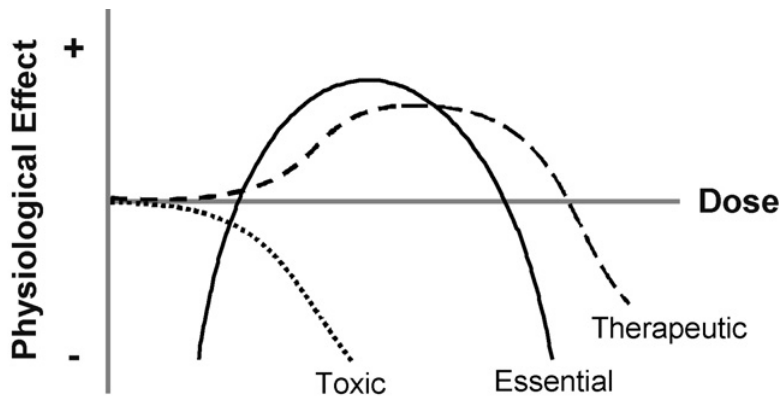


Metalli in medicina 2016-2017

Quali elementi sono essenziali, quali sono benefici e quali tossici? A queste domande si può rispondere con un diagramma dose-risposta del tutto generale per gli elementi (Diagramma di Bertrand, figura), il quale mostra l'effetto ambivalente di molte sostanze e si riassume nel detto di Paracelso "The dose makes the poison". Da notare la differenza tra elementi essenziali e terapeutici



(per i quali, non essendo essenziali, non vi è sofferenza da deficienza). Particolarmente importante è il cosiddetto intervallo terapeutico (*therapeutic window*) che caratterizza l'intervallo di concentrazione che causa effetti fisiologici favorevoli.

Al momento si ritiene che gli **elementi essenziali** per i processi biochimici dei mammiferi siano **24**: H, C, N, O, F, Na, Mg, Si, P, S, Cl,

K, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Se, Mo, Sn e I. Tuttavia la biochimica di alcuni elementi, e in particolare F, Si, V, Ni e Sn è ancora scarsamente compresa. Questa lista di elementi essenziali è probabilmente non ancora completa, per esempio Cr e B potrebbero rivelarsi essenziali, ma al momento l'evidenza sperimentale non è ancora chiara. La lista di elementi essenziali inoltre varia per altre specie animali o vegetali. Per poter considerare un elemento come essenziale, esso deve avere un suo **ruolo specifico** (e.g. in uno specifico enzima o cofattore), tale per cui la sua mancanza causa effetti avversi (cioè una sindrome, una malattia) che vengono annullati quando l'elemento venga nuovamente fornito. Quindi è importante distinguere gli effetti nutrizionali da quelli farmacologici, identificando una funzione biochimica essenziale per questi elementi. Per alcuni *trace elements*, come ad esempio il nichel, la presunta essenzialità è ancora oggetto di dibattito: non si osservano sintomi da deficienza e non è possibile ottenere la deficienza indotta, a causa dell'abbondanza di tracce di nichel nella dieta. Non si conoscono (almeno fino al 2014) enzimi o cofattori che richiedano il nichel negli umani o in altri organismi superiori (al contrario di batteri e piante). Vi è tuttavia evidenza che in animali sottoposti a diete il più povere possibile di nichel si osserva una diminuita concentrazione di altri metalli come rame, ferro e zinco, suggerendo una qualche funzione biologica per questo metallo.

In questo corso non ci occuperemo dei metalli essenziali, del loro metabolismo e della loro omeostasi, se non per citare le terapie sviluppate nei casi di loro carenza o eccesso.

Per quanto riguarda gli elementi metallici non essenziali, ci sono sostanzialmente due aspetti da considerare: quello in cui il metallo 'è il problema', cioè gli aspetti di tossicità, e quello in cui il metallo 'è la cura', cioè l'uso di composti metallici come agenti terapeutici o diagnostici.

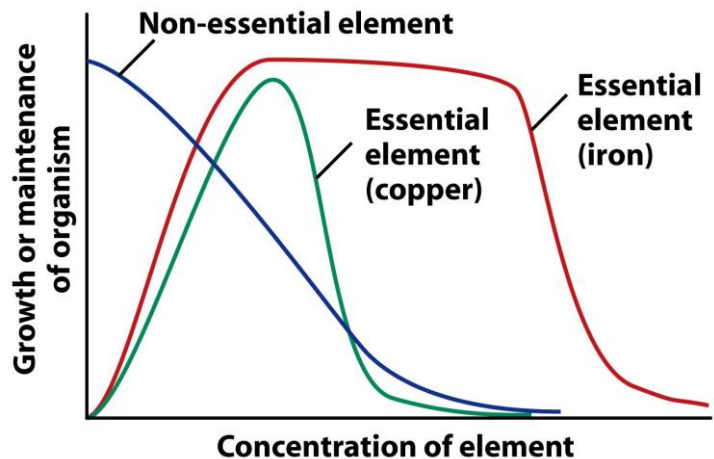
Il metallo è il problema

In questo caso è opportuno distinguere fra metalli endogeni ed esogeni. I metalli esogeni, in genere, indurranno tossicità, più o meno marcata a seconda del metallo, stato di ossidazione, e speciazione. Per i metalli endogeni essenziali si potranno avere sindromi da deficienza o da eccesso (*overload*). L'intervallo fra i sintomi da deficienza di un elemento essenziale e quelli da *overload*, cioè l'ampiezza dell'intervallo di omeostasi, dipende dal tipo di elemento. In figura è riportato il caso di rame e ferro.

Più in dettaglio, per ogni elemento bisogna considerare: 1) la **speciazione**, cioè di quale composto chimico un dato elemento fa parte. Ad esempio, abbiamo bisogno del cobalto, ma probabilmente solo nella forma della vitamina B₁₂. Similmente, la tossicità (spesso usata come un argomento contro l'uso terapeutico di composti metallici) è tipicamente correlata non soltanto al metallo stesso,

ma anche ai leganti e al tipo di complesso. L'aspetto della speciazione è estremamente importante e influenza ovviamente, oltre alle caratteristiche chimiche del metallo, il suo *uptake*, metabolismo, accumulo ed escrezione. L'assorbimento di composti inorganici da parte di un organismo dipende molto dalla loro solubilità e lipofilicità. 2) Le risposte variano con l'età degli organismi e anche all'interno di una popolazione. 3) La variazione di concentrazione di un certo elemento può influenzare la concentrazione e gli effetti fisiologici di altri elementi/sostanze. In generale, due composti/elementi possono interagire per promuovere insieme effetti corrispondenti (*sinergia*) oppure possono competere e sopprimere uno gli effetti dell'altro (*antagonismo*). Ad esempio ioni come Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} e Ca^{2+} sono antagonisti di Zn^{2+} perché lo possono sostituire, oppure Cu^{2+} e S^{2-} sono antagonisti perché formano CuS insolubile e si inattivano a vicenda. In genere si possono individuare dei network di effetti sinergici e antagonisti che coinvolgono numerosi elementi, ulteriormente complicati dalla **distribuzione spaziale** tutt'altro che omogenea degli elementi in un organismo.

Nonostante questa evidente complessità sono ben noti una serie di effetti patologici, più o meno gravi (nell'uomo), dovuti sia alla carenza che all'eccesso (dovuto ad *uptake* eccessivo oppure a carenze nella escrezione) di determinati elementi (vedi tabella):



Elemento	Sintomi da deficienza	Sintomi da eccesso
Ca	Ritardo nella crescita dello scheletro	
Mg	Crampi muscolari, convulsioni	
Fe	Anemia, disordini nel sistema immunitario	Stress ossidativo
Zn	Danni alla pelle, ritardata maturazione sessuale	
Cu	Debolezza delle arterie, disordini del fegato, anemia secondaria, Sindrome di Menkes	Sindrome di Wilson
Mn	Infertilità, ridotta crescita dello scheletro	Disturbi psichiatrici
Mo	Ritardo nella crescita delle cellule, propensione alla carie	Anemia
Co	Anemia perniziosa	Disturbi cardiaci
Si	Disordini nella crescita dello scheletro	
F	Carie	
I	Gotta, disordini tiroidei, metabolismo ritardato	Gotta
Se	Debolezza muscolare, cardiomiopatia	
As	Crescita ritardata	

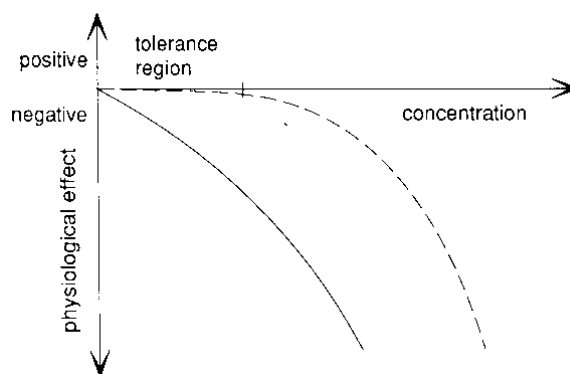
Una sindrome generale dovuta alla carenza di qualunque dei cosiddetti *trace elements* essenziali è il ritardo nella crescita.

Di seguito vengono riportate brevemente le caratteristiche di tossicità di alcuni metalli non essenziali.

Tossicità dei metalli non essenziali

Per quanto riguarda la tossicità degli elementi inorganici non essenziali, si possono distinguere due gruppi: quelli che non sono rilevanti dal punto di vista biologico (figura, linea tratteggiata) e quelli

per i quali sono stati finora rilevati soltanto effetti negativi (figura, linea intera). Tra questi ultimi troviamo i metalli pesanti ‘soft’: mercurio, tallio, cadmio e piombo. Per alcuni elementi, come piombo, mercurio, arsenico o cromo la speciazione (e.g. stato di ossidazione, natura dei leganti,..) è essenziale per determinarne la tossicità; ad esempio in molti casi i cationi alchilati R_nM^+ sono più tossici (perché più lipofili) dei metalli o dei loro cationi idrati M^{m+} .



Gli elementi tossici possono avere origine naturale o antropica (cioè causata dall'uomo). Gli organismi hanno sviluppato diverse strategie di detossificazione, che generalmente richiedono un elevato consumo di energia: 1) trasformazioni enzimatiche di specie tossiche in specie meno tossiche (e.g. riduzione di Hg^{2+} a Hg) o a composti volatili che vengono poi rilasciati nell'ambiente (e.g. $SeO_3^{2-} \rightarrow Me_2Se$). 2) Membrane speciali che impediscono il passaggio di ioni a carica elevata in zone particolarmente delicate, come cervello, feto o nucleo cellulare. 3) Pompe ioniche per rimuovere sostanze indesiderate come AsO_4^{3-} da certe zone cellulari o renderle meno pericolose tramite reazione o precipitazione con partner opportuni (e.g. $Cd^{2+} + S^{2-} \rightarrow CdS \downarrow$). 4) Composti ad elevato peso molecolare, come le proteine *metallotioneine* che possono legare ioni tossici fino a saturazione della loro capacità di accumulo, e quindi toglierli dalla circolazione (vedi dopo).

Verranno ora esaminate le basi bioinorganiche degli effetti tossici di alcuni metalli *soft* ed *hard*.

Piombo

Storicamente il piombo è il metallo che è stato riconosciuto come tossico più anticamente (l'avvelenamento da piombo è noto come *saturnismo*) e anche uno di quelli più presenti nell'inquinamento ambientale. Rispetto a mercurio e cadmio non è particolarmente raro nella crosta terrestre, i suoi minerali sono facilmente estraibili e trattabili, è resistente alla corrosione, e quindi è stato molto utilizzato fin dall'antichità. In tempi più recenti è stato - o è tuttora - usato per la stampa, per la produzione di proiettili, batterie, pigmenti, vetri speciali. Fino a pochi anni fa veniva utilizzato come additivo di carburanti (piombo tetraetile, antidetonante). Il piombo è l'elemento che ha avuto, dalla preistoria ad oggi, il più elevato aumento di concentrazione antropogenica.

Avvelenamento da Pb^{2+} causa disturbi gastrointestinali (coliche) e **anemia**, in quanto inibisce un enzima fondamentale nel processo di biosintesi dell'eme e inibisce anche la ferrochlatasi, che catalizza l'incorporazione del ferro nell'eme. I composti organometallici di Pb, tipo R_3Pb^+ , grazie alla loro buona liposolubilità, possono attraversare la barriera emato-encefalica e danneggiano gravemente il sistema nervoso centrale e periferico (ritardo mentale, perdita di coordinazione, demenza). I composti di piombo vengono escreti con urina, sudore e come componenti di capelli e unghie (che contengono la cheratina, ricca di zolfo, che coordina fortemente i metalli pesanti). La maggior parte del piombo che non viene escreto viene incorporato nelle ossa, dove Pb^{2+} sostituisce Ca^{2+} . La detossificazione da piombo con agenti chelanti (vedi dopo) prevede l'uso di BAL e Ca(EDTA).

Cadmio

Il cadmio è generalmente considerato molto più tossico del piombo. Cadmio o suoi composti vengono usati nelle batterie Ni/Cd, in pigmenti (i rossi CdS e CdSe) e come stabilizzanti per plastiche. Lo ione Cd^{2+} (raggio ionico 0.95 Å) ha una grande somiglianza chimica con due ioni molto importanti biologicamente, cioè Zn^{2+} (0.74 Å) e Ca^{2+} (1.00 Å). Quindi il cadmio è in grado di sostituire lo zinco negli zinco-enzimi (soprattutto quando lo zinco è legato a cisteinati) e sostituire il calcio nel tessuto osseo. Avvelenamento cronico da Cd^{2+} causa gravi disfunzioni a livello renale e, a più lungo termine, fragilità ossea e deformazioni dello scheletro estremamente dolorose (sintomi

osservati su larga scala a Toyama, in Giappone, negli anni 50, quando riso contaminato da Cd^{2+} presente nelle acque di irrigazione causò il cosiddetto **morbo di Itai-Itai**, provocando più di 100 morti).

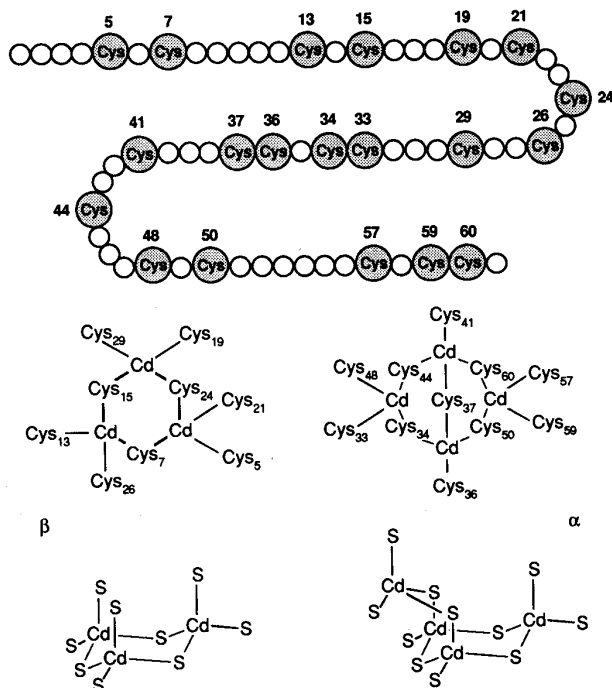
Al contrario di altri elementi pesanti, il cadmio non viene facilmente bio-alchilato in condizioni fisiologiche per formare composti organometallici che potrebbero attraversare le membrane (vedi piombo e mercurio).

Nel corpo umano il cadmio si concentra nel fegato e nei reni dove, come in molti altri organismi, viene catturato dalle *metallotioneine*. Apriamo una parentesi su questa classe di proteine.

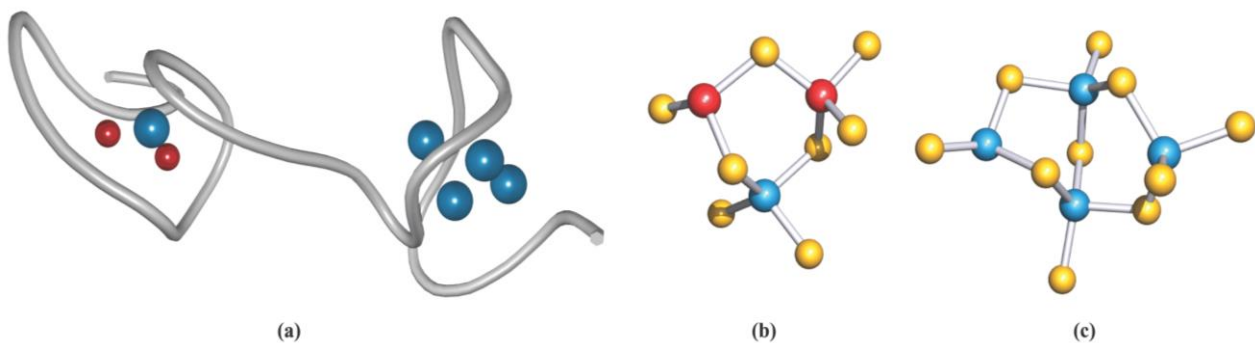
Metallotioneine e glutazione

Le metallotioneine sono piccole proteine (ca. 60 amminoacidi, 6 kDa) **molto ricche in cisteina** (fino al 30%, figura) che legano facilmente ioni di metalli pesanti *soft*, sia tossici come Cd^{2+} e Hg^{2+} , che essenziali come Zn^{2+} e Cu^+ . La sequenza amminoacidica di queste proteine mostra una elevata omologia fra le varie specie, soprattutto per quanto riguarda le cisteine, segno che la loro ottimizzazione è avvenuta nei primi stadi evolutivi e che devono avere funzioni essenziali. Il loro

ruolo non è chiaro, ma sono certamente implicate nel metabolismo di alcuni metalli (trasporto e *storage*) e nella detossificazione di metalli tossici. Vari studi spettroscopici (soprattutto NMR del ^{113}Cd) e strutturali hanno evidenziato che le metallotioneine possono legare tipicamente 7 centri metallici, ognuno di essi tetracoordinato, disposti in due cluster rispettivamente di 3 e 4 ioni (e.g. $[\text{3Cd-3S}]$ e $[\text{4Cd-5S}]$) tenuti insieme da cisteine terminali e a ponte (9 cisteinati, di cui 3 a ponte, nel cluster piccolo e 11, di cui 5 a ponte, in quello grande, figura). La figura successiva riporta la struttura ai raggi X di una Cd/Zn-metallotioneina e, in particolare, i due cluster metallo-cisteina (cadmio blu, zinco rosso).

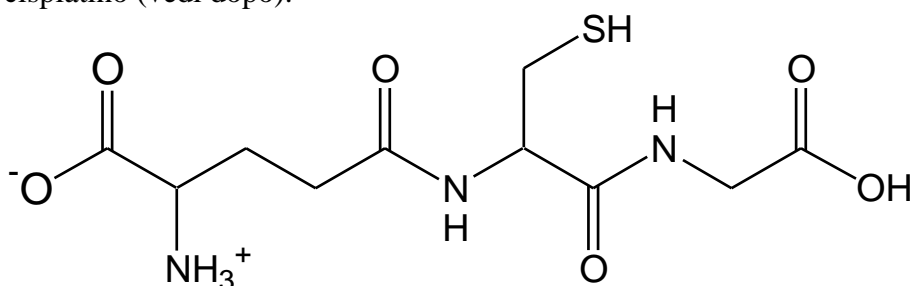


Crostacei e microrganismi come il lievito hanno metallotioneine con composizione dei cluster e selettività verso i metalli un po' diverse. Alcune piante e microrganismi producono dei peptidi ricchi di cisteina, le *fitochelatine* (riconducibili al tripeptide glutatione), che hanno funzioni di regolazione dell'omeostasi di metalli pesanti (Cd, Zn e Cu) simili alle metallotioneine, ma senza formare clusters.



Molto probabilmente le metallotioneine sono **proteine multifunzionali**, la cui funzione principale può dipendere dal tipo di organismo e dalla variante specifica della proteina: 1) la funzione di

detossificazione riguarda principalmente il Cd^{2+} ma anche altri ioni pesanti come Cu^+ , Ag^+ e Hg^{2+} che hanno affinità per il cisteinato. Dal momento che, rispetto al Cd^{2+} , questi ioni preferiscono anche numeri di coordinazione inferiori a quattro, se ne possono legare più di 7, fino a 18, per unità proteica. Non è ancora chiaro se un organismo possa reagire a un avvelenamento da cadmio o altri metalli pesanti aumentando la produzione di metallotioneine. 2) Negli organismi non contaminati da cadmio, dove le metallotioneine legano zinco e rame, si assume che esse svolgano una funzione di *buffer* (o *storage* temporaneo) e trasporto per questi elementi essenziali. 3) Una terza funzione per queste proteine ricche di tiolato potrebbe essere quella di catturare, e quindi disattivare, radicali liberi ossidanti come $\text{OH}\cdot$ (le apo-metallotioneine sono molto sensibili all'ossidazione dello zolfo). Si ritiene che una funzione simile a quella delle metallotioneine venga svolta anche dal **glutathione** (GSH, figura), un tripeptide formato da acido glutammico, cisteina e glicina. Il glutathione è il più importante tiolo intracellulare, essendo presente nelle cellule in elevata concentrazione (0.5 – 10 mM), ed ha numerose funzioni, compresa la detossificazione di agenti chemoterapici come il cisplatino (vedi dopo).



GSH

Tallio

Il tallio forma lo ione monovalente stabile Tl^+ che ha raggio ionico simile al K^+ (1.59 vs. 1.51 Å) e quindi riesce a sostituirlo, penetrando le membrane tramite gli *ion channels* e le pompe ioniche propri del potassio, raggiungendo comparti specifici e provocando gravi danni. Il Tl^+ (al contrario di K^+) è uno ione *soft* ed ha elevata affinità per solfuro e cisteinati. Molti enzimi che funzionano in presenza di potassio vengono inibiti dal tallio, ad esempio il metabolismo del piruvato che fornisce energia alle cellule nervose. I primi segni dell'avvelenamento da tallio sono gastroenteriti e perdita dei capelli, mentre a lungo termine induce neurotossicità, fino alla paralisi.

Mercurio

L'estrema tossicità di molti composti di mercurio divenne nota dopo gli avvelenamenti di massa dovuti al rilascio di catalizzatori a base di mercurio nelle acque della baia di **Minamata** in Giappone tra il 1948 ed il 1960.

Il mercurio metallico è relativamente nobile e piuttosto volatile. Avvelenamento acuto da mercurio metallico è piuttosto raro, sebbene si possa avere inalazione cronica di vapori in seguito ad uso continuato. L'avvelenamento da mercurio (come ione) dà dei tipici **sintomi neurologici**, che contraddistinguevano la *sindrome del cappellaio matto* (dovuta all'uso di $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ per la pulitura del feltro dei cappelli): tremori, perdita di memoria e coordinazione e, per i casi più gravi, perdita dell'udito, cecità e morte.

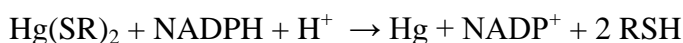
La forma ionica usuale è Hg^{2+} ; questo ione, essendo solubile a pH 7 e non formando precipitati con gli anioni biologici, è immediatamente tossico. Una forma particolarmente tossica è il catione organometallico RHg^+ , e in particolare il **metilmercurio** $(\text{CH}_3)\text{Hg}^+$, che si può formare nell'organismo tramite bio-metilazione di Hg^{2+} da parte della metilcobalamina. Inoltre, batteri anaerobici presenti nei sedimenti di mari, fiumi e laghi possono alchilare il mercurio, che viene poi introdotto sotto forma di alchil-mercurio dal plankton nella catena alimentare. Come già detto, questi cationi organometallici, pur essendo solubili in acqua, hanno una buona lipofilicità che

permette loro di attraversare membrane come quella della placenta e la barriera ematico-encefalica (e quindi penetrare nel feto e nel cervello).

Dal momento che Hg^{2+} preferisce numero di coordinazione due con geometria lineare, usare dei chelanti per rimuoverlo dall'organismo è molto difficile. Anche la detossificazione da parte delle metallotioneine non è molto efficiente, nonostante la preferenza del mercurio per i tiolati.

La tossicità dei composti di mercurio è dovuta proprio alla elevata affinità di questo metallo per tiolati (e.g. cisteinato), per cui influenza la struttura di molte proteine ed il funzionamento di enzimi soprattutto quando questo riguarda cisteine. Per quanto il legame Hg-S sia molto forte, con costanti tra 10^{16} e 10^{22} , esso è piuttosto labile, il che permette la rapida distribuzione dei composti tossici di mercurio in un organismo ed il loro accumulo nei siti che presentano la maggiore affinità per questo metallo: reni, fegato, sistema nervoso e cervello.

Alcuni batteri hanno sviluppato una specifica resistenza verso composti solubili di mercurio, ad esempio tramite la produzione di uno specifico enzima *Hg-reduttasi* che catalizza la riduzione di Hg^{2+} al meno tossico e volatile mercurio elementare secondo la seguente reazione, in cui il riducente è NADPH:



Si ritiene che i quattro residui cisteina presenti nel sito attivo di tale enzima generino una coordinazione inusuale del mercurio, originando uno stato entatico (ad elevata energia) che destabilizza l'altrimenti molto stabile bis(tiolato)mercurio(II) e ne permette la riduzione.

Alluminio

Pur essendo il metallo più abbondante, l'alluminio non ha funzioni biochimiche naturali. La principale ragione è probabilmente da ricercarsi nel fatto che a pH 7 Al^{3+} è presente sotto forma di ossidi o idrossidi altamente insolubili. A pH minore di 5 Al^{3+} può diventare biodisponibile (le piogge acide diminuiscono il pH del terreno, rendendo l'alluminio più biodisponibile). Al^{3+} è un acido di Lewis in grado di polarizzare fortemente i suoi leganti a causa dell'elevato rapporto carica/raggio. Al^{3+} può rimpiazzare efficacemente Mg^{2+} causando alterazioni, in particolare inibizione, dei processi biochimici regolati da magnesio. L'inibizione è sia di tipo cinetico che termodinamico: Al^{3+} è più inerte di Mg^{2+} , è un acido di Lewis più forte e coordina i leganti più fortemente.

Avvelenamento da Al^{3+} induce anemia dovuta all'antagonismo $\text{Fe}^{3+}/\text{Al}^{3+}$ (Al^{3+} ha un'ottima affinità per l'apotransferrina) e disfunzioni nel metabolismo osseo (alta affinità di Al^{3+} per i fosfati). Sembra che in pazienti affetti da Alzheimer si accumulino composti a base di alluminio, e.g. alluminosilicati, nelle tipiche placche amiloidi che si formano in certe regioni del cervello, ma la cosa è ancora piuttosto controversa. Sembra comunque che non ci sia un diretto coinvolgimento dell'alluminio nell'indurre l'Alzheimer.

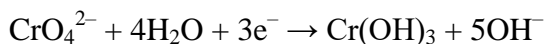
Normalmente l'alluminio che ingeriamo da cibi o bevande (e.g. tè e birra) viene rapidamente escreto dai reni. In pazienti sottoposti a dialisi si può avere accumulo di alluminio con conseguenze anche molto gravi.

Berillio

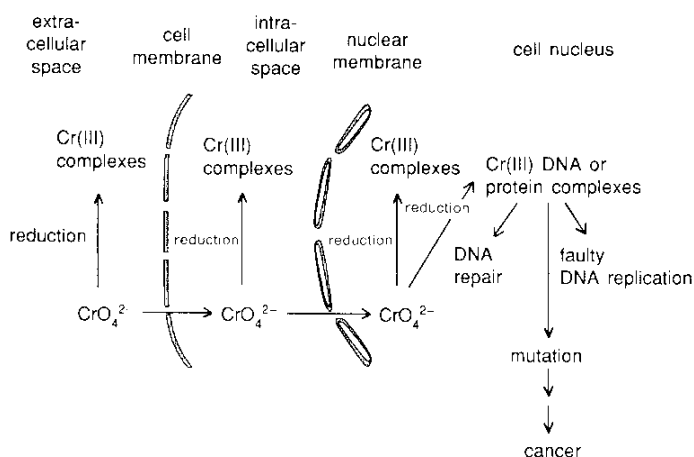
Il berillio è il più tossico di tutti gli elementi. È un elemento molto raro, ma sta diventando ambientalmente rilevante per l'uso che se ne fa soprattutto in materiali tecnici. La chimica del Be^{2+} è abbastanza simile a quella di Al^{3+} , data la relazione diagonale che esiste fra i due elementi nella tabella periodica. Il Be^{2+} è però più solubile rispetto ad Al^{3+} a pH 7. Be^{2+} può interferire con molte delle funzioni del Mg^{2+} , inibendo molti processi enzimatici promossi dal magnesio. Inoltre è mutagenico e cancerogeno (respirare composti di berillio porta a malattie polmonari gravi (berilliosi) e cancro ai polmoni).

Cromo come Cr(VI)

In condizioni fisiologiche gli stati di ossidazione più comuni per il cromo sono Cr(III) e Cr(VI), che a pH 7 è presente come cromato CrO_4^{2-} . A pH 7 il Cr(III) è presente come idrossido insolubile, mentre il cromato è solubile ed è un ben noto agente cancerogeno. In realtà a pH 7 il cromato è solo metastabile in presenza di riducenti, in quanto il potenziale redox per la reazione:



è di ben +0.6 V. Tuttavia, siccome vengono richiesti tre elettroni, sono pochi i riducenti biologici



che possono partecipare efficacemente in questo processo; tra questi l'ascorbato (vitamina c) e il glutatione. A causa della sua somiglianza strutturale con lo ione solfato, il cromato (a meno che non venga rapidamente ridotto) può superare le membrane e raggiungere il nucleo cellulare (figura). Nel nucleo CrO_4^{2-} può danneggiare, ossidandole, importanti componenti genetiche. Gli intermedi della riduzione mono-elettronica a stadi, Cr(V) e Cr(IV), sono ossidanti ancora più forti. Il prodotto finale della riduzione, Cr(III), può legarsi irreversibilmente, in quanto

inerte, ai gruppi fosfato del DNA o dei nucleotidi liberi, influenzando anch'esso il sistema genetico.

Anche alcuni elementi inorganici non propriamente metallici possono essere altamente tossici:

Arsenico

Nelle forme solubili $\text{As}(\text{OH})_3$ o As_2O_3 , l'arsenico è un veleno potente e un agente cancerogeno (ma anche un agente antitumorale, vedi dopo): a causa dell'elevata affinità dell'As(III) per i solfuri (tiofilicità) i composti di arsenico coordinativamente insaturi influiscono sul funzionamento di numerosi enzimi bloccando i gruppi SH. L'avvelenamento da arsenico (che provoca crampi gastrointestinali) infatti si combatte con una terapia a base di agenti chelanti contenenti tiolati (e.g. BAL, vedi dopo). I composti organometallici, in particolare quelli (bio)metilati, sono invece meno tossici e piuttosto comuni, soprattutto negli organismi marini.

Fluoro

Al contrario dei precedenti, il fluoro è un elemento essenziale. E' noto che il fluoruro in minime dosi rinforza lo smalto dei denti e previene le carie. Tuttavia il fluoruro ha una finestra terapeutica molto stretta (circa un ordine di grandezza), cioè al crescere delle dosi il fluoruro diventa rapidamente tossico: a causa della bassa solubilità del CaF_2 va a influire sui numerosissimi processi biochimici che coinvolgono il calcio. Per questo sia l'avvelenamento acuto (necrosi dei tessuti) che cronico da fluoruro (deformazioni dello scheletro, danni renali e debolezza muscolare) sono molto seri. Come antagonista si usa somministrare calcio gluconato. Similmente il contatto con la pelle di soluzioni di acido fluoridrico (che pure è un acido debole) porta a ferite e piaghe che guariscono difficilmente, in quanto il fluoruro disattiva il Ca^{2+} che è essenziale in numerosi stadi del processo di coagulazione del sangue. Infine, numerosi metallo-enzimi vengono inibiti dal fluoruro che si lega ai metalli nei siti catalitici.

Selenio

Anche il selenio è un elemento essenziale. La chimica del selenio è simile a quella dello zolfo; il selenio tende a coordinarsi agli ioni *soft* di metalli pesanti anche più dello zolfo.

Come il fluoruro, il *trace element* selenio ha una finestra terapeutica molto stretta, cioè si passa rapidamente dai sintomi da deficienza (dose giornaliera inferiore a 50 µg), all'avvelenamento (dosi giornaliere superiori a 500 µg). L'elevata tossicità dei composti di selenio è nota da lungo tempo, i sintomi più comuni sono la caduta dei capelli e l'escrezione del maleodorante dimetilselenio, $(\text{CH}_3)_2\text{Se}$, tramite pelle ed alito. Il dimetilselenio ha un forte odore di aglio e viene prodotto dall'organismo per bio-metilazione. I sintomi da deficienza di selenio (che riguardano soprattutto il bestiame) sono degenerazione muscolare e disturbi riproduttivi. Sintomi simili sono stati trovati nel morbo di Keshan, una debolezza fatale del muscolo cardiaco che è stata individuata in adolescenti in regioni cinesi in cui il terreno era particolarmente povero di selenio. Questo morbo viene trattato efficacemente somministrando tracce di Na_2SeO_3 o Na_2SeO_4 . La carenza di selenio nei mammiferi può portare anche alla necrosi del fegato e al glaucoma ossidativo, causato dalla mancanza di enzimi al selenio (e.g. glutatione perossidasi) in grado di distruggere perossidi nel bulbo oculare.

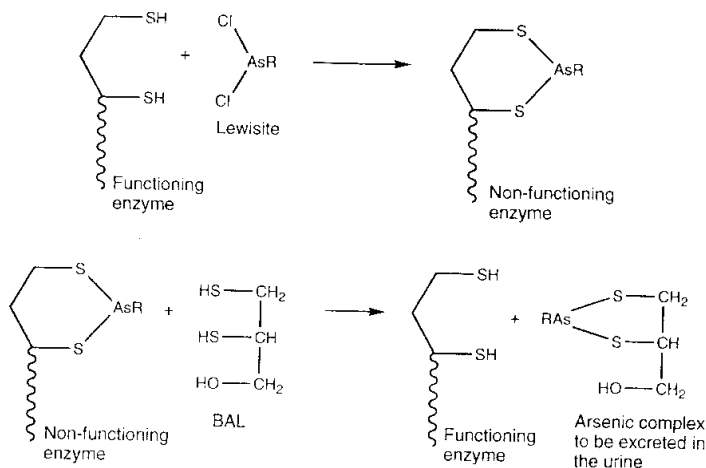
Terapia di chelazione per la detossificazione

Eccessi, potenzialmente anche letali, di ioni metallici – sia essenziali che non – si possono accumulare nel corpo umano per vari motivi. L'accumulo di rame nel fegato e nel cervello derivante da un malfunzionamento genetico del metabolismo del Cu (*Wilson's disease*) può raggiungere i 10–15 g, rispetto ai normali 100–150 mg. Un'altra disfunzione genetica, la β -talassemia, rende il corpo incapace di sintetizzare correttamente una o più catene laterali dell'eme. Come conseguenza sono necessarie continue trasfusioni di sangue, il che comporta un accumulo di ferro nell'organismo, che può arrivare a 70 g in 10 anni, contro i normali 4–5 grammi. Inoltre può avvenire l'avvelenamento da ioni di metalli pesanti, come mercurio, piombo, cadmio o plutonio radioattivo, ad esempio in seguito ad incidenti industriali.

Terapia di Chelazione

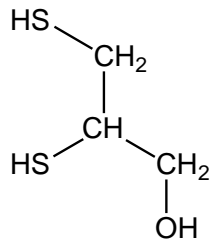
Per rimuovere dall'organismo questi ioni in eccesso sono stati – e vengono tuttora – sviluppati dei **leganti multidentati chelanti** per complessarli e favorirne l'escrezione. Considerando l'elevato numero di ioni di metalli essenziali presenti in un organismo, il problema della **selettività** è fondamentale. Per ottenere elevata selettività, un chelante in genere può sfruttare le dimensioni di un determinato ione e la sua preferenza per una certa geometria di coordinazione e per la natura degli atomi che si coordinano (atomi donatori *hard* per ioni *hard*, *soft* per ioni *soft*). Inoltre, chelanti efficaci, oltre ad essere selettivi, devono essere essi stessi non-tossici, formare complessi termodinamicamente e cineticamente stabili a pH fisiologico, a loro volta non-tossici, ed avere una rapida escrezione renale (quindi essere ben solubili in acqua), e infine non dovrebbero venire metabolizzati.

Storicamente, il primo agente chelante fu il **2,3-dimercapto-1-propanolo** (*British Anti-Lewisite*, *BAL*) sviluppato come antidoto contro la *Lewisite*, un composto organo-arsenico gassoso ($\text{Cl}_2\text{As}-\text{CH}=\text{CH}-\text{Cl}$, 2-chloroethenyldichloroarsine, isomero *trans*) sviluppato negli USA nel 1918 come

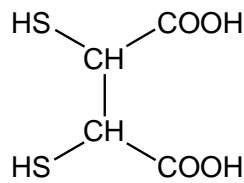


gas tossico da utilizzarsi in guerra. La *Lewisite*, in grado di penetrare tessuti e anche la gomma, attacca polmoni e pelle (come detto prima l'arsenico ha elevata affinità per lo zolfo e inattiva i gruppi SH di alcuni enzimi che metabolizzano il piruvato). Il BAL chela l'arsenico tramite i due gruppi SH formando un anello a 5 termini stabile e questo addotto viene poi escreto nelle urine (figura). Il BAL è stato usato anche per rimuovere metalli pesanti come Hg^{2+} , Pb^{2+} e Cd^{2+} che hanno anch'essi buona affinità per i

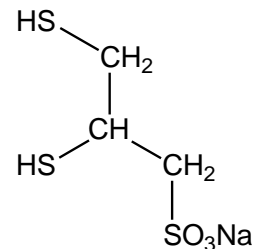
gruppi SH. Tuttavia esso (oltre ad avere una tossicità non trascurabile, $LD_{50} = 105 \text{ mg/kg}$) forma un complesso neutro e liposolubile con Hg^{2+} che è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica ed accumularsi quindi nel cervello. Per questo al posto del BAL sono stati sviluppati chelanti più solubili in acqua, come l'**acido 2,3-dimercapto-succinico** e il **sodio 2,3-dimercapto-1-propansulfonato** (*unithiol*) che, oltre ad essere meno tossico ($LD_{50} = 2000 \text{ mg/kg}$) forma complessi carichi con Hg^{2+} , che quindi non entrano nel cervello ma si accumulano in reni e fegato da dove vengono poi escreti.



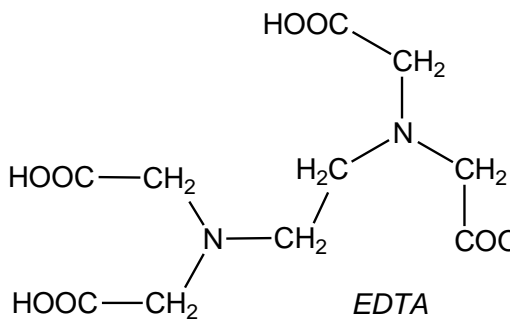
BAL



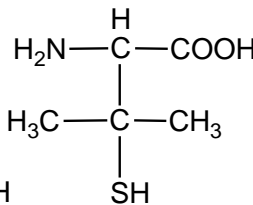
acido 2,3-dimercaptosuccinico



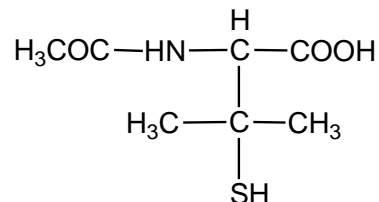
Unithiol



EDTA



Penicillamina

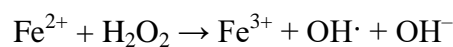


N-acetil-penicillamina

Anche acidi poliamminocarbossilici, e primo fra tutti l'EDTA, sono stati studiati come potenziali agenti terapeutici data la loro ampia capacità di agire da chelanti verso ioni metallici. L'EDTA viene usato contro l'*overload* di Pb^{2+} ; tuttavia, esso complessa molto bene anche il Ca^{2+} , per cui viene somministrato come sale misto di calcio e sodio, $Na_2CaEDTA$, per prevenire il rapido impoverimento del calcio (ipocalcemia). Nell'organismo il Pb^{2+} sostituisce il Ca^{2+} chelato dall'EDTA e il complesso così formato viene escretto nelle urine. Complessi dell'EDTA possono venire usati anche per rimuovere eccessi di mercurio, ferro e altri metalli dall'organismo, ma bisogna prestare molta attenzione al possibile impoverimento di elementi essenziali come lo zinco. La D-penicillamina, un prodotto di degradazione della penicillina, e la N-acetilpenicillamina possono utilizzare atomi di ossigeno, azoto e zolfo come donatori e sono chelanti efficaci per Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} e numerosi altri metalli. Entrambi i composti possono venire somministrati oralmente.

Terapia di chelazione per il trattamento dell'*overload* da ferro.

Il ferro è un elemento essenziale per tutti gli esseri viventi, essendo coinvolto in una moltitudine di processi biologici, e tuttavia è altamente tossico quando sia presente in eccesso. L'origine della tossicità dell'eccesso di ferro è collegata allo stress ossidativo che risulta dalla cosiddetta chimica di Fenton, dove il ferro, metallo redox, catalizza la rottura del perossido di idrogeno generando radicali idrossilici. Una versione semplificata di questa reazione è riportata nella seguente equazione:



La generazione di radicali idrossilici altamente reattivi nella cellula può portare a numerose conseguenze, come danneggiamento del DNA e delle funzioni cellulari.

Gli esseri umani sono particolarmente sensibili all'accumulo di ferro (*Fe overload*) in condizioni di elevato *uptake* di ferro, in quanto non possiedono alcun meccanismo per l'**escrezione attiva** dell'eccesso di ferro. In condizioni fisiologiche normali essi evitano l'accumulo di Fe mantenendo

una stretta regolazione (mediata da ormoni) del suo *uptake* dal cibo. L'*overload* di ferro è essenzialmente una conseguenza di due malattie genetiche, la *emocromatosi* (che induce l'assorbimento sregolato di ferro dalla dieta) e *anemie* come la β -talassemia e l'anemia falciforme. Il trattamento di queste gravissime anemie richiede che i pazienti vengano sottoposti a frequenti trasfusioni di sangue che portano, come effetto collaterale, all'accumulo di ferro.

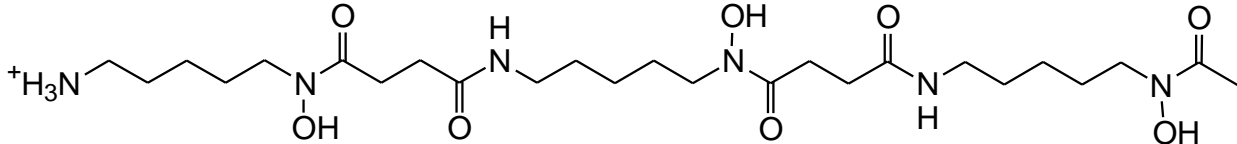
Ci sono essenzialmente due alternative per i pazienti affetti da *overload* di Fe, flebotomie periodiche (prelievi di sangue, questo è il trattamento standard per i pazienti affetti da emocromatosi) o la terapia di chelazione, cioè la somministrazione di farmaci in grado di complessare l'eccesso di ferro e di favorirne l'escrezione.

In assenza di trasfusioni, i pazienti talassemici non raggiungono i 4-5 anni di età. Tuttavia, le trasfusioni inducono un rapido accumulo di ferro che, in assenza di una opportuna terapia di chelazione, porta a morte entro i 20 anni per danni irreversibili al cuore e/o al fegato.

Il metodo attualmente migliore per valutare i livelli di ferro è tramite misure di risonanza magnetica di immagine (MRI) del muscolo cardiaco. Questo è un metodo non invasivo che dà migliori risultati rispetto a misure effettuate su altri organi, soprattutto fegato.

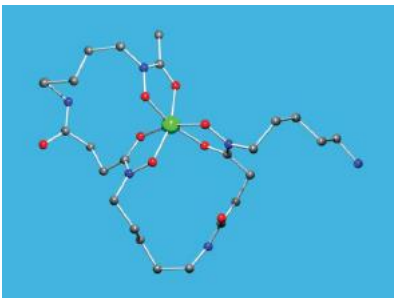
Ci sono quattro aspetti principali che bisogna tenere presenti nella terapia di chelazione del ferro: *i*) l'efficacia del chelante, *ii*) la sua tossicità, *iii*) il suo costo e *iv*) il modo di somministrazione e la conseguente capacità del paziente a sopportare la terapia. E' ovvio che un chelante deve dimostrare di riuscire a ridurre i livelli di ferro e per fare ciò deve essere in grado di raggiungere i tessuti dove è avvenuto l'accumulo, competere favorevolmente per legare il ferro ed essere quindi escreto come un complesso (intatto) di ferro. Per valutare l'affinità di un legante per il ferro si usa solitamente il parametro pFe ($= -\log[Fe^{n+}]$), che viene calcolato dalla concentrazione di ferro libero che rimane quando una soluzione 1 μM di ferro e 10 μM del legante sono in equilibrio a pH fisiologico 7.4.

Vi sono soltanto due chelanti del ferro attualmente in uso clinico per il trattamento dell'*overload*, la desferioxamina B (*Desferal*, prodotto dalla Ciba-Geigy, figura) e il *Deferasirox* (vedi dopo)



Desferrioxamine B (DFO, *desferal*)

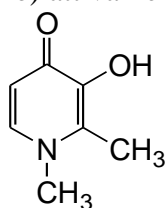
La desferioxamina B (DFO), un chelante esadentato e **sideroforo naturale**, venne individuata più di 40 anni fa come un farmaco efficace per trattare l'*overload* di ferro in pazienti talassemici. Il *desferal* ricevette l'approvazione dall'FDA (*Food and Drug Administration* degli USA) nel 1968 e la sua combinazione con le trasfusioni ha da allora aumentato enormemente il tasso di sopravvivenza dei pazienti. Il composto veniva originariamente isolato da un fungo, lo *Streptomyces pilosus*, e più tardi prodotto per sintesi. La DFO forma con il Fe^{3+} un complesso di stabilità eccezionale ($pFe = 26.6$), comportandosi come un legante esadentato O_6 , in cui tutti i tre gruppi idrossamato sono deprotonati. In figura è riportata la struttura ai raggi X del complesso (atomi H omessi), in cui si vede che il ferro ha geometria ottaedrica distorta ed è legato a tre gruppi idrossamato bidentati.



Nonostante l'indiscussa efficacia, il trattamento con il *Desferal* presenta una serie di **svantaggi**: dato che è scarsamente assorbito dall'intestino, non può venire somministrato oralmente ma deve essere iniettato per infusione subcutanea (flebo). Inoltre il farmaco ha un tempo di vita nel plasma molto breve (ca. 20 min), il che comporta che l'infusione debba venire somministrata per periodi di tempo prolungati e regolari, tipicamente circa 16 ore al giorno per 5-7 giorni alla settimana! Come conseguenza, una elevata percentuale di pazienti (circa un terzo) non riesce a seguire

regolarmente la terapia. Un altro problema è rappresentato dall'elevato costo del farmaco,

soprattutto tenendo conto che più del 90% dei pazienti talassemici vive in aree povere del mondo. Inoltre la desferrioxamina B dà reazioni allergiche in alcuni pazienti. Dato che il trattamento è perpetuo, questi aspetti possono diventare molto problematici, e quindi si sono ricercati (e si ricercano) attivamente altri chelanti.

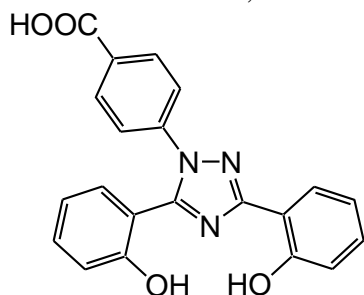
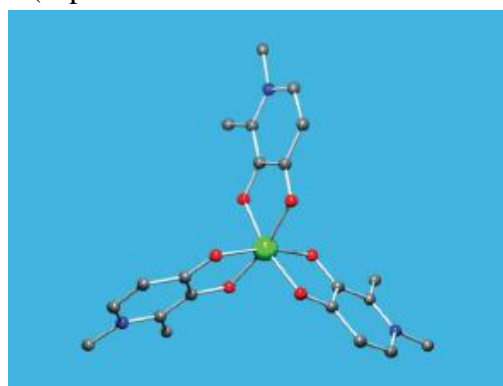


3,4-dihydroxypyridinone
deferiprone

La prima famiglia di composti potenzialmente somministrabili per via orale nella terapia di chelazione del ferro fu quella dei derivati 3,4-idrossipiridinoni, che vengono studiati da circa 20 anni. Il composto più noto di questa classe è stato il *deferiprone* (Figura). Tutti i leganti di questa famiglia formano complessi tris-bidentati di tipo FeO_6 con il Fe^{3+} , con elevate costanti di formazione ($\text{pFe} = 20$). Il gruppo idrossile in posizione 3 si deprotona in seguito a coordinazione e quindi i complessi sono neutri. In figura è riportata la struttura ai raggi X del complesso Fe(III)-*deferiprone*. Sebbene il *deferiprone* formi complessi col Fe(III) meno stabili rispetto alla DFO, la sua velocità di complessazione è circa 10 volte più elevata.

Lo sviluppo clinico del *deferiprone* è stato molto controverso (soprattutto a causa della sua tossicità in relazione all'efficacia) e, sebbene venga utilizzato in Europa (e in altre parti del mondo) come chelante del ferro oralmente attivo quando la terapia con il *desferal* non possa essere applicata, ha ottenuto l'approvazione della FDA solo nel 2011 come farmaco di seconda-linea somministrabile oralmente (sebbene permangano domande irrisolte a riguardo della sua efficacia).

Nel 2005 un nuovo tipo di chelante, il *deferasirox*, sviluppato dalla Novartis, ha ricevuto l'approvazione della FDA come **chelante oralmente attivo** per la terapia di rimozione del ferro, diventando così il secondo farmaco

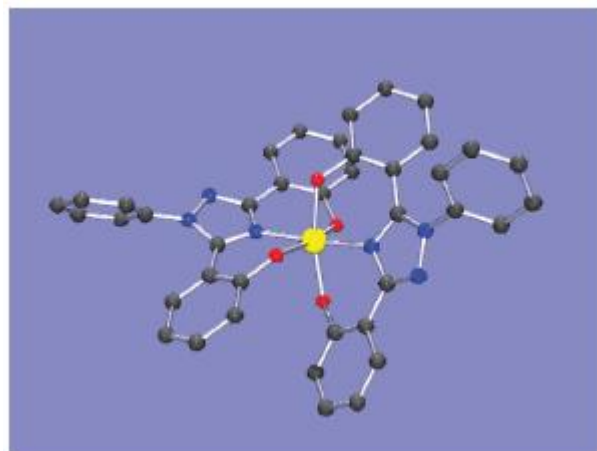


bis-hydroxyphenyl-triazole
deferasirox

disponibile universalmente ed il primo attivo oralmente. Il *deferasirox* è un chelante tridentato *ONO* che appartiene alla classe dei bis-idrossifenil-triazoli (figura). Dal momento che il pK_a del gruppo carbossilico è 3.7, il legante è monoanionico a pH fisiologico 7.4. Inoltre, la coordinazione al Fe(III) è accompagnata dalla deprotonazione di entrambi i gruppi fenolici, e quindi il complesso del Fe^{3+} con due *deferasirox* ha complessivamente carica 3-. A pH 7.4 si forma esclusivamente il complesso 1:2, con $\log\beta_2 = 36.9$; in figura è riportata la struttura ai raggi X del complesso di Fe(III) con un

analogo del *deferasirox*, che non possiede il gruppo carbossilico.

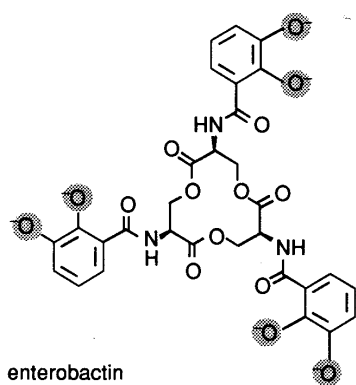
La scoperta del *deferasirox* è stata annunciata come una grande rivoluzione nel trattamento dei pazienti affetti da *overload* del Fe: al contrario del *deferiprone*, che è stato somministrato oralmente a dosi relativamente elevate, o della DFO, che deve venire somministrata per via subcutanea e in modo continuo per periodi lunghi, il *deferasirox* può venire somministrato oralmente in una singola dose giornaliera in virtù del suo lungo tempo di vita nel plasma (ca. 12h). Ci sono tuttavia delle serie perplessità a proposito della tossicità a lungo termine di questo farmaco. In particolare, nel 2010 sul 'bugiardino' che accompagna il farmaco è



stato aggiunto che esso può indurre – in alcuni pazienti – danni ai reni e al fegato ed emorragie gastrointestinali.

Sebbene studi di correlazione struttura-attività possano portare a delle varianti dei composti attualmente esistenti che presentino migliori proprietà, lo sviluppo di nuovi chelanti del ferro che siano efficaci (possibilmente per via orale) e poco tossici è ancora un argomento di interesse per la ricerca. Eventuali nuovi composti dovranno confrontarsi con il *deferasirox*.

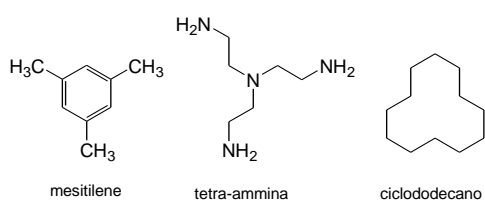
Altri siderofori naturali, come l'enterobactina (figura), pur essendo estremamente efficaci nel chelare il ferro, non possono venire usati nella terapia per una serie di motivi: il legante libero è



poco solubile in acqua, l'anello triestereo è idroliticamente labile e i catecolati vengono facilmente ossidati a *o*-semichinoni e poi *o*-chinoni, e infine perché il complesso ferro-enterobactina sostiene la crescita di batteri e aumenta quindi il rischio di infezioni.

Analoghi sintetici dell'enterobactina (i cosiddetti *siderandi*) generalmente contengono tre gruppi catecolato attaccati ad un supporto con simmetria approssimativamente ternaria, come il mesitilene, tetra-ammine, o il ciclododecano (figura).

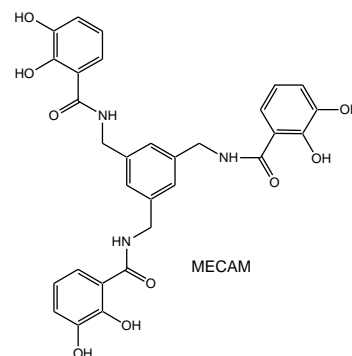
Un esempio è il MECAM (figura), che ha una costante di binding per il ferro molto elevata, sebbene inferiore a quella dell'enterobactina (10^{46} vs 10^{52} , probabilmente perché lo spaziatore mesitilico è più piccolo di quello dell'enterobactina e porta alla formazione di un complesso più *strained*), e non contiene legami esterei facilmente idrolizzabili. Siderandi ancora più preorganizzati hanno costanti di affinità per il Fe^{3+} anche più elevate dei sistemi naturali.



Tuttavia, l'esperienza maturata in alcuni decenni di ricerca in questo settore ha insegnato che alcune caratteristiche di potenziali chelanti del ferro, come le elevate costanti di formazione col $Fe(III)$ e la neutralità della carica del complesso, siano in realtà meno

critiche di quanto si ritenesse inizialmente. Sono attualmente in fase di studio numerosi potenziali chelanti che sono carichi sia come leganti che nella forma complessata e molti di essi, pur legandosi fortemente al ferro, non sono in grado, ad esempio, di competere con la Fe -transferrina per il Fe . Data la complessità della speciazione del ferro nelle cellule, vi sono diversi target oltre alla Fe -transferrina (sia come $Fe(III)$ che $Fe(II)$) a disposizione di potenziali chelanti.

Un fattore importante da considerare è se sono in grado di attraversare la barriera ematico-encefalica (ad esempio il Desferal non è in grado), requisito indispensabile per il trattamento di accumulo abnorme di ferro nel cervello, come nel morbo di Parkinson.



Eccesso o carenza di rame

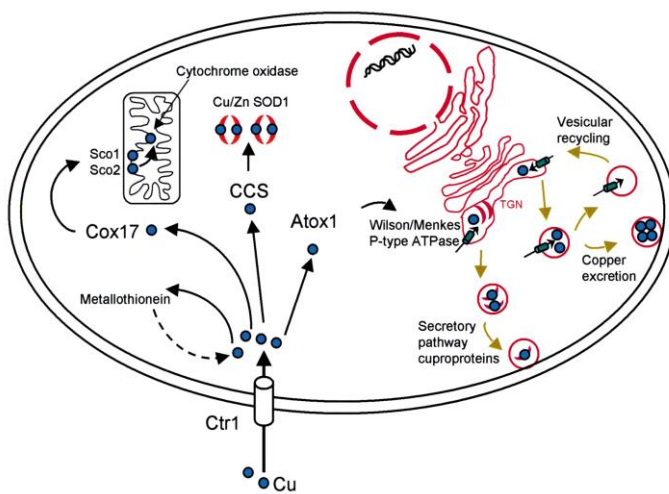
Il rame è un elemento essenziale che svolge un ruolo fondamentale nella biochimica di tutti gli organismi aerobici. Un umano adulto e sano contiene circa 110 mg di rame (di cui circa 9 mg nel cervello). L'*intake* giornaliero raccomandato per il rame in adulti è 0.9 mg, con un massimo di 10 mg. Il rame diventa tossico quando in eccesso o in forma libera all'interno della cellula (cioè coordinato a molecole di acqua o ad altri leganti labili) a causa della sua capacità di promuovere – tramite la cosiddetta chimica di Fenton – la formazione incontrollata di specie altamente reattive (ROS, *Reactive Oxygen Species*) tipo H_2O_2 , O_2^- , $OH\cdot$ (causando cioè il cosiddetto *stress ossidativo*, vedi prima per il ferro), e di coordinarsi indiscriminatamente a gruppi funzionali di proteine.

Negli umani il rame è un micronutriente essenziale, essendo necessario per la respirazione cellulare (citocromo c ossidasi), l'omeostasi del ferro (ceruloplasmina), la formazione di pigmenti e la biosintesi del tessuto connettivo (ascorbato ossidasi) e la difesa anti-ossidanti (SOD). L'omeostasi

del rame deve essere attentamente controllata dalla cellula, per evitare tossicità (ad esempio ossidazione di proteine, lipidi e acidi nucleici). Per questo motivo esistono percorsi specifici per la movimentazione (*trafficking*) e la compartimentalizzazione del rame nelle cellule.

Al momento non è ancora compreso a fondo il meccanismo con cui le cellule riescono a controllare la concentrazione del rame (o di altri metalli di transizione) per premettere la sua consegna e incorporazione in apo-proteine appena sintetizzate, impedendo al contempo ogni possibilità che esso si accumuli fino ad un livello tossico. Tuttavia, studi compiuti in anni molto recenti hanno permesso di individuare e caratterizzare diverse **proteine solubili** che nel citosol cellulare vengono utilizzate per il trasporto del rame (e quindi per la sua protezione da possibili chelanti intracellulari) e la sua consegna a specifiche apo-proteine ‘*target*’ tramite interazioni dirette proteina-proteina durante le quali avviene lo scambio del rame. Tali proteine di trasporto sono state chiamate **metallo-chaperones** (e nel caso specifico rame-*chaperones*).

Fino ad ora sono stati caratterizzati in dettaglio tre percorsi per il trasporto/rilascio di rame mediato da *chaperones*; questi percorsi sono conservati a livello evolutivo, il che suggerisce un comune meccanismo per la sintesi di Cu-proteine in specie diverse.

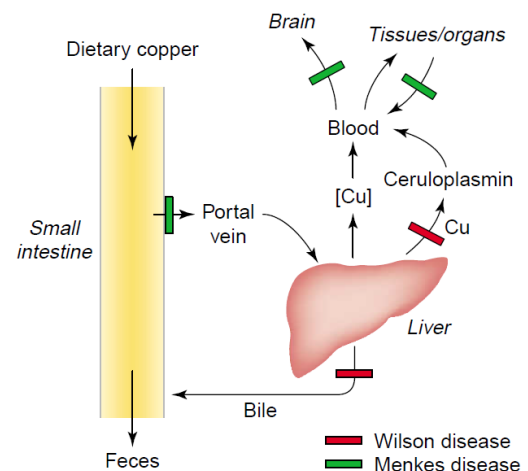


I tre percorsi per il *trafficking* del rame nelle cellule di mammifero sono descritti schematicamente nella figura. Sono indicati i tre principali *copper-chaperones*, le proteine chiamate **Cox17**, **CCS** e **Atox1**, e le loro rispettive proteine target (nelle quali il rame viene consegnato): citocromo c ossidasi, superossidi-dismutasi (SOD1) e le proteine di trasporto trans-membrana del Cu(I) chiamate **Wilson/Menkes ATPasi**. Queste ultime proteine, note anche come **ATP7A** e **ATP7B**, sono sostanzialmente delle pompe ioniche azionate da ATP, e svolgono il duplice ruolo di trasporto del

rame essenziale nel network trans-Golgi (TGN in figura) e di trasporto verso l'esterno della cellula del rame in eccesso. Il trans-Golgi network, l'ultima parte di una membrana fittamente ripiegata (apparato di Golgi), è un cosiddetto compartimento secretorio, dove avviene l'inserimento del rame in molte proteine destinate poi alla membrana esterna o a membrane interne o alla secrezione fuori dalla cellula.

Sindromi di Menkes e di Wilson

Queste sindromi genetiche ereditarie sono causate da difetti dei trasportatori di rame ATP-dipendenti, ATP7A e ATP7B. Essi, pur avendo funzioni biochimiche simili, hanno diversa distribuzione nei tessuti. Nei mammiferi ATP7A è espresso in modo ubiquitario, mentre ATP7B viene espresso più specificamente in fegato, reni, cellule epiteliali e cervello. Il non-funzionamento di ATP7A, in seguito a mutazioni nel gene che lo codifica nel cromosoma X, comporta una generale e letale **deficienza di rame**, nota come **sindrome di Menkes**. Al contrario, mutazioni che portano al non-funzionamento di ATP7B causano i sintomi da **overload di rame**, con tossicità a livello epatico e neuronale, noti come **sindrome di Wilson**. La figura riassume la normale distribuzione del rame nell'organismo, e i passaggi che vengono bloccati



nella sindrome di Menkes (verde) e in quella di Wilson (rosso). Il rame viene normalmente assorbito dagli enterociti dell'intestino tenue e poi trasferito nel flusso sanguigno (passaggio bloccato nella sindrome di Menkes). In condizioni normali la maggior parte del "nuovo" rame viene poi assorbito dal fegato, che è l'organo centrale deputato allo *storage* e all'omeostasi del rame. In caso di *overload*, l'eccesso di rame viene escreto nella bile. Nella sindrome di Wilson questo processo è impedito, così come la consegna del rame alla ceruloplasmina, il maggior trasportatore di rame nel sangue.

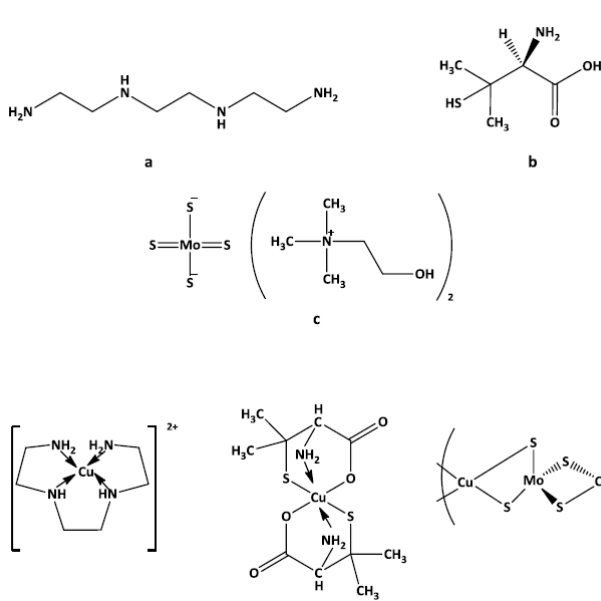
Sindrome di Menkes (deficienza di rame)

Il ridotto trasporto del rame assorbito dal cibo comporta un accumulo di Cu nella mucosa intestinale e la conseguente carenza di Cu nel sangue e negli organi periferici. Risulta anche ridotto il trasporto del Cu attraverso la barriera emato-encefalica (*Blood Brain Barrier*, BBB) verso il sistema nervoso centrale. I sintomi della sindrome di Menkes appaiono nei primi mesi di vita, e includono disfunzioni neurologiche, convulsioni, anomalie nei tessuti connettivi (a causa delle carenze nella formazione dei capelli nei neonati la sindrome è nota anche come *brittle hair* o *kinky hair disease*), ipo-pigmentazione... I sintomi sono in genere spiegabili con la carenza di specifici enzimi al rame. Si ipotizza che la neuro-degenerazione progressiva possa essere dovuta alla minore attività nel cervello di Cu-enzimi come SOD, citocromo c ossidasi e dopamina β -idrossilasi (cioè sintesi di un neurotrasmettitore).

Questa patologia è tipicamente letale entro i primi 3-4 anni di vita. Non esiste una cura, ma se si inizia molto presto la somministrazione di rame si possono attenuare alcuni dei sintomi neurologici, prolungando il tempo di sopravvivenza anche di alcuni anni. L'obiettivo della somministrazione di rame è quello di rifornire i tessuti e gli enzimi che ne dipendono. Tuttavia, la somministrazione orale di vari sali di rame è inefficace, in quanto il rame resta intrappolato nell'intestino. Deve quindi essere somministrato per via parenterale (e.g. per via sub-cutanea, intramuscolo o intravena) ma anche in questo caso tutti i sali di rame sperimentati si sono rivelati inefficaci tranne il complesso **Cu(II)(His)₂**. Il composto, attualmente in fase clinica II, riesce a prevenire i severi problemi neurodegenerativi di questa malattia purché il trattamento inizi il più presto possibile (entro i primi 3 mesi di vita). Nel complesso il Cu(II) è penta o esa-coordinato e si lega ai due imidazoli, ai due gruppi aminici e a uno o entrambi i carbossilati degli amminoacidi. Si ritiene che il complesso venga trasportato nel sangue dall'albumina, tramite la formazione di un addotto ternario rame-istidina-albumina, ma il motivo per cui esso sia l'unico ad avere qualche effetto è ancora ignoto. Potrebbe essere in grado di fornire direttamente il rame ad alcuni enzimi deficienti (non alla lisina-ossidasi, perché i disordini dei tessuti connettivi non vengono attenuati), oppure il complesso rame-istidina potrebbe in qualche modo *bypassare* il non-funzionamento del meccanismo di efflusso ed evitare di rimanere intrappolato nelle cellule.

Sindrome di Wilson

I pazienti affetti da sindrome di Wilson presentano patologie al fegato (epatomegalia, epatiti, cirrosi...) derivanti dall'azione tossica dovuta all'accumulo di rame in questo organo a causa del blocco dell'escrezione verso la bile (che è il ruolo più critico svolto in condizioni normali proprio da ATP7B). Si possono manifestare anche sintomi neurologici (tremore, disordine nei movimenti,...) o psichiatrici a causa dell'accumulo di Cu nel cervello. Al contrario della sindrome di Menkes, quella di Wilson è gestibile tramite la somministrazione perpetua di chelanti del rame accompagnata di solito da sali di zinco (tabella), che riescono ad eliminare con successo l'eccesso di rame. I tre agenti chelanti più comuni per il trattamento della Sindrome di Wilson, tutti somministrati oralmente (figura), sono la D-penicillamina (b), il *trien* (tris-etilenetetrammina) anche detto trientina (a) e il tetratiomolibdato (c). La D-penicillamina, che agisce come un chelante bi- o tridentato, è stata il primo farmaco orale per questa sindrome ed è tuttora l'agente preferito. Riesce a "staccare" il rame in eccesso dalle proteine dove si lega a siti non appropriati, ma non riesce a ridurre completamente l'accumulo di rame nel fegato, tanto che il livello di rame epatico può



rimanere elevato anche dopo anni di terapia. Il maggior problema della D-penicillamina è rappresentato dalla sua tossicità elevata. Circa il 30% dei pazienti sono ipersensibili e non possono venire trattati con questo chelante. In questi casi si usa di solito il trien, che agisce come un chelante tetradentato. Il trattamento con il tetratiomolibdato è ancora da considerarsi sperimentale. Sembra che questo anione agisca sia bloccando l'assorbimento intestinale del rame, sia (forse) formando dei cluster polimetallici Cu–Mo–S che non vengono assunti dal fegato. Tuttavia, essendo noto che il tetratiomolibdato ha effetti tossici sullo scheletro degli animali in crescita, la sua somministrazione dovrebbe essere considerata con cautela. Una volta che il trattamento con i

chelanti abbia riportato i livelli di rame entro la norma, per mantenere stabili i livelli del metallo nell'organismo si può proseguire la terapia somministrando zinco, di solito come zinco acetato, al posto dei chelanti. Si ritiene che lo zinco stimoli l'espressione delle metallothioneine nelle cellule intestinali. Esse, avendo una maggiore affinità per il rame che per lo zinco, aiutano a sequestrare il rame impedendo che venga assorbito dal fegato e lo trattengono finché le cellule intestinali non vengono escrete con le feci. La zinco-terapia ha il grosso vantaggio che lo zinco è molto poco tossico e solitamente viene continuata a meno che si alzino i livelli di rame nelle urine o ricompaiano i sintomi della sindrome di Wilson.

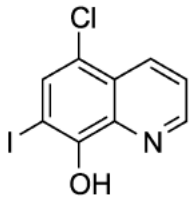
Table 2. Agents for the Treatment of Wilson Disease

agent	mechanism of action	daily adult dosage
D-penicillamine ^a	reduction and chelation of copper; urinary excretion of copper by mobilizing copper from organs	1–2 g orally in divided doses
triethylenetetramine (Trien)	copper chelator and urinary excretion	0.75–1.5 g orally in divided doses
zinc salts	inhibits intestinal absorption of copper by induction of intestinal cell metallothionein; may also induce hepatic metallothionein	150–200 mg orally in divided doses
british anti-Lewisite (BAL)	copper chelator	3 mL of 10% BAL in peanut oil im
tetrathiomolybdate ^b	blocking the intestinal absorption of copper and a copper chelator	Up to 2 mg/kg orally in divided doses

^a Administered with supplementation of 25 mg of pyridoxine orally daily. ^b Experimental.

Altre sindromi da deficienza o da *overload* di metalli essenziali

Altri metalli essenziali possono dare sindromi da deficienza, sia dovute a carenze nutrizionali che a patologie genetiche o di altro tipo che causano problemi metabolici. A livello mondiale la deficienza nutrizionale prevalente è quella del ferro, che riguarda più di 2 miliardi di persone. Deficienze gravi di ferro (anemia) o di vitamina B₁₂ (anemia di Biermer-Addison, una volta nota come anemia perniziosa) possono essere originate rispettivamente da malattie renali croniche o dall'impianto di bypass gastrici. In questi casi gravi vengono fatte iniezioni endovena di ferro-destrano o ferro-saccarosio per il Fe²⁺ e di cianocobalamina (CN-Cbl) o il suo precursore idrossicobalamina (HO-Cbl) per la vitamina B₁₂. Da notare che l'idrossicobalamina viene somministrata ai pazienti in caso di avvelenamento da cianuro, in quanto il cobalto lega il cianuro formando la cianocobalamina che viene poi escreta tramite i reni.



clioquinol

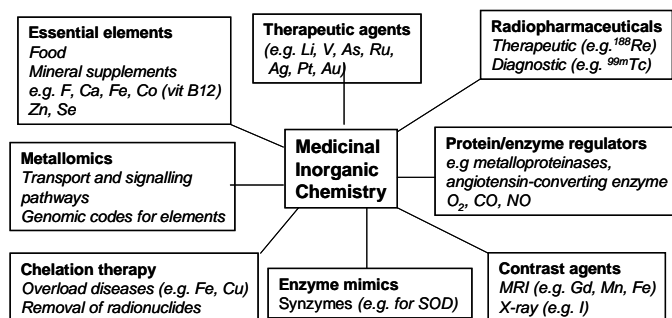
Le sindromi neuro-degenerative di Alzheimer e di Parkinson portano a difficoltà motorie e cognitive progressivamente più gravi e quindi a demenza. Si valuta che circa l'1% della popolazione mondiale soffre del morbo di Parkinson e circa 36 milioni di persone siano affette da demenza e si prevede che aumenteranno rapidamente nei prossimi 40 anni a causa del progressivo invecchiamento della popolazione. Nel cervello dei soggetti affetti da queste sindromi si osserva uno sbilanciamento dell'omeostasi, e a una incorretta distribuzione, di rame, ferro e zinco, in particolare con accumulo di rame e zinco nei depositi (placche) di β amiloide e accumulo di ferro in neuroni associati a tali placche. Per quanto non sia chiaro se questi fenomeni siano una causa o una conseguenza di queste malattie, per le quali non esiste cura, si tentano comunque strategie di chelazione per rimuovere l'eccesso di rame, zinco e ferro dal cervello. Tuttavia, il fatto che i potenziali chelanti devono superare la barriera emato-encefalica complica notevolmente le cose e chelanti del ferro normalmente usati, come la desferrossiamina non danno risultati apprezzabili. Fra i nuovi leganti saggiati citiamo il cliochinolo (figura), un farmaco già utilizzato come antifungino e anti-protozoico, che è in grado di raggiungere il cervello e inibisce il legame di rame e zinco al β amiloide. In uno studio pilota di fase II si sono osservati dei miglioramenti del livello cognitivo dei pazienti con morbo di Alzheimer.

Composti metallici con azione terapeutica (Metalli in medicina)

La Tavola Periodica ci dice che ci sono 82 elementi non radioattivi, più di 60 dei quali formano facilmente composti molecolari stabili all'aria e all'acqua che potrebbero quindi essere potenzialmente utili in chimica farmaceutica. Tuttavia, la stragrande maggioranza dei farmaci contiene solo 10 di quei più di 60 elementi, e ci sono pochissimi farmaci – o candidati tali – che contengano metalli di transizione (se non il platino, vedi dopo).

In realtà, diversi metalli (o loro composti), come oro, ferro, zinco, rame, mercurio, antimonio e bismuto, sono stati usati in maniera del tutto empirica come medicinali fin dall'antichità, da Indiani, Arabi e Cinesi, più probabilmente a causa del loro carattere prezioso o di qualche loro proprietà inusuale, piuttosto che in base a specifiche conoscenze di loro proprietà medicinali. In particolare l'oro ha sempre affascinato gli uomini per le sue caratteristiche ed è stato considerato dagli antichi come una panacea per ogni tipo di malattia (*crisoterapia*). Anche nel medioevo erano note prescrizioni a base di oro, mercurio e antimonio, e il mercurio liquido veniva prescritto come 'sgorgante' intestinale a causa del suo elevato peso specifico.

E' interessante notare come, quasi un secolo fa, tra i primi medicinali frutto di un disegno razionale ci siano stati composti a base di metalli, come l'**arsfenamina** (un composto di organo-arsenico) sviluppato da Ehrlich contro la sifilide (Ehrlich per primo introdusse il concetto di *magic bullet* per indicare la selettività di un farmaco) e composti a base di oro contro l'artrite reumatoide (Forestier, 1929). Tuttavia, a parte questi esempi sporadici, tradizionalmente l'idea di medicine a base di metalli è stata lungamente ritenuta non realistica a causa della nota tossicità dei metalli, soprattutto quelli pesanti. Solo in anni relativamente recenti si è dimostrato che, in alcuni casi, determinati composti di elementi non essenziali e anche metallici, in opportuno dosaggio, possono avere effetti



benefici. Quest'area viene definita *medicinal inorganic chemistry* e attualmente annovera parecchi esempi di composti metallici usati regolarmente come agenti diagnostici o terapeutici.

In generale, il settore dei metalli in medicina si può dividere in vari sotto-settori, come indicato in figura.

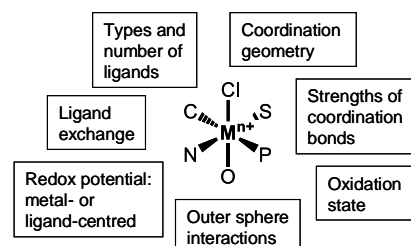
Abbiamo già accennato alla terapia di chelazione, e di seguito tratteremo in un certo

dettaglio alcuni altri settori.

Prima di entrare nei dettagli, vediamo ancora qualche principio generale.

Design di composti farmaceutici inorganici

Il design razionale di farmaci a base di metalli è un concetto relativamente nuovo. Molto spesso – ma non sempre (vedi dopo) – un complesso metallico che viene somministrato è un 'profarmaco' che subisce delle trasformazioni – o meglio una attivazione – *in vivo* prima di raggiungere il suo sito di azione. Queste trasformazioni possono comprendere la riduzione o la ossidazione dello ione metallico, la sostituzione di leganti, o reazioni dei leganti in siti lontani dal metallo. Individuare il preciso meccanismo di azione di questi nuovi farmaci è forse l'aspetto più complesso di questo tipo di ricerca, in quanto richiede che vengano considerati contemporaneamente sia gli aspetti relativi



alla reattività del complesso metallico (riassunti schematicamente nella figura e successiva tabella), che controllano – ad esempio – la stabilità del complesso in ambiente biologico, sia gli aspetti relativi ai percorsi biochimici che governano l'*uptake* cellulare, il metabolismo e l'escrezione.

Con una scelta appropriata dei leganti e dello stato di ossidazione del metallo è possibile – in linea di principio – controllare le proprietà cinetiche e termodinamiche dei complessi metallici e

tentare quindi di controllare la loro attività biologica.

Bisogna inoltre sottolineare che i complessi dei metalli di transizione offrono una **diversità strutturale** ben più ampia di quella dei tipici composti organici. Infatti, solo considerando l'atomo centrale (carbonio vs metallo di transizione) come un template che dispone intorno a sé i sostituenti nello spazio tridimensionale, un atomo di carbonio tetraedrico con quattro sostituenti diversi genera una coppia di enantiomeri, ma un complesso ottaedrico con sei sostituenti diversi genera ben 30 stereoisomeri!

Proprietà	Commenti (esempi)
Numero di Coordinazione	Intero intervallo: 2 – 10; tipicamente da 4 a 6 per i metalli di transizione, può essere più variabile per i metalli dei gruppi principali (e.g. Bi) e più grande per i lantanidi (e.g. 9)
Geometria	Esempi: lineare (Au ^I), planare-quadrata (Pt ^{II}), tetraedrica (e.g. complessi 'piano-stool' Ru ^{II}), bipiramidale trigonale, ottaedrica (Ti ^{IV} , Ru ^{III} , Pt ^{IV}), possibile chiralità centrata sul metallo (Co ^{III} , Rh ^{III})
Stato di Ossidazione	Ampio intervallo (tipicamente 0 – 7 in ambiente biologico); i diversi stati di ossidazione favoriscono diversi numeri di coordinazione e velocità di scambio dei leganti (e.g. Pt ^{IV} vs Pt ^{II})
Tipo di Legante	Ampio numero di atomi donatori e.g. C, N, O, alogenuri, P, S, Se. Leganti chelanti; denticità e.g. (κ^2) 1,2-diamminoetano, (κ^6) EDTA; apticità e.g. legami di tipo η^6 e η^4 per il benzene
Stabilità Termodinamica	Ampio intervallo di forza del legame M–L (tipicamente 50–150 kJ·mol ⁻¹), molto più debole rispetto al tipico legame covalente, e.g. legame singolo C–C (250 – 500 kJ·mol ⁻¹)
Stabilità Cinetica	Il tempo di vita dei legami M–L copre un intervallo molto ampio (ns – anni). Dipende molto dallo stato di ossidazione del metallo e dagli altri leganti; può essere stereospecifico, e.g. effetto <i>trans</i> nel Pt ^{II} .
Proprietà dei Leganti	Interazioni relative alla sfera esterna dei leganti, e.g. legame a idrogeno, interazioni idrofobiche (< 50 kJ·mol ⁻¹), possono servire al riconoscimento recettoriale (chiralità inclusa); possono subire trasformazioni <i>in vivo</i> e.g. di tipo redox, idrolisi, reazioni enzimatiche (e.g. ad opera del P450 nel fegato).
Stabilità Nucleare	Nuclei radioattivi possono essere usati per seguire il metabolismo dei composti e.g. ^{195m} Pt (t _{1/2} = 4 d) e ^{99m} Tc (t _{1/2} = 6 h). A seconda del nuclide variano il tipo di decadimento (α , β , γ) e il tempo di semi-vita.

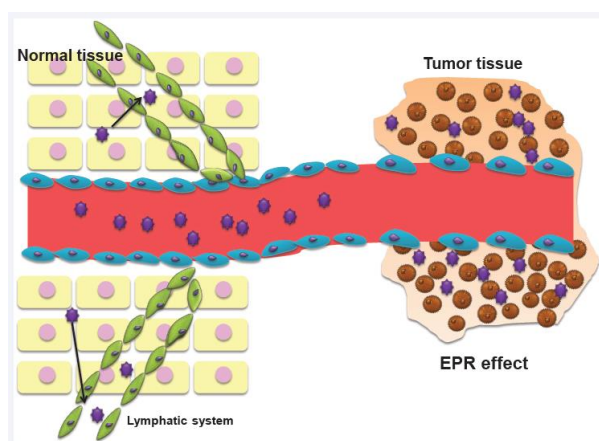
In generale può essere utile suddividere i potenziali farmaci a base di metalli in almeno due grandi categorie principali, i cosiddetti **composti funzionali** e i **composti strutturali**.

I **composti funzionali** sono i tipici profarmaci e il loro meccanismo di azione prevede la **coordinazione diretta del metallo** a una o più biomolecole bersaglio. Questi composti devono quindi possedere almeno un legante labile che possa venire dissociato/sostituito *in vivo* per fornire al complesso almeno un sito di coordinazione (modello *multi-stage rocket*). Per i composti funzionali quindi l'interazione principale è quella di coordinazione, che può essere implementata da altre interazioni non coordinative, cioè di tipo 'supramolecolare', come legami a idrogeno, π - π stacking, interazioni idrofobiche, eccetera.

I **composti strutturali** invece sono più simili alla maggior parte dei farmaci organici, cioè svolgono il loro ruolo biologico rimanendo intatti e quindi interagiscono con le biomolecole bersaglio solo tramite interazioni di tipo supramolecolare a carico dei leganti e non è prevista la coordinazione diretta del metallo. Di conseguenza i complessi devono essere termodinamicamente stabili e cineticamente inerti. Il ruolo del metallo nei composti strutturali è quello di determinare la geometria complessiva del composto.

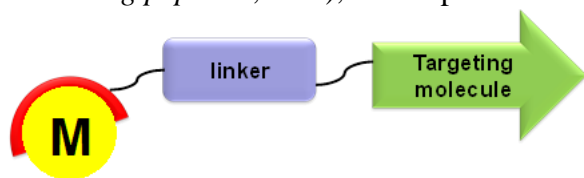
Per motivi storici che saranno chiari più avanti (il primo farmaco a base di metalli di grande successo, il complesso antitumorale cisplatino, è un composto funzionale) si riteneva che tutti i farmaci a base di metalli dovessero essere di tipo funzionale, per cui il loro *design* prevedeva sempre la presenza di leganti labili. In anni più recenti si hanno esempi sempre più numerosi di composti strutturali dotati di evidente attività biologica.

Di seguito verranno esaminate alcune categorie di farmaci e diagnostici inorganici. Per entrambe le categorie si pone il problema della **selettività**, cioè dell'*uptake* preferenziale del composto nel tessuto/organo bersaglio. La selettività può essere spontanea o – più spesso – indotta. Il principale meccanismo di selettività spontanea (o passiva) verso i tessuti tumorali sfrutta il cosiddetto **effetto EPR** (*Enhanced Permeability and Retention*) (Figura). I vasi sanguigni nei tumori solidi sono “bucherellati” (*leaky*) e quindi macromolecole o nanoparticelle con diametro compreso fra 60 e 400 nm possono extra-vasare, godendo così di un



meccanismo passivo di selettività (*passive targeting*) per i tumori (da notare, tuttavia che le dimensioni dei pori nei vasi sanguigni sono variabili e dipendono dal tipo di tumore, dalle dimensioni del tumore e se è tumore primario o metastasi). A questa facilità di uscita si aggiunge il fatto che nei tumori il sistema linfatico è carente, cioè la sua azione di drenaggio è deficiente, e questo porta ad una maggior ritenzione delle macromolecole sfuggite dai vasi sanguigni. In alternativa, si ricorre a sistemi attivi. Il cosiddetto *active targeting* consiste nel funzionalizzare la

molecola (o la superficie di una nanoparticella) con opportuni *targeting vectors* che ne favoriscano la concentrazione nel tessuto bersaglio, tipicamente un tumore. I *targeting vectors* sono molecole o macromolecole che riconoscono selettivamente proteine sovra-esprese sulla superficie delle cellule tumorali; esse quindi tendono ad accumularsi nei tumori, portando con sé il principio attivo. Sono state utilizzate a questo proposito una varietà di piccole molecole, proteine, peptidi (e.g. *cell-penetrating peptides*, CPP), anticorpi monoclonali....



In assenza di, o in aggiunta alla, selettività, è possibile cercare di effettuare una **attivazione selettiva** del farmaco nel tessuto bersaglio (in assenza di attivazione la molecola deve essere – idealmente – inattiva e non tossica). Tale

attivazione può sfruttare dei **fattori endogeni**, ad esempio il fatto che i tessuti dei tumori solidi abbiano un pH fino a un'unità più basso dei tessuti sani oppure che, essendo ipossici, sono degli ambienti più riducenti (o meno ossidanti) dei tessuti sani, o la presenza di specifici enzimi. In alternativa si sfruttano **fattori esogeni**, tipicamente radiazioni di varie lunghezze d'onda o calore.

Questi concetti, spesso combinati fra loro per ottenere la massima selettività possibile (ovvero la minima tossicità verso i tessuti sani) verranno in seguito esplicitati in numerosi esempi.