



**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química**

Projeto de Pesquisa

**SÍNTESE E MECANISMO DE AÇÃO DE COMPLEXOS DE PLATINA E OURO
COMO ANTITUMORAIS PROMISSORES**

Professora Dra. Heveline Silva

Julho/2015

1 Introdução

A quimioterapia é uma das opções para tratamento do câncer além da cirurgia e da radioterapia. Casos nos quais há necessidade de uma abordagem sistêmica recorre-se a quimioterapia cujo objetivo primário é destruir as células cancerosas, preservando as normais. Os agentes quimioterápicos em sua maioria agem interferindo na mitose celular, danificando o DNA, o que desencadeia o processo de apoptose.¹

A utilização de compostos metálicos na quimioterapia foi muito limitada até a demonstração da atividade anticancerígena de complexos contendo platina por Rosenberg e colaboradores no final dos anos 60, do século XX. O sucesso na clínica da Cisplatina e posteriormente da Carboplatina (figura 1) renovaram o interesse na química destes compostos e outros estreitamente relacionados. A cisplatina tem seu mecanismo de ação descrito pela interação da platina com as bases nitrogenadas do DNA que na ausência do reparado desencadeia o processo de apoptose celular.² Muitos problemas relacionados a não especificidade e a resistência a cisplatina motiva a busca por novos compostos com diferentes vias de entrada na célula³ bem como outros metais com novos alvos celulares⁴.

Atualmente, substâncias contendo outros metais, como o ouro, têm demonstrado um grande potencial contra diversas doenças, inclusive o câncer.⁵⁻⁸ Um exemplo é a Auranofina (figura 1), uma fosfina de ouro(I) que é usada no tratamento da artrite e que induz a apoptose celular via inibição seletiva da tioredoxina redutase mitocondrial.⁹

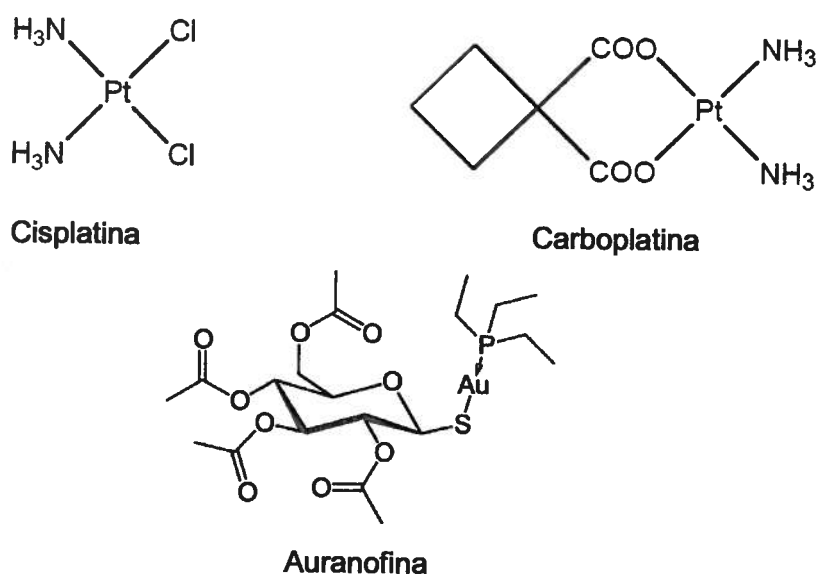


Figura 1- Compostos de platina e ouro utilizados na clínica

Estudos realizados na última década sugerem que complexos de ouro(I) apresentam ação citotóxica sobre as células tumorais e que o principal alvo é o sítio ativo da *tioredoxina redutase* mitocondrial, alterando a permeabilidade de sua membrana, induzindo a apoptose.⁹⁻¹¹ Porém não se sabe ainda como ocorre essa ligação. A variação do metal e do sítio de interação no meio biológico pode mudar a ação biológica favorecendo sua possível aplicação.

A síntese de complexos contendo moléculas orgânicas (que já apresentem alguma atividade farmacológica) estimula o desenvolvimento de novos compostos mais ativos contra o câncer e menos tóxicos para o paciente. Os ligantes devem favorecer o *uptake* celular e ainda mediar a interação do complexo com o alvo. Com tal objetivo, selecionamos derivados do adamantano^{12,13} com oxadiazol e tiazolidinas^{14,15} e pirazolininas¹⁶. Compostos adamantóides exibem atividade biológica contra alguns agentes infecciosos como bactérias e vírus, contra câncer e Mal de Parkinson e também podem ser úteis no tratamento de doenças cardíacas, circulatórias, hipertensão, dentre outras.¹⁷ Estudos indicam ação de derivados do adamantano sobre alvos mitocondriais e esperamos que possuam ação sinérgica com o ouro(I).^{18,19} Substâncias contendo os núcleos 1,3-tiazolidínicos ou 1,3,4-oxadiazolidínicos têm apresentado uma grande diversidade de atividade biológica, dentre elas podemos citar a atividade antimicrobiana, antifúngica e anti-helmíntica, estando estes núcleos presentes em diversos produtos naturais e fármacos.¹²⁻¹⁵ As pirazolininas são caracterizadas por um anel de cinco membros com dois nitrogênios, e neste projeto são derivadas de curcuminas e chalconas unindo a conhecida ação biológica destes grupos no mesmo composto. As pirazolininas em especial são reconhecidas inibidoras da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) que tem importante papel no desenvolvimento e proliferação de tumores. O que torna sua inibição uma importante estratégia antitumoral²⁰. Estes compostos são potenciais ligantes para centros metálicos como ouro e platina podendo gerar complexos bastante interessantes em termos de atividade biológica combinada.

Além destes ligantes, fosfinas serão utilizadas na intenção de aumentar a lipofilicidade e o acúmulo celular dos compostos de ouro. As fosfinas também apresentam atividades farmacológicas no mesmo alvo dos compostos de ouro como a inibição da enzima *tioredoxina redutase* ou o desencadeamento de efeitos antimitocondriais.²¹

A *tioredoxina redutase* (TrxR) é uma enzima antioxidante presente nas células de mamíferos que participa do Sistema Tiorredoxina e desempenha um importante papel no balanço redox intracelular ajudando a remover as espécies de oxigênio reativas (ROS), além de fazer parte de várias vias de sinalização.²² Essa enzima é superexpressa em muitas células de câncer e tem sido identificada como um potencial alvo de drogas

antitumorais.^{8,23} Este fato despertou muito interesse já que a busca de novos compostos com diferentes sítios de ação é uma forma de contornar a resistência adquirida pelas células tumorais aos compostos usados hoje em dia.²⁴

O mecanismo de ação dos compostos de ouro ainda não está elucidado e os resultados de atividade biológica justificam a importância do seu entendimento para que a utilização dos mesmos seja viabilizada sem ônus aos pacientes com câncer. Enquanto o mecanismo de ação dos compostos de platina é mais conhecido, seu uptake celular é variável e está relacionado ao mecanismo de resistência celular.

A proposta atual prevê a síntese de novos complexos de ouro(I) e platina(II) com derivados heterocíclicos como potenciais agentes antitumorais. Os compostos obtidos serão devidamente caracterizados, terão sua atividade antitumoral avaliada e serão utilizados como objeto de estudo do mecanismo de ação.

2 Objetivos

O principal objetivo deste projeto é estudar complexos de ouro e platina, desde sua obtenção até a avaliação do mecanismo de ação. Estes complexos serão sintetizados a partir de subunidades do oxadiazol, tiazolidina e pirazolininas. Seu mecanismo de ação será investigado em relação ao DNA, e a enzima *tioredoxina redutase* além da relação com a atividade citotóxica na intenção de avaliar o sinergismo entre ligante e metal. Para tanto iremos:

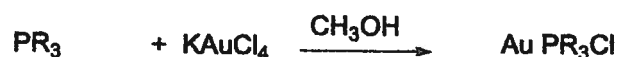
1. Sintetizar os complexos de ouro e platina com ligantes heterocíclicos;
2. Caracterizar complexos pelos métodos usuais de análise, que compreendem espectroscopia na região do IV, espectroscopia raman, análise termogravimétrica, análise elementar de C, H e N, RMN de ^1H e ^{13}C e raio X no caso de monocristais;
3. Avaliar a atividade biológica dos ligantes e dos complexos em células tumorais e não tumorais, determinar a seletividade e Concentração Inibitória de 50% do crescimento e viabilidade celular, comparados aos compostos de mesma classe utilizados na clínica (cisplatina e auranofina);
4. Avaliar a atividade dos ligantes e complexos sintetizados quanto ao potencial de inibição da enzima *tioredoxina redutase*.
5. Avaliar a interação dos compostos com o DNA por diferentes métodos como espectroscopia na região do UV e Dicroísmo Circular.
6. Avaliar a influencia dos ligantes no uptake celular destes complexos em células normais e tumorais.

3 Metodologia e Estratégias de Ação

3.1 Síntese dos complexos

Para a síntese dos complexos de platina, será utilizado K_2PtCl_4 em meio aquoso ou alcóolico (a depender do ligante), a temperatura ambiente ou sob aquecimento e agitação até o consumo total dos reagentes. As proporções poderão variar de 1:1 a 2:1 de acordo com a coordenação monodentada ou bidentada do ligante. As condições ideais serão determinadas durante o desenvolvimento do projeto.

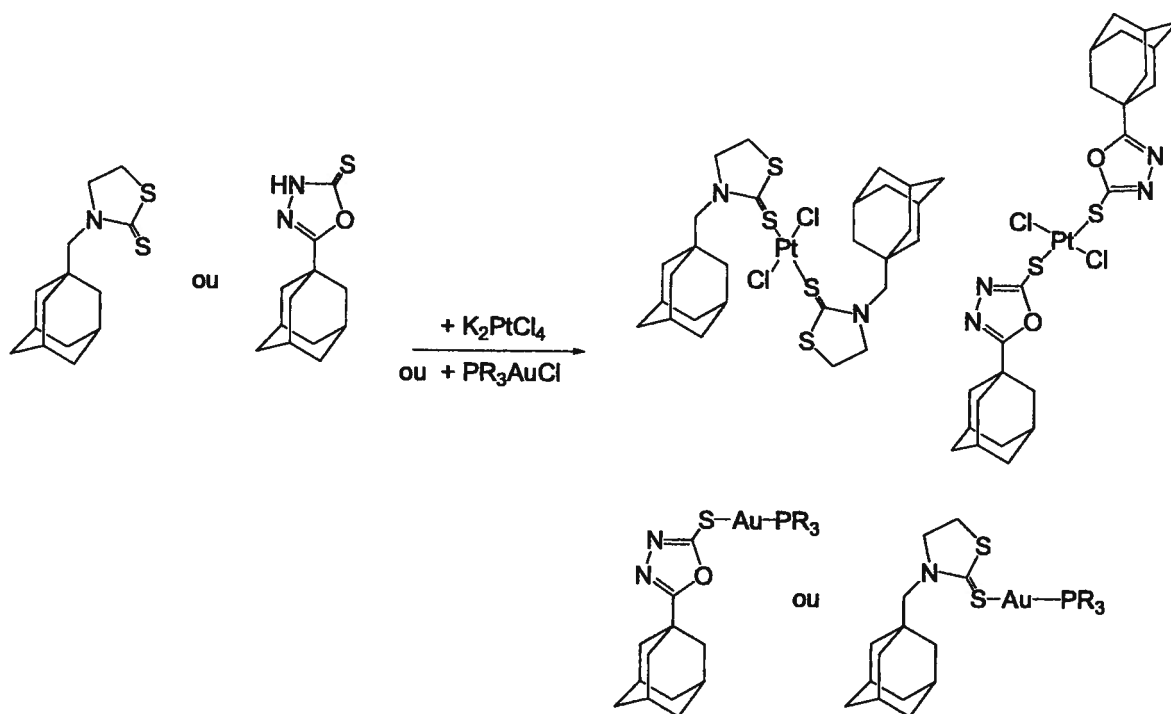
Para a síntese dos complexos contendo ouro, o sal de ouro $KAuCl_4$ será modificado pela substituição dos ligantes cloretos por fosfinas resultando na redução do ouro(III) a ouro(I) que será o complexo precursor da síntese (esquema 1). A reação de obtenção destes precursores será realizada, a princípio, em meio alcóolico sob agitação à temperatura ambiente na razão molar de 1:1 (metal:ligante). A reação deve permanecer sob agitação por cerca 24 horas. Os complexos serão obtidos na forma de precipitado.



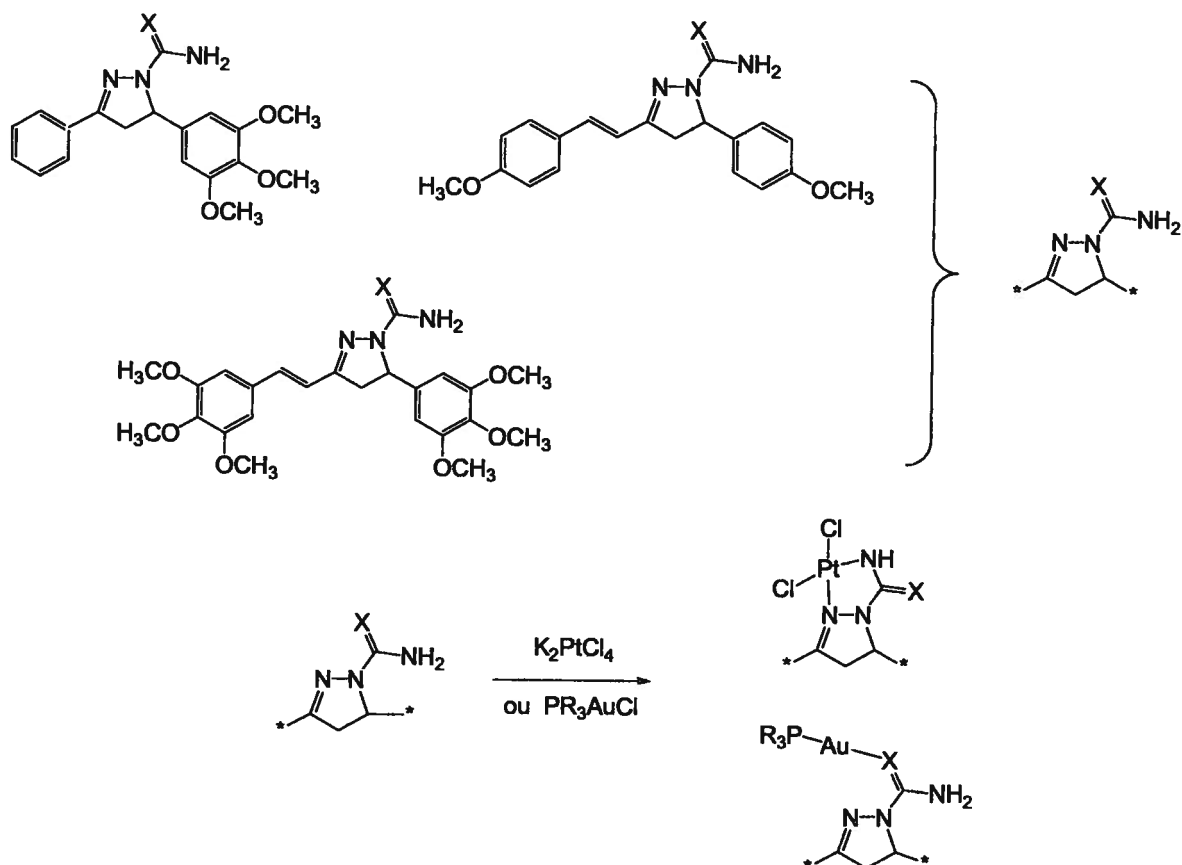
Esquema 1. Síntese dos precursores fosfinados de ouro(I).

A reação de obtenção dos complexos (esquemas 2 e 3) será realizada, a princípio, em meio alcóolico sob agitação à temperatura ambiente. Uma solução do ligante em metanol será adicionada ao precursor metálico na razão molar de 1:1 ou 2:1 (ligante:precursor). As condições ideais serão determinadas experimentalmente durante o desenvolvimento do projeto partindo de experiência prévia com estes metais^{4,25-29}.

É importante destacar que estes ligantes possuem mais de uma possibilidade de complexação e as representações nos esquemas podem não corresponder a estrutura real obtida durante o desenvolvimento do projeto. A estrutura e os modos de ligação serão identificados pelos métodos de caracterização físico-químicos e quando necessário poderá ser proposta em concordância com estudos teóricos realizados em colaboração. Especialmente nos derivados da pirazolina onde o X pode ser enxofre ou oxigênio, variações são esperadas devido à alteração considerável da afinidade pelo metal que pode influenciar nas formas de coordenação.



Esquema 2. Síntese dos complexos de ouro(I) e platina(II) com ligantes derivados de oxadiazol e tiazolidina



Esquema 3. Síntese dos complexos de ouro(I) e platina(II) com ligantes derivados de pirazolina e curcumina

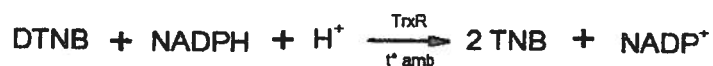
3.2 Atividade Citotóxica:

Neste trabalho serão utilizadas linhagens de células tumorais e células não tumorais a fim de avaliar não somente a atividade antitumoral, mas também a seletividade. As diferentes linhagens celulares utilizadas serão devidamente propagadas em meio de cultura, suplementado com 10% de soro fetal bovino, em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e contendo 5 % (v/v) de dióxido de carbono.

Os complexos sintetizados e os ligantes serão utilizados em diferentes concentrações e a cultura contendo os mesmos será incubada e acompanhada por 72h. A determinação da concentração inibitória de 50 % da viabilidade celular (CI_{50}) usando o método do MTT será determinada pela medida de absorvância a 570 nm num espectrofotômetro de microplacas.²⁵

3.3 Potencial de inibição da *tioredoxina redutase*:

A enzima utilizada será a *tioredoxina redutase* de fígado de rato e as soluções e reagentes serão preparadas conforme as instruções do fornecedor (Sigma Aldrich). Inicialmente a solução da enzima será diluída com tampão fosfato de potássio 1,0 mol.L⁻¹, pH 7,0. Alíquotas desta solução serão misturadas com a solução do complexo em 5% de DMF/ tampão fosfato de potássio pH 7,0 (com diferentes concentrações do complexo) ou para o controle, somente o veículo, sem o complexo. As soluções resultantes serão incubadas por 1 hora a 37°C com agitação moderada. Sobre estas soluções será adicionada a mistura reativa (10 mL da mistura contém 1mL de tampão fosfato de potássio 1mol.L⁻¹, pH 7,0; 0,20 mL de solução de EDTA 500 mmol.L⁻¹, pH 7,5; 0,80 mL de ácido ditiobisnitrobenzóico – DTNB – em etanol 63 mmol.L⁻¹; 0,10 mL de albumina bovina 20mg/mL; 0,05 mL de fosfato de dinucleotideo de adenina e nicotinamida – NADPH – 48 mmol.L⁻¹ e 7,85 mL de água). Para corrigir a formação de produto não enzimático, DMF 2,5% em tampão fosfato de potássio 1.0 mol.L⁻¹ pH 7,0 será usado como branco.^{10,29} Após a adição da solução reativa, se não houver ocorrido inibição enzimática, será formado o TNB (5-tionitrobenzol) que apresenta coloração amarela e cuja concentração pode ser medida em 412 nm (esquema 4).



Esquema 4. Consumo do DTNB pela TrxR

3.4 Interação com o DNA:

O mecanismo de ação dos complexos metálicos muitas vezes envolve interações com o DNA. Além da possibilidade de ligação direta do átomo metálico a nitrogênios das bases do DNA, existe ainda uma possibilidade de intercalação do ligante e aglomeração do DNA com complexo, o que pode gerar uma alteração no DNA favorecendo sua deformação e sucessiva condução a apoptose celular.

Para determinar tal interação usaremos o método de dicroísmo circular (DC) que ao medir diferenças na absorção da luz polarizada pelo sistema em estudo, pode indicar tanto a natureza da estrutura do DNA quanto o grau de modificação conformacional. A comparação dos espectros de DC do DNA isolado em solução e do DNA após interação com o composto de interesse (previamente incubados a 37°C em pH fisiológico) pode demonstrar significativas alterações induzidas pelo complexo metálico.

Esta etapa do projeto conta com a colaboração do professor Frédéric Frézard, do departamento de fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, que além de ter competência na área, tendo colocado a nossa disposição um espectrômetro de Dicroísmo Circular Chirascan™ de última geração.

3.5. Estudos de Uptake celular:

O uptake celular será realizado em cultura de células que serão expostas aos compostos na concentração máxima (IC_{50}) definida nos experimentos de citotoxicidade. As células serão mantidas em condições ideais de crescimento por tempos pré-fixados quando então serão lavadas e centrifugadas em solução de tampão fosfato por duas vezes. A abertura da amostra será realizada em HNO_3 e aquecimento para posterior determinação de metal por Absorção Atômica em forno de grafite.²⁶

5 Resultados e impactos esperados

Esperamos sintetizar novos complexos de ouro e platina que apresentem ação citotóxica para células tumorais e correlacionar esta atividade com o potencial de inibição da enzima *tioredoxina redutase* e a interação com DNA a fim de contribuir para elucidação do mecanismo de ação dessa classe de compostos que vem se destacando dentre os compostos biologicamente ativos.

Os resultados encontrados serão utilizados na produção de artigos científicos publicados em revistas especializadas e congressos da área. Além da formação de recursos humanos a nível de graduação e pós-graduação. Especificamente prevemos 2 alunos de iniciação científica e 1 aluno de pós-graduação. Pelo menos 2 trabalhos em congresso e 1 artigo científico publicado em revista indexada.

6 Cronograma

As atividades propostas estão listadas abaixo em períodos trimestrais.

Atividade	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°
Revisão bibliográfica												
Síntese e caracterização dos complexos												
Ensaio de citotoxicidade												
Ensaio de inibição da TrxR												
Ensaio de interação com DNA												
Ensaio de uptake												
Redação de trabalhos para congresso e artigos												

7 Financiamento

A coordenadora do projeto tem financiamento vigente do CNPq implementado em dezembro de 2014 e válido por 3 anos (455548/2014-5) e financiamento da FAPEMIG (APQ-01648/14) a ser implementado ainda em 2015 válido por 2 anos em projetos que contemplam a proposta aqui apresentada.

8 Referências Bibliográficas

1. ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; MONTANARI, C. A. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quim. Nova*, v. 28, n. 1, 118-129, 2005.
2. FONTES, A. P. S.; ALMEIDA, S. G. D. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. *Química Nova*, v. 20 (4), p. 398-406, 1997.
3. SILVA, H. et al. Heparan Sulfate Proteoglycan-Mediated Entry Pathway for Charged Tri-Platinum Compounds: differential Cellular Accumulation Mechanisms for Platinum. *Molecular Pharmaceutics*, v. 9. p. 1796-1802, 2012.
4. CHAVES, J. D. S. et al. Synthesis and cytotoxic activity of gold(I) complexes containing phosphines and 3-benzyl-1,3-thiazolidine-2-thione or 5-phenyl-1,3,4-oxadiazole-2-thione as ligands. *Inorganica Chimica Acta*. v. 414, p. 85-90, 2014.
5. NAVARRO, M. Gold complexes as potential anti-parasitic agents. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 253, n. 11-12, p. 1619-1626, 2009.
6. MCKEAGE, M. J.; MAHARAJ, L.; BERNERS-PRICE, S. J. Mechanisms of cytotoxicity and antitumor activity of gold(I) phosphine complexes: the possible role of mitochondria. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 232, n. 1-2, p. 127-135, 2002.
7. PILLARSETTY, N. et al. In vitro and in vivo antitumor properties of tetrakis((trishydroxy-methyl)phosphine)gold(I) chloride. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 7, p. 1130-1132, 2003.
8. BINDOLI, A. et al. Thioredoxin reductase: A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 253, n. 11-12, p. 1692-1707, 2009.
9. HOWELL, J. A. S. DFT investigation of the interaction between gold(I) complexes and the active site of thioredoxin reductase. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 694, n. 6, p. 868-873, 2009.
10. LESSA, J. A. et al. Gold(I) complexes with thiosemicarbazones: Cytotoxicity against human tumor cell lines and inhibition of thioredoxin reductase activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 105, n. 12, p. 1729-1739, 2011.
11. BJELOSEVIC, H. et al. Platinum(II) and gold(I) complexes based on 1,1'-bis(diphenylphosphino)metallocene derivatives: Synthesis, characterization and biological activity of the gold complexes. *Journal of Organometallic Chemistry*, v. 720, p. 52-59.
12. MANJUNATHA, K. et al. Synthesis and biological evaluation of some 1,3,4-oxadiazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 11, p. 5225-5233, 2010.
13. DELAUNAY, D.; TOUPET, L.; LECORRE, M. Reactivity of beta-amino alcohols with carbon-disulfide - study on the synthesis of 2-oxazolidinethiones and 2-thiazolidinethiones. *Journal of Organic Chemistry*, v. 60, n. 20, p. 6604-6607, 1995.

14. BEKTAS, H. et al. Antimicrobial and antiurease activities of newly synthesized morpholine derivatives containing an azole nucleus. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 8, p. 3629-3639, 2013.
15. MISRA, S.; DUBEY, B. L.; BAHTEL, S. C. Preparation, characterization and fungitoxicity of the Fe(III) complexes with mercapto azoles. **Revue Roumaine De Chimie**, v. 36, n. 9-10, p. 1161-1168, 1991.
16. KUMAR, A. K, JAYAROOPA, P. Pyrazoles: Synthetic Strategies and Their Pharmaceutical Applications-An Overview. **International Journal of Pharm Tech Research**, v. 5, n. 4, p.1473-1486, 2013.
17. HORVAT, M. et al. Evaluation of Antiproliferative Effect of N-(alkyladamantyl)phthalimides In vitro. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 79, n. 4, p. 497-506, 2002.
18. MARCHETTI, P. et al. The novel retinoid 6- 3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl -2-naphthalene carboxylic acid can trigger apoptosis through a mitochondrial pathway independent of the nucleus. **Cancer Research**, v. 59, n. 24, p. 6257-6266, 1999.
19. SUN, S. Y. et al. Augmentation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by the synthetic retinoid 6- 3-(1-adamantyl)-4-hydroxyphenyl -2-naphthalene carboxylic acid (CD437) through up-regulation of TRAIL receptors in human lung cancer cells. **Cancer Research**, v. 60, n. 24, p. 7149-7155, 2000.
20. EL-DIN, M. M. M. et al. A novel COX-2 Inhibitor Pyrazole Derivative Proven Effective as na Anti-Inflammatory and Analgesic Drug. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, p. 263-273, 2010.
21. SCHEFFLER, H.; YOU, Y.; OTT, I. Comparative studies on the cytotoxicity, cellular and nuclear uptake of a series of chloro gold(I) phosphine complexes. **Polyhedron**, v. 29, n. 1, p. 66-69, 2010.
22. HICKEY, J. L. et al. Mitochondria-targeted chemotherapeutics: The rational design of gold(I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 38, p. 12570, 2008.
23. LIU, C. et al. Enhancement of Auranofin-Induced Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cells by Selenocystine, a Synergistic Inhibitor of Thioredoxin Reductase. **Plos One**, v. 8, n. 1, 2013.
24. BARNARD, P. J.; BERNERS-PRICE, S. J. Targeting the mitochondrial cell death pathway with gold compounds. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 13-14, p. 1889-1902, 2007.
25. TAVARES, T. T. et al. Platinum(II) complexes containing long-chain hydrophobic N-alkyl-diamine ligands: Synthesis, characterization, molecular modeling and cytotoxic activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 115, p. 13-19, 2012.
26. SILVA, H. et al. Impact of the carbon chain length of novel platinum complexes derived from N-alkyl-propanediamines on their cytotoxic activity and cellular uptake. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 767-772, 2008.

27. SILVA, H. et al. Novel Platinum(II) Complexes of Long Chain Aliphatic Diamine Ligands with oxalato as leaving group. Comparative Cytotoxic Activity Relative to Chloride Precursors. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 21, n.10, p. 1961-1967, 2010.
28. SILVA, H. et al. Synthetis, Characterization, and Cytotoxic Activity of Novel Platinum(II) Complexes Derveded from N-Benzyl-Ethylenediamine and Oxalate. **Chemical Biology Drug Design**, v. 75, p. 407-411, 2010.
29. GARCIA, A. et al. Novel antitumor adamantane-azole gold(I) complexes as potential inhibitors of thioredoxin reductase. *In preparation*.