



“CAVALO DE TROIA”: Uma estratégia para o desenvolvimento de novos fármacos

Pedro H. Machado (PG)^{1,3*}, Marcos V. Palmeira-Mello (PQ)¹, Tamara Teixeira (PG)¹, Javier Ellena (PQ)², Fillipe V. Rocha (PQ)¹, Alzir A. Batista (PQ)¹, Rodrigo S. Correa (PQ)³

*pedromachadohm@gmail.com

¹ Departamento de Química - UFSCar, São Carlos – SP, ² Instituto de Física de São Carlos – USP, São Carlos – SP, ³ Departamento de Química – UFOP, Ouro Preto - MG

RESUMO

Visando o desenvolvimento de metalofármacos com propriedades anticancerígenas e menor efeitos colaterais, esse trabalho descreve a síntese, caracterização e estudos biológicos de novos complexos de Ru(II) (1-8) com moléculas bioativas, nucleosídeos e análogos, projetados como metalofármacos anticâncer *via* estratégia de "Cavalo de Troia". Os compostos foram sintetizados e caracterizados por condutividade molar, CHN, ESI-MS, voltametria cíclica, espectroscopias IV e UV-Vis, RMN (¹H, ¹³C, ³¹P{¹H}) e DRX de monocristal (para 2 complexos). A atividade citotóxica dos complexos foi avaliada contra linhagens de células tumorais e saudáveis. Os complexos C3 e C6 mostraram promissores contra células de câncer de ovário (A2780), com IC₅₀ de 1,04 µM e 0,72 µM, respectivamente, e devido a isto estudos mais avançados dos dois compostos foram realizados. Os resultados *in vitro* revelam que os compostos obtidos são promissores agentes quimioterápicos, sendo alguns deles altamente seletivos.

Palavras-chave: rutênio(II), nucleosídeos, estudos *in vitro*, mecanismo Cavalo de Troia.

Introdução

Em 2022, o câncer foi responsável por 19 milhões de casos em todo o mundo e por mais de 9 milhões de morte, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) (1).

Desde a descoberta das propriedades antitumorais da cisplatina em 1965, que ainda é muito utilizada na clínica, mas devidos aos seus efeitos colaterais, procura-se desenvolver novos complexos metálicos que possam atuar como anticâncer e apresentem menos efeitos colaterais (2). Dentre esses, vários compostos de rutênio (II), demonstraram potencial como agentes anticancerígenos e avançaram para a fase de testes clínicos (3-4).

Complexadas ao rutênio, moléculas biotivas, como nucleosídeos e análogos derivados dos ácidos nucleicos DNA e RNA, são de grande interesse por poderem agir como “Cavalo de Tróia” em células cancerígenas, sendo que alguns complexos desse estilo já se mostraram promissores como agentes antitumorais (5-7).

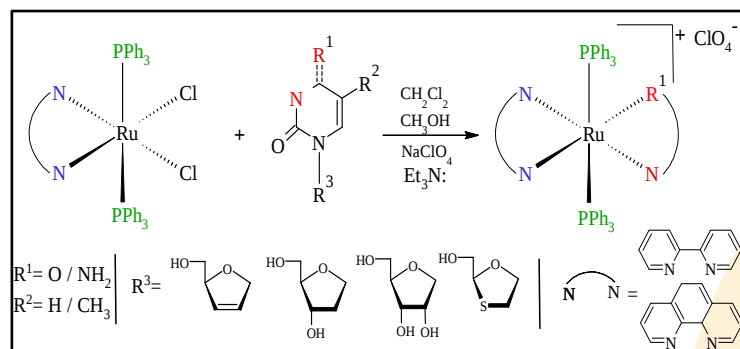
Experimental

Materiais

Os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos comercialmente da Anidrol e foram utilizados sem tratamento prévio. Os solventes deuterados foram obtidos da Sigma Aldrich. Dos reagentes usados, tricloreto de rutênio hidratado (RuCl₃.xH₂O), trietilamina (Et₃N) e ligantes estavudina (D4T), uridina (URD), timidina (TMD) e lamivudina (LAM) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A trifenilfosfina (PPh₃), 2,2'-bipiridina (bipy) a 1,10-fenantrolina (Phen) foram obtidos da Synth. Perclorato de sódio (NaClO₄) foi obtido pela Dinâmica.

Síntese dos Complexos

Os complexos foram sintetizados partindo-se dos precursores já reportados [RuCl₂(PPh₃)₂(bipy)] e [RuCl₂(PPh₃)₂(phen)] (8) usando uma proporção 3:1 diclorometano/metanol, conforme representado no esquema abaixo:



Esquema 1. Rota sintética para obtenção dos complexos C1-C8 com fórmula geral [Ru(L)(PPh₃)₂(N-N)]ClO₄, onde N-N representa 2,2'-bipiridina (bipy)/1,10-fenantrolina (Phen) e L é o ligante de interesse: nucleosídeo (timidina/uridina) e análogos (estavudina/lamivudina).



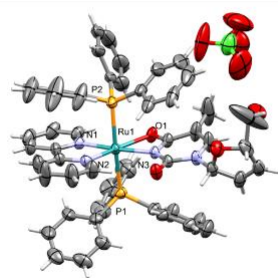
Resultados e Discussão

Os novos complexos de rutênio sintetizados (C1-C7) foram caracterizados por diversas técnicas, as quais confirmaram as estruturas propostas.

A espectrometria de ressonância magnética nuclear de fósforo dos complexos indica a formação de novos produtos apresentando um sinal simpleto relativo às duas trifenilfosfinas (PPh_3) em posição *trans*, em uma região mais desblindada do espectro em torno de (δ) 35 ppm, diferente dos precursores que apresentam sinal em (δ) 21,53 e 23,26 ppm. A voltametria cíclica mostra valores de $E_{1/2}$ em uma região mais energética dos complexos finais em relação ao complexo precursor, que indica uma maior estabilidade do complexo formado. A espectrometria de massas mostra o pico do íon molecular relativo aos complexos formados. A espectrometria de absorção na região do infravermelho mostra bandas características dos ligantes, como C=N, C=O e P-C, que indica a presença dos ligantes ao complexo. A análise elementar indica não só a formação dos complexos, bem como a pureza destes.

Cristais dos complexos C1 e C2 foram obtidos, e suas estruturas cristalinas foram coletadas. A estrutura cristalina dos complexos C1 e C2 mostrada na Figura 1.

C1



C2

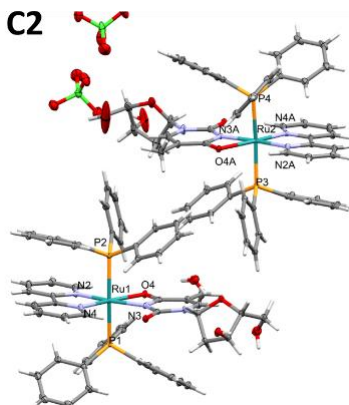


Figura 1. Estruturas cristalinas dos complexos C1 e C₂, com principais átomos rotulados e elipsoides representados com 30% de probabilidade.

Nos estudos das atividades citotóxicas dos complexos, o já reportado, similar aos sintetizados (C8), $[\text{Ru}(\text{LAM})(\text{PPh}_3)_2(\text{bipy})]\text{ClO}_4$, onde LAM é o ligante lamivudina, também foi analisado. Os complexos mostraram grande atividade e seletividade em células tumorais de ovário em comparação a referência cisplatina, como mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Tabela de valores de IC_{50} (48h) de C1-C8 e Cisplatina.

Amostras	IC_{50} ($\mu\text{M} \pm$ Standard error)							
	C1	C2	C3	C7	C4	C5	C6	C8*
A2780	0.16 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.01	1.04 $\pm$ 0.18	0.43 $\pm$ 0.01	0.12 $\pm$ 0.01	0.38 $\pm$ 0.01	0.72 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.02
MRC-5	2.14 $\pm$ 0.32	5.49 $\pm$ 1.89	>20	3.02 $\pm$ 0.27	1.36 $\pm$ 0.15	3.28 $\pm$ 0.39	>20	5.83 $\pm$ 0.99
SI	13.37	15.25	>19.23	7.02	11.33	8.63	>27.78	13.25
								2.46

* Synthesis/characterization already reported by the group.

A partir da obtenção dos valores de IC_{50} , foram escolhidos os complexos C3 e C6 que apresentam maior seletividade para dar prosseguimento a estudos mais avançados. Foram realizados estudos de interação com macromoléculas de DNA e HSA, e também ensaios morfológicos e de formação de colônia. Como o complexo

C6 se destacou em todos ensaios, foi realizado para este o ensaio de esferoides tumorais multicelulares (MCTs) 3D, onde se analisou a eficiência do complexo em células tumorais tridimensionais se observa uma diminuição do esferoide, mostrando a eficiência do composto em combater células tumorais (Figura 2).

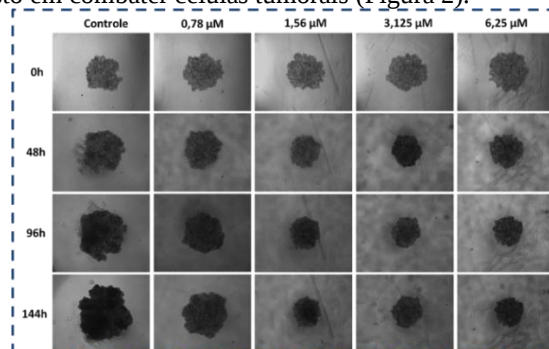


Figura 2. Representação da diminuição do esferoide tumoral em relação ao tempo, variando a concentração do complexo.

Conclusões

Sete novos complexos de rutênio foram sintetizados e caracterizados por condutância molar, análise elementar, espectrometria de massas, espectroscopia de absorção nas regiões do infravermelho e ultravioleta-visível, espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H , ^{13}C , $^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$, e difração de raios X por monocristal, para os compostos C1 e C2. A avaliação de citotoxicidade dos oito complexos foi realizada em células tumorais e saudáveis e mostraram que todos os complexos foram mais ativos e seletivos que o complexo de referência, cisplatina, na linhagem de câncer de ovário. Os complexos C3 e C6 ganharam destaque por apresentar baixo valor de IC_{50} e alta seletividade. A análise de interação com macromolécula de DNA para os compostos C3 e C6 indicaram que ocorre interação. Além disso, ensaio com esferoides 3D mostram a eficiência do complexo C6 em reduzir o tumor. Desse modo, os estudos realizados indicam que os compostos realmente se apresentam promissores como agentes quimioterápicos.

Agradecimentos

Pedro Machado agradece à CAPES e CNPq pelas bolsas de mestrado e doutorado concedidas. Os autores gostariam de agradecer aos órgãos de fomento FAPEMIG, CNPq, CAPES e FAPESP (2021/01787-0), que contribuíram direto e indiretamente para a execução deste trabalho. Gostaríamos de agradecer também às universidades envolvidas por todo o suporte durante a execução deste trabalho.

Referências

- 1 – Ferlay, J. et al. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory: Cancer Today <https://gco.iarc.fr/today> (2022).
- 2- Rosenberg, B., Van Camp, L. & Krigas, T., Nature. **1965**, 205:4972 205, 698- 699
- 3- Zeng, L. et al., **2017**. Chem Soc Rev 46, 5771–5804 .
- 4- Smithen, D. A. et al., **2017**. Inorg Chem 56, 4121–4132 (2017).
- 5- Clarke, M. J., **1978**. J Am Chem Soc 100, 5068 5075
- 6- Correa, R. S. et al., **2019**. J Inorg Biochem 198, 110751
- 7- Carvalho, D. E. L. et al., **2020**. ACS Omega 5, 122–130
- 8-Batista, A. A. et al., **2001**. Polyhedron 20, 2123–2128