1
Introdução

1.1
Câncer: aspectos gerais

O câncer é um termo genérico para um grupo de mais de 100 doenças específicas, as quais têm como principal característica o rápido surgimento de células anormais que se desenvolvem além dos seus limites habituais, podendo disseminar-se para diferentes regiões do corpo em um processo conhecido como metástase, que corresponde à principal causa de mortes por câncer. Para esta doença, são também comumente utilizados os termos tumor maligno e neoplasia (crescimento novo). [1,2]

Os primeiros relatos de enfermidades que, de acordo com suas características, poderiam ser classificadas como câncer datam do Egito antigo, há cerca de 5000 anos. Entretanto, apenas a partir do século XVIII foram encontrados, na Europa, os primeiros registros oficiais que designam o câncer como causa de morte. A partir de então, observa-se o constante aumento das taxas de mortalidade devido a esta doença, acentuadamente após o século XIX, com a chegada da industrialização. [3]

Estimativas atuais situam o câncer como a segunda maior causa de mortes no mundo, tendo sido responsável por cerca de 7,6 milhões de óbitos em 2008, o que o coloca atrás somente das doenças cardiovasculares. Projeções recentes estimam que este número crescerá ainda mais, podendo chegar a 13,1 milhões de mortes de um total de 27 milhões de casos até 2030. No Brasil, segundo estudo publicado pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer), são esperados cerca de 518.510 novos casos para o biênio 2012/2013 (Figura 1). De forma geral, observa-se uma tendência mundial de concentração dos casos (cerca de 70%) nos países de média e baixa renda. [1,2]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

Figura 1. Tipos mais incidentes de câncer por sexo no Brasil em 2012, números arredondados para 10 ou múltiplos de 10 (extraído da ref. 1).

Os fatores associados ao aparecimento do câncer podem ser externos ou internos ao organismo, estando ambos inter-relacionados. Entende-se como fatores externos hábitos pessoais (tabagismo, hábitos alimentares e sexuais, alcoolismo e medicamentos) e aqueles relacionados com o meio ambiente (fatores ocupacionais e radiação solar, por exemplo). As causas internas são, em sua maioria, geneticamente pré-determinadas (hereditárias), estando associadas, entre outras, à capacidade do organismo de se defender das agressões externas. Cerca de 80% dos casos estão relacionados a causas externas, dentre as quais o uso de tabaco representa o fator de risco de maior importância, sendo responsável por 22% do total de mortes por câncer e 71% das mortes por câncer de pulmão em todo o mundo. A infecção por alguns tipos de vírus [vírus da hepatite B e papilomavírus (HPV)] também pode contribuir para o desenvolvimento e propagação do câncer. [1,2,4,5]

As alterações genéticas associadas ao desenvolvimento do câncer ocorrem em duas classes de genes reguladores do crescimento, que estão presentes em células normais: os protooncogenes, que codificam proteínas que estimulam a divisão celular, inibem a diferenciação das células e cessam a morte celular e os genes supressores de tumor, que produzem proteínas que inibem o ciclo celular. O equilíbrio entre a atuação destes genes garante o perfeito funcionamento do ciclo celular. [6,7]

Ao serem expostos aos fatores anteriormente citados, os protooncogenes podem vir a sofrer mutações, passando então a ser denominados oncogenes. Estes oncogenes exibem aumento da produção (superexpressão) de certas proteínas, conduzindo a uma elevação da taxa de divisão celular, diminuição da diferenciação e inibição da morte celular, por meio da diminuição da ação dos genes supressores de tumor (Figura 2). Como resultado líquido, as células tumorais passam a dividir-se sem restrições, deixando de responder a sinais que

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

normalmente causam a morte celular. Uma característica importante dos oncogenes é que eles têm efeito dominante na célula, de modo que um único alelo mutado é suficiente para alterar o fenótipo de uma célula normal para maligna. [4,8,9]

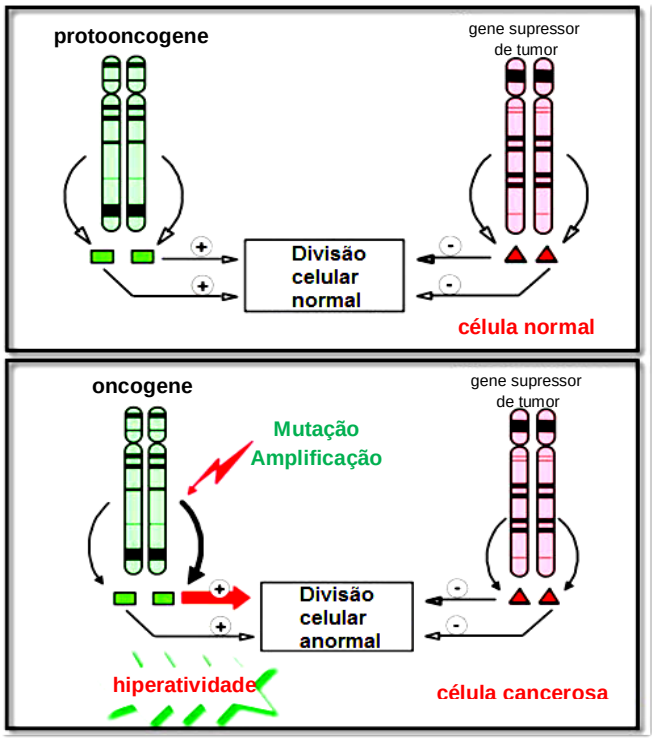

Figura 2. Alterações nos protooncogenes e o surgimento do câncer (adaptado da ref. 10).

Outra alteração do ciclo celular relacionada ao câncer envolve a atividade de uma enzima denominada telomerase, a qual é responsável pela reparação dos telômeros, segmentos de DNA contendo repetições não-codificantes de pares de bases, que mantêm a estabilidade estrutural e protegem a extremidade dos cromossomos. Esta enzima encontra-se ativa em células germinativas, progenitoras e também tumorais. Em células normais, os telômeros sofrem desgaste devido aos sucessivos ciclos de reprodução celular, de modo que as extremidades dos cromossomos tornam-se mais curtas até que seja atingido um limite mínimo, culminando com a morte da célula. Nas células cancerosas, esse limite é transposto devido à superexpressão da telomerase, o que leva à reposição constante dos telômeros, mantendo-os sempre com o tamanho original e permitindo, assim, que as células se dividam continuamente, tornando-se virtualmente imortais. Cerca de 90% das neoplasias humanas apresentam altas taxas de expressão da telomerase. [11,12,13]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

O desenvolvimento de uma neoplasia maligna acontece em um processo de múltiplos estágios, caracterizado por uma progressão de alterações genéticas de uma única linhagem celular. No estágio de iniciação, uma alteração no DNA, causada pela exposição a um agente carcinogênico, leva à mutação em uma célula somática. Esta mutação é transmitida ás células descendentes, que continuam sob a ação do agente carcinogênico, distinguindo o estágio de promoção. No último estágio, a progressão, verifica-se a instalação do câncer e proliferação descontrolada das células tumorais. Estas, em geral, são menos especializadas que as correspondentes normais, de modo que, à medida que substituem progressivamente as células sadias, o tecido invadido vai perdendo funcionalidade. [4,14,15]

1.1.2
Estratégias de combate ao câncer

A grande taxa de incidência e mortalidade do câncer tem motivado a busca por novos tratamentos, mais eficientes e com menos efeitos adversos (mais seletivos). Porém, nenhuma alternativa até hoje se mostrou capaz de destruir células cancerosas sem afetar tecidos normais do organismo.

Os tratamentos disponíveis atualmente caracterizam-se pelo seu elevado custo e índice terapêutico relativamente baixo. As técnicas disponíveis envolvem procedimentos como a cirurgia, através da qual é possível remover eficientemente os tumores quando não há metástase, e a radioterapia, que é capaz de diminuir tumores, assim como a ocorrência de metástases, em combinação com a cirurgia. As técnicas citadas, entretanto, constituem estratégias locais de tratamento. A quimioterapia se faz necessária em 60-70% dos casos, devido há formação de micrometástases. [16]

O tratamento quimioterápico envolve a exposição do corpo a agentes químicos que atingem as células cancerosas de forma mais eficiente que as células dos tecidos normais, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos dessas duas populações celulares. A maioria dos agentes quimioterápicos atua de forma não específica, lesando também as células normais, particularmente aquelas de rápido crescimento, como as da mucosa gastrointestinal, capilares e do sistema imunológico, acarretando diversos efeitos colaterais. A quimioterapia faz uso tanto de compostos

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

orgânicos, como o taxol e a vimblastina, quanto de complexos metálicos tais como a cisplatina e a carboplatina. [4,17,18]

1.2
Compostos inorgânicos na terapia do câncer: re-descoberta da cisplatina

O uso farmacêutico de compostos inorgânicos, notadamente aqueles contendo metais, esteve bastante limitado até o início da década de 60, quando as propriedades antitumorais da *cis*-diaminodicloroplatina(II), comumente conhecida como cisplatina, foram descobertas. [19]

A síntese da cisplatina foi descrita pela primeira vez por Michele Peyrone em 1845, tendo, por esse motivo, o composto ficado conhecido durante anos como cloreto de Peyrone. Um ano antes, Reiset havia sintetizado um composto de mesma fórmula molecular. Somente em 1893, quase meio século após sua síntese, Werner publicou um importante estudo no qual identificou que os complexos anteriormente descritos eram, na verdade, isômeros, com o complexo sintetizado por Reiset correspondendo à forma *trans* e o descrito por Peyrone, ao isômero *cis* (Figura 3). [17,20]

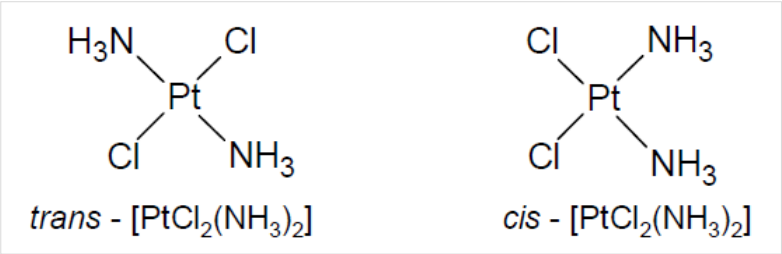

Figura 3. Estruturas representativas dos isômeros *trans* e *cis*-diaminodicloroplatina(II).

Entretanto, apenas em 1965, mais de cem anos após a síntese de Peyrone, as propriedades antitumorais da cisplatina foram acidentalmente descobertas pelo físico americano Barnett Rosenberg e seus colaboradores. Ao realizar experimentos a fim de verificar o efeito de um campo elétrico sobre uma cultura de bactérias *Escherichia coli*, Rosenberg verificou que a divisão celular foi inibida e, como as células não podiam se dividir, cresciam formando filamentos alongados. Rosenberg concluiu que a platina do eletrodo se dissolvia no meio de cultura, composto por cloreto e sais de amônio, dando origem a espécies complexas do metal, as quais eram responsáveis pela atividade.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

Inicialmente, acreditou-se que a indução do crescimento filamentoso em *Escherichia coli* se devia à formação da espécie complexa $(NH_4)_2[PtCl_6]$; todavia, verificou-se mais tarde a ocorrência de uma reação fotoquímica que levava à substituição de Cl^- por NH_3 na esfera de coordenação da platina. [17,21,22] Os primeiros testes frente a células tumorais foram apenas uma questão de tempo e os resultados obtidos, promissores.

Estudos posteriores demonstraram que apenas a forma *cis* era responsável pela atividade antitumoral verificada, sendo a forma *trans*, portanto, inativa. Testes em camundongos mostraram que o composto era capaz de inibir completamente células de sarcoma 180 e leucemia L1210, usadas como modelos em testes farmacológicos.

Os primeiros testes clínicos tiveram início já no começo da década de 70. Primeiro, com pacientes terminais e, mais tarde, em portadores de tumores localizados de ovário e testículo. Em 1978, a cisplatina teve seu uso aprovado pela agência Norte Americana FDA (Food and Drug Administration). [17]

Hoje em dia, a cisplatina é usada no tratamento de um em cada dois pacientes portadores de câncer (geralmente em combinação com outras drogas), com uma taxa de cura de mais de 90% para o câncer testicular, além de alta atividade contra câncer de ovário, colo do útero, cabeça e pescoço, e carcinoma da bexiga. [23]

Outros íons metálicos também têm sido estudados com relação à sua potencial atividade antiproliferativa, como é o caso do gálio(III), titânio(IV) e cobre(II), que já demonstraram importantes resultados frente a linhagens tumorais *in vitro* e *in vivo*, sendo que compostos dos dois primeiros metais encontram-se atualmente em fase de testes clínicos. [24,25]

O primeiro complexo não platinado a entrar em fase de testes clínicos foi o complexo de titânio *cis*-dietóxibis(1-fenilbutano-1,3-dionato)titânio(IV) ou budotitânio. [26] Posteriormente, o dicloreto de titanoceno (Figura 4) também foi aprovado para testes de fase clínica I, tendo apresentado atividade frente a uma ampla gama de linhagens tumorais. Porém, testes de fase II revelaram, como efeito colateral, nefrotoxicidade, assim como baixa eficácia contra carcinomas retal e de mama metastáticos. [27]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

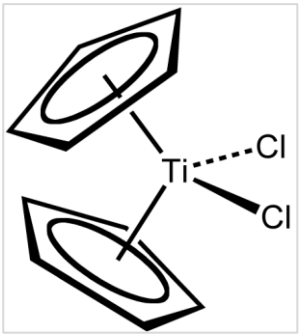

Figura 4. Estrutura molecular do dicloreto de titanoceno.

Atrás somente da platina, o gálio é o metal mais utilizado para o tratamento do câncer. Testes clínicos de fase II demonstraram atividade frente a carcinoma de bexiga e linfoma e, em associação com outras drogas, também foi verificada atividade frente a linhagens resistentes à cisplatina. [28] Os primeiros sais de gálio estudados foram o cloreto e nitrato de gálio, tendo o maltolato de gálio, [Ga^{III}(maltolato)$_3$] demonstrado maior absorção oral que o nitrato do metal, além de relevante atividade antineoplásica. O composto de gálio com maior potencial para se tornar um fármaco antineoplásico é o [Ga^{III}(quinolinolato)$_3$], tendo sido obtidos resultados expressivos frente a células de carcinoma retal e pulmonar humano. Acredita-se que este composto atue por inibição da ribonucleotídeo redutase. [25,29]

Os antitumorais de cobre(II) serão abordados posteriormente.

1.3
Cisplatina

1.3.1
Mecanismo de ação e entrada na célula

A cisplatina é administrada aos pacientes via injeção intravenosa em solução salina aquosa, devido à sua baixa solubilidade em água [30]. Por ser altamente polar, a cisplatina entra nas células de forma relativamente lenta. A sua captação sofre influência de fatores tais como o sódio e as concentrações de íons potássio, pH, e a presença de agentes redutores. [31]

Acredita-se que, no plasma sanguíneo, o composto permaneça na sua forma neutra, em virtude da alta concentração de íons cloreto (≈100 mM), que suprime a formação de mono e diaquo *cis*-Pt(II) espécies, em que um ou ambos

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

os grupos cloreto são substituídos por moléculas de água [32,33]. Em contraste, no meio intracelular, a baixa concentração de cloreto (≈4 mM) faz com que o fármaco sofra sucessivas reações de hidrólise dando origem às espécies ativadas. $[Pt(NH_3)_2Cl(OH_2)]^+$ e $[Pt(NH_3)_2(OH_2)_2]^{2+}$ (Figura 5). A espécie diaquo é muito reativa com relação a centros nucleófilos de biomoléculas devido à água ser muito melhor grupo de saída que o Cl^-. [20,32] Estes aquocomplexos, entretanto, também reagem prontamente com outras biomoléculas, o que acarreta efeitos colaterais indesejados.

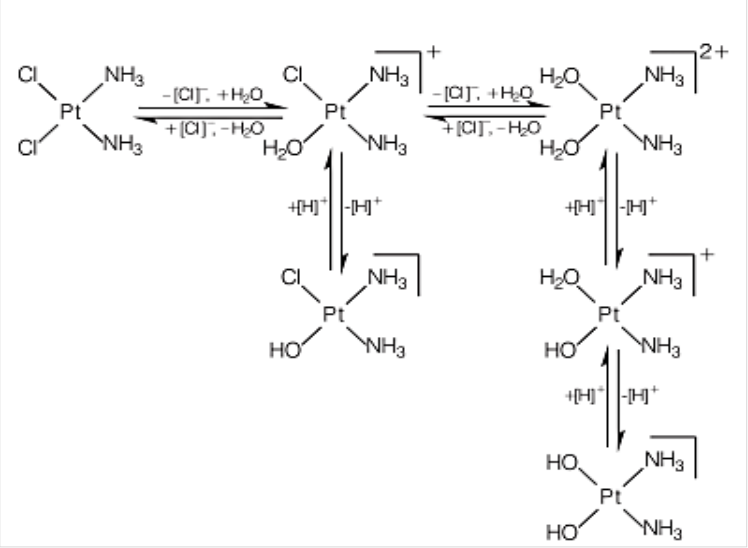

Figura 5. Possíveis vias para a reação de hidrólise da cisplatina (extraído da ref. 19).

Os mecanismos bioquímicos através dos quais se dá a entrada do fármaco no meio intracelular ainda estão sob investigação, porém, durante muito tempo, a difusão passiva foi considerada o principal meio pelo qual a cisplatina atravessa a membrana celular. Estudos posteriores demonstraram também a participação do mecanismo de transporte ativo mediado por transportadores de cobre (Ctr1) e transportadores catiônicos orgânicos (TCO); porém, detalhes sobre o envolvimento destes transportadores ainda precisam ser esclarecidos (Figura 6). [20, 34, 35]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

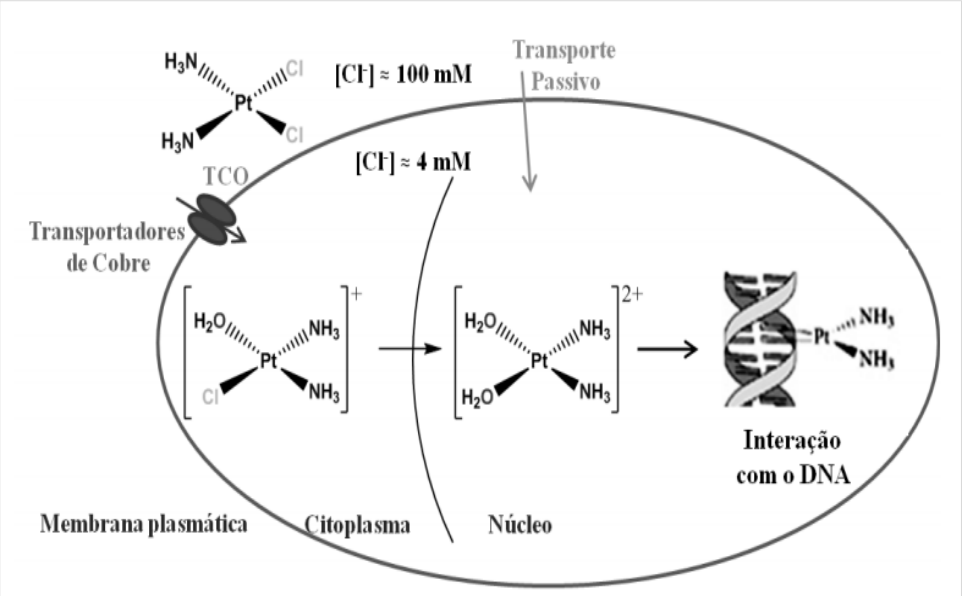

Figura 6. Esquema da entrada da cisplatina (cis-DDP) na célula, o processo de hidrólise e sua posterior interação com o seu principal alvo: o DNA (extraído da ref. 20).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

O modo através do qual o complexo cis-DDP se coordena no organismo ainda é objeto de muitos estudos. Contudo, é amplamente aceito que a atividade biológica exibida se deve à ligação ao DNA, configurando uma lesão a nível molecular. Apenas 1% da cisplatina administrada se liga efetivamente ao DNA. [36,37]

Teoricamente, a interação da platina com o DNA pode ocorrer em qualquer posição onde exista um par de elétrons livres. Porém, ligações com os átomos de oxigênio do açúcar são raramente observadas. Evidências demonstram a existência de uma preferência do fragmento $Pt(NH_3)_2$ pelos átomos de N7 das bases púricas (guanina ou adenina), devido à maior acessibilidade destas quando comparada à dos demais átomos de nitrogênio envolvidos em interações de hidrogênio intermoleculares, que mantêm a estrutura de dupla hélice do DNA. O maior caráter nucleofílico desses nitrogênios também é responsável por essa ligação preferencial da platina. [19,20]

Os adutos formados geram significativas distorções na dupla hélice do DNA, causando desenovelamento e torção da sua estrutura e induzindo a apoptose (morte celular programada). O principal aduto cis-DDP/DNA formado resulta de uma ligação cruzada 1,2-intrafita entre a platina(II) e duas bases adjacentes [G-G, 60% (a) ou A-G, 20% (c)]. A platina pode ligar-se também a átomos de duas bases que se encontram em diferentes fitas [interação interfitas

(e)], a uma fita do DNA e uma proteína (d) ou a duas bases não adjacentes [ligação cruzada 1,3-intrafita (b)] (Figura 7). [19,20]

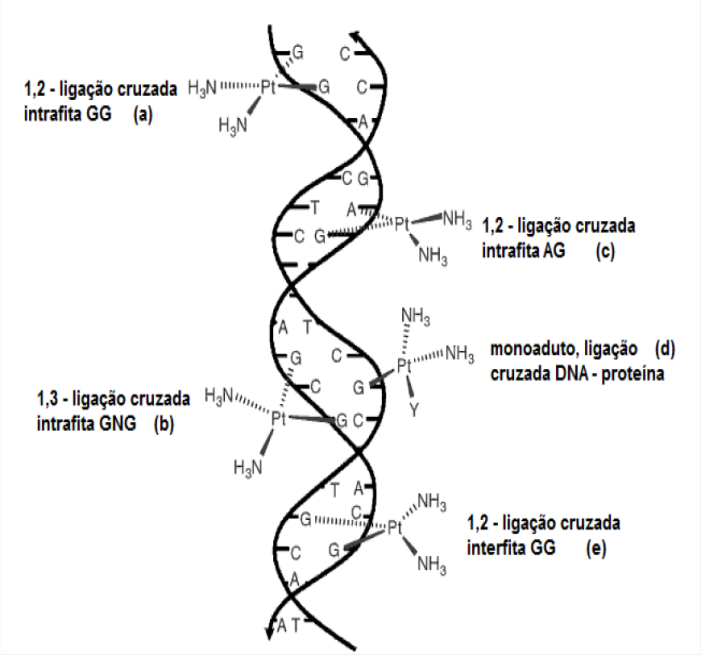

Figura 7. Possíveis modos de ligação entre a cisplatina e o DNA (extraído da ref. 38).

Outro fator relacionado à ação da cisplatina está associado ao reconhecimento dos adutos formados com a platina por proteínas específicas pertencentes à classe HMG (High Mobility Group), capazes de se ligar ao DNA alterado pela cisplatina e levando à indução de apoptose. [20]

1.3.2
Toxicidade e mecanismos de resistência à cisplatina

A cisplatina é um dos agentes quimioterápicos mais ativos disponíveis para o tratamento de uma variedade de doenças malignas. No entanto, a utilidade clínica do fármaco é limitada por considerações tanto toxicológicas (nefro e neurotoxicidade e danos à mucosa do trato intestinal) quanto de resistência. [39]

Diversos fatores podem ser atribuídos à resistência adquirida à cisplatina, entre eles a desativação do fármaco por proteínas e peptídeos contendo enxofre no plasma, tais como ocorrência de reparo no DNA danificado, diminuição do acúmulo na célula e aumento do efluxo. [20, 39] Antes mesmo de ingressar na

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

célula, a cisplatina pode ligar-se a fosfolipídios da membrana celular, além dos muitos potenciais sítios de ligação existentes no citoplasma, incluindo o RNA. [40] A espécie aquo ativada da cisplatina reage preferencialmente (cerca de 90%) com espécies contendo elevados níveis de enxofre (como a cisteína, glutationa e as metalotioneínas), em detrimento do DNA. Em algumas células cancerosas resistentes à platina, verificam-se níveis elevados destas substâncias, de modo que a platina ativada reage com as mesmas antes que possa se ligar ao DNA, gerando efeitos adversos e resistência. [31]

Uma vez formados, os adutos cisplatina-DNA também podem ser reparados. As enzimas reparadoras são capazes de reconhecer o DNA, promovendo a quebra e substituição por fitas não alteradas das fitas modificadas pela ligação à platina. [41]

1.3.3
Análogos da cisplatina de segunda e terceira geração

Nos últimos anos, grande número de análogos da cisplatina foram sintetizados com o intuito de se superar os efeitos colaterais e de resistência aos compostos de platina, tanto intrínsecos quanto adquiridos. [40] Uma das estratégias utilizadas foi a substituição dos cloretos da cisplatina por outros grupos abandonadores: visto que a toxicidade da droga está relacionada à velocidade com que os grupos de saída são substituídos por moléculas de água, quanto mais lábil for o ligante, mais tóxico será o composto em questão. [42]

A carboplatina foi o segundo fármaco platinado a receber aprovação pela FDA para uso clínico, a partir de 1985. [20] A presença de um dicarboxilato como grupo abandonador, em lugar dos íons cloreto, confere maior solubilidade ao complexo, que também é mais estável devido ao efeito quelato. [40] Ao contrário da cisplatina, a carboplatina é essencialmente desprovida de nefrotoxicidade, e é também menos tóxica para o trato gastrointestinal e o sistema nervoso. Contudo, os adutos formados pela carboplatina com o DNA são essencialmente os mesmos formados da cisplatina. Em contrapartida, são necessárias doses 20 a 40 vezes mais elevadas de carboplatina que de cisplatina para se atingir o efeito desejado. [31]

Na oxaliplatina, o primeiro complexo de platina capaz de superar a atividade da cisplatina, as moléculas de amônia foram substituídas pelo ligante bidentado, (1*R*,2*R*)-ciclo-hexano-1,2-diamina, de modo a formar adutos

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

diferentes daqueles da cisplatina, volumosos, mais eficazes na inibição da síntese de DNA. [40,42]

Além da carboplatina e da oxaliplatina, outros complexos também tiveram uso clínico aprovado, porém restrito a alguns países: a nedaplatina foi aprovada apenas no Japão, a lobaplatina na China e a heptaplatina, somente na Coréia (Figura 8). [42]

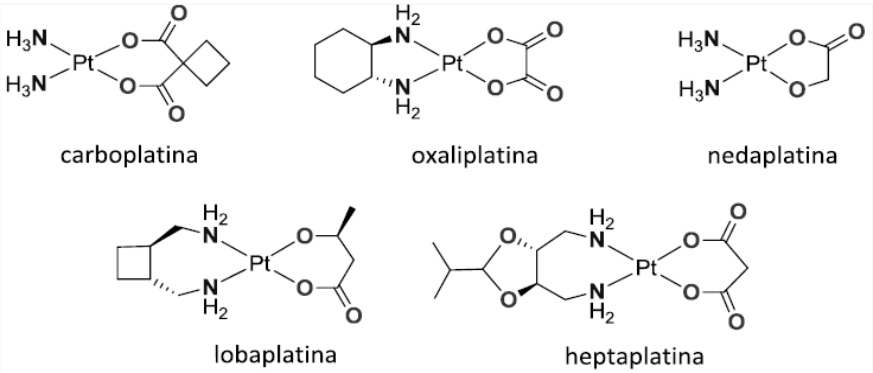

Figura 8. Complexos de platina de segunda e terceira geração aprovados para uso clínico (extraído da ref. 20).

Há atualmente quatro drogas a base de platina em fase de triagem clínica, das quais duas, satraplatina e picoplatina (Figura 9), estão próximas de ter o seu uso liberado. Ambas demonstraram atividade quando administradas oralmente. [42]

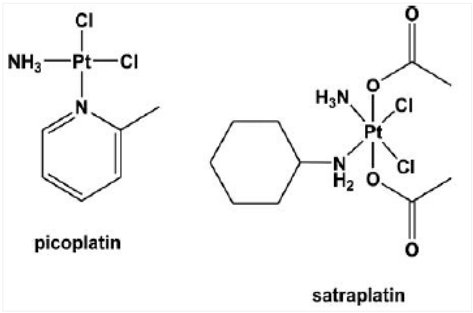

Figura 9. Complexos de platina(II) e platina(IV) em fase de triagem clínica (extraído da ref. 20).

Os complexos de platina, como mono-drogas ou em associações, respondem por cerca de 40 a 80% dos tratamentos de câncer. [20]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

1.4
Novas estratégias de combate ao câncer

Muito esforço tem sido direcionado na busca por novas drogas com melhor perfil toxicológico e de resistência, assim como também na viabilização de novas vias de administração. Neste sentido, diferentes abordagens têm sido empregadas para desenho de drogas anticâncer baseadas em metal, como o emprego de complexos análogos à cisplatina (descritos acima) e complexos que se mostrem mais seletivos em relação ao ambiente tumoral.

Um grande problema das drogas antitumorais atuais é que estas, em sua maioria, são ciclo-celular específicas, de forma que só atuam em células em processo de divisão [43, 44], entretanto, os tumores sólidos, que representam cerca de 90% das variedades de câncer incidentes nos homens, caracterizam-se por uma divisão celular relativamente lenta, respondendo pouco aos agentes quimioterápicos, mesmo em associação com outras técnicas. [43] Para estes casos, uma estratégia que tem se mostrado bastante promissora envolve a preparação de complexos de metais inertes em estados de oxidação mais elevados, que tornam-se ativos apenas após redução, como, por exemplo, compostos de Pt(IV) e Ru(III). [23]

Acredita-se que estes compostos atuem como pró-drogas biorredutíveis, sendo entregues no ambiente de destino sem redução prévia nem grandes transformações. Somente no interior do tumor, devido à condição de hipóxia (baixa oxigenação) estes seriam definitivamente reduzidos, originando então as espécies ativadas, que reagem com o alvo mais facilmente. [23] O cobre é um metal que também tem se mostrado bastante interessante para o desenvolvimento deste tipo de drogas. [45]

1.4.1
Pró-drogas biorredutíveis ativadas por hipóxia (PDAHs)

A existência de regiões em hipóxia é uma característica comum aos tumores sólidos, normalmente não encontrada em tecidos normais, sendo uma consequência da formação insuficiente de novos vasos sanguíneos (angiogênese) em tumores com crescimento acelerado. [23,46] À medida que se dá o crescimento do tumor, alguns vasos sanguíneos acabam sendo obstruídos ou comprimidos pela massa tumoral, sendo então substituídos por novos vasos; no entanto, o crescimento celular se dá mais velozmente que a angiogênese e

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

os novos vasos sanguíneos tendem a ramificar-se de forma irregular. Como consequência, há uma distribuição heterogênea de oxigênio no tumor, de modo que algumas regiões são bem oxigenadas (parte externa do tumor) enquanto outras regiões têm pouca (região em hipóxia, pressão parcial de oxigênio entre 5 e 10 mmHg) ou nenhuma oxigenação (região em necrose) (Figura 10). [43,47]

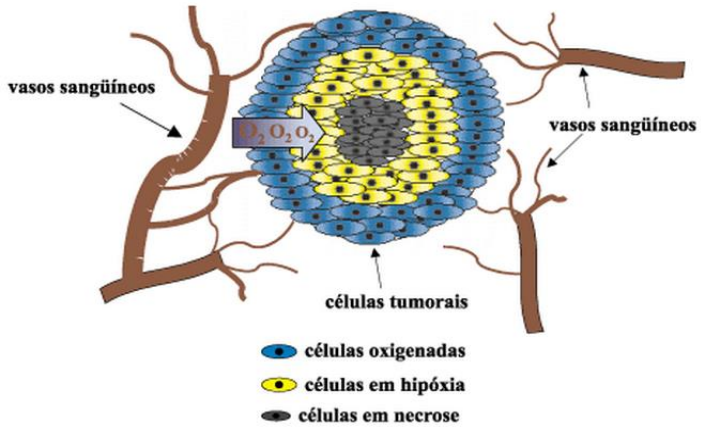

Figura 10. Concentração de oxigênio no tumor em relação à distância capilar (ref. 43).

A hipóxia é uma condição desfavorável ao crescimento das células e, em muitas situações, pode estimular a morte celular. No entanto, a resposta biológica à hipóxia nos tumores sólidos é capaz de promover a metástase, angiogênese e seleção de células com potencial apoptótico diminuído, de modo a proporcionar uma vantagem global positiva para o crescimento do tumor. [23,48]

A presença de células hipóxicas em tumores sólidos tem sido considerada um problema quanto à eficiência da quimioterapia e da radioterapia no tratamento destes tipos de câncer. [49] Para que a radioterapia seja eficaz, é necessária a presença de oxigênio para que ocorram as reações bioquímicas com os radicais livres gerados pela radiação, [50,51] entretanto, a baixa concentração de oxigênio das regiões em hipóxia impede a geração das espécies citotóxicas, [44] de modo que as células hipóxicas chegam a ser três vezes mais resistentes à radioterapia que as células óxicas. [52, 53] No que diz respeito ao tratamento quimioterápico, há grande dificuldade em se fazer o fármaco atingir regiões em hipóxia, dada a pobre vascularização e grandes distâncias intercapilares, impossibilitando a presença deste em concentração terapêutica. [43]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

Entretanto, a reduzida capacidade oxidativa das células em hipóxia oferece a possibilidade de utilizar as características redox dos compostos para conseguir maior seletividade, atuando estes como pró-drogas. [45,54]

A ideia de se explorar as diferenças entre as tensões de oxigênio de tecidos normais e em hipóxia para o desenvolvimento de pró-fármacos foi inicialmente descrita por Sartorelli e colaboradores em 1972. [55] Porém, estudos sobre medicamentos biorredutíveis à base de metal só tiveram início alguns anos mais tarde, com complexos de rutênio(III) e platina(IV). [23] Desde então, este conceito tem sido extensivamente explorado. Diversas classes de substâncias foram estudadas, dentre as quais estão os nitroaromáticos, nitroimidazóis, *N*-óxido-benzotriazinas, complexos contendo metais da primeira série de transição e ligantes polinitrogenados, bem como aminonaftoquinonas e hidroxiquinolinas. [47, 56]

A terapia biorredutível aproveita a habilidade de algumas enzimas redutoras (citocromo P450, DT-diaforase, redutase) para metabolizar redutivamente a pró-droga atóxica, assim liberando ou gerando a espécie citotóxica, geralmente por redução monoeletrônica. A morte seletiva das células ocorre porque nas regiões em hipóxia as espécies citotóxicas geradas não são efetivamente re-oxidadas como nos tecidos normais, dada a pobre oxigenação, de modo que a ativação da droga é favorecida apenas no tecido maligno. Uma vez ativada, a droga pode também difundir-se e matar as células circundantes. [47,57,58]

Para que uma substância possa ser convenientemente explorada como PDAH, algumas propriedades são importantes, tais como: (i) diferença de citotoxicidade entre a pró-droga (oxidada) e a forma reduzida; (ii) seletividade para a ativação por redução monoeletrônica; (iii) capacidade de penetração de tecidos de modo a poder alcançar as células hipóxicas; (iv) capacidade de difusão da forma reduzida para assim matar as células circundantes (efeito espectador). [47, 59]

A adequada seleção do centro metálico é feita com base nas propriedades redox e na labilidade da espécie reduzida. De forma geral, os complexos devem ter potencial de redução na faixa apropriada para poder ser reduzidos por redutases celulares, processo este que é inibido em células oxigenadas devido à competição por estas redutases entre a pró-droga e o oxigênio. [60] A faixa de -400 a -200 mV *vs* NHE parece ser a mais adequada. Entretanto, também são encontradas substâncias ativas fora desta faixa de potenciais. [47] As espécies reduzidas devem permanecer retidas no interior da

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

célula, em virtude de sua carga negativa, sendo suficientemente estáveis para sofrer oxidação, nas células óxicas, mais rápido que decomposição. [45]

1.4.2
Complexos de cobre: aspectos gerais e seu emprego como PDAHs

O cobre é um elemento de transição que possui dois isótopos estáveis, ^{63}Cu e ^{65}Cu. [61,62] Com configuração eletrônica [Ar] $3d^{10}4s^1$ no estado fundamental, tem como estados de oxidação mais comuns o Cu^+ (cuproso, $3d^{10}$) e o Cu^{2+} (cúprico, $3d^9$). Nos sistemas biológicos, verifica-se a predominância da forma Cu^{2+}, visto que o íon cuproso é instável, sendo facilmente oxidado a Cu^{2+}. [62]

No estado +2, o cobre apresenta um elétron desemparelhado, de modo que seus complexos são paramagnéticos e usualmente coloridos em função de transições *d-d*. Ao interagir com ligantes inorgânicos (H_2O, OH^-, CO_3^{2-}, SO_4^{2-}) o íon cúprico liga-se preferencialmente através do oxigênio, coordenando-se através de grupos fenólicos e carboxílicos, ou amínicos, em ligantes orgânicos. Já o Cu^+ tem preferência por ligantes contendo enxofre, como a cisteína e a metionina. [63]

Em seus complexos, são comumente encontrados os números de coordenação 4, com geometrias quadrática ou tetraédrica; 5, com geometria entre pirâmide de base quadrada e bipirâmide trigonal; e 6, com geometria octaédrica. [64,65]

Devido à perda de um elétron o Cu^{+2} apresenta menor simetria, sendo esperadas distorções tanto nas geometrias tetraédricas quanto octaédricas, pois os nove elétrons não podem ser simetricamente distribuídos nos orbitais *d*. [66]

Dentre os metais de transição, no organismo, o cobre só é menos abundante que ferro e zinco, sendo encontrado como elemento traço essencial à dieta humana. [67] Sua importância biológica, funcional e estrutural está relacionada com funções metabólicas de enzimas cobre-dependentes (cuproenzimas), tais como: citocromo c oxidase, superóxido dismutase citosólica, lisil oxidase, tirosinase, ceruloplasmina e dopamina β-hidroxilase, responsáveis pela catálise de importantes reações fisiológicas relacionadas com a fosforilação oxidativa, inativação de radicais livres, biossíntese de colágeno e elastina, formação de melanina, coagulação sanguínea, metabolismo de ferro e a síntese de catecolaminas. [68] A sua grande versatilidade nestas reações catalíticas se

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

deve à grande facilidade que este elemento tem para mudar o seu estado de oxidação de cuproso para cúprico. [69]

Contudo, o papel do cobre vai muito além, porque seus complexos podem também promover a clivagem de ácidos nucléicos e, portanto, pode ser usado como metalofármaco por causar danos ao DNA. [70, 71, 72, 73] A toxicidade do Cu(II) está associada à sua capacidade de se ligar e clivar o DNA, o que leva à paralisação do ciclo celular e morte celular por apoptose, o mesmo mecanismo de ação da cisplatina. [22,74] Seu modo de ação pode também envolver reações redox, em que o cobre reage diretamente com o oxigênio molecular ou o peróxido de hidrogênio para produzir radicais livres tóxicos, os quais, por sua vez, produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) que clivam diretamente o DNA e RNA. [75]

Ruiz-Azuara *et al.* relataram uma interessante classe de complexos de cobre de fórmulas gerais $[Cu(NN)(ON)]NO_3$ e $[Cu(NN)(OO)]NO_3$, genericamente registradas sob o nome comercial Casiopeínas®. Testes *in vitro* e *in vivo* com diversas linhagens de células tumorais mostraram que as Casiopeínas® exibem atividade antineoplásica mais elevada do que a cisplatina para certos tipos de tumor. [76, 77] As Casiopeínas® serão os primeiros compostos de cobre a entrar na fase de testes clínicos, o que acontecerá ainda este ano.

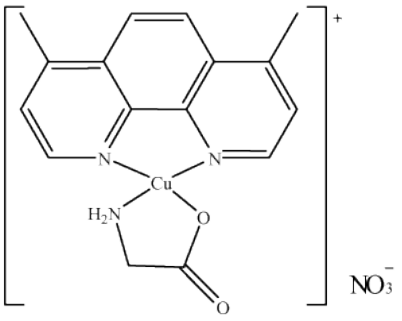

Figura 11. Casiopeína® IIgly, exemplo de casiopeína com atividade antineoplásica (ref. 78).

Devido às propriedades citadas e ao fato do cobre ser um metal fisiológico, podendo ser menos agressivo ao organismo que metais não essenciais, a combinação do cobre com outras moléculas bioativas é uma estratégia muito promissora para o desenvolvimento de novos compostos antitumorais, visto que a coordenação ao metal pode potencializar as propriedades biológicas dos ligantes. [81, 84] Nesse sentido, a possibilidade de

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

se explorar complexos de cobre(II) como pró-fármacos seletivos para regiões em hipóxia tem se mostrado bastante atraente, visto que os seus estados de oxidação mais comuns têm potencial de redução [$E^{0\,'}(Cu^{2+} / Cu^{+})$] acessível dentro da faixa de potencial redox celular. [45,80] Cu(II) e Cu(I) têm preferência por números de coordenação diferentes: em solventes polares, o cobre(II) existe predominantemente como espécies penta ou hexacoordenadas, enquanto o cobre(I) prefere o número de coordenação 4 ou menores. Desta maneira, a redução de Cu(II) a Cu(I) deverá ser acompanhada de importantes mudanças estruturais. [80,81] Ao serem reduzidos pela ação das redutases celulares, os complexos de cobre(II) dão origem a espécies instáveis de cobre(I), capazes então de libertar os ligantes de sua esfera de coordenação. [45,80]

Parker e colaboradores descreveram a síntese de complexos de cobre(II) com sistemas macrocíclicos derivados de mostardas nitrogenadas (Figura 12) que exibiram alta seletividade ao ambiente em hipóxia, sendo cerca de 24 vezes mais citotóxicos do que em células óxicas normais. Estes sistemas se mostraram ativos frente a células de câncer de pulmão. [82]

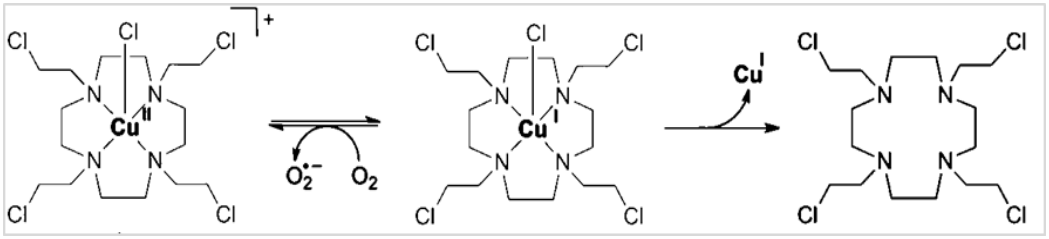

Figura 12. Mecanismo de redução de pró-droga baseada em complexo de cobre(II) com um ligante derivado de mostarda nitrogenada (extraído da ref. 80).

1.5
Heterociclos 1,2,3-triazólicos e oximas: propriedades e importância biológica

Os heterociclos são conhecidos por apresentar um amplo espectro de atividade farmacológica, constituindo uma classe química de grande importância biológica. [83] Dentre estes, tem-se verificado especial interesse pelos heterociclos nitrogenados de cinco membros, em particular os triazólicos ($C_2H_3N_3$), devido à sua grande facilidade de obtenção além das suas interessantes propriedades biológicas. [84]

Os 1,2,3-triazóis e seus derivados melhorados têm sido estudados devido ao seu valor quimioterápico frente a doenças como a AIDS, Parkinson e

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

Alzheimer, estando também presentes em fragmentos estruturais de substâncias antibacterianas, antifúngicas, analgésicas, dentre outras (Figura 13). [83,85,86,87,88,89]

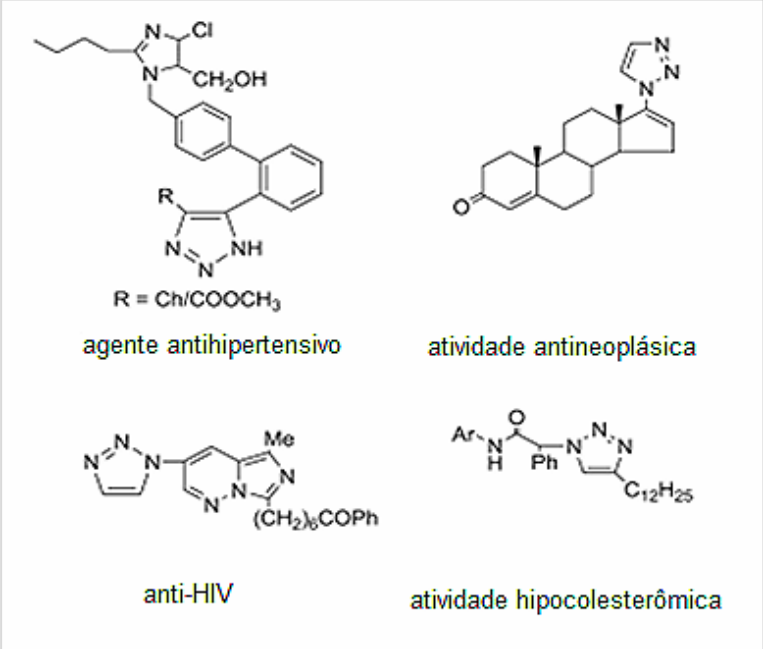

Figura 13. Diversas atividades de compostos derivados de 1,2,3-triazóis (extraído da ref. 88).

Moléculas baseadas em 1,2,3-triazóis têm se mostrado farmacóforos úteis à alquilação do DNA, exibindo grande afinidade pelo mesmo e apresentando atividade anticancerígena frente a determinadas linhagens de células de câncer humano. [90]

Estes compostos tem origem essencialmente sintética, tendo a síntese pioneira sido reportada por Pechmann em 1888. [83] Os triazóis exibem uma química bastante interessante; com seis elétrons *p*, podem apresentar-se em três formas tautoméricas quando não substituídos. 1,2,3-triazóis, em que os nitrogênios são vicinais, encontram-se principalmente como um equilíbrio entre as formas 1H-1,2,3-triazol e 2H-1,2,3-triazol, que diferem apenas pela posição do átomo de H, prototropismo (Figura 14), havendo uma preferência pela forma simétrica 2H-1,2,3-triazol. [83, 87, 91, 92]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

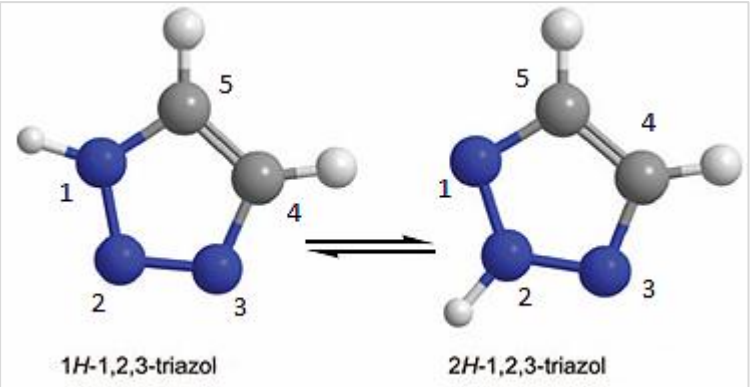

Figura 14. Estruturas tautoméricas do composto 1,2,3-triazol (adaptado da ref. 87).

Os 1,2,3-triazóis possuem caráter anfótero, podendo agir como uma base fraca ou ainda como um ácido fraco, comparável ao fenol, dependendo do substituinte do anel. [92] Devido à estabilidade à degradação metabólica e à capacidade de realizar ligação de hidrogênio, mostram-se como fragmento de grande versatilidade, favorecendo interações com alvos moleculares e aumentando a solubilidade em água. Em pH fisiológico, os nitrogênios tendem a ficar desprotonados. [88,93]

A coordenação de 1,2,3-triazóis a metais de transição ainda permanece pouco explorada. Complexos de paládio e platina, nos quais esse fragmento comporta-se como ligante monodentado, foram descritos por Suijkerbuijk *et al.*, que verificaram que a substituição nas posições 1 e 4 do anel alteram fortemente o seu comportamento de coordenação, influenciando sua estereoquímica e características eletrônicas. [94] O fragmento 1,2,3-triazol 1,4-dissubstituído pode ainda atuar como ligante em ponte, em que a ligação se dá através dos nitrogênios N2 e N3 do anel. Quando monodentado, este fragmento pode se coordenar tanto através do átomo de nitrogênio N3 quanto pelo átomo de carbono C5. [95]

As oximas, por sua vez, são compostos químicos que obedecem à fórmula molecular $R_1R_2C{=}NOH$, sendo denominadas cetoximas nos casos em que as duas cadeias laterais são radicais orgânicos e aldoximas nos casos em que uma destas é um átomo de hidrogênio. Estas são oriundas da condensação, catalisada por ácido, da hidroxilamina com um aldeído ou cetona, apresentando-se como sólidos cristalinos de baixa solubilidade em água. [96] Apresentam como principal aplicação farmacológica o tratamento de intoxicação por pesticidas organofosforados, agindo por reativação da acetilcolinesterase, [97]

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA

também tendo sido verificada uma atividade antiproliferativa de derivados de oximas frente a algumas linhagens de células tumorais. [98,99]

A primeira síntese de complexos metálicos com oximas foi descrita por Hantzch e Werner em 1890. Desde então, diversos trabalhos contendo estes sistemas foram descritos na literatura. [100] As oximas são grupamentos anfóteros, nos quais o átomo de nitrogênio é básico e a hidroxila, levemente ácida. Ao complexarem íons metálicos, estas comportam-se como ligantes ambidentados, podendo ligar-se ou pelo átomo de nitrogênio ou pelo átomo de oxigênio, sendo mais comum a coordenação através do nitrogênio (Figura 15). [101] Também podem, eventualmente, atuar como uma ponte entre dois metais. A grande vantagem desta classe de compostos orgânicos como ligantes é a sua capacidade de coordenar-se ao centro metálico de forma neutra ou desprotonada, podendo gerar espécies tanto neutras quanto carregadas. [102]

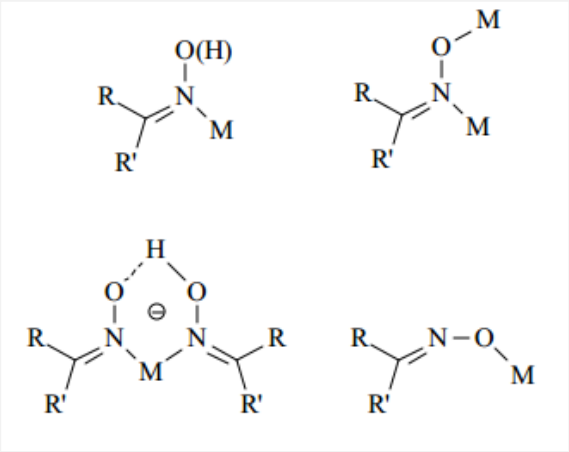

Figura 15. Possíveis modos de coordenação de oximas a íons metálicos (extraído da ref. 102).

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 1111823/CA