

## **5. Metabolómica e complexos metálicos: aliados no combate ao cancro?**

Ana S. Martins, Maria P. Marques, Ana M. Gil

### **Resumo**

O cancro é cada vez mais visto como a nova epidemia do século capaz de assolar as populações um pouco por todo o mundo. Deste modo, urge a procura por estratégias mais eficazes no combate a este grande vilão. A inibição de vias metabólicas essenciais aos tumores para a sua progressão e malignidade representa um passo-chave e de crescente interesse na investigação de tratamentos anticancerígenos. Para tal, a pesquisa de diversas classes de fármacos com potencial anticancerígeno tem sido alvo crescente nos últimos anos, com ênfase para os compostos contendo centros metálicos. Paralelamente, a metabolómica tem-se revelado uma ferramenta valiosa em diversos campos, nomeadamente na área do cancro. Assim, o presente capítulo procura demonstrar como a metabolómica pode ser um aliado na descoberta do potencial de complexos metálicos para o combate ao cancro.

### **5.1 O cancro e a Quimioterapia**

Presentemente, vivem no mundo inteiro milhões de pessoas com o diagnóstico de cancro com uma grande parcela a não resistir e a sucumbir a esta fatalidade. O cancro tem o seu início nas células, mais concretamente na alteração de uma célula ou de um pequeno grupo de células. Normalmente, cada tipo de célula encontra-se presente no número adequado: as células crescem, dividem-se, envelhecem, morrem e são substituídas por novas células. Contudo, por vezes, este processo ordenado e controlado é perturbado e formam-se novas células desnecessárias ao organismo, mantendo-se as células antigas. Apesar das células produzirem sinais a fim de controlar a periodicidade da sua divisão, a falha ou omissão desses sinais resulta na sua proliferação anormal que pode levar à formação de um tumor, designado tumor primário. Os tumores malignos, entendidos como cancro, diferenciam-se dos benignos ao poderem apresentar a capacidade de invadir e danificar os tecidos e órgãos circundantes ou mais distantes, por invasão da corrente sanguínea ou do sistema linfático, processo conhecido como metastização, uma das bases moleculares associadas à malignidade dos tumores (Figura 5.1). Apesar de poderem ser removidos, os tumores malignos podem voltar a crescer colocando em risco a vida do paciente. Neste sentido urge a procura de terapêuticas capazes de fazer frente a esta séria doença. Nesta procura é necessário ter em mente que o cancro não é uma só doença: há muitos tipos de cancro, semelhantes entre si em alguns aspetos mas suficientemente diferentes na forma como crescem e se

disseminam. Deste modo a estratégia de tratamento deve ter em conta diversos fatores nos quais se incluem o tipo de cancro e o estadio da doença bem como parâmetros relacionados com o paciente como a idade, hábito de vida e estado geral.



**Figura 5.1:** Bases moleculares do cancro e seu papel nos processos essenciais à sobrevivência, proliferação e disseminação das células cancerígenas.

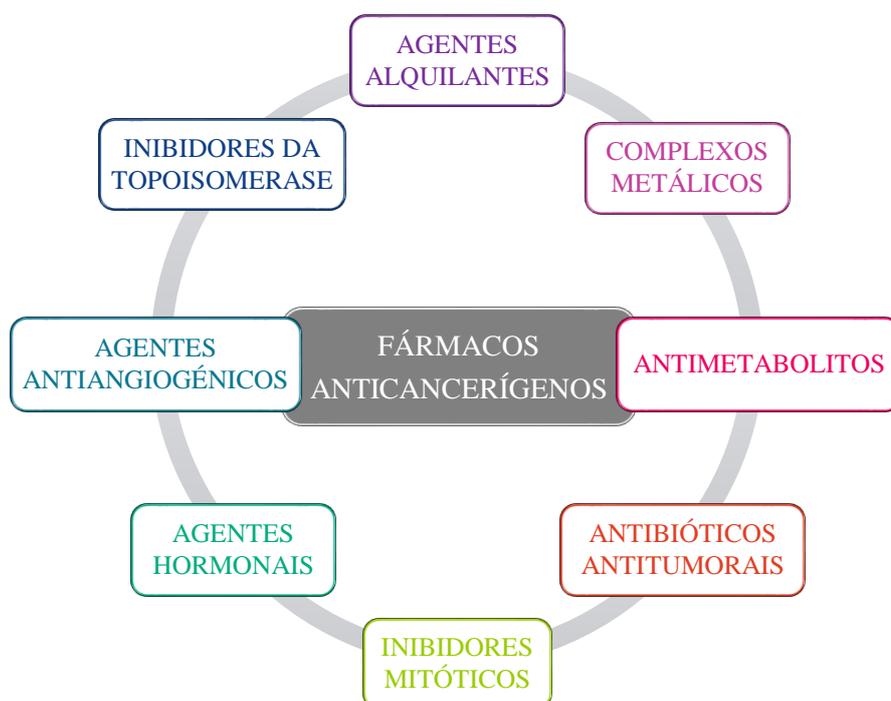
Apesar do objetivo do tratamento passar primeiramente pela cura do cancro, por vezes, a estratégia terapêutica cinge-se ao controlo da doença ou à redução dos sintomas a ela associados. Usualmente a maioria dos planos de tratamento foca-se numa ou mais vertentes: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia consiste na administração de um fármaco, ou associação de fármacos, com vista à morte das células cancerígenas (e idealmente apenas estas). Independentemente da forma de administração (oral ou intravenosa), o fármaco anticancerígeno entra na corrente sanguínea e circula por todo o organismo de forma a exercer a sua função. Trata-se, assim, de uma terapia sistémica que visa controlar o cancro em todo o corpo ao matar ou, pelo menos, desacelerar o crescimento das células cancerígenas componentes do tumor primário e de eventuais metástases. Lamentavelmente, a quimioterapia é capaz de atuar em todas as células do organismo com o efeito antitumoral do fármaco a ser, assim, estendido igualmente às células normais, ainda que com menor especificidade visto os fármacos serem mais específicos para as células cancerígenas.

De acordo com a sua finalidade, a quimioterapia pode ser classificada de diversas formas: curativa – quando é empregue com o intuito de controlar e curar o cancro; adjuvante – quando é utilizada enquanto complemento ao tratamento primário; neoadjuvante – quando empregue como tratamento inicial para obter a redução parcial do tumor seguindo-se a complementação com cirurgia ou radioterapia; e paliativa – quando não apresenta finalidade curativa sendo, antes, utilizada com a finalidade de controlar e melhorar a qualidade de sobrevivência do paciente terminal. Existem atualmente

são várias classes de agentes anticancerígenos disponíveis, as quais serão brevemente abordadas no presente capítulo.

## 5.2 Fármacos no Combate ao Cancro

O tratamento com fármacos anticancerígenos visa prevenir as células cancerígenas de multiplicar, invadir, metastizar, e, em última instância, ocasionar a morte do paciente. Para tal, o agente anticancerígeno promove diretamente a morte da célula cancerígena ou, em última instância, despoleta a sua diferenciação, senescência ou apoptose. Dependendo da sua estrutura química e dos seus mecanismos de ação e de interação com outros agentes, os fármacos anticancerígenos classificam-se em diversas classes (Figura 5.2), as quais serão seguidamente abordadas de forma sucinta.



**Figura 5.2:** Principais classes de agentes anticancerígenos correntemente empregues no tratamento do cancro por quimioterapia.

Os **agentes alquilantes** representam um dos principais tipos de fármacos frequentemente empregues na quimioterapia. Devido à formação de uma espécie iónica altamente instável o fármaco é capaz de se ligar covalentemente às bases azotadas da molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN) alterando a sua conformação nativa e interferindo, assim, com a capacidade da célula cancerígena se dividir. Os **complexos metálicos** constituem uma classe de agente antineoplásico de elevado interesse clínico, na qual um ou mais iões metálicos coordenados a ligandos específicos desempenham uma função chave para o mecanismo de ação do fármaco. De modo análogo aos agentes alquilantes, os compostos metálicos interagem com a dupla hélice de ADN por ligação covalente do(s) catião(iões) metálico(s) às bases purínicas ou pirimidínicas desta

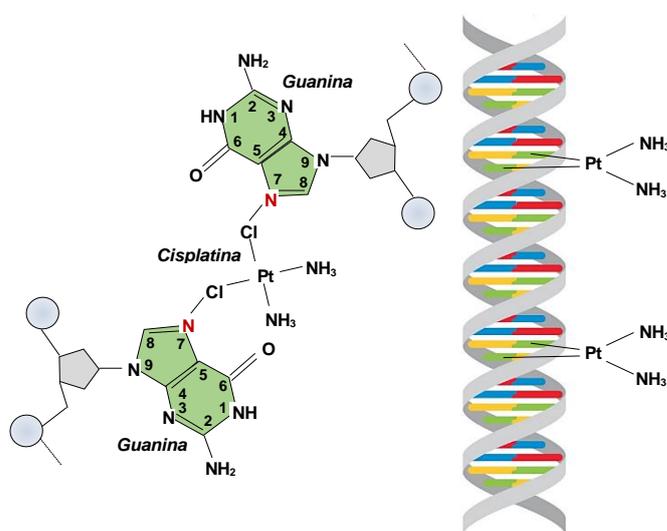
moléculas, deste modo, com as diversas fases do ciclo celular. Devido à semelhança no modo de ação os complexos metálicos são frequentemente englobados na classe de agentes alquilantes, ainda que de forma errónea. Os **antimetabolitos** exercem o seu efeito por interferirem com a síntese das moléculas de ADN e ácido ribonucleico (ARN) ao simularem os componentes normais constituintes das mesmas, justificando, assim, a sua designação enquanto antimetabolitos. Esta classe de fármacos é particularmente ativa durante a fase S do ciclo celular, na qual são copiados. Os **antibióticos antitumorais** representam uma das mais potentes classes de agentes anticancerígenos atualmente em uso clínico e diferenciam-se dos antibióticos antimicrobianos (empregues no tratamento de infeções) ao atuarem ao nível do ADN no interior das células cancerígenas a fim de impedirem as mesmas de crescerem e se multiplicarem, e controlando deste modo o crescimento do tumor. Apesar de interagirem com a molécula de ADN e inibirem a sua síntese, esta classe de fármaco anticancerígeno não atua especificamente em nenhuma fase do ciclo celular. Estes compostos não estabelecem ligações covalentes com o alvo (ADN) mas intercalam-se entre as duas hélices da sua estrutura nativa, alterando-a. Os **inibidores de topoisomerases** tomam esta designação precisamente devido ao facto de atuarem ao nível destas enzimas, as quais têm como função auxiliar na separação das duas cadeias de ADN para que estas possam ser copiadas durante a fase S do ciclo celular. Por sua vez, os **inibidores mitóticos** interferem com o processo de mitose apesar de serem capazes de comprometer todas as fases do ciclo celular ao intervirem na síntese de proteínas essenciais à reprodução das células cancerígenas. No que se refere aos **agentes hormonais** (terapia endócrina), rigorosamente falando, não se trata exatamente de uma terapia quimioterápica mas sim hormonal a fim de modificar ou inibir diversos tipos de tumores malignos que necessitam de determinadas hormonas para crescerem. Por fim, os **agentes antiangiogénicos** representam uma classe de fármacos anticancerígenos de crescente interesse para o tratamento de tumores sólidos dependentes da angiogénese para o seu crescimento e metastização. Como o próprio nome indica, esta classe de agentes inibe a formação de novos vasos sanguíneos essenciais ao processo de metástase e, portanto, determinantes do grau de malignidade do tumor. Em suma, são várias e distintas as classes de agentes com potencial anticancerígeno atualmente empregues na tentativa de inibir vias metabólicas essenciais aos tumores para a sua progressão e malignidade. O presente capítulo explora em maior detalhe os fármacos anticancerígenos contendo centros metálicos, uma classe em franco crescimento.

### 5.3 Complexos Metálicos enquanto Agentes Anticancerígenos

Nos últimos anos, os complexos metálicos têm sido alvo de crescente interesse em Química Medicinal. Um número crescente de estudos explora o potencial destes agentes para o tratamento de diversas doenças com especial ênfase para a sua aplicação em quimioterapia. A sua utilização enquanto agentes anticancerígenos remonta aos anos 60, com a descoberta acidental da cisplatina (por Rosenberg e seus colegas), o mais reconhecido e utilizado agente anticancerígeno contendo um centro metálico. Ao longo

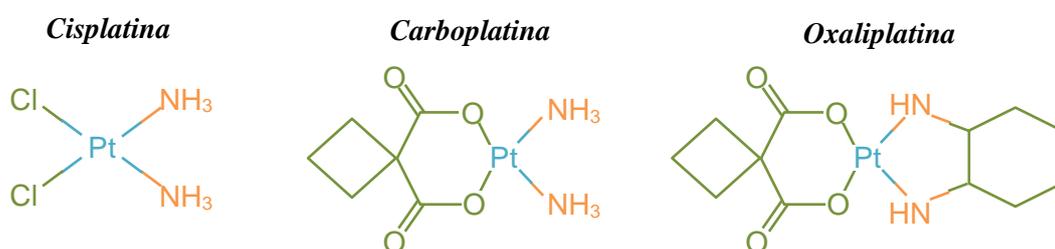
das últimas cinco décadas, um vasto número de complexos metálicos tem sido alvo de extensa investigação e avaliação *in vitro* e *in vivo*. Inseridos nesta classe, os complexos dos metais de transição platina (Pt<sup>II</sup> e Pt<sup>IV</sup>), rutênio (Ru<sup>II</sup> e Ru<sup>III</sup>), ouro (Au<sup>I</sup> e Au<sup>III</sup>) e titânio (Ti<sup>IV</sup>) têm sido os principais alvos de estudo. O preenchimento parcial das camadas orbitais *d* confere aos metais de transição as propriedades eletrônicas necessárias ao estabelecimento de compostos de coordenação representados por um centro metálico coordenado a uma matriz circundante de moléculas ou iões. O desenho de novos compostos de coordenação tem em consideração o estado de oxidação do metal e a hidrólise intracelular dos seus grupos abandonantes, já que estes determinam a sua atividade biológica, bem como o transporte, a biodisponibilidade e a dose ótima do fármaco administrado. A elevada gama de reatividades disponíveis, em conjunto com a capacidade de coordenar diversos tipos de ligandos, confere uma vantagem aos compostos contendo centros metálicos relativamente aos compostos orgânicos convencionais. Até ao momento, os complexos de platina têm sido o principal alvo de estudo e continuam a representar os únicos agentes anticancerígenos desta classe em uso clínico. No entanto, uma nova era emerge na qual se observa a tendência para o desenvolvimento de complexos metálicos anticancerígenos contendo outros metais de transição para além da platina, e conseguinte elucidação das respostas celulares por eles despoletadas.

A cisplatina tem sido empregue enquanto agente anticancerígeno no tratamento de um vasto leque de neoplasias malignas, nomeadamente os cancros de ovário, cervical, cabeça e pescoço, pulmão e testículo. Ao interagir com o ADN origina a formação de adutos, interferindo com os processos de replicação e transcrição, despoletando a morte da célula. O estudo intensivo da interação deste complexo metálico com o ADN demonstrou a ligação covalente da cisplatina aos átomos de nitrogénio das bases da dupla hélice (preferencialmente aos átomos N<sub>7</sub> da guanidina), com consequente alteração da estrutura terciária nativa do ADN. Esta interação é, assim, responsável pela citotoxicidade do agente, como evidenciado na figura que se segue (Figura 5.3).



**Figura 5.3:** Representação esquemática de um aduto resultante da interação entre a cisplatina e a dupla hélice do ADN, mediante coordenação do ião de platina ao átomo N<sub>7</sub> da guanina.

Todavia, a toxicidade associada à cisplatina (principalmente nefrotoxicidade), a resistência desenvolvida pelas células à sua ação terapêutica e a interação do fármaco com outros componentes celulares que não o seu alvo primário (por exemplo, componentes contendo grupos tiol) limitam o seu uso clínico. As desvantagens associadas à cisplatina desencadearam a procura por novos complexos de platina de segunda e terceira geração como a carboplatina e a oxaliplatina, apresentando menor toxicidade e resistência adquirida (Figura 5.4). Ao passo que a carboplatina é efetiva no tratamento do cancro de ovário, pulmão, e cabeça e pescoço, a oxaliplatina encontra-se aprovada clinicamente para o tratamento de cancro colo-rectal, que é resistente à cisplatina. O facto do complexo metálico de carboplatina apresentar um espectro de atividade semelhante ao da cisplatina, o seu mecanismo de ação torna-o ineficiente para o tratamento de tumores resistentes à cisplatina. Por outro lado, o ligando 1,2-diaminociclo-hexano, constituinte da molécula de oxaliplatina, origina a formação de adutos oxaliplatina-ADN capazes de escapar aos sistemas de reparação da célula, observando-se, assim, uma menor resistência à quimioterapia.



**Figura 5.4:** Estrutura química de fármacos anticancerígenos contendo centro metálico de platina: cisplatina, carboplatina e oxaliplatina.

A baixa solubilidade e a reduzida biodisponibilidade celular destes três compostos de platina clinicamente aprovados despoletaram a procura de novos complexos metálicos com propriedades antineoplásicas, de  $Pt^{II}$ ,  $Pt^{IV}$  ou outros catiões de transição. Uma das estratégias empregues passa pela pesquisa de complexos metálicos de  $Pt^{IV}$  em substituição de  $Pt^{II}$ , conhecidos como pró-fármacos, os quais são administrados numa forma inativa, sofrendo posterior redução *in vivo* (a  $Pt^{II}$ ), permitindo que uma maior quantidade do agente atinja o seu alvo biológico. Devido à sua geometria octaédrica, estes compostos de coordenação de  $Pt^{IV}$  apresentam dois locais de ligação adicionais, o que lhes confere uma menor reatividade através da formação de complexos mais estáveis com maior número de ligandos.

O limitado número de tumores tratáveis com complexos de platina, conjugados com os fenómenos de resistência e os efeitos tóxicos associados a este tipo de fármacos, têm potenciado a procura de novos compostos baseados em diferentes metais de transição. O exemplo mais proeminente é a variedade de complexos de ruténio que têm sido alvo de estudo, os quais interagem especificamente com o alvo clássico, o ADN, assim como com alvos não-clássicos, como produtos de genes e vias de transdução de sinal. Os resultados promissores que têm sido alcançados na pesquisa de novos

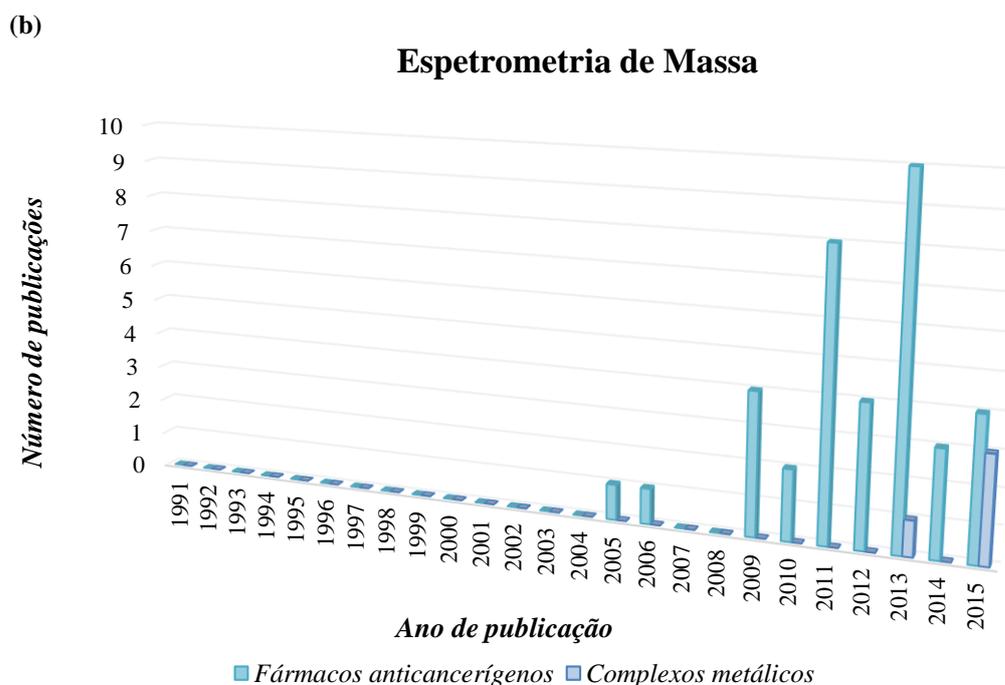
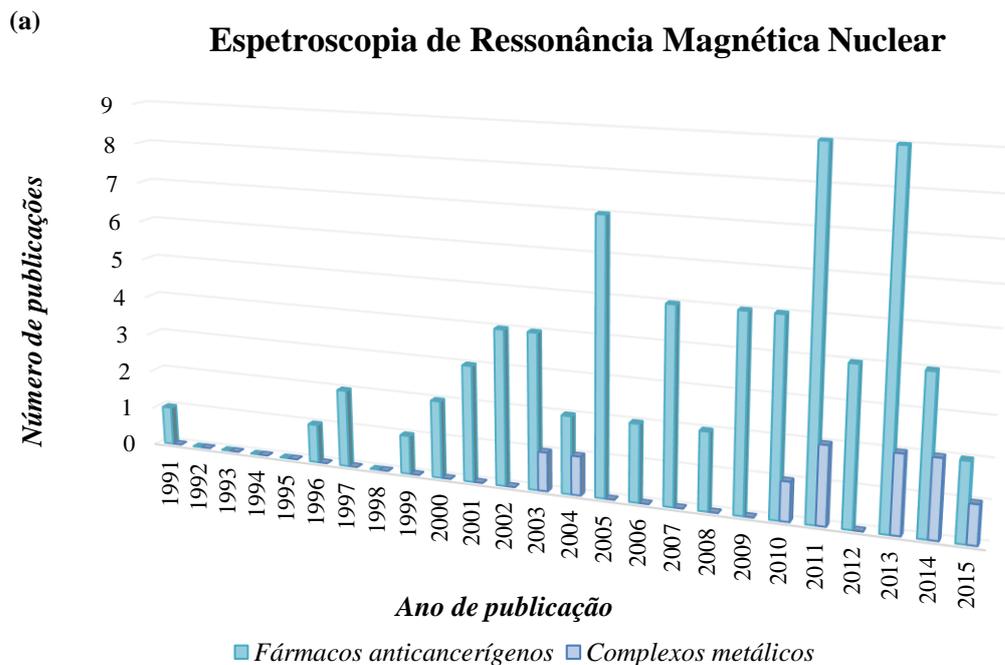
complexos metálicos têm incentivado a sua procura, com a metabolómica a mostrar-se um precioso aliado, como será descrito na seção que se segue.

#### **5.4 A Metabolómica no Desenvolvimento de Novos Fármacos contendo Iões Metálicos**

Os metabolitos compõem o conjunto de pequenas moléculas endógenas e exógenas envolvidas nos diversos processos bioquímicos que ocorrem nos sistemas biológicos. Ao atuarem enquanto substratos ou produtos de reações bioquímicas essenciais a diversas vias metabólicas, a sua avaliação reflete o estado do organismo em resposta a um determinado estímulo. Com a ajuda da metabolómica é possível obter um perfil metabólico elucidativo do estado bioquímico *in vivo* de um dado sistema biológico. Por compreender a análise não-direcionada de uma ampla gama de metabolitos, a metabolómica é capaz de oferecer uma janela mais abrangente do estado metabólico. Para tal, recorre a técnicas de análise de elevada capacidade, fundamentalmente a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Espectrometria de Massa (EM). A espectroscopia de RMN tem sido largamente utilizada em metabolómica uma vez que oferece informação estrutural com elevada reprodutibilidade e pouca ou nenhuma preparação da amostra. Durante décadas esta técnica tem sido extensivamente utilizada por químicos medicinais e orgânicos e, mais recentemente, para avaliar o metaboloma humano na esperança de investigar a diversidade de vias metabólicas e avaliar a presença de potenciais marcadores de estados patológicos. No entanto, a baixa sensibilidade inerente a esta técnica abre portas à utilização da EM para a análise metabolómica. Ao apresentar maior sensibilidade, a EM permite a deteção de metabolitos suscetíveis de serem omissos na análise por RMN. Todavia, a análise por EM apresenta limitações relativamente à sua reprodutibilidade. Frequentemente a solução passa pela aplicação conjunta das duas técnicas, as quais se mostram complementares entre si.

Apesar da metabolómica permitir a análise de diversos tipos de matrizes biológicas como células, tecidos e biofluidos, o recurso a culturas celulares (*in vitro*) tem-se mostrado muito vantajoso, nomeadamente no que respeita à caracterização metabolómica do cancro e à pesquisa de novos fármacos. De facto, a utilização de modelos celulares *in vitro* oferece inúmeras vantagens ao permitir o estudo sob condições controladas e livres de interferência, apesar destes modelos se poderem tornar demasiado simplistas. A metabolómica de células tem-se revelado uma ferramenta vantajosa, sendo frequentemente aplicada no campo da pesquisa oncológica com vista ao estudo do impacto de fármacos com presumível potencial terapêutico no perfil metabólico celular. Esta aplicabilidade da metabolómica é facilmente comprovada pela evolução temporal do número de publicações referentes ao estudo por metabolómica de RMN e de EM da resposta de culturas de células de mamíferos ao tratamento com fármacos anticancerígenos, particularmente no que respeita à classe dos agentes anticancerígenos contendo centro metálico (Figura 5.5). Apesar da espectroscopia de

RMN ter sido mais vastamente empregue, a EM tem ganho importância nos últimos anos com um número crescente de estudos apoiados nesta técnica.



**Figura 5.5:** Evolução temporal do número de publicações referentes ao estudo por metabolómica de (a) RMN e (b) EM da resposta de culturas de células de mamíferos ao tratamento com todas as classes existentes de fármacos anticancerígenos ou somente com agentes contendo centros metálicos (fontes [www.webofknowledge.com](http://www.webofknowledge.com) e [www.pubmed.com](http://www.pubmed.com), até Janeiro de 2016)

A avaliação das alterações induzidas no perfil metabólico das células cancerígenas em resposta ao tratamento com complexos metálicos tem sido maioritariamente dedicada aos complexos de platina, apesar de começar a ser alargada a outros fármacos contendo ruténio enquanto centro metálico. A metabolómica de RMN tem sido extensamente aplicada ao estudo da cisplatina, tendo o primeiro estudo sido publicado em 2003. Desde então têm sido inúmeros os esforços empregues no sentido de elucidar sobre o potencial de complexos de platina – cisplatina e carboplatina – e de ruténio enquanto agentes anticancerígenos. Os cancros de pulmão, cérebro, ovário, ossos, neuroblastoma, glioma, carcinoma de células espumosas e tumor neuroectodérmico representam as patologias até então alvo de estudo pela metabolómica com recurso às respetivas culturas de linhas celulares. Além de linhas celulares tumorais têm sido efetuados estudos em tecidos normais, não tumorais, nomeadamente de rim e fígado, assim como estudos com células estaminais pluripotentes enquanto modelo celular.

A análise metabolómica das alterações induzidas no perfil metabólico das células face ao seu tratamento com complexos de platina tem mostrado resultados deveras promissores, nomeadamente ao nível do metabolismo lipídico. Vários autores têm verificado a existência de alterações ao nível dos lípidos componentes das membranas celulares durante o processo apoptótico com aumento no comprimento da cadeia carbonada dos ácidos gordos e dos triglicerídeos insaturados, e diminuição dos rácios colina/CH<sub>3</sub> e etanolamina/creatina em consequência da exposição das células ao agente anticancerígeno. Curiosamente quando o tratamento é aplicado a linhas celulares tanto sensíveis como resistentes ao fármaco estes resultados têm-se revelado opostos para as duas condições, o que pode sugerir o envolvimento de vias de morte celular distintas. Tem sido igualmente possível constatar a ocorrência de perturbações ao nível da composição e propriedades dos fosfolípidos presentes em membranas celulares. A ocorrência de alterações significativas ao nível dos lípidos e de compostos contendo colina têm sido efetivamente associadas a eventos apoptóticos. Adicionalmente, os complexos de platina mostram a indução de alterações no perfil metabólico das células ao nível dos aminoácidos por decréscimo dos níveis de glutamina e de glutamato, o que pode sugerir a ocorrência de fenómenos de *stress* oxidativo e a ativação de mecanismos de defesa celulares. Reduções ao nível da síntese de ADN, por observação do decréscimo dos compostos *m*- e *s*-inositol, assim como o aumento do índice de metilação do ADN, dado pela razão *S*-adenosilmetionina/*S*-adenosilhomocisteína, têm sido igualmente observados. Conhecido o modo de ação dos complexos de platina, tais alterações ao nível desta macromolécula já eram esperadas uma vez que esta constitui o seu alvo primário de atividade anticancerígena. Como seria de esperar, as alterações metabólicas mencionadas têm-se mostrado distintas para os vários modelos celulares estudados e dependentes da dose e do tempo de exposição das células ao complexo metálico.

O sucesso clínico que tem sido alcançado com a utilização quimioterápica da cisplatina e os resultados promissores demonstrados por novos complexos metálicos em investigação impulsionam a procura por complexos de coordenação de metais com potencial anticancerígeno. Ao conciliar o conhecimento adquirido da química inorgânica medicinal com o potencial demonstrado pela metabolómica no desenvolvimento de

fármacos anticancerígenos e do seu efeito no metaboloma celular é possível antever um futuro promissor no combate ao cancro.

## 5.5 Para saber mais

1. Skeel RT, Khleif SN. Handbook of cancer chemotherapy. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011;144(5):646–74.
3. Farrell N. Transition metal complexes as drugs and chemotherapeutic agents. Springer Science & Business Media; 2012. 304 p.
4. Frezza M, Hindo S, Chen D, Davenport A, Schmitt S, Tomco D, et al. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. Curr Pharm Des. 2010;16(16):1813–25.
5. Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. Cancer Treat Rev. 2007;33(1):9–23.
6. Buijninx PCA, Sadler PJ. New trends for metal complexes with anticancer activity. Curr Opin Chem Biol. 2008;12(2):197–206.
7. Ott I, Gust R. Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. Arch Pharm (Weinheim). 2007;340(3):117–26.
8. Gomase VS, Changbhale SS, Patil SA, Kale K V. Metabolomics. Curr Drug Metab. 2008;9(1):89–98.
9. Lindon JC, Nicholson JK, Holmes E. The handbook of metabonomics and metabolomics. Oxford: Elsevier; 2007. 572 p.