

## CONSIDERAÇÕES SOBRE TEXTOS QUE TRATAM DO DESENVOLVIMENTO DE METALOFÁRMACOS DE RUTÊNIO

Sofia Nikolaou\* e Camila F. N. da Silva

Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Av. dos Bandeirantes 3900, 14040-901 Ribeirão Preto – SP, Brasil

Recebido em 24/01/2018; aceito em 20/03/2018; publicado na web em 10/04/2018

CONSIDERATIONS ON TEXTS TREATING THE DEVELOPMENT OF RUTHENIUM METALLODRUGS. It is relatively easy to verify that literature focused on the planning and investigation of ruthenium complexes biological properties (and their possible application as metallodrugs) has assumed certain generalizations that have been systematically repeated, mainly with respect to parallelisms and antagonisms with the chemistry of iron and platinum. This work proposes a discussion on the construction of the texts that deal with the theme, aiming to criticize the misuse of such generalizations.

Keywords: ruthenium; ruthenium complexes; metallodrugs; biological activity; cancer.

### INTRODUÇÃO

Há muito tempo é conhecido o importante papel dos íons metálicos nos processos biológicos e na formação das estruturas moleculares.<sup>1</sup> Um exemplo são as metaloproteínas (enzimas), que desempenham funções tão variadas quanto o transporte de oxigênio no sangue, feito pelo centro ferro-heme da hemoglobina, transferências multieletrônicas na respiração e transferências fotoinduzidas na fotossíntese.<sup>2</sup> Os metais também são encontrados na composição de nutrientes essenciais como as vitaminas; para citar apenas um exemplo, a vitamina B12 contém um íon de cobalto (Co) em sua estrutura.<sup>1,3</sup> Além disso, relatos de cerca de 5000 anos atrás já remetem ao uso medicinal dos metais.<sup>4</sup> Portanto, existe um grande apelo para o uso de metais na formulação de medicamentos em função do grande potencial dos cátions metálicos, como espécies deficientes em elétrons, interagem com resíduos (bases de Lewis) de biomoléculas como proteínas, enzimas e o próprio DNA e desse modo interferem em processos metabólicos, fisiológicos e patológicos das mais diversas naturezas.<sup>5</sup>

No caso particular dos compostos de rutênio, há muitos anos existe uma série de abordagens que vão desde estudos sobre sua ação fungicida, passando por sua atividade anti-inflamatória,<sup>6</sup> antibiótica,<sup>7</sup> anticarcinogênica,<sup>8</sup> até seu uso indireto como fotosensibilizador em terapia fotodinâmica, seja a partir de complexos com ligantes polipiridínicos hidrofóbicos (bons intercaladores em DNA) ou a partir de complexos liberadores de NO.<sup>9-11</sup>

Este trabalho tem como objetivo propor uma reflexão sobre a *construção* dos textos (predominantemente na forma de artigos científicos) que tratam do planejamento e investigação das propriedades biológicas de complexos de rutênio e sua eventual aplicação como metalofármaco. É possível verificar facilmente (autores familiarizados com o assunto concordarão) que a literatura focada no tema assumiu certas generalizações sobre a química do rutênio que, com o tempo, praticamente alcançaram o *status* de dogma e têm sido sistematicamente repetidas sem maiores discussões, principalmente no que diz respeito a paralelismos e antagonismos com a química dos elementos ferro e platina. Para propor, então, esta reflexão, este texto não tem como objetivo apresentar uma revisão exaustiva sobre o tema, nem tampouco discutir o estado da

arte focando em referências bibliográficas especialmente recentes. Ao contrário, grande parte das referências apresentadas aqui foram selecionadas por serem exemplares no que diz respeito à constituição e repetição das “verdades absolutas” sobre o rutênio, as quais estão sendo propagadas na literatura. Se por um lado esta reflexão pode apenas reforçar o espírito crítico do pesquisador mais experiente e, portanto, já consciente da questão, por outro ela certamente é relevante para estudantes e pesquisadores que estão se aproximando do tema pela primeira vez.

### METALOFÁRMACOS DE RUTÊNIO

O evento que realmente despertou o interesse no desenvolvimento de fármacos a partir de compostos metálicos foi a descoberta, feita por Rosenberg em 1965,<sup>12</sup> da atividade antitumoral da chamada “cisplatina” (*cis*-diaminodicloro-Pt<sup>II</sup>).<sup>13</sup> Sua atividade anticarcinogênica é bem estabelecida para câncer de testículo, ovário, cabeça, pulmão, estômago e esôfago e sua citotoxicidade é função da sua capacidade de ligar-se ao DNA. O complexo passa por reações de aquação das duas posições originalmente ocupadas pelos ligantes cloro e, posteriormente, liga-se covalentemente a uma fita do DNA. Uma vez ligada, a cisplatina causa uma distorção na estrutura da dupla hélice do DNA, comprometendo sua transcrição e replicação, interferindo, portanto, no desenvolvimento das células tumorais.<sup>5,14</sup> Porém, a cisplatina, bem como outras duas drogas análogas em uso clínico (carboplatina e oxaliplatina), apresentam alta toxicidade sistêmica, levando a tratamentos extremamente debilitantes devido aos efeitos colaterais indesejados (toxicidade renal, náuseas severas, diminuição da produção de medula óssea, entre outros), além de serem inativas (por resistência intrínseca ou adquirida) contra vários tipos de células tumorais e, principalmente, não apresentam efeito em fase metastática.<sup>15,16</sup>

Em função de limitações como as exemplificadas acima, há uma busca acentuada por alternativas de fármacos baseados em complexos de coordenação ou organometálicos, com algum interesse naqueles que combinam um centro metálico com fármacos orgânicos com atividade farmacológica já explorada.<sup>17</sup> A importância desta estratégia foi reconhecida há muito tempo na literatura, uma vez que o resultado desta combinação tem proporcionado melhoras no que diz respeito aos efeitos colaterais e à resistência associada a certas drogas com arcabouço exclusivamente orgânico.<sup>15,18</sup>

\*e-mail: sofia@ffclrp.usp.br

De importância histórica podemos citar o “vermelho de rutênio”. Este composto consiste no complexo polinuclear de valência mista  $[(\text{NH}_3)_5\text{Ru}^{\text{III}}\text{ORu}^{\text{IV}}(\text{NH}_3)_4\text{ORu}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_5]^{6+}$ .<sup>19</sup> Sua afinidade por polissacarídeos (componentes presentes em biomembranas) permite sua utilização em exames cintilográficos e, portanto, a visualização de tumores. Além disso, por se ligar preferencialmente a uma série de proteínas carregadoras de cálcio, interfere em processos metabólicos mediados por este íon. Na sua formulação comercial ocorre uma impureza chamada Ru360, cuja fórmula é  $[\text{X}(\text{NH}_3)_4\text{Ru}^{\text{III}}\text{ORu}^{\text{IV}}(\text{NH}_3)_4\text{X}]^{3+}$ , X = Cl<sup>-</sup> ou OH<sup>-</sup>.<sup>9</sup> Hoje é sabido que o Ru360 é de fato o composto responsável por interferir no processo de entrada de Ca<sup>2+</sup> na mitocôndria.<sup>20</sup>

Complexos de rutênio têm sido utilizados também como sensibilizadores em terapia fotodinâmica (TFD), que envolve o uso de luz para matar células tumorais.<sup>21</sup> De modo geral, para ser útil em TFD um composto deve conter sítios de interação hidrofóbica para que possa ser incorporado a biomembranas<sup>22</sup> e ao DNA,<sup>23</sup> deve apresentar um estado fundamental estável em meio fisiológico e deve, idealmente, absorver luz entre 600 nm a 800 nm (a chamada janela terapêutica), radiação com boa penetração em tecidos de organismos vivos.<sup>24</sup>

Em se tratando de rutênio, os análogos funcionais à cisplatina são os complexos denominados NAMI-A e KP1019 (Figura 1) e seus congêneres.<sup>25</sup> Os primeiros artigos sobre a atividade anticâncer de compostos de rutênio datam da década de noventa do século passado, significando que pesquisas com esse foco começaram alguns anos antes.<sup>26</sup> Ou seja: a investigação da aplicação de complexos de rutênio como quimioterápicos para câncer tem aproximadamente 30 anos de ocorrência sistemática e pode ser considerada, portanto, como nova. Os próximos três parágrafos mostram alguns aspectos relacionados a este tema e foram predominantemente baseados em dois trabalhos de revisão do início dos anos 2000 que, portanto, refletem a mentalidade vigente nos anos 90 do século passado. Este trecho foi feito desta forma a fim de, em um segundo momento, permitir ressaltar as virtudes e problemas que a literatura vem carregando quando o assunto é metalofármacos de rutênio.

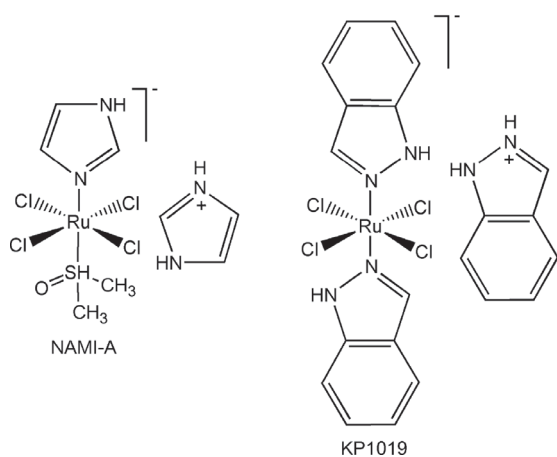


Figura 1. Estrutura dos complexos NAMI-A e KP1019

Admitia-se que complexos cujo centro metálico é o rutênio possuem boa aplicação clínica principalmente devido a baixa toxicidade do metal.<sup>11</sup> Isto foi atribuído à semelhança das propriedades físico-químicas deste íon metálico com as do íon ferro.<sup>27</sup> O organismo consegue proteger-se dos efeitos causados pelo excesso de ferro através do aumento da produção de proteínas captadoras de ferro, como a transferrina e a albumina.<sup>28</sup> Postulou-se que o mecanismo de defesa contra a toxicidade do rutênio seria o mesmo.<sup>11</sup> Essa “crença” se estabeleceu após a publicação de estudos da interação da HSTf (transferrina sérica humana) com cloreto de rutênio marcado

(<sup>103</sup>RuCl<sub>3</sub>).<sup>29</sup> Acreditava-se, também, que a existência ou não de toxicidade associada ao metal poderia estar relacionada aos seus estados de oxidação acessíveis em meio fisiológico (II, III e IV). Esses estados seriam acessíveis possivelmente em decorrência da ação de agentes redutores como o ácido ascórbico ou de enzimas como a citocromo oxidase.<sup>11</sup>

Além da semelhança com o ferro, a presumida baixa toxicidade em função de resultados de citotoxicidade *in vitro* e da possível ocorrência de uma química redox relevante *in vivo*,<sup>30</sup> a busca por complexos ativos de rutênio considerava que sua atividade *deveria* estar relacionada com os mecanismos de atuação da cisplatina.<sup>11,31,32</sup> Portanto, aspectos da cinética de aquação de complexos de rutênio em meio aquoso e pH fisiológico sempre foram pontos críticos no planejamento de candidatos a metalo-fármacos baseados em rutênio.<sup>32</sup>

Com estas premissas em mente, iniciou-se a investigação das propriedades biológicas dos complexos NAMI-A, KP1019 e seus análogos. Ambos apresentam atividade em relação a tumores em fase de metástase, sendo baixa sua toxicidade sistêmica em doses farmacologicamente ativas.<sup>15,33</sup>

A partir deste ponto e, apesar da vasta literatura disponível sobre o tema na forma dos artigos originais e de uma série de trabalhos de revisão mais recentes,<sup>34</sup> minha análise está predominantemente relacionada ao conteúdo de dois artigos de revisão, referências 32 e 35, por haver um alinhamento de ideias. É útil informar que há uma variedade estrutural enorme nos complexos de rutênio que apresentam alguma atividade biológica. No entanto, tratar dos complexos NAMI-A e KP1019 é inescapável a qualquer tentativa de falar sobre metalofármacos baseados em rutênio, uma vez que estes compostos são os únicos dois que chegaram à fase de testes clínicos (Fase I para o KP1019 e Fases I e II para o NAMI-A). Sendo assim, as referências 32 e 35, bem como as referências nelas citadas, servem como base para o resto deste texto.

É uma máxima da química que elementos pertencentes a um mesmo grupo (ou família, para os mais velhos) na Tabela Periódica têm propriedades afins. Com base nessa “verdade”, generalizou-se a hipótese de que, sendo o ferro um metal essencial e sendo o rutênio um metal do mesmo grupo, então a aparente baixa toxicidade de compostos de rutênio derivaria do fato de que o rutênio usaria o mesmo “maquinário biológico” do ferro e seria, em última análise, metabolizado e excretado pelas mesmas vias. É curioso como uma afirmação dessa ordem é sistematicamente repetida pelos mais diversos autores (incluindo-me nesse grupo). É explicação recorrente nas salas de aula que, de modo geral, os metais “pesados” são tóxicos justamente por substituírem metais essenciais parecidos em termos de suas relações carga/raio em seus sítios biológicos (geralmente metaloproteínas).<sup>36</sup>

Além disso, o ferro, sendo um metal do primeiro período de transição, apresenta o fenômeno chamado de “equilíbrio de spin”. Sendo assim, a distribuição eletrônica dos íons Fe(II) e Fe(III) é altamente dependente dos ligantes presentes em sua esfera de coordenação e daí decorre o fato de que seu raio é variável, não apenas em função da variação de *nox* / carga nuclear efetiva, mas também em função dos efeitos eletrônicos de estabilização relativa das distribuições de spin alto e spin baixo. Já o rutênio predomina na condição de distribuição eletrônica de spin baixo, portanto, apresenta um valor praticamente fixo de raio para cada estado de oxidação. O fato do rutênio apresentar um raio maior o torna um ácido mais mole do que o ferro, o que tem implicações importantes na sua reatividade. Portanto, não é adequado justificar um estudo de complexo de rutênio com base na ideia de que suas propriedades, no que diz respeito à atividade biológica e citotoxicidade, decorrem de sua semelhança com o ferro.

Propagou-se também a ideia de que a acessibilidade a vários estados de oxidação, embora indubitavelmente seja uma propriedade

importante, seria um *pré-requisito* para a atividade biológica do rutênio. Bem, na grande maioria dos casos estudados, valores de potencial para os processos redox Ru(IV) / Ru(III) / Ru(II) foram determinados mediante reações de eletrodo, em soluções orgânicas ou aquosas de pH fisiológico, na ausência ou não de moléculas de interesse biológico como a albumina. Ou ainda foram verificadas as reações em solução de complexos com agentes redutores como o ácido ascórbico e a glutatona, ou oxidantes como o peróxido de hidrogênio. Infelizmente, assumir que as propriedades redox observadas nas condições experimentais mencionadas possam ser estritamente extrapoladas para a química redox que venha a ocorrer *in vivo* é temerário, por mais que seja conveniente. A única situação na qual os valores de potenciais redox observados em tais condições podem manter um alinhamento com a química redox *in vivo* seria para casos onde os complexos são inertes, assumindo ainda que a inércia química observada em solução se manteria diante dos mais variados tipos de proteínas presentes *in vivo*.

Uma dificuldade intrínseca de se correlacionar resultados químicos e *in vitro* com o que esperar *in vivo* para complexos de coordenação deriva do fato de que *in vivo* ainda não se tem conhecimento, nem tampouco controle, das estruturas que efetivamente estão presentes. Não se sabe quais são os potenciais redox das espécies efetivamente ativas. Isso ocorre em função de dois fatores: a labilidade dos complexos de rutênio (naturalmente relacionada à sua esfera de coordenação) e sua tendência de se ligar a proteínas séricas. Alguns poucos estudos de raios-X já mostraram que complexos inertes em solução perdem seus ligantes e interagem com a albumina como íons nus, coordenando-se preferencialmente a resíduos de histidina, no caso do rutênio(III).<sup>37,38</sup> Portanto, as propriedades de inércia / labilidade dos compostos de rutênio observadas em solução aparentemente não são reproduzidas na presença de proteínas séricas.

Então, seria mais razoável dizer que não é tão importante avaliar compostos cujos potenciais redox em solução ocorrem em valores acessíveis em meio aquoso de pH 7,4. Mais importante seria avaliar compostos cujos potenciais redox possam ser *modulados* em uma *faixa de potenciais* acessíveis em meio biológico.

Já a questão da labilidade / inércia dos compostos de rutênio nos remete às comparações com os mecanismos de ação da cisplatina. O primeiro comentário a fazer diz respeito ao fato de que, inicialmente, buscava-se por complexos de rutênio que apresentassem taxas de hidrólise comparáveis às dos compostos de platina nas mesmas condições.

A contraposição da labilidade / inércia dos compostos de rutênio com a platina é algo que também costuma ser invocado nos artigos. O Ru(III) é considerado nesses textos como sendo, necessariamente, mais inerte que a Pt(II).<sup>39,40</sup> Se levarmos em conta que a energia de estabilização de campo cristalino, sendo um efeito eletrônico, é o principal fator a ser considerado, poderíamos concluir que este íon não é mais inerte que a Pt(II). Podemos verificar isso a partir da posição relativa dos dois elementos na tabela periódica e nos valer de argumentos simples da química de coordenação, como a variação periódica de  $\Delta_0$  (parâmetro de desdobramento de campo cristalino) e os efeitos de estabilização daí originados. No entanto, a carga maior no íon Ru(III) contribui para uma maior inércia em reações de substituição tanto quanto a geometria quadrado planar dos complexos de Pt(II) levam a uma maior reatividade em comparação com complexos octaédricos, típicos para os íons Ru(II) e (III).

Normalmente a generalização de que compostos de rutênio são (sempre) mais inertes que os de platina se presta a balizar a hipótese de que para um metalofármaco ser ativo ele precisaria passar pelo que se chama de “ativação por redução”. Ou seja: um composto de Ru(III) seria ativo apenas após ser reduzido. A redução o tornaria mais lábil e mais apto a interagir com bioalvos. Novamente há um

viés conceitual, pois o íon Ru(II) de configuração  $d^6$  tenderia a ser mais inerte do que o íon Ru(III)  $d^5$ , novamente considerando as energias de estabilização de campo ligante (efeito eletrônico), que é máxima para íons  $d^6$  dos segundo e terceiro períodos de transição, em geometria octaédrica.

Fazendo uma digressão, essa linha argumentativa é conveniente, pois leva a outra generalização: a de que um complexo obrigatoriamente precisa passar por uma via redutiva, já que o ambiente dos tumores é redutor (devido à hipóxia). A via redutiva oferece hipoteticamente um meio de controle da atividade: compostos de Ru(III) são inertes e inativos até atingirem o tumor, onde seriam reduzidos e passariam a expressar sua atividade. Ou seja: criou-se uma linha argumentativa que habita o imaginário das pessoas envolvidas na área e que embute alguns problemas conceituais, mas que, confortavelmente, presta-se a estabelecer como certo que compostos de Ru(III) precisam ser inertes para serem ativados por redução apenas quando chegarem ao seu bioalvo, o tumor.

Em primeiro lugar, hoje, em 2018, parece haver consenso de que os tumores primários (sólidos) não são os alvos preferenciais dos complexos de rutênio. Fato é que existe uma variedade de exemplos na literatura de complexos de Ru(III) e Ru(II) que são mais ou menos inertes em diferentes condições, especialmente no que diz respeito à presença ou não de uma proteína como a HSA (albumina do soro humano) no meio reacional. Essa frase ocorre aqui apenas para dizer o óbvio: não é de todo realista tentar racionalizar o comportamento de complexos com esfera de coordenação mista, em meio biológico, com argumentos exclusivamente baseados na teoria cinética original de Taube. A linha de análise é obviamente correta, no entanto, há que se estudar caso a caso. Os argumentos sobre labilidade e inércia apresentados acima em termos de estabilização relativa de reagentes e produtos com base em  $\Delta_0$  são válidos para os chamados “complexos de Werner”, que são complexos octaédricos homolépticos com ligantes “simples” como a água, a amônia ou os haletos. Além disso, a racionalização (reitero, correta) do comportamento cinético de um íon metálico a partir da estabilização relativa dos reagentes e produtos por energia de estabilização de campo ligante é apresentada nos livros textos para reações de substituição de água coordenadas (ou seja, de solvente), o que não tem paralelo com os complexos NAMI-A, KP1019 e outros estudados como candidatos a fármacos.

O que se sabe é que a reação de hidrólise da cisplatina é importante para sua atividade, uma vez que é o complexo aquo que se liga ao DNA. A reação de interesse (aquação) ocorre em um intervalo de poucas horas (cerca de duas) nas concentrações de íons  $\text{Cl}^-$  presentes no meio celular ( $4 - 20 \text{ mmol L}^{-1}$ ), intervalo compatível com os processos de divisão celular. Já os complexos de Ru(III) da família do NAMI-A e KP1019 sofrem reação de substituição de íons cloreto mesmo nas concentrações mais altas desse ânion encontradas no meio extracelular ( $\sim 150 \text{ mmol L}^{-1}$ ), o que responderia em parte por sua grande afinidade por proteínas séricas. Hoje já foi descrito, no entanto, que mais de 90% da dose de cisplatina administrada por via intravenosa é desativada por ligação com proteínas séricas. Ou seja: as taxas de hidrólise desses complexos não são dependentes apenas da concentração de  $\text{Cl}^-$  no meio. A reatividade na presença de proteínas séricas possivelmente não é a mesma em comparação com a reatividade estudada em solução.

O conhecimento sobre os mecanismos de ação da cisplatina e seus análogos é muitíssimo maior do que o conhecimento acumulado para os compostos de rutênio. Já está bem estabelecido que a cisplatina atua preferencialmente em tumores, e mais, atua diretamente no DNA. Portanto, é pré-requisito para sua atuação que o complexo seja internalizado pelas células. No caso do rutênio, a grande verdade é que os mecanismos de suas ações biológicas não estão seguramente descritos. Contudo, no que diz respeito a câncer, a maioria dos compostos

de rutênio não atua diretamente em tumores primários. Ao contrário, têm atividade relevante em fase de metástase. Aparentemente esse comportamento pode ser explicado em função de dois fatores já investigados: a internalização (ou “uptake” celular) é baixa no caso dos complexos de rutênio e os mesmos apresentam alta afinidade por proteínas séricas. Até o momento uma das melhores hipóteses para explicar a atividade anti-metastática dos complexos de rutênio seria sua capacidade de se ligar ao colágeno na matriz extracelular e às proteínas do tipo da actina na superfície celular, de modo a interferir na mobilidade de células cancerígenas invasivas.

Esses fatos mostram que o DNA não necessariamente deva ser um alvo pretendido quando se idealiza a estrutura química de um candidato a metalo-fármaco. Obviamente, para que o DNA seja um bioalvo realista, o complexo em avaliação precisa ser internalizado. Verifica-se que o aumento global da hidrofobicidade do complexo (obtido pela escolha de ligantes orgânicos) aumenta sim a interação dos mesmos com biomoléculas. E isso tem como consequência maiores valores de “uptake” celular, possivelmente relacionado ao aumento na interação dos complexos com estruturas da membrana celular.

É necessário, porém, desmistificar a ideia de que a presença de ligantes orgânicos hidrofóbicos e, muitas vezes, aromáticos e planares que servem como âncora para a interação dos complexos com biomoléculas, implica necessariamente em ganho nas propriedades de um metalofármaco. O aumento na hidrofobicidade se traduz, de modo geral, em aumento de lipofilicidade. Muito embora tenha sido demonstrado que, geralmente, esse fato implique em aumento de citotoxicidade nos ensaios *in vitro*, isso também aumenta os tempos de retenção dos complexos no organismo e pode aumentar também sua toxicidade geral.

Daqui deriva outro ponto que precisa ser levantado: o que buscamos quando idealizamos um candidato a metalofármaco? Geralmente buscamos planejar aspectos estruturais que garantam citotoxicidade em concentrações seguras. Ora, o NAMI-A foi investigado justamente por sua citotoxicidade ser baixa, pois ele atua em processos que levam à morte celular sem apresentar alta citotoxicidade *in vitro*. A dicotomia citotoxicidade vs toxicidade é evidente no caso do NAMI-A: os testes clínicos foram descontinuados após a conclusão da fase II pois, apesar da baixa citotoxicidade nos testes *in vitro* e *in vivo* em fase pré-clínica, o composto mostrou-se tóxico nas condições de realização dos testes em humanos.

Portanto, o fato de que altos valores de citotoxicidade não precisam ser necessariamente um objetivo a ser alcançado no desenho de candidatos a metalo-fármacos de rutênio, e do conhecimento de que sua internalização é baixa, confere relevância aos ensaios de interação dos complexos de rutênio com proteínas séricas. Naturalmente esses aspectos devem ser investigados caso a caso, mas para os propósitos deste texto, a generalização é válida.

O NAMI-A é o melhor exemplo disso. Nos testes clínicos de fase II, apresentou toxicidade tão alta aos pacientes que o composto foi, finalmente, descartado. Ao contrário, o complexo KP1019, que apresenta citotoxicidade *in vitro* em geral superior à observada para o NAMI-A, apresentou-se menos tóxico em humanos nos testes clínicos de fase I.

Será que o NAMI-A é de fato ruim? Alessio pondera que, novamente, caiu-se na armadilha do paralelismo “obrigatório” com a cisplatina.<sup>35</sup> De modo bem simplificado, os testes clínicos foram realizados segundo protocolos que levaram em consideração a atuação dos fármacos à base de platina. Estes atuam no DNA e, como já dito, os complexos de rutênio têm como principal alvo biológico proteínas séricas e sua internalização nas células costuma ser baixa. No entanto, é óbvio que essas interações podem ser moduladas, principalmente em função da concentração do fármaco. Foi demonstrado que a internalização de compostos de rutênio aumenta em concentrações

altas (> que  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) devido à maior taxa de ligação à apo-HSTf (a apo-HSTf é a forma livre de ferro da HSTf). A transferrina é uma proteína que apresenta seletividade ao ferro quando este está em excesso em relação a outros metais e quando há também excesso de albumina, que se ligará preferencialmente a esses outros metais. Ou seja: a transferrina é seletiva a ferro nas condições fisiológicas. No entanto, ela é capaz de se ligar a vários outros metais, especialmente se a concentração dos mesmos for alta. Tumores, por serem muito vascularizados, precisam de um aporte alto de ferro. Portanto, há um aumento de receptores de HSTf em sua superfície. Desse modo, o aporte do complexo de rutênio seria maior no tumor se fosse administrado em quantidades altas. Os testes, grosso modo, seguiram os protocolos de administração dos fármacos à base de platina e utilizou-se concentrações tão altas quanto  $600 \mu\text{mol L}^{-1} \text{m}^{-2}$ . Foram deixados em segundo plano o conhecimento de que os mecanismos de ação dos complexos de rutênio são diferentes e que as atividades conhecidas ocorrem em faixas de concentração muito mais baixas.

A HSTf é uma proteína com uma função específica, ela é responsável pela internalização do ferro nas células. Experimentos *in vitro* mostraram que, quando se incubava células com HSTf previamente carregada com KP1019, sua internalização diminuiu em comparação com a incubação com o complexo em solução. Esse fato sugere que, embora a ligação da HSTf com o complexo de rutênio ocorra, é possível que o aduto formado não tenha a conformação correta para interagir com os receptores celulares. Esse ponto ganha força mediante a observação de que a internalização do KP1019 aumenta quando se utiliza uma HSTf pré-carregada com rutênio e ferro, respectivamente nas proporções 1:1:0,3. Por fim, apesar da capacidade da HSTf se ligar a alguns complexos de rutênio em determinadas condições e de ter sido verificada a internalização nas células, por hora nada se sabe sobre a capacidade dos adutos HSTf-Ru e HSTf-Ru-Fe liberarem rutênio nas mesmas condições fisiológicas da liberação do ferro (redução em meio ácido à Fe(II) com consequente diminuição de afinidade pela proteína).

Além dos fatos discutidos acima, outro aspecto inescapável é a grande diferença de concentração plasmática entre a HSA (da ordem de  $600 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) e da HSTf (varia entre 20 a  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ ). *In vivo*, é muito mais provável a ocorrência de ligações inespecíficas entre complexos de rutênio com a HSA. A HSA parece não ter nenhum papel específico além de transportar e armazenar os compostos, mantendo sua concentração plasmática constante.

Diante deste cenário (especificidade para ferro nas condições fisiológicas e atuação dos compostos de rutênio no meio extracelular), talvez não seja tão importante estudar as interações de complexos de rutênio com a HSTf. Em outras palavras, talvez não seja rigorosamente necessário buscar complexos cujo alvo seja o DNA, uma vez que qualquer atuação nesse sentido depende da internalização do complexo de rutênio na célula (assumindo que a principal via de internalização seria mediada pela HSTf). Reitera-se a relevância da realização do estudo das interações dos complexos com a HSA. A avaliação das interações fracas que se estabelecem entre complexo e a HSA é extremamente relevante, pois estas interações dirigem a posterior formação de adutos covalentemente ligados, normalmente com resíduos de histidina (cujo grupo ligante para o rutênio é um imidazol). Recentemente foi levantada a possibilidade de que são os adutos HSA-Ru que seriam responsáveis pela atividade observada para o NAMI-A e o KP1019 *in vivo*.

Não será de uma hora para outra que a comunidade abandonará a ideia de que os compostos precisam obrigatoriamente ser internalizados para serem ativos e, portanto, de que é necessário continuar investigando a HSTf. No entanto, se isso ocorrer, as mesmas questões sobre como o rutênio seria liberado de seu aduto com proteína sérica para realizar suas funções serão centrais. Do ponto de vista



estritamente químico, as ligações Ru(III) / Ru(II) com a histidina são estáveis e pouco lábeis.

A última questão que gostaríamos de levantar diz respeito a quando o metalo-fármaco atua como a droga em si, ou quando ele atua como uma pró-droga. A definição de um complexo como metalofármaco passa pela ideia implícita de que é a estrutura originalmente administrada que tem a atividade biológica. A pró-droga seria o composto químico que, após sua administração, sofreria algum grau de biotransformação e os novos produtos gerados *in vivo* é que seriam efetivamente ativos.

No caso dos complexos de coordenação e particularmente no caso dos compostos de rutênio, o leitor menos familiarizado com a área costuma encarar o complexo como um mero “carregador” de ativos orgânicos (os ligantes) e que, na melhor das hipóteses, sofrerá reações de substituição (aquação, por exemplo) *in vitro* ou *in vivo*, liberando o ativo orgânico. De modo geral não se tem considerado o outro lado da história, o fato de que em reações de substituição em meio biológico, a espécie de interesse pode não ser aquela que foi liberada do composto, mas sim a nova espécie metálica. Há sugestões na literatura de que, em última análise, as ações biológicas observadas para os complexos da família do NAMI-A (e KP1019) teriam origem na simples perturbação das vias metabólicas do Fe(III). Essas perturbações ocorreriam após a perda dos ligantes e a substituição do íon de ferro pelo íon de rutênio nu em metaloproteínas. Essa é a única linha argumentativa que passa pela ideia de biomimetismo originalmente preconizada na bioinorgânica: as eventuais semelhanças entre o ferro e o rutênio, por serem metais do mesmo grupo, permitiriam a substituição em sítios biológicos de ferro, conferindo sim toxicidade aos compostos de rutênio.

Então, três tipos “básicos” de complexos podem ser considerados como candidatos a metalofármacos: a) compostos inertes (metalofármaco propriamente dito); b) compostos que liberam grupos funcionais específicos, como o óxido nítrico, mediante estímulos controlados (pró-droga) e c) complexos lábeis como o NAMI-A, que assumem outra composição *in vivo* pela perda de seus ligantes (pró-droga; neste caso a espécie ativa não seria os ligantes liberados e sim o aduto metálico formado).

## CONCLUSÃO

A conclusão (superficial) que a análise apresentada pode sugerir a um leitor desavisado é a de que, então, não haveria sentido no desenvolvimento de enormes quantidades de artigos acadêmicos focando estudos em solução e *in vitro* de complexos candidatos a fármacos. Nada poderia ser mais equivocado! A ideia aqui é trazer à tona a dificuldade de tratar dados obtidos em solução e *in vitro* como **preditivos** do comportamento *in vivo*. O comportamento *in vivo* pode ser muitíssimo imprevisível, especialmente por que não temos controle de todas as variáveis envolvidas. Essa é, de fato, a única limitação. No entanto, é o comportamento estabelecido a partir de estudos acadêmicos que permite a obtenção reprodutível de um material em quantidades e pureza adequadas. É o que desperta interesse a partir de alguma propriedade distintiva. E mais: não haveria rigorosamente nenhuma chance de se realizar experimentos *in vivo*, seja em protocolos animais ou em humanos, sem o acúmulo de um grande número de dados coletados *in vitro* que permitam **inferir** sobre a atividade e toxicidade de um candidato a fármaco. A pesquisa acadêmica é inescapável.

Do ponto de vista apresentado neste texto, após mais de trinta anos de investigações focando a atividade biológica de complexos de rutênio, simplesmente não será mais o bastante (talvez não seja sequer possível!) justificar estudos dessa natureza a partir de generalizações sobre o comportamento do rutênio e paralelismos com o ferro e a platina. É preciso sim levantar dados de exemplos, tal qual

o NAMI-A, para os quais alguma atividade relevante tenha sido demonstrada.<sup>32,35</sup> É preciso não abandonar pesquisas de cunho básico, que focam alvos clássicos como o DNA, mas fazê-las com um olhar mais arejado, mais crítico.<sup>41</sup> É mandatório investigar outros aspectos, como o metabolismo e as possíveis interações cruzadas dos candidatos a fármacos com outros compostos químicos. E, por fim, é preciso não se intimidar diante de complexos metálicos cuja estrutura não apresente nenhum aspecto facilmente reconhecível como promissor no planejamento de um fármaco.

## REFERÊNCIAS

- Hodgkin, D. C.; Pickworth, J.; Robertson, J. H.; Trueblood, K. N.; Prosen, R. J.; White, J. G.; *Nature* **1955**, *176*, 325.
- Bartnikas, T. B.; Gitlin, J. D.; *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2001**, *8*, 733.
- Toma, H. E.; *O mundo nanométrico: a dimensão do novo século*; Oficina de Textos: São Paulo, 2009.
- Orvig, C.; Abrams, M. J.; *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2201.
- Zhang, C. X.; Lippard, S. J.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 481; Reedijk, J.; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1999**, *3*, 236; Dendrinou-Samara, C.; Tsotsou, G.; Ekateriniadou, L. V.; Kortsaris, A. H.; Raptoulou, C. P.; Terzis, A.; Kyriakidis, D. A.; Kessissoglou, D. P.; *J. Inorg. Biochem.* **1998**, *71*, 171; Farrell, N.; *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 1; Clarke, M. J.; Zhu, F.; Frasca, D. R.; *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2511; Sharma, V.; Piwnica-Worms, D.; *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2545.
- Dharmaraj, N.; Viswanathamurthi, P.; Natarajan, K.; *Transition Met. Chem.* **2001**, *26*, 105.
- Allardyce, C. S.; Dyson, P. J.; Ellis, D. J.; Salter, P. A.; Scopelliti, R.; *J. Organomet. Chem.* **2003**, *668*, 35.
- Aird, R. E.; Cummings, J.; Ritchie, A. A.; Muir, M.; Morris, R. E.; Chen, H.; Jodrell, D. I.; *Br. J. Cancer.* **2002**, *86*, 1652.
- Clarke, M. J.; *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *236*, 209.
- de Lima, R. G.; Lever, A. B. P.; Ito, I. Y.; da Silva, R. S.; *Transition Met. Chem.* **2003**, *28*, 272; Pieper, T.; Keppler, B. K.; *Analysis* **1998**, *26*, 84; Smith, C. A.; Sutherland-Smith, A. J.; Keppler, B. K.; Kratz, F.; Baker, E. N.; Keppler, B. H.; *J. Biol. Inorg. Chem.* **1996**, *1*, 424.
- Allardyce, C. S.; Dyson, P. J.; *Platinum Met. Rev.* **2001**, *45*, 62.
- Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Krigas, T.; *Nature* **1965**, *205*, 698; Rosenberg, B.; Vancamp, L.; Trosko, J. E.; Mansour, V. H.; *Nature* **1969**, *222*, 385.
- Fontes, A. P. S.; César, E. T.; Beraldo, H.; *Cad. Temáticos Quim. Nova. Esc.* **2005**, *6*, 13.
- Messori, L.; Merlino, A.; *Coord. Chem. Rev.* **2016**, *315*, 67.
- Dyson, P. J.; Sava, G.; *Dalton Trans.* **2006**, *16*, 1929.
- Johnstone, T. C.; Suntharalingam, K.; Lippard, S. J.; *Chem. Rev.* **2016**, *116*, 3436.
- Seuanes, G. C.; Moreira, M. B.; Petta, T.; del Lama, M. P. F. M.; de Moraes, L. A. B.; de Oliveira, A. R. M.; Naal, R. M. Z. G.; Nikolaou, S.; *J. Inorg. Biochem.* **2015**, *153*, 178.
- Allardyce, C. S.; Dorcier, A.; Scolaro, C.; Dyson, P. J.; *Appl. Organomet. Chem.* **2005**, *19*, 1.
- Fletcher, J. M.; Greenfield, B. F.; Hardy, C. J.; Scargill, D.; Woodhead, J. L.; *J. Chem. Soc. (Resumed)* **1961**, *382*, 2000.
- Reed, K. C.; Fyfe L. B.; *Biochem. J.* **1974**, *140*, 143.
- Xiang, H. J.; Guo, M.; Liu, J. G.; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 1586; Rau, S.; Zheng, S.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 197; Schatzschneider, U.; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2010**, *10*, 1451.
- Liang, X.; Campopiano, D. J.; Sadler, P. J.; *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36*, 968.
- Zaki, M.; Arjmand, F.; Tabassum, S.; *Inorg. Chim. Acta* **2016**, *444*, 1.
- Machado, A. E. H.; *Quím. Nova* **2000**, *23*, 237.
- Sava, G.; Pacor, S.; Mestroni, G. Alessio, E.; *Clin. Exp. Metastasis* **1992**, *10*, 273.

26. Sava, G.; Pacor, S.; Mestroni, G.; Alessio, E.; *Anti-Cancer Drugs* **1992**, *3*, 25.
27. Medeiros, M. A.; *Quim. Nova Esc.* **2010**, *32*, 208.
28. de Almeida, A.; Oliveira, B. L.; Correia, J. D.; Soveral, G.; Casini, A.; *Coord. Chem. Rev.* **2013**, *257*, 2689; Bal, W.; Sokolowska, M.; Kurowska, E.; Faller, P.; *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 5444; Sun, X.; Tsang, C. N.; Sun, H.; *Metallomics* **2009**, *1*, 25; Timerbaev, A. R.; Hartinger, C. G.; Aleksenko, S. S.; Keppler, B. K.; *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 2224; Espósito, B. P.; Najjar, R.; *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *232*, 137.
29. Clarke, M. J.; *Coord. Chem. Rev.* **2003**, *236*, 209.
30. Zhang, P.; Sadler, P. J.; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, *12*, 1541.
31. Seddon, E. A.; Seddon, K. R.; *The Chemistry of Ruthenium*, Elsevier Science, Publishing Co. Inc.: Amsterdam, 1984; Gielen, M.; Tiekink, E. R. T.; *Metallotherapeutic drugs and metal-based diagnostic agents: the use of metals in medicine*, John Wiley & Sons: Chichester, 2005, p. 359; Reedijk, J.; *Met. Rev.* **2008**, *52*, 2.
32. Levina, A.; Mitra, A.; Lay, P. A.; *Metallomics* **2009**, *1*, 458.
33. Scolaro, C.; Chaplin, A. B.; Hartinger, C. G.; Bergamo, A.; Cocchietto, M.; Keppler, B. K.; Dyson, P. J.; *Dalton Trans.* **2007**, *43*, 5065.
34. Timerbaev, A. R.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2016**, *80*, 547; Medici, S.; Peana, M.; Nurchi, V. M.; Lachowicz, J. I.; Crisponi, G.; Zoroddu, M. A.; *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *284*, 329; Mjos, K. D.; Orvig, C.; *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 4540; Casini, A.; *J. Inorg. Biochem.* **2012**, *109*, 97; Komeda, S.; Casini, A.; *Curr. Top. Med. Chem.* **2012**, *12*, 219; El Kazzouli, S.; El Brahmi, N.; Mignani, S.; Bousmina, M.; Zablocka, M. P.; Majoral, J.; *Curr. Med. Chem.* **2012**, *19*, 4995.
35. Alessio, E.; *Eur. J. Inorg. Chem.* **2017**, 1549.
36. Roat-Malone, R. M.; *Bioinorganic Chemistry, A short course*, Wiley-Interscience: Hoboken, 2002; Alessio, E.; *Bioinorganic Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH: Weinheim, 2011; Toma, H. E.; *Química Bioinorgânica e Ambiental*, Blucher: São Paulo, 2015.
37. Messori, L.; Marzo, T.; Sanches, R. N. F.; Rehman, H.-U.; Silva, D. O.; Merlino, A.; *Angew. Chem.* **2014**, *53*, 6172.
38. Vergara, A.; Russo Krauss, I.; Montesarchio, D.; Paduano, L.; Merlino, A.; *Inorg. Chem.* **2013**, *52*, 10714.
39. Silva, P. P.; Guerra, W.; *Quim. Nova Esc.* **2012**, *34*, 99.
40. Silva, P. P.; Guerra, W.; *Quim. Nova Esc.* **2010**, *32*, 128.
41. Albani, B. A.; Peña, B.; Leed, N. A.; De Paula, N. A.; Pavani, C.; Baptista, M. S.; Turro, C.; *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17095; Turro, C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2011**, *108*, 17573.