



A toxicidade (Atividade Antitumoral) de complexos de molibdênio e tungstênio com ligantes ditioleno em células HeLa e HepG2

Diego G. Meaurio¹, Vasilii Khripun¹, Breno P. Espósito², Guilherme P. Biazoto¹, Adriana P. Duarte¹, Marco A. U. Martinez¹

1- Universidade Federal Mato Grosso do Sul (UFMS).

2- Universidade de São Paulo (USP).

diegogoncalves@ufms.br.

Palavras-Chave: capacidade quelante, Calceína férrica, Enzimas contendo ferro.

Introdução

O ferro é um nutriente essencial com significativa importância em reações de transferências de elétrons devido à sua reatividade redox. A mesma propriedade, entretanto, contribui para sua participação em processos oxidativos danosos à célula. A homeostase do ferro afeta o metabolismo energético, a replicação de DNA, processos inflamatórios, etc. Consequentemente, existem diversas condições clínicas associadas à desregulação do ferro, seja por insuficiência ou sobrecarga deste.

Além das doenças mais comuns, tais como anemia e talassemia, o desenvolvimento de câncer e parasitoses diversas apresentam relação com os níveis de ferro intra e/ou extracelular. Por ser essencial a todas as espécies de organismos e participar de processos inflamatórios, a disponibilidade de ferro é fator determinante no progresso de parasitoses. Bactérias e fungos possuem compostos capazes de sequestrar ferro da célula e algumas classes de vírus se valem de mecanismos que limitam o uso de ferro pelo hospedeiro. Nesse sentido, a terapia por quelação de ferro pode ser uma alternativa para o tratamento dessas condições.

Modelos in vivo e in vitro fornecem evidências de que a administração de quelantes é eficiente no combate à sobrecarga de ferro, ao câncer e a infecções provocadas por bactérias, fungos e vírus. Contudo, os únicos compostos aplicados neste tipo de terapia apresentam efeitos colaterais consideráveis que afetam a qualidade de vida do paciente. Por isso, este projeto propõe avaliar a potencialidade da aplicação terapêutica de novos quelantes de ferro em algumas das condições clínicas supramencionadas.

Assim como parasitoses, o desenvolvimento de tumores desregula a homeostase do ferro através de processos inflamatórios. A liberação de citocinas e espécies oxidativas faz parte da defesa do organismo contra células estranhas. Logo, a inflamação aguda pode ser eficiente na destruição de células defeituosas, mas a crônica causa uma série de danos capazes de lesar, direta ou indiretamente, o DNA e contribuir para a progressão do tumor [1-3]. Diversos estudos demonstram associação entre desregulação de ferro e câncer, especialmente de mama e hepático [2, 4-6]. É sabido que células tumorais se replicam mais rapidamente que células normais e,



portanto, apresentam maior demanda por ferro. Isto é compatível com o fenótipo observado para estas células: expressam mais RNR, DMT 1, hepcidina, IRP 2 e TfR [2, 4, 6].

A terapia por quelação de ferro vem se mostrando uma alternativa viável de tratamento para uma ampla diversidade de doenças. Modelos *in vivo* e *in vitro* estudados até então fornecem evidências de que a administração de compostos quelantes foram eficientes no combate ao câncer [2, 4] e a infecções provocadas por fungos [7], bactérias e vírus [8]. Assim, o desenvolvimento de novos compostos capazes de se ligarem eficazmente ao ferro é uma tarefa extremamente importante.

Material e Métodos

Os ligantes maleonitriloditiolato de sódio Na_2mnt (1), 1,2-benzenoditiol H_2bdt (2), $[\text{Bu}_4\text{N}]_2[\text{MoO}_2(\text{mnt})_2]$ (3), $[\text{Et}_4\text{N}]_2[\text{MoO}(\text{mnt})_2]$ (4), $[\text{Bu}_4\text{N}]_2[\text{WO}_2(\text{mnt})_2]$ (5) e $[\text{Et}_4\text{N}]_2[\text{WO}(\text{mnt})_2]$ (6) foram sintetizados conforme a literatura [9–12] e caracterizados por espectroscopia UV-Vis, FTIR, RMN- ^1H , difração de raios X em pó e análise elementar.

Estudo de competição de Calceína

Em microplacas de 96 poços, adicionaram-se 90 μL de calceína (2 μM , HBS) e a fluorescência foi monitorada ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emt}} = 485/520 \text{ nm}$) por 10 min. Em seguida, adicionaram-se 10 μL de sulfato ferroso amoniacal (FAS; 2 μM final), formando o complexo não fluorescente calceína-ferro (CAFe). Após estabilização (~15 min), foram adicionados os compostos 1 (em água) e 2–6 (em DMSO), obtendo concentrações finais de 0–250 μM e 5% de DMSO. Cada composto foi avaliado na presença e ausência de FAS. Após ~300 ciclos, adicionou-se deferroxamina (DFO; 20 μM) como controle positivo. A recuperação da fluorescência foi calculada conforme descrito em [13–15]. Para o Na_2mnt , diferentes sequências de adição (calceína + mnt + FAS + DFO e calceína + mnt/FAS + DFO) produziram resultados equivalentes. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes, em duplicata.

Estudos de antioxidantes (sistema Ferro-Ascorbato)

A atividade antioxidante foi avaliada utilizando di-hidrorodamina (DHR) como sonda fluorogênica. Em microplacas, adicionaram-se 10 μL de $\text{Fe}(\text{NTA})$ (40 μM), 10 μL das amostras e 180 μL de solução contendo DHR (50 μM) e ácido ascórbico (40 μM) em HBS. As concentrações finais de $\text{Fe}(\text{NTA})$ e dos compostos foram 2 μM e 0–50 μM , respectivamente, com 5% de DMSO. A fluorescência ($\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emt}} = 485/520 \text{ nm}$) foi monitorada por 1 h a 37 °C. Os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos independentemente. A taxa de oxidação da DHR foi utilizada como indicador da geração de espécies reativas de oxigênio.



Estudo de viabilidade celular em células HeLa e HepG2

A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT, baseado na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) por desidrogenases mitocondriais de células viáveis, formando cristais de formazan. Após a verificação da confluência celular, o meio de cultura foi substituído e 1 μL das soluções dos compostos (0–50 mM em DMSO) foi adicionado a cada poço. As concentrações finais dos compostos variaram de 0 a 250 μM , com concentração final de DMSO de 1%. As microplacas foram incubadas por 24 horas, após as quais o meio foi removido e adicionados 100 μL de solução de MTT (1,5 mM em tampão HBS), seguido de incubação por 2 horas. Em seguida, o meio foi aspirado, adicionaram-se 100 μL de DMSO e as placas foram agitadas por 2 minutos para solubilização da formazan. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas a 570 nm.

Resultados e Discussão

Sonda fluorimétrica On/Off para detecção de ferro

A afinidade dos compostos 1–6 (complexos de molibdênio e tungstênio contendo ligantes ditiolatos mnt e bdt) pelo ferro foi avaliada por fluorimetria utilizando a sonda calceína. A calceína apresenta elevada afinidade por Fe(III) ($\log K_{ML} = 24$) e forma um complexo 1:1 não fluorescente. A adição de agentes quelantes capazes de competir pelo ferro promove a dissociação desse complexo e a recuperação da fluorescência, permitindo avaliar a afinidade dos compostos pelo metal.

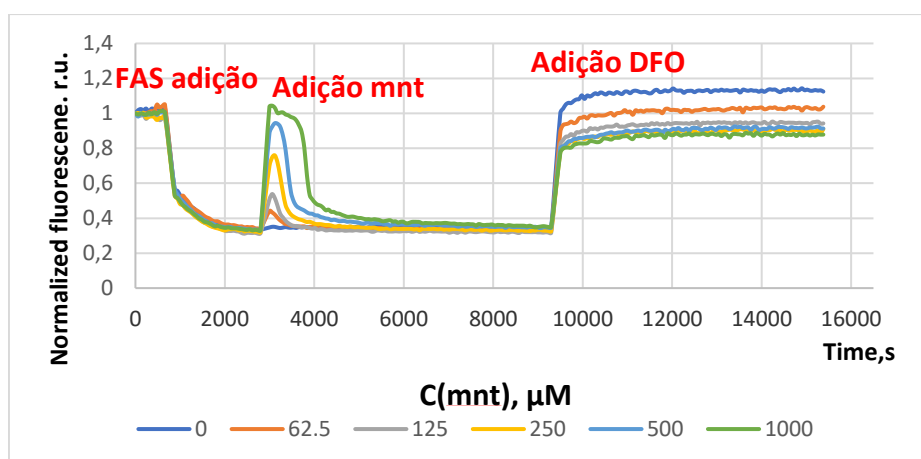


Fig. 1. A curva de recuperação de fluorescência para o composto 1.



O Na_2mnt (1) apresentou maior afinidade pelo ferro, enquanto o H_2bdt (2) não demonstrou interação significativa. Os complexos oxidados de molibdênio e tungstênio (3 e 5) apresentaram afinidade apenas em concentrações elevadas ($>100 \mu\text{M}$), associada à remetalação, enquanto as formas reduzidas (4 e 6), mais estáveis, permaneceram inativas. A recuperação incompleta da fluorescência após adição de DFO foi atribuída à competição entre o excesso de mnt e o quelante pelo ferro. O mnt apresentou comportamento singular, com recuperação imediata da fluorescência seguida de redução gradual do sinal, dependente linearmente da concentração do ligante (Figura 2), sugerindo a formação inicial de um complexo ferro–mnt cineticamente favorecido e posterior deslocamento do equilíbrio para o complexo ferro–calceína, termodinamicamente mais estável. Apesar da necessidade de altas concentrações para recuperação significativa, esse comportamento diferencia o mnt de outros quelantes e destaca a relevância do estudo de ditiolatos aniônicos.

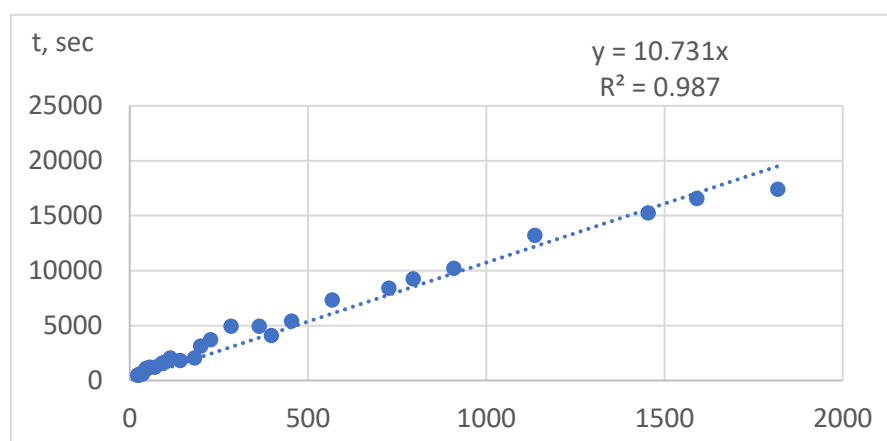


Fig. 2. Tempo de desaparecimento da fluorescência em função da concentração de mnt

Os complexos oxidados 3 e 5 também promoveram recuperação de fluorescência, porém em menor intensidade e velocidade que o mnt livre (Figura 3). O complexo de molibdênio (3) apresentou recuperação apenas a partir de $125 \mu\text{M}$, enquanto o complexo de tungstênio (5) iniciou a recuperação em $62,5 \mu\text{M}$, mesma concentração observada para o mnt. A menor atividade dos complexos foi atribuída à sua elevada estabilidade, que torna o processo de remetalação mais lento. Os resultados indicam ainda menor estabilidade do complexo de tungstênio em relação ao análogo de molibdênio, justificando sua maior atividade.

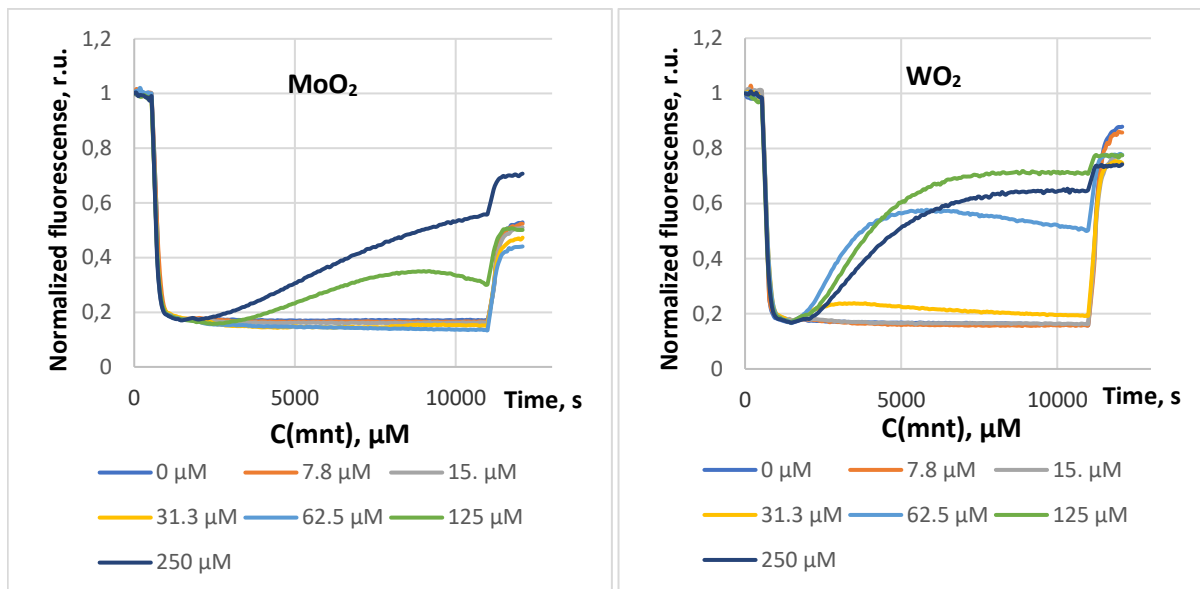


Fig 3. A curva de recuperação da fluorescência para os compostos 3 e 5.

Os valores de recuperação de fluorescência estão apresentados na Tabela 1. Apesar da menor velocidade de resposta, os complexos 3 e 5 apresentaram recuperação máxima superior à do mnt livre nas mesmas concentrações, indicando maior eficiência na remoção do ferro da calceína após a ocorrência da remetalização. Tanto para o mnt quanto para os complexos 3 e 5 observou-se diminuição gradual da fluorescência ao longo do tempo, embora esse processo tenha sido significativamente mais lento para os complexos.

As formas reduzidas (4 e 6) permaneceram inativas mesmo em concentrações superiores a 5 mM. A redução do estado de oxidação do centro metálico e do número de oxigênios terminais diminui sua carga positiva efetiva, aumenta sua maciez e fortalece as ligações metal-enxofre, dificultando a remetalização e, consequentemente, a interação com o ferro.

Tabela 1. A recuperação de fluorescência dos compostos 1, 3 e 5.

C, μM	62,5	125	250	500	1000
1	12%	36%	58%	96%	100%
3	0%	44%	67%	-	-
5	66%	77%	86%	-	-

Embora apresentassem menor velocidade de recuperação devido à elevada estabilidade, os complexos 3 e 5 exibiram recuperação máxima de fluorescência superior à do mnt livre na



mesma concentração, indicando maior eficiência na remoção do ferro da calceína após a remetalização. Tanto para o mnt quanto para os complexos observou-se diminuição gradual da fluorescência ao longo do tempo, mais lenta para os complexos. As formas reduzidas (4 e 6) permaneceram inativas mesmo em concentrações superiores a 5 mM. A redução do estado de oxidação do centro metálico diminui sua carga positiva efetiva, aumenta sua maciez e fortalece as ligações metal-enxofre, dificultando a remetalização e, conseqüentemente, a interação com o ferro.

Estudo de atividade antioxidante (Sistema Ferro-Ascorbato)

A di-hidrorodamina (DHR) é uma sonda fluorescente utilizada para avaliar a atividade oxidante mediada por ferro. Na presença de Fe(III) e ascorbato, EROs oxidam a DHR em rodamina fluorescente, permitindo monitorar a atividade redox do sistema. Ligantes capazes de coordenar Fe(III) podem inibir esse processo por bloqueio dos sítios de coordenação ou alteração do potencial redox do metal. Considerando que complexos de baixa massa molecular, como Fe(NTA), apresentam atividade redox em condições fisiológicas, sua inibição por quelantes pode apresentar relevância terapêutica. A Figura 4 evidencia diferenças na atividade antioxidante entre o mnt (1) e os complexos reduzidos de molibdênio e tungstênio (4 e 6), enquanto as formas oxidadas não apresentaram atividade detectável.

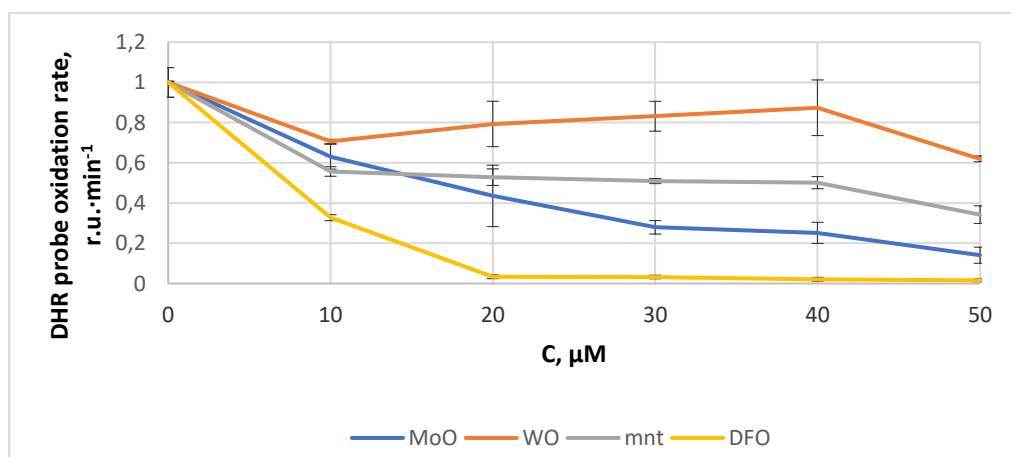


Fig. 4. Atividade antioxidante de 1, 4 e 6.

Todos os compostos avaliados (1, 4 e 6) apresentaram atividade antioxidante inferior à da deferoxamina (DFO). O complexo de molibdênio 4 foi significativamente mais ativo que o complexo de tungstênio 6, resultado atribuído principalmente à sua maior capacidade de reduzir Fe (III) a Fe (II). Embora os potenciais redox M(VI)/M(IV) em acetonitrila (−1,1 V para 4 e −1,50 V para 6) sugiram maior poder redutor do complexo de tungstênio, este é facilmente

oxidado pelo oxigênio dissolvido em solução aquosa, reduzindo sua eficácia em inibir a oxidação da DHR pelo complexo Fe(NTA).

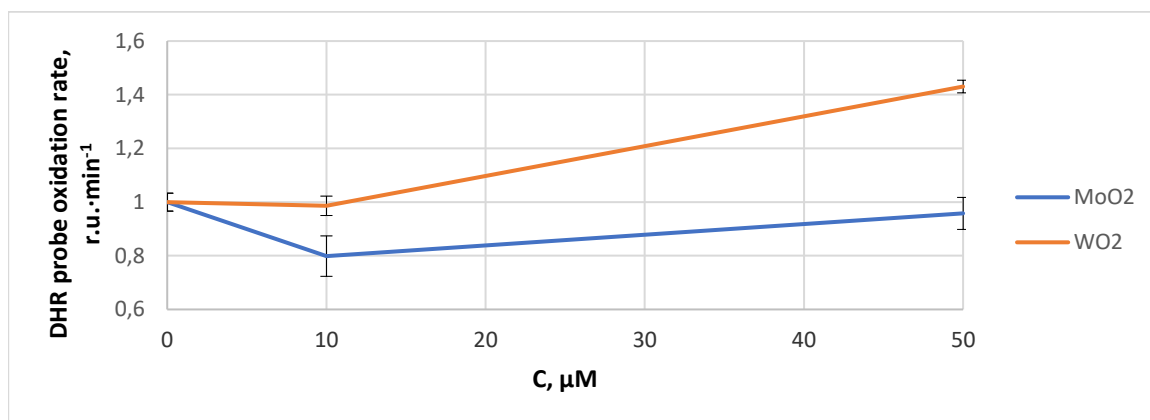


Fig. 5. Atividade antioxidante de 3 e 5.

A forma oxidada do complexo de tungstênio 5, diferentemente do complexo de molibdênio 3, acelerou a oxidação da DHR por Fe(III), atuando como catalisador da reoxidação do ferro reduzido gerado no sistema (Figura 5). Os complexos reduzidos apresentaram atividade antioxidante associada à redução de Fe(III) a Fe(II), enquanto o mnt atua pela formação de complexos estáveis com o ferro, inibindo sua participação na oxidação da DHR. Embora inferior à DFO, a atividade antioxidante do mnt foi relevante devido à rápida formação do complexo ferro–mnt, favorecida cineticamente. Outros ditiolatos e seus complexos de molibdênio e tungstênio serão futuramente avaliados.

Estudo de viabilidade celular com células de HeLa e HepG2

A viabilidade celular dos compostos 1–6 foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de MTT, baseado na redução do sal de tetrazólio a formazana por moléculas redutoras mitocondriais, como NADH e NADPH. A quantidade de formazana formada é proporcional ao número de células viáveis.

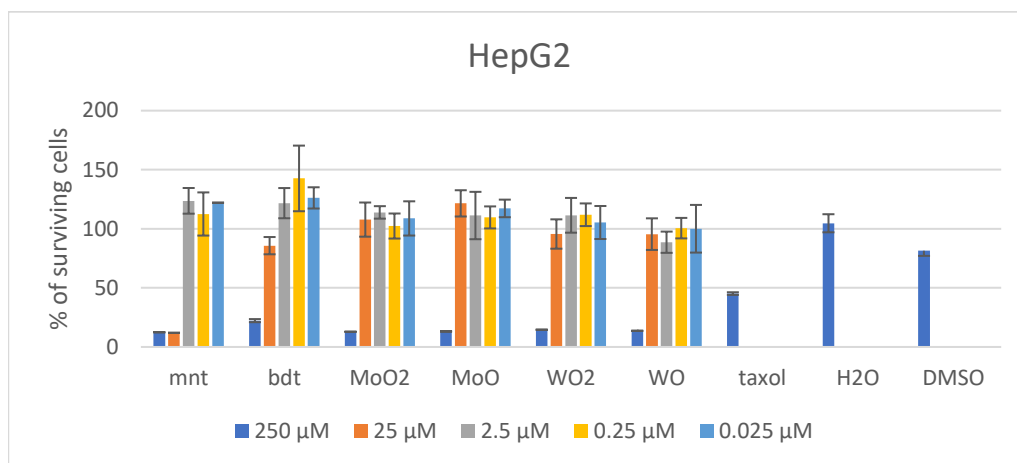


Fig. 6. Sobrevivência das células de HepG2.

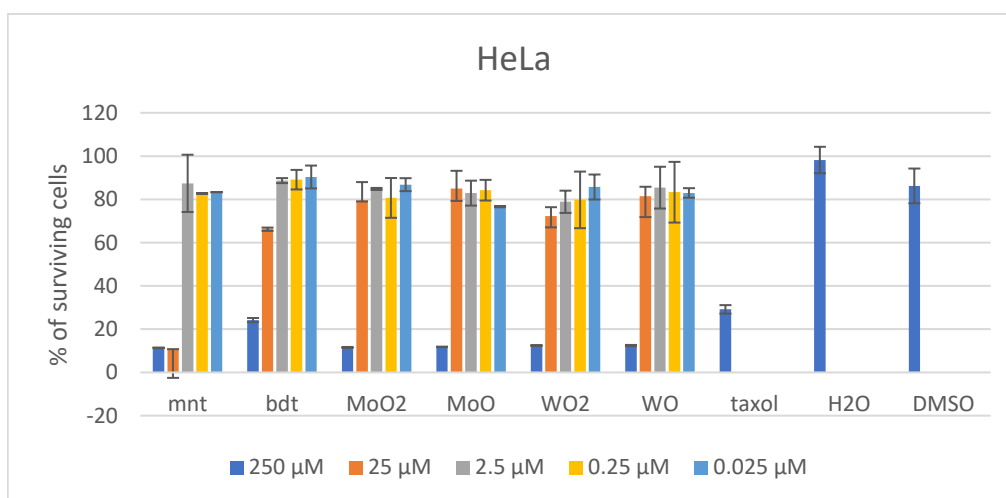


Fig. 7. Sobrevivência das células de HeLa.

As taxas de sobrevivência das células HepG2 e HeLa são apresentadas nas Figuras 6 e 7. O Taxol foi utilizado como controle positivo e água/DMSO como controles de solvente. Com exceção do mnt, os compostos foram solubilizados em DMSO. O ligante mnt apresentou maior toxicidade em ambas as linhagens, com baixa viabilidade celular já em 25 µM. Os demais compostos (2–5) apresentaram toxicidade significativa apenas em concentrações próximas a 250 µM, sendo o bdt ligeiramente mais tóxico entre eles.

As relações entre a sobrevivência celular e a concentração dos compostos, expressas em escala logarítmica, são apresentadas nas Figuras 8 e 9.

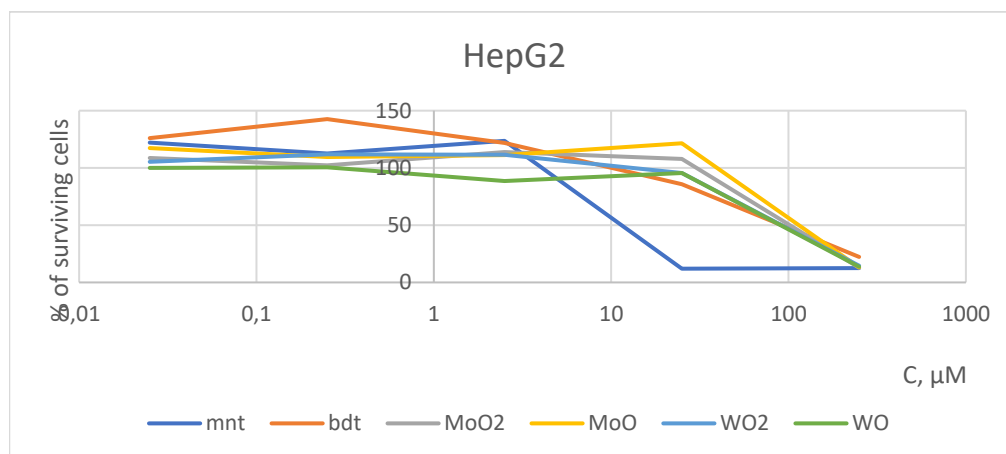


Fig. 8. Sobrevivência das células de HepG2 em escala logarítmica.

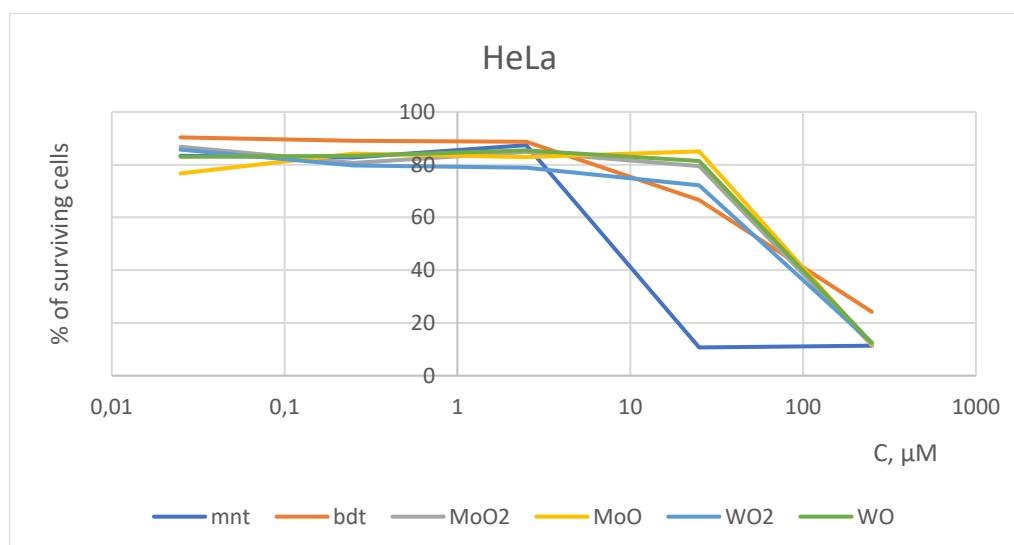


Fig. 9. Sobrevivência das células de HeLa em escala logarítmica.

A partir dos gráficos, foi determinada a concentração letal média (CL_{50}), correspondente à concentração capaz de reduzir a viabilidade celular em 50%. Para o mnt, a CL_{50} foi aproximadamente 10 μM em ambas as linhagens, sendo ligeiramente menor para HeLa. Os demais compostos (2–5) apresentaram valores cerca de dez vezes superiores ($\sim 100 \mu\text{M}$). Assim, o mnt apresentou a maior citotoxicidade entre os compostos avaliados. Futuramente, serão



investigados outros ligantes ditiolatos e o efeito da substituição do mnt na esfera de coordenação dos complexos de molibdênio e tungstênio sobre a toxicidade celular.

Conclusões

Neste trabalho, foram investigadas as propriedades de ligantes ditiolenos e complexos de molibdênio e tungstênio com tais ligantes. Ensaios de fluorescência com calceína foram conduzidos, demonstrando a capacidade desses compostos de se ligarem efetivamente ao ferro; as características antioxidantes dessas substâncias foram estudadas; e testes biológicos de viabilidade celular com células HeLa e HepG2 também foram realizados.

O complexo de molibdênio(IV)-tioleno também demonstrou excelente atividade antioxidante, evidenciando ainda mais o potencial para o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos baseados nesses compostos. O estudo de viabilidade celular com células HeLa e HepG2 demonstrou que os complexos de tioleno de molibdênio e tungstênio e os ligantes de tioleno apresentam toxicidade relativamente alta.

Assim, os compostos estudados apresentam, sem dúvida, grande interesse farmacoterapêutico relacionado aos processos de quelação de ferro e às propriedades antioxidantes. Certamente, a variação dos substituintes nas tioenolinas irá aprimorar ainda mais essas propriedades e criar fármacos com excelentes propriedades farmacológicas.

Agradecimentos

FUNDECT/CNPq concessão 83/053.361/2024.

Referências

1. Halliwell, B., and J. M. C. Gutteridge. Free Radicals in Biology and Medicine. 4th ed., Oxford: University Press, 2007.
2. Torti, S. V., et al. "Iron and Cancer." Annual Review of Nutrition, 38, 97-125, 208.
3. Figueiredo, C. "O intrigante paradoxo da inflamação associada ao câncer: uma atualização." J Bras Patol Med Lab, vol. 55, no 3, 2019, pp. 321-332.
4. Corcé, V., et al. "Recent advances in cancer treatment by iron chelators." Bioorg Med Chem Lett, vol. 26, no 2, 2016, pp. 251-256.
5. Pacheco, D. A. Q., et al. "Iron status in relation to cancer risk and mortality: Findings from a population-based prospective study." Int J Cancer, vol. 143, no 3, 2018, pp. 561-569.
6. Molina-Sánchez, P., and A. Lujambio. "Iron overload and liver cancer." The Journal of experimental medicine, vol. 216, no 4, 2019, pp. 723-724.
7. Martínez-Pastor, M., and S. Puig. "Adaptation to iron deficiency in human pathogenic fungi." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, vol. 1867, n° 10, 2020.



8. Chhabra, R., et al. "Iron Pathways and Iron Chelation Approaches in Viral, Microbial, and Fungal Infections." *Pharmaceuticals*, vol. 13, no 10, 2020, p. 275.
9. Hoepping A., et al. An alternative synthesis of sodium cyanodithioformate and the disodium salt of cis-1,2-dicyanoethylene-1,2-dithiol. *Journal fur Praktische Chemie - Chemiker - Zeitung*. 1998, 3 (340), 269–270.
10. Ondřej Mrózek, et al. An Air- and Moisture-stable Zinc(II) Carbene Dithiolate Dimer Showing Fast TADF and Dexter Energy Transfer Catalysis. *ChemRxiv*. Cambridge: Cambridge Open Engage; 2022. This content is a preprint and has not been peer-reviewed
11. Samar K. Das, et al. Modeling for the Active Site of Sulfite Oxidase: Synthesis, Characterization, and Reactivity of $[\text{Mo}^{\text{VI}}(\text{mnt})_2]^{2-}$ ($\text{mnt}^{2-} = 1,2\text{-Dicyanoethylenedithiolate}$). *J. Am. Chem. Soc.* 1994, 116, 9061-9070.
12. Samar K. Das, et al. Modeling the Tungsten Sites of Inactive and Active Forms of Hyperthermophilic *Pyrococcus furiosus* Aldehyde Ferredoxin Oxidoreductase. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 1387-1397.
13. Alta, R.Y.P., et al. Mitochondria-penetrating peptides conjugated to desferrioxamine as chelators for mitochondrial labile iron. *PLOS ONE*. 2017, 12(2): e0171729.
14. Baccan, M.M., et al. Quercetin as a shuttle for labile iron. *J Inorg Biochem*. 2012, 107(1), 34-39.
15. Esposito, B.P., et al. Labile plasma iron in iron overload: redox activity and susceptibility to chelation. *Blood*. 2003, 102(7), 2670-2677.
16. Vitorino, H.A., et al. Iron Metallodrugs: Stability, Redox Activity and Toxicity against *Artemia salina*. *PLOS ONE*, 2015, 10(4), e0121997..
17. Cerqueira, F.M., et al. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quím. Nova*, 2007, 30, 441-449.