



**Edgar Aristides Lemos Pereira**

Licenciado em Medicina Nuclear

## **Compostos Radioiodados para Terapia Auger**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Química Bioorgânica

Orientador: Doutor António Rocha Paulo, IST-UL

Elemento de ligação: Professora Doutora Teresa Santos Silva, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Paula Cristina de Sérgio Branco, FCT-UNL

Arguente: Doutora Maria Cristina das Neves Oliveira, C<sup>2</sup>TN-IST

Vogal: Doutor António Rocha Paulo, IST-UL



FACULDADE DE  
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro de 2015



**Edgar Aristides Lemos Pereira**

Licenciado em Medicina Nuclear

## **Compostos Radioiodados para Terapia Auger**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Química Bioorgânica

Orientador: Doutor António Rocha Paulo, IST-UL

Elemento de ligação: Professora Doutora Teresa Santos Silva, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Paula Cristina de Sérgio Branco, FCT-UNL

Arguente: Doutora Maria Cristina das Neves Oliveira, C<sup>2</sup>TN-IST

Vogal: Doutor António Rocha Paulo, IST-UL

Faculdade de Ciências e Tecnologia - Universidade Nova de Lisboa

**Setembro de 2015**



## **Compostos Radioiodados para Terapia Auger**

**Copyright**

**Edgar Aristides Lemos Pereira - FCT/UNL**

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **Compostos Radioiodados para Terapia Auger**

O trabalho descrito nesta tese foi realizado no Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C<sup>2</sup>TN) sob orientação do Doutor António Rocha Paulo.

Este trabalho foi financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia através do projecto EXCL/QEQ-MED/0233/2012.





## *Agradecimentos*

Em primeiro lugar, agradeço ao Doutor António Paulo pelo empenho, pelo apoio e pelo rigor com que orientou o trabalho que conduziu a esta tese. Por todos os conhecimentos que me transmitiu, pelo incentivo e pela disponibilidade.

Agradeço à minha co-orientadora, Professora Teresa Santos Silva, pela disponibilidade, pelas sugestões e conselhos.

Agradeço também à Doutora Isabel Rego dos Santos por ter aceitado a minha participação neste projeto do Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares.

Devo também um sincero agradecimento aos restantes investigadores do grupo, em particular à Doutora Maria Cristina Oliveira, por todos os conhecimentos e apoio, fundamentais para o sucesso das marcações com Iodo-125, à Doutora Filipa Mendes pela ajuda preciosa com os ensaios com ADN plasmídico e à Doutora Paula Raposinho pelo apoio na realização e interpretação dos resultados dos ensaios com células.

Aos colegas do laboratório de Síntese Química onde trabalhei, o meu sincero agradecimento pelo apoio que sempre fizeram sentir, pelo bom ambiente de trabalho e pela amizade. À Elisa Palma, agradeço a disponibilidade e apoio. À Letícia Quental o meu enorme agradecimento, porque sem a tua ajuda e constante disponibilidade, tudo teria sido bastante mais difícil.

À Doutora Célia Fernandes, agradeço a disponibilidade para a realização e a ajuda na interpretação dos espectros de ESI-MS e à Dr.<sup>a</sup> Vânia Sousa, agradeço pelas análises elementares de C,H,N.

À Ana Gonçalves, Elisa Palma, Elisabete Ribeiro, Filipe Vultos, Letícia Quental, Maria Belo, Vera Ferreira e Viviana Prado, agradeço também pela ajuda na realização dos espectros de RMN. Letícia, mais uma vez agradeço a tua ajuda na interpretação dos espectros de RMN.

À Doutora Ana Belchior, agradeço a ajuda para a realização e interpretação dos ensaios  $\gamma$ -H2AX.

Aos restantes colaboradores do Grupo, agradeço a hospitalidade e a simpatia com que me receberam.

À Professora Isabel Correia, do Instituto Superior Técnico, agradeço a ajuda nos ensaios espectroscópicos.

Não posso deixar de utilizar um parágrafo desta folha para agradecer aos Professores que me fizeram entrar no mundo da Química Orgânica. Obrigado pela paciência com que me conseguiram transmitir o que hoje sei de Química. Em particular, gostava de agradecer à Professora Paula Branco pela sua exigência, orientação e ajuda, que foram fundamentais em todo este percurso.

Por último, mas não menos importante, agradeço à minha família e aos meus amigos, em particular aos meus pais, irmãos, sobrinhos, ao Luís e ao João, pelo apoio incondicional. Obrigado por compreenderem a minha constante falta de disponibilidade nestes últimos dois anos. Por estarem sempre presentes, nos bons e nos maus momentos, por desculparem o meu mau humor, a minha falta de paciência, sobretudo quando as coisas não corriam como previsto. Muito, muito obrigado!

Sem vocês, todo este processo teria sido muito mais difícil.

Edgar Lemos Pereira

## **Resumo**

O desenho de radiofármacos emissores de elétrons Auger dirigidos ao ADN é um tópico cada vez mais investigado na Química Radiofarmacêutica atual. O trabalho descrito nesta tese insere-se nessa área de investigação e pretendeu demonstrar o interesse dos derivados do alaranjado de acridina (AO) marcados com  $^{125}\text{I}$  no desenho de radiofármacos para terapia Auger.

Assim, tendo em conta as propriedades de intercalação da AO com o ADN, sintetizámos novos derivados alquil-iodobenzamida da AO (**6A**, **6B**, **6C**), por N-alquilação do átomo de azoto central do seu anel heteroaromático. Os compostos congêneres marcados com  $^{125}\text{I}$  ( $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$ ,  $^{125}\text{I-6C}$ ) foram sintetizados via desmetalacão de precursores estânio e radioiodação oxidativa, tendo sido obtidos com elevada estabilidade *in vitro* e pureza radioquímica (> 95%) após purificação por HPLC.

A interação de **6A-C** com ADN de timo de vitelo foi avaliada por técnicas espectroscópicas, que mostraram que estes compostos apresentavam elevada afinidade para o ADN, interagindo preferencialmente por intercalação. Estudos com ADN plasmídico  $\phi\text{X174}$  demonstraram que os compostos  $^{125}\text{I-6A}$  e  $^{125}\text{I-6B}$  apresentavam capacidade de provocar quebras duplas de cadeia (DSB) no ADN, sem diferenças atribuíveis à presença de DMSO (0,07-0,09 DSB/decaimento e 0,05-0,04 DSB/decaimento, respetivamente), levando à conclusão que as DSB produzidas são devidas sobretudo aos efeitos diretos dos elétrons Auger. O composto  $^{125}\text{I-6C}$  não mostrou essa capacidade na presença deste *scavenger* de radicais livres, pelo que concluímos que o tamanho da sua cadeia alquílica apenas permite induzir danos no ADN por efeitos indiretos. Nos estudos de captação celular os compostos radioiodados mostraram boas taxas de captação às 4 horas, nas linhas celulares B16-F1 (13,5 a 26,9%) e PC-3 (13,9 a 28,0%). Ensaio preliminares de radiotoxicidade com o composto  $^{125}\text{I-6B}$  em células PC-3 revelaram mais de 35% de morte celular às 48 horas (ensaio MTT), o que certamente reflete a sua capacidade de induzir DSB no ADN de células vivas, como demonstrou o ensaio  $\gamma\text{-H2AX}$ .

**Palavras Chave:** Química Radiofarmacêutica, Alaranjado de Acridina, Intercaladores do ADN, Danos de ADN; Terapia Auger.



## ***Abstract***

The design of Auger-emitting radiopharmaceuticals for DNA-targeted therapy is an emerging field in contemporary Radiopharmaceutical Chemistry. The research work reported in this thesis aimed to contribute for the progress of this field by studying the potential of  $^{125}\text{I}$ -labelled Acridine Orange (AO) derivatives for Auger therapy.

For this purpose, and based on the DNA-intercalation properties of AO, we've synthesized three new alkyl-iodobenzamide AO derivatives (**6A**, **6B**, **6C**) by N-alkylation at the AO heteroaromatic ring nitrogen atom. The  $^{125}\text{I}$ -labeled congeners ( $^{125}\text{I}$ -**6A**,  $^{125}\text{I}$ -**6B**,  $^{125}\text{I}$ -**6C**) were synthesized via oxidative radioiododestannylation of the corresponding tributylstannyl derivatives, and were obtained in high *in vitro* stability and radiochemical purity (> 95%) after HPLC purification.

The interaction of **6A-C** with calf thymus DNA was evaluated through spectroscopic techniques and all three compounds showed high affinity to DNA, acting mainly as intercalators. Evaluation of  $\phi\text{X174}$  plasmid DNA showed that  $^{125}\text{I}$ -**6A** and  $^{125}\text{I}$ -**6B** induce double-strand breaks (DSB) yields per  $^{125}\text{I}$  decay in the range 0,07-0,09 and 0,05-0,04, respectively, with no significant difference in the presence of DMSO. These results led us to conclude that the produced DNA damage was mainly due to direct effects of emitted Auger electrons. By contrast,  $^{125}\text{I}$ -**6C** didn't show any ability to produce DSB in the presence of the free radical scavenger DMSO. This behavior shows that DNA damage provoked by  $^{125}\text{I}$ -**6C** is essentially due to indirect effects, certainly justified by its long alkyl chain, that places  $^{125}\text{I}$  nuclide far away from the DNA. Cellular uptake assays of this  $^{125}\text{I}$ -labelled compounds revealed good uptake rates, at 4 hours incubation, in B16-F1 (13,5 to 26,9%) and PC-3 (13,9 to 28,0%) cell lines.

Preliminary radiocytotoxicity and DNA damage in living cells were conducted for  $^{125}\text{I}$ -**6B**. Results suggested more than 35% cell death (MTT assay) after 48 h incubation, which is certainly a consequence of its ability to produce DSB in the cellular DNA, as shown by the  $\gamma$ -H2AX assay.

**Key Words:** Radiopharmaceutical Chemistry, Acridine Orange, DNA Intercalators, DNA damage, Auger Therapy.



## *Índice de Matérias*

<b>Agradecimentos</b> .....	v
<b>Resumo e palavras-chave</b> .....	vii
<b>Abstract and key-words</b> .....	xix
<b>Índice de Figuras</b> .....	xv
<b>Índice de Tabelas</b> .....	xix
<b>Lista de Abreviaturas e Símbolos</b> .....	xxi
<b>1. Introdução</b> .....	3
1.1 Medicina Nuclear: Diagnóstico e Terapêutica com Radionuclídeos.....	3
1.2 Efeitos Biológicos das Radiações Ionizantes.....	7
1.3 Radiofármacos para Terapia Auger.....	9
1.3.1 Radionuclídeos Relevantes e o Efeito Auger.....	9
1.3.2 Moléculas Radioiodadas para Terapia Auger.....	13
1.4 Compostos com Afinidade para o ADN e Modos de Interação.....	16
1.4.1 Estrutura do ADN e Tipos de Interação.....	16
1.4.2 Derivados do Alaranjado de Acridina.....	18
1.5 Objetivo do Trabalho.....	19
<b>2. Síntese e Caracterização dos Derivados Iodados do Alaranjado de Acridina</b> .....	23
2.1 Considerações Gerais.....	23
2.2 Síntese e Caracterização dos Compostos Iodados Não Radioativos.....	25
2.2.1 Síntese dos Compostos Bromo-ftalimida (1A, 1B e 1C) e Iodo-ftalimida (2A, 2B e 2C).....	25
2.2.2 Síntese dos Derivados Amina.....	27
2.2.2.1 Síntese dos derivados ftalimida da AO (3A, 3B e 3C).....	27

2.2.2.2 Desproteção da ftalimida e síntese dos derivados amina (4A, 4B e 4C).....	29
2.2.3 Síntese dos Derivados Iodobenzamida (não radioativos).....	32
2.2.3.1 Síntese do éster 4-iodobenzoato de tetrafluorofenilo (5).....	32
2.2.3.2 Síntese dos precursores amida (6A, 6B e 6C).....	33
2.2.4 Síntese dos Precursores Estanhados (7A, 7B e 7C).....	36
2.3 Síntese e Caracterização dos Compostos Radioiodados.....	38
2.3.1 Radiosíntese e Purificação.....	38
2.3.2 Estudos de Estabilidade dos Compostos Radioativos.....	40
<b>3. Interação com o ADN e Estudos com Células Tumorais.....</b>	<b>45</b>
3.1 Interação dos Compostos Não Radioativos com o ADN.....	45
3.1.1 Espectroscopia de UV-Visível.....	45
3.1.2 Espectroscopia de Fluorescência.....	47
3.1.3 Dicroísmo Circular.....	47
3.1.4 Determinação das Constantes de Ligação.....	49
3.2 Avaliação <i>in vitro</i> dos Compostos Radioiodados: Estudos com ADN Plasmídico e com Células Tumorais.....	53
3.2.1 Estudos com ADN Plasmídico.....	53
3.2.2 Estudos com Células Tumorais Humanas (PC-3) e de Origem Murina (B16-F1).....	60
3.2.2.1 Estudos de captação celular.....	60
3.2.2.2 Radiotoxicidade e ensaio $\gamma$ -H2AX em células tumorais.....	62
<b>4. Conclusões e Perspetivas.....</b>	<b>67</b>
<b>5. Parte Experimental.....</b>	<b>73</b>
5.1 Solventes, Reagentes e Técnicas para Purificação e Caracterização.....	73
5.1.1 Solventes e Reagentes.....	73



5.1.2 Cromatografia em Camada Fina (TLC) .....	73
5.1.3 Cromatografia em Coluna.....	73
5.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC).....	73
5.1.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	74
5.1.6 Espectrometria de Massa por Ionização ElectroSpray (ESI-MS).....	74
5.1.7 Análise Elementar de C,H,N.....	74
5.1.8 Medição da Atividade das Soluções Radioativas.....	75
5.2 Síntese Química.....	75
5.2.1 Síntese de 2-(3-bromopropil)isoindol-1,3-diona (1A).....	75
5.2.2 Síntese de 2-(5-bromopentil)isoindol-1,3-diona (1B).....	75
5.2.3 Síntese de 2-(8-bromooctil)isoindol-1,3-diona (1C).....	76
5.2.4 Síntese de 2-(3-iodopropil)isoindol-1,3-diona (2A) .....	76
5.2.5 Síntese de 2-(5-iodopentil)isoindol-1,3-diona (2B) .....	77
5.2.6 Síntese de 2-(8-iodooctil)isoindol-1,3-diona (2C) .....	77
5.2.7 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(3-(1,3-dioxoisoindol-2-il) propil) acridínio (3A).....	78
5.2.8 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(5-(1,3-dioxoisoindol-2-il)pentil) acridínio (3B).....	78
5.2.9 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(8-(1,3-dioxoisoindol-2-il)octil) acridínio (3C).....	79
5.2.10 Síntese de Iodeto de 10-(3-aminopropil)-3,6-bis(dimetilamino)acridínio (4A).....	79
5.2.11 Síntese de Iodeto de 10-(5-aminopentil)-3,6-bis(dimetilamino)acridínio (4B).....	80
5.2.12 Síntese de Iodeto de 10-(8-aminooctil)-3,6-bis(dimetilamino)acridínio (4C).....	81
5.2.13 Síntese do Éster 4-iodobenzoato de tetrafluorofenilo (5).....	82
5.2.14 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(3-(4-iodobenzamida)propil)acridínio (6A).....	82
5.2.15 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(5-(4-iodobenzamida)pentil)acridínio (6B).....	83

5.2.16 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(8-(4-iodobenzamida)octil) acridínio (6C) .....	84
5.2.17 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(3-(4(tributilestanil)benzamida)propil)acridínio (7A).....	85
5.2.18 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(5-(4(tributilestanil)benzamida)pentil)acridínio (7B).....	85
5.2.19 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(8-(4(tributilestanil)benzamida)octil)acridínio (7C).....	86
5.3 Radioiodação.....	87
5.3.1 Considerações Gerais.....	87
5.3.2 Síntese dos Compostos <sup>125</sup> I-6A, <sup>125</sup> I-6B e <sup>125</sup> I-6C.....	87
5.3.3 Estudos de Estabilidade Radioquímica.....	88
5.4 Avaliação Biológica.....	89
5.4.1 Estudos de Interação dos Compostos Não Radioativos com o ADN.....	89
5.4.2 Ensaio com os Compostos Radioativos.....	90
5.4.2.1 Ensaio com o ADN plasmídico.....	90
5.4.2.2 Estudos com células tumorais humanas (PC-3) e de origem murina (B16-F1).....	91
<b>Bibliografia</b> .....	95

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b>	Representação esquemática de um radiofármaco cujo agente químico é seletivo para um dado alvo molecular.....	3
<b>Figura 1.2</b>	Exemplos de radiofármacos emissores de partículas $\beta$ , atualmente em utilização clínica como agentes terapêuticos.....	5
<b>Figura 1.3</b>	Representação esquemática do percurso de partículas $\alpha$ , $\beta$ e elétrons Auger no meio celular e subcelular.....	8
<b>Figura 1.4</b>	À esquerda, representação esquemática do processo de conversão interna. À direita, representação esquemática da libertação de um elétron Auger.....	10
<b>Figura 1.5</b>	Processo de decaimento radioativo do $^{125}\text{I}$ .....	12
<b>Figura 1.6</b>	Complexos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ avaliados <i>in vitro</i> como emissores de elétrons Auger.....	13
<b>Figura 1.7</b>	Compostos radiomarcados com $^{125}\text{I}$ , investigados para terapia Auger.....	15
<b>Figura 1.8</b>	Compostos marcados com $^{123}\text{I}$ , em investigação para diagnóstico de carcinoma da próstata. <b>A2</b> foi já marcado com $^{124/131}\text{I}$ para diagnóstico PET e terapia com partículas $\beta$ .....	15
<b>Figura 1.9</b>	(a) Representação esquemática da estrutura da molécula de ADN; (b) Representação dos sulcos maior e menor do ADN.....	16
<b>Figura 1.10</b>	Interação não-covalente de pequenas moléculas com o ADN. a) <i>outside stacking</i> ; b) <i>groove binding</i> ; c) intercalação.....	17
<b>Figura 1.11</b>	Estrutura química do Alaranjado de Acridina ( <b>A</b> ) e da Acridina ( <b>B</b> ).....	19
<b>Figura 1.12</b>	Compostos finais sintetizados e avaliados neste trabalho.....	20
<b>Figura 2.1</b>	Estratégia geral da síntese dos derivados iodados da AO.....	23
<b>Figura 2.2</b>	Mecanismo envolvido no ataque de um nucleófilo a um átomo de carbono carboxílico.....	24
<b>Figura 2.3</b>	Exemplo da reação de substituição eletrofílica de grupos estânio para obtenção de compostos radioiodados.....	25
<b>Figura 2.4</b>	Síntese dos compostos Bromo-ftalimida ( <b>1A-C</b> ) e Iodo-ftalimida ( <b>2A-C</b> ).....	25
<b>Figura 2.5</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ , em $\text{CDCl}_3$ , do composto <b>1C</b> (em cima) e do composto <b>2C</b> (em baixo).....	26
<b>Figura 2.6</b>	Síntese dos compostos <b>3A-C</b> .....	27
<b>Figura 2.7</b>	Espectro de RMN $^1\text{H}$ , em $\text{CDCl}_3$ , do composto <b>3B</b> .....	28

<b>Figura 2.8</b>	Mecanismo reacional envolvido na síntese do composto <b>3A</b> via desproteção com NaBH <sub>4</sub> .....	29
<b>Figura 2.9</b>	Síntese dos compostos <b>4A-C</b> .....	29
<b>Figura 2.10</b>	Mecanismo reacional para a síntese dos compostos <b>3A-C</b> , na abordagem com Hidrazina.....	30
<b>Figura 2.11</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (em cima) e [ <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C] HSQC (em baixo), em CD <sub>3</sub> OD, do composto <b>4B</b> .....	31
<b>Figura 2.12</b>	Mecanismo da reação envolvido na síntese do éster 4-iodobenzoato de tetrafluorofenilo ( <b>5</b> ).....	32
<b>Figura 2.13</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> , do composto <b>5</b> .....	33
<b>Figura 2.14</b>	Síntese dos compostos <b>6A-C</b> .....	33
<b>Figura 2.15</b>	Espectro de RMN [ <sup>1</sup> H, <sup>1</sup> H] COSY (em cima) e <sup>13</sup> C (em baixo), em CDCl <sub>3</sub> , do composto <b>6B</b> .....	35
<b>Figura 2.16</b>	Síntese dos compostos <b>7A-C</b> .....	36
<b>Figura 2.17</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H, em CDCl <sub>3</sub> , do composto <b>7B</b> .....	37
<b>Figura 2.18</b>	Síntese dos compostos <sup>125</sup> I- <b>6A</b> , <sup>125</sup> I- <b>6B</b> e <sup>125</sup> I- <b>6C</b> .....	39
<b>Figura 2.19</b>	Cromatogramas de HPLC dos compostos radioiodados <sup>125</sup> I- <b>6A</b> , <sup>125</sup> I- <b>6B</b> e <sup>125</sup> I- <b>6C</b> , eluídos simultaneamente com os análogos não radioativos <b>6A</b> , <b>6B</b> e <b>6C</b> .....	40
<b>Figura 2.20</b>	Estabilidade do composto <sup>125</sup> I- <b>6B</b> em EtOH, aos 0, 12 e 20 dias.....	41
<b>Figura 2.21</b>	Estabilidade do composto <sup>125</sup> I- <b>6B</b> em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) e no meio de cultura celular DMEM.....	41
<b>Figura 3.1</b>	Espectros de absorção UV-Vis medidos para as soluções dos ligandos com adição de quantidades crescentes de CT-ADN. Em cima, à esquerda, composto <b>6A</b> (7 μM); Em cima, à direita, composto <b>6B</b> (4 μM); Em baixo, composto <b>6C</b> (6 μM).....	46
<b>Figura 3.2</b>	Espectro de emissão de fluorescência para as soluções 7 μM de <b>6A</b> (em cima, à esquerda), 4 μM de <b>6B</b> (em cima, à direita) e 5,5 μM <b>6C</b> (em baixo), e na presença de quantidades crescentes de CT-ADN, após subtração do espectro de emissão do “branco” .....	47
<b>Figura 3.3</b>	Espectro de CD característico do CT-ADN ([ADN] = 72 μM).....	48
<b>Figura 3.4</b>	Espectro de CD dos compostos <b>6A-C</b> na ausência (traço <b>azul</b> ) e na presença de CT-ADN (razão molar 1:1, traço <b>vermelho</b> ; razão molar 2:1, traço <b>verde</b> ). Em cima à esquerda, espectros de CD para <b>6A</b> ; Em cima à direita, espectros de CD para <b>6B</b> ; Em baixo, espectros de CD para <b>6C</b> .....	48

<b>Figura 3.5</b>	Ajuste matemático segundo o modelo de Kaminoh da variação da intensidade de fluorescência dos compostos <b>6A</b> (em cima, à esquerda), <b>6B</b> (em cima, à direita) e <b>6C</b> (em baixo) em função da concentração de CT-ADN. A curva representa um ajuste não linear à <b>equação 1</b> .....	50
<b>Figura 3.6</b>	Representação gráfica da função de $I/I_0$ em função de $1/[ADN]$ para os ligandos <b>6A</b> (em cima, à esquerda), <b>6B</b> (em cima, à direita) e <b>6C</b> (em baixo), para a determinação do parâmetro $P$ (ordenada na origem) .....	51
<b>Figura 3.7</b>	Ajuste de McGhee von Hippel para os dados de fluorescência obtidos para os compostos <b>6A</b> (em cima, à esquerda), <b>6B</b> (em cima, à direita) e <b>6C</b> (em baixo).....	52
<b>Figura 3.8</b>	Clivagem do ADN plasmídico $\phi X174$ após incubação com os diferentes compostos, a 4°C em tampão Tris (pH 7,4) Nas tiras de eletroforese são apresentadas a forma circular (FC), linear (FL) e superenrolada (FSE) de ADN, na ausência e na presença de DMSO (-DMSO e +DMSO) .....	54
<b>Figura 3.9</b>	Evolução da percentagem das frações de FSE, FC e FL, ao longo do período de incubação, para os compostos $^{125}\text{I-6B}$ (em cima) e $^{125}\text{I-6C}$ (em baixo), na ausência (gráficos da esquerda) e na presença (gráficos da direita) de DMSO 0,2M.....	55
<b>Figura 3.10</b>	Número de decaimentos/cm <sup>3</sup> acumulados ao longo do período de incubação, para os compostos $^{125}\text{I-6A}$ (a preto) $^{125}\text{I-6B}$ (a vermelho) e $^{125}\text{I-6C}$ (a azul) na ausência e na presença de DMSO.....	57
<b>Figura 3.11</b>	Desaparecimento da FSE de ADN em função do número de decaimentos/cm <sup>3</sup> , para os compostos $^{125}\text{I-6A}$ (em cima, à esquerda) $^{125}\text{I-6B}$ (em cima, à direita) e $^{125}\text{I-6C}$ (em baixo), na ausência e na presença de DMSO 0,2 M.....	57
<b>Figura 3.12</b>	DSB em função do número de decaimentos/cm <sup>3</sup> .....	58
<b>Figura 3.13</b>	Percentagem total de atividade captada pelas células PC-3 (gráfico da esquerda) e respetiva internalização celular (gráfico da direita), após incubação a 37 °C durante 4h..	61
<b>Figura 3.14</b>	Percentagem total de atividade captada pelas células B16-F1 (gráfico da esquerda) e respetiva internalização celular (gráfico da direita), após incubação a 37 °C durante 4h..	62
<b>Figura 3.15</b>	Indução de DSB nas células PC-3, após incubação com o composto $^{125}\text{I-6B}$ . Os focos a verde assinalam os locais onde ocorreu a fosforilação da histona H2AX, correspondentes à ocorrência de DSB. <b>A)</b> Controlo (incubação sem $^{125}\text{I-6B}$ ); <b>B)</b> Incubação com 1,5 $\mu\text{Ci}$ de $^{125}\text{I-6B}$ ; <b>C)</b> Incubação com 7,5 $\mu\text{Ci}$ de $^{125}\text{I-6B}$ .....	63
<b>Figura 3.16</b>	Número de focos (DSB) nas células PC-3, após incubação com o composto $^{125}\text{I-6B}$ , em função da atividade ( $\mu\text{Ci}$ ) de incubação.....	63



## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b>	Radionuclídeos em atual utilização clínica em medicina nuclear.....	6
<b>Tabela 1.2</b>	Propriedades físicas de alguns radionuclídeos emissores de elétrons Auger.....	11
<b>Tabela 1.3</b>	Espectro médio de emissão do isótopo $^{125}\text{I}$ .....	12
<b>Tabela 2.1</b>	Valores de $m/z$ obtidos para o pico predominante presente nos espectros ESI-MS (modo positivo) dos compostos <b>4B</b> e <b>4C</b> (comparação com os valores esperados para os respectivos íons moleculares).....	30
<b>Tabela 2.2</b>	Desvio químico (ppm) dos prótons alifáticos adjacentes à função amida para os compostos <b>6A-C</b> e prótons correspondentes nos compostos <b>3A-C</b> e <b>4A-C</b> .....	34
<b>Tabela 2.3</b>	Valores de $m/z$ obtidos e valores esperados para os espectros de ESI-MS dos compostos <b>6A-C</b> .....	36
<b>Tabela 2.4</b>	Desvios químicos dos prótons <i>orto</i> e <i>meta</i> , relativamente ao grupo $\text{SnBu}_3$ , do anel benzênico da função benzamida nos compostos <b>6A-C</b> e <b>7A-C</b> .....	37
<b>Tabela 3.1</b>	Valores de comprimento de onda e absorvância UV-Vis máximas, na ausência e na presença de CT-ADN.....	46
<b>Tabela 3.2</b>	Bandas de Dicroísmo Circular Induzido (nm) dos compostos <b>6A-C</b> , observadas após interação com CT-ADN.....	49
<b>Tabela 3.3</b>	Constantes de ligação ao ADN e outros parâmetros obtidos com a aplicação dos modelos de Kaminoh e McGhee von Hippel aos dados de emissão de fluorescência....	52
<b>Tabela 3.4</b>	Porcentagem da fração FSE de ADN, ao longo do período de incubação.....	55
<b>Tabela 3.5</b>	Atividades ( $\mu\text{Ci}$ ) aplicadas na incubação de cada um dos compostos com ADN plasmídico $\phi\text{X174}$ , na ausência e na presença de DMSO 0,2 M.....	56
<b>Tabela 3.6</b>	Valores de $D_{0(\text{DSB})}$ e de $Y_{\text{DSB}}$ para $^{125}\text{I-6A-C}$ na ausência e presença de DMSO.....	59
<b>Tabela 3.7</b>	Porcentagem total de composto captado e internalizado nas células, para cada uma das linhas celulares.....	62
<b>Tabela 5.1</b>	Condições experimentais usadas nas titulações de Fluorescência.....	89





## ***Lista de Abreviaturas e Símbolos***

### **A**

**AcOEt** – Acetato de etilo

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**AO** – Alaranjado de Acridina (do inglês *Acridine Orange*)

### **B**

**Bq** – Bequerel

### **C**

**CD** – Dicroísmo circular (do inglês *Circular Dichroism*)

**Ci** – Curie

**COSY** – Espectroscopia de correlação homonuclear (do inglês *Homonuclear Correlation Spectroscopy*)

**CT-ADN** – ADN de Timo de Vitelo (do inglês *calf thymus*)

### **D**

**DAPI** – 4',6-diamidino-2-fenilindole

**DCC** – N,N'-diciclohexilcarbodiimida

**DCU** – N,N'-diciclohexilureia

**DIC** – N,N'-diisopropilcarbodiimida

**DIPEA** – N,N-diisopropiletilamina

**DMEM** – Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMF** – Dimetilformamida

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DOTATATE** – DOTA-(Tyr<sup>3</sup>)-octreotato

**DSB** – Quebras de cadeia duplas (do inglês *Double-strand Breaks*)

### **E**

**EDC** – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida

**EDTA** – Ácido etilenodiamino tetraacético

**EDTMP** – ácido etilenodiamino tetrametileno fosfórico

**EP** – Éter de petróleo

**eq.** – Equivalente

**ESI** – Ionização de Electrospray (do inglês *Electrospray Ionization*)

**EtOH** – Etanol

**eV** – elétronVolt

### **F**

**FC** – Forma circular

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**FL** – Forma linear

**FSE** – Forma superenrolada

## G

**g** – grama

**γ-H2AX** – Fosforilação da Histona H2AX

## H

**h** – Hora

**HPLC** – Cromatografia Líquida de Alta Pressão (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

**HSQC** – Coerência heteronuclear quântica única (do inglês *Heteronuclear Single Quantum Coherence*)

## L

**LET** – Transferência Linear de Energia (do inglês *Linear Energy Transfer*)

## M

**MEOD** – Metanol deuterado

**MeOH** – Metanol

**MIBG** – Meta-iodo benzilguanidina

**min** – Minuto(s)

**MS** – Espectrometria de Massa (do acrônimo inglês *Mass Spectrometry*)

**MTT** – brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

## P

**PBS** – Tampão *Phosphate Buffered Saline*

**PDT** – Terapia Fotodinâmica (do inglês *Photodynamic Therapy*)

**PET** – Tomografia por Emissão de Positrões (do inglês *Positron Emission Tomography*)

**ppm** – partes por milhão; medida de desvio químico.

**PSA** – Antígeno específico da próstata (do inglês *Prostate Specific Antigen*)

**PSMA** – Antígeno da membrana específico da prostática (do inglês *Prostate Specific Membrane Antigen*)

## R

**RMN** – Ressonância Magnética Nuclear

**RPMI** – Meio de cultura celular *Roswell Park Memorial Institute*

## S

**SPECT** – Tomografia computadorizada de emissão de fóton único (do inglês *Single Photon Emission Computed Tomography*)

**SSB** – Quebra de cadeia simples (do inglês *Single-strand Break*)

## T

**t.a.** – Temperatura ambiente

**TAE** – Tris-acetato-EDTA

**TFA** – Ácido trifluoracético

**TLC** – Cromatografia em camada fina (do inglês *Thin Layer Chromatography*)

**TMS** – Tetrametilsilano

**t.r.** – Tempo de retenção

**Tris** – tris(hidroximetil)aminometano

## U

**UV-Vis** – Ultra-violeta e Visível

### *Símbolos:*

$\alpha$  – Alfa

Å – Angstrom

$\beta$  – Beta

$\beta^+$  – Positrão

$\gamma$  – Gama

$\mu$  – Micro

$\phi$  – Phi

$\eta$  – Rendimento

$\lambda$  – Comprimento de onda







# 1. INTRODUÇÃO

---



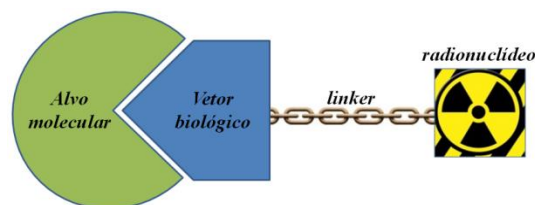


## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Medicina Nuclear: Diagnóstico e Terapêutica com Radionuclídeos

A medicina nuclear é uma especialidade médica na qual são empregues radiofármacos para diagnóstico ou terapêutica de um grande número de patologias.

Como representado na **Figura 1.1**, um radiofármaco é um composto que inclui na sua constituição um radionuclídeo (elemento com núcleo instável, que liberta o excesso de energia através de processos de decaimento radioativo, transformando-se espontaneamente noutro elemento mais estável e emitindo por isso radiação eletromagnética e/ou partículas carregadas) e um agente químico que o transporta de forma preferencial para um determinado órgão ou tecido. Estes dois constituintes do radiofármaco são determinantes para o seu funcionamento. As características do agente químico devem ser tais que promovam a maior seletividade possível na biodistribuição e, em simultâneo, uma boa capacidade de depuração do organismo. Por outro lado, o radionuclídeo deve apresentar características físicas adequadas para a finalidade que é empregue, nomeadamente em termos de quantidade e tipo de energia emitida. Em particular, as características das partículas ou radiação emitidas pelo radionuclídeo vão definir o seu potencial para aplicação em diagnóstico ou em terapêutica[1-3].



**Figura 1.1:** Representação esquemática de um radiofármaco cujo agente químico é seletivo para um dado alvo molecular.

Dependendo dos processos envolvidos na localização nos órgãos ou tecidos alvo, um radiofármaco pode ser classificado como um radiofármaco de perfusão (ou de primeira geração) ou como um radiofármaco específico (ou de segunda geração). Nos primeiros, a biodistribuição depende sobretudo das suas características físico-químicas tais como a carga global, peso molecular, forma estrutural e lipofilia; por outro lado, os últimos contêm um vetor biológico (por exemplo, anticorpos, péptidos, pequena molécula biologicamente ativa) que lhe confere especificidade para que sejam reconhecidos e se liguem de forma específica a um dado alvo molecular cuja expressão ou atividade se pretende estudar *in vivo* (ver **Figura 1.1**). Na sua grande maioria, os radiofármacos usados hoje em dia em medicina nuclear de diagnóstico são agentes de perfusão. Contudo, os avanços da biologia molecular têm levado os radiofármacos de

segunda geração a ganhar uma posição cada vez mais favorável e de maior interesse. As características biológicas dos radiofármacos de segunda geração permitem que tenham uma localização mais específica no órgão ou tecido alvo[1-4].

Em suma, um radiofármaco deve apresentar propriedades físico-químicas, biológicas e farmacocinéticas favoráveis, que confirmam elevada especificidade para o órgão ou tecido em estudo, mínima acumulação em órgãos não-alvo<sup>1</sup>, elevada estabilidade metabólica, semivida biológica<sup>2</sup> e física<sup>3</sup> adequadas ao processo em estudo e ser de fácil acesso ao utilizador final.

Os radiofármacos utilizados em diagnóstico clínico representam a larga maioria dos radiofármacos atualmente comercializados e utilizados em medicina nuclear. Estes compostos têm na sua constituição radionuclídeos emissores de radiação gama ( $\gamma$ ) que decaem por captura eletrónica ou transição isomérica, para utilização em tomografia por emissão de fóton único (SPECT<sup>4</sup>); ou radionuclídeos emissores de positrões ( $\beta^+$ ) para utilização em tomografia por emissão de positrões (PET<sup>5</sup>).

Em particular, o uso de radiofármacos pode permitir o diagnóstico e seguimento das patologias através da chamada imagiologia molecular. A imagiologia molecular tem um carácter não invasivo que permite a visualização de processos químicos e biológicos, *in vivo*, sem interferir com os mecanismos que os controlam. Este procedimento inclui a introdução de uma pequena quantidade de radiofármaco no corpo do paciente, maioritariamente por via endovenosa, sem qualquer efeito tóxico. São adquiridas imagens com boa resolução espacial, que se relacionam com a biodistribuição do radiofármaco no corpo, através de equipamentos que detetam o local onde os fótons  $\gamma$  são emitidos[1,4,5].

Embora a radioterapia convencional seja a modalidade mais utilizada para a terapêutica de doenças oncológicas, por definição não tem qualquer efeito sobre doença oculta ou secundária (metástases). Por outro lado, os agentes radiofarmacêuticos, de aplicação sistémica, são desenvolvidos para apresentarem seletividade para as células de determinado tipo de tumor, estejam estas localizadas na área do tumor primário, ou disseminadas por outras localizações anatómicas.

---

<sup>1</sup> Órgãos não-alvo: órgãos que captam o radiofármaco mas que não são o órgão em estudo.

<sup>2</sup> Semivida biológica: período de tempo necessário para que metade do radiofármaco desapareça do organismo por eliminação metabólica.

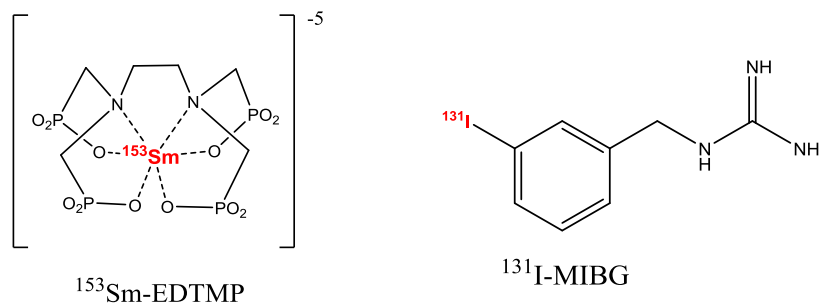
<sup>3</sup> Semivida física ou período de semidesintegração ( $T_{1/2}$ ): período de tempo necessário para reduzir a metade o número de núcleos instáveis de um radioisótopo.

<sup>4</sup> SPECT: Tomografia Computorizada por Emissão de Fóton Único, do inglês *Single Photon Emission Computed Tomography*.

<sup>5</sup> PET: Tomografia por Emissão de Positrões, do inglês *Positron Emission Tomography*.

Neste sentido, um radiofármaco para fins terapêuticos deve apresentar emissão de partículas carregadas (pouco penetrantes) com capacidade para provocar danos no sistema biológico alvo, nomeadamente radionuclídeos emissores de partículas beta ( $\beta$ ), alfa ( $\alpha$ ) ou de elétrons Auger. A toxicidade de um agente radioterapêutico é essencialmente devida aos efeitos das partículas ou radiação ionizantes e não à capacidade de o agente químico que o constitui interferir na replicação celular (como no caso da quimioterapia), devido às baixas concentrações que são administradas. Por esta razão, estes agentes químicos podem ser convenientemente derivatizados, no sentido de desenvolver moléculas com especial especificidade para determinado tecido ou tipo de células, sem que se manifestem eventuais efeitos nas células saudáveis. A aplicação de agentes radioterapêuticos tem assim como objetivo fazer chegar aos tecidos alvo, por exemplo às células de um determinado tipo de tumor, doses terapêuticas de radiação ionizante que impeçam a sua capacidade de replicação ou que conduzam à sua morte por apoptose. O alveijamento de um dado tecido ou tipo de células pode ser feito mediante interação dos radiofármacos com dadas moléculas-alvo, como recetores específicos, antígenos, enzimas ou genes.

Presentemente, a maioria dos radiofármacos em utilização clínica para terapêutica com radionuclídeos são emissores de partículas  $\beta$ . Alguns exemplos como o  $^{153}\text{Sm-EDTMP}$ , para o controlo paliativo da dor na sequência de metástases ósseas, o  $^{131}\text{I-MIBG}$ , para o tratamento de tumores neuroendócrinos (ver **Figura 1.2**) e mais recentemente o  $^{177}\text{Lu-DOTATATE}$ , para terapêutica de tumores neuroendócrinos, mais especificamente os que sobreexpressem recetores de somatostatina. Os efeitos deste tipo de partículas sobre os tecidos conduzem à destruição das células tumorais. Contudo, a captação do radiofármaco no órgão alvo deve ser seletiva, de modo a minimizar os efeitos secundários. A escolha do emissor  $\beta$  vai depender da energia das partículas emitidas, das dimensões do tumor, da distribuição intratumoral e da farmacocinética do radiofármaco. Existe uma intensa investigação no sentido de desenvolver radiofármacos emissores  $\alpha$  ou de elétrons Auger com interesse como agentes radioterapêuticos[1,5-8].



**Figura 1.2:** Exemplos de radiofármacos emissores de partículas  $\beta$ , atualmente em utilização clínica como agentes terapêuticos.

Embora não seja uma característica essencial para radiofármacos usados em terapia, a emissão concomitante de radiação gama de baixa energia (100-200 keV) pode ser uma vantagem, dada a utilidade clínica de poder haver monitorização cintigráfica simultânea.

Alguns radionuclídeos (ex.:  $^{131}\text{I}$ ) ou pares de radionuclídeos (ex.:  $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ ) apresentam propriedades físicas ideais para aplicações de diagnóstico por imagem e, simultaneamente, para fins terapêuticos. O uso de radiofármacos para o diagnóstico e/ou terapêutica apresenta por isso uma relevância cada vez mais significativa, conduzindo à deteção precoce e terapia dirigida das patologias[9]. Por esta razão, a teranóstica<sup>6</sup> é uma modalidade cada vez mais atrativa para o uso de radiofármacos.

Na **Tabela 1.1** apresentam-se exemplos relevantes de radionuclídeos em atual utilização clínica, para diagnóstico ou terapêutica.

**Tabela 1.1:** Radionuclídeos em atual utilização clínica em medicina nuclear[10-12].

Radionuclídeo	$T_{1/2}$	Tipo de emissão (energia)	Aplicação clínica
$^{18}\text{F}$	1,8 horas	$\beta^+$ (634 keV)	Diagnóstico PET
$^{67}\text{Ga}$	3,2 dias	$\gamma$ (93, 185, 300, 394 keV)	Diagnóstico SPECT
$^{68}\text{Ga}$	68,1 min	$\beta^+$ (1899 keV)	Diagnóstico PET
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,0 horas	$\gamma$ (141 keV)	Diagnóstico SPECT
$^{111}\text{In}$	2,8 dias	$\gamma$ (171 e 245 keV)	Diagnóstico SPECT
$^{123}\text{I}$	13,2 horas	$\gamma$ (159 keV)	Diagnóstico SPECT
$^{125}\text{I}$	59,4 dias	$\gamma$ (35,5 keV)	Radioimunoensaio
$^{131}\text{I}$	8,0 dias	$\gamma$ (364 keV) $\beta$ (606 keV)	Diagnóstico + Terapêutica SPECT
$^{177}\text{Lu}$	6,7 dias	$\gamma$ (113 e 208 keV) $\beta$ (490 keV)	Terapêutica
$^{153}\text{Sm}$	46,8 horas	$\gamma$ (103 keV) $\beta$ (máx: 634, 703 e 807 keV)	Terapêutica (permite imagem)
$^{201}\text{Tl}$	3,04 dias	$\gamma$ (71, 135 e 167 keV)	Diagnóstico SPECT

<sup>6</sup> Teranóstica refere-se ao emprego do mesmo fármaco para fins simultaneamente de diagnóstico e terapia.

## 1.2 Efeitos Biológicos das Radiações Ionizantes

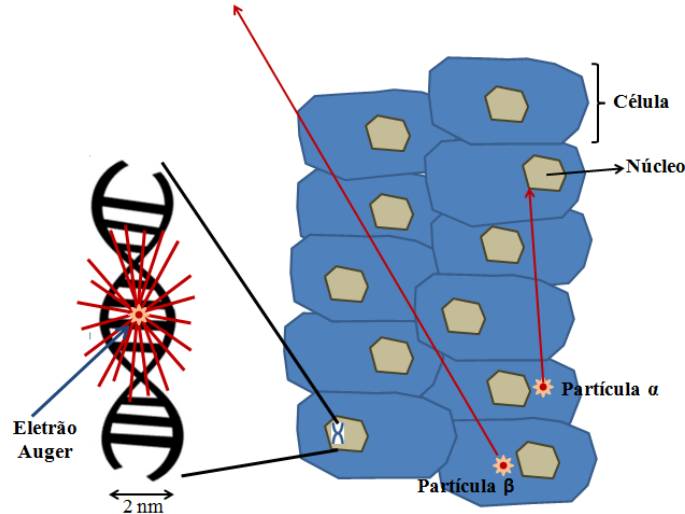
As radiações ionizantes conduzem a diferentes eventos quando interagem com a matéria, podendo causar danos celulares. Muito embora os princípios radiobiológicos relativos à exposição da matéria a fontes externas de radiação (fotões) sejam os mesmos para a terapêutica com radionuclídeos (partículas), existem diferenças notáveis nos efeitos observados ao nível celular em mamíferos[7,13].

O ácido desoxirribonucleico (ADN) é a molécula mais radiosensível da célula, o que o torna por um lado a estrutura mais importante a proteger contra os efeitos nefastos das radiações ionizantes e, por outro, o alvo mais almejado para a terapêutica anti-carcinogénica, uma vez que é determinante para a sobrevivência celular. Os efeitos biológicos das radiações ionizantes com maior peso são os devidos a danos causados na dupla hélice do ADN. Estes danos podem ocorrer por interação da radiação diretamente com a molécula de ADN (efeitos diretos), causando ionização de um ou mais pares de bases nucleotídicas, ou por interação da radiação ionizante com outras moléculas presentes no meio intracelular, particularmente as moléculas de água. Neste caso, ocorre produção de espécies reativas de oxigénio (radicais livres), especialmente de radicais hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), por radiólise. Por sua vez, essas espécies radicalares interagem com a molécula de ADN, causando ionizações nucleotídicas (efeitos indiretos)[7,13]. As principais lesões causadas no ADN celular pelas radiações ionizantes caracterizam-se por quebras na cadeia nucleotídica. Estas quebras podem ser simples (SSB, do inglês *Single-Strand Breaks*), quando ocorrem em apenas um dos lados da cadeia, ou duplas (DSB, do inglês *Double-Strand Breaks*), quando ambos os lados da dupla hélice são danificados. Esses danos podem conduzir à morte celular por apoptose ou por necrose[13,14].

A presença de compostos antioxidantes e os mecanismos de reparação do ADN celular podem reduzir de forma significativa os efeitos das radiações ionizantes. Contudo, não são de forma geral muito eficientes contra radiações com elevada deposição de energia, estando ainda este tipo de radiação associada a efeitos diretos e a DSB, que conduzem a uma reduzida taxa de sobrevivência celular[7,13].

Assim, diferentes tipos de radiação ionizante promovem diferentes danos na matéria biológica, mesmo se possuírem quantidade idêntica de energia. Este facto deve-se a um processo designado por transferência linear de energia (LET, do inglês *Linear Energy Transfer*), que define a quantidade de energia depositada na matéria pela radiação ionizante por unidade de percurso e é expressa em  $\text{keV}/\mu\text{m}$ . Neste sentido, os efeitos diretos da radiação ionizante na matéria ocorrem preferencialmente quando há exposição a radiação com capacidade de deposição de grande quantidade de energia num percurso muito curto na matéria, ou seja,

radiação com elevada LET. Esta grandeza tem particular importância no campo da terapêutica com radionuclídeos, uma vez que partículas  $\alpha$ ,  $\beta$  e elétrons Auger têm percursos diferentes na matéria biológica (ver **Figura 1.3**), que dependem da sua carga, massa e energia[11,13,14].



**Figura 1.3:** Representação esquemática do percurso de partículas  $\alpha$ ,  $\beta$  e elétrons Auger no meio celular e subcelular.

A LET das partículas  $\beta$  é baixa e, dependendo da sua energia, estas partículas podem percorrer até alguns milímetros a partir do local onde são depositadas. O diâmetro típico de uma célula é de 5 a 20  $\mu\text{m}$ . Assim, o alcance na matéria de uma partícula  $\beta$  corresponde ao diâmetro de várias células (por exemplo, o alcance das partículas  $\beta$  emitidas pelos isótopos  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{131}\text{I}$  e  $^{153}\text{Sm}$  é de 1,8 mm, 2,4 mm e 3,0 mm, respetivamente). Neste sentido, as células irradiadas por radiofármacos emissores  $\beta$  não serão apenas as células alvo, mas também as células circundantes, sejam estas doentes ou saudáveis. Por este motivo, existe uma desvantagem na utilização deste tipo de radiofármacos, nomeadamente quando os tecidos circundantes ao tumor primário são tecidos com radiosensibilidade aumentada, como é o caso da medula óssea. Nos tumores de grandes dimensões, geralmente ocorrem alterações metabólicas que conduzem a um menor suprimento de vasos sanguíneos para as camadas celulares mais externas. Desta forma, a distribuição do radiofármaco neste tipo de tumor não será homogênea. Nestes casos de tumores ou metástases de grandes dimensões, existe uma vantagem clara na utilização de radiofármacos que contenham radionuclídeos emissores de partículas  $\beta$ , uma vez que o seu relativamente longo alcance vai permitir a irradiação do conjunto das células tumorais, mesmo que individualmente nem todas capturem o radionuclídeo[11,13].

Por outro lado, as partículas  $\alpha$  apresentam elevada LET, pelo que o seu percurso a partir do local onde são depositadas é consideravelmente mais curto. Como se pode verificar pela representação apresentada na **Figura 1.3**, o percurso das partículas  $\alpha$  tem uma ordem de

grandeza equivalente à dimensão de algumas células (menos de 100 nm), o que significa que muito pouca da energia emitida é depositada fora do grupo de células alvo. Contudo, uma das desvantagens do uso de emissores de partículas  $\alpha$  reside no facto de que estes radionuclídeos têm que ser depositados em praticamente todas as células tumorais, sob pena de uma irradiação insuficiente do tumor, que poderia facilmente resultar numa recidiva tumoral.

Foi recentemente aprovado pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) o primeiro radiofármaco emissor de partículas  $\alpha$  para terapêutica com radionuclídeos, o  $^{223}\text{RaCl}_2$ . Este tipo de radiofármacos é particularmente interessante para o tratamento de pequenas massas tumorais ou metastáticas de tumores da próstata com resistência à castração, que apresentem elevado suprimento sanguíneo e avidéz metabólica[11,13].

Os eletrões Auger têm um alcance ainda mais curto do que as partículas  $\alpha$ , percorrendo uma distância máxima inferior à dimensão do núcleo celular, depositando por isso toda a sua energia num volume muito limitado (ver **Figura 1.3**). Para que apresentem radiocitotoxicidade, os emissores de eletrões Auger têm que ser depositados o mais próximo possível da dupla hélice de ADN das células alvo. Atualmente, não se encontra em utilização clínica corrente nenhum radiofármaco de emissores de eletrões Auger. No entanto, como discutido a seguir, radiofármacos com emissores de eletrões Auger são considerados bastante promissores, pois seriam muito adequados para o tratamento de metástases ou de pequenos tumores.

### 1.3 Radiofármacos para Terapia Auger

#### 1.3.1. Radionuclídeos Relevantes e o Efeito Auger

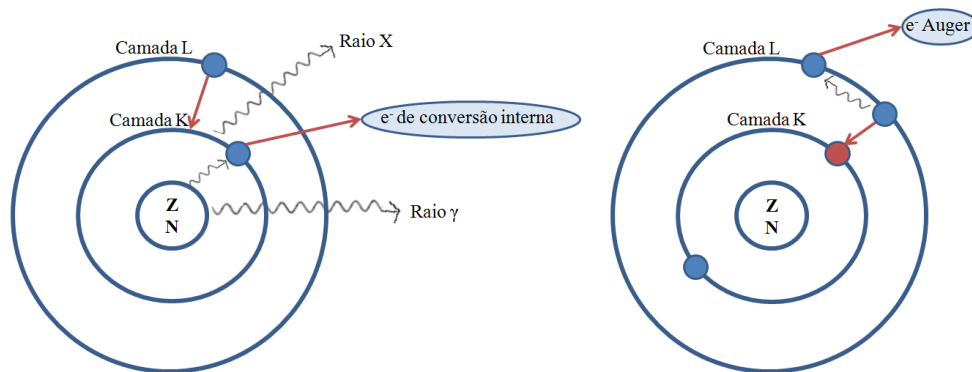
Na sequência da transformação nuclear inerente ao processo de decaimento radioativo, o núcleo final ainda fica na maior parte das vezes num estado excitado. A libertação deste excesso de energia ocorre maioritariamente por emissão de radiação  $\gamma$ . Se o estado excitado tiver um tempo de vida mensurável, estamos na presença de isómeros ditos metastáveis. Neste caso, o processo envolvido designa-se por transição isomérica, sendo o processo que ocorre no decaimento do  $^{99m}\text{Tc}$ . Em alternativa, o excesso de energia do núcleo final é transferido diretamente para um eletrão de uma orbital eletrónica interna (mais provavelmente da camada K), levando à sua ejeção por um processo que se designa "conversão interna".

A probabilidade de ocorrência do fenómeno de conversão interna aumenta com o aumento do período de semidesintegração do radioisótopo e com o aumento do número atómico, sendo

ainda mais frequente em radioisótopos emissores de radiação gama de baixa energia. Na sequência deste processo, cria-se uma lacuna numa camada interna da distribuição eletrónica.

É de salientar que o processo de decaimento radioativo designado por "captura eletrónica" também gera lacunas na camada mais interna da nuvem eletrónica. A captura eletrónica ocorre quando um eletrão da camada interna interage com um protão do núcleo para formar um neutrão[7,11,17].

Em qualquer um dos casos atrás descritos, a lacuna originada na camada interna por conversão interna ou por captura eletrónica é rapidamente preenchida, na sequência de uma cascata de transições eletrónicas, por eletrões das camadas mais externas (**Figura 1.4**). A diferença energética resultante deste rearranjo eletrónico pode, ou não, envolver a emissão de radiação ionizante, como por exemplo de fótons X de energia característica[10,15,16]. O processo de desexcitação que compete com esta emissão fotónica designa-se "efeito Auger". Como representado na imagem da direita da **Figura 1.4**, este efeito envolve a emissão de eletrões Auger, *Coster-Kronig* e *Super Coster-Kronig*, que se distinguem pela camada de origem envolvida do processo de transição eletrónica, mas é usual a designação comum de "eletrões Auger" para todos eles[10,15,16].



**Figura 1.4:** À esquerda, representação esquemática do processo de conversão interna. À direita, representação esquemática da libertação de um eletrão Auger.

O "efeito Auger" deve o seu nome ao físico francês Pierre Auger, que demonstrou a sua ocorrência durante a desexcitação eletrónica dos átomos. Durante vários anos, a importância deste fenómeno foi ignorada, sobretudo devido ao facto de a energia transportada por este tipo de eletrões ser negligenciável, quando comparada com a energia total libertada durante o decaimento radioativo[10,15-18].

A energia dos eletrões Auger emitidos depende sobretudo do número atómico do átomo do elemento, da camada eletrónica de onde é emitido o eletrão e da configuração eletrónica envolvida, estando tipicamente num intervalo que vai desde alguns eV até 100 keV. Como este tipo de eletrões apresenta um reduzido alcance na matéria, de 2 a 500 nm (com a maior parte da



energia depositada num raio de 1-2 nm), a sua LET é bastante elevada (4-26 keV/ $\mu$ m) quando comparada com os radionuclídeos atualmente em utilização clínica para terapêutica, como os emissores de partículas  $\beta$  (LET = 0,2 keV/ $\mu$ m), que apresentam alcances na ordem dos milímetros (0,05-12 mm), como atrás referido[7,10,11,17]. Neste sentido, os eletrões Auger têm um grande potencial para utilização em terapêutica com radionuclídeos, sobretudo segundo o conceito da radioterapia dirigida.

Foi na década de 1970, na sequência de uma conferência organizada pelo Professor Feinendegen da Universidade de Düsseldorf, que começaram a ser feitos avanços consideráveis em relação à possível utilização de emissores de eletrões Auger para terapêutica antitumoral. Passados 10 anos, começaram a surgir estudos mais robustos que conduziram à melhor compreensão dos efeitos radiobiológicos dos eletrões Auger. Este tipo de decaimento resulta na emissão de eletrões de baixa energia, promovendo irradiação de elevada densidade eletrónica na vizinhança imediata do local de decaimento[10, 5, 6].

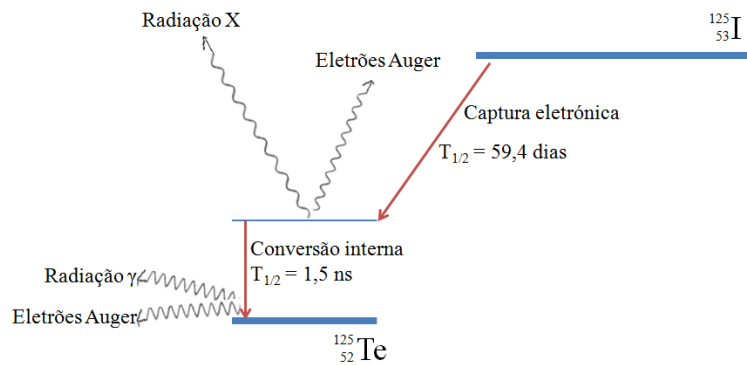
Estudos de microdosimetria permitiram concluir que os efeitos biológicos dos eletrões Auger apresentam uma dependência crítica à localização celular do radionuclídeo emissor, uma vez que quando esses isótopos se encontram no espaço extranuclear, não são detetados efeitos tóxicos relevantes nas células. Por outro lado, quando o decaimento ocorre próximo do ADN, os eletrões Auger provocam danos celulares característicos de radiação com elevada LET, nomeadamente quebras na cadeia nucleotídica, mutações, aberrações cromossómicas ou morte celular[11,15,16]. Por essa razão, o desenvolvimento da terapêutica com radionuclídeos emissores de eletrões Auger implica necessariamente que o radiofármaco seja captado pelo núcleo das células do órgão-alvo, sendo o ADN um alvo preferencial para os efeitos biológicos deste tipo de partículas[20,27-31].

Atualmente existe um número razoável de radionuclídeos emissores de eletrões Auger que são utilizados clinicamente em medicina nuclear para fins de diagnóstico. Na **Tabela 1.2** apresentam-se alguns exemplos de isótopos emissores de eletrões Auger, como o Gálio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), Tecnécio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), Índio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), Iodo-123 ( $^{123}\text{I}$ ), Iodo-125 ( $^{125}\text{I}$ ) e o Tálcio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ). Contudo, cerca de metade dos radioisótopos cujo decaimento ocorre por transição isomérica ou por captura eletrónica são emissores de eletrões Auger[11,15,17].

**Tabela 1.2:** Propriedades físicas de alguns radionuclídeos emissores de eletrões Auger.

Radionuclídeo	T <sub>1/2</sub>	Nr.º médio eletrões Auger emitidos por decaimento
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,0 horas	4
$^{111}\text{In}$	2,8 dias	14,7
$^{123}\text{I}$	13,2 horas	14,9
$^{125}\text{I}$	59,4 dias	24,9
$^{201}\text{Tl}$	3,04 dias	36,9

O radioisótopo  $^{125}\text{I}$  é um dos emissores de elétrons Auger mais estudados. Para além do potencial interesse como emissor de elétrons Auger, o elevado período de semidesintegração do  $^{125}\text{I}$  e a emissão de radiação  $\gamma$  de baixa energia torna-o também atrativo para utilização em ensaios preliminares de desenvolvimento de radiofármacos com  $^{125}\text{I}$  para imagiologia SPECT. Como descrito na **Figura 1.5**, o decaimento radioativo do  $^{125}\text{I}$  ocorre em duas etapas. Na primeira, o isótopo  $^{125}\text{I}$ , com um período de semidesintegração de cerca de 59,4 dias, decai por captura eletrónica para um estado excitado do Telúrio-125 ( $^{125}\text{Te}$ ), havendo emissão de radiação X característica e elétrons Auger provenientes da desexcitação eletrónica da camada L para a camada K. Este estado intermediário excitado tem um tempo de vida muito curto (cerca de 1,5 ns), e transforma-se em  $^{125}\text{Te}$  (no estado fundamental) através de um processo de conversão interna, com emissão de fótons  $\gamma$  de 35,5 keV. Este processo de conversão interna conduz a nova emissão de elétrons Auger[19].



**Figura 1.5:** Processo de decaimento radioativo do  $^{125}\text{I}$ [19].

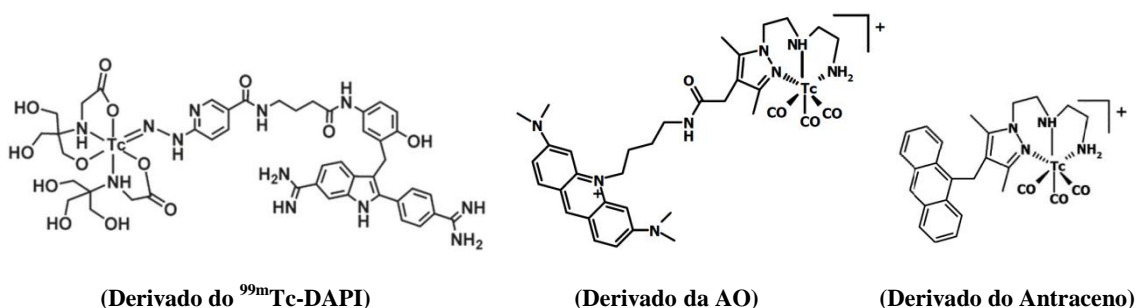
Os espectros dos radionuclídeos emissores de elétrons Auger são muito complexos, exigindo a aplicação de modelos computacionais e matemáticos sofisticados que têm vindo a evoluir ao longo das últimas décadas[10]. Fruto desses avanços, o Professor Roger Howell do grupo de trabalho de Medicina Nuclear da *American Association of Physicists in Medicine* publicou um estudo detalhado do espectro de emissão do isótopo  $^{125}\text{I}$ , que é apresentado na **Tabela 1.3**[19].

	Energia Média (MeV)	Rendimento/decaimento	Alcance ( $\mu\text{m}$ )		Energia Média (MeV)	Rendimento/decaimento
$\gamma_1$	$3.55E-02$	$6.47E-02$				
IC 1 K	$3.65E-03$	$7.97E-01$	$4.98E-01$	X-ray $\text{K}_{\alpha 1}$	$2.75E-02$	$7.51E-01$
IC 1 L	$3.06E-02$	$1.10E-01$	$1.86E+01$	X-ray $\text{K}_{\alpha 2}$	$2.72E-02$	$3.94E-01$
IC 1 M,N...	$3.47E-02$	$2.84E-02$	$2.31E+01$	X-ray $\text{K}_{\beta 1}$	$3.10E-02$	$1.38E-01$
Auger KLL	$2.24E-02$	$1.38E-01$	$1.08E+01$	X-ray $\text{K}_{\beta 2}$	$3.17E-02$	$4.03E-02$
Auger KLLX	$2.64E-02$	$5.90E-02$	$1.43E+01$	X-ray $\text{K}_{\beta 3}$	$3.09E-02$	$6.85E-02$
Auger KXY	$3.02E-02$	$6.50E-03$	$1.82E+01$	X-ray $\text{K}_{\beta 5}$	$3.12E-02$	$1.20E-03$
CK LLX	$2.19E-04$	$2.64E-01$	$1.02E-02$	X-ray $\text{KM,N,O}$	$3.17E-02$	$3.00E-03$
Auger LMM	$3.05E-03$	$1.25E+00$	$3.73E-01$	X-ray L	$3.93E-03$	$1.32E-01$
Auger LMX	$3.67E-03$	$3.40E-01$	$5.04E-01$	X-ray M	$5.42E-04$	$4.00E-03$
Auger LXY	$4.34E-03$	$2.11E-02$	$6.62E-01$			
CK MMX	$1.27E-04$	$1.44E+00$	$6.43E-03$			
Auger MXY	$4.61E-04$	$3.28E+00$	$2.25E-02$			
CK NNX	$2.99E-05$	$3.51E+00$	$1.75E-03$			
Auger NXY	$3.24E-05$	$1.09E+01$	$1.97E-03$			
CK OOX	$6.00E-06$	$3.66E+00$	$1.50E-04$			

**Tabela 1.3:** Espectro médio de emissão do isótopo  $^{125}\text{I}$ [19].

Além do  $^{125}\text{I}$ , outros radionuclídeos emissores de elétrons Auger têm sido estudados, sobretudo nos últimos anos, sendo de destacar o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e o  $^{111}\text{In}$ .

A maior parte dos radiofármacos em atual utilização clínica para diagnóstico corresponde a complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Do ponto de vista da aplicação dual, diagnóstico e terapia, existe muito interesse no desenvolvimento de radiofármacos tecneciados. Vários grupos têm dirigido a sua investigação para os efeitos decorrentes da emissão Auger do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Recentemente, a importância dos elétrons Auger emitidos por este radioisótopo foi descrita por Cambien e colaboradores, que investigaram o fenômeno de hibernação das células do tecido tiroideu, por exposição *in vivo* ao ião  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertechnetato ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ). Outros grupos estudaram ainda os efeitos em ADN plasmídico de complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  com afinidade para o ADN, como derivados do antraceno, do DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) ou do alaranjado de acridina (**Figura 1.6**), entre outros[21-23].



**Figura 1.6:** Complexos de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  avaliados *in vitro* como emissores de elétrons Auger. [21-23]

Vários radiofármacos utilizados para diagnóstico em medicina nuclear correspondem a péptidos ou anticorpos marcados com  $^{111}\text{In}$ . Este radionuclídeo emite cerca de 15 elétrons Auger por decaimento, o que faz com que haja interesse no estudo de potenciais radiofármacos marcados com  $^{111}\text{In}$  para terapêutica com radionuclídeos. Os grupos de investigação de Andreas Wicki e de Raymond Reilly têm desenvolvido trabalhos recentes que envolvem a utilização de péptidos ou anticorpos marcados com  $^{111}\text{In}$ , com o propósito de investigar o seu potencial enquanto radiofármacos para terapêutica por radionuclídeos emissores de elétrons Auger[24-26].

### 1.3.2 Moléculas Radiodadas para Terapia Auger

O Iodo-127 ( $^{127}\text{I}$ ) é o único isótopo natural de Iodo, mas são conhecidos mais de 30 radioisótopos artificiais deste halogéneo, alguns dos quais são utilizados atualmente na medicina para preparar radiofármacos utilizados em diagnóstico e terapêutica.

Com efeito, o primeiro radioisótopo utilizado na prática clínica foi o  $^{131}\text{I}$ , usado desde a década de 1940. O facto de ser um elemento com elevada afinidade para a glândula tiroideia e, simultaneamente, um emissor de partículas  $\beta$ , tornou-o atrativo para o tratamento do cancro da tiroideia, tendo sido posteriormente o primeiro radiofármaco em utilização clínica aprovado pela FDA[32,33]. Posteriormente, com o trabalho pioneiro de Hal Anger na década de 1960 que desenvolveu equipamentos capazes de obter imagens bidimensionais da distribuição de um radiofármaco no corpo de um paciente, a utilização de moléculas marcadas com  $^{131}\text{I}$  passou a poder ser seguida *in vivo* de forma mais fácil e não invasiva. Apesar das suas características físicas não serem as ideais para as Câmaras Gama (previamente designadas por Câmaras Anger) da medicina nuclear, ainda nos dias de hoje o isótopo  $^{131}\text{I}$  continua a ser utilizado extensivamente na clínica, sobretudo no âmbito da terapêutica com radionuclídeos.

Outros isótopos radioativos do Iodo são hoje em dia empregues para fins diagnósticos. Destaca-se o  $^{123}\text{I}$  com características físicas que se adequam melhor à obtenção de imagens nas modernas câmaras gama, largamente empregue em estudos cerebrais para diagnóstico de doença de Parkinson, com base no mapeamento *in vivo* da densidade do transportador dopaminérgico, utilizando um análogo da cocaína marcado com  $^{123}\text{I}$ . Mais recentemente, estudos sugerem a aplicabilidade de pequenas moléculas marcadas com  $^{123}\text{I}$  para diagnóstico do cancro da próstata e respetivas metástases que sobreexpressem o antigénio específico da próstata, PSA[34]. Têm também sido desenvolvidos estudos no sentido de apurar a utilidade clínica do uso do isótopo  $^{124}\text{I}$ , um emissor de positrões, para técnicas imagiológicas por PET[32,35,36].

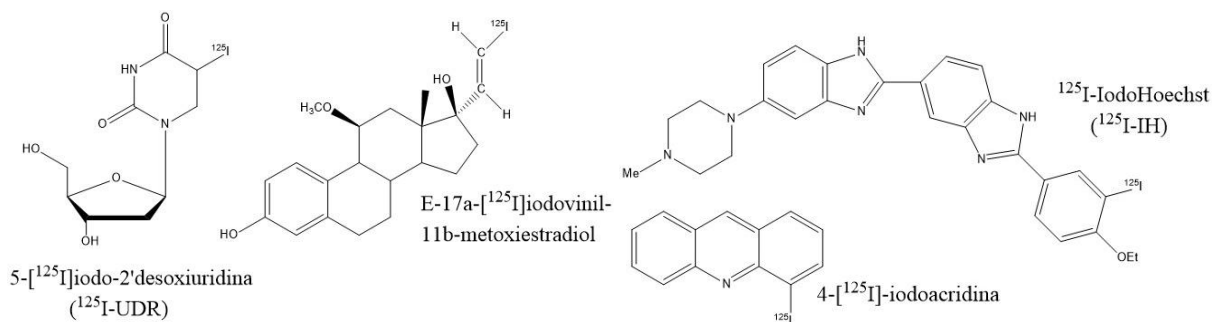
Consideravelmente menos utilizado na prática clínica, o isótopo  $^{125}\text{I}$  foi bastante utilizado em radioimunoensaios. A sua utilização para imagiologia não é exequível uma vez que emite fotões  $\gamma$  de apenas 35,5 keV, energia não adequada à deteção por SPECT. Mais recentemente, este isótopo tem sido aplicado para braquiterapia, em doentes com carcinoma prostático[35,37,38]. Como já referido, o  $^{125}\text{I}$  é um isótopo do Iodo com grande relevância para desenvolvimento de radiofármacos para terapêutica Auger, área em que se insere o trabalho apresentado.

Existem diversas estratégias disponíveis para sintetizar moléculas marcadas com iodo radioativo ( $^{131}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{124}\text{I}$  ou  $^{125}\text{I}$ ), as quais foram desenvolvidas tendo em conta a química orgânica do elemento iodo e as restrições impostas pela elevada atividade específica<sup>7</sup> dos radioisótopos do iodo. O desenvolvimento de compostos radioiodados para terapêutica Auger dirigida ao ADN envolve, de uma forma geral, a síntese e avaliação de compostos com capacidade de se incorporar na dupla hélice de ADN ou de estabelecer fortes interações intermoleculares com o ADN. Estas interações intermoleculares podem envolver a intercalação entre pares de bases ou interação com os sulcos maiores ou menores do ADN, como discutido com mais detalhe no subcapítulo 1.4[5]. Neste sentido, uma intensa investigação tem vindo a ser desenvolvida,

---

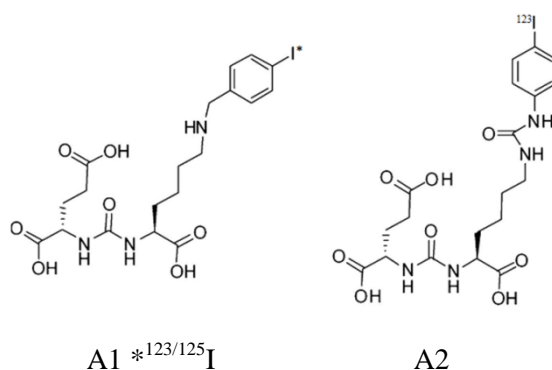
<sup>7</sup> Atividade Específica refere-se à radioatividade por unidade de massa de um dado elemento ou composto.

nomeadamente com compostos como o  $^{123/125}\text{I}$ -Iodoestrogénio, com especial afinidade para tumores com recetores de estrogénio, o 5- $^{125}\text{I}$ iodo-2'-desoxiuridina ( $^{125}\text{I}$ -UDR), que substitui a timidina na estrutura do ADN, o  $^{125}\text{I}$ -iodoHoechst ( $^{125}\text{I}$ -IH), que estabelece interação com o sulco maior do ADN, ou ainda derivados radioiodados de acridina, um conhecido intercalador do ADN (ver **Figura 1.7**)[28-30,40-44].



**Figura 1.7:** Compostos radiomarcados com  $^{125}\text{I}$ , investigados para terapia Auger.

É de referir que a utilização de radiofármacos de  $^{125}\text{I}$  enquanto emissores Auger tem também sido alvo de estudos recentes, com vista à terapêutica de tumores primários da próstata com sobreexpressão de PSMA e respetivas lesões secundárias. Os compostos representados na **Figura 1.8** foram já radiomarcados com  $^{123}\text{I}$  e têm comprovada utilidade para diagnóstico desta doença por SPECT. O composto representado por **A1** foi também marcado com  $^{125}\text{I}$  para avaliação de efeito Auger e os estudos pré-clínicos em ratinho com tumor induzido mostraram uma resposta terapêutica com resultados bastante promissores[45].



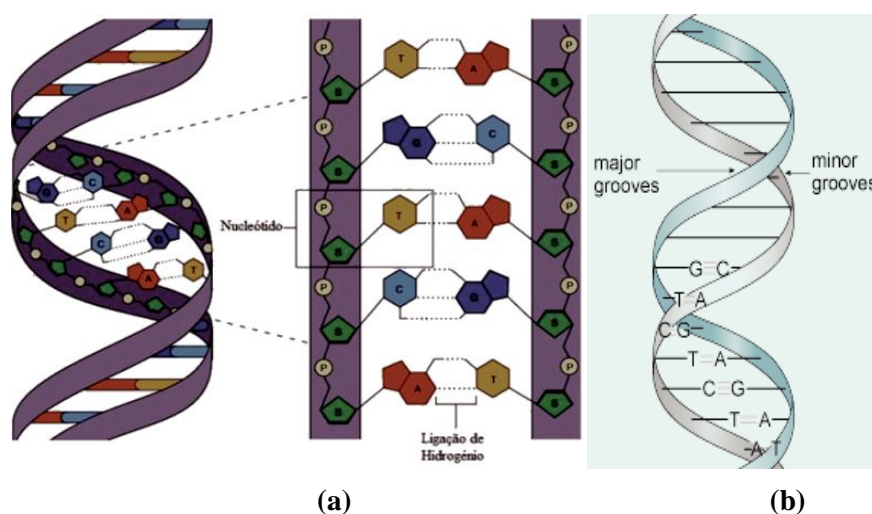
**Figura 1.8:** Compostos marcados com  $^{123}\text{I}$ , em investigação para diagnóstico de carcinoma da próstata. **A2** foi já marcado com  $^{124/131}\text{I}$  para diagnóstico PET e terapia com partículas  $\beta$  [45,46].

O elevado período de semidesintegração do  $^{125}\text{I}$  torna-o também atrativo para utilização em ensaios preliminares de desenvolvimento de radiofármacos marcados com  $^{123}\text{I}$ , pois permite avaliar *in vivo* compostos radioiodados por períodos de tempo mais longos. O  $^{125}\text{I}$  é também um dos principais isótopos utilizados para o estudo dos efeitos terapêuticos dos eletrões Auger. Por estas características, este foi o radionuclídeo escolhido para os ensaios realizados neste trabalho.

## 1.4 Compostos com Afinidade para o ADN e Modos de Interação

### 1.4.1. Estrutura do ADN e Tipos de Interação

A dupla hélice de ADN é um polímero que consiste em duas cadeias antiparalelas constituídas por açúcares (riboses) e grupos fosfato unidos por ligações fosfodiéster. Os pares de bases azotadas adenina/citosina e guanina/timina ligam-se por pontes de hidrogénio e associam-se às moléculas de ribose por ligações covalentes, como representado na **Figura 1.9**[47,48].



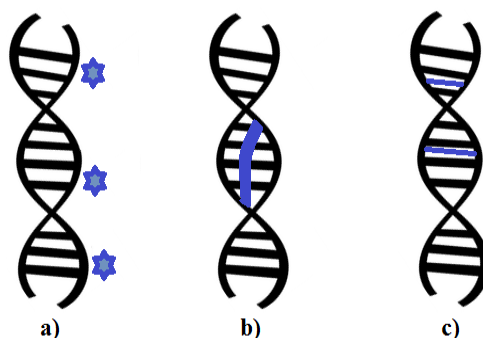
**Figura 1.9:** (a) Representação esquemática da estrutura da molécula de ADN; (b) Representação dos sulcos maior e menor do ADN.

A arquitetura das duas cadeias polinucleotídicas da dupla hélice de ADN define uma conformação helicoidal da molécula, conferindo-lhe dois tipos de sulcos: o maior e o menor, tal como se representa na **Figura 1.9**[47,48].

Dada a importância do ADN como biomolécula e pelo facto de apresentar vários locais disponíveis para ligação, têm sido feitos esforços para desenhar novos compostos com capacidade para interagir com o ADN, que são particularmente interessantes pelo seu potencial como agentes terapêuticos contra vários tipos de patologias, nomeadamente o cancro[49,50]. Nesta área de investigação, um dos grandes desafios relaciona-se com a síntese de estruturas com capacidade de interação seletiva com o ADN, incluindo ADN de diferentes topologias[49].

Compostos orgânicos pequenos como a ciclosporina ou o gás mostarda, são eletrófilos fortes e interagem com grupos nucleófilos do ADN, formando ligações covalentes com a dupla hélice do ADN por reações de alquilação. Agentes quimioterapêuticos com conhecida utilidade clínica interagem com o ADN desta forma, como é também o caso da cisplatina[47-49,51].

Alguns compostos orgânicos interagem com o ADN de forma não-covalente, como representado na **Figura 1.10**. Neste tipo de interações, destacam-se as interações eletroestáticas (*outside stacking*), as interações por ligação aos sulcos maior e menor (*major e minor groove binding*) e as interações por intercalação do composto entre os pares de bases nucleotídicas[47-49,51].



**Figura 1.10:** Interação não-covalente de pequenas moléculas com o ADN. **a)** *outside stacking*; **b)** *groove binding*; **c)** intercalação.

As ligações eletroestáticas ocorrem devido à interação entre os grupos fosfato da dupla hélice de ADN, carregados negativamente, e as pequenas moléculas com carga positiva. A maioria dos corantes orgânicos tendem a formar este tipo de ligações. Alguns complexos metálicos, nomeadamente complexos catiónicos, interagem desta forma com os grupos fosfato do ADN.

As interações de pequenas moléculas orgânicas do tipo *groove binding* ou por intercalação ocorrem devido ao envolvimento do  $\pi$ - $\pi$  *stacking*, ligações por pontes de hidrogénio, forças de van der Waals ou interações hidrofóbicas. A diferença principal entre estas duas formas de interação reside no facto de, quando ocorre intercalação, surgir uma consequente distorção de conformação na estrutura do ADN, alteração que não se verifica nas interações do tipo *major* ou *minor groove binding*[49-51].

A maioria dos compostos que interagem com o ADN por *groove binding* liga-se ao sulco menor. Nas interações do tipo *groove binding*, o composto interage diretamente com os pares de bases do ADN, nomeadamente com o par Guanina-Citosina (*major groove*) ou com o par Adenina-Timina (*minor groove*). Os *groove binders* não introduzem alterações conformacionais relevantes na estrutura do ADN. Este tipo de interação ocorre com compostos aromáticos ou heteroaromáticos[47-49].

Os compostos com capacidade de intercalação entre os pares de bases nucleotídicas do ADN têm também sido extensivamente estudados como potenciais fármacos. Na molécula de ADN, as bases apresentam uma disposição próxima de um arranjo coplanar, permitindo que estruturas aromáticas policíclicas intercalem entre dois pares de bases. Neste tipo de ligação, os anéis aromáticos do composto, com conformação planar, inserem-se entre os pares de bases do ADN com o eixo mais longo da molécula paralelo ou perpendicular ao local de ligação, estabelecendo

a chamada interação por  $\pi$ - $\pi$  *stacking*. Embora o processo de intercalação envolva geralmente um maior gasto energético do que outros processos de interação com o ADN, este tipo de ligação é bastante forte e estabilizada por forças de van der Waals, hidrofóbicas e eletrostáticas. A intercalação ocorre preferencialmente entre os pares de bases das sequências Citosina-Guanina e confere, como já mencionado, alguma distorção à conformação estrutural do ADN, reduzindo a sua liberdade de movimento[47-49,51].

Uma vez que a interação de pequenas moléculas com o ADN pode alterar a sua estrutura e conseqüentemente a sua função, torna-se essencial o estudo das propriedades físico-químicas dos complexos DNA-ligando resultantes, o que pode ser feito recorrendo a diferentes técnicas espectroscópicas, como discutido no capítulo 3[49,50,52].

### 1.4.2 Derivados do Alaranjado de Acridina

Vários derivados da acridina têm sido estudados pela sua capacidade de intercalação com as bases nucleotídicas do ADN para o desenvolvimento de fármacos com potencial ação quimio e radioterapêutica. O Alaranjado de Acridina (AO, do inglês *Acridine Orange*) é um composto heteroaromático planar, cuja estrutura se relaciona com a do antraceno e tem potencial como agente anticarcinogénico, o que motivou uma intensa investigação. Este foi o primeiro composto a ser proposto como modelo molecular para estudar a interação ligando-ADN, por Lerman, em 1961. Em 1977, Roger F Martin foi dos primeiros autores a publicar sobre a capacidade de indução de DSB no ADN por uma acridina radioiodada com  $^{125}\text{I}$ . Senait Ghirmai e colaboradores realizaram também uma extensiva investigação com compostos derivados da acridina marcados com  $^{125}\text{I}$ , sobre a sua capacidade de indução de danos irreversíveis na estrutura do ADN. Mais recentemente, estudos de Maryline Gardette mostraram o potencial de derivados da acridina marcados com  $^{125}\text{I}$  para terapêutica do melanoma com eletrões Auger[44,52-53,54-58].

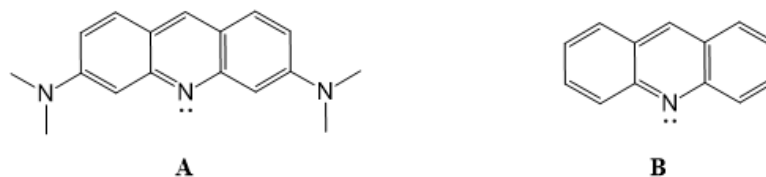
Nos trabalhos desenvolvidos nesta tese utilizámos a AO como unidade intercaladora do ADN, com o objetivo de obter novos compostos marcados com  $^{125}\text{I}$  com potencial para terapêutica de tumores através de eletrões Auger.

Os derivados da acridina apresentam-se sob a forma de catião monovalente, como resultado da protonação no átomo de azoto da unidade aromática, mesmo sob condições neutras. Sabe-se também que a protonação neste átomo potencia a capacidade de o composto intercalar entre as bases nucleotídicas do ADN[49,53].

Como representado na **Figura 1.11**, o alaranjado de acridina é um derivado dimetilamino-substituído da acridina que também apresenta capacidade de interação com o ADN por



intercalação, que é potenciada por atrações eletrostáticas com os grupos fosfato. Derivados da AO são geralmente estáveis do ponto de vista químico e apresentam uma afinidade elevada para as moléculas de ADN. A sua elevada absorção de luz, intensidade de fluorescência e propriedades corantes faz com que esta estrutura molecular proporcione a realização de uma grande variedade de estudos espectroscópicos que facilitam o estudo da interação com o ADN, bem como a avaliação da captação celular dos compostos por microscopia de fluorescência[49,59]. Estas vantagens motivaram a escolha da AO como estrutura base dos derivados radioiodados que se descrevem nesta tese.



**Figura 1.11:** Estrutura química do Alaranjado de Acridina (**A**) e da Acridina (**B**).

É ainda de salientar que é bem conhecida a capacidade da AO se acumular seletivamente em sarcomas músculo-esqueléticos. Tem vindo a ser explorada a sua atividade fotossensibilizadora no tratamento *in vivo* desta doença por terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *Photodynamic Therapy*), através da irradiação com luz visível ou irradiação com baixas doses de radiação X. Os resultados obtidos são promissores e a utilização clínica da AO para PDT neste tipo de tumores é já uma realidade[60,61]. Este comportamento favorável dos derivados de AO em terapia fotodinâmica leva-nos ainda a considerar que a obtenção dos congêneres radioiodados poderá potenciar novas aproximações terapêuticas do cancro (PDT + imagiologia PET ou SPECT + Terapêutica Auger). No entanto, esta vertente encontra-se fora do âmbito do trabalho que é descrito nesta tese.

### 1.5 Objetivo do Trabalho

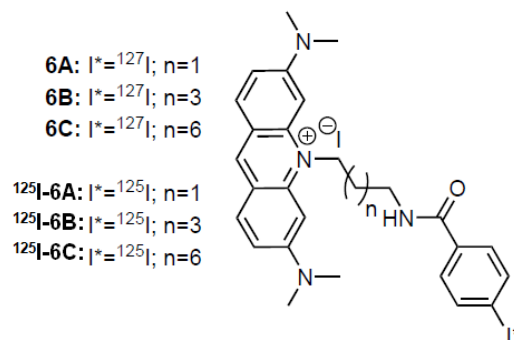
Nos últimos anos, tem sido feito um grande esforço para explorar as propriedades ionizantes dos emissores de elétrons Auger para terapia com radionuclídeos seletiva e dirigida. Entre os radionuclídeos emissores de elétrons Auger, o  $^{125}\text{I}$  apresenta particular interesse pois emite cerca de 20 elétrons por decaimento, em oposição aos 14 e 4 elétrons por decaimento emitidos pelo  $^{111}\text{In}$  e pelo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , respetivamente. Uma vez que os elétrons Auger apenas percorrem curtas distâncias nos tecidos, o radionuclídeo tem que ser transportado para o núcleo da célula, de forma a causar danos no ADN.

Partindo das conhecidas propriedades de intercalação da AO e dos seus derivados com o ADN, o objetivo principal do trabalho foi sintetizar derivados da AO úteis para desenvolver compostos marcados com  $^{125}\text{I}$  com potencial para radioterapia dirigida ao ADN.

O projeto compreendeu as seguintes etapas:

**a. Síntese e caracterização dos compostos**

Propusemo-nos sintetizar três compostos derivados da AO contendo uma cadeia alquílica de tamanho variável entre a estrutura da AO e o isótopo emissor de elétrons Auger. Para avaliar o efeito da distância do radionuclídeo à cadeia de ADN nos danos causados, foram exploradas cadeias metilénicas com 3, 5 e 8 átomos de carbono.



**Figura 1.12:** Compostos finais sintetizados e avaliados neste trabalho.

**b. Estudos de interação dos compostos com o ADN**

Estes estudos envolveram a avaliação da interação com ADN de timo de vitelo (CT-ADN) dos compostos não radioativos, usando diferentes técnicas espectroscópicas: UV/Visível (UV-Vis), fluorescência e dicroísmo circular (CD). Estes estudos pretenderam confirmar se os novos derivados de AO interagem com o ADN preferencialmente por intercalação e verificar se os diferentes espaçadores influenciavam o modo de interação e afinidade para o ADN.

Estudou-se ainda os danos induzidos na cadeia de ADN plasmídico pelos compostos marcados com  $^{125}\text{I}$ , investigando a importância do efeito direto e indireto dos elétrons Auger nos danos causados, através de técnicas de eletroforese em gel de agarose e análise densitométrica.

**c. Estudos celulares:**

Estes estudos tiveram como objetivo verificar se os derivados de AO marcados com  $^{125}\text{I}$  eram captados pelas células tumorais e se apresentavam capacidade de induzir efeitos citotóxicos. Envolveram por isso a determinação da captação e internalização celular dos compostos radioiodados em diferentes linhas celulares tumorais. A sua radiocitotoxicidade foi avaliada de forma preliminar, usando ensaios de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e  $\gamma$ -H2AX (fosforilação da histona H2AX).

**2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS  
DERIVADOS IODADOS DO ALARANJADO  
DE ACRIDINA**

---

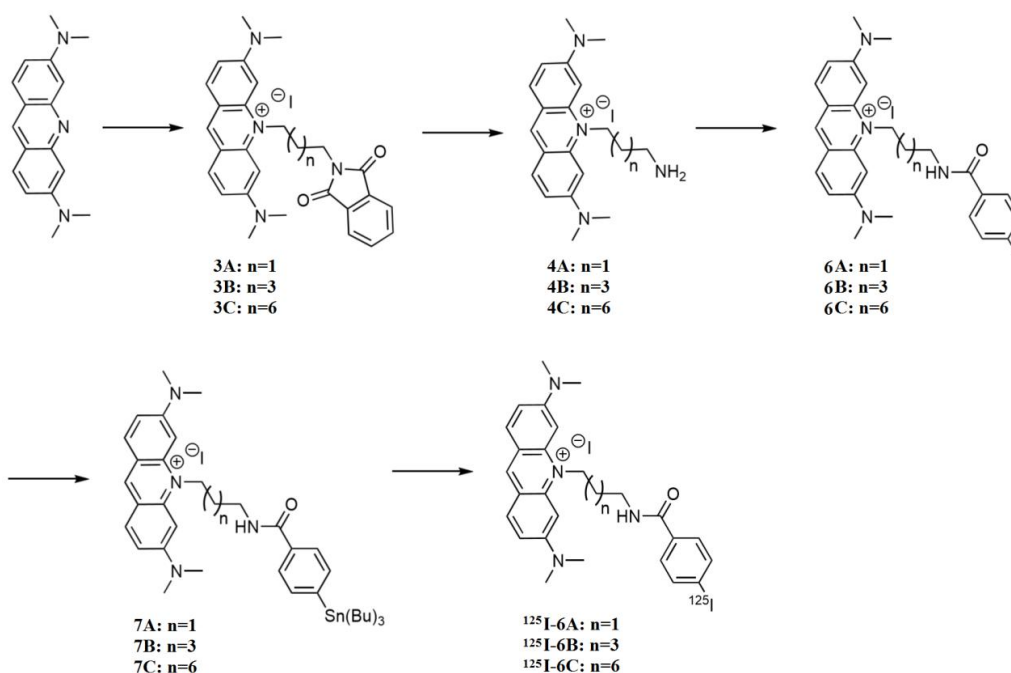


## 2. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS IODADOS DO ALARANJADO DE ACRIDINA

### 2.1 Considerações Gerais

Neste capítulo, é descrita a síntese e a caracterização dos diferentes derivados da AO que foram estudados neste trabalho, incluindo os compostos finais radioiodados e os congêneres não radioativos.

Sendo um objetivo deste trabalho a avaliação do efeito da distância entre o átomo emissor de elétrons Auger e o intercalador do ADN, foram sintetizados três derivados da AO, com uma cadeia alifática de três, cinco e oito átomos de carbono entre o átomo de  $^{125}\text{I}$  e a AO. A **Figura 2.1** ilustra de forma genérica os vários passos de síntese envolvidos na obtenção dos compostos pretendidos.

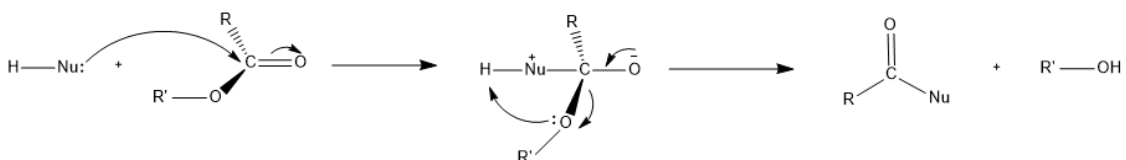


**Figura 2.1:** Estratégia geral da síntese dos derivados iodados da AO.

Em síntese orgânica é muitas vezes importante a proteção de grupos amina, de forma que a sua nucleofilia característica não comprometa o rendimento da reação. Uma das abordagens possíveis consiste na sua substituição por um grupo ftalimida contrariando o seu caráter nucleofílico. Assim, foram inicialmente sintetizados derivados iodo-*n*-alquilftalimida contendo espaçadores alquílicos de diferentes tamanhos (3, 5 e 8 átomos de carbono), os quais foram utilizados nas reações de N-alquilação da AO, para obtermos os compostos **3A**, **3B** e **3C** (**Figura 2.1**).

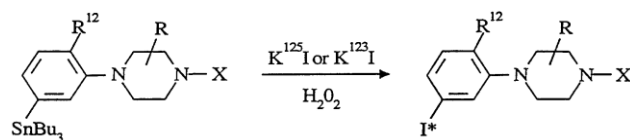
Para conversão dos grupos ftalimida a funções amina podem utilizar-se reações com hidrazina, ou reagentes redutores nucleófilos como o  $\text{LiAlH}_4$  (Hidreto de alumínio e lítio) ou o  $\text{NaBH}_4$  (Boro-hidreto de sódio)[62-64]. Foi inicialmente adotada como abordagem de desproteção do grupo ftalimida do composto **3A** a redução com boro-hidreto de sódio. Este reagente de transferência de hidreto atuaria diretamente no átomo de carbono do grupo carbonilo, conduzindo à abertura do anel da ftalimida e à consequente libertação da amina primária. Dado o baixo rendimento obtido por esta abordagem, optou-se por levar a cabo as reações de desproteção da ftalimida com hidrazina monoidratada, que conduziu à formação dos compostos **4A**, **4B** e **4C**, como descrito com detalhe a seguir.

Como se explica mais à frente, para a síntese dos derivados iodobenzamida da AO, **6A**, **6B** e **6C**, utilizámos o éster ativado 4-iodobenzoato de tetrafluorofenilo que reagiu com os precursores **4A**, **4B** e **4C**. A utilização de ésteres ativados em reações de formação de amida é uma estratégia muito comum uma vez que o carbono de grupos carboxílicos é pouco eletrofílico, apresentando baixa reatividade face ao ataque de aminas. Além disso, o ião carboxilato é estabilizado por ressonância sendo por isso dificilmente atacado por nucleófilos[64]. Ao promover a esterificação de um ácido carboxílico, sobretudo quando se utiliza um álcool com  $\text{R}'$  muito eletronegativo (**Figura 2.2**), o carbono carboxílico torna-se muito eletrofílico, permitindo assim o ataque nucleofílico por grupos amina, para a formação de amidas.



**Figura 2.2:** Mecanismo envolvido no ataque de um nucleófilo a um átomo de carbono carboxílico.

Finalmente, foram sintetizados os derivados estanano **7A**, **7B** e **7C**, com vista à radioiodação por substituição eletrofílica com  $^{125}\text{I}$  e formação dos compostos finais radioiodados  $^{125}\text{I}$ -**6A**,  $^{125}\text{I}$ -**6B** e  $^{125}\text{I}$ -**6C**. Na literatura encontram-se descritas várias metodologias para radiohalogenação, envolvendo reações de substituição eletrofílica ou nucleofílica. Um dos métodos mais comuns utilizados para radioiodação em anéis aromáticos, consiste na substituição eletrofílica de grupos estanano pelo radioisótopo de iodo. A reação é feita sob condições que permitam a oxidação do iodeto radioativo de partida ( $\text{I}^{*-}$ ) e subsequente incorporação do átomo de iodo no anel aromático (**Figura 2.3**). Este tipo de reações são geralmente efetuadas num período de tempo razoável e com bons rendimentos, sendo vantajosa quando comparada com reações de substituição nucleofílica aromática que, além de mais lentas, envolvem geralmente temperaturas elevadas[39,53,65].



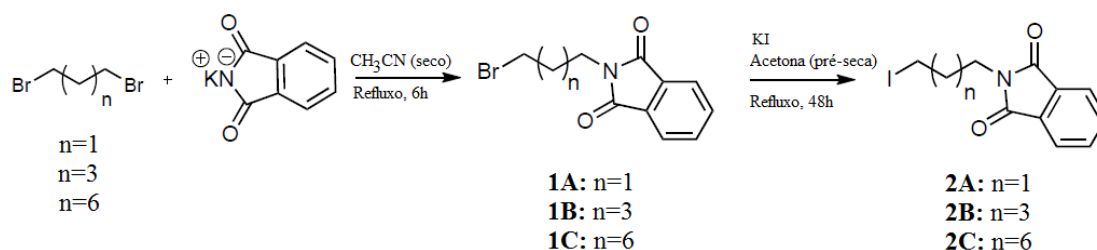
**Figura 2.3:** Exemplo da reação de substituição eletrofílica de grupos estano para obtenção de compostos radioiodados[66].

A síntese e caracterização dos vários compostos sintetizados, incluindo os compostos radioiodados, são descritas e discutidas de forma mais detalhada nos subcapítulos seguintes.

## 2.2 Síntese e Caracterização dos Compostos Iodados Não Radioativos

### 2.2.1 Síntese dos Compostos Bromo-ftalimida (1A, 1B e 1C) e Iodo-ftalimida (2A, 2B e 2C)[67-69]

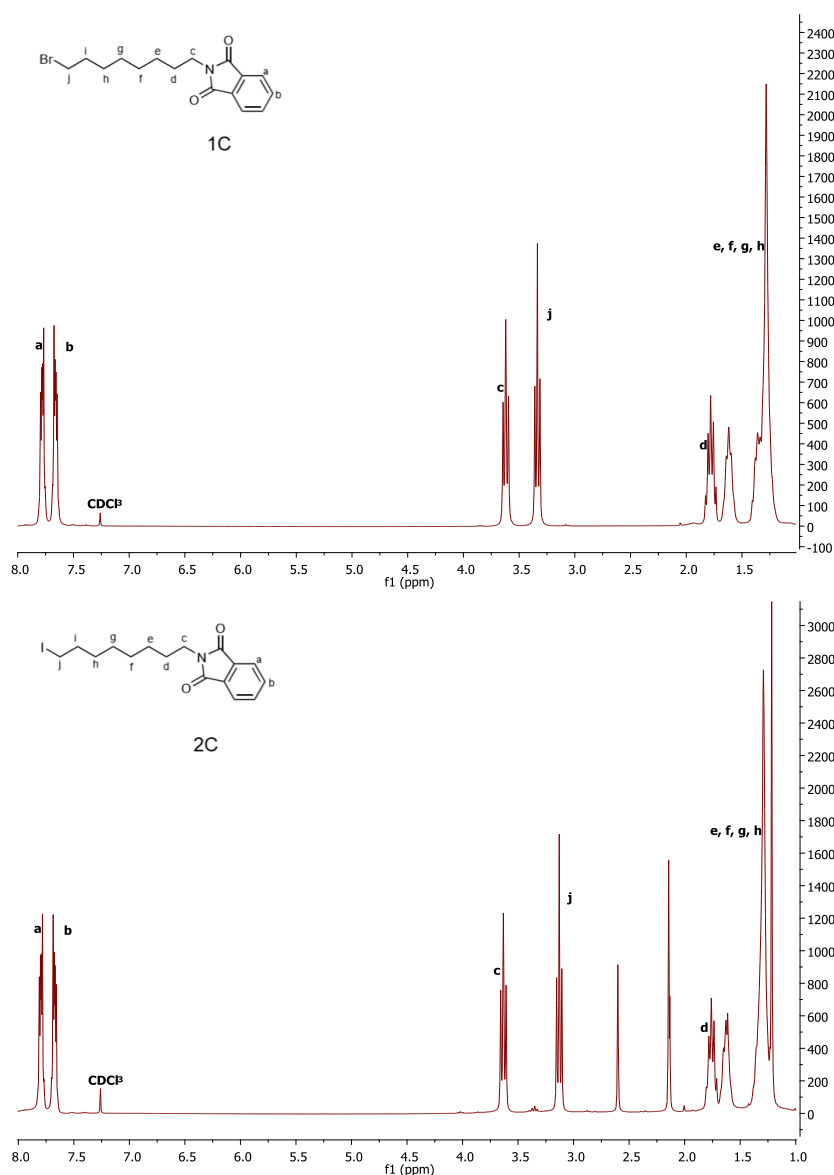
O trabalho foi iniciado com a síntese dos derivados do tipo bromo-*n*-alquilftalimida (compostos **1A-C**), como indicado na **Figura 2.4**. Para a síntese destes compostos, a ftalimida de potássio reagiu em CH<sub>3</sub>CN seco com excesso do dibromo-*n*-alcano adequado (3 eq.), em refluxo e sob atmosfera de azoto durante 24 horas. A mistura reacional foi filtrada, lavada com MeOH frio e concentrada. Fez-se extração com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O e concentrou-se a fase orgânica. Uma vez que pode ocorrer *N*-alquilação da ftalimida através de ambos os átomos de carbono terminais da estrutura do dibromo-*n*-alcano, fez-se purificação por coluna de sílica gel (eluente: AcOEt:EP, 1:8), de modo a isolar o produto pretendido. Os compostos **1A-C** foram obtidos na forma pura, sob a forma de óleos amarelos escuro, com rendimentos de 69%, 19% e 68%, respetivamente. Como descrito na literatura, o mecanismo reacional envolve o ataque nucleofílico do par não-ligante do átomo de azoto ao carbono alquílico terminal do dibromo-*n*-alcano. O KBr é insolúvel no solvente orgânico, precipitando[67-69].



**Figura 2.4:** Síntese dos compostos Bromo-ftalimida (**1A-C**) e Iodo-ftalimida (**2A-C**).

Para a síntese dos derivados iodo-*n*-alquilftalimida (**2A-C**), cada um dos três compostos de bromo-*n*-alquilftalimida (**1A-C**) reagiu com 1,7 eq. de KI, em acetona pré-seca, em refluxo e sob atmosfera de azoto durante 48 horas (**Figura 2.4**). A mistura reacional foi filtrada, lavada com acetona e concentrada. Foram obtidos produtos puros, sob a forma de um sólido amarelo no caso do composto **2A** e um óleo amarelo escuro no caso dos compostos **2B** e **2C**, com rendimentos de 94%, 99% e 82%, respectivamente.

Os compostos **1A-C** e **2A-C** foram caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$ . A título de exemplo, apresentam-se os espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos **1C** e **2C** na **Figura 2.5**.



**Figura 2.5:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$  do composto **1C** (em cima) e do composto **2C** (em baixo).

A substituição do átomo de bromo pelo átomo de iodo ligado ao carbono terminal da cadeia alquílica promove maior blindagem dos prótons ligados a este carbono, traduzindo-se num



desvio do sinal desses prótons para campo mais alto nos compostos iodados (**2A-C**), em comparação com os compostos análogos bromados (**1A-C**).

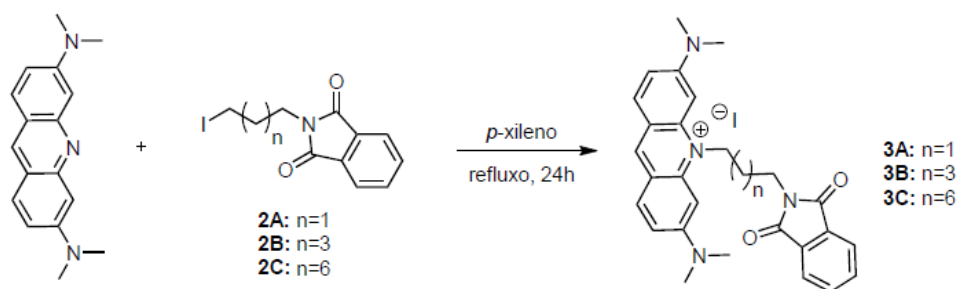
Concretamente, nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos compostos bromados (**1A-C**), os tripletos correspondentes aos prótons alifáticos ligados ao carbono que se encontra diretamente ligado ao átomo de bromo (**e**, **g** e **j**, respetivamente) observam-se a 3.40, 3.35 e 3.34 ppm, respetivamente. Após a substituição do átomo de bromo pelo átomo de iodo (compostos **2A-C**), o desvio químico desses prótons (**e**, **g** e **j**, respetivamente) vai para campo mais alto, a 3.17, 3.18 e 3.13 ppm, respetivamente.

Em relação às ressonâncias observadas na região aromática, identifica-se um multiplete que corresponde aos prótons **a** e **b** (sistema AB) da ftalimida. O desvio químico destes prótons, tal como esperado, não sofre diferenças significativas com o aumento da cadeia alquílica, ou com a substituição do halogénio.

## 2.2.2 Síntese dos Derivados Amina[67-69]

### 2.2.2.1 Síntese dos derivados ftalimida da AO (**3A**, **3B** e **3C**)

Para a síntese dos compostos **3A-C**, fez-se reagir os compostos iodo-*n*-alquilftalimida (**2A-C**) com a AO (**Figura 2.6**). O átomo de carbono da *n*-alquilftalimida ligado ao halogénio sofre o ataque nucleofílico pelo par não-ligante do átomo de azoto da AO. Sendo o átomo de iodo um bom grupo de saída, a AO é *N*-alquilada pelo composto iodo-*n*-alquilftalimida (compostos **2A-C**). A reação ocorreu em *p*-xileno, durante 24 horas, em refluxo e sob atmosfera de azoto.



**Figura 2.6:** Síntese dos compostos **3A-C**.

A mistura reacional foi arrefecida até à temperatura ambiente e filtrada. Cada um dos compostos **3A-C** foi obtido sob a forma de um sólido vermelho escuro, com rendimentos acima dos 95% para os dois primeiros e de 50% para o composto **3C**.

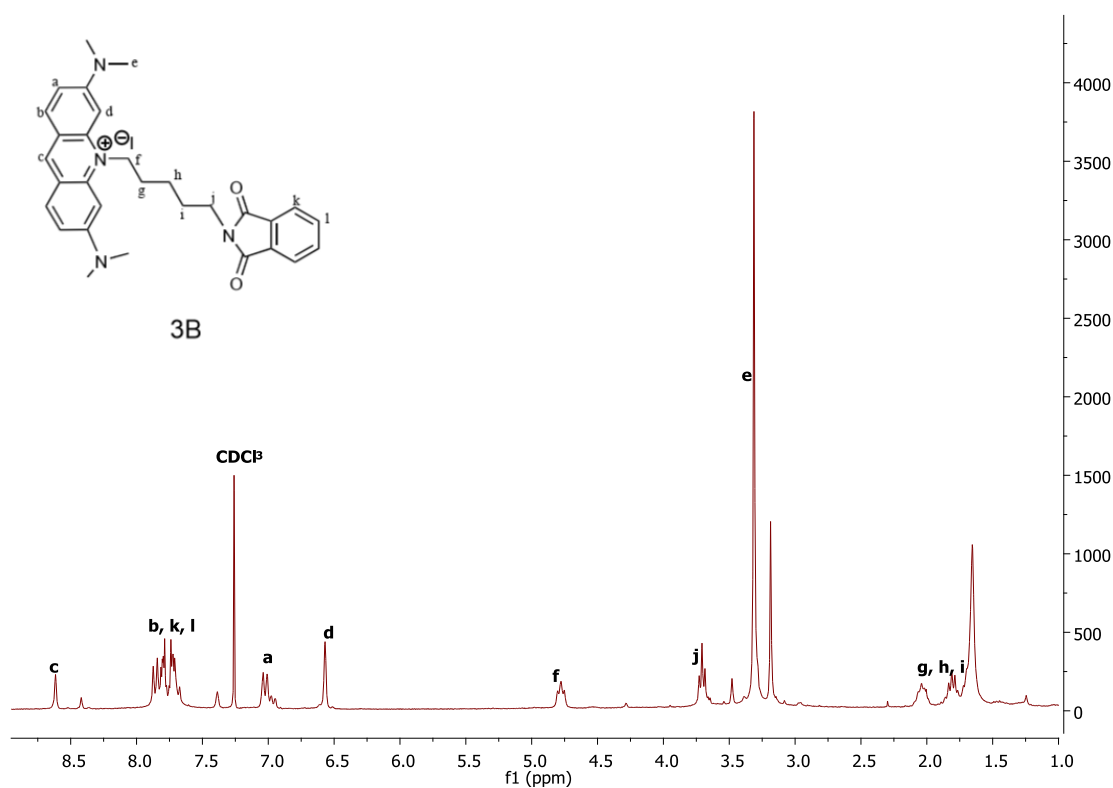
Os compostos foram caracterizados por RMN de  $^1\text{H}$ .

Os tripletos correspondentes aos prótons alifáticos do átomo de carbono ligado ao átomo de azoto da AO foram identificados a 4.88, 4.78 e 4.77 ppm, nos espectros dos compostos **3A-C**, respetivamente.

Os tripletos correspondentes aos prótons alifáticos do átomo de carbono ligado ao átomo de azoto da ftalimida foram identificados a 4.13, 3.71 e 3.64 ppm, nos espectros do composto **3A-C**, respetivamente.

Em relação às ressonâncias observadas na região aromática, não se encontrou diferenças significativas no desvio químico dos prótons dos compostos de partida e dos respetivos produtos da reação. A atribuição das ressonâncias correspondentes a estes prótons foi feita por comparação com dados publicados na literatura[67-69]: i) Os singletos correspondentes aos prótons d da AO foram identificados entre 6.53 e 6.57 ppm; ii) os dupletos correspondentes às ressonâncias dos prótons a foram observadas entre 7.00 e 7.03 ppm; iii) Os dupletos correspondentes aos prótons b foram observados entre 7.87 e 7.92 ppm; iv) Os dupletos correspondentes aos prótons aromáticos do grupo ftalimida foram identificados entre 7.66 e 7.83 ppm.

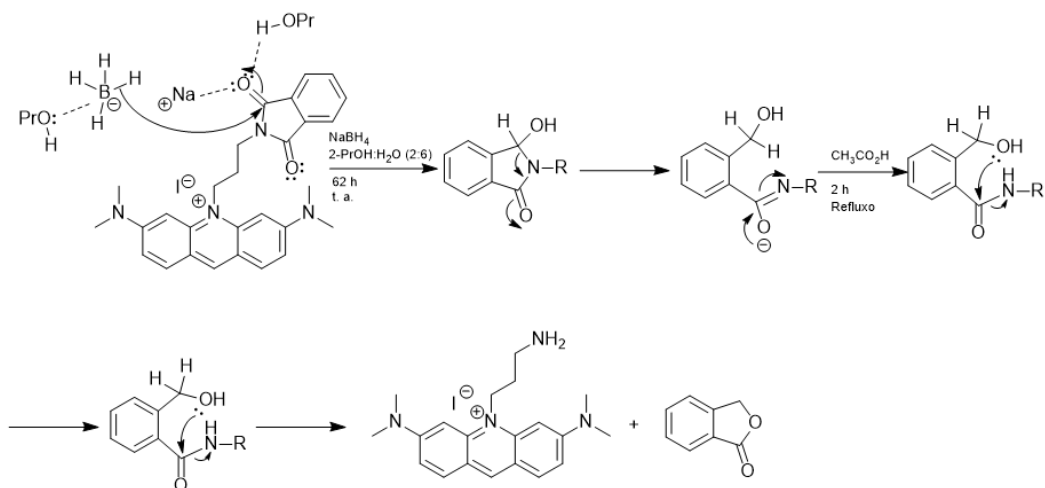
A título de exemplo, apresenta-se na **Figura 2.7** o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **3B**.



**Figura 2.7:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$  do composto **3B**.

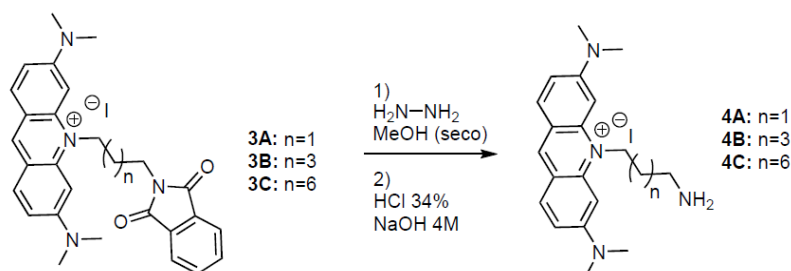
### 2.2.2.2 Desproteção da ftalimida e síntese dos derivados amina (4A, 4B e 4C)

Como atrás referido, numa primeira abordagem para a reação de desproteção da ftalimida **3A**, usou-se 5 eq. de  $\text{NaBH}_4$  e uma mistura propanol: $\text{H}_2\text{O}$ , 6:1 como solvente. O boro-hidreto de sódio atua como reagente de transferência de hidreto, diretamente no átomo de carbono do grupo carbonilo, promovendo a formação do grupo carboxilo. A adição de 18 eq. de ácido acético permite a ciclização do isobenzofurano e conseqüentemente, a formação da amina primária  $\text{R-NH}_2$ , como proposto no mecanismo apresentado na **Figura 2.8**.



**Figura 2.8:** Mecanismo reacional envolvido na síntese do composto **3A**, via desproteção com  $\text{NaBH}_4$ .

O *workup* fez-se por extração com  $\text{CHCl}_3:\text{H}_2\text{O}$ . O pH ácido garante a protonação da amina primária e a sua extração na fase aquosa. Seguidamente, basificou-se a fase aquosa com  $\text{NaOH}$  4 M, até pH ~14, de forma a promover a desprotonação do sal de amónio e fez-se segunda extração com  $\text{CHCl}_3$ . Obteve-se como produto final um sólido vermelho, com rendimento de 19,6%. Dado o baixo rendimento obtido por esta abordagem, optou-se por levar a cabo as reações de desproteção dos grupos ftalimida com hidrazina monoidratada (**Figura 2.9**).



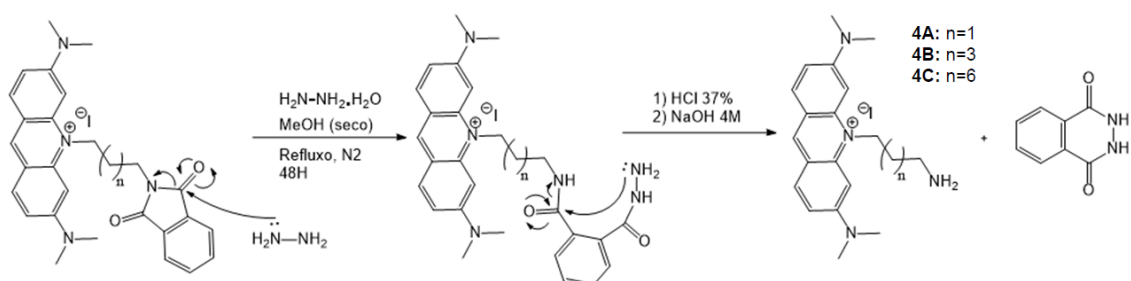
**Figura 2.9:** Síntese dos compostos **4A-C**.

A reação de desproteção da ftalimida dos compostos **3A-C** com hidrazina decorreu em refluxo, sob atmosfera de azoto, durante 120 horas, em  $\text{MeOH}$  seco. O par não ligante do átomo de azoto da hidrazina ataca o carbono do grupo carbonilo da ftalimida, levando à abertura do anel de

cinco membros, onde a hidrazina fica acoplada. A adição de HCl promove o ataque do par não ligante do segundo átomo de azoto da hidrazina ao segundo carbonilo da ftalimida, levando à ciclização e precipitação da ftalazina. Este processo promove a libertação da amina primária (**Figura 2.10**).

Terminada a reação, filtrou-se a mistura reacional, removendo a ftalazina formada. Após filtração, teve que se basificar a solução até pH ~14, para promover a desprotonação da amina, que se extraiu com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. O composto, depois de seco, foi retomado num pequeno volume de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, ao qual se adicionou éter dietílico. O tubo foi mantido a -4 °C durante 48 horas e depois centrifugado para separar um precipitado vermelho. Foi recuperado o sólido vermelho com 42%, 37% e 55% de rendimento (compostos **4A-C**, respetivamente).

Uma abordagem mecanística desta reação é apresentada na **Figura 2.10**.



**Figura 2.10** Mecanismo reacional para a síntese dos compostos **3A-C**, na abordagem com Hidrazina.

Todos os compostos foram caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H. Os compostos **4B** e **4C** foram ainda caracterizados por RMN de <sup>13</sup>C e ESI-MS. O composto **4A** havia sido descrito previamente pelo Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas. A sua caracterização por RMN de <sup>1</sup>H levou à obtenção de dados espectroscópicos concordantes com os descritos na literatura[67-69].

Nos espectros de ESI-MS dos compostos **4B** e **4C**, observámos um pico que correspondia ao ião molecular  $[\text{M}]^+$ , apresentando um desdobramento correspondente ao teoricamente esperado, de acordo com a distribuição isotópica dos compostos, como se indica na **Tabela 2.1**.

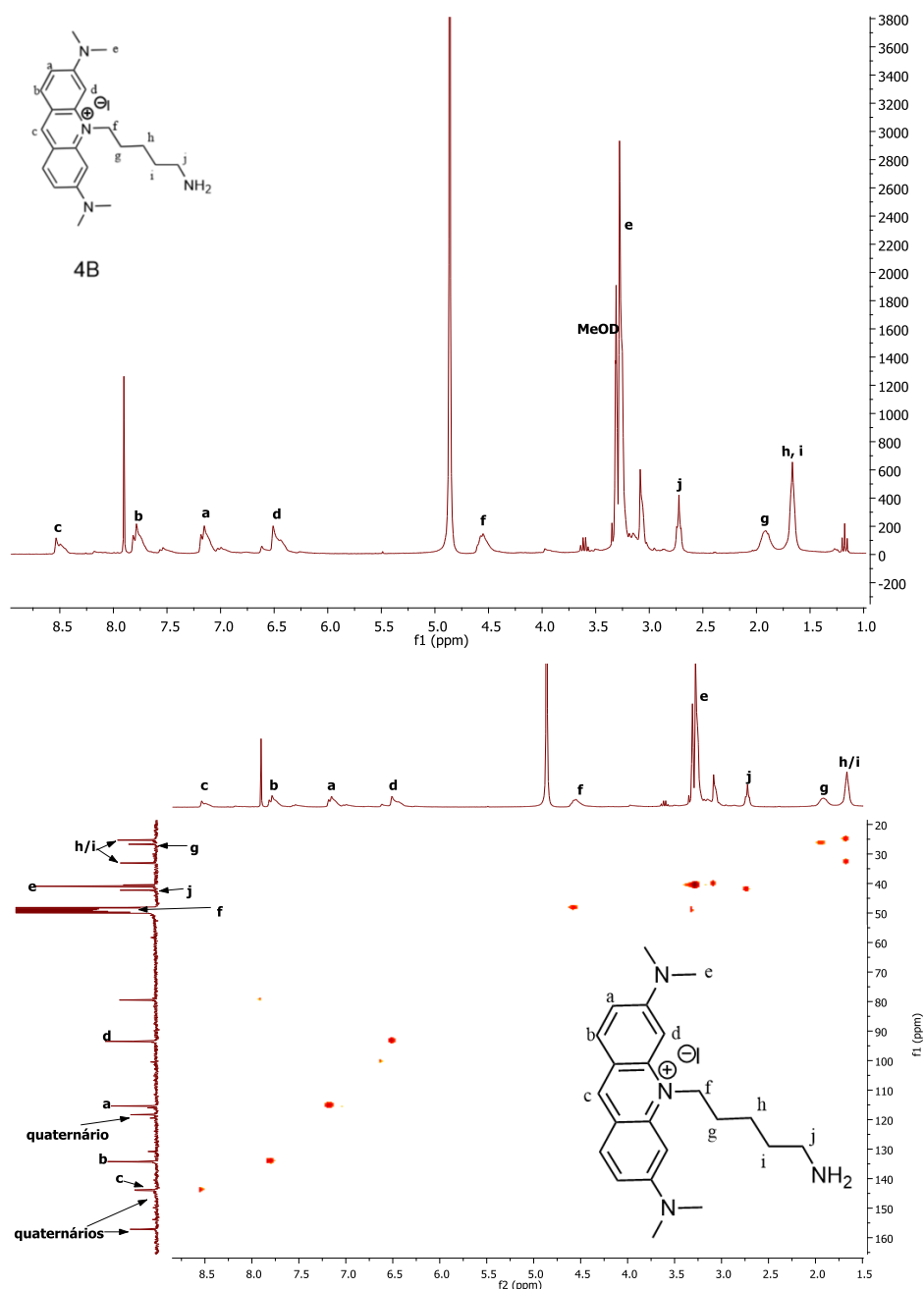
**Tabela 2.1:** Valores de m/z obtidos para o pico predominante presente nos espectros ESI-MS (modo positivo) dos compostos **4B** e **4C** (comparação com os valores esperados para os respetivos iões-moleculares).

	Composto <b>4B</b>	Composto <b>4C</b>
m/z observado	351.8	393.5
Valor teórico	351.3	393.3

Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos **4B** e **4C** observam-se quatro ressonâncias na região aromática, apenas correspondentes aos prótons da AO, comprovando a desproteção do grupo ftalimida. Observam-se ainda cinco e sete ressonâncias na região alifática, respetivamente.

Em relação aos dupletos observados na região alifática, os prótons  $\underline{f}$  são aqueles que apresentam um desvio químico mais elevado, a 4.55 e 4.54 ppm, nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos compostos **4B** e **4C**, respetivamente, como exemplificado para **4B** na **figura 2.11**. Estes prótons alifáticos são os mais desblindados, devido ao efeito eletroatrator do anel heteroaromático adjacente.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos compostos **4B** e **4C** apresentam as ressonâncias esperadas, nomeadamente sete ressonâncias na região aromática, devidas ao grupo AO (**Figura 2.11**).

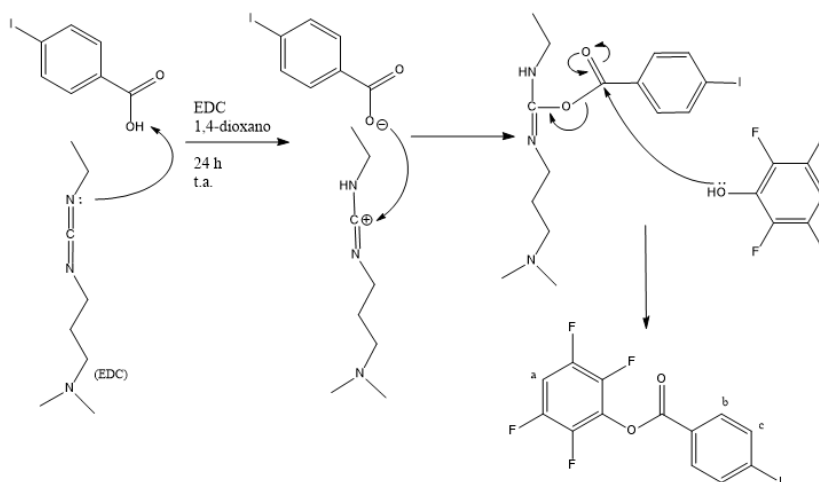


**Figura 2.11:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (em cima) e  $[^1\text{H},^{13}\text{C}]$  HSCQ (em baixo), em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , do composto **4B**.

## 2.2.3 Síntese dos Derivados Iodobenzamida (não radioativos)

### 2.2.3.1 Síntese do éster 4-iodobenzoato de tetrafluorofenilo (5)

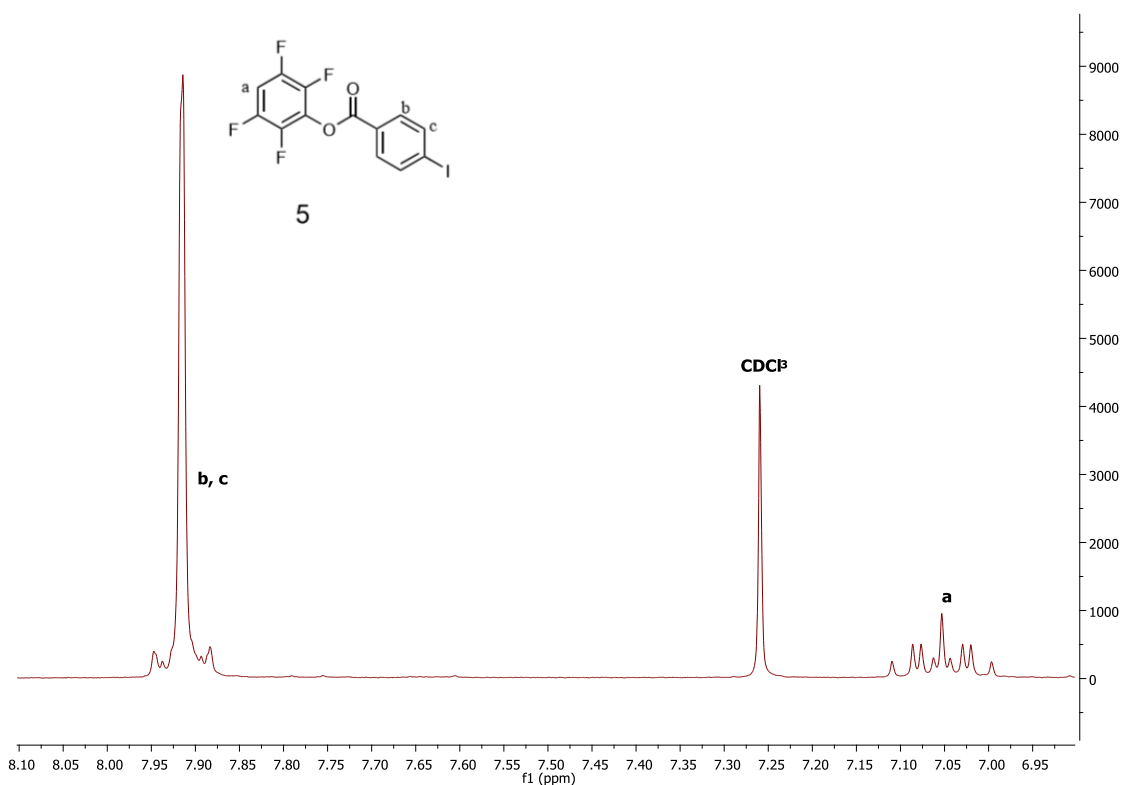
Para a síntese dos compostos iodados finais, os derivados iodobenzamida da AO, utilizámos o éster 4-iodobenzoato de tetrafluorofenilo. A síntese deste éster ativado foi efetuada como descrito na literatura, por reação do ácido 4-iodobenzóico com EDC em 1,4-dioxano, à temperatura ambiente (**Figura 2.12**)[67-70]. O par não ligante do átomo de azoto ligado ao grupo etilo da EDC é protonado pelo átomo de hidrogénio do grupo OH do ácido carboxílico, levando à formação de dois intermediários iónicos. O par não-ligante do oxigénio fenólico é responsável pela reação com o carbocátion da EDC, permitindo o acoplamento do tetrafluorofenol. A reação ocorreu durante 24h, conduzindo à síntese do éster 4-iodobenzoato de tetrafluorofenilo (**5**). Optámos por utilizar EDC como reagente de desidratação, uma vez que a ureia resultante da reação com esta carbodiimida é solúvel em água, sendo facilmente removida por extração líquido-líquido[71-74].



**Figura 2.12:** Mecanismo da reação envolvido na síntese do éster 4-iodobenzoato de tetrafluorofenilo (**5**).

A recuperação do composto **5** da mistura reacional fez-se por extração com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$ . Secou-se a fase orgânica com  $\text{MgSO}_4$ , filtrou-se e evaporou-se o solvente. Adicionalmente, procedeu-se a uma purificação por coluna de sílica gel (eluente  $\text{AcOEt}:\text{EP}$ , 1:6) e foi obtido o éster ativado **5**, puro, sob a forma de cristais brancos e com rendimento de 92%.

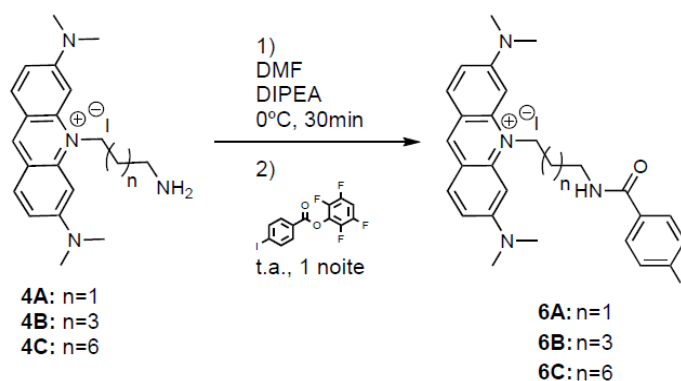
O composto **5** foi caracterizado por RMN de  $^1\text{H}$  (**Figura 2.13**). No seu espectro observam-se duas ressonâncias a 7.92 e a 7.05 ppm, atribuídas respetivamente aos quatro prótons do anel benzóico (**b** e **c**) e ao próton do anel tetrafluorofenilo (**a**), ambos aromáticos. O sinal a 7.05 ppm aparece como multiplete devido ao acoplamento do próton **a** com os núcleos dos átomos de flúor ( $^{19}\text{F}$ ).



**Figura 2.13:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$  do composto **5**.

### 2.2.3.2 Síntese dos precursores amida (**6A**, **6B** e **6C**)

Para a síntese das amidas **6A-C**, fez-se reagir cada um dos derivados amino-acridina **4A-C** com 2 eq. de DIPEA, em DMF, durante 30 minutos e a  $0^\circ\text{C}$  (**Figura 2.14**). Seguidamente fez-se a adição de 1,5 eq. de éster 4-iodobenzoato de tetrafluorofenilo (**5**) que sofre ataque nucleofílico pela amina dos precursores **4A-C**, conduzindo à síntese dos compostos **6A-C**. A reação prolongou-se durante a noite, à temperatura ambiente.



**Figura 2.14:** Síntese dos compostos **6A-C**.

A purificação dos compostos finais foi feita por coluna de alumina (eluentes: MeOH:CHCl<sub>3</sub>, 1:9); foram obtidos os produtos puros, sob a forma de um sólido vermelho, com rendimentos de 72%, 71% e 20% para os compostos **6A-C**, respetivamente.

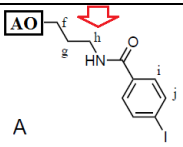
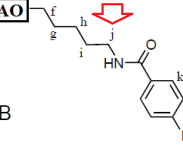
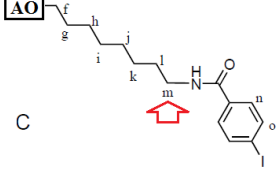
Os compostos **6A-C** foram caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, ESI-MS e análise elementar (C,H,N).

Nos espectros de RMN <sup>1</sup>H dos compostos **6A-C**, observam-se quatro, cinco e sete ressonâncias na região alifática, respetivamente, e seis na região aromática.

Os prótons alifáticos adjacentes à função amida (prótons h do composto **6A**, j do composto **6B** e m do composto **6C**) encontram-se desviados face aos respetivos derivados ftalimida ou correspondentes amina, o que corrobora a formação dos derivados amida (**Tabela 2.2**).

**Tabela 2.2:** Desvio químico (ppm) dos prótons alifáticos adjacentes à função amida para os compostos **6A-C** e prótons correspondentes nos compostos **3A-C** e **4A-C**.

**Desvio químico (ppm) dos derivados:**

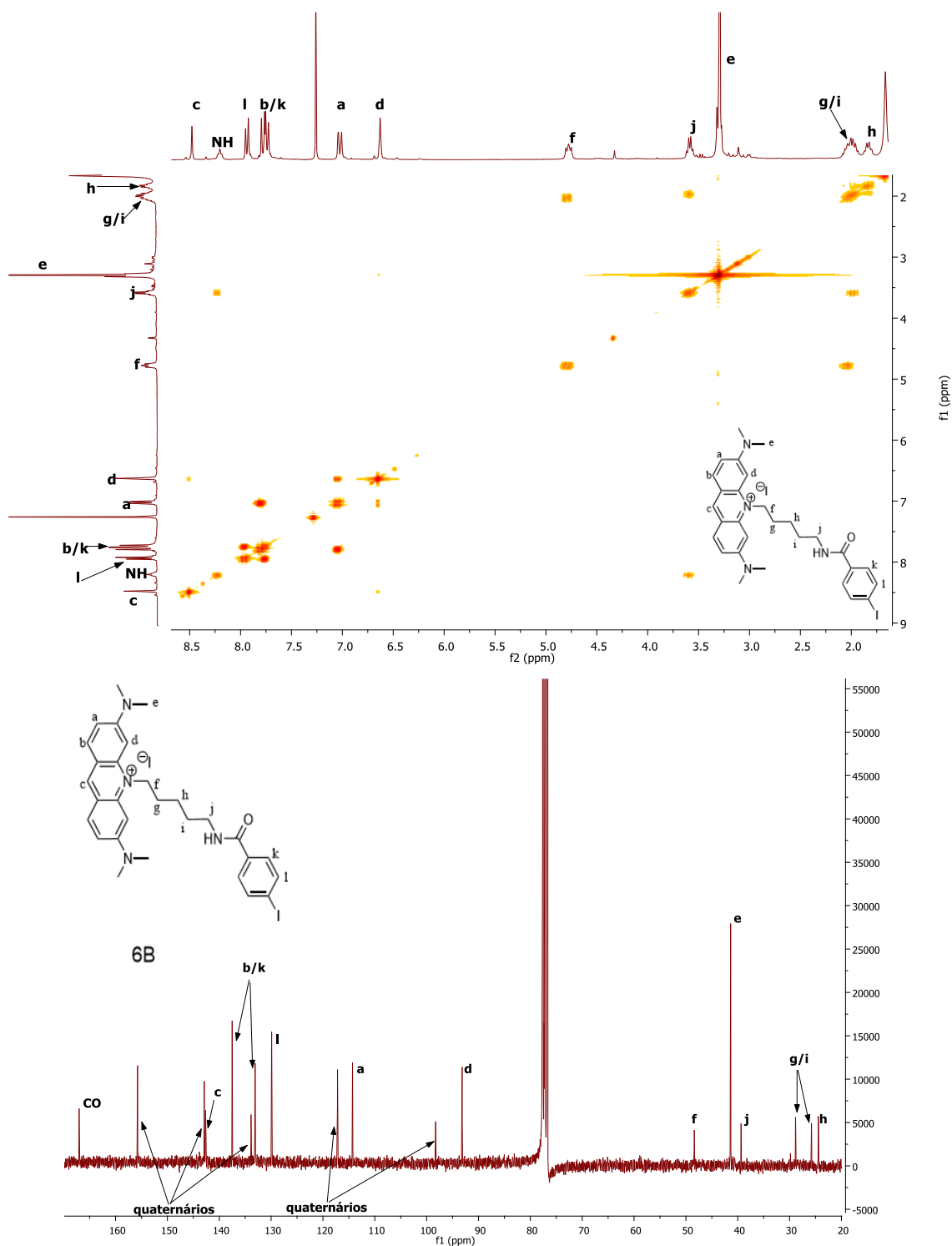
	Derivados ftalimida (compostos <b>3A-C</b> )	Derivados amina (compostos <b>4A-C</b> )	Derivados amida (compostos <b>6A-C</b> )	
<b>Próton <u>h</u></b>	4.13	2.92	<b>3.89</b>	
<b>Próton <u>j</u></b>	3.71	2.72	<b>3.60</b>	
<b>Próton <u>m</u></b>	3.64	2.67	<b>3.38</b>	

Os espectros RMN de <sup>1</sup>H dos compostos **6A-C** também apresentam dois sinais adicionais na zona aromática, em comparação com os espectros RMN de <sup>1</sup>H dos compostos amina correspondentes, comprovando-se por isso a presença do grupo iodobenzoilo.

Nos espectros de RMN <sup>13</sup>C dos compostos **6A-C**, observa-se um sinal que atribuímos ao grupo carbonilo (C=O) a cerca de 167 ppm, resultante da formação dos derivados amida. Verificamos ainda que os sinais dos carbonos alifáticos h, j e m dos compostos **6A-C**, adjacentes à função amida, aparecem a 37.45, 39.35 e 40.05 ppm, respetivamente, com deslocação gradual destes sinais para campo baixo, à medida que o tamanho da cadeia alifática aumenta.



A título de exemplo, apresentam-se na **Figura 2.15** os espectros RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do composto **6B**.



**Figura 2.15:** Espectro de RMN [ $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ ] COSY (em cima) e  $^{13}\text{C}$  (em baixo), em  $\text{CDCl}_3$ , do composto **6B**.

Nos espectros de ESI-MS dos compostos **6A-C** cujos resultados apresentámos na **Tabela 2.3**, observa-se um pico maioritário correspondente ao ião molecular  $[\text{M}]^+$ , com um desdobramento de acordo com o teoricamente esperado.

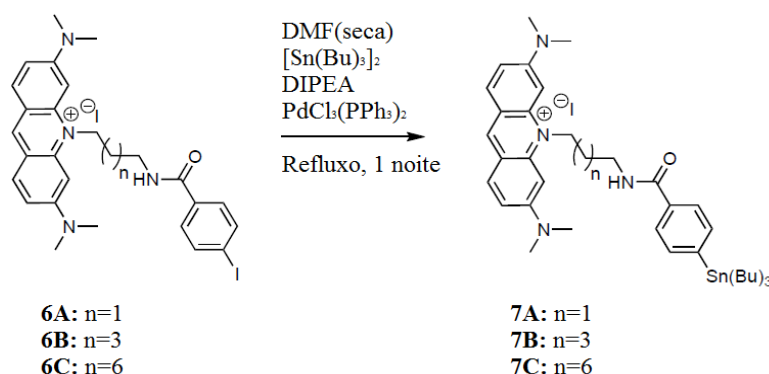
**Tabela 2.3:** Valores de m/z obtidos e valores esperados para os espectros de ESI-MS dos compostos **6A-C**.

	Composto <b>6A</b>	Composto <b>6B</b>	Composto <b>6C</b>
<b>m/z observado</b>	553.2	581.4	623.6
<b>Valor teórico</b>	553.1	581.2	623.2

Os derivados amida sintetizados (**6A-C**) foram utilizados nos estudos espectroscópicos com ADN, descritos no **capítulo 3**. Estes compostos foram ainda utilizados para a síntese e confirmação da identidade química dos congêneres radioativos, descritos no **subcapítulo 2.3**.

#### 2.2.4 Síntese dos Precursores Estanho (**7A, 7B e 7C**)

Procedeu-se à estanhagem dos compostos **6A-C** como indicado na **Figura 2.16**, de modo a sintetizar os precursores estanhados necessários para obter os congêneres radioiodados.



**Figura 2.16:** Síntese dos compostos **7A-C**.

A reação dos compostos **6A-C** com tributilestanho decorreu em DMF seca, na presença de 2,4 eq de DIPEA e 0,1 eq de catalisador de Paládio(II). O composto foi depois purificado por coluna de alumina (eluente: MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9), tendo-se obtido um sólido vermelho com rendimento de 38%, 86% e 53% para a síntese dos compostos estanhados **7A-C**, respetivamente. Estes compostos foram armazenados sob atmosfera de azoto, a 4 °C, ao abrigo da luz, até serem utilizados como precursores nas reações de radioiodação a seguir descritas.

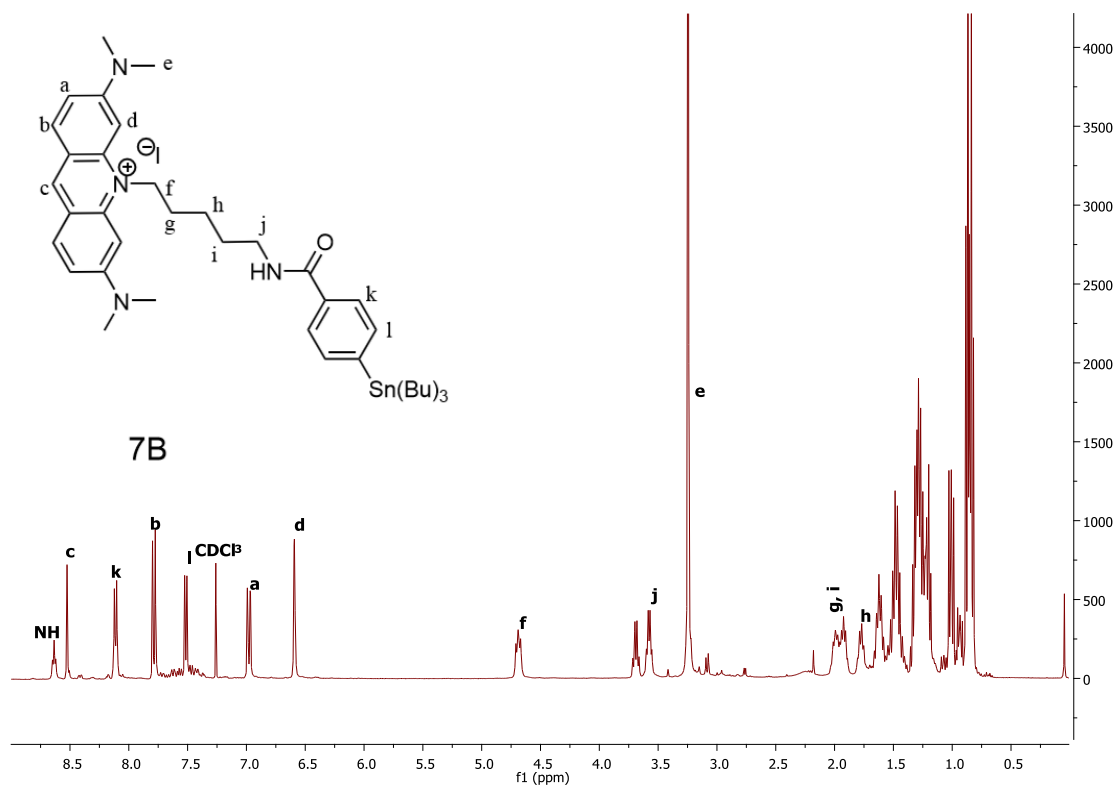
Os produtos das reações de estanhagem (**7A-C**) foram caracterizados por RMN de <sup>1</sup>H. Observam-se diferenças significativas nos valores de desvio químico dos sinais relativos aos prótons aromáticos do anel benzénico do grupo benzamida dos compostos **7A-C**, quando comparados com os desvios químicos dos prótons equivalentes dos compostos **6A-C**, como se

pode constatar pelos valores apresentados na **Tabela 2.4**. Os prótons em posição *orto* em relação ao grupo tributilestanho (j, l e o) apresentam um desvio para campo mais alto, originado pela maior blindagem conferida por este grupo, em relação à conferida pelo átomo de iodo nos compostos **6A-C**. Quando comparados com os prótons homólogos dos compostos **6A-C**, os prótons em posição *meta* em relação ao grupo tributilestanho (i, k e n) dos compostos **7A-C** apresentam um desvio para campo mais baixo.

**Tabela 2.4:** Desvios químicos dos prótons *orto* e *meta*, relativamente ao grupo SnBu<sub>3</sub>, do anel benzênico da função benzamida nos compostos **6A-C** e **7A-C**.

Sinais dos prótons <i>meta</i> (ppm)	7.83 vs 8.26	<b>Composto 6A vs 7A</b>
Sinais dos prótons <i>orto</i> (ppm)	8.15 vs 7.63	
Sinais dos prótons <i>meta</i> (ppm)	7.76 vs 8.12	<b>Composto 6B vs 7B</b>
Sinais dos prótons <i>orto</i> (ppm)	7.95 vs 7.53	
Sinais dos prótons <i>meta</i> (ppm)	7.58 vs 7.84	<b>Composto 6C vs 7C</b>
Sinais dos prótons <i>orto</i> (ppm)	7.78 vs 7.49	

Na **Figura 2.17** apresenta-se ainda o espectro do composto **7B**, a título de exemplo e para comparação com o espectro do composto **6B** da **Figura 2.15**.



**Figura 2.17:** Espectro de RMN <sup>1</sup>H, em CDCl<sub>3</sub>, do composto **7B**.

## 2.3 Síntese e Caracterização dos Compostos Radioiodados

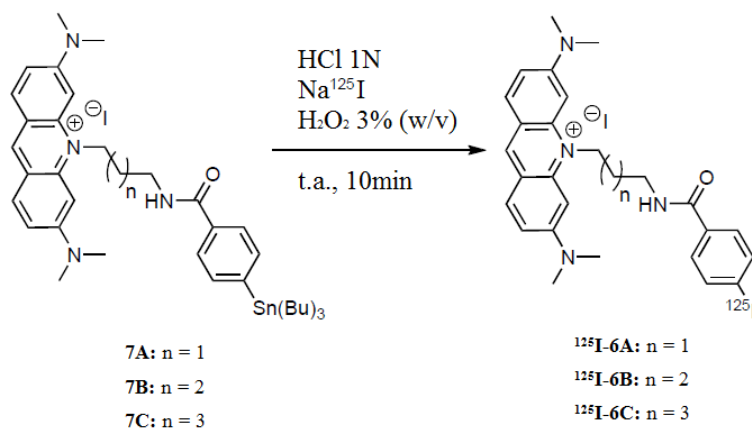
### 2.3.1- Radiosíntese e Purificação

O método de radioiodação a selecionar deve ter em conta a estrutura química da molécula, a posição para a introdução do radioisótopo de iodo, a pureza química e a atividade específica exigidas para o produto final. Estão descritas na literatura várias metodologias para radiohalogenação, envolvendo reações de substituição eletrofílica ou nucleofílica, permuta isotópica ou reações de conjugação[39].

No método de substituição eletrofílica, a reação ocorre sob condições que permitam a oxidação do átomo de  $^{125}\text{I}$  a  $\text{I}^+$ . O átomo de iodo carregado positivamente ( $\text{I}^+$ ) ataca um sistema com elevada densidade eletrónica (como um anel aromático ou uma dupla ligação), formando-se subsequentemente uma ligação covalente carbono-iodo, com perda de um grupo abandonante carregado positivamente. Embora o iodo possa apresentar vários estados de oxidação, a espécie  $\text{I}^+$  é a forma química ativa para que a substituição eletrofílica ocorra. Como o  $^{125}\text{I}$  está disponível comercialmente sob a forma de iodeto de sódio ( $\text{Na}^+\text{I}^-$ ), são utilizados diferentes agentes oxidantes como a cloramina-T, o iodogénio e o peróxido de hidrogénio, para realizar a oxidação de  $\text{I}^-$  a  $\text{I}^+$ . A oxidação do  $^{125}\text{I}$  deve ocorrer já na presença do composto a ser radioiodado e a reação é interrompida por adição de um agente redutor, que tem por função desativar o oxidante e reconverter a espécie ativa  $\text{I}^+$  em  $\text{I}^-$ . As condições reacionais tais como valor de pH, concentração do agente oxidante, razão molar substrato/oxidante e o tempo de reação são geralmente otimizadas para cada reação de radioiodação[39,65,75].

Quando não é possível a permuta isotópica (substituição eletrofílica direta do átomo de  $^{127}\text{I}$  pelo átomo de  $^{125}\text{I}$ ), o radionuclídeo  $^{125}\text{I}$  tem que ser incorporado na molécula um bom grupo abandonante. Assim, um dos métodos mais comuns para a radioiodação de anéis aromáticos, consiste na substituição eletrofílica indireta em que grupos organometálicos, nomeadamente grupos tributilestanho, são substituídos pelo iodo radioativo. Neste caso, a substituição eletrofílica ocorre por desmetalção. Devido às suas características (comprimento, energia de ligação e carácter iónico), as ligações C-M são mais propensas a sofrer um ataque eletrofílico, comparativamente às ligações C-H. Este tipo de reações são geralmente regioseletivas, sendo efetuadas num período de tempo razoável e com bons rendimentos, o que a torna vantajosa quando comparada com reações de substituição nucleofílica aromática que, além de mais lentas, envolvem geralmente o emprego de temperaturas elevadas[1,39,65].

Como indicado na **Figura 2.18**, a incorporação do  $^{125}\text{I}$  nos precursores estanhados **7A-C** foi efetuada via radioiodação eletrofílica, com utilização de peróxido de hidrogénio como agente oxidante, em meio ácido. É de referir que se encontra descrita na literatura a utilização deste método na radioiodação de compostos derivados da acridina, sendo considerada uma abordagem que envolve condições reacionais mais suaves, minimizando o risco de sobre-oxidação de I [39,75].

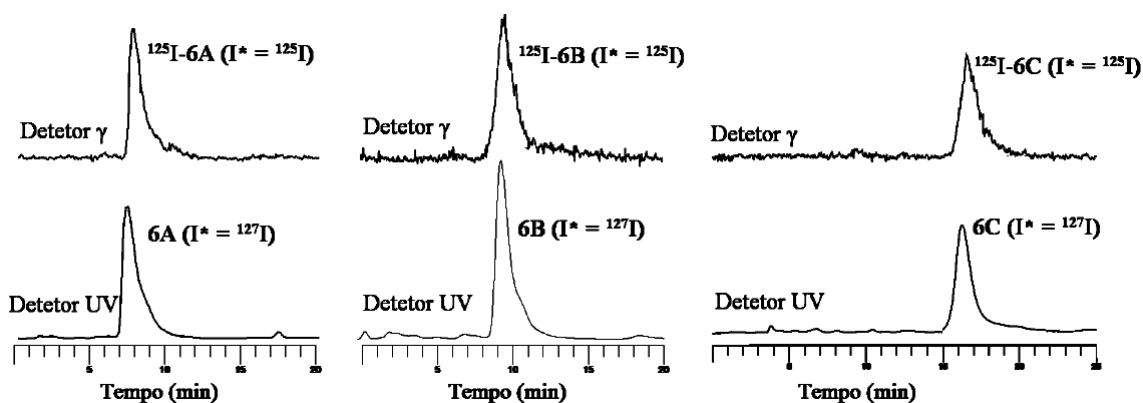


**Figura 2.18:** Síntese dos compostos  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$ .

A oxidação de I pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  em meio ácido (pH~2) torna-o eletrofílico e, por isso, capaz de atacar espécies ricas em eletrões, conduzindo à formação de uma ligação covalente carbono-iodo e expulsando o grupo abandonante metálico. A reação ocorreu à temperatura ambiente durante 10 min, sendo depois interrompida pela adição do agente redutor  $\text{NaHSO}_3$  e de  $\text{NaHCO}_3$  que neutralizou o pH.

Após radioiodação, as misturas reacionais foram extraídas com  $\text{AcOEt}$  ( $5 \times 200 \mu\text{L}$ ) para remoção dos sais e do iodeto radioativo livre. Após evaporação do solvente orgânico sob corrente de azoto, os resíduos sólidos resultantes foram dissolvidos em  $\text{EtOH}$  e purificados por HPLC (subcapítulo 5.1.4). É de referir que os compostos radioiodados obtidos,  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$ , foram identificados pela eluição simultânea de alíquotas destes compostos e dos análogos iodados não radioativos (**6A-C**), simultaneamente com deteção UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) e deteção radiométrica ( $\gamma$ ) (**Figura 2.19**).

Em Química Radiofarmacêutica, assume-se que compostos radioativos e os congéneres não radioativos possuem a mesma estrutura química se apresentarem tempos de retenção (t.r.) idênticos nas mesmas condições cromatográficas de HPLC. Como o  $^{125}\text{I}$  apresenta uma elevada atividade específica (2200Ci/mmol) os respetivos compostos são sintetizados em quantidades mássicas muito baixas. Além disso, o facto de se tratar de um composto radioactivo inviabiliza o seu estudo pelas técnicas usuais de caracterização química.



**Figura 2.19:** Cromatogramas de HPLC dos compostos radioiodados  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$ , eluídos simultaneamente com os análogos não radioativos **6A**, **6B** e **6C**.

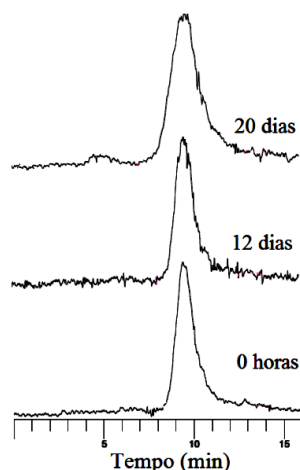
O método de HPLC utilizado permitiu uma boa separação dos compostos radioiodados de todas as outras espécies químicas e radioquímicas, isolando-se assim os compostos  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$ , com rendimentos de 23, 32 e 30%, respetivamente. Todos os compostos foram obtidos com atividade específica elevada<sup>8</sup> e com uma pureza radioquímica superior a 98%, após purificação por HPLC. As frações recolhidas por HPLC foram posteriormente diluídas em água (10 mL) e eluídas com EtOH (5×1 mL), numa *cartridge* de Sep-Pak C18, para neutralizar o valor de pH.

### 2.3.2 Estudos de Estabilidade dos Compostos Radioativos

A estabilidade radioquímica é um dos aspetos mais importantes a considerar na avaliação de compostos radioativos com potencial interesse para aplicações biomédicas. Em particular, os compostos radiohalogenados podem sofrer libertação do halogéneo, contribuindo para a formação de impurezas radioquímicas indesejáveis.

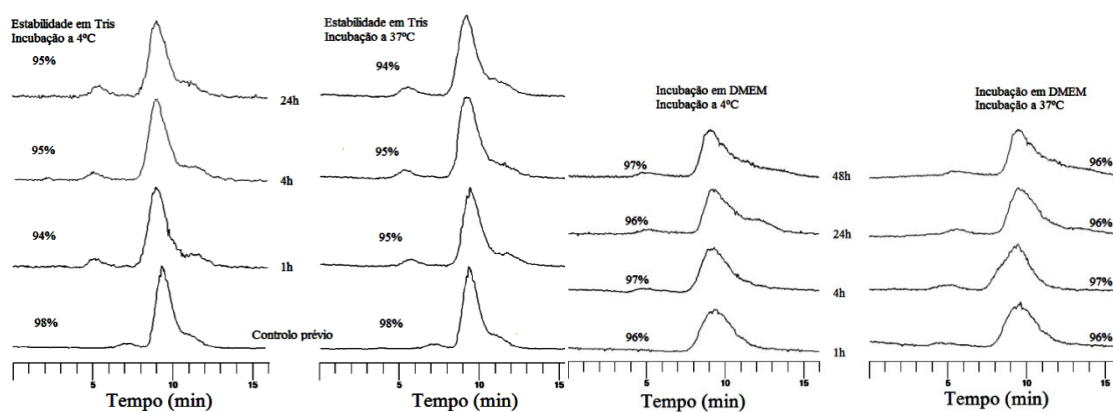
As misturas reacionais dos compostos  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$  em AcOEt mostraram ser estáveis quando armazenadas a 4 °C durante pelo menos 20 dias. Após purificação e quando armazenados em EtOH, estes compostos também mostraram ser estáveis a 4 °C durante pelo menos 20 dias, como se pode observar na **Figura 2.20**, em que se apresentam os cromatogramas do estudo de estabilidade do composto  $^{125}\text{I-6B}$  em EtOH.

<sup>8</sup> Não tendo sido detetado nenhum sinal pelo detetor UV no cromatograma dos compostos radioiodados, após purificação, assumimos que a sua atividade específica estaria na mesma gama da correspondente ao  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , 2200Ci/mmol.



**Figura 2.20:** Estabilidade do composto  $^{125}\text{I-6B}$  em EtOH, aos 0, 12 e 20 dias.

A estabilidade radioquímica dos compostos  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$  foi ainda estudada em solução de Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4), tampão utilizado nos ensaios com o ADN descritos no capítulo seguinte. Este estudo mostrou que os compostos apresentam uma elevada estabilidade neste tampão, a 4 °C e a 37 °C, durante pelo menos 24 horas. Os estudos de estabilidade radioquímica dos compostos  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$  foram ainda efetuados em meio de cultura celular DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) completo, meio utilizado nos estudos de captação e internalização celulares. Estes estudos também mostraram que os compostos tinham uma elevada estabilidade neste meio, a 4 °C e a 37 °C, durante pelo menos 48 horas. A título de exemplo, apresentam-se na **Figura 2.21** os cromatogramas do estudo de estabilidade em Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) e meio de cultura celular DMEM para o composto  $^{125}\text{I-6B}$ .



**Figura 2.21:** Estabilidade do composto  $^{125}\text{I-6B}$  em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) e no meio de cultura celular DMEM.

Os compostos radioiodados sintetizados foram posteriormente utilizados para os ensaios *in vitro* com ADN plasmídico e com células, como se descreve no **capítulo 3**.





### **3. INTERAÇÃO COM O ADN E ESTUDOS COM CÉLULAS**

---



### 3. INTERACÇÃO COM O ADN E ESTUDOS COM CÉLULAS

#### 3.1 Interação dos Compostos Não Radioativos com o ADN

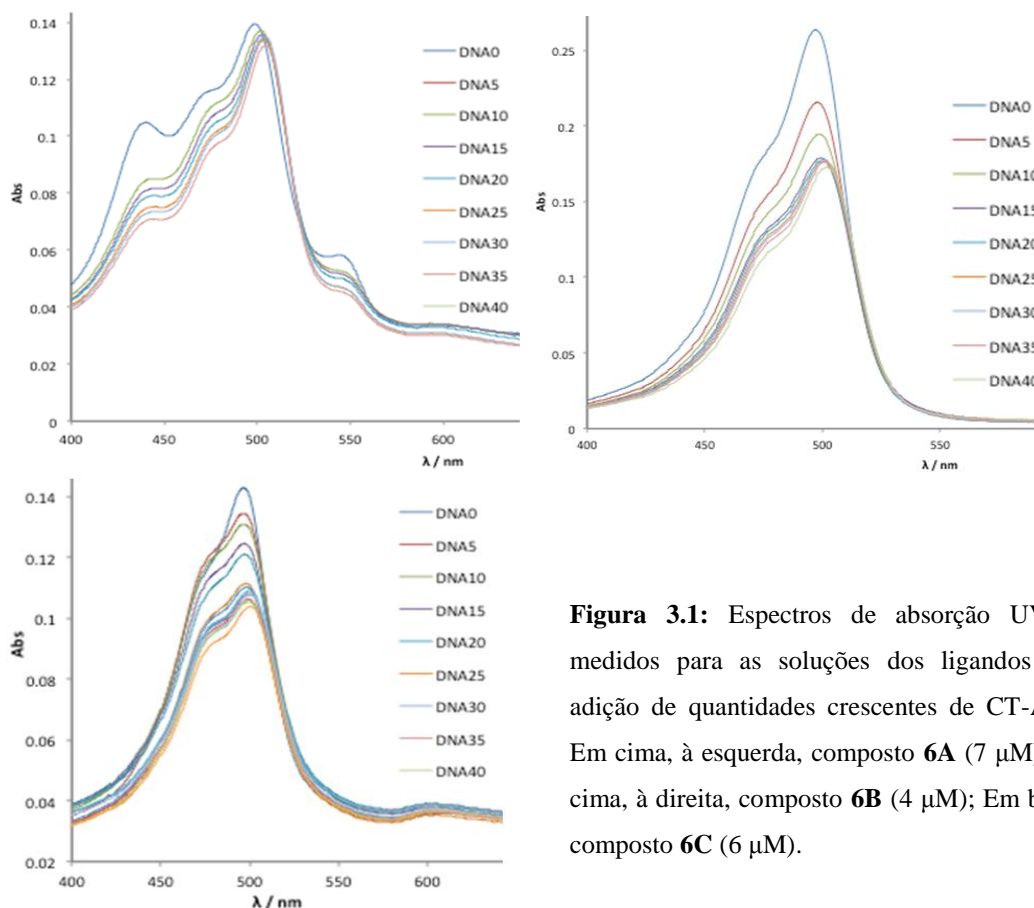
O objetivo principal desta tese consistia na avaliação do potencial terapêutico de derivados de AO contendo o emissor de elétrons Auger  $^{125}\text{I}$  e diferentes espaçadores alifáticos para ligar a unidade de AO e o anel benzênico radiomarcado. Para que estes compostos tivessem utilidade para o fim em vista, era essencial verificar que mantinham a capacidade de interagir com o ADN, preferencialmente através do modo de intercalação, característico da AO. Assim, foram realizados estudos para avaliar a natureza e a intensidade da interação dos diferentes compostos iodados com o ADN[51]. Estes estudos envolveram ensaios espectroscópicos de UV-Visível (UV-Vis), fluorescência e dicroísmo circular (CD), efetuados para os compostos iodados não radioativos **6A-C**.

##### 3.1.1 Espectroscopia de UV-Visível

A espectroscopia de UV-Vis é um método muito utilizado para estudo da formação de complexos entre moléculas pequenas e o ADN. Quando uma molécula pequena interage com o ADN originando complexos do tipo molécula-ADN, são verificadas alterações na absorvância e/ou na posição dos picos do máximo de absorção, sendo estas alterações tanto maiores quanto mais intensa for a interação[49].

Quando os compostos intercalam com o ADN, verifica-se geralmente um desvio batocrômico (*red shift*) e hipocrômico (diminuição da absorvância), quando comparado o espectro de absorção com o do mesmo composto na ausência de ADN[49,50].

A **Figura 3.1** mostra o espectro de absorção eletrônica dos ligandos livres (compostos **6A-C**) e os respetivos espectros obtidos na presença de quantidades crescentes de CT-ADN. Apesar de os dados destes ensaios espectrofotométricos não terem sido utilizados para determinar os parâmetros da ligação composto iodado-ADN, este estudo forneceu uma clara indicação de que os compostos estudados estabelecem uma forte interação com o CT-ADN, visto verificar-se a ocorrência de hipocromismo e *red shift* nas bandas de absorção.



**Figura 3.1:** Espectros de absorção UV-Vis medidos para as soluções dos ligandos com adição de quantidades crescentes de CT-ADN. Em cima, à esquerda, composto **6A** (7  $\mu\text{M}$ ); Em cima, à direita, composto **6B** (4  $\mu\text{M}$ ); Em baixo, composto **6C** (6  $\mu\text{M}$ ).

A **Tabela 3.1** resume os valores de comprimento de onda e de absorvância UV-Visível de cada um dos compostos estudados, na ausência e na presença de CT-ADN.

**Tabela 3.1:** Valores de comprimento de onda e absorvância UV-Vis máximas, na ausência e na presença de CT-ADN.

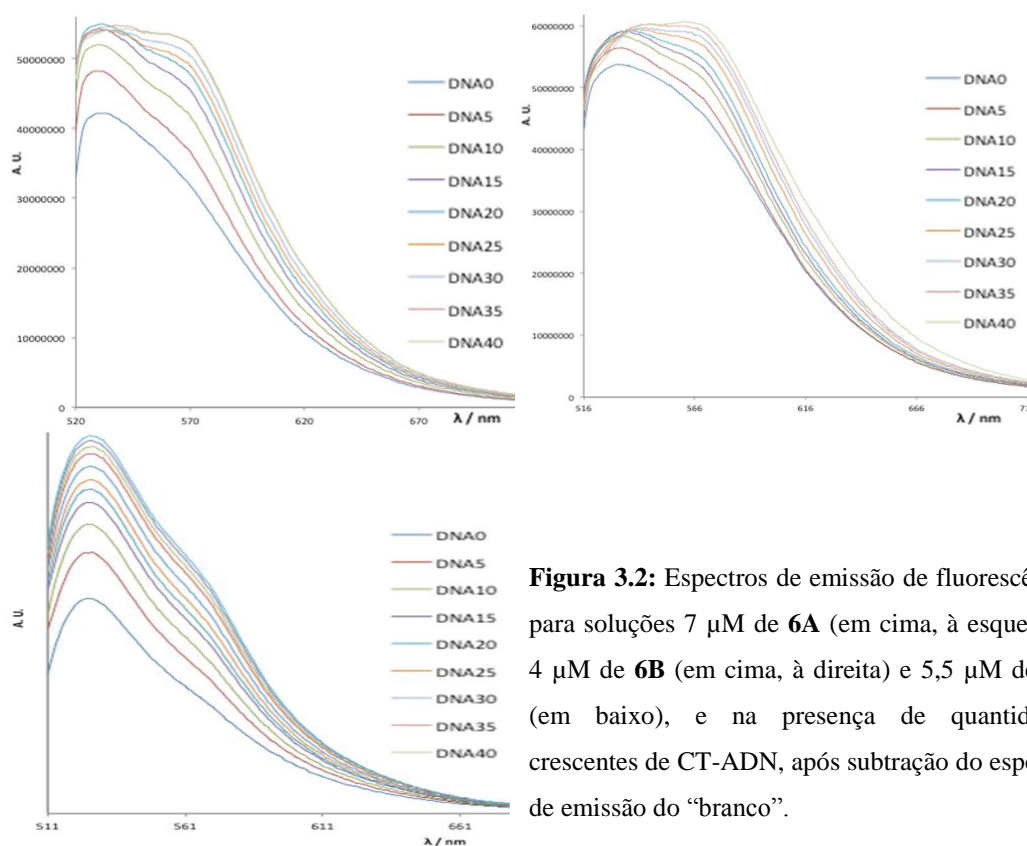
	$\lambda_{\text{max}}$ (Abs), sem ADN	$\lambda_{\text{max}}$ (Abs), com ADN
<b>6A</b>	444,0 (0,103)	448,0 (0,071)
	503,5 (0,135)	508,0 (0,129)
<b>6B</b>	479,5 (0,190)	483,5 (0,124)
	449,5 (0,259)	505,0 (0,168)
<b>6C</b>	499,0 (0,140)	505,0 (0,100)

Como se pode observar nos espectros da **Figura 3.1** e pela análise dos dados da **Tabela 3.1**, o pico do máximo de absorção do composto **6A** ( $\lambda_{\text{max}}=503,5$  nm) apresenta um desvio batocrômico após ligação do composto ao CT-ADN ( $\lambda_{\text{max}}=508,0$  nm). Por outro lado, o pico observado a 444 nm desvia-se para os 448 nm após interação do composto com o CT-ADN, sofrendo simultaneamente uma forte diminuição na intensidade (de 0,103 para 0,071). Foi observado um comportamento semelhante para os compostos **6B** e **6C**. As alterações observadas estão em concordância com a literatura e são consistentes com interação do tipo intercalação destes compostos com o ADN[76].

### 3.1.2 Espectroscopia de Fluorescência

Os estudos de emissão de fluorescência oferecem informação adicional em relação à forma como a interação entre moléculas pequenas e o ADN ocorre. Para compostos intercaladores com o ADN que apresentem fluorescência, pode verificar-se aumento da intensidade de fluorescência após intercalação do composto com a macromolécula de ADN, sem variações significativas no valor máximo de emissão[49,50].

Os compostos **6A-C** mostraram emissão de fluorescência quando excitados a 500 nm, o que permitiu realizar titulações por fluorescência com quantidades crescentes de CT-ADN. Como se pode verificar na **Figura 3.2**, observou-se um forte aumento da emissão de fluorescência com a adição de ADN, até se atingir uma situação de saturação.



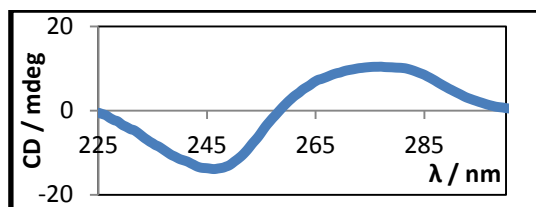
**Figura 3.2:** Espectros de emissão de fluorescência para soluções 7 μM de **6A** (em cima, à esquerda), 4 μM de **6B** (em cima, à direita) e 5,5 μM de **6C** (em baixo), e na presença de quantidades crescentes de CT-ADN, após subtração do espectro de emissão do “branco”.

### 3.1.3 Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular é frequentemente empregue para estudar a afinidade e o modo de ligação de moléculas pequenas a biomoléculas como o ADN[49,52]. Quando compostos aquirais, que não apresentam por isso sinal de CD, são colocados em ambientes

quirais, por exemplo na sequência da sua associação com o ADN, ocorre a indução de bandas de CD na gama das frequências de absorção do composto aquiral[52].

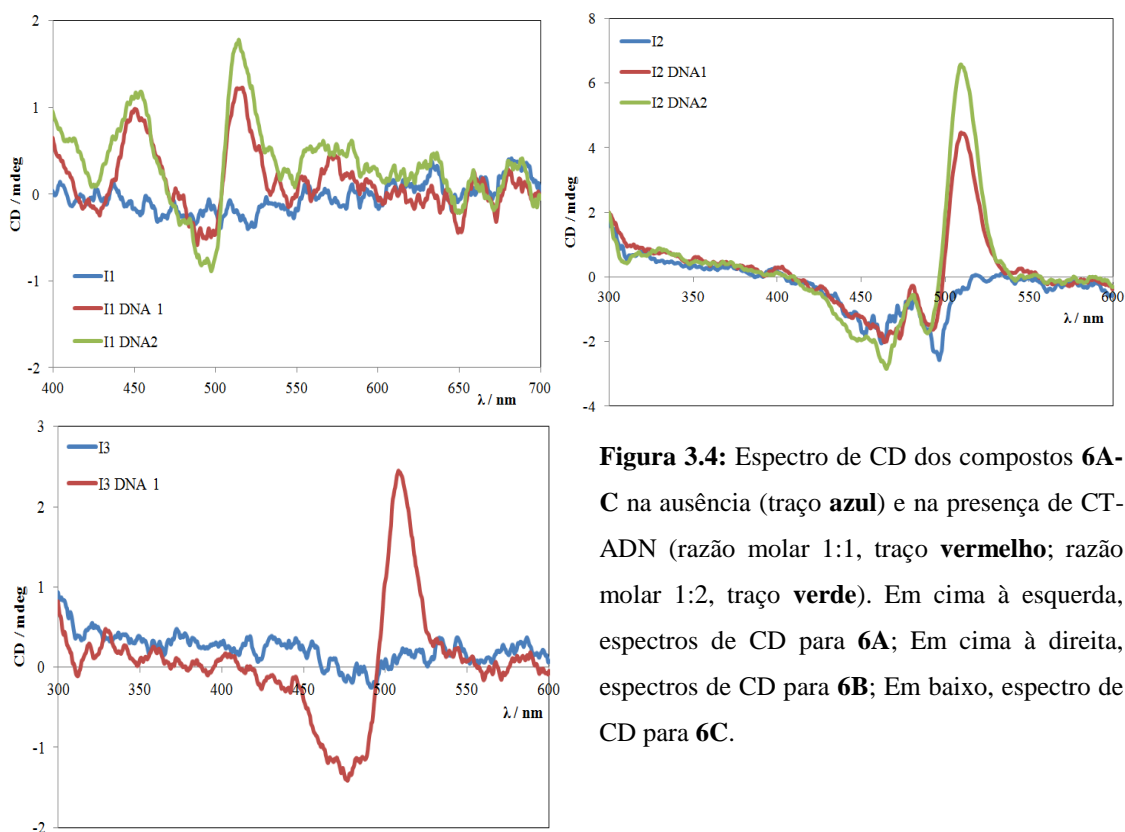
As ligações entre os grupos fosfato e as riboses do ADN conferem-lhe quiralidade, que resulta num sinal de CD característico entre os 200-300 nm (**Figura 3.3**). Assim, alterações espectrais neste sinal de CD indicam a ocorrência de alterações conformacionais[78,79].



**Figura 3.3:** Espectro de CD característico do CT-ADN ([ADN] = 72 μM).

Na presença dos compostos em estudos, foram observadas alterações nas bandas de CD do ADN, ou seja para comprimentos de onda inferiores a 300 nm. Este comportamento reflete pequenas alterações conformacionais induzidas na sequência da interação com os compostos. Tendo em conta os espectros de absorvância dos compostos estudados, prestámos particular atenção à presença de sinais de CD induzido a comprimentos de onda superiores a 300.

Na **Figura 3.4** apresentam-se os espectros de CD dos três compostos estudados na ausência e na presença de CT-ADN.



**Figura 3.4:** Espectro de CD dos compostos **6A-C** na ausência (traço azul) e na presença de CT-ADN (razão molar 1:1, traço vermelho; razão molar 1:2, traço verde). Em cima à esquerda, espectros de CD para **6A**; Em cima à direita, espectros de CD para **6B**; Em baixo, espectro de CD para **6C**.

Na **Tabela 3.2** apresentam-se os valores de  $\lambda_{\text{máx}}$  para as bandas de dicroísmo circular induzido que foram observadas para cada um dos compostos.

**Tabela 3.2:** Bandas de Dicroísmo Circular Induzido (nm) dos compostos **6A-C**, observadas após interação com CT-ADN.

<b>6A</b>	<b>6B</b>	<b>6C</b>
456 (+)	-	-
499 (-)	499 (+)	480 (-)
516 (+)	511 (+)	510 (+)

Todos os compostos mostraram a presença de bandas de CD induzido na região espectral 400-500 nm, embora o composto **6A** tenha mostrado um sinal de CD induzido mais fraco, provavelmente devido à sua menor solubilidade. Como se verifica pelo gráfico apresentado na **Figura 3.4** (gráfico em cima, à direita), o composto **6B** apresentou sinal CD mesmo na ausência de ADN, ao contrário dos compostos **6A** e **6C**. Não são claras as razões que justificam esta diferença de comportamento, mas pode resultar eventualmente do estabelecimento de interações intramoleculares no caso do composto **6B** que não se manifestam nos outros compostos, refletindo a diferença no tamanho das respectivas cadeias alquílicas.

### 3.1.4 Determinação das Constantes de Ligação

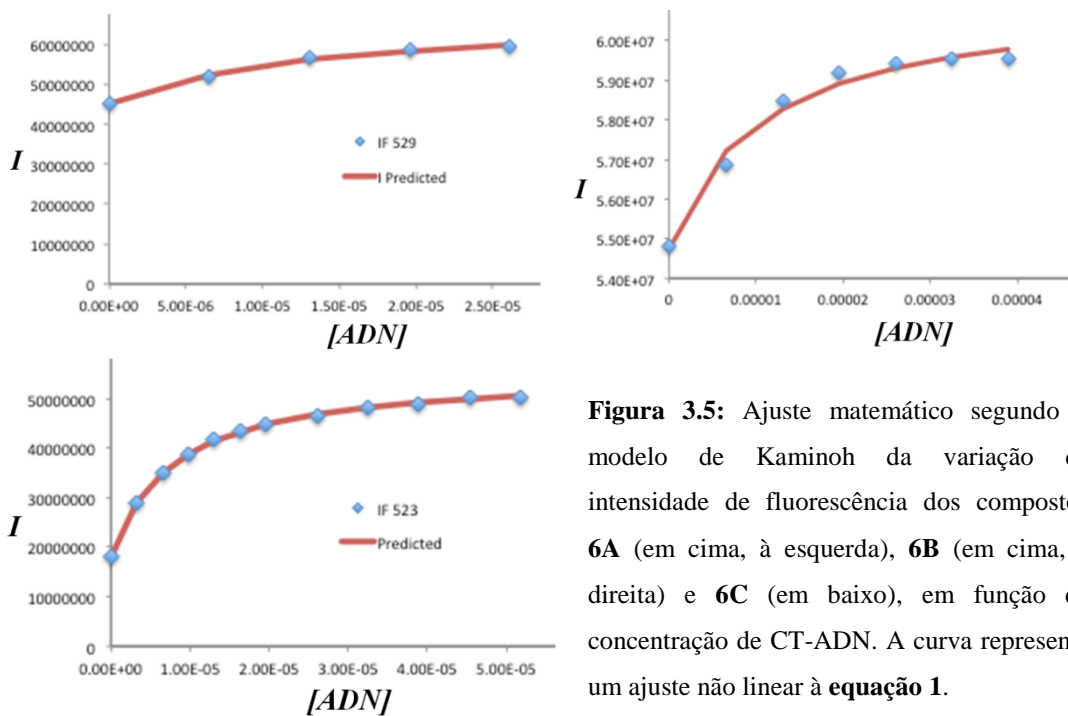
As constantes de ligação (K) de um composto ao ADN podem ser calculadas a partir dos estudos de UV-Vis e fluorescência, após correção dos dados experimentais, tendo em conta o fator de diluição das soluções e utilizando modelos matemáticos. Neste trabalho foram utilizados os modelos de Kaminoh e de McGhee von Hippel para ajuste matemático dos dados das titulações por espectroscopia de fluorescência[80-82].

O modelo de Kaminoh é aplicável a qualquer tipo de partição entre duas fases[80-82]. Para este trabalho, considerou-se as duas fases como sendo correspondentes aos compostos livres em solução e ligados ao ADN, não havendo qualquer separação física entre eles. Assim, a extensão da interação dos compostos com o ADN foi quantificada (forma livre de ADN vs. forma ligada ao ADN) por titulação dos compostos com várias concentrações de CT-ADN, através da adição de alíquotas de uma solução mais concentrada de ADN.

Segundo o modelo de Kaminoh, os dados da espectroscopia de fluorescência foram utilizados para efetuar um ajuste matemático, de acordo com a **equação 1** [80-82].

$$I = (I_0 + K [\text{DNA}] I_{SAT}) / (1 + K [\text{DNA}]) \quad (\text{equação 1})$$

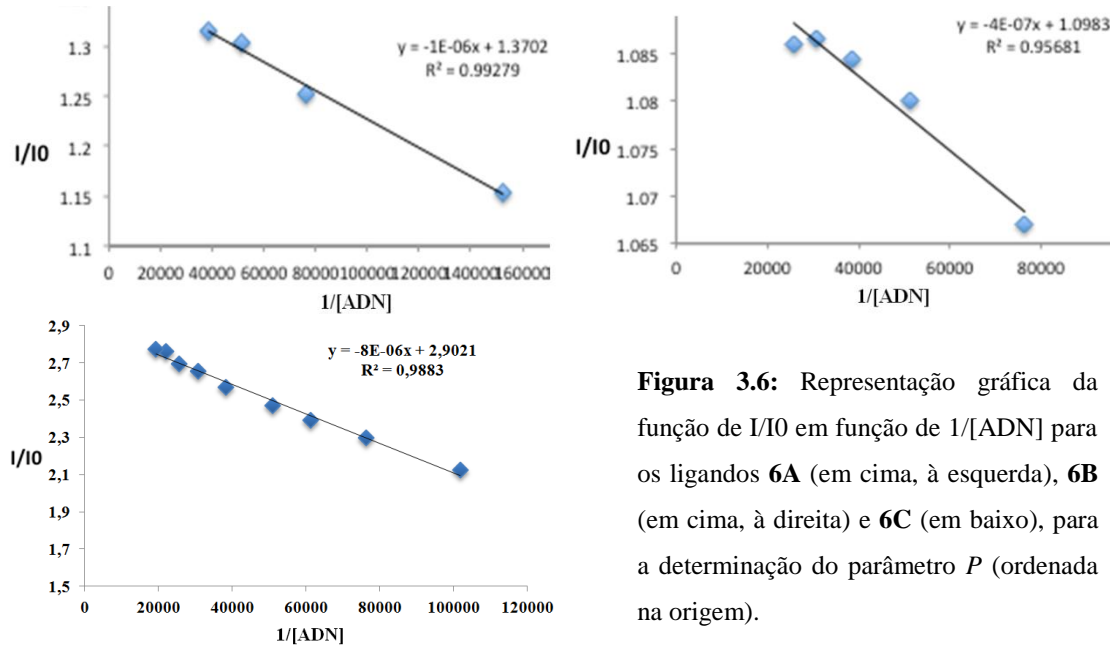
Na medida em que a intensidade de fluorescência ( $I$ ), a concentração do cromóforo e a sua intensidade de emissão ( $I_0$ ) são conhecidas, o valor de saturação ( $I_{SAT}$ ) pode ser calculado a partir da representação gráfica de  $I$  vs.  $[\text{ADN}]$ , mostrada na **Figura 3.5**. A partir desse ajuste e por aplicação da **equação 1** pode ainda obter-se o valor de  $K$ .



**Figura 3.5:** Ajuste matemático segundo o modelo de Kaminoh da variação da intensidade de fluorescência dos compostos **6A** (em cima, à esquerda), **6B** (em cima, à direita) e **6C** (em baixo), em função da concentração de CT-ADN. A curva representa um ajuste não linear à **equação 1**.

O modelo de McGhee von Hippel é considerado muito adequado para determinar constantes de ligação para compostos que intercalam com o ADN, nomeadamente através da análise da variação de intensidade de fluorescência em função da razão molar ligando/ADN. Em primeiro lugar, fez-se uma representação gráfica de  $I/I_0$  em função de  $1/[\text{ADN}]$ , como representado na **Figura 3.6**, para retirar o valor do parâmetro  $P$  (extrapolação do valor da ordenada na origem).





**Figura 3.6:** Representação gráfica da função de  $I/I_0$  em função de  $1/[ADN]$  para os ligandos **6A** (em cima, à esquerda), **6B** (em cima, à direita) e **6C** (em baixo), para a determinação do parâmetro  $P$  (ordenada na origem).

O parâmetro  $P$  permite o cálculo de  $C_F$  (concentração do composto livre) através do valor conhecido de  $C_T$  (concentração total de composto) e dos valores da área dos espectros de fluorescência obtidos na presença ( $I$ ) e ausência ( $I_0$ ) de CT-ADN, de acordo com a **equação 2**.

$$C_F = C_T \times (I/I_0 - P)/(1 - P) \quad \text{(equação 2)}$$

A obtenção do valor de  $C_F$  permite calcular  $C_B$  (concentração do composto ligado ao ADN), de acordo com a **equação 3**.

$$C_B = C_T - C_F \quad \text{(equação 3)}$$

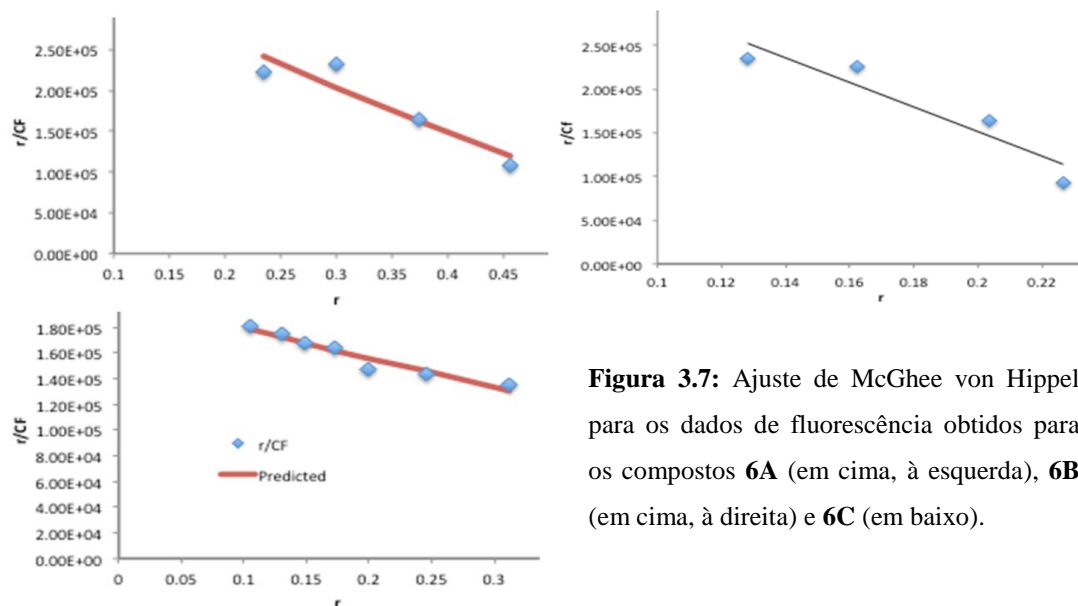
O valor de  $C_B$  permite calcular o parâmetro  $r$  através da **equação 4**.

$$r = C_B/[ADN] \quad \text{(equação 4)}$$

A variação de  $r/C_F$  em função de  $r$ , de acordo com a **equação 5** e por ajuste não linear dos dados, permite calcular os valores da constante de ligação  $K$  e do parâmetro  $n$ . Este parâmetro traduz-se no número de locais de ligação ao CT-ADN ocupados por intercalação do composto nos pares de bases nucleotídicas[80-82].

$$r/C_F = K(1-nr)[(1-nr)/[1-(n-1)r]]^{n-1} \quad \text{(equação 5)}$$

A **Figura 3.7** mostra as representações gráficas obtidas pela aplicação do modelo McGhee von Hippel para determinação dos valores de  $K$  e  $n$  dos compostos estudados.



**Figura 3.7:** Ajuste de McGhee von Hippel para os dados de fluorescência obtidos para os compostos **6A** (em cima, à esquerda), **6B** (em cima, à direita) e **6C** (em baixo).

Na **Tabela 3.3** apresentam-se os valores das constantes de ligação ( $K$ ) de cada composto ao CT-ADN, calculados pela aplicação dos dois modelos atrás apresentados (Kaminoh e McGhee von Hippel) aos dados das titulações espectrofluorimétricas, bem como os valores de  $n$ .

**Tabela 3.3:** Constantes de ligação ao ADN e outros parâmetros obtidos com a aplicação dos modelos de Kaminoh e McGhee von Hippel aos dados de emissão de fluorescência.

	<b>6A</b>	<b>6B</b>	<b>6C</b>
<b>Kaminoh</b>			
$K \times 10^4$	7,8±2,1	9,5±2,8	12,6±0,3
$I_{sat} \times 10^7$	6,7±0,3	6,12±0,06	5,55
$R^2$	0,995	0,983	0,9996
<b>McGhee von Hippel</b>			
$K \times 10^4$	38,0±6,0	47,0±9,0	20,2±0,06
$n$	1,3±0,2	2,4±0,3	1,07±0,06
$R^2$ (n.º de pontos)	0,871 (4)	0,864 (4)	0,926 (7)

No ajuste usando o modelo de Kaminoh obteve-se sempre valores inferiores para a constante de ligação, em relação ao modelo de McGhee von Hippel. É de referir que para alguns dos compostos, apenas alguns pontos puderam ser utilizados no ajuste pelo modelo de McGhee von Hippel (ver **Figura 3.7**), o que pode justificar esta discrepância. Os três compostos iodados apresentam constantes de ligação ao CT-ADN relativamente elevadas, sendo essencialmente da mesma ordem de grandeza para todos eles. Importa ainda referir que os valores encontrados para as constantes de ligação ao CT-ADN e para a distância em número de pares de bases ( $n$ ) entre duas moléculas do composto intercaladas, estão de acordo com valores descritos na literatura para a AO[83-85].

## 3.2 Avaliação *in vitro* dos Compostos Radioiodados: Estudos com ADN Plasmídico e com Células Tumorais

Nesta secção estão descritos os estudos de avaliação *in vitro* realizados para os compostos radioiodados  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$ .

Depois de se ter confirmado que os congéneres não radioativos intercalam com o ADN, avaliámos a capacidade dos compostos radioativos induzirem danos em ADN plasmídico e estudou-se a importância dos efeitos diretos e indiretos na formação de quebras simples e duplas.

Adicionalmente, foram realizados estudos com células tumorais humanas e murinas, tendo sido avaliada a captação celular dos compostos radioiodados. Para a avaliação da radiotoxicidade, foram realizados ensaios preliminares de MTT e ensaios  $\gamma\text{-H2AX}$ . Os estudos de radiotoxicidade foram realizados apenas para um dos compostos em estudo, o  $^{125}\text{I-6B}$ .

Antes do início dos estudos *in vitro*, foi confirmada por HPLC a estabilidade dos compostos em tampão Tris (pH = 7,4) e em meio de cultura celular DMEM a 37 °C, como descrito no **capítulo 2**.

### 3.2.1 Estudos com ADN Plasmídico

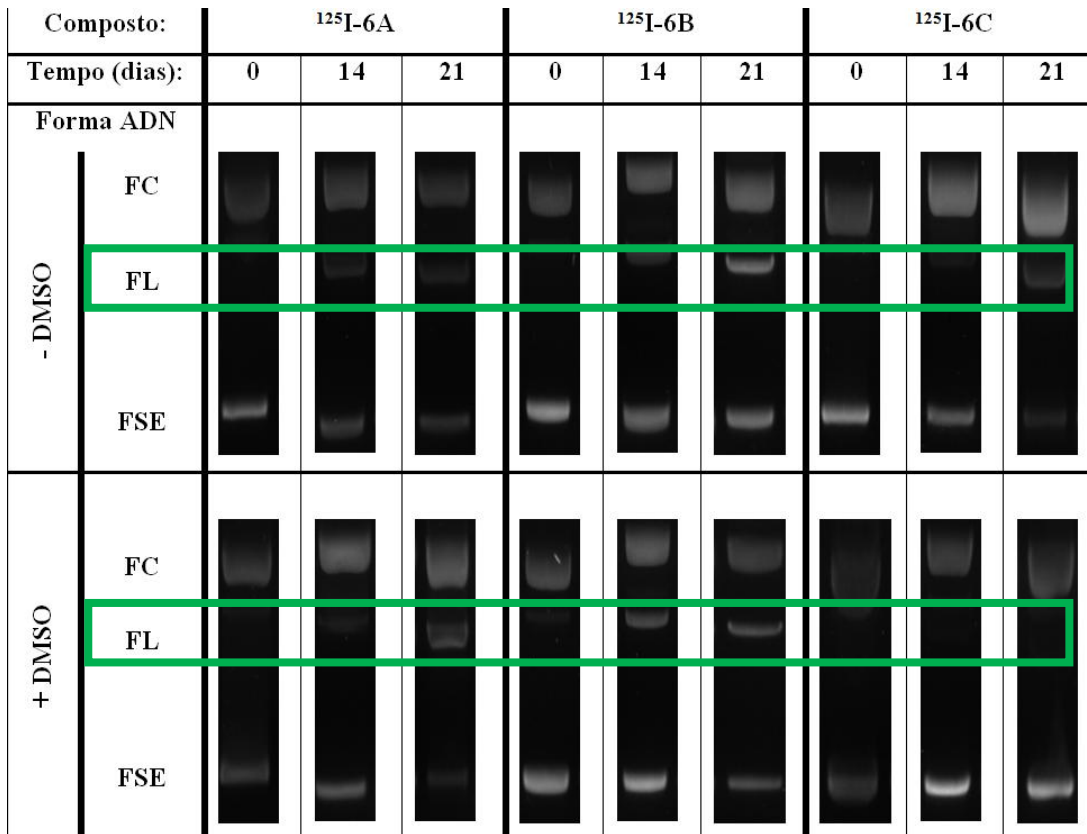
A formação de quebras na cadeia de ADN foi avaliada por eletroforese em gel de agarose, após incubação de cada um dos compostos  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$  com 2  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico  $\phi\text{X174}$ , a 4 °C, durante um período de 28 dias. A quantidade de ADN utilizada foi calculada para se obter uma razão molar ligando-ADN de 1:6. O emprego de um excesso molar de ADN teve como finalidade evitar que o composto ficasse livre em solução, não se ligando ao ADN.

Os estudos de eletroforese foram realizados com intervalos de sete dias por análise de alíquotas das misturas reacionais.

Adicionalmente, foram conduzidos ensaios sem adição de qualquer um dos compostos radioativos, permitindo excluir danos causados no ADN plasmídico pelas próprias condições de incubação. Foram ainda avaliados os danos induzidos no ADN plasmídico por incubação com  $^{125}\text{I}$  livre em solução, para comprovar se os danos verificados na cadeia de ADN induzidos pelos compostos em estudo eram devidos à proximidade do  $^{125}\text{I}$  com o ADN.

Todos os ensaios foram feitos na ausência e presença de DMSO 0,2 M, para avaliar a extensão dos efeitos diretos e indiretos nos danos causados à molécula de ADN. Como se explica no **capítulo 1**, a radiólise da água promove o aparecimento de espécies radicalares, nomeadamente

do radical hidroxilo, que são altamente reativas e conduzem a danos de ADN, nomeadamente quebras de cadeia. Estes efeitos, por serem originados não pela incidência direta da radiação ionizante sobre o ADN, mas pela reatividade das espécies radicalares, denominam-se efeitos indiretos. A presença de DMSO, um *scavenger* de radicais livres, impede em larga medida a ocorrência destes efeitos indiretos. Por outro lado, efeitos diretos da radiação sobre a cadeia de ADN não são afetados pela presença de DMSO. Por este motivo, o estudo foi conduzido na ausência e na presença de DMSO, com o objetivo de avaliar a importância dos efeitos diretos e indiretos nos danos de ADN induzidos pela exposição aos compostos  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$ . A **Figura 3.8** apresenta alguns dos resultados obtidos por análise densitométrica dos géis de eletroforeses correspondentes à incubação do ADN com os compostos a diferentes intervalos de tempo, na ausência e presença de DMSO.



**Figura 3.8:** Clivagem do ADN plasmídico  $\phi\text{X174}$  após incubação com os diferentes compostos, a 4 °C em tampão Tris (pH 7,4). Nas tiras de eletroforese são apresentadas a forma circular (FC), linear (FL) e superenrolada (FSE) de ADN, na ausência e na presença de DMSO (- DMSO e +DMSO).

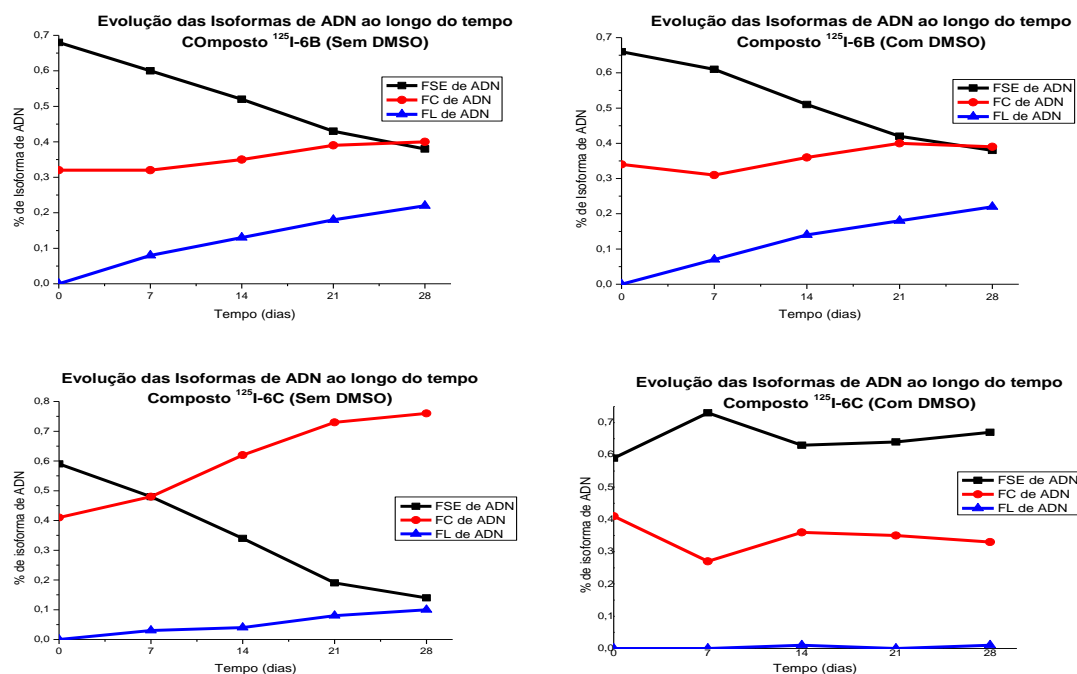
Observou-se o aparecimento da isoforma linear de ADN (FL) a partir do 7º dia, particularmente para os compostos  $^{125}\text{I-6A}$  e  $^{125}\text{I-6B}$  (na ausência e na presença de DMSO), Também se observou esse aparecimento com menos intensidade para o composto  $^{125}\text{I-6C}$ , mas unicamente na ausência de DMSO. A formação da FL tornou-se particularmente evidente a partir do 14º e 21º dias de incubação.

Para cada composto, foi quantificada a fração das formas superenrolada (FSE), circular (FC) e linear (FL) que foi observada para cada período de incubação.

**Tabela 3.4:** Percentagem da fração FSE de ADN, ao longo do período de incubação.

Composto	DMSO	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
$^{125}\text{I-6A}$	- DMSO	0,68	0,55	0,39	0,43	0,36
	+ DMSO	0,53	0,48	0,37	0,22	0,14
$^{125}\text{I-6B}$	- DMSO	0,68	0,60	0,52	0,43	0,38
	+ DMSO	0,66	0,61	0,51	0,42	0,38
$^{125}\text{I-6C}$	- DMSO	0,59	0,48	0,34	0,19	0,14
	+ DMSO	0,59	0,73	0,63	0,64	0,67
$\text{Na}^{125}\text{I}$	- DMSO	0,68	0,68	0,67	0,64	0,63
	+ DMSO	0,72	0,72	0,66	0,71	0,68

Nas incubações do ADN plasmídico com os compostos  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$ , verificou-se diminuição gradual da fração de FSE de ADN e, simultaneamente, um aumento das frações de FC e FL. (Figura 3.9) Na Tabela 3.4 e na Figura 3.9 apresenta-se a variação da FSE na sequência da clivagem do ADN plasmídico induzida pelos compostos  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$  ao longo do período de incubação.



**Figura 3.9:** Evolução da percentagem das frações de FSE, FC e FL, ao longo do período de incubação, para os compostos  $^{125}\text{I-6B}$  (em cima) e  $^{125}\text{I-6C}$  (em baixo), na ausência (gráficos da esquerda) e na presença (gráficos da direita) de DMSO 0,2 M.

Os compostos  $^{125}\text{I-6A}$  (com espaçador de 3 carbonos) e  $^{125}\text{I-6B}$  (com espaçador de 5 carbonos) apresentaram resultados semelhantes quanto à formação da isoforma linear de ADN. Para o composto  $^{125}\text{I-6A}$ , ao fim do período de incubação de 28 dias, a fração FL foi de 18% na ausência de DMSO e de 23% na presença de DMSO. Para o composto  $^{125}\text{I-6B}$ , ao fim dos 28 dias de incubação, a fração FL foi de 22% na ausência e na presença de DMSO.

Por outro lado, o composto  $^{125}\text{I-6C}$  (com espaçador de 8 carbonos) apresentou menor capacidade de linearização do ADN. Ao fim do mesmo período de incubação, a fração linearizada de ADN não ultrapassou os 10% na ausência de DMSO 0,2 M ou 1% na presença de DMSO 0,2 M.

Foi quantificada a eficiência da indução de quebras duplas (DSB) na cadeia ADN para os diferentes compostos, mediante cálculo do rendimento em DSB por decaimento. Para este efeito, foi necessário proceder à determinação do número de decaimentos radioativos acumulados por unidade de volume, a que ficaram expostas as soluções de ADN plasmídico incubadas com os diferentes compostos. O número de decaimentos acumulados foi calculado a partir da **equação 6**, onde  $A_0$  representa o número de desintegrações por minuto (dpm) por unidade de volume ( $\text{cm}^3$ ) e  $T_{1/2}$  o período de semidesintegração do radioisótopo[86-88].

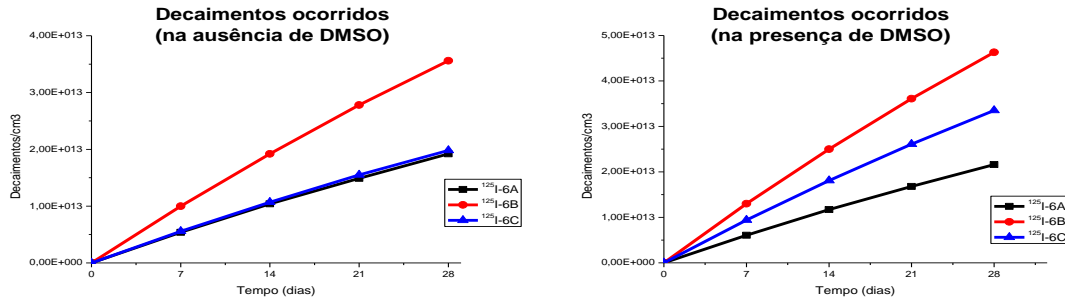
$$N_{\text{DECAY}/\text{cm}^3} = A_0 \left( 1 - \text{EXP}^{-\frac{\ln 2 \times t}{T_{1/2}}} \right) \times \frac{T_{1/2}}{\ln 2} \quad \text{(equação 6) [86-88]}$$

Na **Tabela 3.5** apresenta-se a atividade utilizada para a incubação com cada um dos compostos  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$ , na ausência e na presença de DMSO 0,2 M.

**Tabela 3.5:** Atividades ( $\mu\text{Ci}$ ) aplicadas na incubação de cada um dos compostos com ADN plasmídico  $\phi\text{X174}$ , na ausência e na presença de DMSO 0,2 M.

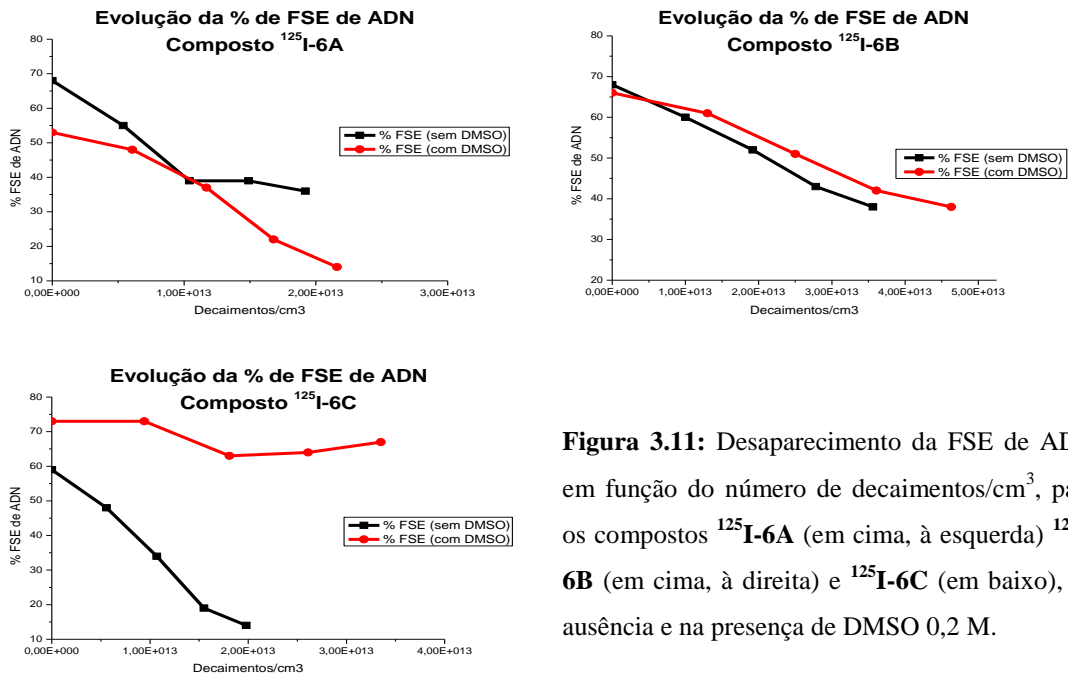
	Composto $^{125}\text{I-6A}$	Composto $^{125}\text{I-6B}$	Composto $^{125}\text{I-6C}$
- DMSO	42,0	49,0	44,0
+ DMSO	40,0	48,5	43,5

Os gráficos da **Figura 3.10** mostram a variação dos decaimentos acumulados para o período de tempo envolvido neste estudo. Para todos os compostos estudados o valor medido para o número de desintegrações por minuto por unidade de volume ( $A_0$ ,  $\text{dpm}/\text{cm}^3$ ) e consequentemente o número de decaimentos acumulados, foi superior na presença de DMSO. Este comportamento reflecte certamente a maior solubilidade dos compostos em solventes orgânicos, pois a variação das atividades aplicadas ( $\mu\text{Ci}$ ) no início de cada incubação não foi significativa. É de referir que o composto  $^{125}\text{I-6B}$  foi o mais solúvel e o composto  $^{125}\text{I-6A}$  o que apresentou menor solubilidade, nas condições em que foram realizados os ensaios.



**Figura 3.10:** Número de decaimentos/cm<sup>3</sup> acumulados ao longo do período de incubação para os compostos  $^{125}\text{I-6A}$  (a preto)  $^{125}\text{I-6B}$  (a vermelho) e  $^{125}\text{I-6C}$  (a azul) na ausência e presença de DMSO.

Na **Figura 3.11** apresenta-se a variação da FSE de ADN, em função do número de decaimentos ocorridos ao longo do tempo de incubação, na ausência e na presença de DMSO 0,2 M.



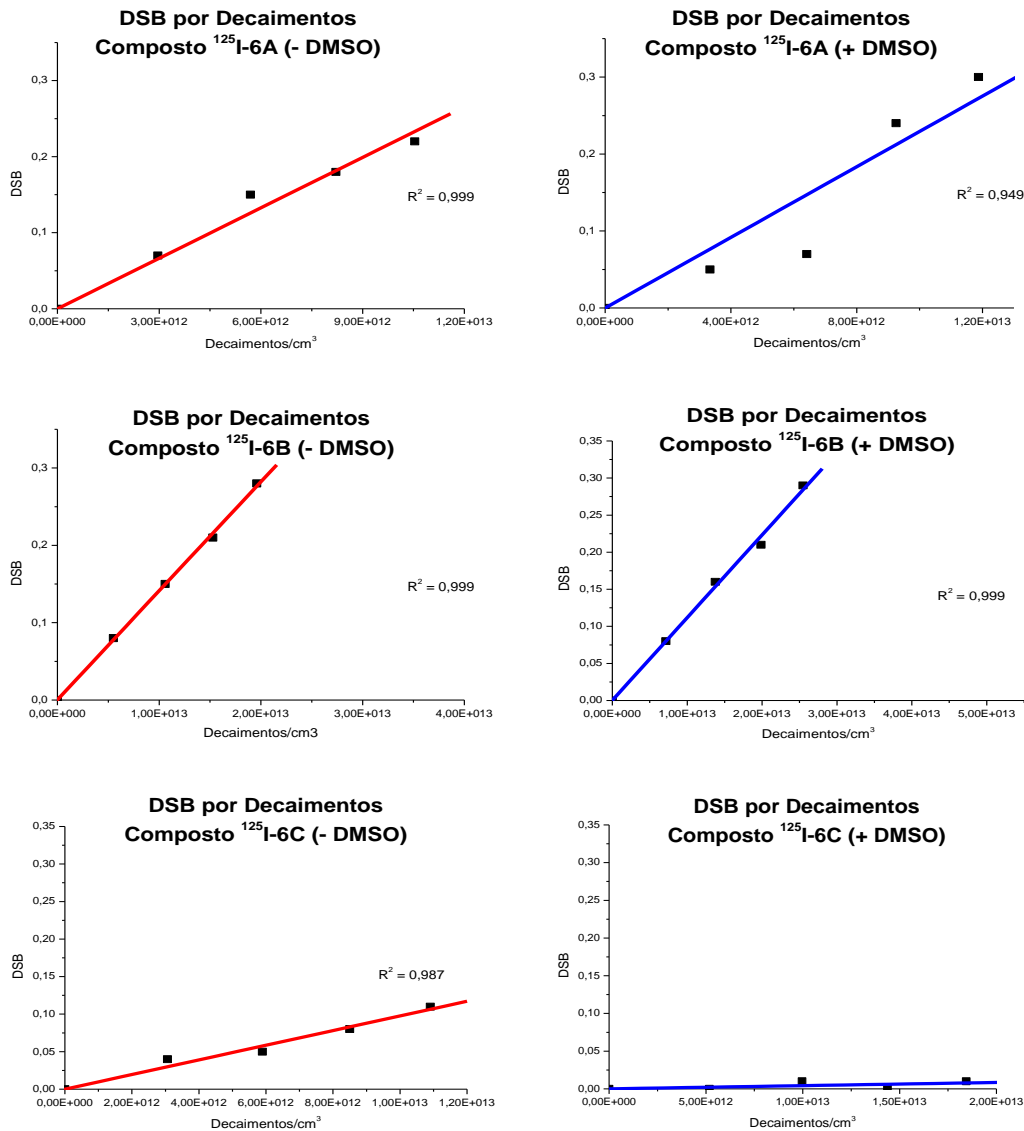
**Figura 3.11:** Desaparecimento da FSE de ADN em função do número de decaimentos/cm<sup>3</sup>, para os compostos  $^{125}\text{I-6A}$  (em cima, à esquerda)  $^{125}\text{I-6B}$  (em cima, à direita) e  $^{125}\text{I-6C}$  (em baixo), na ausência e na presença de DMSO 0,2 M.

Como se pode ver pelos gráficos apresentados na **Figura 3.11**, existe uma correlação positiva e forte entre o desaparecimento da FSE de ADN e o número de decaimentos ocorridos para todos os compostos estudados, exceto para  $^{125}\text{I-6C}$  na presença de DMSO. Para  $^{125}\text{I-6A}$  e  $^{125}\text{I-6B}$ , não se verificou uma diferença muito significativa entre a progressão do desaparecimento de FSE de ADN na presença e na ausência de DMSO. Por outro lado, para o composto  $^{125}\text{I-6C}$ , existe uma grande diferença na progressão do desaparecimento de FSE de ADN na presença e na ausência de DMSO. Estes resultados indicam que os danos na dupla hélice de ADN induzidos por  $^{125}\text{I-6A}$  e  $^{125}\text{I-6B}$  são devidos essencialmente aos efeitos diretos dos eletrões Auger e os danos induzidos por  $^{125}\text{I-6C}$  são devidos essencialmente a efeitos indiretos.

Seguidamente, foi calculado o número de quebras duplas (DSB) ocorridas em cada período de incubação, através da **equação 8**, onde  $N_{DSB}$  representa o número de DBS ocorridas durante o tempo de exposição e FL representa a fração de ADN na forma linear.

$$N_{DSB} = FL/(1-FL) \quad \text{(equação 8) [30, 87]}$$

Procedeu-se à representação gráfica do número de DBS em função dos decaimentos ocorridos ao longo do período de incubação dos compostos com o ADN (**Figura 3.12**). Verificou-se que, para os três compostos em estudo, existe uma correlação linear positiva muito forte entre o número de decaimentos calculados por unidade de volume e o número de quebras duplas de cadeia ( $R^2 > 0,98$ ), quando a incubação foi feita na ausência de DMSO 0,2 M. Também se verificou uma correlação linear positiva muito forte entre o número de decaimentos por volume e o número de DSB, para os compostos  $^{125}\text{I-6A}$  e  $^{125}\text{I-6B}$ , na presença de DMSO 0,2 M.



**Figura 3.12:** DSB em função do número de decaimentos/cm<sup>3</sup>.



Para determinar o número de decaimentos necessários para produzir uma DSB, calculou-se o valor de  $D_{0(DSB)}$ , partindo do valor do declive das retas de regressão linear obtidas por ajuste do número de DSB em função do número de decaimentos/cm<sup>3</sup> (**Figura 3.12**).

O valor  $D_0$  é uma medida da radiosensibilidade do ADN à exposição aos compostos estudados e pode calcular-se pela **equação 9**. Este parâmetro é muito importante, pois representa o número de decaimentos necessários para produzir uma quebra na cadeia nucleotídica.

$$D_0 = \frac{1}{\text{declive}} \quad \text{(equação 9) [30, 84]}$$

Os valores de  $D_0$  permitiram calcular um outro parâmetro, designado rendimento de DSB ( $Y_{DSB}$ ), que corresponde ao número de quebras de cadeia que se observam por molécula de ADN, por decaimento ocorrido (**equação 10**).

$$Y_{DSB} = \frac{[ADN]}{D_0} \quad \text{(equação 10) [30, 84]}$$

Onde [ADN] representa a concentração de ADN utilizada no estudo ( $3,36 \times 10^{12}$  moléculas/cm<sup>3</sup>).

Na **Tabela 3.6**, apresentam-se os valores de  $D_{0(DSB)}$  e de  $Y_{DSB}$  determinados para os derivados radioiodados de AO, <sup>125</sup>I-6A-C.

**Tabela 3.6:** Valores de  $D_{0(DSB)}$  e de  $Y_{DSB}$  para <sup>125</sup>I-6A-C na ausência e presença de DMSO.

	$D_0$ (decaimentos/cm <sup>3</sup> × 10 <sup>+13</sup> )		$Y_{DSB}$ (DSB/decaimento)	
	- DMSO	+ DMSO	- DMSO	+ DMSO
<sup>125</sup> I-6A	4,760 ± 0,084	3,797 ± 0,191	0,07 ± 0,006	0,09 ± 0,017
<sup>125</sup> I-6B	7,098 ± 0,010	8,968 ± 0,020	0,05 ± 0,001	0,04 ± 0,001
<sup>125</sup> I-6C	10,50 ± 0,093	230,8 ± 0,817	0,03 ± 0,003	0,00 ± 0,001

Nos compostos <sup>125</sup>I-6A e <sup>125</sup>I-6B verificou-se cerca de 0,07-0,09 e 0,05-0,04 DSB por decaimento, respetivamente, sem diferenças significativas introduzidas pela presença de DMSO. O composto <sup>125</sup>I-6C revelou menor capacidade de indução de DSB e, na presença de DMSO 0,2 M, praticamente não se verificou a ocorrência deste tipo de danos de ADN.

Balagurumorthy e colaboradores, num estudo realizado em 2012 com derivados do *groove binder* Hoechst33258, chegaram a valores de rendimento em DSB entre 0,52 e 0,24, para compostos em que o <sup>125</sup>I se encontrava a uma distância do ADN entre 10,5 e 12,0 Å [30,31],

uma distância semelhante àquela que esperamos obter para os compostos  $^{125}\text{I-6A}$  e  $^{125}\text{I-6B}$ , tendo em conta resultados preliminares de estudos de *docking* que estão a ser realizados em colaboração com o Dr. João Lavrado (iMed.Ulisboa).

O estudo realizado mostrou que o composto com espaçador de menor tamanho (composto  $^{125}\text{I-6A}$ ) é aquele para o qual é requerido o menor número de decaimentos por unidade de volume (menor valor de  $D_0$ ), para produzir quebras duplas de cadeia, tendo-se obtido por isso valores superiores de rendimento de DSB. Após intercalação, o átomo de  $^{125}\text{I}$  encontra-se estruturalmente mais próximo da cadeia de ADN quando comparado com  $^{125}\text{I-6B}$  e com  $^{125}\text{I-6C}$ , assumindo que a cadeia alquílica linear dos compostos, depois de intercalados não interage diretamente com o ADN, tal como sugeriu o estudo preliminar de *docking*. Os valores de  $D_0$  e de  $Y_{\text{DSB}}$  encontrados para este composto não variaram significativamente na presença de DMSO, o que confirma que as DSB produzidas são essencialmente resultado dos efeitos diretos dos elétrons Auger. Comparativamente ao composto  $^{125}\text{I-6A}$ , o composto  $^{125}\text{I-6B}$  apresentou resultados ligeiramente superiores de  $D_0$  e valores ligeiramente inferiores de  $Y_{\text{DSB}}$ , sem variações significativas atribuíveis à presença de DMSO.

Pelo contrário, para o composto onde o átomo de  $^{125}\text{I}$  se encontra presumivelmente mais afastado da estrutura do ADN (composto  $^{125}\text{I-6C}$ ), são necessários bastante mais decaimentos (maior valor de  $D_0$ ), para produzir DSB na cadeia de ADN. Este valor torna-se extremamente elevado na presença de DMSO, o que sugere também que as quebras de cadeia produzidas serão praticamente na sua totalidade, resultado dos efeitos indiretos da radiação. Outros autores descreveram também resultados semelhantes que mostraram que existe um efeito pronunciado da distância entre o  $^{125}\text{I}$  e a cadeia de ADN na proporção entre quebras de cadeia simples e duplas e no envolvimento de efeitos diretos ou indiretos[31, 87, 89].

## **3.2.2 Estudos com Células Tumerais Humanas (PC-3) e de Origem Murina (B16-F1)**

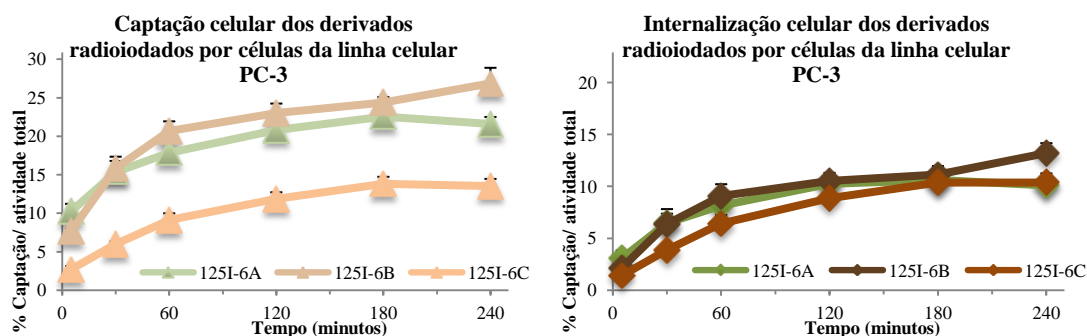
### **3.2.2.1 Estudos de captação celular**

Os estudos de captação celular em células PC-3 de carcinoma da próstata e em células B16-F1 de melanoma murino permitiram avaliar a capacidade dos compostos radioiodados entrarem na célula, através da medição da atividade associada à membrana e ao interior da célula. A soma das duas frações corresponde à captação celular.

As células PC-3 e B16-F1 foram incubadas a 37°C com cada um dos compostos e os resultados da captação e internalização celular foram expressos em percentagem de atividade total adicionada às células (média ± desvio padrão, n = 4) e são apresentados nas **Figuras 3.13 e 3.14**.

Como se verifica pela análise dos gráficos da **Figura 3.13**, nos estudos com células tumorais humanas PC-3, verificámos que após 4 horas de incubação, os compostos  $^{125}\text{I-6A}$  e  $^{125}\text{I-6B}$  são aqueles que apresentam maior captação celular, com  $21,6 \pm 0,9\%$  e  $26,9 \pm 2,0\%$  da actividade associada à célula (na membrana ou no interior da célula), respetivamente. O ligando  $^{125}\text{I-6C}$  foi o que apresentou captação celular inferior, com apenas  $13,5 \pm 0,9\%$  da atividade associada à célula.

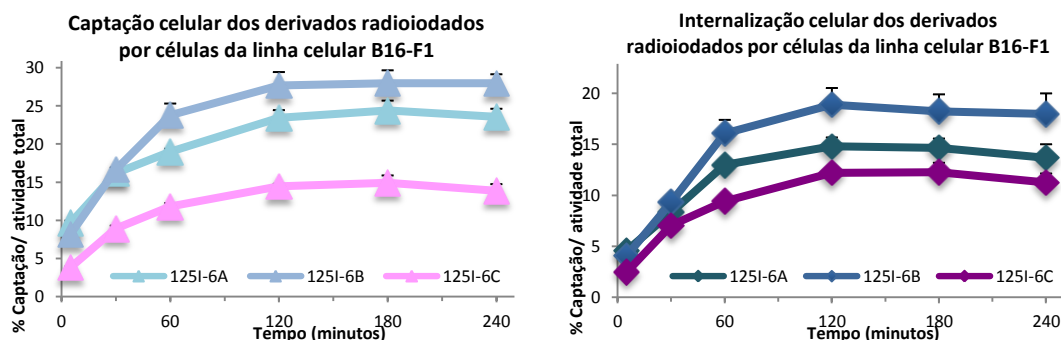
Nesta linha celular, os três compostos apresentaram uma capacidade de internalização celular semelhante, com  $10,1 \pm 0,5\%$ ,  $13,2 \pm 0,9\%$  e  $10,4 \pm 0,9\%$  da atividade total aplicada encontrada no interior das células, para os compostos  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$ , respetivamente.



**Figura 3.13:** Percentagem total de atividade captada pelas células PC-3 (gráfico da esquerda) e respetiva internalização celular (gráfico da direita), após incubação a 37 °C durante 4 h.

Nos estudos com células B16-F1, de origem murina (**Figura 3.14**), verificámos que os compostos  $^{125}\text{I-6A}$  e  $^{125}\text{I-6B}$  apresentam maior captação celular, com  $23,6 \pm 1,1\%$  e  $28,0 \pm 1,2\%$  da atividade associada à célula, respetivamente, após 4 horas de incubação. O composto radioiodado  $^{125}\text{I-6C}$  foi o que apresentou captação celular inferior, com apenas  $13,9 \pm 0,9\%$  da atividade associada à célula.

Nesta linha celular, observaram-se algumas diferenças na capacidade de internalização celular, tendo sido registados  $13,7 \pm 1,3\%$ ,  $18,0 \pm 2,0\%$  e  $11,3 \pm 0,9\%$  da atividade total aplicada, no interior das células para os compostos  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$ , respetivamente.



**Figura 3.14:** Percentagem total de atividade captada pelas células B16-F1 (gráfico da esquerda) e respectiva internalização celular (gráfico da direita), após incubação a 37 °C durante 4 h.

Em ambas as linhas celulares, verificou-se que o composto <sup>125</sup>I-6B apresenta melhores resultados quer em termos de captação, quer no que respeita à internalização celular.

A **Tabela 3.7** resume os valores medidos para a captação e internalização celular de cada um dos compostos nas duas linhas celulares estudadas.

**Tabela 3.7:** Percentagem total de composto captado e internalizado nas células, para cada uma das linhas celulares.

	Captação celular (%/atividade total)		Internalização celular (%/atividade total)	
	PC-3	B16-F1	PC-3	B16-F1
<sup>125</sup> I-6A	21,6 ± 0,9	23,6 ± 1,1	10,1 ± 0,5	13,7 ± 1,3
<sup>125</sup> I-6B	26,9 ± 2,0	28,0 ± 1,2	13,2 ± 0,9	18,0 ± 2,0
<sup>125</sup> I-6C	13,5 ± 0,9	13,9 ± 0,9	10,4 ± 0,9	11,3 ± 0,9

### 3.2.2.2 Radiotoxicidade e ensaio $\gamma$ -H2AX em células tumorais

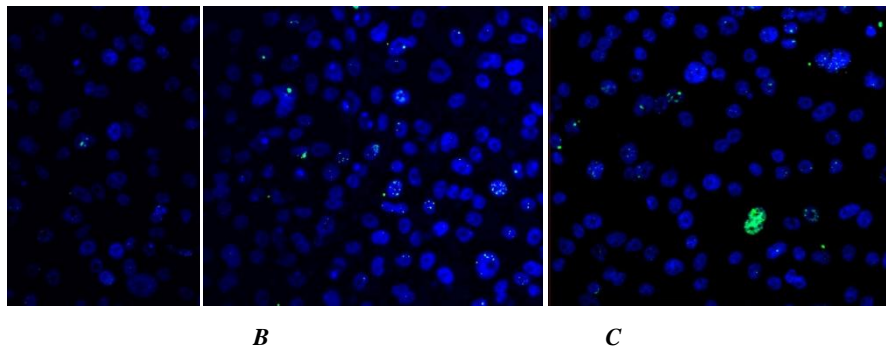
Uma vez que os estudos de captação celular mostraram melhores resultados para o composto <sup>125</sup>I-6B (com espaçador de 5 átomos de carbonos), decidimos realizar, preliminarmente, ensaios de radiotoxicidade para este composto nas linhas celulares PC-3 e B16-F1.

#### Ensaio $\gamma$ -H2AX

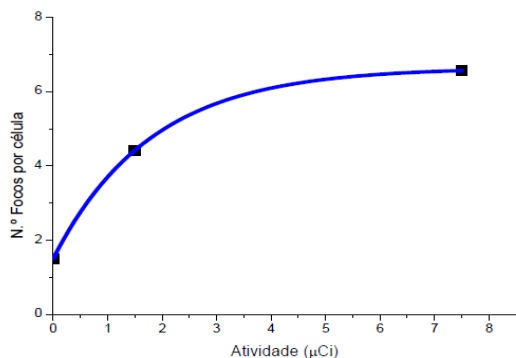
Os danos provocados pela radiação ionizante ao nível do ADN devem ter em consideração que várias estruturas peri-ADN podem ter influência crítica no que concerne ao processo de reparação e morte celular. Um conceito recente refere a monitorização do processo de

fosforilação da histona H2AX ( $\gamma$ -H2AX), presente como um invólucro para as bases do ADN, como marcador dos danos causados pela radiação ionizante, nomeadamente DSB. Estes ensaios possibilitam a avaliação de focos de histona H2AX fosforilada nos locais do ADN onde ocorreram DSB, que podem ser visualizados por microscopia de fluorescência ou por técnicas mais robustas como a citometria de fluxo, representando por isso um método de avaliação da radiosensibilidade celular. Está descrito na literatura a relação entre o número de decaimentos de  $^{125}\text{I}$ , quando incorporado no ADN celular e o número de focos de histona  $\gamma$ -H2AX detetados por célula. Este método é inclusivamente descrito como tendo uma sensibilidade para deteção de DSB muito superior a outros métodos de deteção[91,92].

O ensaio  $\gamma$ -H2AX foi unicamente realizado para a linha celular PC-3. As células foram incubadas com diferentes atividades (1,5-1,75  $\mu\text{Ci}$  e 7,0-8,0  $\mu\text{Ci}$ ) de composto  $^{125}\text{I}$ -6B durante 48 horas a 37 °C. Ao fim deste tempo, foram lavadas com PBS e incubadas com  $10^{-4}$  M de timidina e os núcleos corados com DAPI. As células foram depois incubadas com anticorpo anti- $\gamma$ -H2AX. Depois de lavar novamente as células com PBS, estas foram incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488 nm (verde). Este anticorpo possibilitou a deteção das DSB, corando os locais onde ocorreu fosforilação da histona H2AX, o que permitiu a sua visualização por imunofluorescência (**Figuras 3.15 e 3.16**).



**Figura 3.15:** Indução de DSB nas células PC-3, após incubação com o composto  $^{125}\text{I}$ -6B. Os focos a verde assinalam os locais onde ocorreu fosforilação da histona H2AX, correspondentes à ocorrência de DSB. **A)** Controlo (incubação sem  $^{125}\text{I}$ -6B); **B)** Incubação com 1,5  $\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}$ -6B; **C)** Incubação com 7,5  $\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}$ -6B.



**Figura 3.16:** Número de focos (DSB) nas células PC-3, após incubação com o composto  $^{125}\text{I}$ -6B, em função da atividade ( $\mu\text{Ci}$ ) de incubação.

Os resultados apresentados nas **Figuras 3.15 e 3.16** indicaram que existe indução de DSB na cadeia de ADN das células PC-3 incubadas com o composto  $^{125}\text{I-6B}$ , sobretudo para a incubação com 7,5  $\mu\text{Ci}$  de composto. Embora preliminares, estes resultados vão ao encontro dos obtidos nos ensaios *in vitro* anteriormente realizados.

### **Ensaio MTT para células de melanoma murino B16-F1**

Ensaio preliminares de radiotoxicidade foram realizados por um teste denominado MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-11)-2,5-difeniltetrazólio) que avalia a atividade metabólica das células, quantificando a redução metabólica do MTT. Os cristais de formazan formados no interior das células podem ser observados por microscopia ou quantificados por espectrofotometria, depois de extraídos com solvente orgânico adequado, como o DMSO[90].

Assim, foi avaliada a viabilidade das células após a sua exposição ao composto em estudo. As células que se mantêm viáveis reduziram o MTT a formazan, durante a respiração celular, nas mitocôndrias. A deteção do formazan formado é uma indicação da integridade das mitocôndrias e da viabilidade celular.

No ensaio MTT realizado, células de melanoma B16-F1 foram expostas, durante 48 horas a 37 °C, a 1-1,2  $\mu\text{Ci}$  de composto  $^{125}\text{I-6B}$  (0,2 mL). Este ensaio, embora preliminar, mostrou que existe cerca de 36% de morte celular ao fim de um período de incubação de 48 horas, a 37 °C.

## **4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS**

---





## 4. CONCLUSÕES E PERSPETIVAS

Nos últimos anos, vários grupos de investigação têm explorado as propriedades ionizantes dos emissores de elétrons Auger para terapêutica com radionuclídeos dirigida ao ADN. Os elétrons Auger são elétrons pouco energéticos, que apresentam elevada capacidade de transferência linear de energia, uma vez que depositam toda a sua energia ao longo do seu muito curto percurso nos tecidos biológicos[5,7,16].

Entre os radionuclídeos emissores de elétrons Auger, o  $^{125}\text{I}$  é um dos mais estudados. Este radioisótopo apresenta particular interesse uma vez que emite cerca de 20 elétrons Auger por decaimento[28-30,40-44].

Dado que os elétrons Auger apenas percorrem curtas distâncias nos tecidos humanos, o radionuclídeo emissor de elétrons Auger tem necessariamente que ser transportado para o núcleo da célula, de forma a causar danos no material genético[20,27-31].

O alaranjado de acridina e os seus derivados apresentam conhecidas propriedades de intercalação do com o ADN, sendo compostos muito atrativos para conjugação a radionuclídeos emissores de elétrons Auger para radioterapia dirigida ao ADN. Com o objetivo de contribuir para demonstrar a relevância desta classe de compostos para este tipo de aplicação, sintetizaram-se diferentes derivados de AO, procedeu-se à sua radioiodação e estudou-se a sua capacidade para causar quebras de cadeia, usando ADN plasmídico ou células tumorais, correlacionando essa capacidade com o aumento da distância entre o radionuclídeo  $^{125}\text{I}$  e a dupla hélice de ADN.

Concretamente, sintetizámos três derivados (radio)iodados do alaranjado de acridina contendo uma cadeia alquílica de tamanho variável (3, 5 e 8 grupos metilénicos) entre o intercalador do ADN e o isótopo emissor de elétrons Auger ( $^{125}\text{I}$ ).

Começámos pela síntese dos compostos iodo-*n*-alquilftalimida **2A** (*n* = 3) **2B** (*n* = 5) e **2C** (*n* = 8), que foram utilizados na N-alquilação do alaranjado de acridina, de que resultou a formação dos compostos **3A**, **3B** e **3C** (rendimentos acima dos 95% para os dois primeiros e de 50% para o composto **3C**). Esses derivados alquilftalimida foram transformados nas correspondentes aminas primárias (compostos **4A**, **4B** e **4C**), que reagiram com o éster ativado 4-iodobenzoato de tetrafluorofenilo (composto **5**), promovendo-se o acoplamento do ácido iodobenzóico, com formação dos compostos finais do tipo 4-iodobenzamida **6A-C** (rendimentos de 72%, 71% e 20% para os produtos **6A**, **6B** e **6C**, respetivamente).

Seguidamente, avaliou-se se os compostos **6A**, **6B** e **6C** mantinham a capacidade de intercalação com ADN, tal como era espectável. Para isso, foram usadas diferentes técnicas espectroscópicas, como UV-Visível, fluorescência e Dicroísmo Circular, que permitiram estudar a interação dos compostos com CT-ADN. Com os estudos de fluorescência, foi ainda possível determinar as constantes de ligação ao ADN para cada um dos compostos, por ajuste dos dados obtidos nas titulações de Fluorescência a modelos matemáticos de Kaminoh e McGhee von Hippel.

Os estudos de espectroscopia UV-Visível mostraram hipocromismo e batocromismo nas bandas do espectro de absorção UV-Visível, na sequência da interação dos compostos com o ADN. Esta interação também conduziu ao aumento da intensidade de fluorescência e ainda a sinais de dicroísmo circular induzido, sobretudo para o composto **6B**. Estes resultados vêm sugerir uma forte capacidade de ligação ao ADN, provavelmente por intercalação. Uma vez que nenhum dos compostos sintetizados é quiral, a existência de dicroísmo circular induzido detetado, em especial para o complexo **6B**-DNA, é sugestivo de alguma flexibilidade na conformação espacial da cadeia alquílica após intercalação entre os pares de bases nucleotídicas. Segundo o modelo de McGhee von Hippel, os valores de  $K$  encontrados (entre  $20,2 \pm 0,06$  e  $47,0 \pm 9,0$ ), bem como a distância em número de pares de bases ( $n$ , entre  $1,07 \pm 0,06$  e  $2,4 \pm 0,3$ ) entre duas moléculas do composto intercaladas, estão de acordo com valores previamente estabelecidos na literatura para o alaranjado de acridina[83-85].

Foram depois sintetizados os compostos radioiodados  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$  por radioiodação oxidativa dos respetivos precursores estanano (rendimentos de marcação de 23,3%, 32,3% e 30,2%, respetivamente). Estes compostos foram obtido com valores de pureza radioquímica superiores a 98%, após purificação por HPLC (fase reversa) e por *cartridge* Sep-Pak C18.

Adicionalmente, realizaram-se estudos de estabilidade dos compostos radioiodados em EtOH (para armazenamento), em tampão Tris-HCl 0,1 M (tampão utilizado para estudos com ADN) e em meio de cultura celular DMEM (meio utilizado para estudos celulares). Os diferentes compostos radioiodados apresentaram uma elevada estabilidade radioquímica em todas as condições estudadas.

Avaliámos os danos causados na cadeia de ADN plasmídico  $\phi\text{X174}$ , induzidos por cada um dos três compostos radioativos marcados com  $^{125}\text{I}$ , através de técnicas de eletroforese em gel de agarose e posterior análise densitométrica.

Os compostos  $^{125}\text{I-6A}$  e  $^{125}\text{I-6B}$  foram aqueles que provocaram maior número de DSB, com rendimentos de cerca de 0,07-0,09 e 0,05-0,04 DSB por decaimento, respetivamente, sem diferenças significativas quando os ensaios foram conduzidos na presença de DMSO 0,2 M.

Estes resultados sugerem que para os compostos  $^{125}\text{I-6A}$  (com espaçador de 3 carbonos) e  $^{125}\text{I-6B}$  (com espaçador de 5 carbonos), a maior proximidade entre o radionuclídeo  $^{125}\text{I}$  e as bases de ADN é tal, que leva ao predomínio de efeitos diretos nos danos causados no ADN. Pelo contrário, o número de DSB causadas pelo composto  $^{125}\text{I-6C}$  (com espaçador de 8 carbonos) é reduzido drasticamente na presença de DMSO 0,2 M, não se verificando praticamente a ocorrência deste tipo de quebras na cadeia nucleotídica. Esta tendência aponta para uma maior preponderância dos efeitos indiretos nos danos provocados pelo composto  $^{125}\text{I-6C}$ , o que reflete certamente a maior distância entre o átomo emissor de elétrons Auger e o eixo central de ADN, no caso da intercalação deste composto.

Foram também realizados estudos para avaliar a captação e a capacidade de internalização celular dos compostos radioiodados em diferentes linhas celulares tumorais.

Os resultados obtidos revelaram que o composto  $^{125}\text{I-6B}$  foi aquele que mostrou melhores resultados, com cerca de 30% de captação e cerca de 18% de internalização na linha celular B16-F1.

O composto  $^{125}\text{I-6B}$  revelou bons resultados nos ensaios *in vitro* com ADN plasmídico e nos ensaios de captação e internalização celular, o que nos levou a proceder ao estudo preliminar da sua capacidade de produzir DSB no ADN de células tumorais e provocar efeitos radiocitotóxicos, através de ensaios  $\gamma\text{-H2AX}$  e MTT, respetivamente. Os resultados dos ensaios  $\gamma\text{-H2AX}$  sugerem também que o composto  $^{125}\text{I-6B}$  é capaz de provocar DSB na cadeia de ADN das células tumorais, na proporção à atividade aplicada nas células. O ensaio MTT mostrou que a exposição das células a cerca de 1  $\mu\text{Ci}$  de composto  $^{125}\text{I-6B}$ , durante 48 horas, induz a morte celular em mais de 35% das células expostas.

Para melhor interpretar esses estudos e resultados, dever-se-á ainda realizar estudos de internalização nuclear, que fornecerão informação fundamental acerca da capacidade de cada um dos compostos entrar no núcleo das células, ficando assim em contacto com o ADN. Por limitações de tempo, não nos foi possível realizar e/ou concluir estes estudos durante o período de realização do trabalho experimental que deu origem a esta tese.

Seria interessante repetir os ensaios de  $\gamma\text{-H2AX}$ , nomeadamente incluindo também o composto  $^{125}\text{I-6C}$  no ensaio e incluir adicionalmente incubações com atividades superiores.

É importante avançar para a realização de estudos de modelação molecular (*docking*), que corroborem a interação dos compostos com o ADN por intercalação, determinem a

conformação espacial do composto após intercalação e estime a distância do  $^{125}\text{I}$  ao eixo central da dupla hélice de ADN. Estes estudos computacionais já estão neste momento a decorrer, em colaboração com o Dr João Lavrado (iMed.UL).

Como já referido, a modelação molecular deverá fornecer informação importante sobre a distância exata do átomo  $^{125}\text{I}$  à molécula de ADN, para cada um dos compostos estudados. Esta informação será útil para relacionar com cálculos de nanodosimetria, que já se encontram em curso e estão a ser realizados por investigadores do grupo de Protecção e Segurança Radiológica do C<sup>2</sup>TN-IST.

É conhecida a afinidade de compostos derivados de acridina para células que sobreexpressem melanina. [43, 44, 58] Seria interessante avaliar a farmacocinética, *in vivo*, dos compostos sintetizados, nomeadamente em modelos animais portadores de melanoma maligno.

Os derivados do alaranjado de acridina podem também atuar como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica (PDT). Por exemplo, alguns artigos recentes referem o uso da AO, com sucesso, no tratamento de sarcomas músculo-esqueléticos via PDT[60,61]. A possibilidade de combinar eventuais propriedades fotossensibilizadoras dos derivados de AO descritos nesta tese, com a visualização *in vivo* da sua localização (por deteção da radiação emitida por  $^{123}\text{I}$  ou  $^{124}\text{I}$ ) ou com efeitos dos eletrões Auger ( $^{125}\text{I}$ ) abrem novas perspetivas para o trabalho de investigação aqui apresentado, podendo potenciar novas aproximações teranósticas do cancro (PDT + imagiologia PET ou SPECT + Terapia Auger).

## **5. PARTE EXPERIMENTAL**

---



## 5. PARTE EXPERIMENTAL

---

### 5.1 Solventes, Reagentes e Técnicas para Purificação e Caracterização

#### 5.1.1 Solventes e Reagentes

Todos os solventes utilizados eram de qualidade pró-análise e foram usados sem purificação adicional. Os solventes secos utilizados foram preparados e mantidos de acordo com métodos descritos[93].

Os reagentes adquiridos comercialmente não foram submetidos a nenhuma purificação prévia.

#### 5.1.2 Cromatografia em Camada Fina (TLC)

As reações químicas foram monitorizadas por TLC, utilizando tiras de sílica-gel 0,25 mm ou tiras de óxido de alumínio em suporte de alumínio (Merck). Os cromatogramas foram revelados por luz UV ao comprimento de onda de 254 nm e em câmara de iodo (I<sub>2</sub>).

#### 5.1.3 Cromatografia em Coluna

Alguns dos compostos sintetizados foram purificados por cromatografia em coluna. Para o efeito, dependendo do composto, foram efetuadas cromatografias em coluna com sílica-gel 60 (granulometria 0,060 mesh, Merck) ou com óxido de alumínio (Macherey-Nagel) como suporte. Foram utilizadas colunas de vidro de dimensão adequada à quantidade de amostra a purificar, enchidas com uma mistura fase estacionária/eluente, escolhidos de acordo com o composto em causa, em função das suas características (polaridade). Após aplicação da amostra no topo da coluna, a eluição foi feita por ação da gravidade e os compostos recolhidos em frações de volume adequado. As frações recolhidas foram analisadas por TLC para determinar as que correspondiam ao produto pretendido. As frações que continham o produto puro foram juntas e secas sob vácuo no evaporador rotativo (Büchi) e na linha de vazio.

#### 5.1.4 Cromatografia Líquida de Alta Pressão (HPLC)

As análises por HPLC dos compostos iodados ou radioiodados (<sup>127</sup>I ou <sup>125</sup>I), bem como o estudo da sua estabilidade radioquímica foram realizadas num sistema cromatográfico equipado com uma bomba Perkin-Elmer LC 200 e com dois detetores em série: um detetor de radiação  $\gamma$  (Berthold LB-507 A), e um detetor UV (LC 290). Todos os solventes utilizados foram de

qualidade HPLC e foram previamente desaerificados com hélio. A água foi bidestilada em aparelho de quartzo e filtrada utilizando filtros millipore 0,22  $\mu\text{m}$ .

Os controlos analíticos e a purificação dos compostos radioiodados foram realizados de acordo com o seguinte método:

**Coluna:** Macherey-Nagel EC-Nucleosil 100 C<sub>18</sub> (10  $\mu\text{m}$ ; 250 mm  $\times$  4 mm)

**Pré-coluna:** Macherey-Nagel CC-Nucleosil 100 C<sub>18</sub> (5  $\mu\text{m}$ ; 8 mm  $\times$  4 mm)

**Fluxo:** 1,0 mL/min

**Deteção:** UV (254 nm) e  $\gamma$

**Eluentes:** (A) - CH<sub>3</sub>CN com 0,1% de TFA; (B) - TFA 0,1%

**Programa:** eluição isocrática dos 0 aos 35 minutos, com 60% do eluente A e 40% do eluente B.

### 5.1.5 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos em CDCl<sub>3</sub> ou CD<sub>3</sub>OD, de acordo com a solubilidade do composto em estudo, e registados em espectrómetros Varian Unity de 300 ou 400 MHz. Os espectros foram obtidos a 20 °C. Em alguns casos, a atribuição dos prótons e dos carbonos foi efetuada com base em experiências 2D (correlação <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H, COSY, e correlação heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C, HSQC). Os desvios químicos dos espectros são dados na escala  $\delta$  (ppm) e foram referenciados a partir das ressonâncias residuais do solvente deuterado relativamente ao tetrametilsilano (SiMe<sub>4</sub>, TMS).

### 5.1.6 Espectrometria de Massa por Ionização ElectroSpray (ESI-MS)

Os espectros de massa foram obtidos num espectrómetro ESI/QITMS Bruker HCT, com ionização por electroSpray. As amostras foram dissolvidas em metanol, com uma concentração aproximada de 10<sup>-4</sup> M. Estes espectros foram realizados pela Dra. Célia Fernandes, nas instalações do C<sup>2</sup>TN-IST.

### 5.1.7 Análise Elementar de C,H,N

As análises elementares de C,H,N foram efetuadas num analisador automático EA 110 CE Instruments. Estas análises foram realizadas pela Dra. Vânia Sousa, nas instalações do C<sup>2</sup>TN.

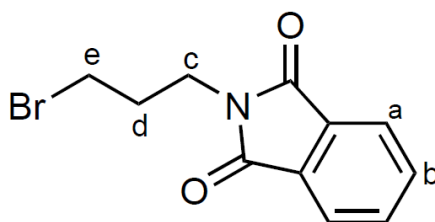


### 5.1.8 Medição da Atividade das Soluções Radioativas

A atividade das soluções de  $^{125}\text{I}$  foi medida numa câmara de ionização (Aloka, Curiemeter IGC-3) e num contador gama (Berthold, LB2111).

## 5.2 Síntese Química

### 5.2.1 Síntese de 2-(3-bromopropil)isoindol-1,3-diona (1A) [67-69]

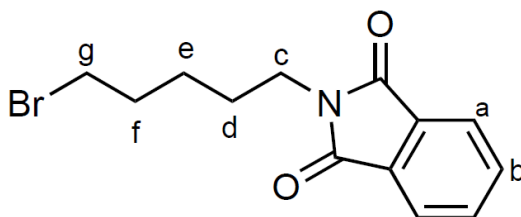


A 270 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  seco, adicionou-se 12,70 g (68,56 mmol) de ftalimida de potássio e 23,5 mL de 1,3-dibromopropano (39,70 g, 196,68 mmol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto durante 6h. De seguida, filtrou-se, lavou-se com MeOH frio e descartou-se o precipitado. Fez-se extração com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$  e concentrou-se a fase orgânica. O composto final foi purificado por coluna de sílica (eluente AcOEt:EP, 1:8), tendo-se obtido 12,68 g do composto **1C** sob a forma de óleo amarelo escuro (47,31 mmol,  $\eta = 69\%$ ).

$R_f$  (AcOEt:EP, 1:6) = 0,42.

$^1\text{H RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 2.24 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (d)); 3.40 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (e)); 3.80 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (c)); 7.73 (t, 2H, 2CH (a/b)); 7.84 (t, 2H, 2CH (a/b)).

### 5.2.2 Síntese de 2-(5-bromopentil)isoindol-1,3-diona (1B) [67-69]

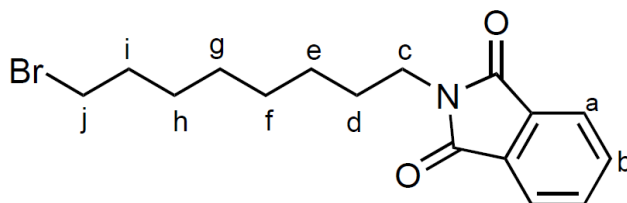


A 3 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  seco, adicionou-se 401,9 mg (2,17 mmol) de ftalimida de potássio e 887  $\mu\text{L}$  de 1,5-dibromopentano (1,50 g, 6,51 mmol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto durante 6h. De seguida, filtrou-se, lavou-se com MeOH frio e descartou-se o precipitado. Fez-se extração com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$  e concentrou-se a fase orgânica. O composto final foi purificado por coluna de sílica (eluente AcOEt:EP, 1:8), tendo-se obtido 41,0 mg do composto **1C** sob a forma de óleo amarelo escuro (0,41 mmol,  $\eta = 19\%$ ).

$R_f$  (AcOEt:EP, 1:6) = 0,42.

$^1\text{H RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 1.47 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (e)); 1.67 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (f)); 1.86 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (d)); 3.35 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (g)); 3.65 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (c)); 7.67 (t, 2H, 2CH (a/b)); 7.79 (t, 2H, 2CH (a/b)).

### 5.2.3 Síntese de 2-(8-bromooctil)isoindol-1,3-diona (**1C**) [67-69]

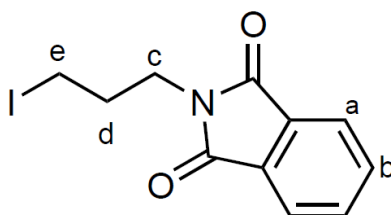


A 55 mL de  $\text{CH}_3\text{CN}$  seco, adicionou-se 6,73 g (36,32 mmol) de ftalimida de potássio e 29,60 g de 1,8-dibromooctano (108,96 mmol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto durante 6h. De seguida, filtrou-se, lavou-se com MeOH frio e descartou-se o precipitado. Fez-se extração com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{H}_2\text{O}$  e concentrou-se a fase orgânica. O composto final foi purificado por coluna de sílica (eluente AcOEt:EP, 1:8), tendo-se obtido 8,35 g do composto **1C** sob a forma de óleo amarelo escuro (24,69 mmol,  $\eta = 68\%$ ).

$R_f$  (AcOEt:EP, 1:6) = 0,40.

$^1\text{H RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 1.28 e 1.36 (m, 2+6H, 4 $\text{CH}_2$  (e, f, g, h)); 1.62 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (i)); 1.80 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (d)); 3.34 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (j)); 3.62 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (c)); 7.67 (m, 2H, 2CH (a/b)); 7.77 (m, 2H, 2CH (a/b)).

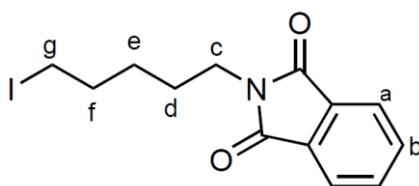
### 5.2.4 Síntese de 2-(3-iodopropil)isoindol-1,3-diona (**2A**) [67-69]



A 60 mL de acetona pré-seca, adicionou-se 3,00 g de N-(bromo-3-propil)ftalimida (11,19 mmol) e 3,13 g de KI (18,86 mmol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto durante 48 h. O precipitado formado foi separado por filtração e descartado. O filtrado foi evaporado e seco sob pressão reduzida, tendo-se obtido 3,47 g de composto **2A**, sob a forma de um sólido amarelo (11,01 mmol,  $\eta = 98\%$ ).

$R_f$  (AcOEt:EP, 1:6) = 0,38.

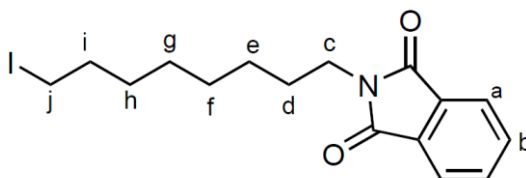
$^1\text{H RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 2.25 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (d)); 3.17 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (e)); 3.77 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (c)); 7.73 (m, 2H, 2CH (a/b)); 7.84 (m, 2H, 2CH (a/b)).

5.2.5 Síntese de 2-(5-iodopentil)isoindol-1,3-diona (**2B**) [67-69]

A 40 mL de acetona pré-seca, adicionou-se 2,02 g de N-(bromo-5-pentil)ftalimida (6,82 mmol) e 2,17 g de KI (13,07 mmol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto durante 48 h. O precipitado formado foi separado por filtração e descartado. O filtrado foi evaporado e seco sob pressão reduzida, tendo-se obtido 2,32 g de composto **2B**, sob a forma de um óleo amarelo (6,77 mmol,  $\eta = 99\%$ ).

$R_f$  (AcOEt:EP, 1:6) = 0,38.

$^1\text{H RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 1.44 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (e)); 1.69 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (f)); 1.88 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (d)); 3.18(t, 2H,  $\text{CH}_2$  (g)); 3.68(t, 2H,  $\text{CH}_2$  (c)); 7.71(t, 2H, 2CH (a/b)); 7.84(t, 2H, 2CH (a/b)).

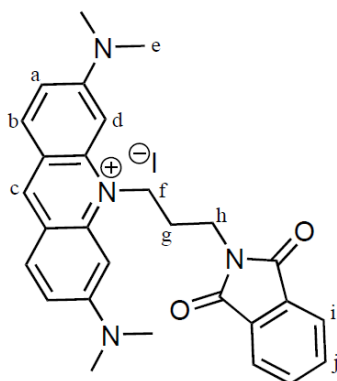
5.2.6 Síntese de 2-(8-iodooctil)isoindol-1,3-diona (**2C**) [67-69]

A 12 mL de acetona pré-seca, adicionou-se a 549,0 mg de N-(bromo-8-octil)ftalimida (1,62 mmol) e 457,0 mg de KI (2,75 mmol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto durante 48 h. O precipitado formado foi separado por filtração e descartado. O filtrado foi evaporado e seco sob pressão reduzida, tendo-se obtido 516,0 mg de composto **2C**, sob a forma de um óleo amarelo (1,33 mmol,  $\eta = 82\%$ ).

$R_f$  (AcOEt:EP, 1:6) = 0,38.

$^1\text{H RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 1.29 (m, 8H, 4 $\text{CH}_2$  (e, f, g, h)); 1.65 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (i)); 1.78 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (d)); 3.13 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (j)); 3.63 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (c)); 7.69 (t, 2H, 2CH (a/b)); 7.80 (m, 2H, 2CH (a/b)).

### 5.2.7 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(3-(1,3-dioxoisindol-2-il)propil)acridínio (3A) [67-69]

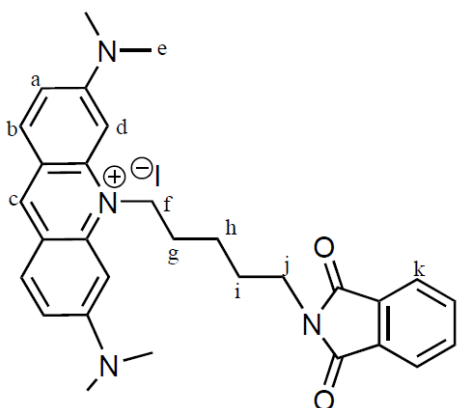


A 27 mL de *p*-xileno, adicionou-se a 513,0 mg de AO (1,93 mmol) e 1,19 g de composto **2A** (3,77 mmol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto durante 24 h. Passadas 24 h, arrefeceu-se a mistura até à temperatura ambiente e filtrou-se, tendo-se obtido 1,12 g de composto **3A**, sob a forma de um sólido vermelho escuro (1,93 mmol, rendimento quantitativo).

$R_f$  (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9) = 0,40.

<sup>1</sup>H RMN [CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)]: 2.35 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (g)); 3.29 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub> (e)); 4.13 (t, 2H, CH<sub>2</sub> (h)); 4.88 (t, 2H, CH<sub>2</sub> (f)); 6.53 (s, 2H, 2CH (d)); 7.00 (d, 2H, 2CH (a)); 7.76 (m, 2H, 2CH (b)); 7.83 (m, 4H, 4CH (i, j)); 8.58 (s, 1H, CH (c)).

### 5.2.8 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(5-(1,3-dioxoisindol-2-il)pentil)acridínio (3B) [67-69]

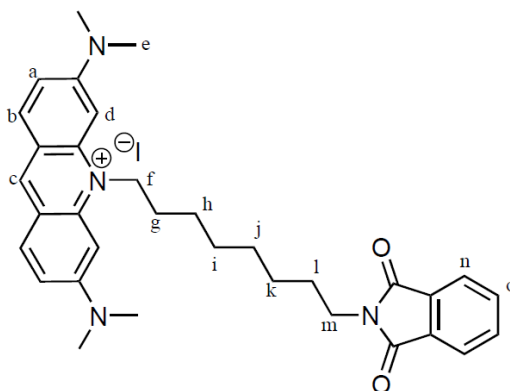


A 15 mL de *p*-xileno, adicionou-se a 280,0 mg de AO (1,05 mmol) e 665,0 mg de composto **2B** (1,94 mmol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto durante 24 h. Passadas 24 h, arrefeceu-se a mistura até à temperatura ambiente e filtrou-se, tendo-se obtido 577,0 mg de composto **3B**, sob a forma de um sólido vermelho escuro (0,95 mmol, η = 90%).

$R_f$  (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9) = 0,35.

$^1\text{H RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 1.81 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$  (g/h/i)); 2.04 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (g/h/i)); 3.31 (s, 12H,  $4\text{CH}_3$  (e)); 3.71 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (j)); 4.78 (t, 2H,  $\text{CH}_2$ , (f)); 6.57 (s, 2H, 2CH (d)); 7.01 (d, 2H, 2CH (a)); 7.67-7.87 (m, 6H, 6CH (b, k, l)) 8.61 (s, 1H, CH (c)).

### 5.2.9 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(8-(1,3-dioxoisindol-2-il)octil)acridínio (3C) [67-69]

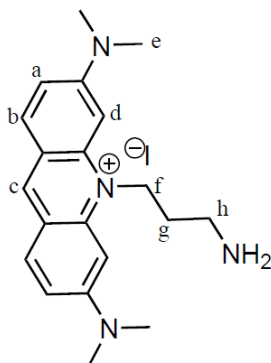


A 10 mL de *p*-xileno, adicionou-se a 176,5 mg de AO (0,67 mmol) e 516,1 mg de composto **2C** (1,33 mmol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto durante 24 h. Passadas 24 h, arrefeceu-se a mistura até à temperatura ambiente e filtrou-se, tendo-se obtido 215,0 mg de composto **3C**, sob a forma de um sólido vermelho escuro (0,33 mmol,  $\eta = 49\%$ ).

$R_f$  (MeOH: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1:9) = 0,35.

$^1\text{H RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 1.36 (m, 8H,  $4\text{CH}_2$  (h, i, j, k)); 1.62 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (l)); 1.94 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (g)); 3.31 (s, 12H,  $4\text{CH}_3$  (e)); 3.64 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (m)); 4.77 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (f)); 6.56 (s, 2H, 2CH (d)); 7.03 (d, 2H, 2CH (a)); 7.71 (d, 2H, 2CH (b/n/o)); 7.82 (d, 2H, 2CH (b/n/o)); 7.89 (d, 2H, 2CH (b/n/o)); 8.71 (s, 1H, CH (c)).

### 5.2.10 Síntese de Iodeto de 10-(3-aminopropil)-3,6-bis(dimetilamino)acridínio (4A) [67-69]



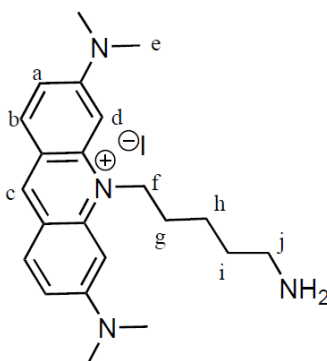
A 35 mL de MeOH seco, adicionou-se a 525,0 mg de composto **3A** (0,90 mmol) e 0,55 mL de hidrazina monoidratada (11,36 mmol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto durante 5 dias. Passados 5 dias, a mistura foi arrefecida até à temperatura ambiente. Acidificou-se com 6,5 mL de HCl 37%, filtrou-se e basificou-se as águas de lavagem com 15 mL de NaOH 4 M, até pH ~14. Evaporou-se o MeOH e extraiu-se com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Após secar a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporou-se o solvente e dissolveu-se em 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Recuperou-se para dois tubos de centrífuga, reconstituiu-se com éter dietílico até aos 40 mL e centrifugou-se 10 min a 2500 rpm. Arrefeceu-se os tubos durante 48 h a 0 °C, filtrou-se o sobrenadante e descartou-se a solução de éter dietílico. Lavou-se o filtro e os tubos com MeOH frio e recuperou-se o sólido vermelho. Evaporou-se o MeOH tendo-se obtido 405,3 mg de composto **4A**, sob a forma de um sólido vermelho (0,90 mmol; rendimento quantitativo).

$R_f$  (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9) = 0,27.

<sup>1</sup>H RMN [CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm)]: 2.04 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (g)); 2.92 (t, 2H, CH<sub>2</sub> (h)); 3.27 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub> (e)); 4.69 (t, 2H, CH<sub>2</sub> (f)); 6.64 (s, 2H, 2CH (d)); 7.18 (d, 2H, 2CH (a)); 7.78 (d, 2H, 2CH (b)); 8.17 (m, 1H, NH); 8.53 (s, 1H, CH (c)).

### 5.2.11 Síntese de Iodeto de 10-(5-aminopentil)-3,6-bis(dimetilamino)acridínio (4B)

[67-69]



A 135 mL de MeOH seco, adicionou-se a 2,02 g de composto **3B** (3,35 mmol) e 2,3 mL de hidrazina monoidratada (47,42 mmol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto durante 5 dias. Passados 5 dias, a mistura foi arrefecida até à temperatura ambiente. Acidificou-se com 25 mL de HCl 37%, filtrou-se e basificou-se as águas de lavagem com NaOH 4 M, até pH ~14. Evaporou-se o MeOH e extraiu-se com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Após secar a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporou-se o solvente e dissolveu-se em 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Recuperou-se para dois tubos de centrífuga, reconstituiu-se com éter dietílico até aos 40 mL e centrifugou-se 10 min a 2500 rpm. Arrefeceu-se os tubos durante 48 h a 0 °C, filtrou-se o sobrenadante e descartou-se a solução de éter dietílico. Lavou-se o filtro e os tubos com MeOH frio e recuperou-se o sólido vermelho.

Evaporou-se o MeOH tendo-se obtido 594,0 mg de composto **4B**, sob a forma de um sólido vermelho (1,24 mmol;  $\eta = 37\%$ ).

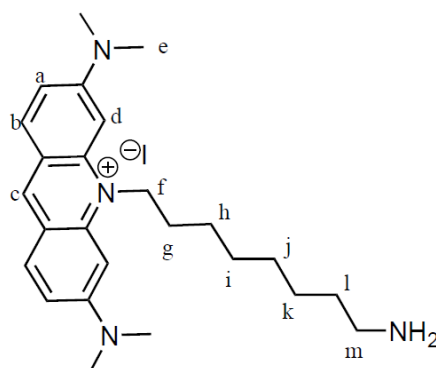
$R_f$  (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9) = 0,27.

<sup>1</sup>H RMN [CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]: 1.66 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub> (h, i)); 1.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (g)); 2.72 (t, 2H, CH<sub>2</sub> (j)); 3.28 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub> (e)); 4.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (f)); 6.51 (m, 2H, 2CH (d)); 7.15 (m, 2H, 2CH (a)); 7.79 (m, 2H, 2CH (b)); 8.54 (m, 1H, CH (c)).

<sup>13</sup>C RMN [CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]: 25.31 (CH<sub>2</sub> (h/i)); 26.70 (CH<sub>2</sub> (g)); 33.06 (CH<sub>2</sub> (h/i)); 40.93 (4CH<sub>3</sub> (e)); 42.27 (CH<sub>2</sub> (j)); 48.55 (CH<sub>2</sub> (f)); 93.48 (2CH (d)); 115.38 (2CH (a)); 118.34 (C); 134.21 (2CH (b)); 143.80 (CH (c)); 144.01 (C); 157.15 (C).

ESI-MS (MeOH): m/z (calculado) 351,8 [M]<sup>+</sup> (351.3).

### 5.2.12 Síntese de Iodeto de 10-(8-aminooctil)-3,6-bis(dimetilamino)acridínio (**4C**) [67-69]



A 65 mL de MeOH seco, adicionou-se a 1,00 g de composto **3C** (1,55 mmol) e 1 mL de hidrazina monoidratada (60,62 mmol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto durante 5 dias. Passados 5 dias, a mistura foi arrefecida até à temperatura ambiente. Acidificou-se com 12 mL de HCl 37%, filtrou-se e basificou-se as águas de lavagem com 18 mL de NaOH 4 M, até pH ~14. Evaporou-se o MeOH e extraiu-se com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Após secar a fase orgânica com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, evaporou-se o solvente e dissolveu-se em 5 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Recuperou-se para dois tubos de centrifuga, reconstituiu-se com éter dietílico até aos 40 mL e centrifugou-se 10 min a 2500 rpm. Arrefeceu-se os tubos durante 48 h a 0 °C, filtrou-se o sobrenadante e descartou-se a solução de éter dietílico. Lavou-se o filtro e os tubos com MeOH frio e recuperou-se o sólido vermelho. Evaporou-se o MeOH tendo-se obtido 444,0 mg de composto **4C**, sob a forma de um sólido vermelho (0,85 mmol;  $\eta = 55\%$ ).

$R_f$  (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9) = 0,27.

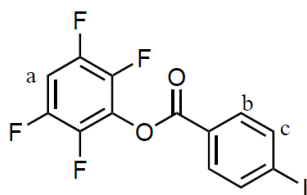
<sup>1</sup>H RMN [CD<sub>3</sub>OD,  $\delta$  (ppm)]: 1.37 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub> (i, j)); 1.49 (m, 4H, 2CH<sub>2</sub> (h, k)); 1.61 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (l)); 1.89 (m, 2CH, CH<sub>2</sub> (g)); 2.67 (t, 2H, CH<sub>2</sub> (m)); 3.25 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub> (e)); 4.54 (t, 2H,

CH<sub>2</sub> (f)); 6.49 (s, 2H, 2CH (d)); 7.15 (d, 2H, 2CH (a)); 7.78 (d, 2H, 2CH (b)); 8.51 (s, 1H, CH (c)).

<sup>13</sup>C RMN [CD<sub>3</sub>OD, δ (ppm)]: 26.88 (CH<sub>2</sub> (g)); 27.82 (CH<sub>2</sub> (l)); 27.91 (CH<sub>2</sub> (i/j)); 30.35 (CH<sub>2</sub> (h/k)); 30.49 (CH<sub>2</sub> (i/j)); 32.43 (CH<sub>2</sub> (h/k)); 40.92 (4CH<sub>3</sub> (e)); 42.08 (CH<sub>2</sub> (m)); 49.85 (f)); 93.53 (2CH (d)); 115.42 (2CH (a)); 118.36 (C); 134.23 (2CH (b)); 143.83 (CH (c)); 144.02 (C); 157.16 (C).

ESI-MS (MeOH): m/z (calculado) 393.5 [M]<sup>+</sup> (393.3).

### 5.2.13 Síntese do éster 4-iodobenzoato de tetrafluorofenilo (5) [70, 74]

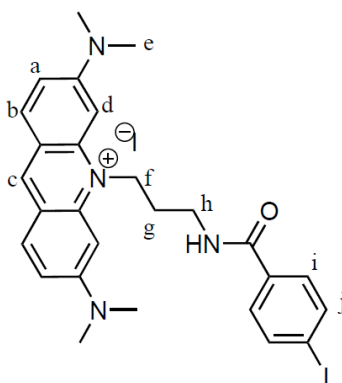


A 10 mL de 1,4-dioxano adicionou-se 500,0 mg de ácido 4-iodobenzóico (2,02 mmol), 1,2 eq. de EDC (2,42 mmol, 463,9 mg) e 1,2 eq. de tetrafluorofenol (2,42 mmol, 401,8 mg). A mistura permaneceu em agitação à t.a. durante 24 h. Fez-se extração com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O (50 mL:50 mL). A fase orgânica foi seca com MgSO<sub>4</sub>, filtrada e o solvente evaporado. Fez-se purificação por coluna de sílica-gel (eluente AcOEt:EP, 1:6) e foram obtidos 737,0 mg do composto **5**, puro, sob a forma de cristais brancos (1,86 mmol, η = 92%).

R<sub>f</sub> (AcOEt:EP, 1:6) = 0,8.

<sup>1</sup>H RMN [CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)]: 7.05(m, 1H, CH (a)); 7.92(m, 4H, 4CH (b, c)).

### 5.2.14 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(3-(4-iodobenzamida)propil)acridínio (6A)



A 9 mL de DMF, adicionou-se 405,0 mg de composto **4A** (0,90 mmol) e 320 μL de DIPEA (1,80 mmol). A mistura ficou em agitação em banho de gelo durante 30 min. Retirou-se o banho



de gelo e adicionou-se 541,0 mg do composto **5** (1,37 mmol). A mistura permaneceu em agitação à temperatura ambiente uma noite.

Após evaporar a DMF, purificou-se o produto por coluna de óxido de alumínio (eluente MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9) tendo-se obtido 342,0 mg de composto **6A**, sob a forma de um sólido vermelho (0,65 mmol; η = 72%).

R<sub>f</sub> (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9) = 0,30.

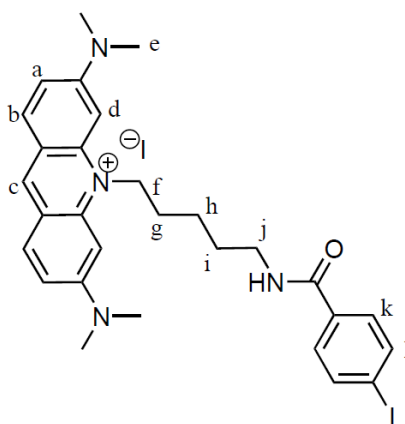
<sup>1</sup>H RMN [CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)]: 2.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (g)); 3.18 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub> (e)) 3.89 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (h)); 4.96 (t, 2H, CH<sub>2</sub> (f)); 6.67 (s, 2H, 2CH (d)); 7.01 (d, 2H, 2CH (a)); 7.75 (d, 2H, 2CH (b)); 7.83 (d, 2H, 2CH (i)); 8.15 (d, 2H, 2CH (j)); 8.41 (s, 1H, CH (c)).

<sup>13</sup>C RMN [CDCl<sub>3</sub>, δ (ppm)]: 26.07 (CH<sub>2</sub> (g)); 37.45 (CH<sub>2</sub> (h)); 41.06 (4CH<sub>3</sub> (e)); 47.17 (CH<sub>2</sub> (f)); 93.07 (2CH (d)); 98.77 (C); 114.27 (2CH (a)); 117.14 (C); 129.96 (2CH (j)); 133.01 (2CH (b)); 133.35 (C); 137.73 (2CH (i)); 142.51 (CH (c)); 142.89 (C); 155.79 (C); 167.18 (CO).

ESI-MS (MeOH): m/z (calculado) 553.2 [M]<sup>+</sup> (553.1).

CHN experimental (calculado): C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>I<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O, C 43,59 (46,66); H 4,45 (4,44); N 7,32 (8,23).

### 5.2.15 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(5-(4-iodobenzamida)pentil)acridínio (6B)



A 8 mL de DMF, adicionou-se 120,0 mg de composto **4B** (0,25 mmol) e 90 μL de DIPEA (0,50 mmol). A mistura ficou em agitação em banho de gelo durante 30 min. Retirou-se o banho de gelo e adicionou-se 150,0 mg do composto **5** (0,38 mmol). A mistura permaneceu em agitação à temperatura ambiente uma noite.

Após evaporar a DMF, purificou-se o produto por coluna de óxido de alumínio (eluente MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9) tendo-se obtido 100,0 mg de composto **6B**, sob a forma de um sólido vermelho (0,18 mmol; η = 72%).

R<sub>f</sub> (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9) = 0,40.

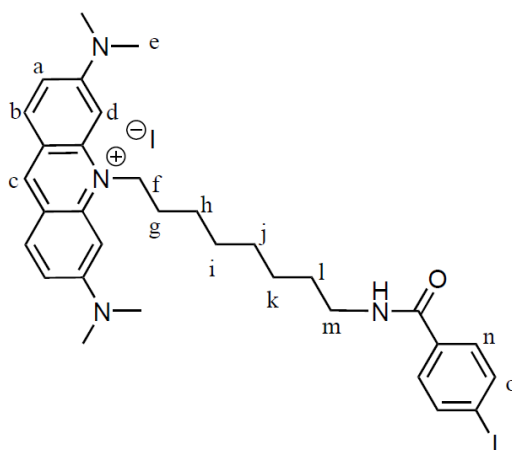
$^1\text{H RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 1.85 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (h)); 2.00 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$  (g, i)); 3.29 (s, 12H,  $4\text{CH}_3$  (e)); 3.60 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (j)); 4.78 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (f)); 6.63 (s, 2H,  $2\text{CH}$  (d)); 7.04 (d, 2H,  $2\text{CH}$  (a)); 7.76-7.80 (m, 4H,  $4\text{CH}$  (b, k)); 7.95 (d, 2H,  $2\text{CH}$  (l)); 8.20 (t, 1H, NH); 8.48 (s, 1H, CH (c)).

$^{13}\text{C RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 24.44 ( $\text{CH}_2$  (h)); 25.77 ( $\text{CH}_2$  (g/i)); 28.85 ( $\text{CH}_2$  (g/i)); 39.35 ( $\text{CH}_2$  (j)); 41.36 ( $4\text{CH}_3$  (e)); 48.39 ( $\text{CH}_2$  (f)); 93.15 ( $2\text{CH}$  (d)); 98.26 (C); 114.30 ( $2\text{CH}$  (a)); 117.19 (C); 129.90 ( $2\text{CH}$  (l)); 133.08 ( $2\text{CH}$  (b/k)); 133.87 (C); 137.51 ( $2\text{CH}$  (b/k)); 142.64 (CH (c)); 142.89 (C); 155.76 (C); 167.03 (CO).

**ESI-MS** (MeOH):  $m/z$  (calculado) 581.4 [ $\text{M}$ ] $^+$  (581,2).

**CHN experimental (calculado):**  $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{I}_2\text{N}_4\text{O}$ , C 47,64 (49,17); H 5,27 (4,84); N 8,43 (7,91).

### 5.2.16 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(8-(4-iodobenzamida)octil)acridínio (6C)



A 6 mL de DMF, adicionou-se 290,0 mg de composto **4C** (0,56 mmol) e 20  $\mu\text{L}$  de DIPEA (1,1 mmol). A mistura ficou em agitação em banho de gelo durante 30 min. Retirou-se o banho de gelo e adicionou-se 330 mg do composto **5** (0,83 mmol). A mistura permaneceu em agitação à temperatura ambiente uma noite.

Após evaporar a DMF, purificou-se o produto por coluna de óxido de alumínio (eluente  $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1:9) tendo-se obtido 70,0 mg de composto **6C**, sob a forma de um sólido vermelho (0,11 mmol;  $\eta = 20\%$ ).

$R_f$  ( $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1:9) = 0,40.

$^1\text{H RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 1.34-1.43 (m, 6H,  $3\text{CH}_2$  (i, j, k)); 1.61 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$  (h, l)); 1.85 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (g)); 3.23 (s, 12H,  $4\text{CH}_3$  (e)); 3.38 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (m)); 4.57 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (f)); 6.40 (s, 2H,  $2\text{CH}$  (d)); 6.97 (d, 2H,  $2\text{CH}$  (a)); 7.58 (d, 2H,  $2\text{CH}$  (n)); 7.73-7.78 (m, 4H,  $4\text{CH}$  (b, o)); 8.53 (s, 1H, CH (c)).

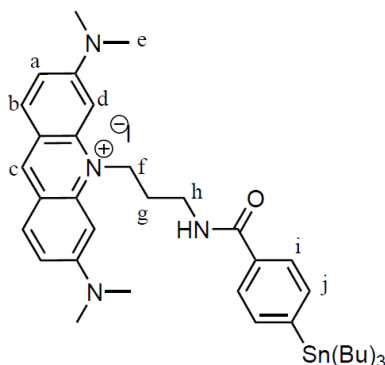
$^{13}\text{C RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 25.99 ( $\text{CH}_2$  (g)); 26.48 ( $\text{CH}_2$  (j)); 26.69 ( $\text{CH}_2$  (h/l)); 28.70 ( $2\text{CH}_2$  (i/k)); 29.03 ( $\text{CH}_2$  (h/l)); 40.05 ( $\text{CH}_2$  (m)); 41.10 ( $4\text{CH}_3$  (e)); 48.25 ( $\text{CH}_2$  (f)); 93.10 ( $2\text{CH}$  (d));

93.96 (C); 114.36 (2CH (a)); 117.31 (C); 129.82 (2CH (b/o)); 133.01 (C); 133.28 (2CH (b/o)); 134.40 (C); 137.35 (2CH (n)); 142.94 (CH (c)); 155.84 (C); 166.74 (CO).

ESI-MS (MeOH): m/z (calculado) 623,6 [M]<sup>+</sup> (623,2).

CHN experimental (calculado): C<sub>32</sub>H<sub>40</sub>I<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O, C 54,85 (51,21); H 7,29 (5,37); N 8,23 (7,47).

### 5.2.17 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(3-(4(tributilestanil)benzamida)propil)acridínio (7A)

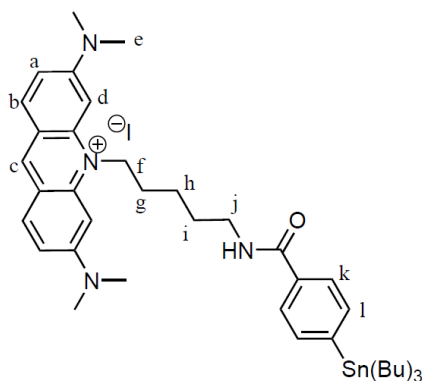


A 3 mL de DMF seca, adicionou-se a 64,0 mg de composto **6A** (0,12 mmol), 82,0  $\mu$ L de (Sn(Bu)<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0,29 mmol) e 8,56 mg de catalisador de PdCl<sub>3</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (12,32  $\mu$ mol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto uma noite. Após evaporar a DMF, purificou-se o produto por coluna de óxido de alumínio (eluente MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9), tendo-se obtido 24,0 mg de composto **7A**, sob a forma de um sólido vermelho (0,046 mmol;  $\eta$  = 38%).

R<sub>f</sub> (MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 1:9) = 0,45.

<sup>1</sup>H RMN [CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  (ppm)]: 2.28 (m, 2H, CH<sub>2</sub> (g)); 3.12 (s, 12H, 4CH<sub>3</sub> (e)) 3.90 (t, 2H, CH<sub>2</sub> (h)); 4.68 (t, 2H, CH<sub>2</sub> (f)); 6.42 (s, 2H, 2CH (d)); 6.81 (d, 2H, 2CH (a)); 7.63 (d, 2H, 2CH (j)); 7.73 (d, 2H, 2CH (b)); 8.26 (d, 2H, 2CH (i)); 8.54 (s, 1H, CH (c)); 8.81 (1H, NH).

### 2.18 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(5-(4(tributilestanil)benzamida)pentil)acridínio (7B)

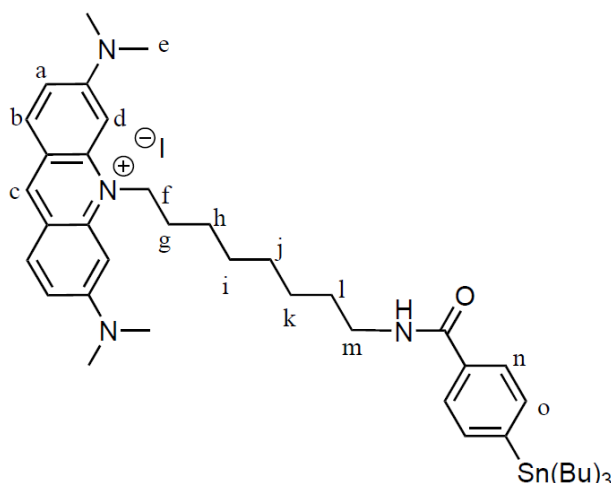


A 4 mL de DMF seca, adicionou-se a 44,0 mg de composto **6B** (0,078 mmol), 48,1  $\mu$ L de  $(\text{Sn}(\text{Bu})_3)_2$  (0,17 mmol) e 5,08 mg de catalisador de  $\text{PdCl}_3(\text{PPh}_3)_2$  (7,23  $\mu$ mol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto uma noite. Após evaporar a DMF, purificou-se o produto por coluna de óxido de alumínio (eluente  $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1:9), tendo-se obtido 49,0 mg de composto **7B**, sob a forma de um sólido vermelho (0,062 mmol;  $\eta = 79\%$ ).

$R_f$  ( $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1:9) = 0,55.

$^1\text{H RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 1.77 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (i)); 1.97 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$  (g, h)); 3.25 (s, 12H,  $4\text{CH}_3$  (e)); 3.58 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (j)); 4.69 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (f)); 6.59 (s, 2H,  $2\text{CH}$  (d)); 6.99 (d, 2H,  $2\text{CH}$  (a)); 7.53 (d, 2H,  $2\text{CH}$  (l)); 7.80 (d, 2H,  $2\text{CH}$  (b)); 8.12 (d, 2H,  $2\text{CH}$  (k)); 8.53 (s, 1H,  $\text{CH}$  (c)); 8.63 (t, 1H, NH).

### 5.2.19 Síntese de Iodeto de 3,6-bis(dimetilamino)-10-(8-(4(tributilestanil)benzamida)octil)acridínio (7C)



A 3 mL de DMF seca, adicionou-se a 50,0 mg de composto **6C** (0,080 mmol), 53,7  $\mu$ L de  $(\text{Sn}(\text{Bu})_3)_2$  (0,19 mmol) e 5,63 mg de catalisador de  $\text{PdCl}_3(\text{PPh}_3)_2$  (8,02  $\mu$ mol). A mistura refluxou sob atmosfera de azoto uma noite. Após evaporar a DMF, purificou-se o produto por coluna de óxido de alumínio (eluente  $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1:9), tendo-se obtido 39,0 mg de composto **7C**, sob a forma de um sólido vermelho (0,047 mmol;  $\eta = 59\%$ ).

$R_f$  ( $\text{MeOH}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 1:9) = 0,60.

$^1\text{H RMN}$  [ $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  (ppm)]: 1.61 (m, 8H,  $4\text{CH}_2$  (h, i, j, k)); 1.89 (m, 4H,  $2\text{CH}_2$  (g, l)); 3.25 (s, 12H,  $4\text{CH}_3$  (e)); 3.42 (m, 2H,  $\text{CH}_2$  (m)); 4.57 (t, 2H,  $\text{CH}_2$  (f)); 6.47 (s, 2H,  $2\text{CH}$  (d)); 7.00 (d, 2H,  $2\text{CH}$  (a)); 7.49 (d, 2H,  $2\text{CH}$  (o)); 7.84 (m, 4H,  $4\text{CH}$  (b, n)); 8.59 (s, 1H,  $\text{CH}$  (c)).

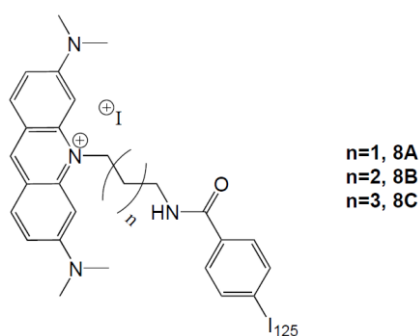
## 5.3 Radioiodação

### 5.3.1 Considerações Gerais

Todos os procedimentos que envolveram manipulação de substâncias radioativas foram realizados num laboratório com as condições exigidas pelas normas de proteção e segurança radiológica em vigor. Dentro do laboratório foi sempre utilizado dosímetro individual de corpo inteiro, que permitiu monitorizar a dose de radiação recebida pelo operador. Antes de sair do laboratório é obrigatório monitorizar os pés e as mãos num detetor de radiação adequado para esse fim.

As marcações de compostos com  $^{125}\text{I}$  foram feitas no interior de uma caixa de luvas com depressão e condições necessárias à manipulação deste radionuclídeo. O  $\text{Na}^{125}\text{I}$  "carrier-free" usado nas marcações foi adquirido à Perkin Elmer, UK, com atividade específica de 17 Ci/mg. A deteção simultânea da radiação  $\gamma$  e UV (254 nm) permitiu assegurar a recolha do produto radioiodado radioquimicamente puro e isento dos precursores. Os rendimentos radioquímicos são definidos como a razão entre a atividade do produto final e a atividade total usada na preparação do composto radioativo.

### 5.3.2 Síntese dos Compostos $^{125}\text{I}$ -6A, $^{125}\text{I}$ -6B e $^{125}\text{I}$ -6C



A uma solução dos precursores organometálicos **7A**, **7B** e **7C** (100  $\mu\text{g}$ ) em MeOH (50  $\mu\text{L}$ ) foi adicionada uma solução oxidante constituída por  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% (w/v, 50  $\mu\text{L}$ ) e HCl 1 N (50  $\mu\text{L}$ ) e  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (5 a 7  $\mu\text{L}$ ). Cada uma das misturas foi agitada com vórtex e ficou a reagir durante 10 minutos à temperatura ambiente (pH~2). A reação foi depois interrompida por adição sequencial de 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaHSO}_3$  e 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{NaHCO}_3$  (pH 6 a 7).

A mistura reacional foi extraída com AcOEt (5 $\times$ 200  $\mu\text{L}$ ), juntou-se as frações extraída de cada composto e reduziu-se o volume total sob corrente de azoto. Cada um dos compostos  $^{125}\text{I}$ -6A,  $^{125}\text{I}$ -6B e  $^{125}\text{I}$ -6C, foi purificado por HPLC com deteção simultânea da radiação  $\gamma$  e UV (254 nm), como descrito em 5.1.4. As frações correspondentes a cada um dos produtos radioiodados foram analisadas por HPLC analítico para avaliar a sua pureza radioquímica.

Para neutralizar o valor de pH de cada uma das frações recolhidas do HPLC, estas foram diluídas em H<sub>2</sub>O (10 mL) e eluídas numa *cartridge* de Sep-Pak C18. Os compostos radioiodados foram eluídos com EtOH (5×1 mL).

Todas as frações eluídas com EtOH foram caracterizadas por HPLC e comparado o tempo de retenção com os respetivos análogos iodados não radioativos **6A**, **6B** e **6C**.

### Composto <sup>125</sup>I-6A

**Atividade de marcação** = 35,67-37,37 MBq (964-1010 μCi) de Na<sup>125</sup>I

**Rendimento radioquímico** = 23,3%

**Tempo de Retenção (minutos)** = 7,81

### Composto <sup>125</sup>I-6B

**Atividade de marcação** = 33,23-33,52 MBq (898-906 μCi) de Na<sup>125</sup>I

**Rendimento radioquímico** = 32,3%

**Tempo de Retenção (minutos)** = 9,42

### Composto <sup>125</sup>I-6C

**Atividade de marcação** = 24,46-28,05 MBq (661-758 μCi) de Na<sup>125</sup>I

**Rendimento radioquímico** = 30,2%

**Tempo de Retenção (minutos)** = 16,44

## 5.3.3 Estudos de Estabilidade Radioquímica

### **Estabilidade da mistura reacional em Acetato de Etilo**

Avaliou-se a estabilidade radioquímica da mistura reacional em AcOEt. As amostras foram mantidas a 4 °C e alíquotas destas soluções foram retiradas aos 0, 2, 7, 12 e 20 dias após marcação e analisadas por HPLC.

### **Estabilidade dos compostos purificados em Etanol**

Estudou-se a estabilidade radioquímica dos compostos finais em solução etanólica. As amostras foram mantidas a 4 °C e alíquotas destas soluções foram retiradas aos 0, 2, 7, 12 e 20 dias após marcação e analisadas por HPLC.

### **Estabilidade dos compostos purificados em Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4)**

Foi também estudada a estabilidade radioquímica dos compostos purificados em tampão Tris-HCl 0,1M (pH 7,4), tampão utilizado nos ensaios com ADN. Uma amostra foi incubada a 4 °C e

outra a 37 °C. Alíquotas dessas soluções foram retiradas às 1, 2, 4 e 24 horas e analisadas por HPLC.

#### **Estabilidade dos compostos purificados em meio celular DMEM completo**

A estabilidade radioquímica dos compostos purificados foi ainda avaliada no meio de cultura celular DMEM, meio utilizado nos estudos com células. Uma amostra foi incubada a 4 °C e outra a 37 °C. Alíquotas dessas soluções foram retiradas às 0, 1, 4, 24 e 48 horas e analisadas por HPLC.

## **5.4 Avaliação Biológica**

### **5.4.1 Estudos de Interação dos Compostos Não Radioativos com o ADN**

Os espectros de UV-Vis foram traçados num espectrofotômetro Perkin-Elmer Lambda 35, à temperatura ambiente. Os espectros de fluorescência foram medidos num espectrômetro de fluorescência Horiba Jobin Yvon, modelo FL 1065, à temperatura ambiente. Os espectros de CD foram traçados num espectropolarímetro Jasco J-720 que possui um fotomultímetro UV-Visível EXEL-308 (200-700 nm), à temperatura ambiente.

As experiências de fluorescência foram feitas utilizando cuvetes de 1 cm de percurso ótico. A largura da banda foi de 5 nm na excitação e na emissão. As titulações de fluorescência foram feitas aumentando a quantidade da solução de CT-DNA (3,3 mM) adicionada à solução de fluoróforo. O espectro do solvente no qual se encontravam solubilizados os compostos (tampão Tris) foi subtraído ao espectro das amostras. As concentrações foram selecionadas de forma a obter valores de absorvância abaixo dos 0,2. Foram escolhidos comprimentos de onda de excitação próximos dos pontos isobésticos para evitar alterações muito grandes nos valores de absorvância.

**Tabela 5.1:** Condições experimentais usadas nas titulações de Fluorescência.

<b>Composto</b>	<b>5A</b>	<b>5B</b>	<b>5C</b>
<b>Concentração (µM)</b>	7	4	3.3
<b>Rácio de ADN</b>	0-7	0-13	0-15
<b><math>\lambda_{exc}</math> (nm)</b>	510	510	505
<b><math>\lambda_{em}</math> (nm)</b>	529	532	523

Às soluções dos compostos em estudo, em Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4), foi-se adicionando quantidades variáveis de uma solução de CT-ADN até não se registrar qualquer alteração nos

espectros resultantes analisados por espectroscopia de UV-Vis e fluorescência. Para os estudos de CD, foram adicionadas quantidades variáveis dos compostos em estudo (em solução em Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4)) a uma solução de CT-ADN.

O CT-ADN (Sigma) encontrava-se na forma de sal de sódio e foi utilizado sem qualquer purificação adicional. O sal de ADN foi dissolvido numa quantidade mínima de solução tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) para obter uma solução com 1 mg/mL. Após agitação durante 24 a 48 h em banho de gelo, a concentração da solução de CT-ADN, expressa por nucleótido, foi determinada por espectrometria de UV-Vis ( $\epsilon_{260\text{nm}} = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A pureza das soluções de ADN foi verificada por medição da absorvância a 260 e 280 nm, aplicando a razão  $\text{Abs}_{260\text{nm}}/\text{Abs}_{280\text{nm}}$ .

Os estudos espectroscópicos de UV-Vis, fluorescência e CD foram realizados no Centro de Química Estrutural do Instituto Superior Técnico com a colaboração da Professora Isabel Correia.

### 5.4.2 Ensaios com os Compostos Radioativos

Previamente à utilização de cada um dos compostos  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$  para os diferentes estudos *in vitro*, as frações com elevada pureza química e radioquímica foram escolhidas, o solvente foi evaporado sob corrente de azoto de baixo fluxo e o resíduo foi reconstituído na solução em que o estudo foi feito (Tampão Tris ou meio de cultura celular).

#### 5.4.2.1 Ensaios com o ADN plasmídico

A indução de quebras no ADN foi avaliada pela análise em eletroforese da conversão do ADN plasmídico da forma superenrolada para a forma circular ou forma linear.

Os compostos radioiodados  $^{125}\text{I-6A}$ ,  $^{125}\text{I-6B}$  e  $^{125}\text{I-6C}$  foram incubados com ADN plasmídico (2  $\mu\text{g}$ , ADN plasmídico  $\phi\text{X174}$  adquirido à Promega) em Tris-HCl 0,1 M (pH 7,4) durante 28 dias a 4 °C. A cada período de sete dias, retirou-se uma alíquota de 8  $\mu\text{L}$  para um microtubo onde se adicionou 5  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (Ficoll 400, 20%, EDTA, SDS, azul de bromofenol) e as amostras foram aplicadas em gel de agarose a 0,8% (AppliChem) em tampão TAE 1x (Tris-acetato-EDTA) contendo 15  $\mu\text{L}$  de corante GelRed (10 mg/mL, AppliChem) para visualização do ADN. Controlos de plasmídeo não incubado e linearizado (FL) foram incluídos no gel de agarose.

Cada eletroforese decorreu durante cerca de 2 horas a 100 V. As bandas foram visualizadas sob luz UV e as imagens capturadas digitalmente com AlphaImager EP (Alpha Innotech). A quantificação foi realizada por densitometria usando o programa AlphaView Software (Alpha Innotech). O valor obtido para a forma superenrolada foi corrigido com um factor de 1,47 para



contabilizar a baixa capacidade corante do GelRed para este tipo de conformação do ADN. Após esta correção foi calculada a fração de cada forma (FSE, FC e FL).

A análise dos dados foi realizada com o programa *Origin®*, versão 7.5 SR6 da *OriginLab Corporation*.

Estes estudos foram realizados em colaboração com a Doutora Filipa Mendes, investigadora do grupo onde o trabalho apresentado nesta tese foi realizado.

### 5.4.2.2 Ensaios com células tumorais humanas (PC-3) e de origem murina (B16-F1)

Nestes estudos utilizaram-se as linhas celulares B16-F1 de melanoma de ratinho e PC-3 do cancro humano da próstata. Os meios de cultura utilizados no cultivo destas células foram o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, contendo Glutamax-I, Invitrogen ref. 61965) e o RPMI (contendo L-glutamina, Invitrogen ref. 21875042), respetivamente para as células B16-F1 e PC-3. Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen, ref. 10270) e 1% de solução de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, Gibco, ref. 15140). As células foram mantidas numa estufa a 37 °C, numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

Sempre que as células em cultura atingiam 70 a 80% da confluência (preenchimento do fundo do frasco), eram subcultivadas pelo método usual: aspiração do meio de cultura, lavagem das células com PBS, adição de uma solução de tripsina – 0,5% EDTA (Invitrogen ref. 25300), incubação a 37 °C durante o tempo necessário para as células se soltarem do fundo do frasco, inativação da tripsina por adição de meio de cultura (3-4 vezes o volume de solução de tripsina), ressuspensão celular e distribuição/diluição das células para novo frasco de cultura. A cultura prosseguiu com mudança do meio de 2 em 2 dias.

Os estudos com células foram efetuados com a colaboração da Doutora Paula Raposinho, investigadora do grupo onde o trabalho apresentado nesta tese foi realizado.

### Ensaios $\gamma$ -H2AX

As células PC3 foram incubadas com o composto <sup>125</sup>I-6B, durante 48 horas a 37 °C. Para este efeito, efetuaram-se estudos com  $2 \times 10^4$  e  $1 \times 10^4$  células em 0,5 mL de volume de meio de cultura e incubaram-se as células com 7-8 µCi e 1,5-1,75 µCi de composto <sup>125</sup>I-6B.

Após 48 horas de irradiação com o composto <sup>125</sup>I-6B, as DSB resultantes dessa exposição foram avaliadas através da consequente resposta na fosforilação da histona H2AX (formação de focos de H2AX nos sítios de lesão). Os focos produzidos foram visualizados microscopicamente após a marcação com anticorpo específico.

As células foram fixadas em 4% formaldeído (Thermo scientific, Rockford, USA) em PBS durante 15 minutos, lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 (0,5%), à

temperatura ambiente, durante 5 minutos. Foram depois lavadas duas vezes com 1% BSA (*Bovine Serum Albumin*) e bloqueadas com 4% de BSA durante 1 hora.

Para realizar o ensaio  $\gamma$ -H2AX propriamente dito, as células foram incubadas com 2  $\mu\text{g/mL}$  do anticorpo primário  $\gamma$ -H2AX (anticorpo de rato anti- $\gamma$ -H2AX Stressgen, bioreagents corp., Canada), durante 2 horas. Lavou-se duas vezes com 1% BSA e incubou-se com 1  $\mu\text{g/mL}$  do anticorpo secundário "*FITC-conjugated goat anti-mouse*" (Santa Cruz Biotechnology, inc., USA), durante 1 hora. As células foram depois lavadas três vezes com PBS.

A detecção das DSB foi feita através da análise das células com amplificação de 63 vezes num microscópio de fluorescência (Leica DMLB, Germany), equipado com um filtro de excitação a 480/40 nm com arco curto HBO 103 W/2, lâmpada de mercúrio e filtro barreira a 527/30 nm, adaptado a uma câmara digital (Applied imaging Corp., now Genetix), ligada a um computador. As imagens das células foram selecionadas de forma aleatória e a posterior análise dos focos de  $\gamma$ -H2AX foi feita utilizando o programa Cellprofiler (Carpenter et al., 2006). Os focos/núcleos  $\gamma$ -H2AX foram contabilizados e foi calculada a fluorescência dos focos  $\gamma$ -H2AX em cada imagem, de forma a distinguir células com vários focos e células com focos grandes.

Os ensaios  $\gamma$ -H2AX foram efetuados com a colaboração da Doutora Ana Belchior, investigadora do grupo de proteção e segurança radiológica do C<sup>2</sup>TN.

### **Estudos de Viabilidade Celular/ Ensaio MTT**

O ensaio MTT foi usado para determinar a viabilidade celular de células de melanoma B16-F1, após irradiação, durante 48 horas a 37 °C, com 1-1,2  $\mu\text{Ci}$  de composto <sup>125</sup>I-6B (0,2 mL).

Os ensaios MTT foram efetuados com a colaboração da Doutora Paula Raposinho, investigadora do grupo onde o trabalho apresentado nesta tese foi realizado, de acordo com procedimentos descritos na literatura[90].

## **BIBLIOGRAFIA**

---



## BIBLIOGRAFIA

---

1. Saha G B. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 5<sup>th</sup> edition. 2003. Springer-Verlag, New York.
2. Sharp P F, Gemmell H G, Murray A D. Practical Nuclear Medicine. 3<sup>rd</sup> edition. 2005. Springer-Verlag, London.
3. Leslie H D, Greenberg I D. Nuclear Medicine. 2003. Lands Biosciences, USA.
4. Hamoudeh M, Kamleh M A, Diab R, Fessi H. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60(12):1329-1346. doi:10.1016/j.addr.2008.04.013.
5. Cornelissen B. Imaging the inside of a tumor: a review of radionuclide imaging and theranostics targeting intracellular epitopes. *J Labelled Compd and Radiopharm* 2014;57:310-316. doi:10.1002/jlcr.3152.
6. Wadsak W, Mitterhauser M. Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT. *Eur J Radiol.* 2010;73(3):461-469. doi:10.1016/j.ejrad.2009.12.022.
7. Kassis A I, Adelstein S J. Radiobiologic principles in radionuclide therapy. *J Nuc Med* 2005;46(1):4S-12S.
8. Kassis A I. Radiotargeting agents for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 2005;2(6):981-991.
9. Park J, Kim J Y. Recent Advances in Radiopharmaceutical Application of Matched-Pair Radiometals. *Curr Top Med Chem.* 2013;13(4):458-469.
10. Lee B Q, Kibédi T, Stuchbery A E, Robertson K A. Atomic Radiations in the Decay of Medical Radioisotopes: A Physics Perspective. *Comput Math Methods Med.* 2012;2012, Article ID 651475, 14 pages. doi:10.1155/2012/651475.
11. Buchegger F, Perillo-Adamer F, Dupertuis Y M, Delaloye A B. Auger radiation targeted into DNA: a therapy perspective. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2006;33:1352–1363. doi:10.1007/s00259-006-0187-2.
12. Delacroix D, Guerre J P, Leblanc P, Hickman C. Radionuclide and radiation protection data handbook. 2<sup>nd</sup> edition. 2002. Radiation Protection Dosimetry, Vol. 98, N.º1, Nuclear Technology Publishing, UK.
13. Radiation Biology: A Handbook for Teachers and Students. 2010. Vienna: IAEA. IAEA-TCS-42. ISSN 1018-5518.
14. Radionuclide Metabolic Therapy: Clinical Aspects, Dosimetry and Imaging. Vienna: EANM. ISBN 978-3-902785-08-4.

15. Howell R W. Auger processes in the 21st century. *Int J Radiat Biol.* 2008;84(12):959-975. doi:10.1080/09553000802395527.
16. Hofer K G. Biophysical aspects of Auger processes. *Acta Oncol.* 2000;39(6):651-657.
17. Tavares A A, Tavares J M. (99m)Tc Auger electrons for targeted tumor therapy: a review. *Int J Radiat Biol.* 2010;86(4):261-270. doi:10.3109/09553000903564083.
18. Feinendegen L E. The Auger effect in biology and medicine. *Nuklearmedizin.* 2012;51:161-162.
19. Howell R W. Radiation spectra for Auger-electron emitting radionuclides: report No. 2 of AAPM Nuclear Medicine Task Group No. 6. *Medical Physics.* 1992;19(6):1371-1384.
20. Kassis A I. Molecular and cellular radiobiological effects of Auger emitting radionuclides. *Radiat Prot Dosim.* 2011;143(2-4):241-247. doi:10.1093/rpd/ncq385.
21. Cambien B, Franken P R, Lamit A, Mauxion T, Fiardo P R, Guglielmi J, Crescence L, Mari B, Pourcher T, Darcourt J, Bardiès M, Vassaux G.  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  Auger mediated thyroid stunning: Dosimetric requirements and associated molecular events. *Plos One.* 2014;9(3), 10 pages.
22. Chung W J, Cui Y, Huang F Y, Tu T H, Yang T S, Lo J M, Chiang C S, Hsu I C.  $^{99m}\text{Tc}$  pyrene derivative complex causes double-strand breaks in dsDNA mainly through cluster-mediated indirect effect in aqueous solution. *Plos One.* 2014;9(9), 7 pages.
23. Kotzerke J, Punzet R, Runge R, Ferl S, Oehme L, Wunderlich G, Freudenberg R.  $^{99m}\text{Tc}$ -labeled HYNIC-DAPI causes plasmid DNA damage with high efficiency. *Plos One.* 2014;9(8), 10 pages.
24. Wicki A, Wild D, Prêtre V, Mansi R, Orleth A, Reubi J C, Rochlitz C, Mamot C, Mäcke H R, Christofori G. Synergism of peptide receptor-targeted Auger electron therapy with anti-angiogenic compounds in a mouse model of neuroendocrine tumors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2014;4(9), 13 pages.
25. Panosa C, Fonge H, Batalla M F, Menéndez J A, Massaguer A, Llorens R, Reilly R M. A comparison of non-biologically active truncated EGF (EGFt) and full-length hEGF for delivery of Auger electron-emitting  $^{111}\text{In}$  to EGFR-positive breast cancer cells and tumor xenografts in athymic mice. *Nuclear Medicine and Biology.* 2015 (*In Press Corrected Proof*). <http://dx.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2015.08.003>.
26. Leytona J V, Williams B, Gao C, Keating A, Minden M, Reilly R M. Micro SPECT/CT imaging of primary human AML engrafted into the bone marrow and spleen of NOD/SCID mice using  $^{111}\text{In}$ -DTPA-NLS-CSL360 radioimmunoconjugates recognizing the CD123+/CD131-epitope expressed by leukemia stem cells. *Leukemia Research.* 2014;38:1367-1373.
27. Sahu S K, Kortylewicz Z P, Baranowska-Kortylewicz J, Taube R A, Adelstein S J, Kassis A I. Strand breaks after the decay of Iodine-125 in proximity to plasmid pBR322 DNA. *Radiation Research.* 1997;147:401-408.

28. Kassis A I, Harapanhalli R S, Adelstein S J. Strand breaks in plasmid DNA after positional changes of Auger-emitting Iodine-125: direct compared to indirect effects. *Radiation Research*. 1999;152:530-538.
29. Lobachevsky P N, Karagiannis T C, Martin R F. Plasmid DNA breakage by decay of DNA-associated Auger electron emitters: approaches to analysis of experimental data. *Radiation Research*. 2004;162:84-95.
30. Balagurumoorthy P, Chen K, Bash R C, Adelstein S J, Kassis A I. Mechanisms underlying production of double-strand breaks in plasmid DNA after decay of <sup>125</sup>I-Hoechst. *Radiation Research*. 2006;166:333-344.
31. Balagurumoorthy P, Xu X, Wang K, Adelstein S J, Kassis A I. Effect of distance between decaying <sup>125</sup>I and DNA on Auger-electron induced double-strand break yield. *Int J Radiat Biol*. 2012;88(12):998-1008. doi:10.3109/09553002.2012.706360.
32. Pryma D A, Mandel S J. Radioiodine therapy for thyroid cancer in the era of risk stratification and alternative targeted therapies. *J Nucl Med*. 2014;55:1485-1491. doi:10.2967/jnumed.113.131508.
33. Jackson M R, Falzone N, Vallis K A. Advances in anticancer radiopharmaceuticals. *Clin Oncol*. 2013;25:604-609.
34. Barret J A, Coleman R E, Goldsmith S J, Vallabhajosula S, Petry N A, Cho S, Armor T, Stubbs J B, Maresca K P, Stabin M G, Joyal J L, Eckelman W C, Babich J W. First-in-man evaluation of 2 high affinity PSMA-avid small molecules for imaging prostate cancer. *J Nucl Med*. 2013;54(3):380-387. doi:10.2967/jnumed.112.111203.
35. Cascini G L, Asabella A N, Notaristefano A, Restuccia A, Ferrari C, Rubini D, Altini C, Rubini G, <sup>124</sup>Iodine: A longer life positron emitter isotope - New opportunities in molecular imaging. *Biomed Res Int*. 2014;2014, Article ID 672094, 14 pages.
36. Brachirolli A M, Waissmann W, Silva J B, Santos G R. Production of iodine-124 and its application in nuclear medicine. *Appl Rad Isotopes*. 2014;90:138-148.
37. Hollis B W, Kamerud J Q, Selvaag S R, Lorenz J D, Napoli J L. Determination of vitamin D status by radioimmunoassays with an <sup>125</sup>I-labeled tracer. *Clin Chem*. 1993;39(3):529-533.
38. Zuber S, Weiß S, Baaske D, Schöpe M, Stevens S, Bodis S, Zwahlen D R. Iodine-125 seed brachytherapy for early stage prostate cancer: a single institution review. *Radiation Oncology*. 2015;10(49): 10 pages. doi:10.1186/s13014-015-0349-0.
39. Wager K M, Jones G B. Radio-iodination methods for the production of SPECT imaging agents. *Curr Radiopharm*. 2010;3:37-45.
40. Walicka M A, Adelstein S J, Kassis A I. Indirect mechanisms contribute to biological effects produced by decay of DNA-incorporated Iodine-125 in mammalian cells *in vitro*: Clonogenic survival. *Radiation Research*. 1998;149:142-146.

41. Kassis A I, Walicka M A, Adelstein S J. Double-strand break yield following  $^{125}\text{I}$  decay. *Acta Oncol.* 2000;39(6):721-726.
42. Elmroth K, Stenerlöv B. DNA-incorporated  $^{125}\text{I}$  induces more than one double-strand break per decay in mammalian cells. *Radiation Research.* 2005;163:369-373.
43. DeSombre E R, Hughes A, Hanson R N, Kearney T. Therapy of estrogen receptor-positive micrometastases in the peritoneal cavity with Auger electron-emitting estrogens - theoretical and practical considerations. *Acta Oncol.* 2000;39(6):659-666.
44. Gardette M, Viallard C, Paillas S, Guerquin-Kern J, Papon J, Moins N, Labarre P, Desbois N, Chung P W, Palle S, Wu T, Pouget J, Noirault E M, Chezal J, Degoul F. Evaluation of two  $^{125}\text{I}$ -radiolabeled acridine derivatives for Auger electron radionuclide therapy of melanoma. *Invest New Drugs.* 2014;32:587-597. doi:10.1007/s10637-014-0086-5.
45. Kiess A P, Minn I, Chen Y, Hobbs R, Sgouros G, Mease R C, Pullambhatla M, Shen C J, Foss C A, Pomper M G. Auger radiopharmaceutical therapy targeting prostate-specific membrane antigen. *J Nucl Med.* 2015;56(9):1401-1407. doi:10.2967/jnumed.115.155929.
46. Mier W, Hadaschik B, Joyal J, Kopka K, Debus J, Babich J W, U. Radiation dosimetry and first therapy results with a  $^{124}\text{I}/^{131}\text{I}$ -labeled small molecule (MIP-1095) targeting PSMA for prostate cancer therapy. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2014;41:1280-1292. doi:10.1007/s00259-014-2713-y.
47. Paul A, Bhattacharya S. Chemistry and biology of DNA-binding small molecules. *Current Science.* 2012;100(2):212-231.
48. Gowda K R S, Mathew B B, Sudhamani C N, Naik H S B. Mechanism of DNA binding and cleavage. *Biomed Biotechnol.* 2014;2(1):1-9. doi:10.12691/bb-2-1-1.
49. Ihmels H, Otto D. Intercalation of organic dye molecules into double-stranded DNA - General principles and recent developments. *Top Curr Chem.* 2005;258:161-204. doi:10.1007/b135804.
50. Sarwar T, Husain M A, Rehman S U, Ishqi H M, Tabish M. Multi-spectroscopic and molecular modelling studies on the interaction of esculetin with calf thymus DNA. *Molec Biosystems.* 2015;11:522-531. doi:10.1039/c4mb00636d.
51. Sirajuddin M, Ali S, Badshah A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible spectroscopies and cyclic voltametry. *J Photochem Photobiol B: Biolog.* 2013;124:1-19.
52. Hafshejani S M, Hedley J H, Haigh A O, Pike A R, Tuite E M. Synthesis and binding of proflavine diazides as functional intercalators for directed assembly on DNA.
53. Ghirmai S. Synthesis of Organic Compounds for Nuclide Therapy. Tese de Doutorado. Uppsala University. 2004.
54. Mao F, Leung W, Xin X, inventors. US Patent 2014/0106349 A1. USA. 2014.



55. Martin R F. Induction of double-strand breaks in DNA by binding with an  $^{125}\text{I}$ -labeled acridine. *Int J Radiat Biol.* 1977;32(5):491-497.
56. Kullberg E B, Stenerlöw B, Ghirmai S, Lundqvist H, Malmström P, Orlova A, Tolmachev V, Gedda L. An aminoacridine derivative for radionuclide therapy: DNA-binding properties studied in a novel cell-free *in vitro* assay. *Int J Oncol.* 2005;27:1355-1360.
57. Lerman L S. Considerations in the interaction of DNA and acridines. *J Mol Biol.* 1961;3(1):18-30. doi: 10.1016/S0022-2836(61)80004-1.
58. Desbois N, Gardette M, Papon J, Labarre P, Maisonial A, Auzeloux P, Lartigue C, Bouchon B, Debiton E, Blache Y, Chavignon O, Teulade J, Maublant J, Madelmont J, Moins N, Chezal J. Design, synthesis and preliminary biological evaluation of acridine compounds as potential agents for a combined targeted chemo-radionuclide therapy approach to melanoma. *Bioorganic and Medicinal Chemistry.* 2008;16:7671-7690.
59. Biver T, Eltugral N, Pucci A, et al. Synthesis, characterization, DNA interaction and potential applications of gold nanoparticles functionalized with Acridine Orange fluorophores. *Dalton Trans.* 2011;40(16):4190-4199. doi:10.1039/c0dt01371d.
60. Kusuzaki K, Hosogi S, Ashihara E, Matsubara T, Satonaka H, Nakamura T, Matsumine A, Sudo A, Uchida A, Murata H, Baldini N, Fais S, Marunaka Y. Translational research of photodynamic therapy with acridine orange which targets cancer acidity. *Curr Pharm Des.* 2012;18(10):1414-20.
61. Matsubara T, Kusuzaki K, Matsumine A, Murata H, Marunaka Y, Hosogi S, Uchida A, Sudo A. Photodynamic therapy with acridine orange in musculoskeletal sarcomas. *J Bone Joint Surg Br.* 2010;92(6):760-2. doi:10.1302/0301-620X.92B6.23788.
62. Horii Z, Iwata C, Tamura Y. Reduction of phtalimides with sodium borohydride. *J Org Chem.* 1961;26(7):2273-2276.
63. Osby J B, Martin M G, Ganem B.  $\text{NaBH}_4$  Phtalimide deprotection of amines - An exceptional mild procedure. *Tetrahedron Lett.* 1984;25:2093-2096.
64. Santos P P. Química orgânica - Volume 2. 1ª edição. 2013. Coleção Ensino da Ciência e da Tecnologia, IST press. Lisboa.
65. Mume E. Radiohalogenated compounds for tumor targeting. Tese de Doutorado. Uppsala University. 2005.
66. Cliffe I A, Fletcher A, White A C, inventors. Patent WO1996001656 A1, 1966.
67. Esteves, T S A. Complexos de elementos emissores de radiação gama e de eletrões Auger para diagnóstico e/ou terapia do cancro. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa. 2011.
68. Gama S, Mendes F, Esteves T, Marques F, Matos A, Rino J, Coimbra J, Ravera M, Gabano E, Santos I, Paulo A. Synthesis and biological studies of Pyrazolyl-diamine  $\text{Pt}^{\text{II}}$  complexes

- containing polyaromatic DNA-binding groups. *Chem BioChem.*, 2012;13:2352-2362. doi:10.1002/cbic.201200472.
69. Rosa, A B. Multifunctional organometallic compounds for Auger therapy. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa. 2014.
70. Quental L A, Péptidos para a deteção de agregados de alfa-sinucleína. Tese de Mestrado. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. 2013.
71. Valeur E, Mradley M. Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem Soc Rev.* 2009;38:606-631. doi:10.1039/b701677h.
72. Clayden J, Greeves N, Warren S. Organic Chemistry. 2nd edition. 2012. Oxford University Press. UK
73. Sheehan J C, Cruickshank P A, Boshart G L. Convenient synthesis of water-soluble carbodiimides. *J Org Chem.* 1961;26:2525.
74. Lockett M R, Phillips M F, Jarecki J L, Peelen D, Smith L M. A tetrafluorophenyl activated ester self-assembled monolayer for the immobilization of amine-modified oligonucleotides. *Langmuir.* 2008;24(1):69-75. doi:10.1021/1a72493u.
75. Fuchigami T, Kobashi N, Haratake M, Kawasakyi M, Nakayama M. Syntesis and biological evaluation of radioiodinated quinacrine-based derivatives for SPECT imaging of A $\beta$  plaques. *Europ J Medicinal Chem.* 2013;60:469-478.
76. Sedlacek O, Kucka J, Mattova J, Parizek M, Studenovky M, Zadinova M, Poukova P, Hruby M. Multistage-targeted pH-responsive polymer conjugate of Auger electron emitter: Optimized design and *in vivo* activity. *Eur J Parmaceutical Sciences.* 2014;63:216-225.
77. Esteves T, Xavier C, Gama S, Mendes F, Raposinho P, Marques F, Paulo A, Pessoa J C, Rino J, Viola G, Santos I. Tricarbonyl M(I) (M = Re, <sup>99m</sup>Tc) complexes bearing acridine fluorophores: synthesis, characterization, DNA interaction studies and nuclear targeting.
78. Garbett NC, Ragazzon PA, Chaires JB. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions. *Nat Protoc.* 2007;2:3166–3172.
79. J. Costa Pessoa, I. Correia, G. Gonçalves, A.I. Tomaz, Circular dichroism in coordination compounds. *J. Argent. Chem. Soc.*, 2009;(97):151-165.
80. Chaurasiya K R, Paramanathan T, McCauley M J, Williams M C. Biophysical characterization of DNA binding from single molecule force measurements. *Phys Life Rev.* 2010;7(3):299-341. doi:10.1016/j.plrev.2010.03.001.
81. Santos N C, Prieto M, Castanho M. Quantifying molecular partition into model systems of biomembranes: An emphasis on optical spectroscopic methods. *Biochim Biophys Acta,* 2003;1612:123–135.

82. McGhee, J D, von Hippel P H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: Cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J Mol Biol.* 1974;86:469-489.
83. Lyles M B, Cameron I L, Interactions of the DNA intercalator acridine orange, with itself, with caffeine, and with double stranded DNA, *Biophys Chem.* 2002;96:53-76.
84. Kure N, Sano T, Harada S, Yasunaga T, Kinetics of the interaction between DNA and acridine orange, *Bull Chem Soc Jpn.* 1988;61:643-653.
85. Kapuscinski J, Darzynkiewicz Z, Interactions of acridine orange with double stranded nucleic acids. Spectral and affinity studies, *J Biomol Struct Dyn.* 1987;5:127-143.
86. Kishikawa H, Wang K, Adelstein S J, Kassis A I. Inhibitory and stimulatory bystander effects are differentially induced by Iodine-125 and Iodine-123. *Radiation Research.* 2006;265:688-694.
87. Kassis A I, Harapanhalli R S, Adelstein S J. Comparison of strand breaks in plasmid DNA after positional changes of Auger electron-emitting Iodine-125. *Radiation Research.* 1999;151:167-176.
88. Bishayee A, Rao D V, Bouchet L G, Bolch W E, Howell R W. Protection by DMSO against cell death caused by intracellular localization of Iodine-125, Iodine-131 and Polonium-210. *Radiation Research.* 2000;153:416-427.
89. Adelstein S J, Kassis A I. Strand breaks in plasmid DAN following positional changes of Auger-electron-emitting radionuclides. *Acta Oncol.* 1966;35(7):797-801.
90. Nicolau A, Dias N, Carvalho G S, Mota M, Lima N. Os protozoários como ferramenta da monitorização biotecnológica da poluição: Ensaio *in vitro*. *Actas da 6ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente.* Lisboa. Universidade Nova de Lisboa. 1999;2:789-798.
91. Kao J, Lavaf A, Lan C, Fu S. Inhibition of  $\gamma$ -H2AX after ionizing radiation as a biological surrogate of impaired upstream DNA damage signaling and radiosensitivity. *J Cancer Mol.* 2010;5(2)49-54.
92. Panyutin I V, Sedelnikova O A, Bonner W M, Panyutin I G, Neumann R D. DNA damage produced by <sup>125</sup>I-Triplex-Forming oligonucleotides as a measure of their successful delivery into cell nuclei. *Ann NY Acad Sci.* 2005;1058:140-150. doi:10.1196/annals.1359.022.
93. Perrin D, Armarego W. Purification of Laboratory Chemicals. 1988. 3<sup>rd</sup> edition. Oxford: Pergamon Press.