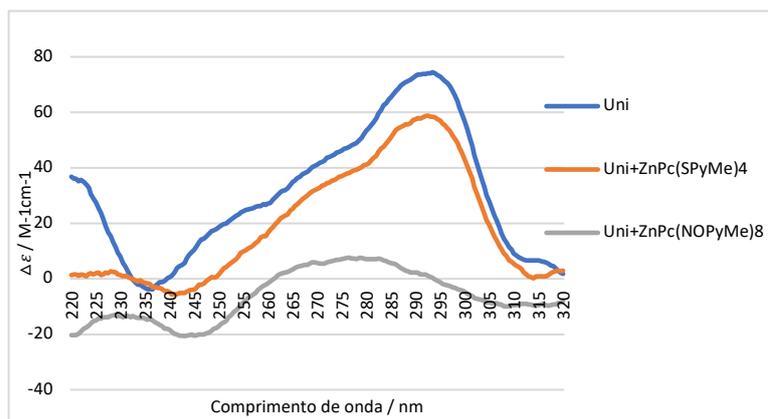


Figura 58 - Espectros de CD obtidos para $AG_3(T_2AG_3)_3$ com as diferentes ftalocianinas em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

No caso da interação de $AG_3(T_2AG_3)_3$ com $ZnPc(NOPyMe)_8$ (figura 58, traço cinza) as alterações produzidas no espectro de CD comparativamente ao espectro obtido para o oligonucleótido sozinho (figura 58, traço azul) são drásticas. Com esta interação observa-se uma banda positiva em torno dos 275 nm e uma negativa em torno de 245 nm. Estas bandas são características de cadeias de ADN em cadeia dupla.

Numa primeira análise, estes resultados sugerem a destruição do G-quadruplex inicialmente formado aquando da interação com $ZnPc(NOPyMe)_8$. Contudo, nos capítulos anteriores vimos que $ZnPc(NOPyMe)_8$ apresentou resultados de batocromismo e DC50 semelhantes para todos os oligonucleótidos estudados exceto para o oligonucleótido de cadeia dupla o 5GC. Se a interação de $ZnPc(NOPyMe)_8$ com $AG_3(T_2AG_3)_3$ conduzisse realmente a uma mudança de conformação de G-quadruplex para ADN duplex seria de esperar que os resultados de batocromismo e DC50 obtidos para este oligonucleótido fossem semelhantes aos obtidos para a sequência 5GC. Além disso, nas experiências de FID com $ZnPc(NOPyMe)_8$ e $AG_3(T_2AG_3)_3$ a intensidade máxima de fluorescência foi obtida a 534 nm, comprimento de onda típico dos G-quadruplexes em interação com TO^{113} , enquanto para o 5GC esse comprimento de onda foi de 527 nm. Assim, com base nos resultados obtidos para o ligando $ZnPc(NOPyMe)_8$ discutidos nos capítulos anteriores, podemos afirmar que esta ftalocianina não induz a destruição do G-quadruplex inicialmente formado.

O espectro de CD obtido pode dever-se a desnaturação do G-quadruplex, não sendo por isso possível concluir a conformação desta sequência de ADN aquando da interação com $ZnPc(NOPyMe)_8$ sem a realização de novas experiências.

Na figura 59 observa-se os espectros de CD obtidos para 5GC quando misturado com as ftalocianinas $ZnPc(SPyMe)_4$ e $ZnPc(NOPyMe)_8$. Para ambas as ftalocianinas, os espectros

obtidos foram idênticos ao espectro obtido apenas com 5GC. Estes resultados revelam que a interação destas ftalocianinas com o 5GC não altera a sua conformação de duplex.

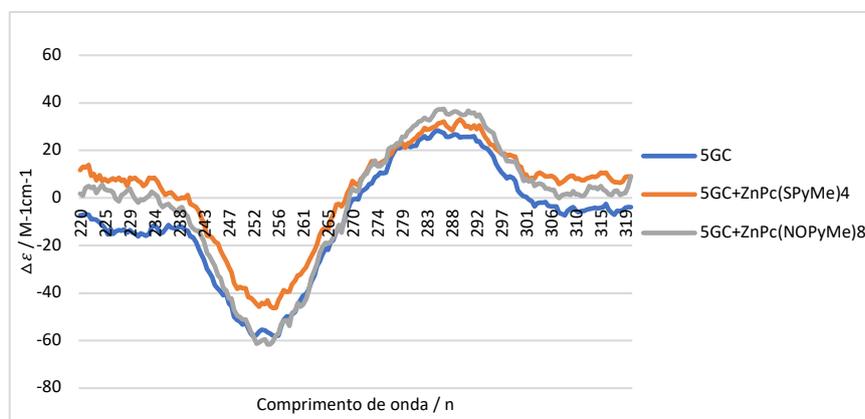


Figura 59 - Espectros de CD obtidos para 5GC com as diferentes ftalocianinas em solução de PBS (100mM de KCl) a 25°C.

Resumindo, tal como para as porfirinas, a interação do oligonucleótido $AG_3(T_2AG_3)_3$ com $ZnPc(SPMe)_4$ leva à preferência deste pela conformação híbrida. A interação de 5GC com qualquer uma das ftalocianinas estudadas não produziu mudanças significativas nos espectros de CD.

Assim, com este método foi possível confirmar a estrutura de G-quadruplex do oligonucleótido $AG_3(T_2AG_3)_3$ assim como perceber a sua conformação. Confirmar a estrutura de cadeia dupla do 5GC e perceber as alterações conformacionais produzidas pelos ligandos nestas cadeias de ADN. Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- o oligonucleótido $AG_3(T_2AG_3)_3$ apresenta conformações múltiplas do tipo híbrido e “tipo cesto”;
- O G-quadruplex unimolecular $AG_3(T_2AG_3)_3$ tende a preferir uma conformação híbrida ao interagir com as porfirinas estudadas ou com a $ZnPc(SPMe)_4$;
- Nem as porfirinas nem as ftalocianinas estudadas originam alterações significativas ao interagir com o oligonucleótido 5GC.

2.5. Avaliação da capacidade de estabilização dos ligandos por estudos de CD-*melting*

Uma aplicação adicional da espectroscopia de CD é a determinação da estabilidade térmica da estrutura dos G-quadruplexes e sua estabilização por ligandos. Ao registrar a elipticidade, a 295 nm, em função da temperatura é possível observar a desnaturação térmica ocorrida no G-quadruplex estudado. Para tal, é necessário assegurar uma gama de temperaturas onde, na temperatura mínima usada o G-quadruplex esteja perfeitamente formado e na temperatura máxima usada este esteja completamente desnaturado. Estes dados podem ser usados para determinar os valores da temperatura de *melting*, T_m (temperatura de desnaturação, ou mais precisamente, temperatura de transição média) e parâmetros termodinâmicos dependentes do modelo. Quando mais estável for o G-quadruplex maior será a sua T_m . Do mesmo modo, um ligando capaz de estabilizar um G-quadruplex aumenta o valor da sua T_m observado para a mistura. Assim, quanto maior for a ΔT_m obtida nos estudos de interação de G-quadruplex/ligando, maior é a estabilização conferida por esse ligando ao G-quadruplex.

Neste trabalho foram analisados a T_m para $AG_3(T_2AG_3)_3$ na ausência e na presença de diferentes ligandos nomeadamente das porfirinas TMPyP, ZnTMPyP, β -TMPyP e TTPyP e das ftalocianinas ZnPc(NO₂PyMe)₈ e ZnPc(SPyMe)₄ (tabela 15 e figura 60). Para o G-quadruplex na ausência de ligando obteve-se uma T_m de 56,1°C. Todos os ligandos estudados promoveram um aumento da T_m deste quadruplex, em especial a β -TMPyP, a ZnPc(NO₂PyMe)₈ e a ZnPc(SPyMe)₄.

Tabela 15 - T_m (°C) obtidas para $AG_3(T_2AG_3)_3$ na ausência e na presença dos respetivos ligandos

| UNI | TMPyP | ZnTMPyP | β -TMPyP | TTPyP | ZnPc(NO ₂ PyMe) ₈ | ZnPc(SPyMe) ₄ |
|------|----------|------------|----------------|------------|---|--------------------------|
| 56,1 | 63,1 (7) | 62,9 (6,8) | 64,8 (8,7) | 57,7 (1,4) | 67,9 (11,8) | 65,9 (9,8) |

(entre parenteses - valores relativos a ΔT_m)

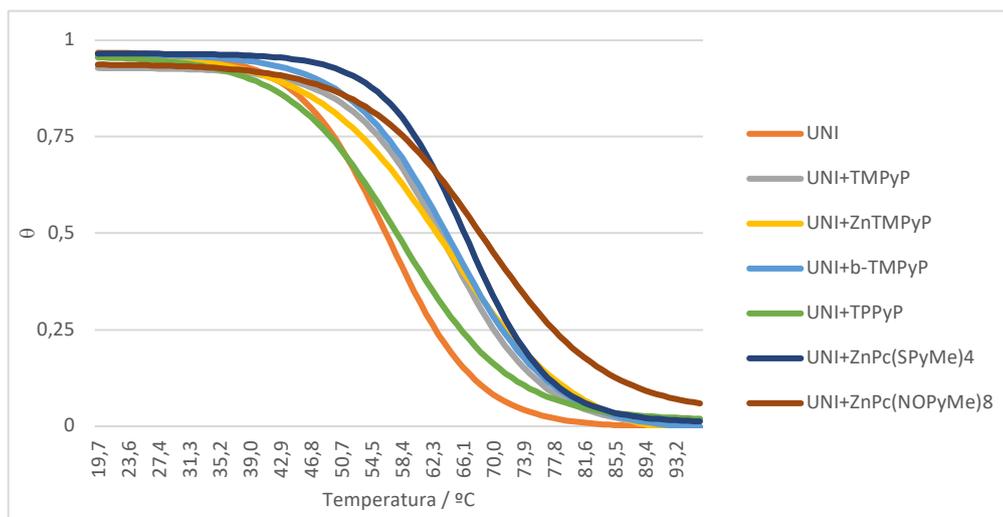


Figura 60 - Curvas CD-melting para $AG_3(T_2AG_3)_3$ na ausência e na presença dos diferentes ligandos na proporção 1:1 em solução de PBS (100mM de KCl).

Segundo a literatura, quando a TMPyP interage com $AG_3(T_2AG_3)_3$ provoca um aumento de cerca de 9°C na temperatura de *melting* deste oligonucleótido.¹²⁰ Contudo, os resultados obtidos para esta porfirina apresentam um aumento de no máximo 7°C. Estes resultados podem ser atribuídos a elevadas concentrações de sal no tampão fosfato utilizado.^{117,121} Um G-quadruplex apresenta grande estabilidade em meio de potássio ou sódio, traduzido em temperaturas de *melting* muito elevadas. Nestas condições, a estabilidade conferida por um ligando mostra-se pouco relevante uma vez que este já se encontra estabilizado pelos iões presentes nos sais. É no entanto possível ajustar a estabilidade do quadruplex sem alterar a concentração total de sal, substituindo todo ou parcialmente o sal de potássio/sódio usado por um sal de lítio.¹²¹ Assim em trabalhos futuros é necessário substituir o KCl do tampão por LiCl de modo a melhorar os resultados obtidos.

Capítulo 3.
Conclusões

3. Conclusões e trabalho futuro

Os estudos de afinidade e seletividade dos ligandos selecionados para G-quadruplexes realizados por espectroscopia de absorção e por FID, mostraram que dentro das porfirinas estudadas aquela que apresenta maior afinidade e seletividade para o G-quadruplex unimolecular é a ZnTMPyP. Contudo, a β -TMPyP apresentou também resultados bastante promissores mostrando a relevância em posicionar os grupos metilpiridínio nas posições *beta* pirrólicas para uma melhoria na seletividade pretendida.

No que diz respeito às ftalocianinas, tanto a ZnPc(NOPyMe)₈ com a ZnPc(SPyMe)₄ apresentaram resultados bastante relevantes apontando para a importância da existência de um equilíbrio entre o número de cargas do ligando e a sua posição de modo a que a estabilização, em especial dos G-quadruplexes, ocorra de uma forma efetiva. É também de notar que a grande afinidade da TPPyP para ADN de cadeia dupla não cumpre os requisitos pretendidos neste trabalho, contudo, demonstrou ser uma molécula muito promissora para trabalhos onde seja necessária uma elevada afinidade e seletividade para ADN de cadeia dupla.

O modelo de *screening* competitivo desenvolvido permitiu tirar as mesmas conclusões acima referidas, tendo sido obtidos resultados que corroboram os obtidos usando um sistema de titulações convencional com todos os gastos e custos associados. Assim, este modelo aparenta ser uma mais-valia permitindo avaliar a afinidade e seletividade para G-quadruplexes de novos ligandos de uma forma rápida e económica.

Através da espectroscopia de CD foi possível confirmar a formação de AG₃(T₂AG₃)₃ como G-quadruplex, apresentando-se numa mistura de conformações híbrida e paralela. Quando este G-quadruplex unimolecular interage com os ligandos estudados tende a preferir a sua conformação híbrida.

Através de experiências de CD foi possível obter as temperaturas de *melting* e foi confirmado um ligeiro aumento de estabilidade do G-quadruplex unimolecular por parte dos ligandos analisados em especial por parte de ZnPc(NOPyMe)₈ e ZnPc(SPyMe)₄.

Podemos concluir que as ftalocianinas catiónicas estudadas demonstraram ser uma classe de moléculas muito promissora para a inibição da telomerase, destacando-se neste trabalho a ZnPc(SPyMe)₄ e a ZnPc(NOPyMe)₈. A ZnTMPyP demonstrou ser dentro das porfirinas estudadas a mais seletiva para os G-quadruplexes, confirmando os resultados positivos já descritos na literatura. A β -TMPyP apresentou também resultados bastante promissores nas condições experimentais utilizadas. Assim sugere-se a realização de mais

estudos, nomeadamente estudos *in-vitro*, com as ftalocianinas $ZnPc(SPyMe)_4$ e $ZnPc(NOPyMe)_8$ e também com a β -TMPyP.

Considerando o aumento de seletividade observado na $ZnTMPyP$, quando comparada com a $TMPyP$ sugere-se também que sejam feitos estudos com o complexo de zinco(II) da porfirina β -TMPyP, uma vez que, quando comparada com a $TMPyP$, a porfirina livre, β -TMPyP, já demonstrou possuir maior seletividade para G-quadruplexes.

Capítulo 4.
Procedimentos experimentais

4. Procedimentos experimentais

4.1. Considerações gerais

Todas as experiências foram realizadas com controle de temperatura (25°C) e foi sempre utilizado tampão fosfato para a preparação e ajuste de soluções e volumes, exceto na técnica de FID. Nesta técnica optou-se por utilizar água mili-Q para o ajuste de volumes uma vez que esta mostrou menos interferência na leitura de fluorescência dos compostos do que o tampão fosfato. Cada ensaio foi efetuado pelo menos em duplicado, no entanto na sua maioria foram feitos em triplicado.

4.1.1. Preparação do tampão fosfato (PBS)

Preparou-se uma solução com 20mM de tampão fosfato (10mL de KH_2PO_4 e 200ul de K_2HPO_4 , ambos a 1μM), 0,1mM de EDTA e 100mM de KCl. Adicionou-se pastilhas de KOH de modo a ajustar o pH a 6,8.

4.1.2. Preparação dos oligonucleótidos de ADN

Os oligonucleótidos de ADN foram dissolvidos em tampão fosfato e aquecidos em banho seco a 85°C, durante 10 minutos, sob agitação de 350 rpm e deixados em repouso, *overnight*, a -20 °C. Os oligonucleótidos utilizados, respetivas topologias e concentrações são apresentadas na tabela 16.

Tabela 16 - Oligonucleótidos utilizados e respetivas topologias e concentrações.

| Oligonucleótidos | Topologia | Concentração/μM |
|--|-----------------------------|-----------------|
| 5GC | ADN de cadeia dupla | 50 |
| T ₂ G ₅ T | G-quadruplex tetramolecular | 25 |
| TAG ₃ T ₂ A | G-quadruplex tetramolecular | 25 |
| G ₄ T ₄ G ₄ | G-quadruplex bimolecular | 50 |
| AG ₃ (T ₂ AG ₃) ₃ | G-quadruplex unimolecular | 100 |

Sempre que necessário os oligonucleótidos foram reaquecidos e deixados em repouso *overnight* de modo a garantir a correta formação das estruturas de ADN pretendidas, cadeia dupla e G-quadruplexes.

4.1.3. Preparação das soluções de porfirina e ftalocianinas catiónicas¹

Foram preparadas soluções *stock* de 40 μ M de cada ligando em DMSO. A partir destas, prepararam-se soluções de 2 μ M, 4 μ M ou 5 μ M diluídas em tampão fosfato. As soluções diluídas em tampão foram preparadas no próprio dia de modo a minorar os efeitos de agregação. No caso das ftalocianinas estudadas, as soluções *stock*, em DMSO, foram também preparadas no dia da sua utilização. Foram determinados por espectrofotometria de UV-vis, os coeficientes de extinção molar ao comprimento de onda máximo da banda característica de cada ligando, banda Soret para as porfirinas ou banda Q para as ftalocianinas (tabela 17). Os valores obtidos foram depois usados para acertar a concentração exata de cada ligando antes de cada experiência.

Tabela 17 - Coeficientes de extinção molar dos ligandos obtidos nos máximos de absorção

| Ligando | Máximo da banda característica/nm | Coefficiente de extinção molar/M ⁻¹ cm ⁻¹ |
|---|-----------------------------------|---|
| TMPyP | 422 | 226000 |
| ZnTMPyP | 437 | 225000 |
| β -TMPyP | 454 | 85350 |
| TPPyP | 424 | 244445 |
| β -TPPyP | 466 | 43261 |
| TSPyP | 416 | 316228 |
| ZnPcH ₈ (NOPyMe) ₈ | 677 | 106299 |
| ZnPcH ₁₂ (NOPyMe) ₄ | 620 | 23956 |

¹ Os ligandos estudados neste trabalho foram fornecidos por membros do grupo de Química Orgânica da Universidade de Aveiro.

| | | |
|--|-----|-------|
| ZnPcH₈(SPyMe)₈ | 658 | 70808 |
| ZnPcH₁₂(SPyMe)₄ | 638 | 78217 |

4.2. Técnicas

4.2.1. Titulações espectrofotométricas de UV-vis

As titulações foram realizadas através da adição sucessiva de volumes crescentes dos oligonucleótidos selecionados a 1 mililitro da solução de ligando com concentração inicial de 2µM. Os espectros de absorção foram adquiridos num espectrofotómetro UV-2501PC Shimadzu entre os comprimentos de onda de 350-800nm, no caso das porfirinas, e entre os 300-800nm no caso das ftalocianinas. Os valores de absorvância obtidos foram corrigidos, quanto ao efeito de diluição, para todas as adições. As titulações foram terminadas após a leitura de, no mínimo, três valores de absorvância consecutivos sem registo de alterações consideráveis, tal como descrito na literatura.⁶⁹

Para a análise dos resultados foi tido em conta o batocromismo e o hipocromismo resultante das titulações. O batocromismo corresponde ao desvio para a zona do vermelho na banda característica de cada ligando observado no final da titulação. A percentagem de hipocromismo foi calculada pela fórmula como descrito na literatura:⁷³

$$\%hipocromismo = \frac{\varepsilon' - \varepsilon}{\varepsilon'} \times 100$$

onde ε corresponde ao coeficiente de extinção molar característica de cada ligando livre e ε' é o correspondente valor no final da titulação. O hipocromismo registado nas titulações ligando-oligonucleótido foi corrigido relativamente ao hipocromismo resultante apenas da presença do tampão.

4.2.2. Competições espectrofotométricas de UV-vis

Os estudos de competição foram realizados usando dois instrumentos distintos: um espectrofotómetro (UV-2501PC Shimadzu) e um instrumento *multi-mode reader* (SYNERGY BioTek).

No primeiro caso, em cada estudo foram adicionados 500µL de uma solução contendo a porfirina, com concentração de 4µM, a 500µL de uma solução contendo a

ftalocianina na mesma concentração de modo a obter 1mL de solução com concentração de 2 μ M de porfirina e 2 μ M de ftalocianina. A esta solução foram adicionados volumes selecionados de oligonucleótido de modo a obter soluções finais com proporções 2:1, 1:1, 1:2 (mistura porfirina/ftalocianina: oligonucleótido), os espectros de absorção foram registados no intervalo de comprimentos de onda 250 a 800nm. Os valores de absorvância obtidos foram corrigidos quanto ao efeito de diluição ao longo das adições. No leitor de placas usaram-se as mesmas concentrações de porfirina, ftalocianina e oligonucleótido e todas os parâmetros foram proporcionalmente ajustados para um volume final de 300 μ L.

4.2.3. G4-FID

Foram previamente preparadas várias soluções *stock* contendo uma mistura de TO (*Thiazole Orange*) com concentração de 35 μ M e oligonucleótido com concentração de 10 μ M. Esta mistura foi sujeita a 10 minutos de agitação no *vortex* na velocidade mínima. Estas soluções *stock* mostraram ser estáveis ao longo do tempo sendo por isso possível a sua preparação no dia anterior.

A otimização das condições experimentais foi realizada no fluorímetro convencional (Horiba, Fluoromax-3), contudo, de modo a agilizar a recolha de resultados, todas as experiências foram realizadas em placas de 96 poços num instrumento *multi-mode reader* (SYNERGY, BioTek) adaptando assim as condições anteriormente estudadas. Em cada poço foram colocados 60 μ L de solução *stock* TO-oligonucleótido e um volume determinado de ligando, com concentração 5 μ M, de modo a obter uma concentração crescente de ligando, entre 0 e 4 μ M. O volume final de 300 μ L foi acertado com água mili-Q. Foram realizados os seguintes controlos: água mili-Q, TO a 3,5 μ M, oligonucleótido a 1 μ M, ligando a 0,25 μ M e a 4 μ M, ligando 0,25 μ M com TO a 3,5 μ M, ligando 4 μ M com TO a 3,5 μ M, ligando 0,25 μ M com oligonucleótido a 1 μ M e ligando 4 μ M com oligonucleótido a 1 μ M. Na tabela 18 encontra-se um exemplo das fluorescências máximas obtidas por estes controlos usando TMPyP e 5GC. Tal como esperado, todos os controlos deram valores próximos de zero, em comparação com a fluorescência obtida pela mistura TO com oligonucleótido.

Tabela 18 – Fluorescências máximas obtidas nos controlos realizados com TO, 5GC e TMPyP

| | | | |
|------------------|----|-----------------------|--------------|
| H ₂ O | 15 | TMPyP(0,25)+TO | 21 |
| TO (3,5µM) | 82 | TMPyP(4)+TO | 156 |
| 5GC (1µM) | 18 | TMPyP(0,25)+5GC | 8 |
| TMPyP (0,25µM) | 8 | TMPyP(4)+5GC | 94 |
| TMPyP (4µM) | 86 | TO(3,5)+5GC(1) | 43868 |

A fluorescência das amostras foi medida num instrumento *multi-mode reader* (SYNERGY BioTek) com temperatura controlada (25 °C). O comprimento de onda de excitação usado foi 485 nm (~ 20 nm) e o de emissão 528 nm (~ 20 nm).

As percentagens de deslocamento (%DC) foram calculadas a partir da variação da intensidade de fluorescência, utilizando a seguinte formula como descrito na literatura¹⁰⁶:

$$\%DC = 100 - \frac{F_A}{F_{A0}} \times 100$$

onde $F_A = F - F_{H_2O}$ e $F_{A0} = F_0 - F_{H_2O}$, sendo F a fluorescência de cada amostra, F_{H_2O} a fluorescência da água mili-Q e F_0 a fluorescência da amostra sem ligando.

4.2.4. Dicroísmo circular, CD

Foram preparadas várias amostras contendo 2 µM do oligonucleótido selecionado, AG₃(T₂AG₃)₃ e os vários ligandos na mesma concentração. As diferentes soluções foram aquecidas em banho seco a 85°C, durante 10 minutos, sob agitação de 350 rpm e deixados em repouso, *overnight*, a -20 °C. Os espectros de CD foram adquiridos num espectropolarímetro Jasco J-1500, entre os 220-320 nm, considerando 3 acumulações, a 40 nm/min, DIT de 16 segundos e 1 nm de largura de banda. Foram usadas cuvetes de quartzo de 1 mm de largura.

4.2.5. CD-melting

Foram usadas as mesmas amostras preparadas para as experiências de CD. Os espectros de CD-melting foram recolhidos num espectropolarímetro Jasco J-1500 entre 320-

220 nm, utilizando 3 acumulações a 40 nm/min, DIT de 16 segundos e 1 nm de largura de banda, usando cuvetes de quartzo de 1 mm de largura.

O espectro foi obtido no intervalo de temperatura entre os 20 e os 95 °C, ao comprimento de onda característico dos quadruplexes, 295 nm. Os dados de CD obtidos foram convertidos na respetiva fração de quadruplex “*folded*” (θ) usando a seguinte formula, descrita na literatura¹¹⁷:

$$\theta = \frac{CD - CD^{min}}{CD^{max} - CD^{min}}$$

onde CD é a elipticidade obtida a diferentes temperaturas, dentro do intervalo de temperaturas selecionado, CD^{min} e CD^{max} são a elipticidade mínima e máxima observadas, respetivamente.

As temperaturas de *melting* (T_m 's) foram determinadas ajustando os valores obtidos a uma curva sigmoidal, usando a função Boltzmann, no *software* Origin 8.0, onde o valor do ponto médio corresponde a T_m .

Bibliografia

1. Estatísticas sobre causas de morte. at <http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Causes_of_death_statistics/pt#Estat.C3.ADsticas_sobre_causas_de_morte>
2. Harley, C. B. Telomerase and cancer therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 167–179 (2008).
3. Blackburn, E. H. Structure and function of telomeres. *Nature* **350**, 569–573 (1991).
4. Harley, C. B., Futcher, A. B. & Greider, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **345**, 458–460 (1990).
5. Chang, E. & Harley, C. B. Telomere length and replicative aging in human vascular tissues. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**, 11190–11194 (1995).
6. Allsopp, R. C. & Harley, C. B. Evidence for a Critical Telomere Length in Senescent Human Fibroblasts. *Exp. Cell Res.* **219**, 130–136 (1995).
7. Vaziri, H. & Benchimol, S. Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr. Biol.* **8**, 279–282 (1998).
8. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* **43**, 405–413 (1985).
9. Nobel da Medicina para estudo sobre enzima que protege os cromossomas. at <<https://www.publico.pt/2009/10/05/mundo/noticia/nobel-da-medicina-para-estudo-sobre-enzima-que-protege-os-cromossomas-1403703>>
10. Muller, H. J. The remaking of chromosomes. *Collect. Net* **13**, 181–195 (1938).
11. Watson, J. D. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.* **239**, 197–201 (1972).
12. Levy, M. Z., Allsopp, R. C., Futcher, A. B., Greider, C. W. & Harley, C. B. Telomere end-replication problem and cell aging. *J. Mol. Biol.* **225**, 951–960 (1992).
13. Olovnikov, A. M. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J. Theor. Biol.* **41**, 181–190 (1973).
14. Campisi, J. The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer* **33**, 703–709 (1997).
15. Mason, M., Schuller, A. & Skordalakes, E. Telomerase structure function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 92–100 (2011).
16. Zhu, H., Belcher, M. & van der Harst, P. Healthy aging and disease: role for telomere biology? *Clin. Sci.* **120**, 427–440 (2011).
17. Greider, C. W. & Blackburn, E. H. Telomeres, Telomerase and Cancer [Reprint]. *Sci. Am.* (2009). at <<https://www.scientificamerican.com/article/telomeres-telomerase-and/>>
18. Shay, J. W. & Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur. J. Cancer* **33**, 787–791 (1997).
19. Chen, Z. F., Qin, Q. P., Qin, J. L., Liu, Y. C., Huang, K. Bin, Li, Y. L., Meng, T., Zhang, G. H., Peng, Y., Luo, X. J. & Liang, H. Stabilization of G-quadruplex DNA, inhibition of telomerase activity, and tumor cell apoptosis by organoplatinum(II) complexes with oxoisoaporphine. *J. Med. Chem.* **58**, 2159–2179 (2015).
20. Zhang, F., Wang, X. L., Shi, J., Wang, S. F., Yin, Y., Yang, Y. S., Zhang, W. M. & Zhu, H. L. Synthesis, molecular modeling and biological evaluation of N-benzylidene-2-((5-(pyridin-4-yl)-

- 1,3,4-oxadiazol-2-yl)thio)acetohydrazide derivatives as potential anticancer agents. *Bioorganic Med. Chem.* **22**, 468–477 (2014).
21. Tang, W. J., Wang, J., Tong, X., Shi, J. B., Liu, X. H. & Li, J. Design and synthesis of celastrol derivatives as anticancer agents. *Eur. J. Med. Chem.* **95**, 166–173 (2015).
 22. Reed, J. E., Neidle, S. & Vilar, R. Stabilisation of human telomeric quadruplex DNA and inhibition of telomerase by a platinum–phenanthroline complex. *Chem. Commun.* 4366–4368 (2007). at <http://xlink.rsc.org/?DOI=b709898g>
 23. Camp, E. R., Summy, J., Bauer, T. W., Liu, W., Gallick, G. E. & Ellis, L. M. Molecular mechanisms of resistance to therapies targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin. Cancer Res.* **11**, 397–405 (2005).
 24. Watson, J. D. & Crick, F. H. C. Molecular Structure of Nucleic Acids. *Nature* **171**, 737–738 (1953).
 25. Senior, M. M., Jones, R. A. & Breslauer, K. J. Influence of loop residues on the relative stabilities of DNA hairpin structures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6242–6246 (1988).
 26. Virus-induced fever might change bacteria from commensal to pathogen. at <http://www.virology.ws/2013/10/29/virus-induced-fever-might-change-bacteria-from-commensal-to-pathogen/>
 27. Frank-Kamenetskii, M. D. & Mirkin, S. M. Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 65–95 (1995).
 28. Felsenfeld, G., Davies, D. R. & Rich, A. Formation of a three stranded polynucleotide molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 2023–2024 (1957).
 29. Beal, P. & Dervan, P. Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide-directed triple-helix formation. *Science (80-.)*. **251**, 1360–1363 (1991).
 30. Stefan, L., Bertrand, B., Richard, P., Le Gendre, P., Denat, F., Picquet, M. & Monchaud, D. Assessing the Differential Affinity of Small Molecules for Noncanonical DNA Structures. *ChemBioChem* **13**, 1905–1912 (2012).
 31. Sen, D. & Gilbert, W. Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motifs in DNA and its implications for meiosis. *Nature* **334**, 364–366 (1988).
 32. Davis, J. T. & Spada, G. P. Supramolecular architectures generated by self-assembly of guanosine derivatives. *Chem. Soc. Rev.* **36**, 296–313 (2007).
 33. Biffi, G., Tannahill, D., McCafferty, J. & Balasubramanian, S. Quantitative Visualization of DNA G-quadruplex Structures in Human Cells. *Nat Chem* **5**, 182–186 (2013).
 34. Gellert, M., Lipsett, M. N. & Davies, D. R. Helix Formation By Guanylic Acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **48**, 2013–2018 (1962).
 35. Ramos, C. I. Espectrometria de Massa de Macrociclos e dos seus Aductos com o ADN. (2012).
 36. Rhodes, D. & Lipps, H. J. Survey and summary G-quadruplexes and their regulatory roles in biology. *Nucleic Acids Res.* **43**, 8627–8637 (2015).
 37. Pinnavaia, T. J., Marshall, C. L., Fisk, C. L., Miles, H. T. & Becker, E. D. Alkali Metal Ion Specificity in the Solution Ordering of a Nucleotide, 5'-Guanosine Monophosphate. *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3625–3627 (1978).
 38. Murat, P., Singh, Y. & Defrancq, E. Methods for investigating G-quadruplex DNA/ligand

- interactions. *Chem. Soc. Rev.* **40**, 5293 (2011).
39. Paramasivan, S., Rujan, I. & Bolton, P. H. Circular dichroism of quadruplex DNAs: Applications to structure, cation effects and ligand binding. *Methods* **43**, 324–331 (2007).
 40. Zhang, Z., Dai, J., Veliath, E., Jones, R. A. & Yang, D. Structure of a two-G-tetrad intramolecular G-quadruplex formed by variant human telomeric sequence in K⁺ solution: Insights into the interconversion of human telomeric G-quadruplex structures. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1009–1021 (2009).
 41. Dai, J., Carver, M., Punchihewa, C., Jones, R. A. & Yang, D. Structure of the hybrid-2 type intramolecular human telomeric G-quadruplex in K⁺ solution: Insights into structure polymorphism of the human telomeric sequence. *Nucleic Acids Res.* **35**, 4927–4940 (2007).
 42. Xu, Y., Noguchi, Y. & Sugiyama, H. The new models of the human telomere d[AGGG(TTAGGG)₃] in K⁺ solution. *Bioorganic Med. Chem.* **14**, 5584–5591 (2006).
 43. Burge, S., Parkinson, G. N., Hazel, P., Todd, A. K. & Neidle, S. Quadruplex DNA: Sequence, topology and structure. *Nucleic Acids Res.* **34**, 5402–5415 (2006).
 44. Neidle, S. The structures of quadruplex nucleic acids and their drug complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**, 239–250 (2009).
 45. David, W. M., Brodbelt, J., Kerwin, S. M. & Wang Thomas, P. Investigation of quadruplex oligonucleotide - Drug interactions by electrospray ionization mass spectrometry. *Anal. Chem.* **74**, 2029–2033 (2002).
 46. Clay, E. H. & Gould, I. R. A combined QM and MM investigation into guanine quadruplexes. *J. Mol. Graph. Model.* **24**, 138–146 (2005).
 47. Jain, A. K., Paul, A., Maji, B., Muniyappa, K. & Bhattacharya, S. Dimeric 1,3-Phenylene-bis(piperazinyl benzimidazole)s: Synthesis and structure-activity investigations on their binding with human telomeric G-quadruplex DNA and telomerase inhibition properties. *J. Med. Chem.* **55**, 2981–2993 (2012).
 48. Tan, J.-H., Gu, L.-Q. & Wu, J.-Y. Design of selective G-quadruplex ligands as potential anticancer agents. *Mini-reviews Med. Chem.* **8**, 1163–1178 (2008).
 49. Breslow, R. A., Shay, J. W., Gazdar, A. F. & Srivastava, S. Telomerase and early detection of cancer: a National Cancer Institute workshop. *J Natl Cancer Inst* **89**, 618–623 (1997).
 50. Gowan, S. M., Harrison, J. R., Patterson, L., Valenti, M., Read, M. a, Neidle, S. & Kelland, L. R. A G-quadruplex-interactive potent small-molecule inhibitor of telomerase exhibiting in vitro and in vivo antitumor activity. *Mol. Pharmacol.* **61**, 1154–1162 (2002).
 51. Huppert, J. L. & Balasubramanian, S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. *Nucleic Acids Res.* **35**, 406–413 (2007).
 52. Cogoi, S. & Xodo, L. E. G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2536–2549 (2006).
 53. Shivalingam, A., Izquierdo, M. A., Marois, A. Le, Vyšniauskas, A., Suhling, K., Kuimova, M. K. & Vilar, R. The interactions between a small molecule and G-quadruplexes are visualized by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Nat. Commun.* **6**, (2015).
 54. Wei, C. Y., Wang, J. H., Wen, Y., Liu, J. & Wang, L. H. 4-(1H-Imidazo[4,5-f]-1,10-phenanthrolin-2-

- yl)phenol-based G-quadruplex DNA binding agents: Telomerase inhibition, cytotoxicity and DNA-binding studies. *Bioorganic Med. Chem.* **21**, 3379–3387 (2013).
55. Williamson, J. R., Raghuraman, M. K. & Cech, T. R. Monovalent cation-induced structure of telomeric DNA: The G-quartet model. *Cell* **59**, 871–880 (1989).
 56. Hardin, C. C., Henderson, E., Watson, T. & Prosser, J. K. Monovalent cation induced Structural transitions in telomeric DNAs: G-DNA folding intermediates. *Biochem* **30**, 4460–4472 (1991).
 57. Smith, F. W. & Feigon, J. Quadruplex structure of Oxytricha telomeric DNA oligonucleotides. *Nature* **356**, 164–8 (1992).
 58. Dixon, I. M., Lopez, F., Estève, J. P., Tejera, A. M., Blasco, M. A., Pratviel, G. & Meunier, B. Porphyrin derivatives for telomere binding and telomerase inhibition. *ChemBioChem* **6**, 123–132 (2005).
 59. Campbell, N. H., Karim, N. H. A., Parkinson, G. N., Gunaratnam, M., Petrucci, V., Todd, A. K., Vilar, R. & Neidle, S. Molecular Basis of Structure–Activity Relationships between Salphen Metal Complexes and Human Telomeric DNA Quadruplexes. *J. Med. Chem.* **55**, 209–222 (2012).
 60. Zhang, S., Wu, Y. & Zhang, W. G-quadruplex structures and their interaction diversity with ligands. *ChemMedChem* **9**, 899–911 (2014).
 61. Romera, C., Bombarde, O., Bonnet, R., Gomez, D., Dumy, P., Calsou, P., Gwan, J. F., Lin, J. H., Defrancq, E. & Pratviel, G. Improvement of porphyrins for G-quadruplex DNA targeting. *Biochimie* **93**, 1310–1317 (2011).
 62. Zhang, L., Huang, J., Ren, L., Bai, M., Wu, L., Zhai, B. & Zhou, X. Synthesis and evaluation of cationic phthalocyanine derivatives as potential inhibitors of telomerase. *Bioorganic Med. Chem.* **16**, 303–312 (2008).
 63. Ren, L., Zhang, A., Huang, J., Wang, P., Weng, X., Zhang, L., Liang, F., Tan, Z. & Zhou, X. Quaternary ammonium zinc phthalocyanine: Inhibiting telomerase by stabilizing G quadruplexes and inducing G-quadruplex structure transition and formation. *ChemBioChem* **8**, 775–780 (2007).
 64. Le, V. H., Nagesh, N. & Lewis, E. A. Bcl-2 Promoter Sequence G-Quadruplex Interactions with Three Planar and Non-Planar Cationic Porphyrins: TMPyP4, TMPyP3, and TMPyP2. *PLoS One* **8**, 1–9 (2013).
 65. Gaier, A. J. & McMillin, D. R. Binding studies of G-quadruplex DNA and porphyrins: Cu(T4) vs sterically friendly Cu(t D4). *Inorg. Chem.* **54**, 4504–4511 (2015).
 66. Zhu, L. N., Wu, B. & Kong, D. M. Specific recognition and stabilization of monomeric and multimeric G-quadruplexes by cationic porphyrin TMPipEOPP under molecular crowding conditions. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4324–4335 (2013).
 67. Izbicka, E., Wheelhouse, R. T., Raymond, E., Cells, H. T., Davidson, K. K., Lawrence, R. a, Sun, D., Windle, B. E., Hurley, L. H. & Hoff, D. D. Von. Effects of Cationic Porphyrins as G-Quadruplex Interactive Agents in Human Tumor Cells. *Cancer Res.* **59**, 639–644 (1999).
 68. Grand, C. L., Han, H., Muñoz, R. M., Weitman, S., Von Hoff, D. D., Hurley, L. H. & Bearss, D. J. The cationic porphyrin TMPyP4 down-regulates c-MYC and human telomerase reverse transcriptase expression and inhibits tumor growth in vivo. *Mol. Cancer Ther.* **1**, 565–73 (2002).
 69. Wei, C., Han, G., Jia, G., Zhou, J. & Li, C. Study on the interaction of porphyrin with G-quadruplex

- DNAs. *Biophys. Chem.* **137**, 19–23 (2008).
70. Arora, A. & Maiti, S. Effect of loop orientation on quadruplex-TMPyP4 interaction. *J. Phys. Chem. B* **112**, 8151–8159 (2008).
 71. Membrino, A., Paramasivam, M., Cogoi, S., Alzeer, J., Luedtke, N. W. & Xodo, L. E. Cellular uptake and binding of guanidine-modified phthalocyanines to KRAS/HRASG-quadruplexes. *Chem. Commun.* **46**, 625–627 (2010).
 72. Alzeer, J., Vummidi, B. R., Roth, P. J. C. & Luedtke, N. W. Guanidinium-modified phthalocyanines as high-affinity G-quadruplex fluorescent probes and transcriptional regulators. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 9362–9365 (2009).
 73. Hassani, L., Hakimian, F. & Safaei, E. Spectroscopic investigation on the interaction of copper porphyrazines and phthalocyanine with human telomeric G-quadruplex DNA. *Biophys. Chem.* **187–188**, 7–13 (2014).
 74. Yaku, H., Fujimoto, T., Murashima, T., Miyoshi, D. & Sugimoto, N. Phthalocyanines: A new class of G-quadruplex-ligands with many potential applications. *Chem. Commun.* **48**, 6203–6216 (2012).
 75. Porphyrins : the Colors of Life. (2016). at <<http://physicsopenlab.org/2016/07/04/porphyrins-the-colors-of-life/>>
 76. Fujiwara, T. & Harigae, H. Biology of Heme in Mammalian Erythroid Cells and Related Disorders. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
 77. Orten, J. M. Metabolism of Hemoglobin and Bile Pigments. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **1**, 113–124 (1971).
 78. Rebeiz, C. A., Wu, S. M., Kuhadja, M., Daniell, H. & Perkins, E. J. Chlorophylla biosynthetic routes and chlorophylla chemical heterogeneity in plants. *Mol. Cell. Biochem.* **57**, 97–125 (1983).
 79. Milgrom, L. R. in *colours life* 6–13 (Oxford University Press, 1997).
 80. Schuitmaker, J. J., Baas, P., van Leengoed, H. L. L. M., van der Meulen, F. W., Star, W. M. & van Zandwijk, N. Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **34**, 3–12 (1996).
 81. Haq, I., Trent, J. O., Chowdhry, B. Z. & Jenkins, T. C. Intercalative G-tetraplex stabilization of telomeric DNA by a cationic porphyrin. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 1768–1779 (1999).
 82. Han, H. & Hurley, L. H. G-quadruplex DNA: A potential target for anti-cancer drug design. *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 136–142 (2000).
 83. Wu, X. & Maizels, N. Substrate-specific inhibition of RecQ helicase. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1765–1771 (2001).
 84. Guliaev, A. B. & Leontis, N. B. Cationic 5,10,15,20-Tetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphyrin Fully Intercalates at 5'-CG-3' Steps of Duplex DNA in Solution. *Biochemistry* **38**, 15425–15437 (1999).
 85. Rha, S. Y., Izbicka, E., Lawrence, R., Lines, N. C., Davidson, K., Sun, D., Moyer, M. P., Roodman, G. D., Hurley, L. & Hoff, D. Von. Effect of Telomere and Telomerase Interactive Agents on Human Tumor and Normal Cell Lines. *Clin. Cancer Res.* **6**, 987–993 (2000).
 86. Dixon, I. M., Tejera, A. M., Este, J., Blasco, M. A., Meunier, B., Coordination, L. D. C. De, Narbonne, D., Cedex, T., Bugnard, I. L., Cedex, T., National, S. & Cedex, T. A G-Quadruplex Ligand with 10000-Fold Selectivity over Duplex DNA. *J. AM. CHEM. SOC.* **129**, 1502–1503

- (2007).
87. Müller, S. & Rodriguez, R. G-quadruplex interacting small molecules and drugs: From bench toward bedside. *Expert Rev. Clin. Pharmacol.* **7**, 663–679 (2014).
 88. Mikami-Terao, Y., Akiyama, M., Yuza, Y., Yanagisawa, T., Yamada, O., Kawano, T., Agawa, M., Ida, H. & Yamada, H. Antitumor activity of TMPyP4 interacting G-quadruplex in retinoblastoma cell lines. *Exp. Eye Res.* **89**, 200–208 (2009).
 89. Fujimori, J., Matsuo, T., Shimose, S., Kubo, T., Ishikawa, M., Yasunaga, Y. & Ochi, M. Antitumor effects of telomerase inhibitor TMPyP4 in osteosarcoma cell lines. *J. Orthop. Res.* **29**, 1707–1711 (2011).
 90. Shamma, M. A., Shmookler Reis, R. J., Akiyama, M., Koley, H., Chauhan, D., Hideshima, T., Goyal, R. K., Hurley, L. H., Anderson, K. C. & Munshi, N. C. Telomerase inhibition and cell growth arrest by G-quadruplex interactive agent in multiple myeloma. *Mol. Cancer Ther.* **2**, 825–33 (2003).
 91. Liu, A. H., Sun, X., Wei, X. Q. & Zhang, Y. Z. Efficacy of Multiple Low-dose Photodynamic TMPYP4 Therapy on Cervical Cancer Tumour Growth in Nude Mice. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **14**, 5371–5374 (2013).
 92. Rapozzi, V., Zorzet, S., Zacchigna, M., Della Pietra, E., Cogoi, S. & Xodo, L. E. Anticancer activity of cationic porphyrins in melanoma tumour-bearing mice and mechanistic in vitro studies. *Mol. Cancer* **13**, 1–17 (2014).
 93. Singh, S., Aggarwal, A., Bhupathiraju, N. V. S. D. K., Arianna, G., Tiwari, K. & Drain, C. M. Glycosylated Porphyrins, Phthalocyanines, and Other Porphyrinoids for Diagnostics and Therapeutics. *Chem. Rev.* **115**, 10261–10306 (2015).
 94. Sakamoto, K. & Ohno-Okumura, E. Syntheses and functional properties of phthalocyanines. *Materials (Basel)*. **2**, 1127–1179 (2009).
 95. Giuntini, F., Nistri, D., Chiti, G., Fantetti, L., Jori, G. & Roncucci, G. Synthesis of trimethylammoniumphenylthio-substituted phthalocyanines with different pattern of substitution. *Tetrahedron Lett.* **44**, 515–517 (2003).
 96. De Filippis, M. P., Dei, D., Fantetti, L. & Roncucci, G. Synthesis of a new water-soluble octa-cationic phthalocyanine derivative for PDT. *Tetrahedron Lett.* **41**, 9143–9147 (2000).
 97. Rotelok, D. Síntese de novos materiais baseados em ftalocianinas para captura de CO₂. (2013).
 98. Taquet, J., Frochot, C., Manneville, V. & Barberi-Heyob, M. Phthalocyanines Covalently Bound to Biomolecules for a Targeted Photodynamic Therapy. *Curr. Med. Chem.* **14**, 1673–1687 (2007).
 99. Varotto, A., Nam, C. Y., Radivojevioc, I., Tomé, J. P. C., Cavaleiro, J. A. S., Black, C. T. & Drain, C. M. Phthalocyanine blends improve bulk heterojunction solar cells. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 2552–2554 (2010).
 100. Xu, P., Chen, J., Chen, Z., Zhou, S., Hu, P., Chen, X. & Huang, M. Receptor-targeting phthalocyanine photosensitizer for improving antitumor photocytotoxicity. *PLoS One* **7**, 8–15 (2012).
 101. Ribeiro, A. O., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Iamamoto, Y. & Torres, T. [1,2,3,4-Tetrakis(α/β -D-galactopyranos-6-yl)phthalocyaninato] zinc(II): a water-soluble phthalocyanine. *Tetrahedron Lett.* **47**, 9177–9180 (2006).
 102. Çolak, S., Durmuş, M. & Yildiz, S. Z. The water-soluble zwitterionic and cationic tetra-substituted

- zinc(II) phthalocyanines: Synthesis, photophysical, photochemical and protein binding properties. *Polyhedron* **113**, 115–122 (2016).
103. Sakamoto, K. & Ohno, E. Synthesis of soluble metal phthalocyanine derivatives and their electron transfer properties. *J. Soc. Dye. Colour.* **112**, 365–374 (1996).
 104. Kernag, C. A. & Mcgrath, D. V. Non-aggregating octasubstituted dendritic phthalocyanines. *Chem. Commun.* 1048–1049 (2003).
 105. Monchaud, D., Allain, C., Bertrand, H., Smargiasso, N., Rosu, F., Gabelica, V., De Cian, A., Mergny, J. L. & Teulade-Fichou, M. P. Ligands playing musical chairs with G-quadruplex DNA: A rapid and simple displacement assay for identifying selective G-quadruplex binders. *Biochimie* **90**, 1207–1223 (2008).
 106. Tran, P. L. T., Largy, E., Hamon, F., Teulade-Fichou, M. P. & Mergny, J. L. Fluorescence intercalator displacement assay for screening G4 ligands towards a variety of G-quadruplex structures. *Biochimie* **93**, 1288–1296 (2011).
 107. Largy, E., Hamon, F. & Teulade-Fichou, M. P. Development of a high-throughput G4-FID assay for screening and evaluation of small molecules binding quadruplex nucleic acid structures. *Anal. Bioanal. Chem.* **400**, 3419–3427 (2011).
 108. Mender, I. & Shay, J. W. Telomerase Repeated Amplification Protocol (TRAP). *Bio Protoc.* **5**, 1922–2013 (2015).
 109. Isago, H. & Fujita, H. Solvent effects on molecular aggregation of highly water-soluble phthalocyanines. *J. Porphyr. Phthalocyanines* **22**, 102–111 (2018).
 110. Parkinson, G. N. in *Quadruplex Nucleic Acids* (eds. Neidle, S. & Balasubramanian, S.) 1–27 (RSCPublishing, 2016).
 111. Bağda, E., Bağda, E. & Durmuş, M. G-quadruplex and calf thymus DNA interaction of quaternized tetra and octa pyridyloxy substituted indium (III) phthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* **175**, 9–19 (2017).
 112. Nygren, J., Svanvik, N. & Kubista, M. The Interactions Between the Fluorescent Dye Thiazole Orange and DNA. *Biopolymers* **46**, 39–51 (1998).
 113. Shi, S., Huang, H.-L., Gao, X., Yao, J.-L., Lv, C.-Y., Zhao, J., Sun, W.-L., Yao, T.-M. & Ji, L.-N. A comparative study of the interaction of two structurally analogous ruthenium complexes with human telomeric G-quadruplex DNA. *J. Inorg. Biochem.* **121**, 19–27 (2013).
 114. Kypr, J., Kejnovská, I., Renčiuk, D. & Vorlíčková, M. Circular dichroism and conformational polymorphism of DNA. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1713–1725 (2009).
 115. Del Mundo, I. M. A., Zewail-Foote, M., Kerwin, S. M. & Vasquez, K. M. Alternative DNA structure formation in the mutagenic human c-MYC promoter. *Nucleic Acids Res.* **45**, 4929–4943 (2017).
 116. Dapić, V., Abdomerović, V., Marrington, R., Peberdy, J., Rodger, A., Trent, J. O. & Bates, P. J. Biophysical and biological properties of quadruplex oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **31**, 2097–2107 (2003).
 117. Carvalho, J., Queiroz, J. A. & Cruz, C. Circular dichroism of G-Quadruplex: A laboratory experiment for the study of topology and ligand binding. *J. Chem. Educ.* **94**, 1547–1551 (2017).
 118. Ambrus, A., Chen, D., Dai, J., Bialis, T., Jones, R. A. & Yang, D. Human telomeric sequence forms

- a hybrid-type intramolecular G-quadruplex structure with mixed parallel/antiparallel strands in potassium solution. *Nucleic Acids Res.* **34**, 2723–2735 (2006).
119. Qi, J. & Shafer, R. H. Covalent ligation studies on the human telomere quadruplex. *Nucleic Acids Res.* **33**, 3185–3192 (2005).
120. Ruan, T. L., Davis, S. J., Powell, B. M., Harbeck, C. P., Habdas, J., Habdas, P. & Yatsunyk, L. A. Lowering the overall charge on TMPyP4 improves its selectivity for G-quadruplex DNA. *Biochimie* **132**, 121–130 (2017).
121. Mergny, J. L. & Lacroix, L. UV melting of G-quadruplexes. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* 17.1.1-17.1.15 (2009).

Anexos

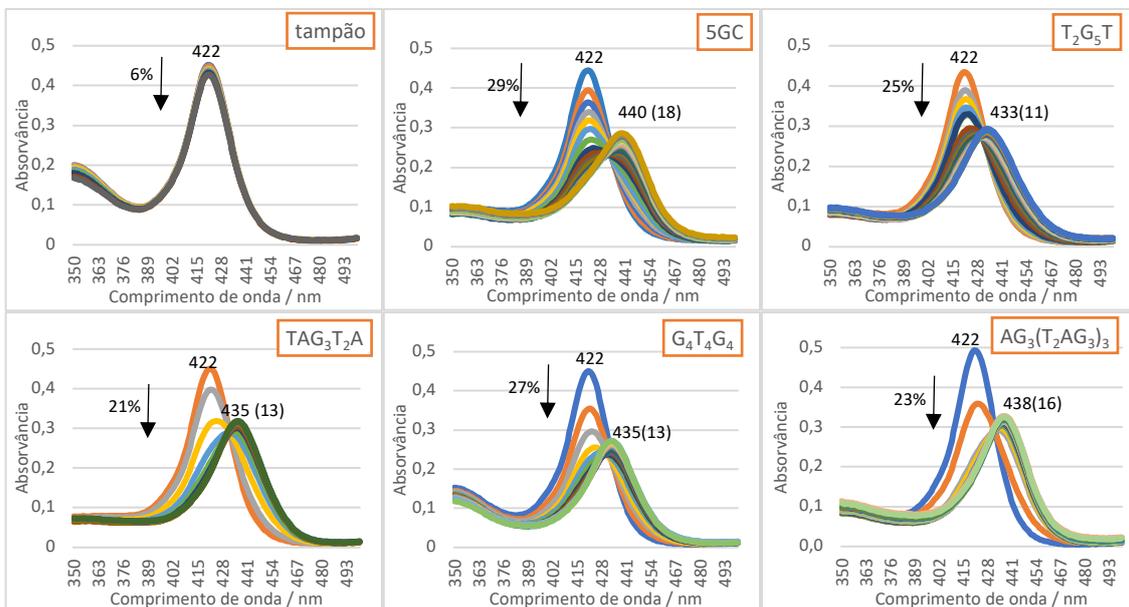
Anexo 1

| Porfirina | Abreviatura |
|---|--------------------|
| <i>meso</i> -tetraquis(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)porfirina | TMPyP |
| <i>meso</i> -tetraquis(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)porfirinato de zinco | ZnTMPyP |
| <i>N</i> -metilpiridíniodibenzoporfirina | β -TMPyP |
| <i>meso</i> -tetraquis(<i>N</i> -pentilpiridínio-4-il)porfirina | TPPyP |
| <i>N</i> -pentilpiridíniodibenzoporfirina | β -TPPyP |
| <i>meso</i> -tetraquis[2,3,5,6-tetrafluoro-4-(<i>N</i> -metilpiridínio-4-ilsulfanil)fenyl] porfirina | TSPyP |
| <i>meso</i> -tetraquis(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)porfirinato de manganês | MnTMPyP |
| <i>meso</i> -tetraquis(<i>N</i> -metilpiridínio-4-il)porfirinato de cobre | CuTMPyP |
| <i>meso</i> -tetraquis(<i>N</i> -trimetilamóniofenil)porfirina | TTMAPP |
| <i>meso</i> -tetraquis(<i>N</i> -trimetilamóniofenil)porfirinato de zinco | ZnTTMAPP |

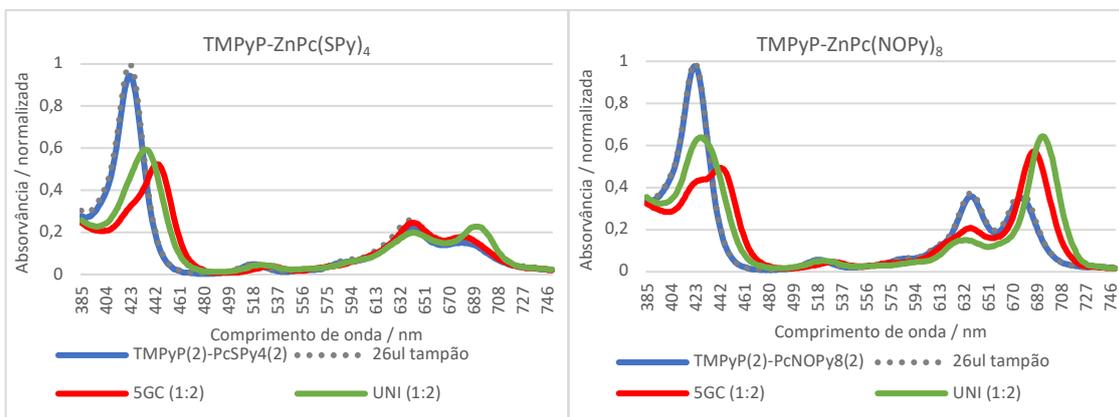
| Ftalocianina | Abreviatura |
|---|---------------------------|
| 2,3,9,10,16,17,23,24-octaquis(metoxipiridínio-4-il)ftalocianinato de zinco(II) | ZnPc(NOPyMe) ₈ |
| 2,3,9(10),16(17),23,24-tetraquis(metoxipiridínio-4-il)ftalocianinato de zinco(II) | ZnPc(NOPyMe) ₄ |
| 2,3,9,10,16,17,23,24-octaquis(4-piridilsulfanil)ftalocianinato de zinco(II) | ZnPc(SPyMe) ₈ |
| 2,9(10),16(17),23(24)- tetraquis(4-piridilsulfanil)ftalocianinato de zinco(II) | ZnPc(SPyMe) ₄ |

Anexo 2 – Resultados obtidos para TMPyP

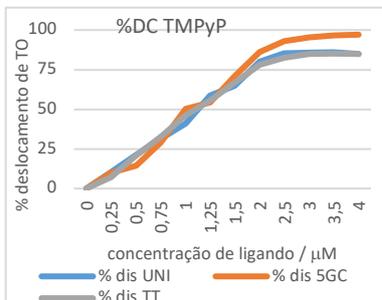
Espectros de absorção UV-vis das titulações:



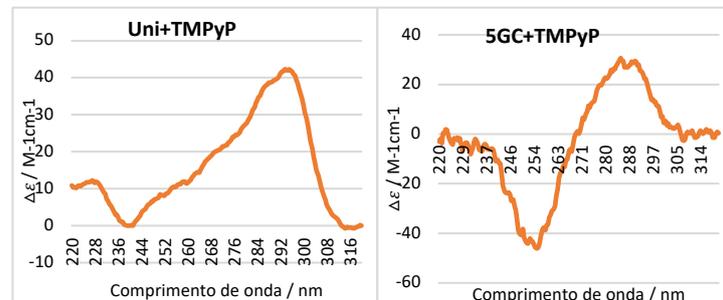
Espectros de absorção UV-vis das competições:



FID:

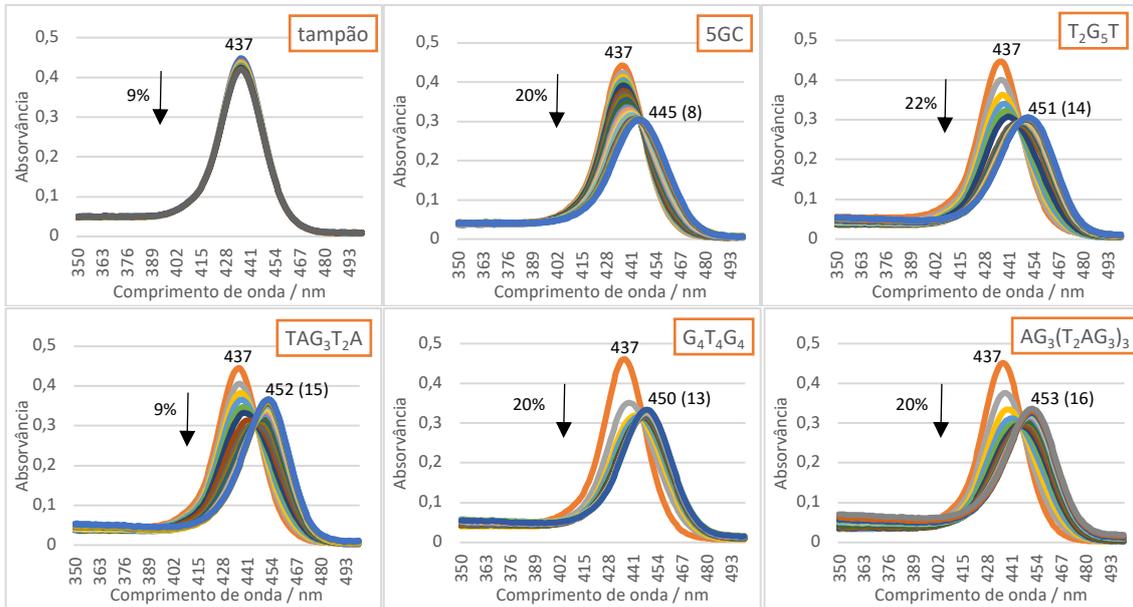


CD:

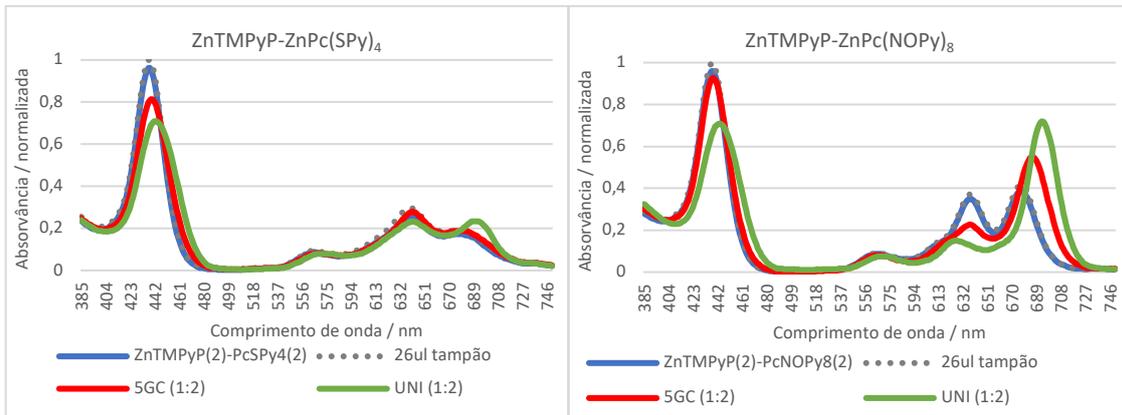


Anexo 3 - Resultados obtidos para ZnTMPyP

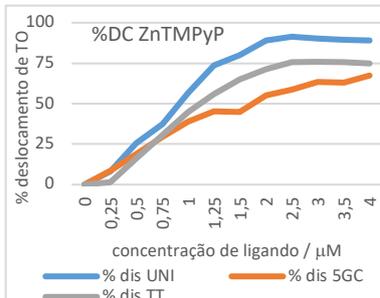
Espectro de absorção UV-vis das titulações:



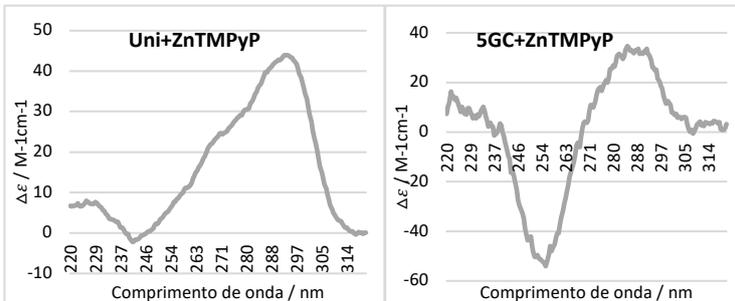
Espectro de absorção UV-vis das competições:



FID:

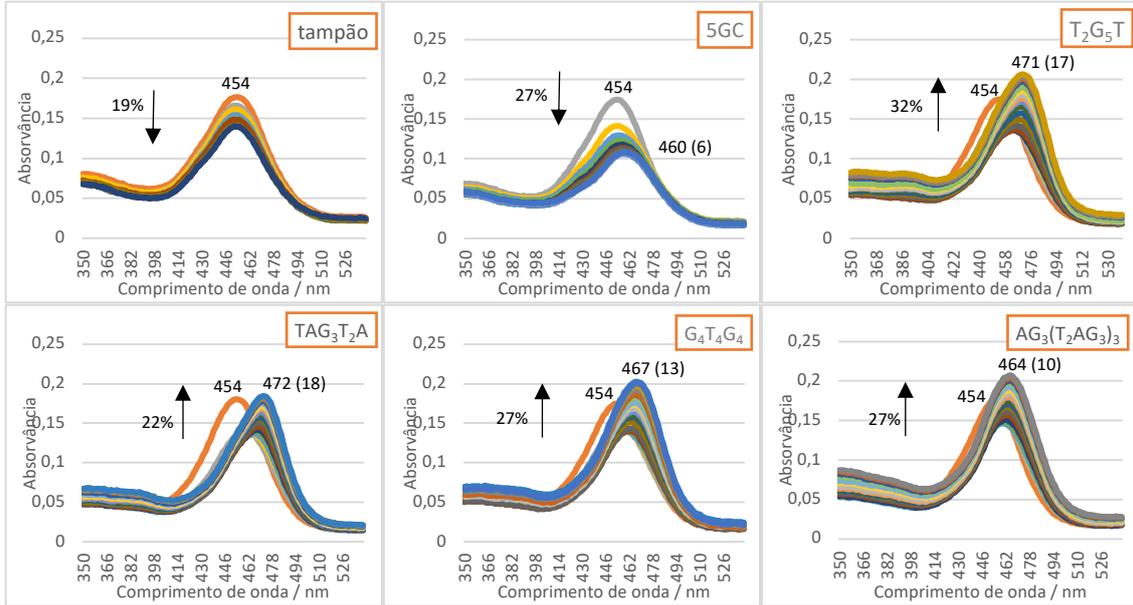


CD:

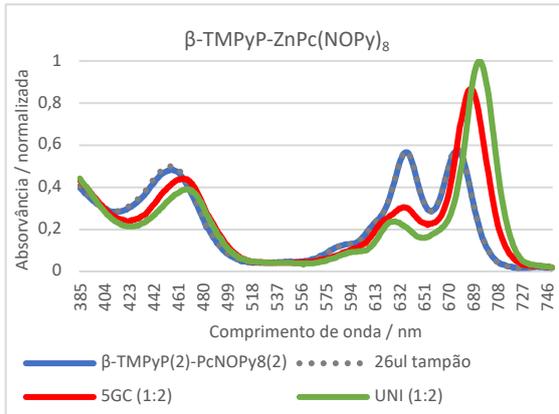


Anexo 4 – Resultados obtidos para β -TMPyP

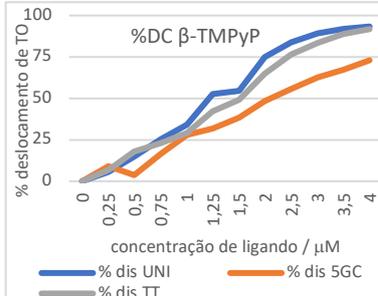
Espectros de absorção UV-vis das titulações:



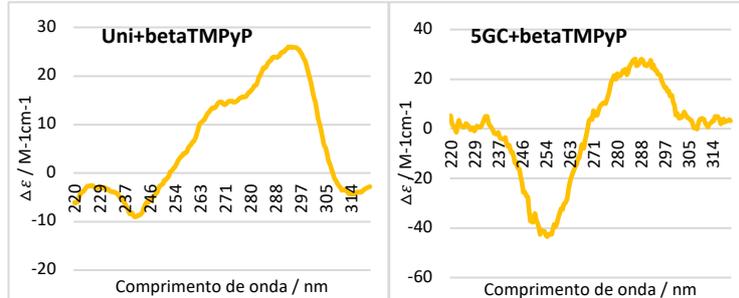
Espectros de absorção UV-vis das competições:



FID:

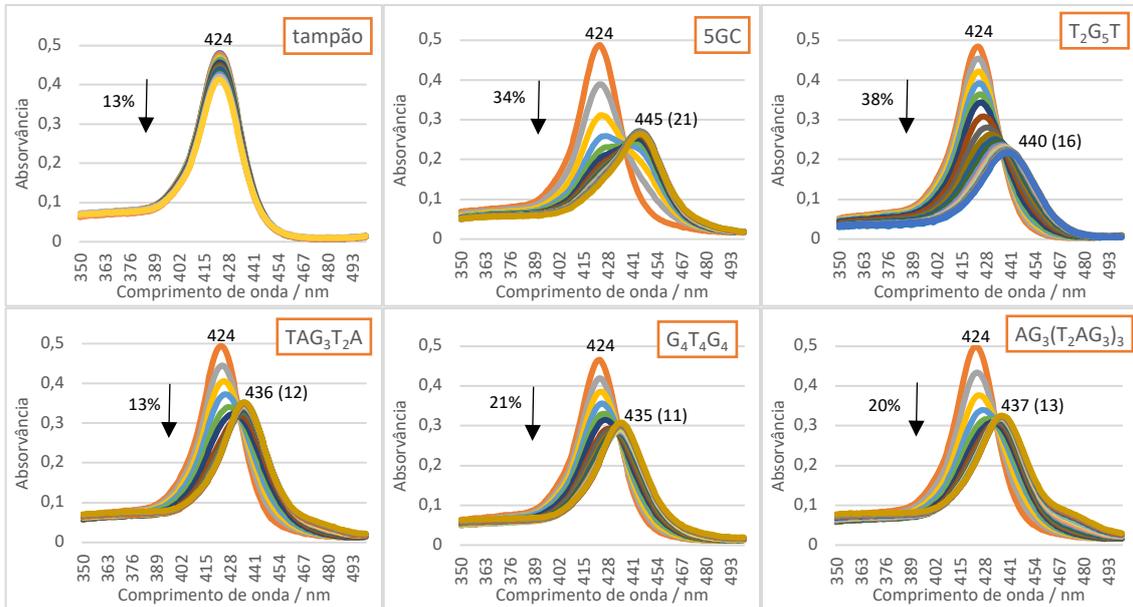


CD:

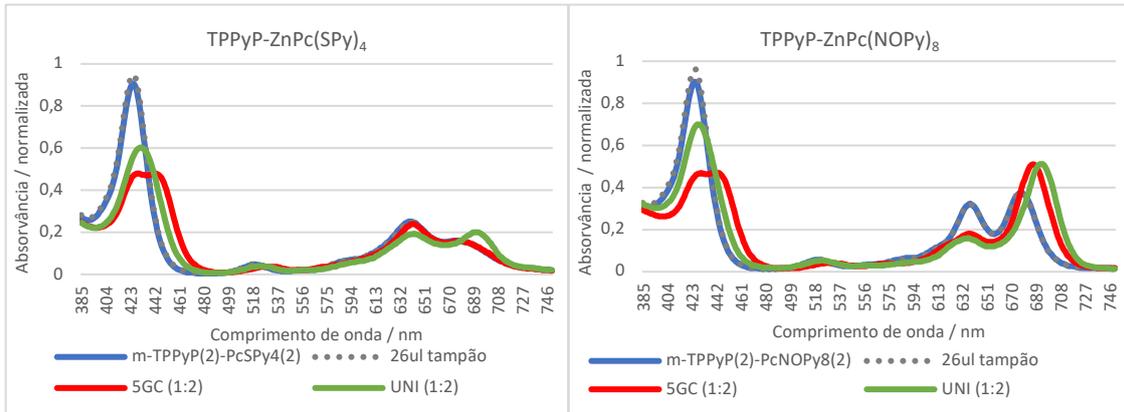


Anexo 5 – Resultados obtidos para TPPyP

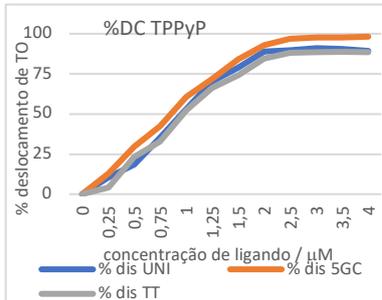
Espectros de absorção UV-vis das titulações:



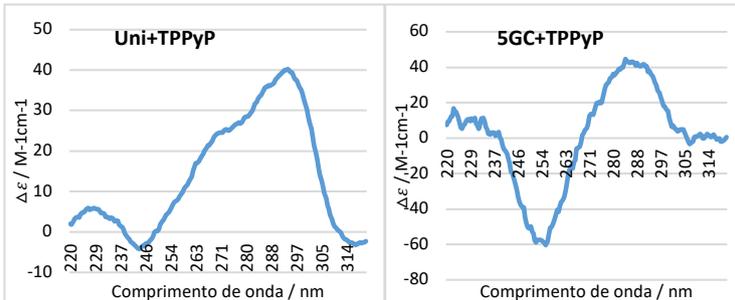
Espectros de absorção UV-vis das competições:



FID:

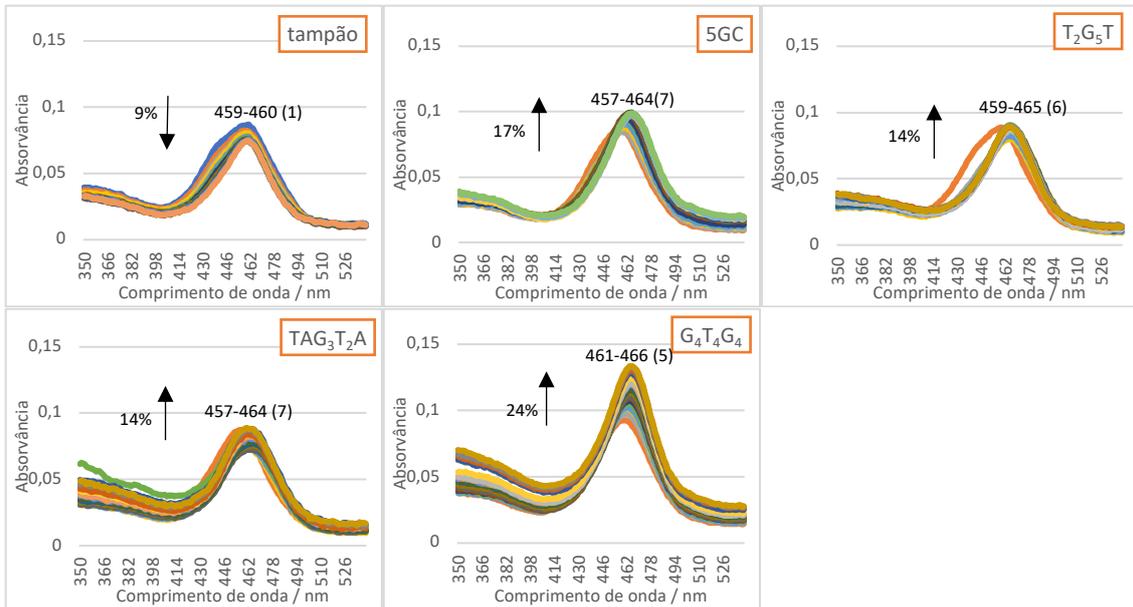


CD:



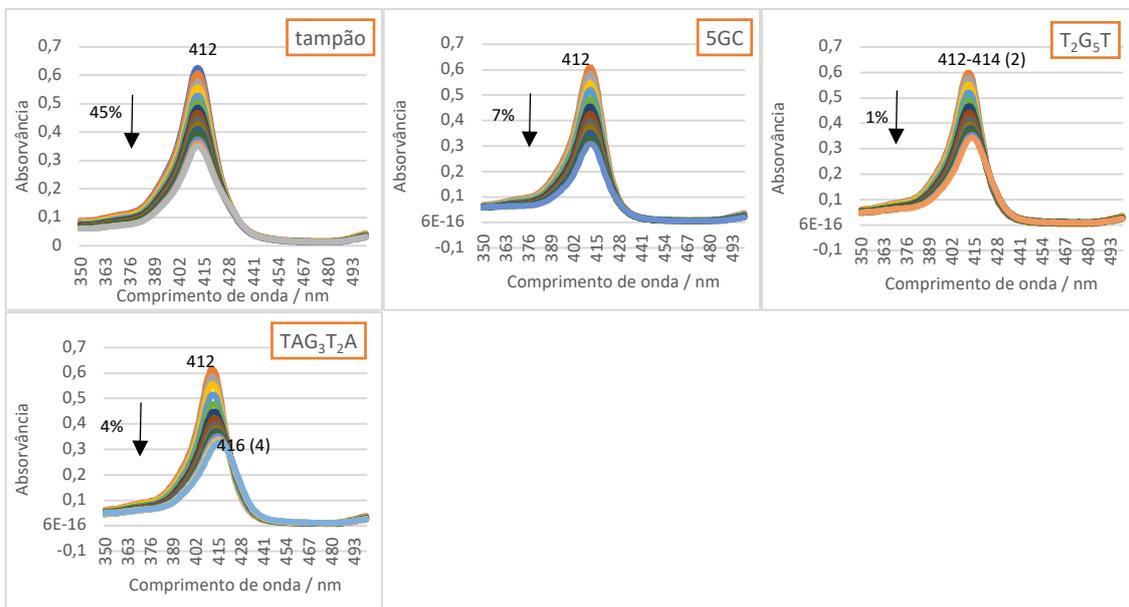
Anexo 6 – Resultados obtidos para β -TPPyP

Espectros de absorção UV-vis das titulações:



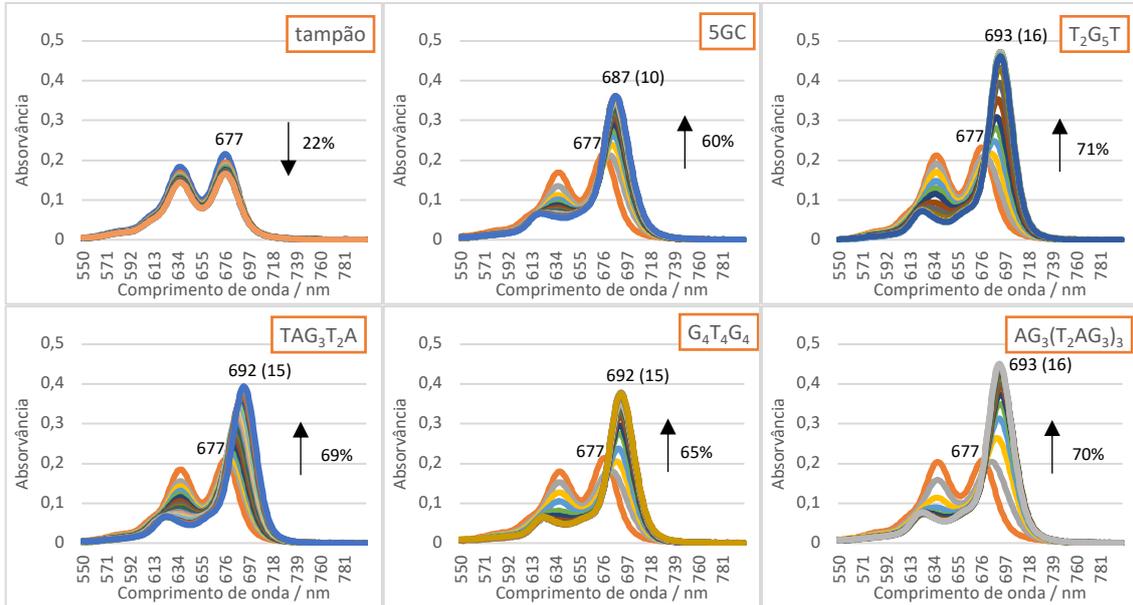
Anexo 7 – Resultados obtidos para TSPyP

Espectros de absorção UV-vis das titulações:

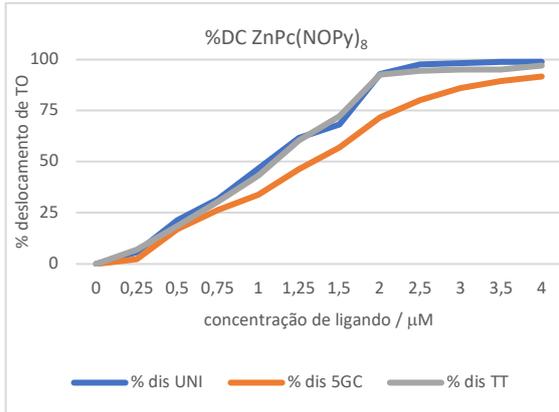


Anexo 8 – Resultados obtidos para ZnPc(NOPyMe)₈

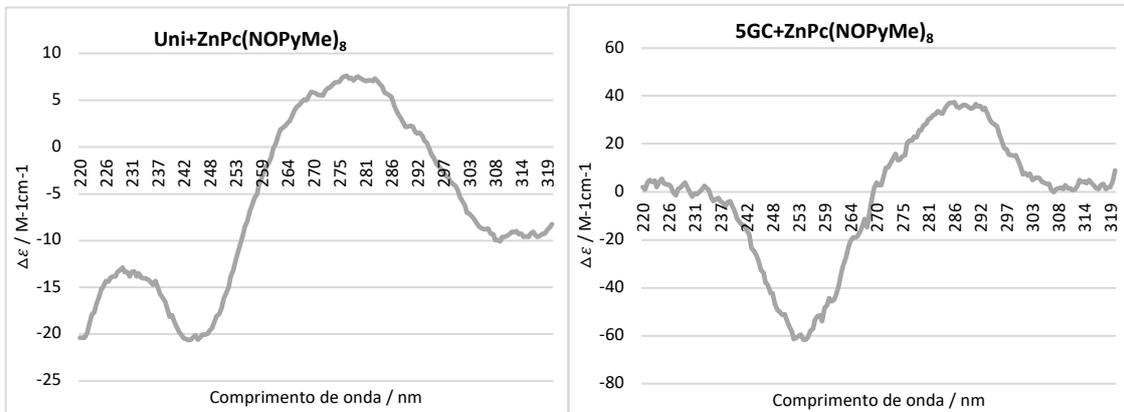
Espectros de absorção UV-vis das titulações:



FID:

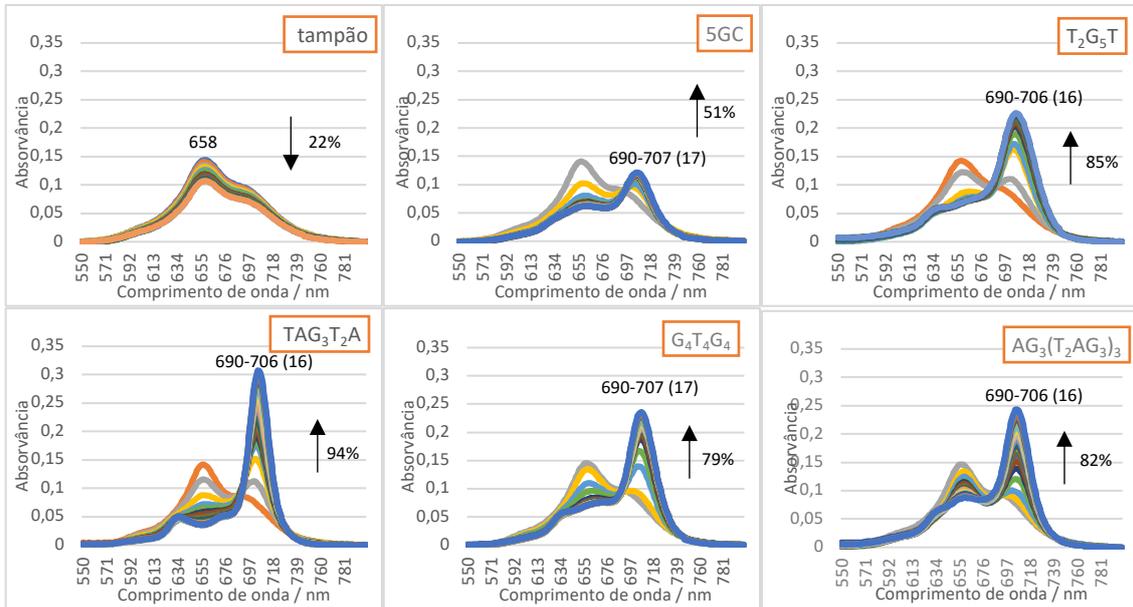


CD:

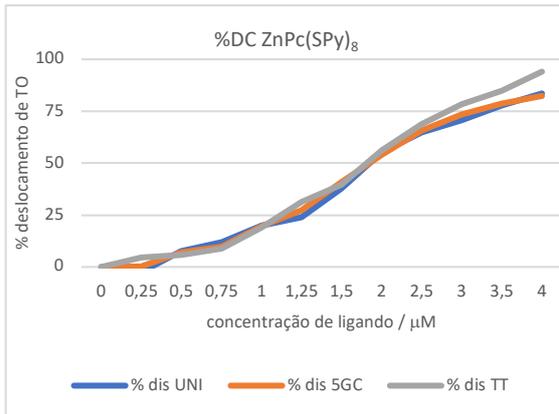


Anexo 9 -Resultados obtidos para ZnPc(SPyMe)₈

Espectros de absorção UV-vis das titulações:

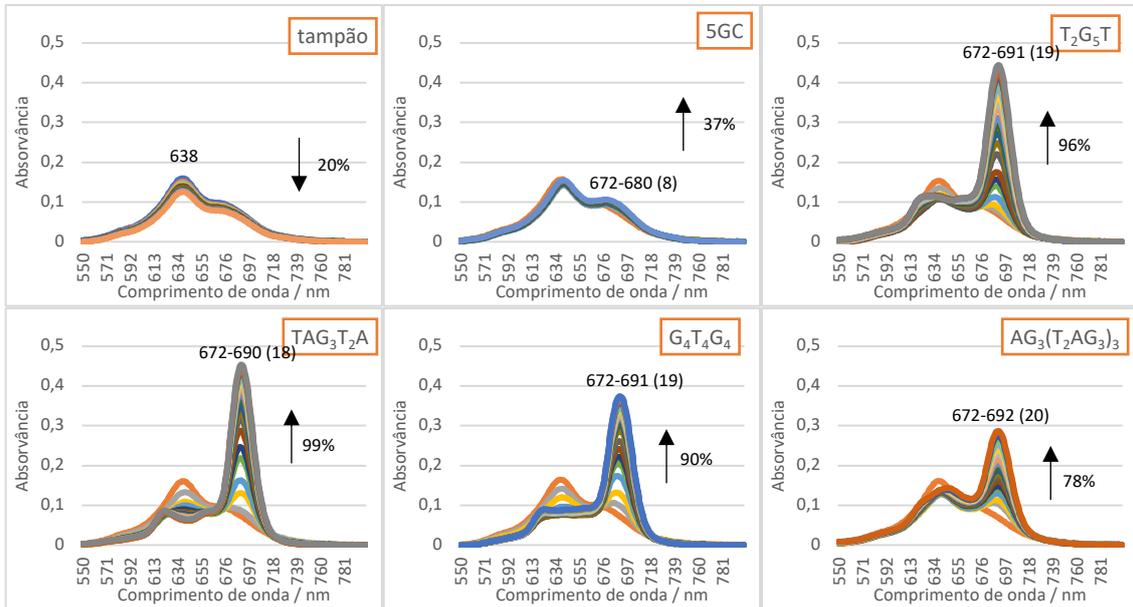


FID:

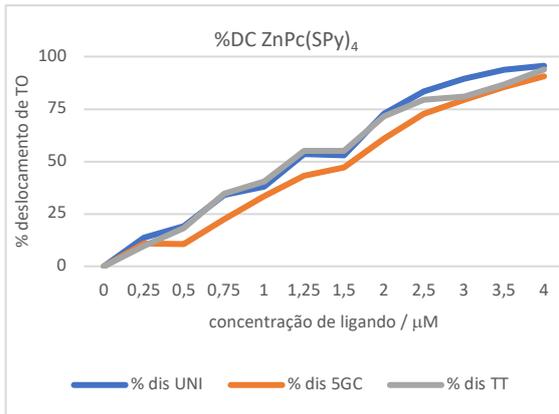


Anexo 10 – Resultados obtidos para ZnPc(SP_YMe)₄

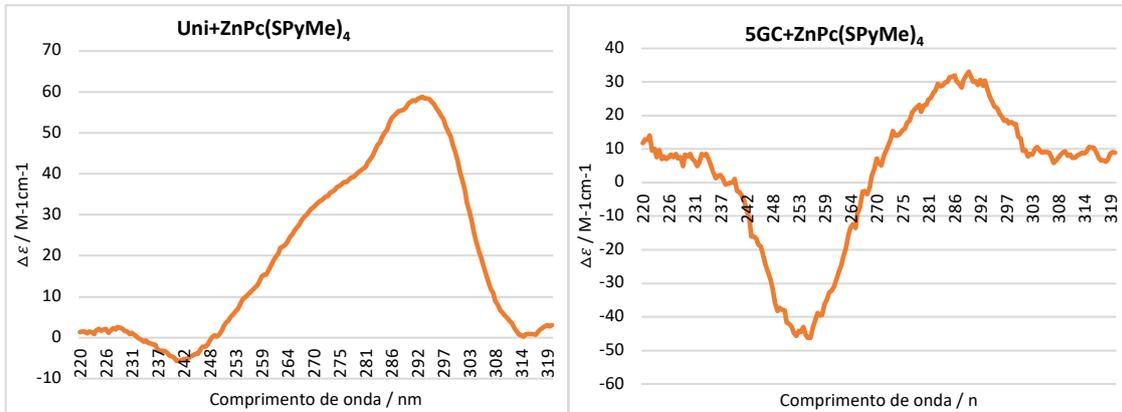
Espectros de absorção UV-vis das titulações:



FID:



CD:



Anexo 11 – Batocromismos obtidos para as competições com ZnPc(NOPyMe)₈ em dois tipos de espectrofotómetro

| TMPyP | 5GC | AG₃(T₂AG₃)₃ |
|-----------------------------|------------|--|
| Com leitor de placas | 21 | 6 |
| Sem leitor de placas | 19 | 6 |

| ZnTMPyP | 5GC | AG₃(T₂AG₃)₃ |
|-----------------------------|------------|--|
| Com leitor de placas | 1 | 7 |
| Sem leitor de placas | 1 | 8 |

| β-TMPyP | 5GC | AG₃(T₂AG₃)₃ |
|-----------------------------|------------|--|
| Com leitor de placas | 5 | 12 |
| Sem leitor de placas | 6 | 11 |

| TPPyP | 5GC | AG₃(T₂AG₃)₃ |
|-----------------------------|------------|--|
| Com leitor de placas | 19 | 5 |
| Sem leitor de placas | 20 | 11 |