

Complexos de metais do grupo VIII na terapêutica antitumoral: passado, presente e futuro

Ana Isabel Figueiredo Lopes

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João Lourenço

**Complexos de metais do grupo VIII na
terapêutica antitumoral: passado, presente
e futuro**

Ana Isabel Figueiredo Lopes

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João Lourenço

Complexos de metais do grupo VIII na terapêutica antitumoral: passado, presente e futuro

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados nos textos e constam da listagem de referências incluída.

Copyright © 2021 Ana Isabel Figueiredo Lopes

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de reportórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Dedico este trabalho à minha família e, em especial, ao meu pai e à minha avó, que infelizmente já não estão entre nós, mas que certamente estariam igualmente orgulhosos.

AGRADECIMENTOS

Passados 5 anos de uma longa caminhada chegou, finalmente, o momento de agradecer a todos os que, de alguma forma, acompanharam o meu percurso acadêmico e contribuíram para o tornar inesquecível.

Em primeiro lugar, quero agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor João Lourenço, por todo o apoio, disponibilidade e dedicação ao longo da realização deste trabalho. Não podia ter feito melhor escolha e não podia estar mais feliz por ter aceite fazer este desafio comigo e tê-lo levado a bom porto.

Quero deixar uma palavra de apreço a todos os docentes com quem tive a oportunidade de aprender e partilhar conhecimentos.

À minha mãe e avós agradecer por todos os sacrifícios, pela educação e valores que me transmitiram e por todo o apoio incondicional que me deram ao longo destes 5 anos. Ao meu irmão, pela amizade e pelo amparo em todos os momentos de indecisão. Aos restantes familiares que sempre me apoiaram e ajudaram ao longo deste percurso, um obrigada!

Às minhas amigas de todas as horas, Olga, Inês, Cláudia, Catarina, Joana e Fatumata, obrigada por todos os momentos, pelos devaneios mentais partilhados na época de exames, por todos os jantares e arraiais de pura diversão, por toda a cumplicidade e compreensão através de um único olhar e por todas as boas memórias que levo deste curso. Obrigada por cada gargalhada e lágrima que partilhamos juntas!

À Rita, Patrícia e Marília obrigada por me apoiarem e acompanharem neste percurso, pela vossa presença e pela amizade. Ao João por todas as vezes que me amparou, obrigada!

À Beatriz, por ser o meu porto seguro, o meu apoio, a minha amiga para a vida e pela paciência que teve comigo ao longo destes 5 anos, um grande obrigada. À Juliana por ser a maior surpresa e a amiga que nunca me faltou, obrigada!

Por fim, mas não menos importante, agradecer ao Alexandre, por sempre me apoiar, compreender e por ter sido sempre tão presente e compreensível.

A todas as outras pessoas que, não estando diretamente mencionadas, caminharam ao meu lado nos últimos 5 anos e contribuíram para o sucesso desta jornada. Obrigada!

RESUMO

O cancro, caracterizado por um crescimento celular desregulado, é atualmente uma das principais causas de morte no mundo. Devido à diversidade, quer de mecanismos de crescimento, quer de locais alvo, o tratamento do cancro continua a ser um desafio para a comunidade científica.

Desde a descoberta acidental da cisplatina como agente antitumoral, diversos grupos de investigação têm-se debruçado sobre o desenvolvimento de novos compostos de coordenação com potencial antineoplásico.

Os compostos de ferro, um metal essencial em sistemas biológicos, apresentam um mecanismo de ação associado a reações *redox* envolvendo o par Fe(II)/Fe(III). A perturbação de diversos equilíbrios *redox* ou a promoção de uma reação *redox* que por um mecanismo radicalar possa dar origem a danos irreparáveis em diferentes biomoléculas faz deste metal um candidato no desenvolvimento de complexos com ação citotóxica como é já o caso do complexo Fe-bleomicina.

Os compostos de ruténio têm demonstrado beneficiar de características que os tornam promissores agentes antitumorais, pela riqueza das suas propriedades químicas, conquistando, atualmente, um papel importante na investigação de terapêuticas contra o cancro. Estes compostos destacam-se pela reduzida toxicidade, boa tolerância *in vivo* e pelos diferentes mecanismos de ação, contando já com dois complexos usados em ensaios clínicos em humanos, NAMI-A e KP1019/NKP1339.

Por fim, estudos recentes mostram que o ósmio apresenta reatividade química e os seus complexos podem ser ajustados pela escolha do seu estado de oxidação, dos ligandos e da geometria de coordenação e estereoquímica, abrindo assim uma ampla gama de novas aplicações biológicas e médicas. A terapêutica antitumoral com recurso a estes complexos pode ter diversos mecanismos de ação e alvos, incluindo interações com o ADN, atividade *redox* e inibição de proteínas.

A presente dissertação centra-se nas potencialidades dos complexos de metais do grupo VIII na terapêutica antitumoral. É efetuada uma revisão bibliográfica aprofundada e crítica dos resultados obtidos em diversos estudos que envolveram ou envolvem complexos dos três metais deste grupo.

Palavras – chave: cancro, terapêutica anticancerígena, metal, compostos de ruténio, compostos de ósmio, compostos de ferro

ABSTRACT

Cancer, a set of pathologies that share deregulated cell growth, is currently one of the leading causes of death in the world. Due to the diversity of both growth mechanisms and target sites, cancer treatment remains a challenge for the scientific community.

Since the accidental discovery of cisplatin as an antitumor agent, several research groups have focused on the development of new coordination compounds with antineoplastic potential. Iron compounds, an essential metal in biological systems, have a mechanism of action associated with redox reactions involving the Fe(II)/Fe(III) pair. The disturbance of several redox balances or the promotion of a redox reaction that, by a radical mechanism, can give rise to irreparable damage in different biomolecules, makes this metal a candidate in the development of complexes with cytotoxic action, as it is already the case of the Fe-bleomycin complex.

Ruthenium compounds have shown to benefit from characteristics that make them promising antitumor agents, due to the richness of their chemical properties, currently conquering an important role in the research of cancer therapies. These compounds stand out for their reduced toxicity, good tolerance *in vivo* and for the different mechanisms of action by which they act, already counting on two complexes used in clinical trials in humans, NAMI-A and KP1019/ NKP1339.

Finally, recent studies show that osmium presents chemical reactivity and its complexes can be adjusted by the choice of its oxidation state, ligands, and coordination and stereochemical geometry, thus opening up a wide range of new biological and medical applications. Antitumor therapy using these complexes may have several mechanisms of action and targets, including DNA interactions, redox activity, and protein inhibition.

This dissertation focuses on the potentialities of group VIII metal complexes in antitumor therapy. A thorough and critical literature review of the results obtained in several studies involving complexes of the three metals in this group is carried out.

Keywords: cancer, antitumor activity, metals, ruthenium compounds, osmium compounds, iron compounds

ÍNDICE REMISSIVO

ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	X

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	12
2. CANCRO	13
2.1 Terapêuticas atuais	19
2.2 Complexos de coordenação no tratamento do cancro	21
3. COMPLEXOS DO GRUPO VIII	23
3.1 Ferro	24
3.1.1 Complexos Organometálicos de Ferroceno	26
3.1.1.1 A Família Ferrocifeno	27
3.1.1.1.1 Ferrocifenos semelhantes ao tamoxifeno	27
3.1.1.1.2 Ferrocifenos Mono e Difenólicos.....	29
3.1.1.1.3 Ansa-ferrocifenos	31
3.1.2 Complexos de Coordenação de Ferro (II) e Ferro (III).....	33
3.1.3 Moléculas ativas por ação quelante com ferro	34
3.1.3.1 Bleomicinas (BLMs)	34
3.1.3.2 Quelantes de Ferro	37
3.2 Ruténio e Ósmio	39
3.2.1 Diversidade estrutural	39
3.2.2 Complexos de coordenação octaédricos	40
3.2.2.1 Mecanismos de ação.....	40
3.2.2.2 Ensaio clínicos	42
3.2.3 Complexos Arenos Organometálicos de geometria ' <i>Piano-stool</i> '	44

3.2.3.1 Unidade Areno	45
3.2.3.2 Ligando monodentado X.....	45
3.2.3.3 Ligandos Y e Z.....	45
3.2.3.4 ADN como um alvo	46
3.2.4 Modulação <i>redox</i> e direcionamento mitocondrial.....	47
4. DESAFIOS NAS INVESTIGAÇÕES DOS MECANISMOS DE AÇÃO A NÍVEL CELULAR	53
5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	54
6. BIBLIOGRAFIA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Processos de iniciação, promoção e progressão na evolução clonal de tumores malignos (adaptado de ⁷).....	16
Figura 2 - Fluxograma que destaca os estadios no desenvolvimento de uma neoplasia maligna decorrente da exposição a agente carcinogéneo que produz lesão no ADN (adaptado de ⁷)...	17
Figura 3 - Incidência e mortalidade em números, de diversos tipos de cancro, para ambos os géneros e todas as idades (adaptado de ¹³).....	18
Figura 4 - Especificidade de atuação no ciclo celular das diferentes classes de agentes quimioterápicos (adaptado de ¹⁷).....	20
Figura 5 - Metalofármacos anticancerígenos aprovados em diferentes regiões (adaptado de ¹⁵⁴)	22
Figura 6 - Estrutura química do ferroceno (adaptado de ⁴⁶).....	26
Figura 7 - Estrutura química do Fc-OH-Tam, complexo 1 (adaptado de ⁵³).....	27
Figura 8 - Estrutura química do hidroxitamoxifeno (OH-Tam) (adaptado de ⁵³).....	28
Figura 9 - Mecanismos de síntese dos derivados de ferroceno de tamoxifeno (adaptado de ⁵⁴)	28
Figura 10 - Estrutura química dos complexos mono e difenólicos, complexo 2 e complexo 3, respetivamente (adaptado de ⁵³).....	30
Figura 11 - Formação de meteto de quinona resultante da oxidação da fração ferroceno (adaptado de ⁵³).....	30
Figura 12 - Estrutura química dos metetos de quinona 2-QM e 3-QM, respetivamente (adaptado de ¹⁵⁴).....	31
Figura 13 - Estrutura química do complexo ansa-Fc-diOH, complexo 4 (adaptado de ⁵³).....	32
Figura 14 - Estrutura química do radical orgânico [4-QM]• (adaptado de ¹⁵⁴).....	33
Figura 15 - Complexos de coordenação de ferro II e ferro III (adaptado de ³⁴).....	34
Figura 16 - Estrutura química da bleomicina (adaptado de ³⁵).....	35
Figura 17 - Mecanismos de formação da "bleomicina ativada" in vivo (adaptado de ³⁵).....	35
Figura 18 - Formação da "bleomicina ativada" e clivagem do ADN (adaptado de ³⁵).....	36
Figura 19 - Exemplo da interação proposta entre a região de ligação do metal-bleomicina e o ADN (adaptado de ⁷⁷).....	37
Figura 20 - Estrutura química dos quelantes de ferro (adaptado de ³⁶).....	39
Figura 21 - Genealogia de complexos de ruténio anticancerígenos referentes à primeira evidência publicada para a atividade terapêutica dos compostos num modelo de tumor in vivo (adaptado de ⁹⁶).....	40

Figura 22 - Mecanismos de ação subjacentes à atividade anticancerígena de KP1019 e NKP1339 (adaptado de ⁹⁶)	41
Figura 23 - Efeitos do NAMI-A nos componentes do microambiente tumoral e na atividade antimetastática (adaptado de ⁹⁹)	42
Figura 24 - Primeiros compostos RAPTA que apresentaram atividade anticancerígena promissora (adaptado de ¹¹⁷)	46
Figura 25 - Ativação do complexo RM175: a) hidrólise; b) ligação ao N7 da guanina (adaptado de ¹⁵⁴).....	47
Figura 26 - Complexos de rutênio (II) sintetizados por Sadler (adaptado de ¹³²)	49
Figura 27 - Estrutura química do complexo FY26 (adaptado de ¹³⁶).....	50
Figura 28 - Possíveis vias de ativação do complexo FY26 e consequente disfunção mitocondrial, produção de ROS e morte celular (adaptado de ¹³⁸)	51
Figura 29 - Genes expressos diferencialmente em cada ponto do tempo na via de resposta ao stress oxidativo a partir de estudos transcritômicos (adaptado de ¹⁴⁰)	51

LISTA DE ABREVIATURAS

- 9L** Células de glioblastoma de rato
- A2780** Células de cancro do ovário
- ADN** Ácido desoxirribunucleico
- ARN** Ácido ribonucleico
- BLM** Bleomicina
- C6** Células de glioma de rato
- CPCNP** Cancro do Pulmão de Células Não Pequenas
- DFO** Desferroxamina
- DFP** Deferiprona
- DFX** Deferasirox
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- DMT** Dose Máxima Tolerada
- EPR** *Electron Paramagnetic Resonance* (Ressonância paramagnética eletrónica)
- GSH** Glutathiona
- HCT116** Células de cancro colorretal
- HT-29** Linha de células de cancro do cólon humano
- Huh-7** Linha de células de cancro do fígado humano
- IC50** 50% da concentração máxima inibitória
- ICP-OES** *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry* (Espetrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente)
- IV** Intravenoso
- LNC** *Lipid Nanocapsules* (nanocápsulas lipídicas)
- MCF-7** Células de cancro da mama hormonodependentes
- MDA-MB-231** Células de cancro da mama hormonoindependentes
- MMP** *Mitochondria Membrane Potential* (Potencial de membrana mitocondrial)
- NF-κB** Fator nuclear κB
- OMS** Organização Mundial de Saúde
- PTA** 1,3,5-triaza-7-fosfoadamantano
- QM** *Quinone Methide* (meteto de quinona)
- RE** Retículo Endoplasmático
- ROS** *Reactive Oxygen Species* (Espécies Reativas de Oxigénio)
- SCID** Imunodeficiência combinada grave
- SKOV-3** Linha de células de cancro do ovário humanas

TFD Terapia fotodinâmica

TNF- α Fator de Necrose Tumoral Alfa

TrxR *Thioredoxin reductase* (Tio-redoxina redutase)

U87 Linha celular primária de glioblastoma humano

UV Ultravioleta

1. Introdução

O cancro é uma das principais causas de morte em todo o mundo, tendo sido responsável por quase 10 milhões de mortes em 2020. Devido à sua crescente evolução, esta doença exerce uma enorme pressão física, emocional e financeira sobre os indivíduos, famílias, comunidades e sistemas de saúde. O cancro, uma patologia que pode ter início em quase qualquer órgão ou tecido do corpo, ocorre quando as células anormais crescem descontroladamente e vão além dos seus limites habituais, invadindo partes adjacentes do corpo e/ou espalhando-se para outros órgãos.¹ De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o cancro pode surgir devido à interação entre os fatores genéticos e de agentes externos, incluindo agentes físicos, químicos e biológicos. Dependendo do tipo e estadió do cancro, os pacientes são tratados com terapias tradicionais, tais como intervenção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia, ou novas formas terapêuticas, como imunoterapia, terapia direcionada, terapia hormonal, terapia genética e terapia fotodinâmica (TFD).²

A cisplatina e outros complexos de platina (Pt) desenvolvidos posteriormente com vista à terapêutica antitumoral tiveram, e continuam a ter, um grande impacto no tratamento do cancro. A cisplatina é um dos melhores e primeiros fármacos anticancerígenos baseados num metal. Este composto foi descoberto em 1845 por Michele Peyrone, mas a sua atividade biológica ficou desconhecida até 1965, quando um biofísico, Dr. Barnett Rosenberg, descobriu a sua capacidade de inibir a divisão celular. Posteriormente, estudos confirmaram que a cisplatina exerce a sua atividade antitumoral atacando mais do que um local, podendo exercer a sua atividade por diferentes mecanismos, sendo que o mecanismo mais relevante envolve a ligação ao ácido desoxirribonucleico (ADN) (genómico e mitocondrial). No entanto, os efeitos colaterais e a resistência aos medicamentos são os dois desafios inerentes à cisplatina que limitam a sua aplicação e eficácia. A resistência à cisplatina depende de vários fatores, tais como o acumulo reduzido do medicamento ou inativação do mesmo pela ligação a diferentes proteínas. As limitações clínicas da cisplatina motivaram a criação de milhares de análogos, mas apenas dois, carboplatina e oxaliplatina, foram aprovados em todo o mundo (nedaplatina, heptaplatina e lobaplatina foram apenas aprovados no Japão, Coreia do Sul e China, respetivamente), sendo que alguns fizeram parte de ensaios clínicos. Para além destes, a maioria dos compostos de Pt não tem mostrado vantagem substancial sobre a cisplatina.^{2,3}

O sucesso desses compostos como agentes anticancerígenos tem estimulado a procura de outros compostos citotóxicos envolvendo complexos de metais de transição com perfis de

toxicidade mais aceitáveis e, se possível, aumentando a atividade antitumoral. Entre estes metais encontram-se os do grupo VIII da tabela periódica. A conhecida capacidade do ferro (Fe) em participar em reações *redox* em sistemas biológicos bem como alguma semelhança de comportamento químico com os restantes metais do grupo, tem estimulado a investigação em torno destes metais no sentido de explorar outros mecanismos de ação diferentes do da cisplatina, como sejam a ligação a diferentes biomoléculas ou a perturbação de equilíbrios *redox* celulares. Assim, nas últimas três décadas, uma ampla gama de complexos de ruténio (Ru) foi sintetizada e testada com o objetivo de avaliar as propriedades antitumorais. Os estudos com o Ru mostraram resultados promissores, uma vez que apresentaram um padrão de citotoxicidade e atividade antitumoral diferente do da cisplatina. É assim de prever que também o Fe e o ósmio (Os) apresentem mecanismos de ação igualmente promissores, desde que criado o ambiente químico adequado.⁴

Neste sentido, o objetivo da presente dissertação centra-se na evolução dos complexos de metais do grupo VIII no tratamento antitumoral. Será apresentada uma perspetiva geral sobre o cancro bem como uma revisão bibliográfica aprofundada que incluirá não só o conhecimento sobre os complexos de metais do grupo VIII envolvidos em ensaios clínicos, mas também diversos estudos com resultados promissores.

2. Cancro

As neoplasias ou cancros são termos utilizados para designar um conjunto de doenças que estão relacionadas e que são caracterizadas por um crescimento descontrolado, exagerado e indefinido das células, cuja proliferação resulta na invasão dos tecidos circundantes e metástases.⁵

Normalmente, as células humanas crescem e dividem-se para formar novas células à medida que o corpo necessita. Quando as células normais envelhecem, começam a falhar na sua função ou já não são necessárias, sofrem um processo de morte programada conhecido por apoptose. Estas células são substituídas por células novas que se dividem e diferenciam em células maduras funcionantes. No cancro, o que ocorre é a produção de um número excessivo de células resultante de uma divisão celular descontrolada associada a uma diminuição da sua eliminação por apoptose. As células neoplásicas escapam aos vários mecanismos de controlo, seguem o seu próprio programa de replicação, ignoram os sinais inibitórios, tornando-se autónomas e imortais. Outra particularidade destas células é a sua capacidade de escapar ao seu

tecido de origem e disseminar-se pelo organismo promovendo novos tumores secundários, chamados metástases.^{5,6}

Os tumores são massas de tecido que podem ser benignas ou malignas, sendo que os malignos podem estender-se aos tecidos em redor e invadi-los. Contudo, quando os tumores crescem, algumas células cancerígenas podem libertar-se e mover-se para lugares distantes do corpo por meio do sistema circulatório e do sistema linfático, formando novos tumores longe do tumor inicial. Ao contrário dos tumores malignos, os tumores benignos não se estendem aos tecidos vizinhos e não os invadem, no entanto, podem atingir dimensões elevadas. Quando os tumores benignos são removidos, normalmente não voltam a crescer, enquanto os tumores malignos voltam a crescer algumas vezes. Ao contrário da maioria dos tumores benignos noutras partes do corpo, os tumores benignos do cérebro podem pôr a vida em perigo.⁶

Atualmente, sabe-se que a etiologia do cancro não é apenas uma sequela geneticamente determinada, podendo ser também uma manifestação do comportamento cultural e pessoal imposto a uma suscetibilidade hereditária individual.⁵ As causas do cancro são muito complexas e podem ser vistas de duas perspetivas: origens e mecanismos moleculares e celulares; e fatores externos e contextuais, como idade, hereditariedade e agentes ambientais, que influenciam o seu início e crescimento.

Os carcinogéneos ambientais atuam de duas formas principais: uns induzem lesões dos genes que regulam a proliferação celular, nomeadamente mutações; outros não lesam os genes, mas favorecem o crescimento das células tumorais. Os carcinogéneos ambientais podem ser químicos, físicos ou biológicos.

A exposição a carcinogéneos químicos tem normalmente de ser prolongada no tempo para que o cancro se desenvolva, o que explica o facto da maioria dos tumores ocorrer numa faixa etária mais avançada. O facto de existirem diferentes incidências dentro de uma população exposta aos mesmos carcinogéneos pode ser explicado quer pela presença de enzimas *detox* quer pelo facto de outros sistemas de defesa variarem de indivíduo para indivíduo. Estes agentes químicos podem ser as aflotoxinas, as mustardas, as amins aromáticas, os hidrocarbonetos policíclicos, produtos da combustão dos combustíveis fósseis, pesticidas e herbicidas.

No que diz respeito aos agentes físicos, são exemplos as radiações ionizantes, as radiações ultravioletas (UV) ou até determinadas fibras minerais, como o asbesto (amianto). As radiações UV e ionizantes, provenientes da radiação solar e de fontes industriais ou médicas, respetivamente, induzem a formação do cancro por lesão direta ao ADN e pela supressão de defesas antitumorais.

Por fim, como agentes biológicos, é importante referir os vírus, que são responsáveis por um em cada sete cânceros.

Por sua vez, quando falamos em genes herdados, estes são responsáveis por menos de 5% das neoplasias mortais. É verdade que certos indivíduos nascem com mutações que favorecem diretamente a proliferação celular e transformação maligna ou até o aparecimento de mutações. No entanto, a seleção natural torna essas mutações raras.

No que diz respeito às características fisiológicas hereditárias, é verdade que podem favorecer o aparecimento do cancro. O cancro de pele, por exemplo, é mais prevalente em pessoas de pele clara, pois a falta de melanina torna-as suscetíveis a radiação UV.

São ainda um fator de risco para o aparecimento de cancro, a acumulação de mutações somáticas não corrigidas durante a vida e a produção de carcinogêneos pelo organismo, responsáveis por cerca de 25% dos cânceros.⁵

Na maioria dos casos, acredita-se que a patogenicidade molecular do cancro tenha a sua origem em lesões genéticas ou mutações que alteram a fisiologia da célula e transformam uma célula com funcionamento normal numa célula cancerígena. Os mecanismos genéticos e moleculares que aumentam a suscetibilidade ao cancro ou que facilitam o aparecimento do cancro incluem defeitos nos mecanismos de reparação do ADN, defeitos nas vias de sinalização de fator do crescimento, evasão de apoptose, fuga dos mecanismos de antienvhecimento e de senescência, desenvolvimento de angiogénese sustentada, invasão e metástase. Como o cancro não é uma doença isolada, é provável que múltiplos fatores interajam a nível molecular e celular, transformando células normais em células cancerígenas.⁷

A carcinogénese, mecanismo de transformação de uma célula normal numa outra com características neoplásicas, compreende múltiplas etapas. O período entre a exposição a um determinado agente carcinogénico e o desenvolvimento de células neoplásicas abrange três etapas distintas: a iniciação, a promoção e a progressão.

A exposição a agentes carcinogêneos com consequente lesão do ADN cromossômico de células normais, ausência de reparação da lesão, replicação e transmissão à descendência, traduz a etapa de iniciação. Esta é seguida da etapa de promoção, que assinala o momento em que as alterações genéticas das células sujeitas a carcinogêneos e promotores da carcinogénese determinam a transformação neoplásica e o desenvolvimento de células com capacidade de crescimento autónomo. A última etapa, a progressão, é caracterizada por uma marcada malignidade como resultado da acumulação de modificações genéticas e epigenéticas. O tumor apresenta um elevado ritmo de proliferação e capacidade de invasão e metástase.⁸

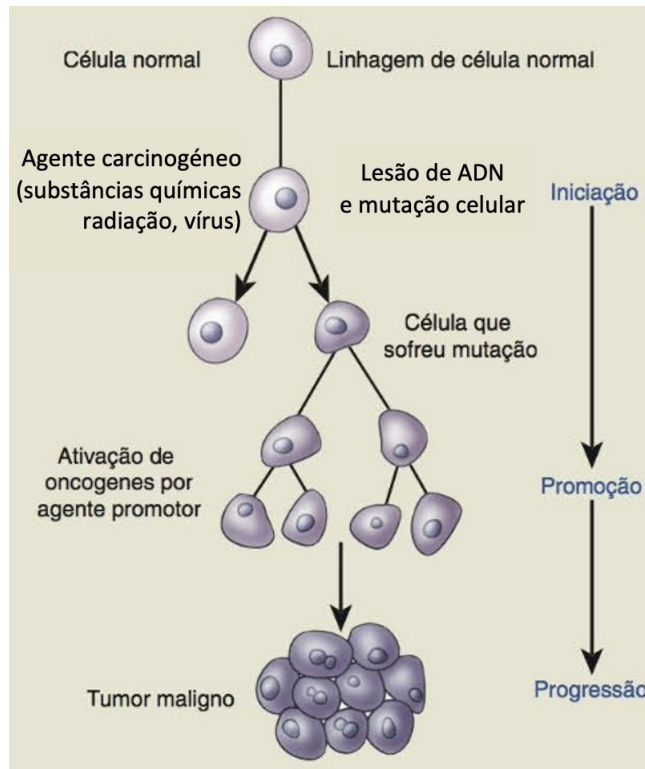


Figura 1 - Processos de iniciação, promoção e progressão na evolução clonal de tumores malignos (adaptado de ⁷)

A par com as etapas acima enumeradas, três regras fundamentais têm de ser infringidas para o desenvolvimento de um tumor. As células apenas iniciam o processo de divisão celular quando estimuladas. Quando este primeiro princípio não é respeitado, as células arranjam forma de manter ativo o processo pela qual são estimuladas por uma hormona ou fator de crescimento.

A segunda premissa sugere que em condições impróprias para a replicação do ADN, as células ativam programas de morte celular com o objetivo de impedir a replicação do ADN lesado. Para escaparem aos programas de autodestruição, as células evitam os pontos de controlo durante o ciclo celular. Os genes supressores de tumores desempenham um papel importante neste aspeto. Quando estes genes são alterados por mutação, perdem as suas funções e as células adquirem a capacidade de se dividirem continuamente e escaparem à apoptose.

A última regra determina que o número de divisões de uma célula é limitado devido a uma estrutura na posição terminal de cada cromossoma, o telómero. Cada vez que a célula se divide, a sequência de ADN constituída por pequenas repetições é encurtada. Após um número fixo de divisões, o encurtamento dos telómeros é incompatível com a continuidade da divisão celular, o que conduz à senescência e apoptose. As células neoplásicas, por outro lado, através da ativação da telomerase, enzima que promove a regeneração dos telómeros, adquirem uma característica que as torna “imortais”.⁹

A infração conjunta destas três regras é a chave para uma célula se tornar tumoral. A complexidade da tumorigênese advém da aptidão da célula para operar todas estas modificações de uma forma coordenada e é por este motivo que se acredita que o cancro depende simultaneamente de fatores genéticos e ambientais.⁹

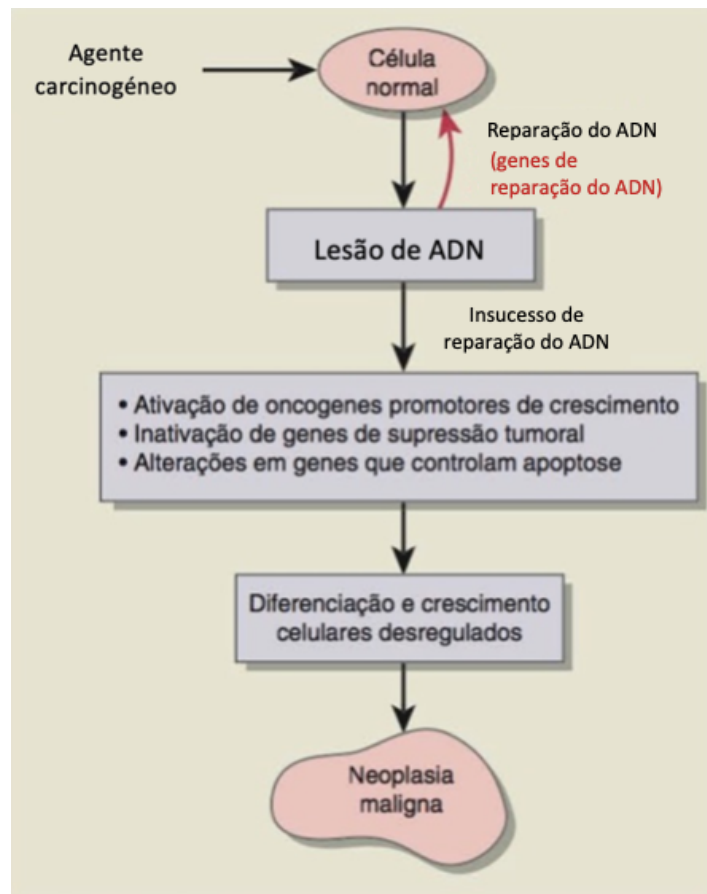


Figura 2 - Fluxograma que destaca os estádios no desenvolvimento de uma neoplasia maligna decorrente da exposição a agente carcinogénico que produz lesão no ADN (adaptado de ⁷)

Ainda no que concerne ao processo de carcinogénese, as alterações genéticas mais comuns abrangem os proto-oncogenes, os genes supressores de tumor e os genes reparadores do ADN. Os proto-oncogenes codificam proteínas com funções no controlo do crescimento celular. Modificações na sua estrutura ou expressão podem desencadear a sua ativação em oncogenes (genes causadores de cancro), porque permitem que as células cresçam e sobrevivam quando não deveriam. São assim designados porque promovem a proliferação celular. Contrariamente, alguns genes contribuem para o desenvolvimento de tumores quando são inativados. É o caso dos genes supressores de tumor que exercem igualmente funções na gestão do crescimento e proliferação celular. Uma mutação neste gene conduz à codificação de uma

proteína disfuncional, incapaz de impedir a divisão celular quando necessário. Considera-se ainda uma terceira classe de genes, associada ao mecanismo de carcinogénese. Embora não estejam diretamente envolvidos, os genes responsáveis pelo processo de reparação do ADN quando inativados deixam a célula exposta ao desenvolvimento de mutações e consequentemente à ativação de oncogenes e inativação dos genes supressores de tumores.^{7,9,10}

Durante as últimas décadas foram exploradas teorias alternativas, tendo resultados experimentais recentes mostrado que a presença de mutações e fatores de crescimento não conseguem por si só explicar a indução da proliferação celular e que o microambiente em que a célula está inserida contribui ativamente para a iniciação da carcinogénese. A interação entre as células e o microambiente que as rodeia, com o envolvimento de fatores bioquímicos e biofísicos, impulsiona de forma determinante a emergência do cancro.¹¹

Os estudos estatísticos mais recentes indicam que, em 2020, em todo o mundo, 19,3 milhões de novos casos de cancro foram diagnosticados, dos quais 10,1 milhões nos homens e 9,23 milhões nas mulheres. É expectável que este número aumente para 30,2 milhões em 2040. No que respeita à mortalidade, registaram-se 9,96 milhões de mortes por cancro, em 2020 e estima-se que, em 2040, o cancro venha a vitimar, aproximadamente, 16,3 milhões de pessoas por ano.¹²

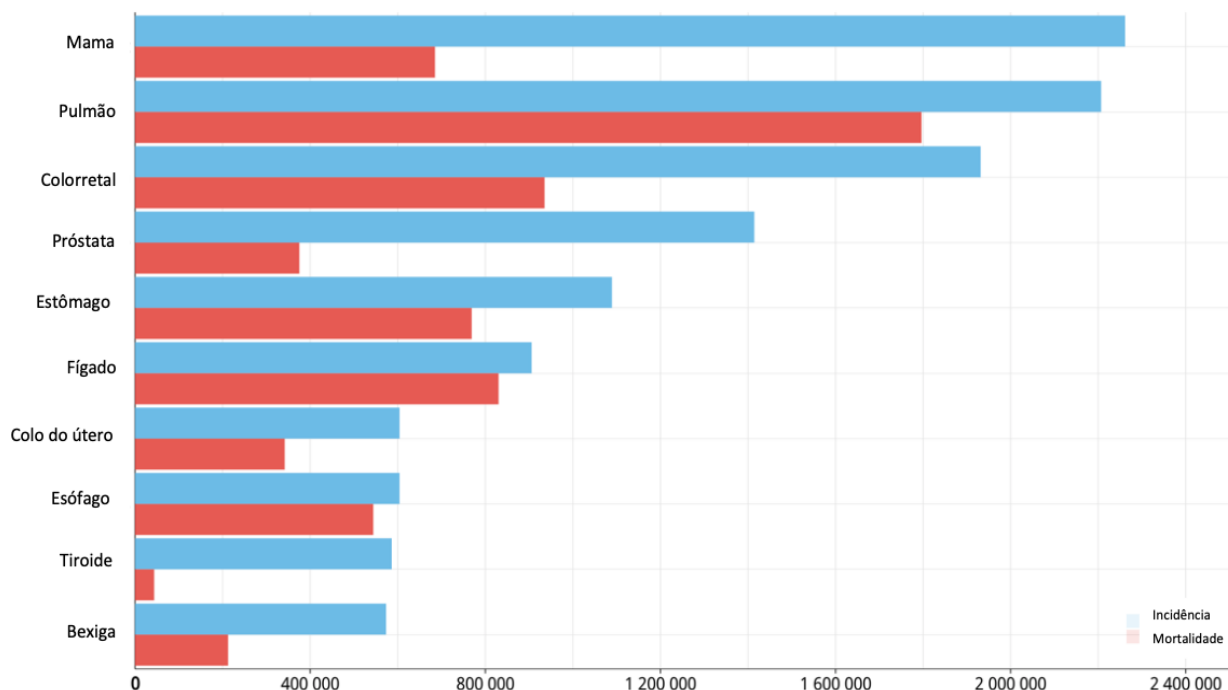


Figura 3 - Incidência e mortalidade em números, de diversos tipos de cancro, para ambos os géneros e todas as idades (adaptado de ¹³)

O cancro da mama foi registado como o mais prevalente em todo o mundo, registando assim 11,7% do total de novos casos diagnosticados em 2020. O cancro do pulmão foi identificado como o segundo tipo de cancro mais frequente com, aproximadamente, 11,4% de novos casos no mesmo ano. O cancro colorretal ficou classificado como o terceiro tipo de cancro mais comum, representando uma parcela de 10% do número total de casos em 2020.¹³

No decorrer dos anos, com o objetivo de contrariar estes números, a investigação na área da química inorgânica tem tido um papel importante no que diz respeito às aplicações médicas, quer em termos de diagnóstico, quer em termos de terapêutica. A constante investigação tem proporcionado um crescimento contínuo do nosso conhecimento acerca das causas do cancro, o que permite a possibilidade de desenvolver estratégias de prevenção da doença, de deteção precoce e de intervenção na sua progressão.

2.1 Terapêuticas atuais

Atualmente, existem vários tipos de tratamento contra o cancro, sendo que as modalidades terapêuticas mais usadas são, a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia.¹⁴ O tipo de tratamento recebido é individualizado e depende do tipo de cancro e do seu estadio. Normalmente, a maioria das pessoas tem uma combinação de tratamentos, enquanto algumas podem ter apenas um dos tratamentos.¹⁵

A remoção cirúrgica de um tumor é direta, rápida, eficaz e constitui a terapêutica mais utilizada. É também o único método capaz de permitir um estudo anátomo-patológico do tumor. Infelizmente não é uma arma absoluta, pois não garante a eliminação de micrometástases, para além de obrigar a uma remoção de muito tecido saudável, vizinho do tumor, o que perturba o funcionamento normal do órgão. Quando um tumor se encontra localmente avançado, ou seja, invasão das estruturas adjacentes, ou disseminado, a cirurgia já não está indicada.⁵

Em alguns casos, a radioterapia é preferível à cirurgia. Através deste método, o tumor é irradiado por raios X ou raios gama emitidos por uma fonte externa (radioterapia externa) ou por implantes intraorgânicos definitivos ou temporários (braquiterapia). A irradiação das células neoplásicas provoca a sua morte por ação direta ou através da indução da apoptose. Tal como a cirurgia, a radioterapia não está indicada no caso de tumores disseminados. Por outro lado, é muito difícil impedir a irradiação de tecidos vizinhos sãos, apesar da sofisticação dos aparelhos atuais.⁵

A quimioterapia é a única opção para os cancros metastáticos, onde o tratamento deve ser sistémico. Esta terapêutica usa agentes químicos para o tratamento do cancro. A maioria

dos agentes quimioterápicos exerce o seu efeito citotóxico modificando o ADN, mimetizando componentes do ADN, inibindo enzimas envolvidas na síntese de ADN ou bloqueando a divisão celular. A quimioterapia tradicional mata as células que se dividem rapidamente, independentemente de serem células cancerígenas ou não. Portanto, a quimioterapia padrão danifica os tecidos saudáveis, especialmente aqueles que apresentam uma alta taxa de reposição.¹⁶ Hoje em dia, muitos agentes alquilantes diferentes são administrados como parte dos regimes de terapia anticancerígena. Além disso, uma ampla gama de fármacos não alquilantes foi desenvolvida para tratar o cancro. A quimioterapia pode ser classificada segundo o espectro de atuação dos citotóxicos no ciclo celular ou de acordo com o seu mecanismo de ação. No que respeita à primeira classificação, os agentes quimioterápicos podem ser distinguidos em fase-específicos, ciclo-específicos e ciclo-inespecíficos, consoante a especificidade de atuação no ciclo celular.¹⁷

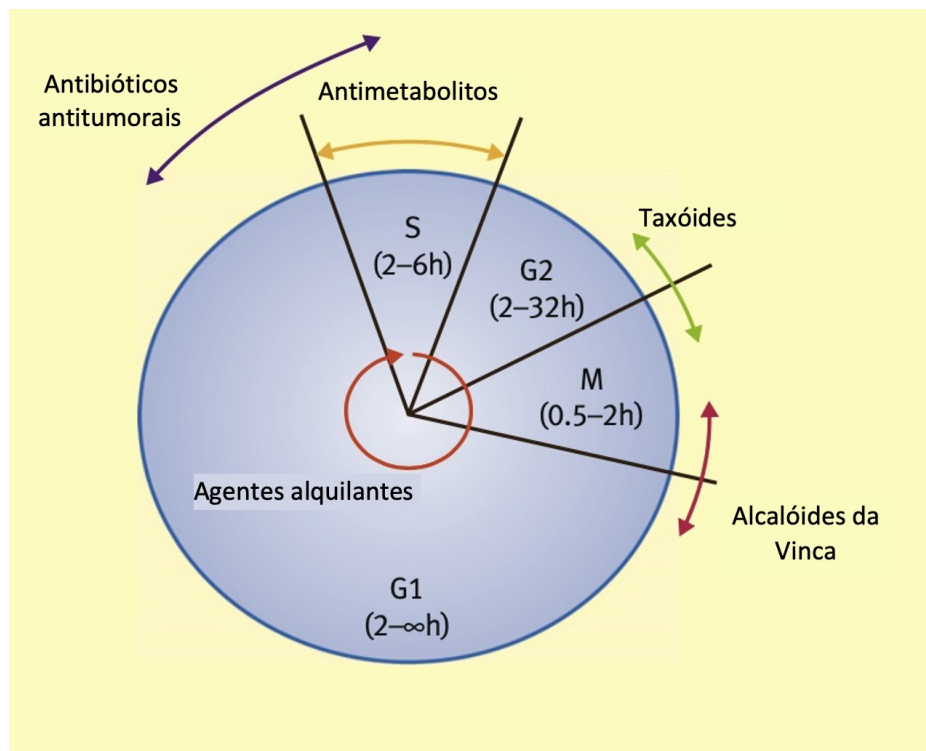


Figura 4 - Especificidade de atuação no ciclo celular das diferentes classes de agentes quimioterápicos (adaptado de ¹⁷)

No que diz respeito à segunda classificação, os medicamentos quimioterápicos atuais também podem ser classificados em várias categorias de acordo com seu mecanismo de ação:

-Agentes Modificadores do ADN: operam interagindo com os ácidos nucleicos.

Integram duas categorias de quimioterápicos:

- Agentes Alquilantes: atuam pela inibição das funções celulares ao transferirem o seu grupo alquilo (R-CH₂) para os constituintes celulares e, desta forma,

estabelecerem ligações covalentes com proteínas e com ácidos nucleicos (clorambucil, ciclofosfamida e dacarbazina).^{16,17}

- Complexos de Platina: a atividade antitumoral destes complexos é atribuída à sua ligação ao ADN, com formação de adutos que conduzem a modificações estruturais e, por consequência, à inibição da síntese de ADN e indução da apoptose (cisplatina, oxaliplatina e carboplatina).^{16,18}

-Antimetabolitos: são análogos estruturais de metabolitos naturais envolvidos na síntese de ácidos nucleicos. Exercem a sua atividade ao competirem com o substrato natural pelo sítio ativo de enzimas com funções na biossíntese de ácido ribonucleico (ARN) e ADN (6-mercaptopurina, 5- fluoruracilo e gencitabina).¹⁷

-Antibióticos Antitumorais: atuam por intercalação no ADN em sequências específicas, com a formação de radicais livres e consequente disrupção das cadeias de ADN. As antraciclina, produto do fungo *Streptomyces*, inibem, adicionalmente a ação das Topoisomerasas I e II (bleomicina, daunorrubicina e doxorrubicina).¹⁷

-Inibidores da Topoisomerase: o mecanismo de ação destes compostos relaciona-se com a inibição da atividade das Topoisomerasas I e II. Estas enzimas são responsáveis pela estrutura 3D do ADN, durante o processo de replicação (irinotecano, topotecano e etoposido).¹⁷

-Compostos Naturais: estes agentes, também denominados por “Venenos do Fuso Mitótico”, atuam por se ligarem à tubulina, o monómero funcional do microtúbulo. Integram na sua categoria:

- Alcaloides da Vinca: atuam por ligação à tubulina e, por conseguinte, inibição da formação do microtúbulo, componente extremamente importante no processo de mitose, assim como na estrutura da célula (vimblastina e vincristina).
- Taxoides: estes compostos, por outro lado, impedem a desconstrução do microtúbulo, e assim, a função normal da célula (paclitaxel e docetaxel).

O sucesso da quimioterapia como terapêutica anticancerígena é limitado por problemas com toxicidade, eficácia e resistência aos medicamentos.^{16,17}

2.2 Complexos de coordenação no tratamento do cancro

Os iões metálicos são indispensáveis em várias funções dos organismos vivos e estão a tornar-se cada vez mais importantes no diagnóstico e na terapêutica de diferentes patologias. A lista desses metais é cada vez maior e inclui não apenas metais essenciais à vida, como zinco,

cobre e manganês, mas também muitos metais antes considerados nocivos, como selênio e molibdênio.¹⁹

Uma propriedade importante dos metais é que eles perdem elétrons facilmente e formam iões carregados positivamente que têm tendência para se ligar e interagir com as moléculas biológicas. Alguns dos papéis importantes que os metais exibem incluem: o transporte de oxigênio em todo o corpo, a regulação do metabolismo do açúcar, servir como componentes essenciais de metaloenzimas e fornecimento de estruturas para muitas proteínas. Visto que a natureza selecionou o uso tão extenso de iões metálicos em sistemas biológicos, a ideia de que os complexos metálicos também poderiam desempenhar um papel importante na medicina não foi uma surpresa.¹⁹

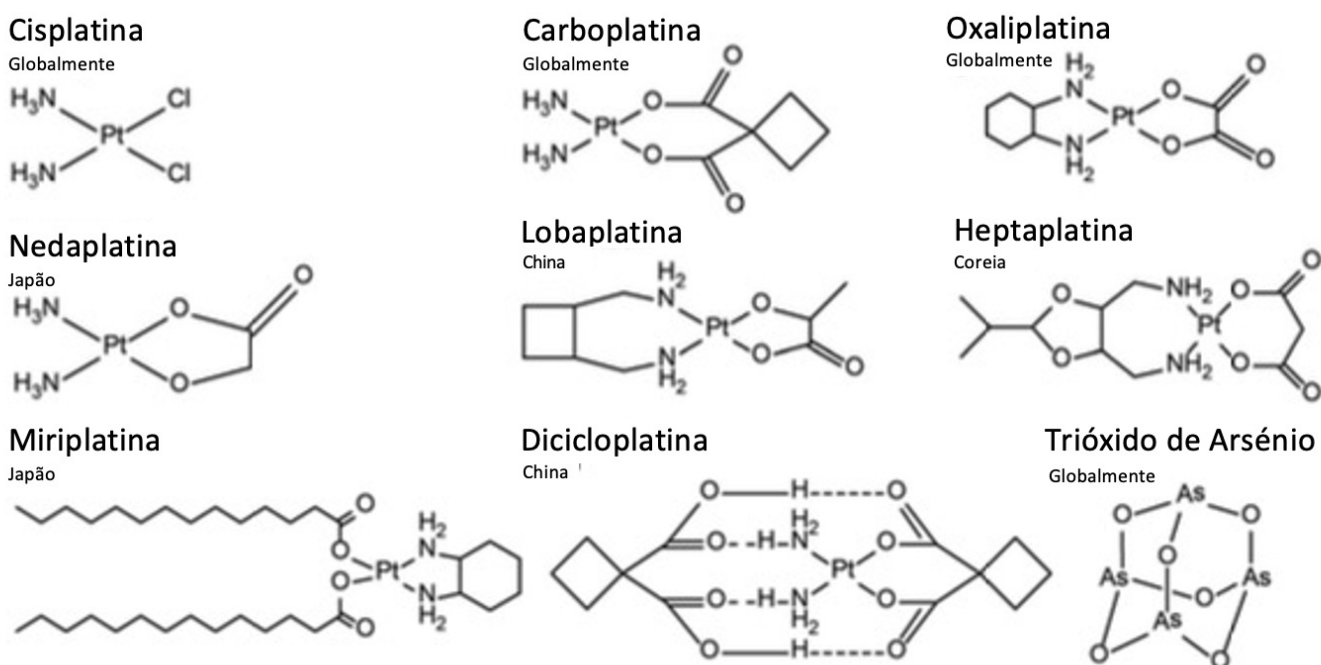


Figura 5 - Metalofármacos anticancerígenos aprovados em diferentes regiões (adaptado de ¹⁵⁴)

Os complexos de coordenação têm sido usados ao longo da história da medicina humana para tratar várias doenças, incluindo o cancro.

Desde a descoberta da cisplatina em 1965, um grande número de complexos de metais de transição como a platina, o rutênio, o ouro ou o cobre, foram sintetizados e testados com o objetivo de desenvolver fármacos clinicamente eficazes e seguros. A descoberta das propriedades citotóxicas da cisplatina (cis-diaminodicloroplatina (II)), abriu um novo caminho para a aplicação de complexos metálicos na terapia do cancro. Contudo, o efeito antiproliferativo da cisplatina e de outros compostos induz efeitos adversos nos tecidos normais, diminuindo a efetividade terapêutica. Além disso, em muitos cancros, as células tumorais

podem adquirir resistência à terapêutica. Nos últimos 15 anos, um grande esforço tem sido dedicado ao desenvolvimento de medicamentos mais eficazes e menos tóxicos. Vários novos complexos de transplatina (II) e platina (IV) foram sintetizados e, alguns deles, foram selecionados para ensaios clínicos, mas com eficácia e segurança variáveis.

Os compostos de arsênio também têm um papel importante nesta área. Por exemplo, o trióxido de arsênio (As_2O_3) é usado há dez anos em pacientes com leucemia promielocítica aguda (APL). Além disso, o trióxido de arsênio é seguro e eficaz não apenas em pacientes com leucemia, mas também em pacientes com muitas outras doenças malignas.²⁰

Portanto, metais menos tóxicos, como rutênio, ouro ou cobre foram introduzidos como candidatos promissores para uma terapia eficaz e segura. Esta abordagem surge com a justificação de que complexos baseados noutros iões metálicos possam atuar em diferentes alvos celulares, incluindo ADN, vias enzimáticas, espécies reativas de oxigénio (ROS) ou mitocôndrias. Além disso, os complexos metálicos podem imitar compostos endógenos e, através de vias endógenas fisiológicas, aumentar o efeito citotóxico e, possivelmente, reduzir os efeitos adversos sistémicos.¹⁸

3. Complexos do grupo VIII

O rutênio e o ósmio são metais do bloco d e, juntamente com o ferro, são membros do grupo VIII da tabela periódica.²¹

A tríade Fe, Ru e Os é dominada, como todo o bloco de elementos de transição, pela imensa importância do ferro. Este elemento é conhecido desde os tempos pré-históricos e nenhum outro metal desempenhou um papel mais importante no progresso material do homem.

Biologicamente, o ferro desempenha papéis cruciais no transporte e armazenamento de oxigénio e também no transporte de eletrões, e é seguro dizer que, com apenas algumas exceções possíveis no mundo bacteriano, não haveria vida sem ferro. Novamente, nos últimos quarenta anos ou mais, a já rica química organometálica do ferro foi enormemente expandida e o trabalho em todo o campo recebeu um impulso adicional pela descoberta e caracterização do ferroceno.²²

Na terra, o rutênio e o ósmio costumam ocorrer juntos nos mesmos depósitos minerais. Embora o ósmio tenha sido descoberto antes do rutênio, a sua química e também a sua atividade anticancerígena são menos exploradas do que a do seu homólogo.

Os metalofármacos de rutênio e ósmio foram inicialmente projetados para imitar o mecanismo de ação dos agentes anticancerígenos de platina. Isso refletiu-se nos primeiros complexos de rutênio e o ADN foi, por muito tempo, considerado o alvo principal. No entanto, essa visão mudou consideravelmente durante a última década. É agora experimentalmente evidente que as terapêuticas baseadas em rutênio e ósmio oferecem muito potencial como fármacos citostáticos e citotóxicos, seguindo novos mecanismos de ação.

Os metalofármacos anticancerígenos baseados em rutênio e ósmio estão entre os metalofármacos sem platina mais investigados e avançados. A descoberta de medicamentos inorgânicos com esses agentes passou por avanços consideráveis nas últimas duas décadas e, atualmente, tem dois representantes em ensaios clínicos ativos. Como muitos metalofármacos, os complexos de rutênio e ósmio são pró-fármacos, sendo que uma questão chave a ser abordada é como é que a reatividade molecular de tais terapêuticas baseadas nestes metais dita a seletividade e o tipo de interação com alvos moleculares.²¹

3.1 Ferro

O ferro é o metal de transição mais abundante na Terra e também é um elemento essencial para o funcionamento do corpo humano, que contém, em média, aproximadamente 6g para um homem de 70kg.²³ É um componente-chave do heme e, como tal, desempenha um papel essencial no transporte de oxigênio no sangue, além de estar envolvido a nível celular na produção de energia e na síntese de ADN.²⁴

O ferro também está presente em hemoproteínas, como as catalases e citocromos P450, bem como em enzimas de ferro não heme que desempenham um papel importante na ativação do oxigênio.^{25,26}

Essas atividades biológicas estão associadas aos seus diferentes estados de oxidação, essencialmente ferro (II) e ferro (III), e à sua capacidade de circular entre esses dois estados estáveis (ferroso e férrico). O ferro também é um componente da transferrina e da ferritina, metaloproteínas responsáveis, respetivamente, pelo transporte do ferro livre nos fluidos biológicos e no seu armazenamento no corpo.

A mudança de estado do ferro (II) para ferro (III) na presença de oxigênio é acompanhada pela produção de ROS que são potencialmente tóxicos para as células. A homeostase do ferro na célula é um fator chave no seu comportamento e deve ser bem controlada para evitar esse efeito tóxico. Também foi observado que as células cancerosas requerem mais ferro do que as células saudáveis devido em parte à sua rápida taxa de síntese de ADN.²⁴

De todos os metais usados na composição dos metalofármacos, o ferro é o único elemento presente no corpo na faixa de gramas, o que lhe dá a vantagem não desprezável de ser um metal que, exceto em distúrbios que envolvam um excesso de ferro, é considerado não tóxico para os humanos. Por esse motivo, as moléculas que contêm ferro são mais prontamente aceitas pela comunidade médica do que os metalofármacos à base de metais pesados, como a platina.

O interesse pelo ferro como agente anticancerígeno leva ao estudo de três categorias muito diferentes de complexos.

A primeira é a família de complexos organometálicos de ferroceno que foram objeto de uma série de artigos de revisão^{27,28,29,30} e capítulos de livros^{31,32,33}.

A segunda família, é a dos complexos de coordenação de ferro (II) e ferro (III).³⁴

E, por fim, uma terceira família de moléculas designada por agentes quelantes de ferro. Estas moléculas têm a capacidade de usar o ferro presente no corpo para formar complexos citotóxicos de ferro. As moléculas mais representativas dessa família são as bleomicinas, antibióticos produzidos pela bactéria *Streptomyces verticillus* que são prescritos no tratamento de certos cânceros, como o câncer do testículo e certos tipos de linfoma.³⁵ Também podem ser adicionadas a esta família as moléculas originalmente destinadas para tratar o excesso de ferro, que demonstraram ter efeitos antiproliferativos nas células cancerosas.^{36,37}

Um grande número das publicações de interesse citadas nesta dissertação referem-se ao trabalho conjunto da química e da biologia, geralmente enquadrados em duas categorias. A primeira categoria é focada na síntese de novos complexos, enquanto a segunda diz respeito ao estudo dos efeitos antiproliferativos dos complexos *in vitro* numa ou mais linhagens de células cancerígenas.

O objetivo é a determinação dos valores de IC50 para os novos complexos com o intuito de fornecer uma avaliação preliminar do seu potencial como agentes anticancerígenos. As moléculas mais promissoras são então submetidas a estudos biológicos, alguns mais extensos do que outros, para tentar determinar o seu mecanismo de ação, o seu efeito no ciclo celular, o tipo de morte celular que induzem, o seu efeito nas vias de sinalização e possivelmente outros parâmetros. Os estudos *in vivo* dos efeitos dessas novas moléculas no crescimento de tumores xenoinxertados raramente são realizados nesta fase, embora seja importante ter em mente que o teste *in vitro* está longe de ser suficiente para prever o comportamento das moléculas *in vivo*. Artigos recentes sublinharam este ponto evidente, em particular para medicamentos administrados por via oral.^{21,38} Além disso, a regra de cinco de *Lipinski*³⁹, que é usada na indústria farmacêutica para selecionar os melhores candidatos para estudo *in vivo*, não é

adequada para complexos organometálicos, que são geralmente moléculas lipofílicas, e a regra de estimativa quantitativa de semelhança com o fármaco⁴⁰, que propõe outra abordagem, ainda não é amplamente utilizada⁴¹. Para estudos *in vitro*, essas moléculas são dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) e depois adicionadas ao meio biológico para atingir um máximo final de 1% que não é tóxico para as células. *In vitro*, esses compostos lipofílicos passam facilmente pela membrana celular. Assim, foi demonstrado que a adição de um substituinte lipofílico a uma unidade estrutural potencialmente citotóxica, mas hidrofílica, facilita a sua entrada na célula e permite a expressão da sua citotoxicidade⁴².

No entanto, fundamentar a seleção de complexos potencialmente interessantes no critério dos seus valores de IC50 não leva em consideração o facto de que, *in vivo*, uma molécula inativa pode ser metabolizada para formar um metabolito ativo. É o caso do tamoxifeno, que é metabolizado no fígado em hidroxitamoxifeno, a sua forma ativa.

3.1.1 Complexos Organometálicos de Ferroceno

O ferroceno (figura 6) foi sintetizado em 1951 por P. L. Pauson⁴³ e S. A. Miller⁴⁴, e a sua estrutura foi determinada em 1952 por E. O. Fischer⁴⁵ e G. Wilkinson⁴⁶ que receberam o Prémio Nobel de Química por este trabalho em 1973.

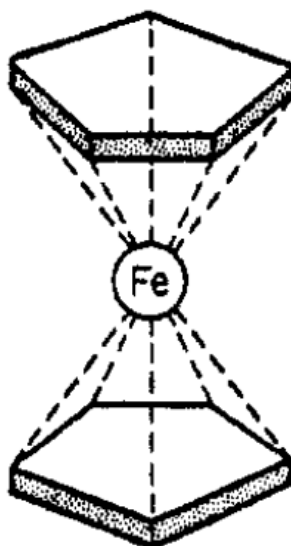


Figura 6 - Estrutura química do ferroceno (adaptado de ⁴⁶)

O ferroceno é o arquétipo dos compostos organometálicos sanduíche. É estável ao ar e comporta-se como um composto aromático, fornecendo acesso a uma biblioteca de moléculas extremamente variadas. O ferroceno é caracterizado pela oxidação fácil e reversível do ferro (II) em ferro (III). O seu potencial *redox* é de 0,4V, um valor que é particularmente interessante

para a química medicinal, pois é compatível com os potenciais *redox*, na faixa de +0,4 a -0,44V, encontrados na célula.⁴⁷

Os primeiros complexos de ferroceno a representar uma inovação real no domínio dos medicamentos anticancerígenos surgiram apenas em 1996, quando foram sintetizados os complexos de ferroceno de hidroxitamoxifeno (Fc-OH-Tam, figura 7, complexo 1).^{48,49}

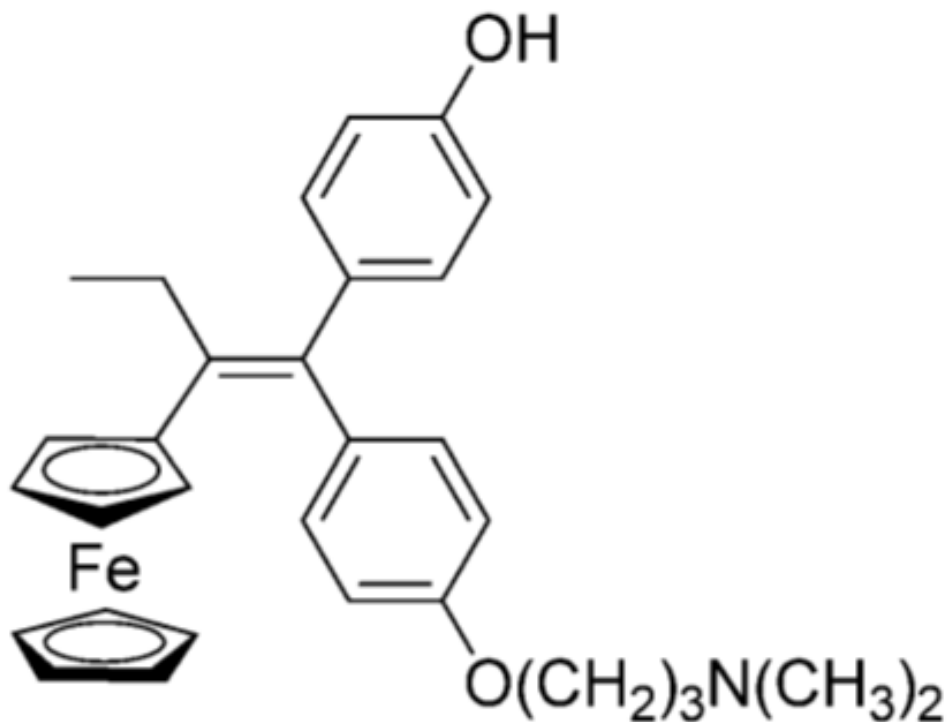


Figura 7 - Estrutura química do Fc-OH-Tam, complexo 1 (adaptado de ⁵³)

3.1.1.1 A Família Ferrocifeno

Esta família conta com cerca de 300 moléculas^{27,50,51}, sendo que os complexos mais estudados da família ferrocifeno são os complexos do tipo tamoxifeno (figura 7), os complexos mono e difenólicos (figura 10) e o complexo ansa-difenólico (figura 13), em que os dois anéis ciclopentadienil estão ligados por uma cadeia alifática.

3.1.1.1.1 Ferrocifenos semelhantes ao tamoxifeno

Os primeiros complexos desta família a serem sintetizados foram os análogos do ferroceno de hidroxitamoxifeno (OH-Tam, figura 8), o metabolito ativo do tamoxifeno, um fármaco usado no tratamento adjuvante de câncros da mama hormonodependentes.⁵²

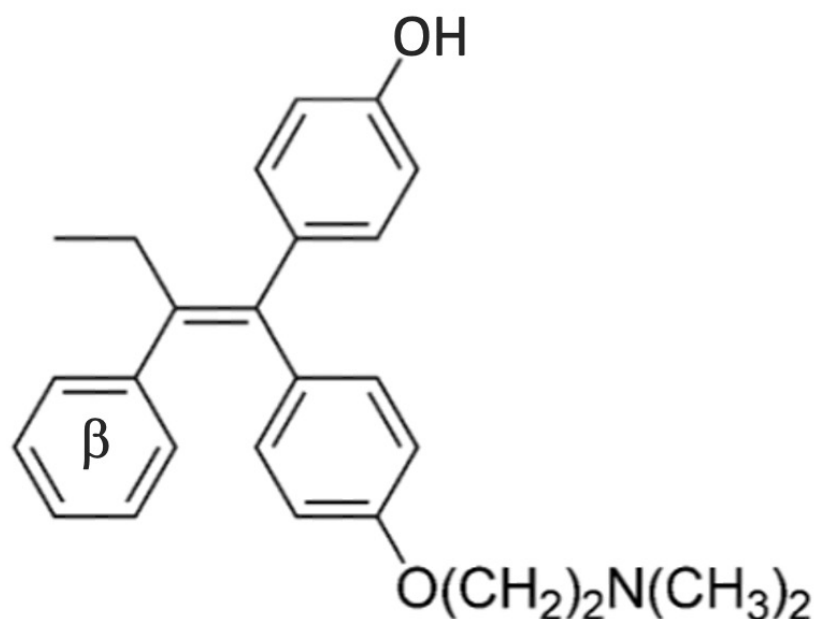


Figura 8 - Estrutura química do hidroxitamoxifeno (OH-Tam) (adaptado de ⁵³)

Inicialmente, a intenção era estudar o efeito da substituição do anel β aromático de OH-Tam com um substituinte ferrocenil. Esses complexos são obtidos por meio de uma reação de acoplamento de *McMurry* das cetonas correspondentes (figura 9).^{49,53}

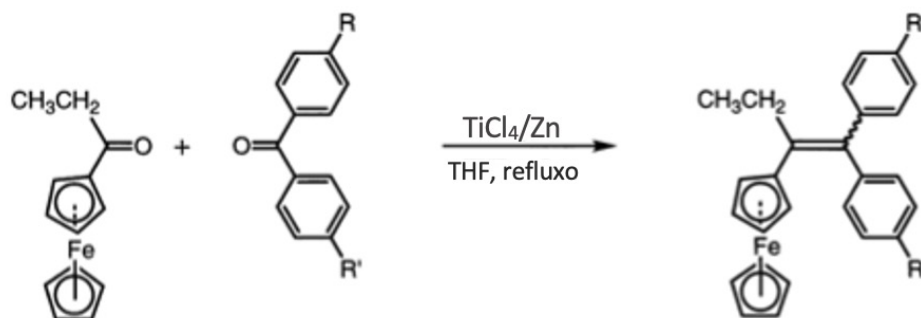


Figura 9 - Mecanismos de síntese dos derivados de ferroceno de tamoxifeno (adaptado de ⁵⁴)

Foram sintetizados complexos com cadeias de amino de vários comprimentos. O complexo 1 (figura 7) foi o mais estudado devido à sua facilidade de síntese e ao seu forte efeito antiproliferativo (IC₅₀ aproximadamente de 0,5 μ M) em células de cancro da mama hormonodependentes (MCF-7) e hormonoindependentes (MDA-MB-231), enquanto o próprio OH-Tam é apenas ativo em células hormonodependentes.^{49,53} Esse efeito duplo é notável, uma

vez que a forma puramente orgânica correspondente mostra atividade anti-estrogênio apenas em células de cancro da mama hormonodependentes. Isso revela o significado citotóxico da unidade ferrocenil^{27,50,51}.

O complexo 1 produz ROS imediatamente após entrar nas células MCF-7 e MDA-MB-231, enquanto OH-Tam não.^{54,55} Em baixas concentrações (1 μM), o complexo 1 induz senescência, um processo de envelhecimento a nível celular, mas não apoptose de células MCF-7 e MDA-MB-231.⁵⁵

Curiosamente, o complexo 1 induz este tipo de morte celular em células que não são suscetíveis à apoptose (glioblastomas e células cancerígenas da mama triplo-negativas) que estão associadas a tumores sólidos, que permanecem os mais difíceis de tratar. Em células Jurkat (leucemia) que são suscetíveis apenas à apoptose, uma alta concentração do complexo 1 (15 μM) induz a inibição da tioredoxina redutase mitocondrial (TrxR), bem como diminui o potencial de membrana mitocondrial (MMP), levando à apoptose das células.⁵⁶

Os catiões lipofílicos são conhecidos por se localizarem preferencialmente nas mitocôndrias. A interação do complexo 1 ao nível da mitocôndria pode ser explicada pela protonação, a pH fisiológico, do seu grupo dimetilamina, conferindo-lhe o caráter de um catião lipofílico. A sua presença nesses organelos foi confirmada pela alta quantidade de ferro encontrada por espectrometria de emissão ótica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES) nas mitocôndrias das células Jurkat (36% do ferro total nas mitocôndrias).⁵⁶

Devido à sua lipofilia, o complexo 1 não pode ser administrado *in vivo* sem encapsulação em nanocápsulas lipídicas (LNCs). Estas são preparadas com um núcleo lipofílico (Labrafac®) que permite a solubilização de complexos de ferroceno. A injeção intraperitoneal de LNCs carregadas com o complexo 1 mostrou regressão significativa de tumores xenoenxertados de células MDA-MB-321 em ratos imunodeficientes combinados graves (SCID).⁵⁷

3.1.1.1.2 Ferrocifenos Mono e Difenólicos

Os complexos mono e difenólicos, 2 e 3, figura 10, foram sintetizados e têm um forte efeito citotóxico nas células MDA-MB-231 (IC₅₀ = 1,5 e 0,6 μM , respetivamente)⁵⁸.

Este efeito está relacionado com as propriedades *redox* exclusivas dos ferrocifenos e envolve a formação dos metetos de quinona correspondentes 2-QM e 3-QM, de acordo com um esquema de reação em que todas as etapas foram confirmadas por eletroquímica e ressonância paramagnética eletrónica (EPR)⁵⁹.

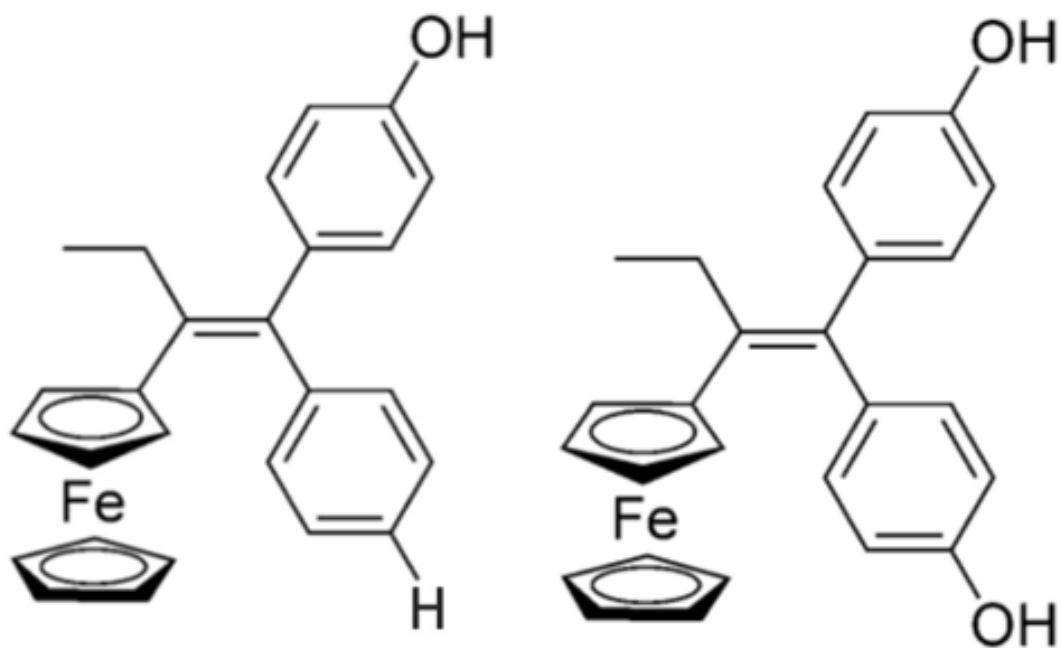


Figura 10 - Estrutura química dos complexos mono e difenólicos, complexo 2 e complexo 3, respectivamente (adaptado de ⁵³)

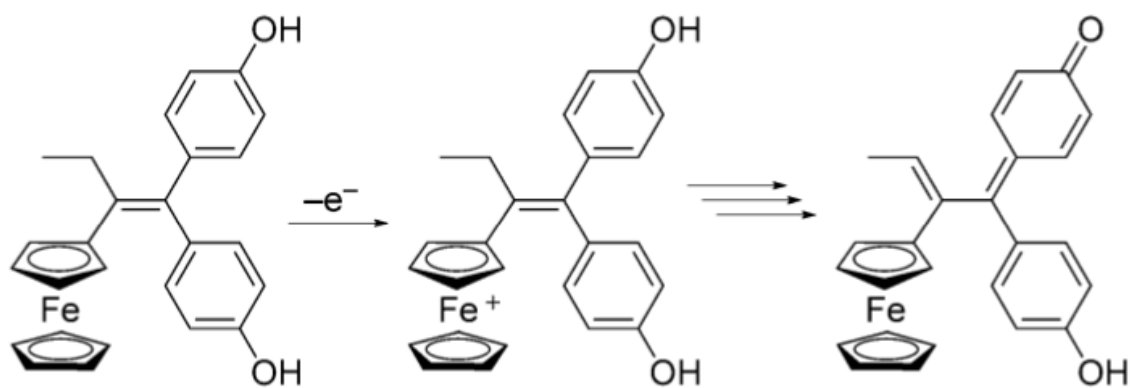


Figura 11 - Formação de meteto de quinona resultante da oxidação da fração ferroceno (adaptado de ⁵³)

Acredita-se que estes QMs sejam a fonte da toxicidade dos ferrocifenos 2 e 3, pró-fármacos, cuja ativação nas células leva à sua citotoxicidade.

Esses QMs podem ser obtidos quimicamente por oxidação na presença de Ag_2O . Eles são espécies reativas que dão origem a adições de 1,8-Michael com tióis nucleofílicos, como a glutationa (GSH).⁶⁰ São também bons inibidores *in vitro* de TrxR citosólico purificado (IC50 em torno de 2,5 μM), enquanto os complexos 2 e 3 não são.

Por outro lado, o complexo 2, ao contrário do complexo 1, não inibe TrxR dentro das células Jurkat.⁶¹

Experiências em linhagens de células de glioma humano (Hs683 e U373) mostraram que o complexo 3 induziu senescência.⁶² Isso está ligado à expressão de SA- β -galactosidase, à secreção de várias interleucinas e ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). *In vivo*, a injeção intravenosa (IV) em ratos com LNCs carregadas com o complexo 3 induz regressão significativa de tumores de células 9L (glioblastoma de rato). A sobrevivência de longo prazo (animais ainda vivos após 100 dias de experiência) ocorreu em ratos portadores de tumores de células 9L quando a injeção de LNCs carregadas com o complexo 3 é acompanhada por radioterapia.⁶³

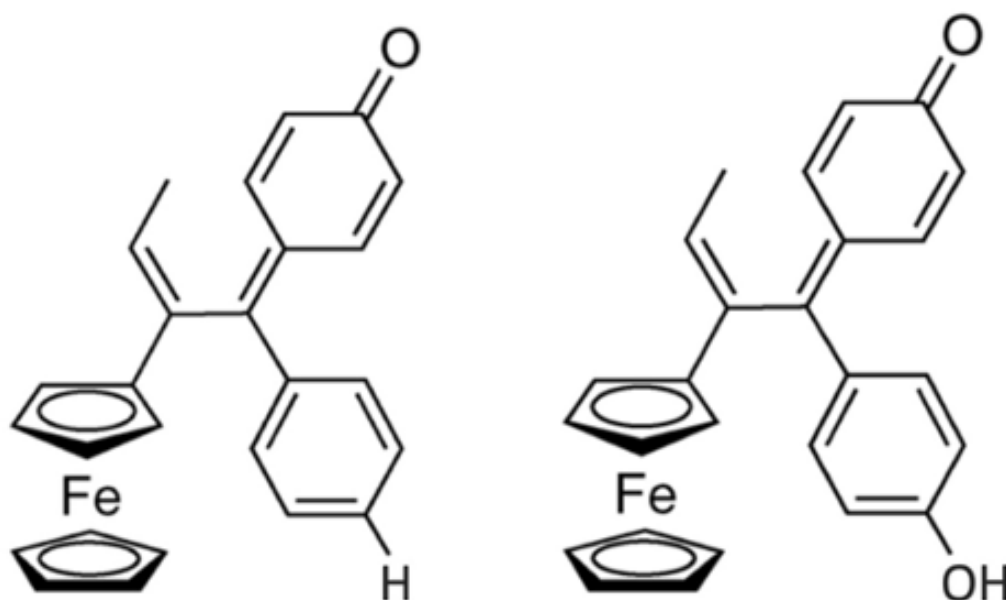


Figura 12 - Estrutura química dos metetos de quinona 2-QM e 3-QM, respectivamente (adaptado de ¹⁵⁴)

3.1.1.1.3 Ansa-ferrocifenos

Os complexos ansa-ferrocifenos são complexos em que os dois anéis ciclopentadienil estão ligados por uma cadeia alifática de comprimento variável⁶⁴⁻⁶⁶, a molécula mais citotóxica desta série é ansa-Fc-diOH, figura 13, complexo 4.

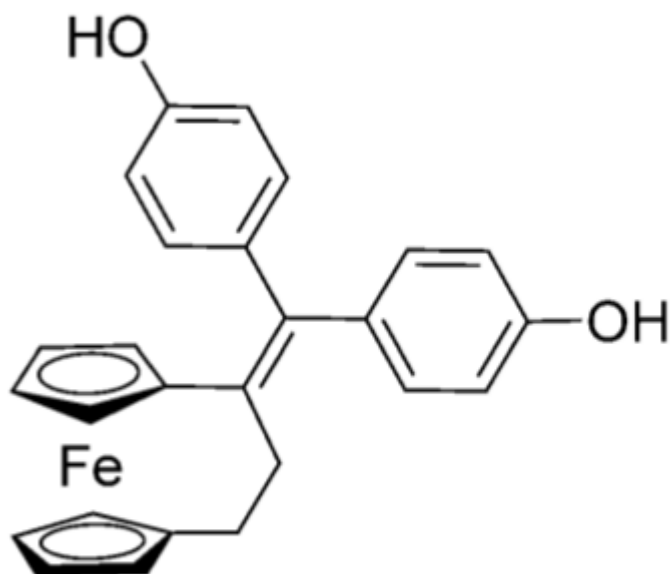


Figura 13 - Estrutura química do complexo ansa-Fc-diOH, complexo 4 (adaptado de ⁵³)

A sua toxicidade nas células MDA-MB-231 é muito alta ($IC_{50} = 0,089 \mu M$), ou seja, cerca de dez vezes maior do que o complexo 3, o complexo acíclico correspondente⁵⁸.

A análise realizada com o complexo 3 e 4, difenóis acíclicos e cíclicos na coleção do Instituto Nacional do Cancro (NIH NCI) de 60 linhas de células cancerosas, confirmaram a forte toxicidade desses complexos (valores médios de IC_{50} 0,52 e 0,18 μM , respetivamente).

Esses dois complexos são mais ativos em linhas de células cancerosas que são resistentes à apoptose e não têm efeito em células saudáveis.⁶⁷ Ao contrário da série acíclica, a oxidação química do complexo 4 pelo Ag_2O não permite a formação do meteto de quinona correspondente. No entanto, o radical orgânico [4-QM][•] (figura 14) foi observado por EPR durante a oxidação enzimática do complexo 4 pelo sistema HRP/ H_2O_2 .⁶⁸

A estabilização relativa deste último pode explicar a alta toxicidade do complexo 4. Metetos de quinona podem novamente ser formados por oxidação química quando a cadeia que liga os dois anéis é alongada, mas a toxicidade desses complexos é menor do que o complexo 4 ($IC_{50} = 1,85 \mu M$ para uma cadeia de cinco carbonos).⁶⁴

O estudo dos efeitos biológicos do complexo 4 mostra que, em doses baixas (50 nM), induz a senescência de células 9L, enquanto uma dose mais alta (0,5 μM) induz apoptose. Estudos *in vivo* realizados com LNCs revelam forte regressão de tumores de células 9L implantadas em ratos.⁶⁹

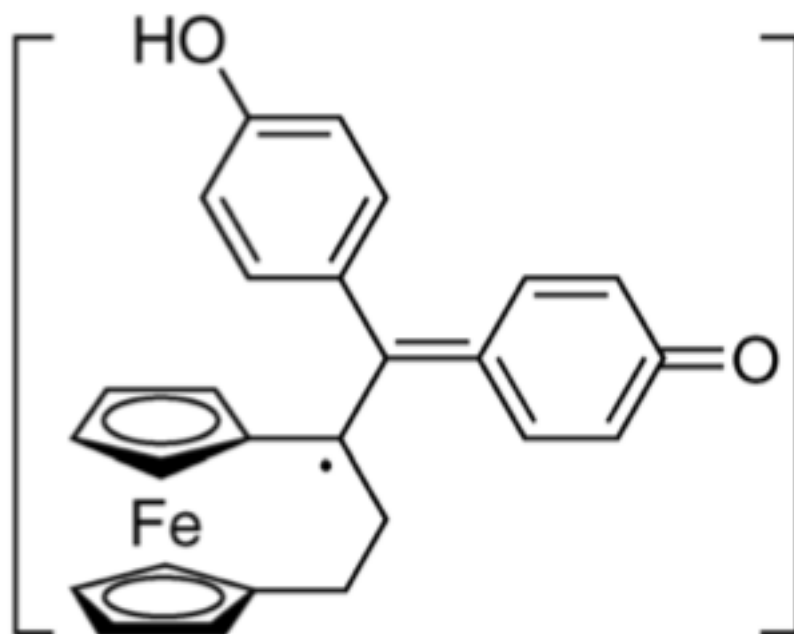


Figura 14 - Estrutura química do radical orgânico [4-QM]• (adaptado de ¹⁵⁴)

3.1.2 Complexos de Coordenação de Ferro (II) e Ferro (III)

Numa revisão recente, surgiram complexos inorgânicos de ferro (II) e ferro (III) sintetizados como agentes anticancerígenos (figura 15).³⁴

Os primeiros complexos nesta série (5 e 6) foram publicados em 2005 por Chi-Ming Che^{70,71}. São complexos de ferro (II) de ligandos doadores N pentadentados que se destinam a mimetizar os efeitos da bleomicina. Esses complexos têm alta citotoxicidade (IC₅₀ = 0,6–3,4 μM), induzindo apoptose das células, associada a danos ao ADN celular, paragem do ciclo celular, indução de vias de sinalização da proteína quinase ativada por mitógeno e proteína supressora de tumor p53.

Os complexos salofenos de ferro (II) e ferro (III) (7-9) foram preparados com o objetivo de mimetizar o mecanismo de ação da cisplatina.⁷²⁻⁷⁴ Os primeiros dois complexos (7 e 8) bloqueiam o crescimento de células tumorais sólidas (MCF-7, MDA-MB-231, HT-29), bem como de linfomas e leucemias. Eles libertam superóxido dismutase de Cu/Zn e induzem a apoptose.^{72,73}

O último complexo desta família, 9, é altamente citotóxico para células de cancro de ovário SKOV-3 ($IC_{50} = 300 \text{ nM}$)⁷⁴ e neuroblastoma⁷⁵, no qual induz apoptose das células, bloqueando-as na fase S do ciclo celular.

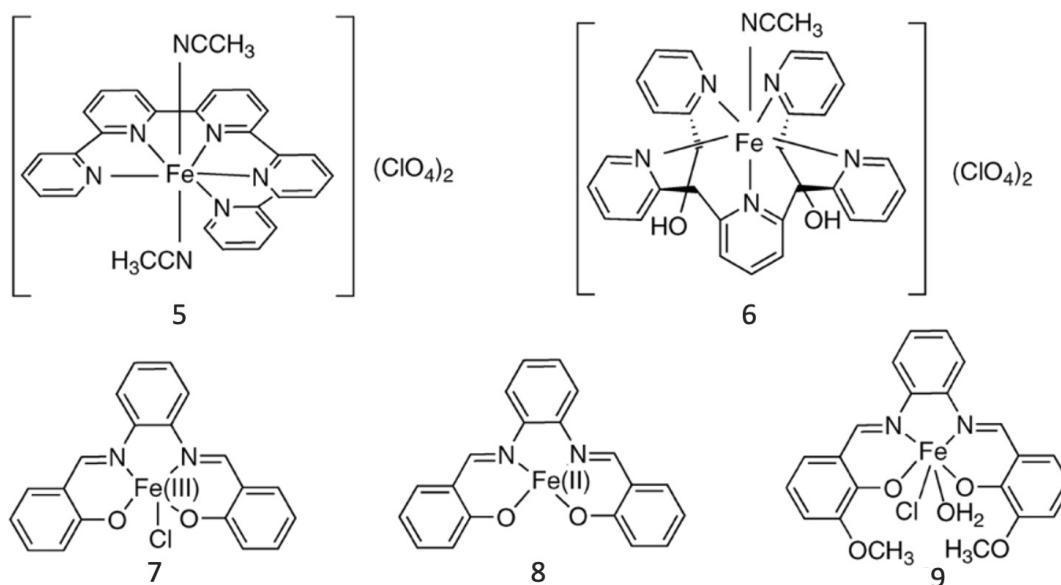


Figura 15 - Complexos de coordenação de ferro II e ferro III (adaptado de ³⁴)

3.1.3 Moléculas ativas por ação quelante com ferro

Todas as moléculas desta família possuem uma região de ligação ao metal, que se liga na célula ao ferro (II) ou ferro (III) para dar complexos citotóxicos.

3.1.3.1 Bleomicinas (BLMs)

O exemplo que melhor ilustra este tipo de moléculas são as bleomicinas, uma família de antibióticos glicopeptídicos descobertos em 1966 e isolados pela primeira vez de *Streptomyces verticillus*.³⁵ As bleomicinas são usadas em associação com outros fármacos no tratamento de vários tipos de cancro, como linfomas, tumores cerebrais e do pescoço e tumores de células germinativas. A sua estrutura química é representada na figura 16.

Os estudos do mecanismo de ação da bleomicina têm sido o assunto de muitas publicações e revisões.^{35,76-78} Existem indicações de que a bleomicina, administrada por via intravenosa na sua forma livre de metal, é rapidamente complexada no plasma sanguíneo pelo Cu^{II} . Este complexo é então introduzido na célula por transportadores adequados. Após a redução do Cu^{II} a Cu^I , este é trocado pelo ferro (II). Por ligação ao oxigénio molecular, forma-se o que pode ser designado como um complexo Fe(III) superóxido ($Fe(III)-(O_2)^{\cdot-}$). Este complexo com bleomicina pode agora ser reduzido por transferência eletrónica por parte de um

reductor celular, dando origem ao complexo de bleomicina ativado, como descrito nas figuras 17 e 18.

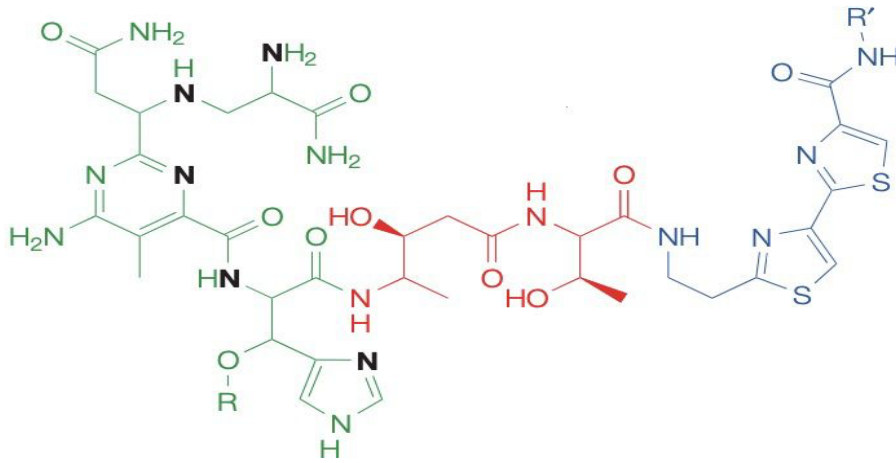


Figura 16 - Estrutura química da bleomicina (adaptado de ³⁵)

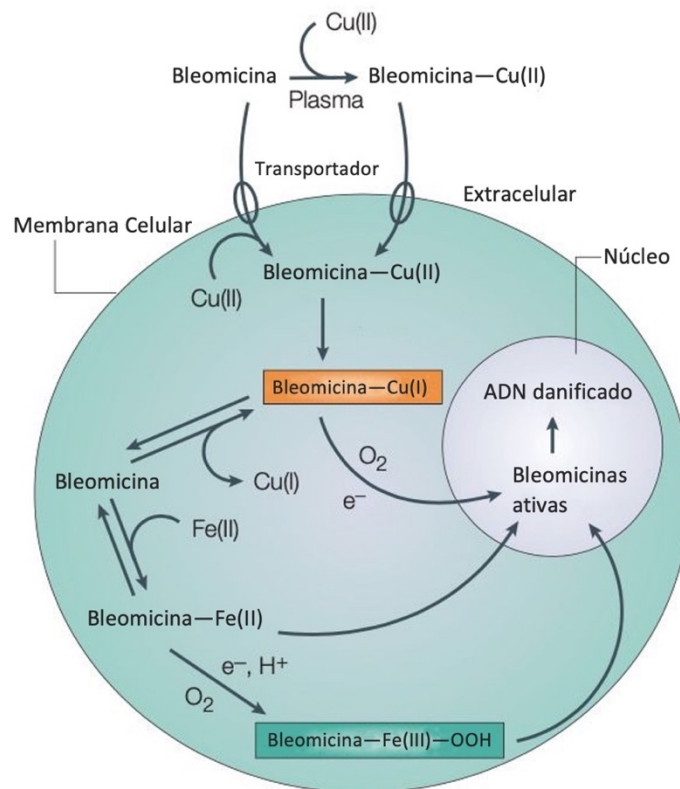


Figura 17 - Mecanismos de formação da "bleomicina ativada" in vivo (adaptado de ³⁵)

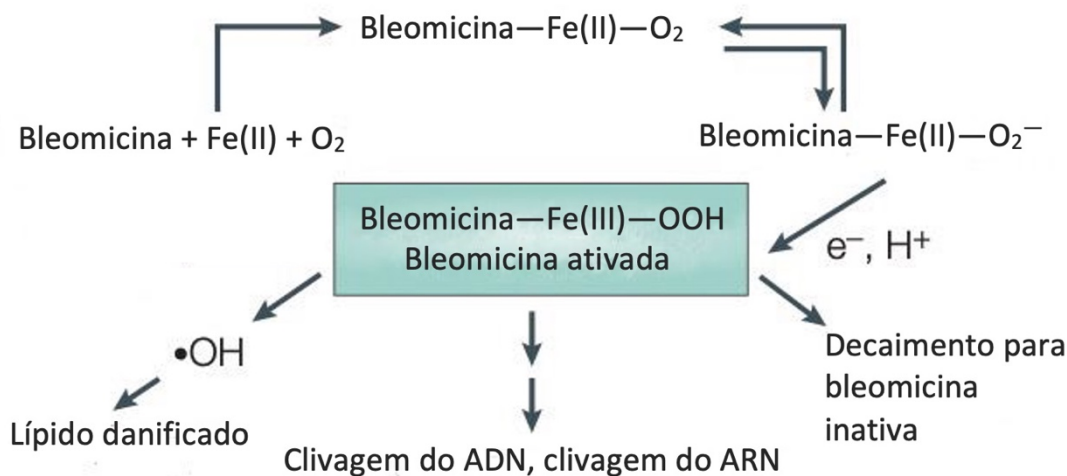


Figura 18 - Formação da "bleomicina ativada" e clivagem do ADN (adaptado de ³⁵)

Esse intermediário tem semi-vida de vários minutos a 4°C e é responsável por iniciar o dano ao ADN. O dano é semelhante ao gerado pela radiação ionizante. A formação de espécies radiculares altamente reativas levam à existência de danos em diversas estruturas, no entanto, é aceite que o principal alvo é o ADN. Para isto contribui a capacidade de intercalação do grupo ditiazole, levando a que o centro metálico fique localizado próximo da desoxirribose permitindo a quebra oxidativa (figura 19)⁷⁸.

A estrutura de raios-X desse intermediário, que tem semi-vida de apenas alguns minutos, nunca foi determinada. No entanto, a estrutura do complexo bleomicina/Cu^{II} foi descoberta, tornando possível visualizar a organização dos ligandos da bleomicina em torno do metal.³⁵

O papel desempenhado pelos outros catiões metálicos presentes nas células (Cu^{II}, Zn^{II}, Co^{II}) na toxicidade da bleomicina tem sido amplamente discutido. Isso levou à síntese de análogos sintéticos com domínios de ligação do metal às bleomicinas, o que tornou possível compreender melhor o seu mecanismo de ação em culturas de células e sistemas livres de células.^{79,80}

Este é o caso do ferro(II)-N₄-Py que foi particularmente bem estudado e permitiu demonstrar que, dentro das células, os metais dos outros complexos são substituídos pelo ferro (II). É, portanto, o complexo de ferro(II)-N₄-Py que parece ser a fonte do dano oxidativo nas células, independentemente do complexo de metal inicial (Mn^{II}, Cu^{II}, Zn^{II}) que foi originalmente adicionado ao meio de cultura celular.⁸¹

Osella e colegas de trabalho fizeram a observação interessante de que uma pré-incubação de 24 horas de células MCF-7 na presença de complexos derivados do ferroceno aumentou significativamente a citotoxicidade da bleomicina. Isso traduz-se numa percentagem de sobrevivência celular de 65% para incubação na presença de bleomicina sozinha e 13% após pré-incubação com o complexo derivado do ferroceno⁸². Este efeito sinérgico é devido à formação de catiões de ferro dentro da célula decorrente da degradação do complexo de ferro e confirma o papel desempenhado pelo ferro na citotoxicidade da bleomicina.

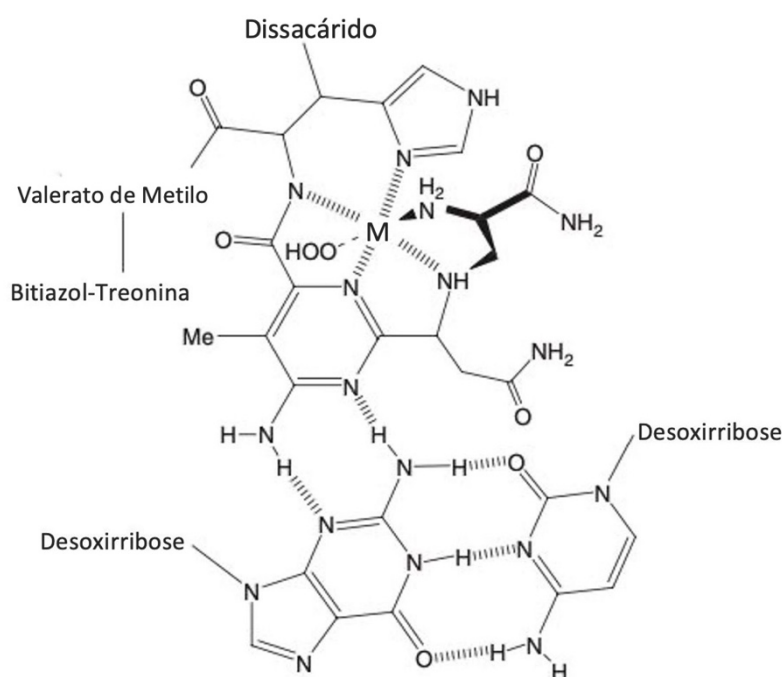


Figura 19 - Exemplo da interação proposta entre a região de ligação do metal-bleomicina e o ADN (adaptado de ⁷⁷)

3.1.3.2 Quelantes de Ferro

A família de moléculas quelantes de ferro foi inicialmente preparada para o tratamento de patologias associadas com o excesso de ferro, por exemplo na beta-talassemia⁸³.

Essas moléculas também têm efeitos anticancerígenos que foram objeto de muitos estudos *in vitro* e *in vivo*, conforme relatado num número de revisões.^{36,37,81,84} Uma leitura da literatura mostra que vários deles foram submetidos a numerosos ensaios clínicos, alguns apresentando resultados encorajadores.³⁷

Uma seleção de ligandos de interesse é mostrada na figura 20. Esses ligandos podem formar complexos de ferro octaédricos. Eles podem ser divididos em três categorias,

dependendo do número de átomos doadores no ligando (2, 3 ou 6) e dar origem a complexos bidentados, tridentados ou hexadentados com estequiometria 1:3, 1:2 e 1:1.

A primeira molécula dessa família a ser estudada foi a desferroxamina (DFO). A DFO é um sideróforo hexadentado natural da bactéria *Streptomyces pilosus*. Este quelante de ferro é considerado o padrão ouro para o tratamento do excesso de ferro em pacientes que sofrem de beta-talassemia, embora a necessidade de injeções intravenosas repetidas seja uma restrição. DFO é um ligando hexadentado que forma um complexo com ferro de estequiometria 1:1.

Muitos estudos têm demonstrado a sua atividade antiproliferativa contra uma ampla variedade de linhagens de células tumorais. Por exemplo, a DFO inibe, *in vitro* e *in vivo*, o crescimento de células de melanoma e hepatoma, bloqueando a sua proliferação na fase S do ciclo celular.³⁶

Esse complexo possui também efeitos antiproliferativos *in vitro* em células de neuroblastoma e leucemia.^{85,86} Ensaios clínicos realizados em pacientes com neuroblastoma com DFO isoladamente ou em combinação com outras moléculas anticancerígenas (carboplatina, etoposídeo, ciclofosfamida) produziram resultados contrastantes.³⁷ Um dos estudos realizado em 57 pacientes mostrou-se particularmente conclusivo (24 respostas completas, 26 respostas parciais, 3 respostas menores e 4 não respostas), enquanto o estudo em crianças foi negativo. O desenvolvimento clínico desta molécula tem sido limitado pela sua baixa biodisponibilidade e semi-vida plasmática curta (aproximadamente 12 minutos).

O deferasirox (DFX) é uma molécula sintética usada para tratar o excesso de ferro que tem as vantagens de ser administrado por via oral e ter poucos efeitos secundários. Essa molécula é citotóxica em células cancerígenas hepáticas (Huh-7), mas não em culturas de hepatócitos primários⁸⁷, levantando a perspectiva de uma especificidade de ação nas células cancerígenas.

O seu mecanismo de ação e consequente efeito antiproliferativo resultam da depleção do ferro, indução de ROS, inativação do fator nuclear oncogénico- κ B (NF- κ B) e modulação do metabolismo das poliaminas, moléculas essenciais, como o ferro, para a proliferação celular^{36,88}.

DFX também está ativo *in vivo* num modelo de rato de leucemia mieloide humana (células U-937).

A deferiprona (DFP), uma terceira molécula aprovada para o tratamento de talassemias, também tem um efeito antiproliferativo em células tumorais em cultura.⁸⁹ É um ligando bidentado da família da hidroxipiridona que forma complexos de ferro de estequiometrias de 3:1 em concentrado médio. No meio fisiológico, o último tende a desassociar-se em complexos

2:2 e 2:1. Essa coordenação incompleta do ferro favorece a produção de ROS e dá ao complexo alta toxicidade, atuando como um pró-oxidante ou anti-oxidante protetor³⁶. No entanto, está atualmente em ensaios clínicos para o tratamento da doença de *Parkinson*.⁹⁰

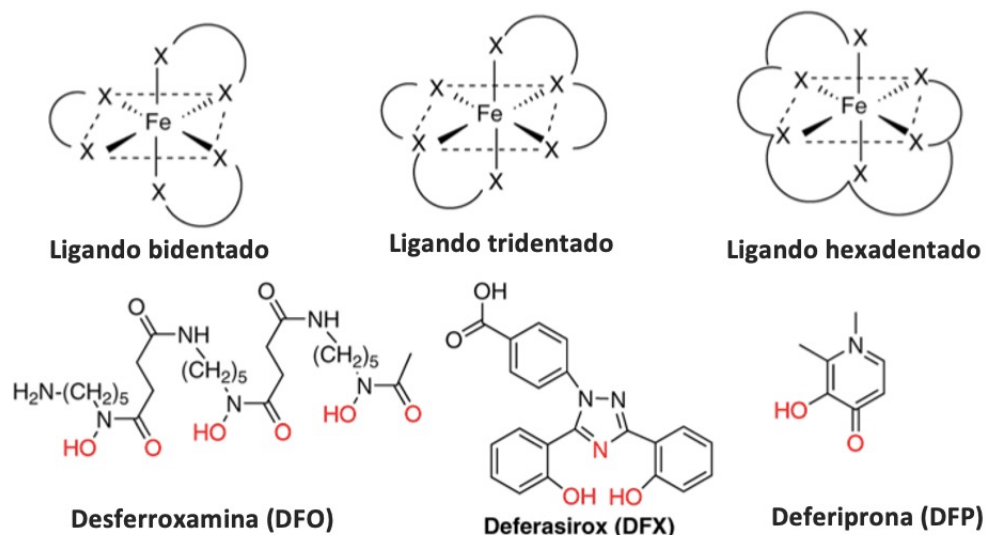


Figura 20 - Estrutura química dos quelantes de ferro (adaptado de ³⁶)

3.2 Rutênio e Ósmio

3.2.1 Diversidade estrutural

A diversidade molecular oferecida pelos complexos de Ru e Os é vasta, o que lhes permite um amplo espectro de fármacos candidatos a ensaios clínicos. Em geral, as atividades biológicas dos complexos dependem da natureza do centro metálico, além do seu estado de oxidação, número de coordenação e geometria, e o ajuste da sua atividade biológica pode ser alcançado por pequenas variações nos ligandos. Juntas, estas características influenciam a reatividade dos complexos, bem como a cinética e a termodinâmica da substituição dos ligandos, que são cruciais para a atividade antiproliferativa.

As propriedades de substituição dos ligandos foram a razão para o desenvolvimento original dos complexos de Ru, pois eles são altamente semelhantes aos dos complexos de Pt. Outras vantagens também incluem uma geometria octaédrica, que permite uma gama mais ampla de mecanismos de reação envolvendo o centro metálico, uma gama mais variada de estados de oxidação acessíveis dentro de condições biologicamente relevantes e a capacidade de Ru para imitar o Fe em processos de ligação a proteínas.⁹¹

3.2.2 Complexos de coordenação octaédricos

O complexo octaédrico $\text{fac-}[\text{Ru}(\text{NH}_3)_3\text{Cl}_3]$, relatado por Clarke em 1980, foi um dos primeiros complexos de Ru a ser estudado como agente anticancerígeno após observações de que o complexo tinha a capacidade de inibir a divisão de *Escherichia coli*.⁹² No entanto, só em 1989 foi registado o primeiro avanço significativo nesta área, quando Keppler e colaboradores relataram o KP1019.⁹³ Este complexo de fórmula molecular $\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{Ind})_2]\text{IndH}$, onde Ind = indazol, é isoeletrónico como o complexo de Clarke, mas reduz as suas limitações em relação à estabilidade química sob condições biologicamente relevantes.

A segunda descoberta veio na forma do NAMI-A, de fórmula molecular $\text{trans-}[\text{RuCl}_4(\text{DMSO})(\text{Im})]\text{ImH}$, onde Im = imidazol, que foi sintetizado pelos grupos de Alessio e Sava.^{94,95}

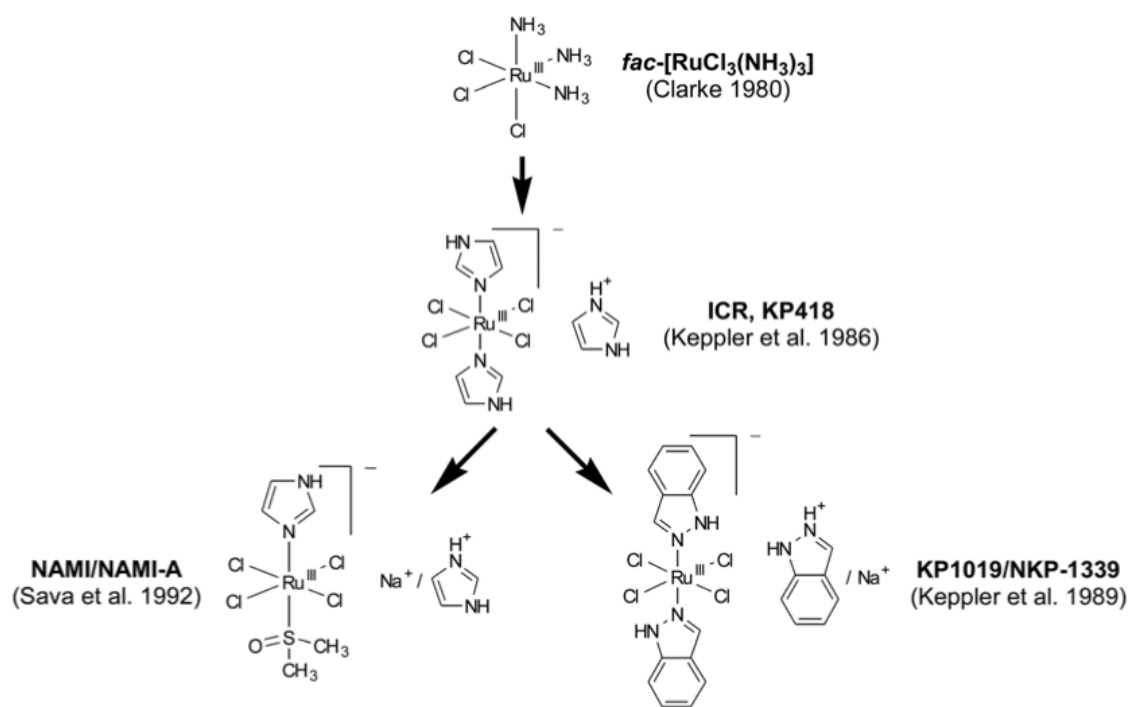


Figura 21 - Genealogia de complexos de ruténio anticancerígenos referentes à primeira evidência publicada para a atividade terapêutica dos compostos num modelo de tumor *in vivo* (adaptado de ⁹⁶)

3.2.2.1 Mecanismos de ação

Conforme mencionado anteriormente, dois complexos principais Ru (III) entraram em ensaios clínicos, o KP1019 e o NAMI-A. Embora estes dois complexos tenham grandes semelhanças estruturais no que diz respeito ao estado de oxidação, número de coordenação e geometria, eles exibem propriedades biológicas muito diferentes.

O NAMI-A tem sido considerado como tendo potencialidades para controlar a metástase tumoral, enquanto o KP1019 e seu sal de sódio NKP1339 são ambos ativos para tumores primários. Acredita-se que os centros de rutênio (III) sejam ativados por redução intracelular em rutênio (II) por reação com ácido ascórbico ou GSH. No entanto, as semelhanças no destino celular desses complexos terminam aí.

Não há evidências que sugiram que KP1019 ou NKP1339 tenham o ADN como seu alvo celular, e é aceite que seu mecanismo de ação está intimamente ligado a alterações no estado *redox* celular. Em particular, por causar dano às proteínas e *stress* no retículo endoplasmático (RE), o que leva ao bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e apoptose.^{96,97}

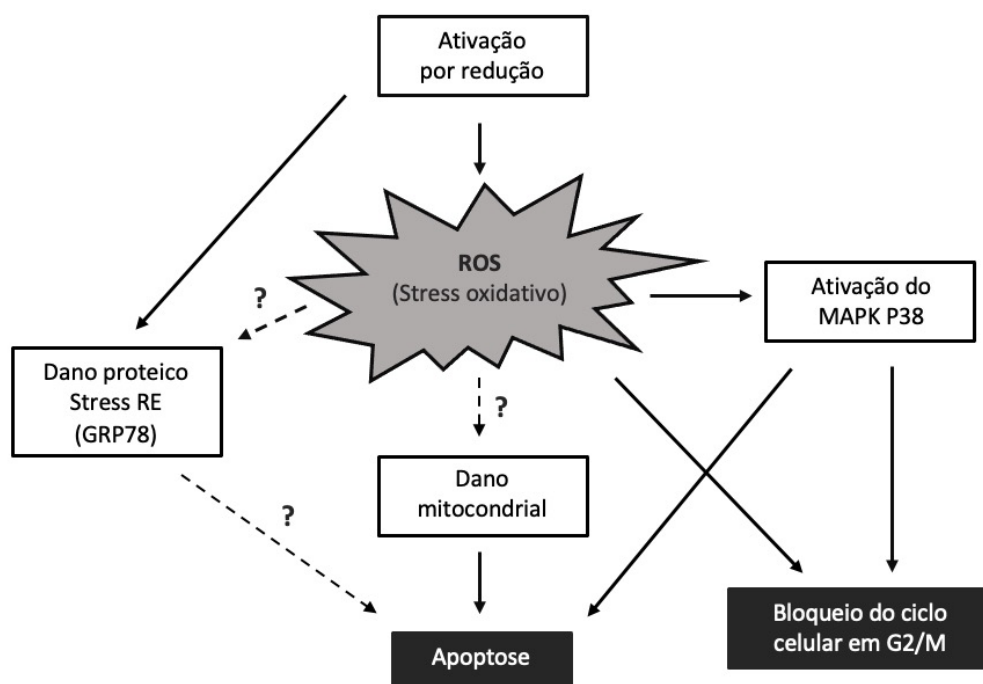


Figura 22 - Mecanismos de ação subjacentes à atividade anticancerígena de KP1019 e NKP1339 (adaptado de ⁹⁶)

Por sua vez, o NAMI-A pode inibir a angiogénese induzida pelo fator de crescimento endotelial vascular. Além disso, acredita-se que este complexo interaja com proteínas do tipo actina na superfície celular, o que leva à mobilidade reduzida de células cancerosas invasivas e, portanto, à atividade anticancerígena observada.^{94,98,99}

Tal contraste no mecanismo de ação de complexos de rutênio (III) altamente relacionados quimicamente mostra a ampla diversidade de eventos celulares que podem ser ativados por pequenas mudanças estruturais.

Portanto, a pesquisa na base celular do mecanismo de ação dos complexos de Ru e Os é de grande relevância no desenvolvimento de candidatos a fármacos com potencial. Embora esforços intensos tenham sido direcionados para compreender a relação estrutura-atividade de tais complexos, a extrapolação das regras gerais nem sempre é direta.

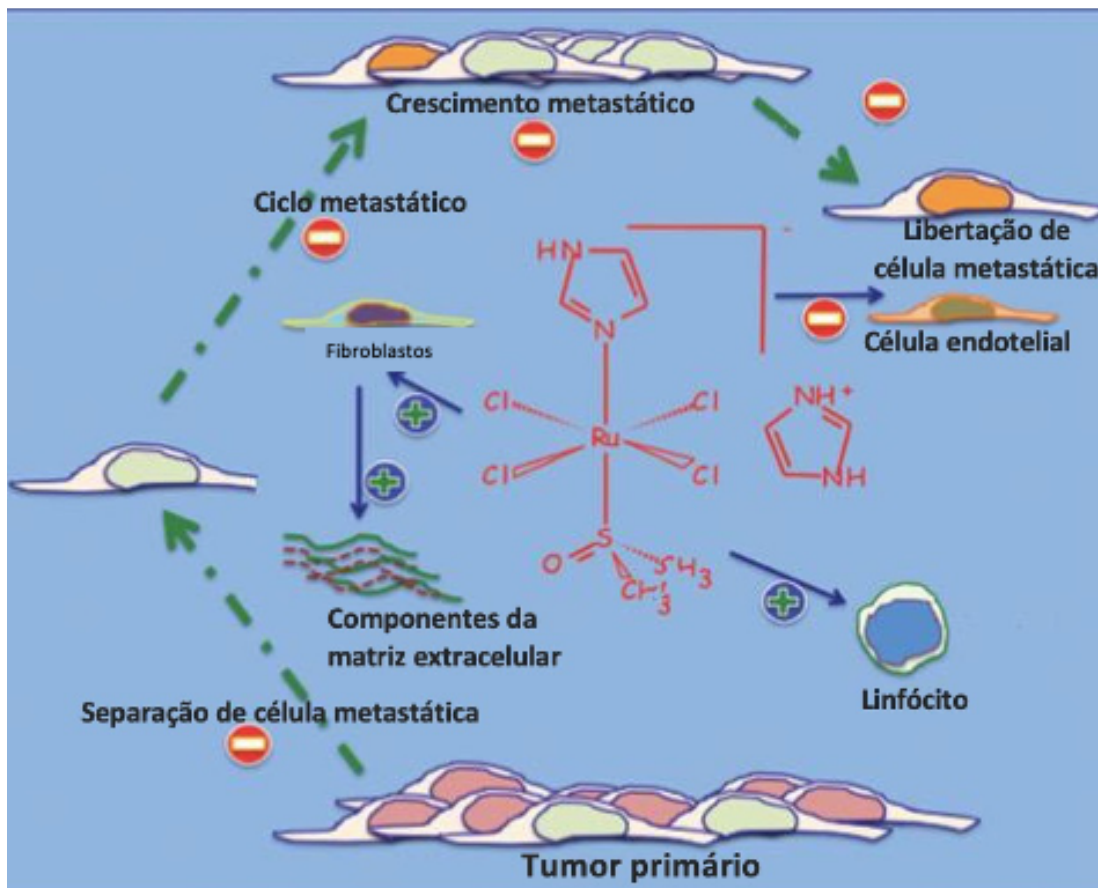


Figura 23 - Efeitos do NAMI-A nos componentes do microambiente tumoral e na atividade antimetastática (adaptado de⁹⁹)

3.2.2.2 Ensaios clínicos

O NAMI-A foi introduzido num estudo de fase I em 1999, foi o primeiro candidato a um medicamento de rutênio a ser testado em humanos⁹⁵. O estudo compreendeu 12 níveis de dose (2,4–500 mg/m²/dia). Vinte e quatro pacientes adultos, com diferentes tipos de tumores sólidos, foram perfundidos com NAMI-A (3h) por cinco dias consecutivos a cada três semanas. O perfil de toxicidade do NAMI-A era bastante diferente dos medicamentos anticancerígenos de platina: a toxicidade renal leve, observada nas doses mais altas, era completamente reversível, enquanto a toxicidade hematológica era desprezível. Doses ≥ 400 mg/m²/dia resultaram em bolhas dolorosas nos dedos das mãos e dos pés, que eram limitantes da dose. Na dose máxima tolerada (DMT) de 300 mg/m²/dia, foram observados mal-estar geral leve a

moderado, mas tratável, náuseas, vômitos e diarreia.⁴ A retenção corporal total de rutênio foi mais longa do que o esperado nos estudos pré-clínicos, devido à extensa ligação às proteínas do sangue. Nenhuma resposta parcial ou completa foi obtida, mas a estabilização da doença (até 21 semanas) foi observada em pacientes fortemente pré-tratados com cancro de pulmão de células não pequenas (CPCNP) avançado. No entanto, deve-se notar que a eficácia não é o objetivo principal de um estudo de fase I e que a maioria dos doentes geralmente tem uma doença progressiva refratária à terapia e recebeu várias linhas de tratamento antes do recrutamento. Em virtude deste resultado e da atividade mostrada por NAMI-A contra metástases pulmonares em modelos de rato, e em analogia com os regimes de gencitabina + cisplatina amplamente usados para o tratamento de primeira linha de CPCNP¹⁰⁰, este cancro foi selecionado como a doença alvo para um estudo de combinação de fase I/II de NAMI-A + gencitabina. O estudo (2008–2011) foi realizado em 32 pacientes com CPCNP avançado¹⁰¹. Na fase I do estudo, a gencitabina foi administrada na dose típica de 1g/m², enquanto o NAMI-A teve aumento da dose ao longo de um ciclo de três semanas, foi administrado por via IV, numa perfusão de 3h nos dias 1 e 8 de cada semana. Neutropenia e anemia de grau 2-4 CTC (critérios de terminologia comuns) foram observadas nas doses mais altas, enquanto as bolhas já mencionadas (toxicidade limitante da dose) apareceram em 600 mg/m². A DMT encontrada foi de 450 mg/m², onde os principais eventos adversos não hematológicos foram elevação das enzimas hepáticas, elevação transitória da creatinina, toxicidade renal, constipação e fadiga. Na fase II do estudo, a atividade antitumoral de acordo com os critérios RECIST (critérios de avaliação de resposta em tumores sólidos) para tumores sólidos¹⁰² foi avaliada em 15 pacientes com CPCNP tratados com o DMT de NAMI-A. Uma expansão adicional do grupo de fase II com pacientes adicionais não foi encontrada porque a eficácia do tratamento acabou por ser menor do que a esperada para a gencitabina sozinha (um caso de remissão parcial e 10 pacientes com doença estável por pelo menos seis a oito semanas). Além disso, os pacientes acharam o tratamento combinado muito exaustivo, principalmente por causa das náuseas, vômitos e diarreia bastante graves. Em conclusão, o tratamento foi declarado ser “Insuficientemente eficaz para uso posterior”¹⁰¹.

Em 2006, um estudo preliminar de escalonamento de dose de fase I foi realizado com KP1019 (doses totais de 25 a 600 mg) em apenas oito pacientes com tumores sólidos avançados^{93,103}. O complexo, administrado via IV duas vezes por semana durante três semanas, foi bem tolerado na faixa de dose investigada e apenas foi observada toxicidade leve. A estabilização da doença por oito a dez semanas, não relacionada com a dose, foi observada em cinco de seis pacientes avaliáveis. Neste estudo, a DMT de KP1019 não pôde ser determinada

devido à solubilidade insuficiente (volume muito grande de solução de infusão necessário para escalonamento de dose adicional) e, portanto, um estudo de fase I em escala real foi realizado posteriormente em 34 pacientes com o mais solúvel derivado de sódio Na[trans-RuCl₄(Ind)₂] (NKP-1339). A investigação compreendeu nove níveis de dose (20–780 mg/m²/dia) e o complexo foi administrado por via IV nos dias 1, 8 e 15 em um ciclo de 28 dias⁹⁶. Apenas efeitos adversos menores foram observados. Náusea de grau 2–3 juntamente com níveis aumentados de creatinina foram considerados DLT (toxicidade limitante da dose) na dose mais alta. Doença estável (SD), até 88 semanas, foi encontrada em sete pacientes com diferentes tipos de tumores (incluindo dois casos de CPCNP), e um paciente com tumor neuroendócrino teve uma resposta parcial (PR). Mais recentemente, a investigação clínica fase I foi repetida em 46 pacientes, com os mesmos níveis de dose e esquema de tratamento, por Burris et al. nos Estados Unidos da América (EUA)^{104,105}. A DMT foi estabelecida em 625 mg/m². Além disso, o perfil de tolerabilidade e segurança foi semelhante ao estabelecido anteriormente: nenhuma toxicidade hematológica ou neurotoxicidade significativa foi encontrada, os principais eventos adversos sendo clinicamente controláveis de grau ≤2 náuseas, fadiga e vômitos. No geral, o complexo mostrou uma atividade antitumoral moderada, com taxa de controle da doença de 26% - que, curiosamente, envolveu três dos cinco pacientes com tumores neuroendócrinos carcinoides - e uma resposta parcial em um paciente com cancro de cólon.⁹⁵

3.2.3 Complexos Areno Organometálicos de geometria ‘*Piano-stool*’

Os complexos organometálicos com geometria *piano-stool*, que incluem na sua estrutura um areno, foram originalmente relatados por Tocher em 1992 e posteriormente desenvolvidos pelos grupos de Sadler e Dyson.¹⁰⁶ Esses complexos de rutênio foram inicialmente projetados para incluir um ligando monodentado de cloro (Cl) como um local de ativação que, como a cisplatina, se hidrolisaria antes da ligação ao ADN.

Atualmente, esses complexos são de grande interesse no campo bioinorgânico devido à flexibilidade química da sua estrutura, e o seu potencial é reconhecido além das interações com o ADN. Com base em cinco blocos de construção principais e na fórmula geral [(areno)M(X)(Y)(Z)]ⁿ⁺, há um número quase ilimitado de complexos. Nos casos de interesse desta dissertação, M representa íons d⁶ de rutênio (II) e ósmio (II). A unidade areno é usada para ajustar as propriedades lipofílicas do complexo e o ligando X monodentado funciona como um local de ativação. Curiosamente, os ligandos Y e Z podem ser monodentados ou estruturalmente ligados para oferecer um ligando bidentado Y – Z.¹⁰⁷ Em ambos os casos, esses ligandos permitem a modificação dos parâmetros termodinâmicos e cinéticos da ativação da

ligação M – X. A atividade biológica e o potencial para o desenvolvimento de fármacos de tais complexos resultam de uma relação intrínseca entre todos esses blocos de construção.

3.2.3.1 Unidade Areno

As unidades de areno frequentemente usadas incluem p-cimeno e bifenil em complexos de rutênio (II) e ósmio (II). A relação entre esta unidade estrutural e a solubilidade em água dos complexos está bem estabelecida. No entanto, a sua influência no comportamento biológico e na atividade anticancerígena ainda está em discussão.¹⁰⁸

Em princípio, os complexos lipofílicos, obtidos por extensão da unidade areno, devem ser capazes de se acumular nos compartimentos intracelulares e, se a concentração estiver diretamente relacionada com atividade biológica, então esses três parâmetros (lipofilia, acumulação e atividade) devem se correlacionar linearmente.

Portanto, é de esperar que, por exemplo, um complexo bifenil de rutênio (II) seja mais potente do que seu análogo p-cimeno, contando que todas as outras unidades estruturais permaneçam inalteradas.

3.2.3.2 Ligando monodentado X

Embora o impacto da unidade areno e a natureza dos ligandos Y e Z tenham sido amplamente investigados, as repercussões das modificações do ligando monodentado X ainda estão no início. De acordo com o conceito do *design* original, o ligando monodentado X só era relevante devido à sua capacidade de gerar um derivado -aqua- ou -hidroxo-. Estas espécies poderiam então facilitar a ligação do complexo ao ADN. No entanto, uma compreensão mais profunda dos diversos mecanismos de ação desses complexos revelou que a inclusão de um ligando monodentado X hidrolisável não é um requisito indispensável.¹⁰⁹

No caso dos complexos de rutênio (II), as variações no ligando monodentado incluem: halogênios, acetonitrilo¹¹⁰, derivados de açúcar ligados a P¹¹¹ e carbenos^{112,113}, bem como derivados em que o ligando monodentado X é realmente um braço de extensão da unidade areno^{114,115}. A troca do ligando X em complexos de ósmio (II) tem sido menos estudada até agora. No entanto, é possível traçar semelhanças no comportamento dos complexos de Ru e Os.

3.2.3.3 Ligandos Y e Z

Variações nos átomos doadores dos ligandos Y e Z e, em geral, nas suas propriedades eletrônicas têm uma forte repercussão na ligação M–X e na hidrólise do complexo.¹¹⁶

Um complexo altamente estudado de rutênio (II) *'piano-stool'* contendo dois ligandos Y e Z monodentados independentes é o RAPTA-C desenvolvido pelo grupo de Dyson. Este complexo contém dois átomos de Cl e uma unidade de 1,3,5-triaza-7-fosfadamantano (PTA) ligada a P como o terceiro ligando monodentado, que é altamente relevante para alcançar a solubilidade em água. A estrutura básica deste complexo tem sido investigada sistematicamente resultando em complexos altamente ativos como RAPTA-B e RAPTA-T. No primeiro, a unidade areno é um benzeno e no último é um tolueno. Outros relatórios incluem *'piano-stools'* que mantêm a porção PTA constante e mudam Y e Z como ligandos monodentados ou bidentados.¹¹⁷

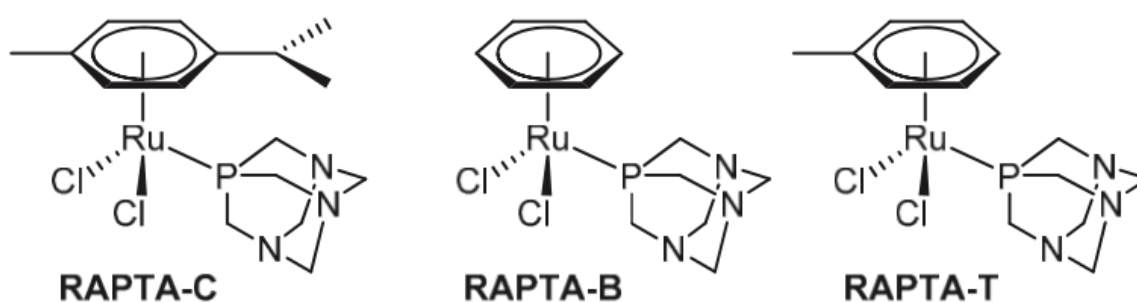


Figura 24 - Primeiros compostos RAPTA que apresentaram atividade anticancerígena promissora (adaptado de ¹¹⁷)

Provavelmente, o mais conhecido complexo de rutênio (II) *'piano-stool'* que envolve um ligando quelante Y – Z é o RM175, desenvolvido pelo grupo de Sadler.¹¹⁸ Este complexo, que progrediu para os ensaios pré-clínicos, exibiu grande atividade contra carcinomas mamários em particular. Levando em consideração tal potencial, um derivado semelhante foi sintetizado usando ósmio (II) como o centro metálico que se mostrou inativo.¹¹⁹ Esta observação pode ser justificada levando em consideração que o mecanismo de ação do RM175 é baseado em interações com o ADN após a hidrólise e nas diferenças marcantes na cinética de ambos os derivados. Essas diferenças nas reações de troca de ligandos também foram observadas noutras séries de complexos de areno.¹²⁰

3.2.3.4 ADN como um alvo

Como mencionado anteriormente, os complexos de geometria *'piano-stool'* foram originalmente projetados para ter um comportamento celular semelhante ao da cisplatina. O ligando monodentado permitiria a ativação da hidrólise antes da ligação ao ADN e uma unidade de areno estendida forneceria um local adicional para a intercalação de dupla hélice.

Portanto, os primeiros estudos foram maioritariamente focados nas interações com o ADN e, embora esta área de investigação tenha avançado para incluir outros alvos celulares e a investigação se tenha diversificado numa variedade de mecanismos de ação, a interação com o ADN ainda é um objetivo atraente.

Um excelente exemplo de tais complexos é o RM175. Este complexo sofre ativação por hidrólise, seguida pela formação de um derivado -aqua ou -hidroxo, e então liga-se seletivamente ao N7 da guanina, bem como intercalando no sulco menor da dupla hélice, dada a unidade areno estendida (figura 25). Essas interações de ADN foram extensivamente investigadas pelos grupos de Sadler e Brabec.¹¹⁰

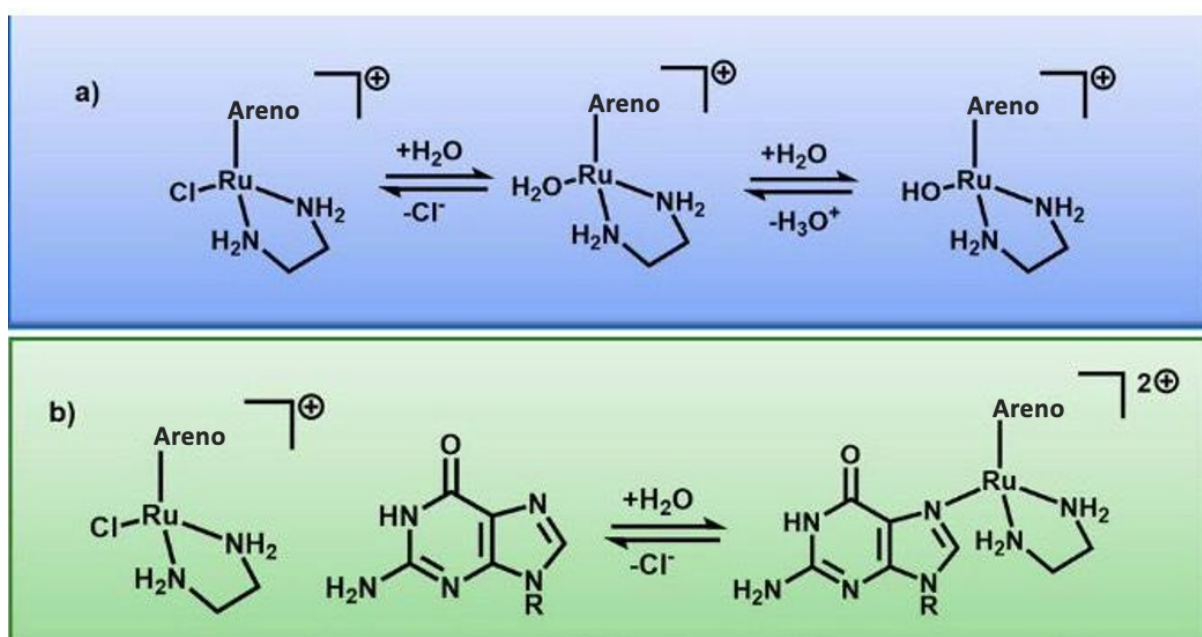


Figura 25 - Ativação do complexo RM175: a) hidrólise; b) ligação ao N7 da guanina (adaptado de ¹⁵⁴)

3.2.4 Modulação *redox* e direcionamento mitocondrial

Outro alvo altamente relevante para complexos à base de metal, com atividade antineoplásica, são as mitocôndrias nas células cancerígenas. Embora não representem um alvo clássico ou longamente estudado na investigação envolvendo metais na área médica, as mitocôndrias estão a ganhar reconhecimento nesta área e os desenvolvimentos recentes são altamente promissores. O ressurgimento do efeito *Warburg*, um fenómeno conhecido pelo aumento da glicólise aeróbica em células tumorais, em aspetos da investigação do cancro^{121,122} e a seletividade celular, despertaram um interesse significativo no desenvolvimento de

complexos que podem explorar a disfunção mitocondrial, tirando vantagem das propriedades *redox* não apenas dos centros metálicos, mas dos complexos como um todo.¹²³

Está bem estabelecido que os fármacos de Pt, atualmente em uso clínico, têm como alvo o ADN (embora possam também ter efeito noutras estruturas e processos biológicos²). O seu meio mais proeminente de seletividade é a rápida taxa de duplicação das células tumorais, que, como consequência, tem efeitos colaterais pronunciados noutras células de proliferação rápida.¹²⁴

O direcionamento às mitocôndrias oferece a possibilidade de minimizar essa desvantagem. As mitocôndrias nas células cancerígenas, como a máquina responsável por acompanhar as altas demandas de energia da rápida proliferação, são altamente suscetíveis às alterações *redox*. Tais mudanças, mesmo pequenas, colocam uma carga excessiva num organelo que é, na maioria dos casos de cancro, defeituoso e já se depara com níveis elevados de ROS.¹²⁵

Portanto, projetando um complexo à base de metal que pode maximizar o desequilíbrio *redox* permite, em princípio, a rutura direcionada do metabolismo das células cancerígenas, evitando no entanto danos nas células saudáveis.¹²⁶ Esta estratégia tira proveito da disfunção mitocondrial, um evento que ocorre frequentemente em células cancerígenas que pode envolver *stress* oncogénico, ADN mitocondrial, mutações e hiperatividade *redox*.^{127,128}

Esse desequilíbrio *redox*, e a manipulação dos níveis de ROS em geral,^{123,129} pode ser alcançado por vários meios, tais como gerar diretamente um excesso de ROS, diminuir os níveis de moléculas controladoras de ROS como a GSH ou mesmo perturbar equilíbrios delicados como NAD(P)⁺/NAD(P)H, GSH/GSSG ou piruvato/lactato, entre outros.¹³⁰ Ainda mais recompensador seria o desenvolvimento de um agente com vários alvos que pudesse modificar vários aspetos desse equilíbrio *redox* celular.¹³¹ Tal estratégia reduziria as possibilidades de desenvolvimento de resistência em ambiente clínico.

Sadler e colaboradores foram os pioneiros desta investigação, começando com o desenvolvimento de complexos de ruténio (II) (figura 26), que poderiam catalisar a dimerização de GSH e não tinham ADN como seu alvo celular.¹³²

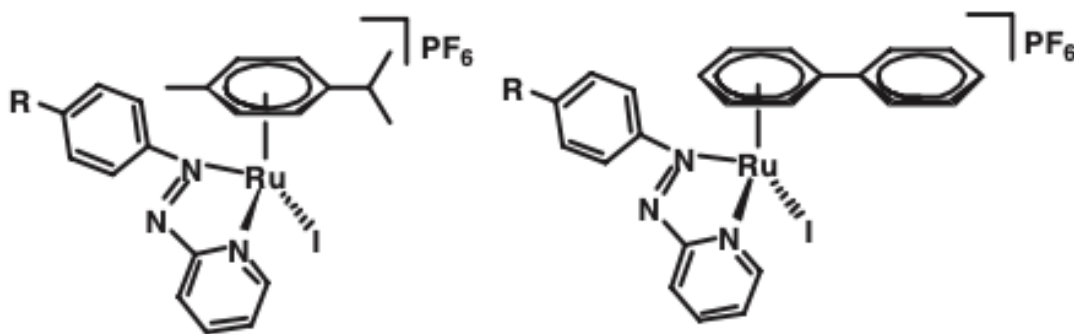


Figura 26 - Complexos de rutênio (II) sintetizados por Sadler (adaptado de ¹³²)

Esta investigação foi expandida para incluir estruturas análogas contendo centros metálicos de ósmio (II) que são de particular interesse. Estes compostos são mais ativos *in vitro* do que a cisplatina e oxaliplatina em câncros colorretais HCT116 e são igualmente potentes em linhas de células resistentes à platina e deficientes em proteína supressora de tumor p53.^{133,134} Eles também são mais seletivos do que os medicamentos à base de Pt para as células cancerígenas dos fibroblastos pulmonares normais e células epiteliais da mama, sugerindo uma potencial redução na toxicidade fora do alvo.¹³⁵ Esses resultados positivos levaram a estudos adicionais, particularmente com base no composto principal FY26¹³⁶ [(p-cimeno)Os(NMe₂-azpy)I]PF₆.

O complexo FY26 (figura 27) contendo um ligando iodeto, não se hidrolisa imediatamente, ao contrário do seu análogo com um ligando cloreto. Além disso, é estável em solução salina tamponada com fosfato e soro sanguíneo.

No entanto, a exposição das células cancerígenas MCF-7 ao complexo leva a um rápido efluxo de iodo. Essa observação foi feita após a síntese de um derivado radiomarcado de ¹³¹I e investigações da sua acumulação celular, com monitorização independente de Os/I.

O efluxo do ligando monodentado X, enquanto o centro metálico permaneceu em compartimentos intracelulares, indicou que o complexo foi ativado ao entrar nas células cancerígenas. Investigações mais profundas revelaram que o complexo de ósmio (II) pode formar derivados de hidróxido (X = -OH) após a ativação por GSH intracelular e, subsequentemente, gerar adutos de tiolato e sulfenato.

Foi comprovado que essas reações - num tubo de ensaio - produzem espécies radiculares que são consistentes com observações de ROS geradas *in vitro*.¹³⁷ Uma vez no espaço intracelular, o complexo FY26 localiza-se preferencialmente na mitocôndria¹³⁸ permitindo um

mecanismo de ação que está altamente relacionado com a perturbação da função mitocondrial e pode explorar mutações presentes em células cancerígenas.



Figura 27 - Estrutura química do complexo FY26 (adaptado de ¹³⁶)

Portanto, o mecanismo de ação proposto para este complexo é baseado na indução de ROS, mais particularmente numa explosão de superóxido. Em condições semelhantes, os fibroblastos MRC5 não geram níveis de ROS relevantes e a baixa indução de *stress* oxidativo observada é rapidamente equilibrada pelos fibroblastos - o que pode sustentar a seletividade do complexo de ósmio. A atividade *in vivo* também é muito promissora. Uma única injeção de FY26 em ratos a 0,25x ou 1x da sua dose máxima tolerada induziu um atraso estatisticamente significativo no crescimento do tumor em modelos de xenoinxerto HCT116, com o último a apresentar um tempo médio de duplicação do tumor por dia de 6,2, em comparação com 6,4 para a cisplatina e 3,9 para o controlo não tratado. Alcançar eficácia semelhante à cisplatina é um resultado impressionante para um único bólus IV de um medicamento não otimizado e, com base nesses dados, prevê-se que a dosagem repetida de medicamentos de ósmio durante um período de tempo, ou seja, semelhante a um regime de quimioterapia, teria um efeito antitumoral significativo e duradouro.¹³⁹

O FY26 também foi usado para demonstrar que é possível usar abordagens de biologia de sistemas de ponta para investigar o mecanismo de ação de complexos baseados em metal.

Esta comunicação resulta do primeiro estudo em que o sequenciamento de ARN de células inteiras foi usado para estabelecer uma visão geral dependente do tempo da resposta genética de células de cancro de ovário a um agente quimioterápico de ósmio.¹⁴⁰ Estudos transcritômicos e proteômicos sugerem um ataque à glicólise que muda a produção de energia para a fosforilação oxidativa.

Também demonstra a relação crucial entre uma explosão de superóxido celular e a potência dos complexos metálicos. Em particular, o complexo FY26 é altamente lipofílico e positivamente carregado, daí o seu potencial para se acumular na mitocôndria.¹³⁸ Os estudos de sequenciamento de ARN destacaram que a via de resposta ao *stress* oxidativo do NRF2 é ativada dentro de 4h após a exposição ao fármaco (figura 29).

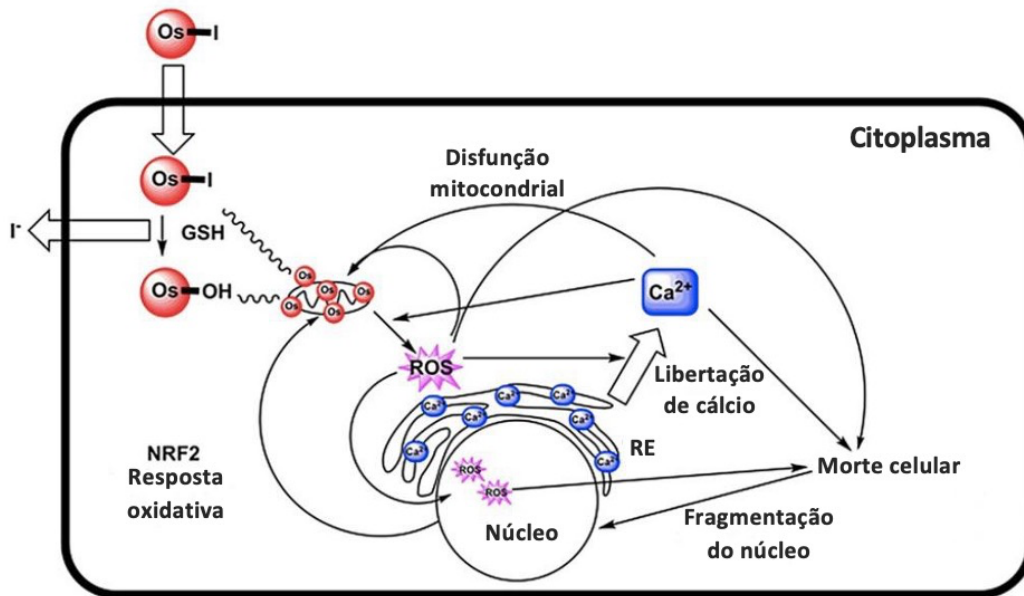


Figura 28 - Possíveis vias de ativação do complexo FY26 e consequente disfunção mitocondrial, produção de ROS e morte celular (adaptado de ¹³⁸)

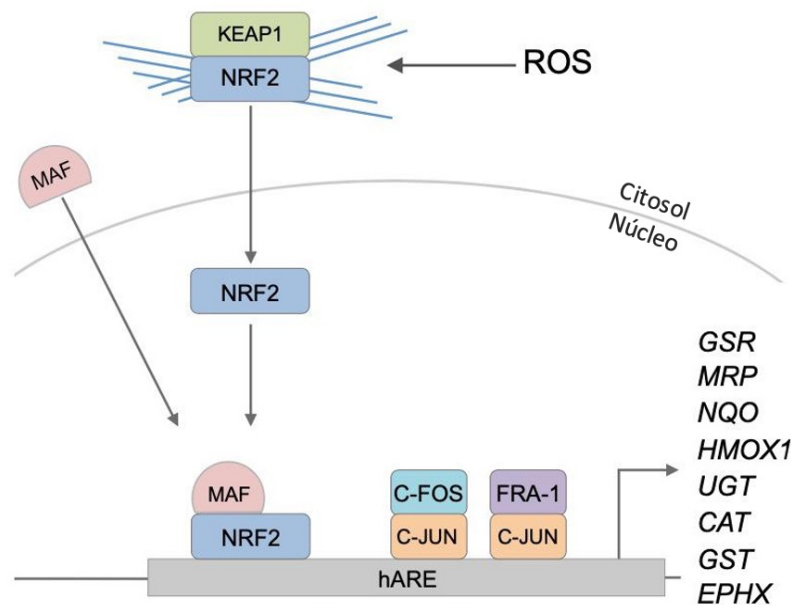


Figura 29 - Genes expressos diferencialmente em cada ponto do tempo na via de resposta ao stress oxidativo a partir de estudos transcritômicos (adaptado de ¹⁴⁰)

A análise da regulação diferencial para cima e para baixo dos componentes dessa via mostra que algumas enzimas antioxidantes são reguladas para baixo, destacando as deficiências na resposta ao *stress* em células A2780 de cancro de ovário.

Além disso, a suprarregulação observada da superóxido dismutase (SOD) sugere que tanto o superóxido quanto o peróxido de hidrogénio desempenham um papel importante na atividade anticancerígena desse complexo metálico.

Os níveis elevados de ROS e a consequente disfunção mitocondrial iniciam uma citotoxicidade multi-alvo, levando à morte celular por apoptose. Embora este trabalho tenha sido pioneiro na área, ainda há muito a ser explorado em relação às vias ativadas por tais complexos.¹⁴⁰

A modulação *redox* em células cancerosas, como meio de atividade antiproliferativa, também pode ser alcançada explorando reações catalíticas. Os complexos à base de metal são bem conhecidos como catalisadores e, levando em consideração a riqueza do conhecimento em torno do seu uso na indústria, explorar essas propriedades catalíticas faz todo o sentido^{116,141}.

Um trabalho inicial propôs a ligação entre a atividade catalítica de um complexo e a sua atividade antiproliferativa e usou derivados da fórmula geral [(areno)Ru(azpy)I]PF₆, onde a unidade areno variou entre p-cimeno e bifenil, enquanto o ligando bidentado incluía vários derivados de aril azopiridina. Embora estes complexos não tenham sofrido hidrólise, eles são ativos contra as células A549 de cancro do pulmão, o que exclui a teoria de direcionamento de ADN que havia sido previamente estabelecida.

Esta atividade antiproliferativa foi justificada com a ajuda de duas observações principais. Primeiramente, os complexos foram capazes de, num tubo de ensaio, catalisar a dimerização de GSH em GSSG e, segundo, foram detetados ROS em células A549.

O alcance da atividade antiproliferativa por meio da modulação *redox* celular abre grandes possibilidades para o desenvolvimento de terapia de combinação inteligente. A maioria dos regimes de combinação atuais são determinados pela escolha de dois ou mais medicamentos, que preferencialmente não se sobrepõem em termos do seu mecanismo de ação.

Esta abordagem resulta num regime que pode apresentar efeitos aditivos muito bons em comparação com os componentes individuais. No entanto, essas escolhas não maximizam totalmente o potencial de qualquer um dos medicamentos.

Em contrapartida, a terapia de combinação inteligente é guiada não por efeitos aditivos, mas por interações sinérgicas, nas quais o mecanismo de ação de um componente ajuda, habilita ou aumenta o mecanismo de ação do segundo fármaco.

Um exemplo dessa estratégia é o uso de moduladores *redox* em combinação com complexos à base de metal, que não apenas potencializam a atividade antiproliferativa, mas também aumentam drasticamente a seletividade das células cancerosas em relação às células normais.

Além de fornecer novas terapias para o cancro, a manipulação dos níveis celulares de ROS também pode fornecer uma estratégia altamente eficaz para o tratamento de cânceros resistentes a fármacos de platina.

Complexos organometálicos de areno para os quais a indução de ROS faz parte do seu mecanismo de ação podem beneficiar da co-administração com produtos químicos que podem permitir a redução de inibidores *redox* celulares, como a L-butionina sulfoximina (L-BSO). Inibe seletivamente a γ -glutamil-cisteína-sintetase, uma enzima necessária na primeira etapa da síntese de GSH, permitindo, assim, a redução dos níveis de GSH nas células cancerosas¹³¹.

O complexo FY26 é altamente ativo *in vitro* e o seu mecanismo de ação envolve explosões de superóxido. O seu IC50 em células A2780 de cancro do ovário é 160 nM. No entanto, esse valor pode ser reduzido para 69 nM quando co-administrado com uma dose não tóxica de 5 μ M L-BSO. É importante ressaltar que a seletividade entre as células normais e cancerosas é melhorada de 28 para 63 vezes, o que poderia ser potencialmente traduzido numa redução dos efeitos colaterais no ambiente clínico; o valor correspondente para a cisplatina nas mesmas condições é uma melhoria de 10 vezes.

Investigações mais profundas sobre a base celular para esta observação revelaram que a co-administração do modulador *redox* não causa modificação no ciclo celular das células cancerosas, nem induz níveis mais elevados de ROS ou um início precoce de apoptose. Por outro lado, 5 μ M L-BSO reduz 50% da GSH disponível, portanto, embora não aumente o dano causado pelo FY26, remove a possibilidade da célula cancerosa reparar tal dano.¹³⁵

Resultados semelhantes também foram obtidos usando complexos de areno de rutênio (II) e ósmio (II) estruturalmente relacionados¹³¹.

4. Desafios nas investigações dos mecanismos de ação a nível celular

Os complexos metálicos com propriedades antineoplásicas são, na maioria dos casos, direcionados a vários alvos e, embora vantajosos no que diz respeito à possibilidade reduzida de desenvolver resistência, isso cria um grande desafio na investigação do seu comportamento a nível celular.

Tal afirmação é sustentada pela reatividade dos complexos metálicos, portanto, definir um único alvo para um determinado complexo e, conseqüentemente, definir o mecanismo de ação com base na única interação com o alvo de escolha pode fornecer apenas um histórico parcial do que ocorre a nível celular.

O rápido desenvolvimento de novas técnicas analíticas e físico-químicas está a aumentar a capacidade de investigar o destino dos complexos metálicos, a partir do momento da sua entrada nos compartimentos intracelulares.

No entanto, ainda há um longo caminho a percorrer para definir uma influência celular desses agentes metálicos. Nenhuma técnica contém a resposta, portanto, uma abordagem de biologia de sistemas para investigar os processos biológicos que culminam na morte celular pode ser uma estratégia muito atraente¹⁴².

Algumas das técnicas mais inovadoras são a radiação de sincrotrão, análise de espectrometria de massa de iões secundários em nanoescala (NanoSIMS) e abordagens proteômicas avançadas.

Um exemplo do uso da radiação de sincrotrão é o uso de uma nanossonda de fluorescência de raios-X (SXRFN) para revelar o local alvo e a distribuição subcelular do complexo de ósmio (II), FY26, em células do cancro de ovário (A2780). A investigação mostrou que o metal acumula-se seletivamente na mitocôndria e isso é acompanhado por um fluxo de cálcio (Ca) do retículo endoplasmático como uma primeira etapa na ativação das vias de morte celular (figura 28)¹³⁸.

O mesmo complexo de ósmio (II) foi investigado posteriormente usando fluorescência de raios-X (SXRF) para estabelecer a penetração do fármaco em modelos 3D de células cancerígenas. Esses resultados forneceram informações sobre a distribuição eficiente de FY26 em esferóides 3D de cancro de ovário¹⁴³.

5. Conclusão e Perspetivas Futuras

Os avanços recentes na investigação dos complexos metálicos já referidos nesta dissertação com aplicações anticancerígenas mostram, sem qualquer dúvida, que existe um grande potencial neste campo. A prova disso é o vasto número de exemplos e publicações que incluem complexos com notável atividade *in vitro* e até *in vivo*.

No entanto, a verdade é que não houve um grande número de complexos submetidos a ensaios clínicos, até ao momento, apenas dois complexos de ruténio (III) foram usados em humanos.

Contudo, os grandes avanços são evidentes, principalmente na compreensão dos mecanismos de ação a nível celular. Atualmente, as estratégias de direcionamento vão além do ADN e incluem uma ampla gama de eventos celulares, como a inibição da tioredoxina redutase. Além disso, o desenvolvimento da catálise celular introduz possibilidades importantes para manipular a atividade *redox* de células cancerosas como um meio para a atividade antiproliferativa.

Na família dos fármacos anticancerígenos de ferro apresentados nesta dissertação, os complexos de ferroceno, moléculas emblemáticas da química organometálica, figuram com destaque. No entanto, os outros membros dessa família também trazem uma ampla diversidade de estruturas e mecanismos de ação. Quanto aos quelantes de ferro, o seu uso como agentes anticancerígenos têm sido objeto de uma série de ensaios clínicos, sem, no entanto, levar ao uso sob prescrição. Sem surpresa, as moléculas que atraem mais atenção são os pró-fármacos. O melhor exemplo é a bleomicina, que, na presença de um agente redutor e oxigênio, extrai ferro do reservatório de ferro intracelular para gerar *in situ* um complexo de ferro (III) altamente reativo. Os ferrocifenos, por sua vez, são ativados dentro das células cancerosas em metetos de quinona, espécies eletrofílicas reativas que são a fonte da sua citotoxicidade. O espectro dos fármacos anticancerígenos de ferro abrange um vasto campo de pesquisa, e é um bom presságio por fornecer novas descobertas.

Recentemente, foram descobertos complexos de coordenação de ferro, cujo potencial para uso em TFD parece promissor. A TFD surgiu como um novo método terapêutico para o tratamento do cancro na presença de luz. A ativação seletiva do fármaco nas células cancerosas leva à morte celular através de ROS que foram gerados fotoquimicamente, enquanto as células normais não expostas permanecem pouco afetadas pela citotoxicidade fotoinduzida. Chakravarty e colegas de trabalho prepararam recentemente os primeiros ferrocenil conjugados ativos em TFD¹⁴⁴. Estes complexos mostram alta fotocitotoxicidade após irradiação com luz visível (400-700 nm), induzindo a apoptose das células pela produção de ROS. Chakravarty e o seu grupo também sintetizaram complexos que só se tornam citotóxicos quando irradiados por luz visível (400–700 nm) ou vermelha (600–750 nm). Foi descrito que estes complexos mostram toxicidade elevada em células heLa após a irradiação, localizando-se essencialmente no núcleo das células onde, após irradiação, induz a clivagem do ADN e morte celular por apoptose^{145–147}. Complexos de polipiridina de vários metais têm sido muito estudados quanto ao seu potencial para uso em TFD¹⁴⁸. Alguns complexos apresentam fortes efeitos antiproliferativos em várias linhas celulares, mais particularmente nas células Caski (carcinoma do cancro cervical). Esses complexos são lipofílicos e são transportados para o interior da célula

pelo recetor de transferrina. Os seus efeitos antiproliferativos induzem apoptose, com bloqueio das células na fase sub-G1, e podem estar ligados a uma inibição da TrxR^{149,150}. É importante também referir que existem complexos de Ru que apresentam estruturas altamente ajustáveis e oferecem grande espaço para a melhoria das propriedades fotofísicas; tornando-os ideais para o desenvolvimento de fotossensibilizadores para TFD^{151,152}. Explorando estas excelentes características luminescentes, complexos ciclometalados, em particular com centros de ruténio (II), estão a ser desenvolvidos como alternativas viáveis para a TFD¹⁵³.

Por fim, é relevante dizer que estes progressos só acontecem devido ao aumento de equipas inter e multidisciplinares que lidam com questões desafiantes de múltiplas perspectivas, bem como pelo desenvolvimento de novas técnicas analíticas. No devido tempo, esse novo conhecimento ajudará a otimizar as novas gerações de complexos, que, esperançosamente, incluirão a alternativa aos complexos à base de platina no uso clínico.

6. Bibliografia

- 1 Cancer, https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1, (accessed 5 April 2021).
- 2 S. Ghosh, Cisplatin: The first metal based anticancer drug, *Bioorg. Chem.*, 2019, **88**, 102925.
- 3 C. S. Allardyce and P. J. Dyson, Metal-based drugs that break the rules, *Dalt. Trans.*, 2016, **45**, 3201–3209.
- 4 J. M. Rademaker-Lakhai, D. Van Den Bongard, D. Pluim, J. H. Beijnen and J. H. M. Schellens, A phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent, *Clin. Cancer Res.*, 2004, **10**, 3717–3727.
- 5 A. M. Pinto, *Fisiopatologia - Fundamentos e Aplicações*, 2009.
- 6 ¿Qué es el cáncer? - Instituto Nacional del Cáncer, <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>, (accessed 13 April 2021).
- 7 C. M. Porth and G. Matfin, *Fisiopatologia*, 2009
- 8 CARCINOGENESIS - Comparative Oncology - NCBI Bookshelf, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9552/>, (accessed 22 April 2021).
- 9 P. Boyle and B. Levin, *World CanCer report 2008*, 2008, vol. 199.
- 10 Oncogenes - Holland-Frei Cancer Medicine - NCBI Bookshelf, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20806/#A1032>, (accessed 22 April 2021).
- 11 M. Bizzarri and A. Cucina, Tumor and the microenvironment: A chance to reframe the paradigm of carcinogenesis?, *Biomed Res. Int.*
- 12 Cancer Tomorrow, https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/isotype?mode=population&types=1&single_unit=500000, (accessed 17 June 2021).
- 13 Cancer Today, https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars?v=2020&mode=cancer&mode_population=countries&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=1, (accessed 17 June 2021).
- 14 Tratamento - IPO Lisboa, <https://www.ipolisboa.min-saude.pt/sobre-o-cancro/tratamento/#>, (accessed 12 May 2021).
- 15 Types of Cancer Treatment - National Cancer Institute, <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types>, (accessed 12 May 2021).
- 16 R. A. de Mello, A. Tavares and G. Mountzios, *International Manual of Oncology Practice*, 2015, vol. 52.
- 17 A. Caley and R. Jones, The principles of cancer treatment by chemotherapy, *Surgery*, 2012, **30**, 186–190.
- 18 F. Trudu, F. Amato, P. Vañhara, T. Pivetta, E. M. Peña-Méndez and J. Havel, Coordination compounds in cancer: Past, present and perspectives, *J. Appl. Biomed.*, 2015, **13**, 79–103.
- 19 D. Chen, V. Milacic, M. Frezza and Q. Dou, Metal Complexes, their Cellular Targets and Potential for Cancer Therapy, *Curr. Pharm. Des.*, 2009, **15**, 777–791.
- 20 B. Desoize, Metals and metal compounds in cancer treatment, *Anticancer Res.*, 2004, **24**, 1529–1544.
- 21 S. M. Meier-Menches, C. Gerner, W. Berger, C. G. Hartinger and B. K. Keppler, Structure-activity relationships for ruthenium and osmium anticancer agents-towards clinical development, *Chem. Soc. Rev.*, 2018, **47**, 909–928.
- 22 N. N. Greenwood and A. Earnshaw, *Chemistry of the Elements (1st Edition)*, 1984.
- 23 H. Haraguchi, Metallomics: Integrated biometal science, *Met. Recent Anal. Tech. Appl.*,

- 2017, 3–39.
- 24 J. C. Kwok, The iron metabolism of neoplastic cells: Alterations that facilitate proliferation?, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2002, **42**, 65–78.
- 25 W. Nam, High-valent iron(IV)-oxo complexes of heme and non-heme ligands in oxygenation reactions, *Acc. Chem. Res.*, 2007, **40**, 522–531.
- 26 W. Nam, Y. M. Lee and S. Fukuzumi, Tuning reactivity and mechanism in oxidation reactions by mononuclear nonheme iron(IV)-oxo complexes, *Acc. Chem. Res.*, 2014, **47**, 1146–1154.
- 27 G. Jaouen, A. Vessières and S. Top, Ferrocifen type anti cancer drugs, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 8802–8817.
- 28 S. S. Braga and A. M. S. Silva, A new age for iron: Antitumoral ferrocenes, *Organometallics*, 2013, **32**, 5626–5639.
- 29 K. Kowalski, Recent developments in the chemistry of ferrocenyl secondary natural product conjugates, *Coord. Chem. Rev.*, 2018, **366**, 91–108.
- 30 C. Ornelas, Application of ferrocene and its derivatives in cancer research, *New J. Chem.*, 2011, **35**, 1973–1985.
- 31 R. Atkinson, C. J., J. Long, C. Nicholas, S. W. Hor, T. S. A. Colacot, J. Thomas, S. Parisel, *Ferrocenes, Ligands, Materials and Biomolecules*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2018
- 32 R. Alberto, C. Biot, A. Casini, D. Dive, P. J. Dyson, S. Gibaud, A. Habtemariam, C. G. Hartinger, E.A. Hillard, M. Hogan, G. Jaouen, B. E. Mann, E. Meggers, S.P. Mulcahy, A. Nazarov, N. Metzler-Nolte, A. Pizarro, P. J. Sadler, M. Tacke, A. Vessieres, *Medicinal Organometallic Chemistry*, Springer, New York, 2010
- 33 A. Pietrzykowski and W. Buchowicz, *Advances in Organometallic Chemistry and Catalysis*, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2010
- 34 W. A. Wani, U. Baig, S. Shreaz, R. A. Shiekh, P. F. Iqbal, E. Jameel, A. Ahmad, S. H. Mohd-Setapar, M. Mushtaque and L. Ting Hun, Recent advances in iron complexes as potential anticancer agents, *New J. Chem.*, 2016, **40**, 1063–1090.
- 35 J. Chen and J. A. Stubbe, Bleomycins: Towards better therapeutics, *Nat. Rev. Cancer*, 2005, **5**, 102–112.
- 36 V. Corcé, S. G. Gouin, S. Renaud, F. Gaboriau and D. Deniaud, Recent advances in cancer treatment by iron chelators, *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2016, **26**, 251–256.
- 37 Y. Yu, E. Gutierrez, Z. Kovacevic, F. Saletta, P. Obeidy, Y. Suryo Rahmanto and D. R. Richardson, Iron Chelators for the Treatment of Cancer, *Curr. Med. Chem.*, 2012, **19**, 2689–2702.
- 38 M. P. Gleeson, A. Hersey, D. Montanari and J. Overington, Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2011, **10**, 197–208.
- 39 C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy and P. J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, **64**, 4–17.
- 40 G. R. Bickerton, G. V. Paolini, J. Besnard, S. Muresan and A. L. Hopkins, Quantifying the chemical beauty of drugs, *Nat. Chem.*, 2012, **4**, 90–98.
- 41 S. M. Meier, M. Hanif, Z. Adhireksan, V. Pichler, M. Novak, E. Jirkovsky, M. A. Jakupec, V. B. Arion, C. A. Davey, B. K. Keppler and C. G. Hartinger, Novel metal(ii) arene 2-pyridinecarbothioamides: A rationale to orally active organometallic anticancer agents, *Chem. Sci.*, 2013, **4**, 1837–1846.
- 42 S. Clède, F. Lambert, R. Saint-Fort, M. A. Plamont, H. Bertrand, A. Vessières and C. Policar, Influence of the side-chain length on the cellular uptake and the cytotoxicity of rhenium triscarbonyl derivatives: A bimodal infrared and luminescence quantitative

- study, *Chem. - A Eur. J.*, 2014, **20**, 8714–8722.
- 43 O. Klement, Theoretical determination of electron density in organic molecules, *Nature*, 1951, **168**, 162.
- 44 A. Miller, J. A. Tebboth and F. Tremaine, Dicyclopentadienyliron, 1952, 1–4.
- 45 E. O. Fischer and W. Pfab, Cyclopentadien-Metallkomplexe ein neuer Typ metallorganischer Verbindungen, *Zeitschrift für Naturforsch. - Sect. B J. Chem. Sci.*, 1952, **7**, 377–379.
- 46 A. Gide, A new aromatic system, *Angew. Chemie Int. Ed.* 6(11), 951–952., 1967, **883**, 5–24.
- 47 P. Kovacic, Unifying mechanism for anticancer agents involving electron transfer and oxidative stress: Clinical implications, *Med. Hypotheses*, 2007, **69**, 510–516.
- 48 S. Top, J. T. Tang, A. Vessières, D. Carrez, C. Provote and G. Jaouen, Ferrocenyl hydroxytamoxifen: a prototype for a new range of oestradiol receptor site-directed cytotoxics, *Chem. Commun.*
- 49 S. Top, A. Vessières, G. Leclercq, J. Quivy, J. Tang, J. Vaissermann, M. Huché and G. Jaouen, Synthesis, Biochemical Properties and Molecular Modelling Studies of Organometallic Specific Estrogen Receptor Modulators (SERMs), the Ferrocifens and Hydroxyferrocifens: Evidence for an Antiproliferative Effect of Hydroxyferrocifens on both Hormone-Depen, *Chem. - A Eur. J.*, 2003, **9**, 5223–5236.
- 50 A. Vessières, Metal carbonyl tracers and the ferrocifen family: Two facets of bioorganometallic chemistry, *J. Organomet. Chem.*, 2013, **734**, 3–16.
- 51 A. Nguyen, A. Vessières, E. A. Hillard, S. Top, P. Pigeon and G. Jaouen, Ferrocifens and ferrocifenols as new potential weapons against breast cancer, *Chimia (Aarau)*, 2007, **61**, 716–724.
- 52 V. C. Jordan, Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer, *Br. J. Pharmacol.*, 2006, **147**, 269–276.
- 53 S. Top, A. Vessières, C. Cabestaing, I. Laios, G. Leclercq, C. Provot and G. érard Jaouen, Studies on organometallic selective estrogen receptor modulators. (SERMs) Dual activity in the hydroxy-ferrocifen series, *J. Organomet. Chem.*, 2001, **637–639**, 500–506.
- 54 C. Lu, J. M. Heldt, M. Guille-Collignon, F. Lemaître, G. Jaouen, A. Vessières and C. Amatore, Quantitative analyses of ROS and RNS production in breast cancer cell lines incubated with ferrocifens, *ChemMedChem*, 2014, **9**, 1286–1293.
- 55 A. Vessières, C. Corbet, J. M. Heldt, N. Lories, N. Jouy, I. Laños, G. Leclercq, G. Jaouen and R. A. Toillon, A ferrocenyl derivative of hydroxytamoxifen elicits an estrogen receptor-independent mechanism of action in breast cancer cell lines, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, **104**, 503–511.
- 56 V. Scalcon, M. Salmain, A. Folda, S. Top, P. Pigeon, H. Z. Shirley Lee, G. Jaouen, A. Bindoli, A. Vessières and M. P. Rigobello, Tamoxifen-like metalocifens target the thioredoxin system determining mitochondrial impairment leading to apoptosis in Jurkat cells, *Metallomics*, 2017, **9**, 949–959.
- 57 N. T. Huynh, C. Passirani, P. Saulnier and J. P. Benoit, Lipid nanocapsules: A new platform for nanomedicine, *Int. J. Pharm.*, 2009, **379**, 201–209.
- 58 M. Görmen, P. Pigeon, S. Top, E. A. Hillard, M. Huché, C. G. Hartinger, F. de Montigny, M. A. Plamont, A. Vessières and G. Jaouen, Synthesis, cytotoxicity, and COMPARE analysis of ferrocene and [3]ferrocenophane tetrasubstituted olefin derivatives against human cancer cells, *ChemMedChem*, 2010, **5**, 2039–2050.
- 59 E. Hillard, A. Vessières, L. Thouin, G. Jaouen and C. Amatore, Ferrocene-mediated proton-coupled electron transfer in a series of ferrocifen-type breast-cancer drug candidates, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2005, **45**, 285–290.

- 60 Y. Wang, M. A. Richard, S. Top, P. M. Dansette, P. Pigeon, A. Vessières, D. Mansuy and G. Jaouen, Ferrocenyl Quinone Methide–Thiol Adducts as New Antiproliferative Agents: Synthesis, Metabolic Formation from Ferrociphenols, and Oxidative Transformation, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2016, **55**, 10431–10434.
- 61 A. Citta, A. Folda, A. Bindoli, P. Pigeon, S. Top, A. Vessières, M. Salmain, G. Jaouen and M. P. Rigobello, Evidence for targeting thioredoxin reductases with ferrocenyl quinone methides. A possible molecular basis for the antiproliferative effect of hydroxyferrocifens on cancer cells, *J. Med. Chem.*, 2014, **57**, 8849–8859.
- 62 C. Bruyère, V. Mathieu, A. Vessières, P. Pigeon, S. Top, G. Jaouen and R. Kiss, Ferrocifen derivatives that induce senescence in cancer cells: Selected examples, *J. Inorg. Biochem.*, 2014, **141**, 144–151.
- 63 E. Allard, D. Jarnet, A. Vessières, S. Vinchon-Petit, G. Jaouen, J. P. Benoit and C. Passirani, Local delivery of ferrociphenol lipid nanocapsules followed by external radiotherapy as a synergistic treatment against intracranial 9L glioma xenograft, *Pharm. Res.*, 2010, **27**, 56–64.
- 64 M. Beauperin, S. Top, M. A. Richard, D. Plazuk, P. Pigeon, S. Toma, V. Poláčková and G. Jaouen, The length of the bridging chain in ansa-metallocenes influences their antiproliferative activity against triple negative breast cancer cells (TNBC), *Dalt. Trans.*, 2016, **45**, 13126–13134.
- 65 D. Plazuk, A. Vessières, F. Le Bideau, G. Jaouen and J. Zakrzewski, Synthesis of benzyl- and benzhydrylferrocenes via Friedel-Crafts alkylation of ferrocene. Access to ferrocenyl bisphenols with high affinities for estrogen receptors, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 5425–5427.
- 66 D. Plazuk, A. Vessières, E. A. Hillard, O. Buriez, E. Labbé, P. Pigeon, M. A. Plamont, C. Amatore, J. Zakrzewski and G. Jaouen, A [3]ferrocenophane polyphenol showing a remarkable antiproliferative activity on breast and prostate cancer cell lines, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 4964–4967.
- 67 E. Allard, C. Passirani, E. Garcion, P. Pigeon, A. Vessières, G. Jaouen and J. P. Benoit, Lipid nanocapsules loaded with an organometallic tamoxifen derivative as a novel drug-carrier system for experimental malignant gliomas, *J. Control. Release*, 2008, **130**, 146–153.
- 68 V. Scalcon, A. Citta, A. Folda, A. Bindoli, M. Salmain, I. Ciofini, S. Blanchard, J. de Jesús Cázares-Marinero, Y. Wang, P. Pigeon, G. Jaouen, A. Vessières and M. P. Rigobello, Enzymatic oxidation of ansa-ferrocifen leads to strong and selective thioredoxin reductase inhibition in vitro, *J. Inorg. Biochem.*, 2016, **165**, 146–151.
- 69 A. L. Lainé, A. Clavreul, A. Rousseau, C. Tétaud, A. Vessieres, E. Garcion, G. Jaouen, L. Aubert, M. Guilbert, J. P. Benoit, R. A. Toillon and C. Passirani, Inhibition of ectopic glioma tumor growth by a potent ferrocenyl drug loaded into stealth lipid nanocapsules, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, 2014, **10**, 1667–1677.
- 70 W. L. Kwong, C. N. Lok, C. W. Tse, E. L. M. Wong and C. M. Che, Anti-cancer iron(II) complexes of pentadentate N-donor ligands: Cytotoxicity, transcriptomics analyses, and mechanisms of action, *Chem. - A Eur. J.*, 2015, **21**, 3062–3072.
- 71 E. L. M. Wong, G. S. Fang, C. M. Che and N. Zhu, Highly cytotoxic iron(II) complexes with pentadentate pyridyl ligands as a new class of anti-tumor agents, *Chem. Commun.*, 2005, 4578–4580.
- 72 A. Hille, I. Ott, A. Kitanovic, I. Kitanovic, H. Alborzina, E. Lederer, S. Wölfl, N. Metzler-Nolte, S. Schäfer, W. S. Sheldrick, C. Bischof, U. Schatzschneider and R. Gust, [N,N'-Bis(salicylidene)-1,2-phenylenediamine]metal complexes with cell death promoting properties, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2009, **14**, 711–725.
- 73 A. Hille, T. Wolf, P. Schumacher, I. Ott, R. Gust and B. Kircher, Effects of metal

- salophene and saldach complexes on lymphoma and leukemia cells, *Arch. Pharm. (Weinheim)*., 2011, **344**, 217–223.
- 74 T. S. Lange, K. K. Kim, R. K. Singh, R. M. Strongin, C. K. McCourt and L. Brard, Iron(III)-salophene: An organometallic compound with selective cytotoxic and anti-proliferative properties in platinum-resistant ovarian cancer cells, *PLoS One*.
- 75 K. K. Kim, R. K. Singh, R. M. Strongin, R. G. Moore, L. Brard and T. S. Lange, Organometallic iron(iii)-salophene exerts cytotoxic properties in neuroblastoma cells via mapk activation and ros generation, *PLoS One*.
- 76 R. M. Burger, J. Peisach and S. B. Horwitz, Activated bleomycin. A transient complex of drug, iron, and oxygen that degrades DNA., *J. Biol. Chem.*, 1981, **256**, 11636–11644.
- 77 C. Jones and J. Thornback, *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*, The Royal Society of Chemistry, Dorchester, 2007.
- 78 S. K. Bardal, J. E. Waechter and D. S. Martin, *Applied Pharmacology*, 2011.
- 79 Q. Li, T. A. Van Den Berg, B. L. Feringa and G. Roelfes, Mononuclear Fe(ii)-N4Py complexes in oxidative DNA cleavage: Structure, activity and mechanism, *Dalt. Trans.*, 2010, **39**, 8012–8021.
- 80 Q. Li, M. G. P. Van Der Wijst, H. G. Kazemier, M. G. Rots and G. Roelfes, Efficient nuclear DNA cleavage in human cancer cells by synthetic bleomycin mimics, *ACS Chem. Biol.*, 2014, **9**, 1044–1051.
- 81 A. Geersing, N. Ségaud, M. G. P. Van Der Wijst, M. G. Rots and G. Roelfes, Importance of Metal-Ion Exchange for the Biological Activity of Coordination Complexes of the Biomimetic Ligand N4Py, *Inorg. Chem.*, 2018, **57**, 7748–7756.
- 82 G. Tabbi, C. Cassino, G. Cavigiolo, D. Colangelo, A. Ghiglia, I. Viano and D. Osella, Water stability and cytotoxic activity relationship of a series of ferrocenium derivatives. ESR insights on the radical production during the degradation process, *J. Med. Chem.*, 2002, **45**, 5786–5796.
- 83 J. B. Porter, Optimizing iron chelation strategies in β -thalassaemia major, *Blood Rev.*, 2009, **23**, S3–S7.
- 84 P. Heffeter, V. F. S. Pape, É. A. Enyedy, B. K. Keppler, G. Szakacs and C. R. Kowol, Anticancer thiosemicarbazones: Chemical properties, interaction with iron metabolism, and resistance development, *Antioxidants Redox Signal.*, 2019, **30**, 1062–1082.
- 85 J. Blatt and S. Stitely, Antineuroblastoma Activity of Desferoxamine in Human Cell Lines, *Cancer Res.*, 1987, **47**, 1749–1750.
- 86 Z. Estrov, A. Tawa, X. H. Wang, I. D. Dubé, H. Sulh, A. Cohen, E. W. Gelfand and M. H. Freedman, In vitro and in vivo effects of deferoxamine in neonatal acute leukemia, *Blood*, 1987, **69**, 757–761.
- 87 K. Chantrel-Groussard, F. Gaboriau, N. Padeloup, R. Havouis, H. Nick, J. L. Pierre, P. Brissot and G. Lescoat, The new orally active iron chelator ICL670A exhibits a higher antiproliferative effect in human hepatocyte cultures than O-trensox, *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, **541**, 129–137.
- 88 E. Messa, S. Carturan, C. Maffè, M. Pautasso, E. Bracco, A. Roetto, F. Messa, F. Arruga, I. Defilippi, V. Rosso, C. Zanone, A. Rotolo, E. Greco, R. M. Pellegrino, D. Alberti, G. Saglio and D. Cilloni, Deferasirox is a powerful NF- κ b inhibitor in myelodysplastic cells and in leukemia cell lines acting independently from cell iron deprivation by chelation and reactive oxygen species scavenging, *Haematologica*, 2010, **95**, 1308–1316.
- 89 J. F. Zeidner, J. E. Karp, A. L. Blackford, B. Douglas Smith, I. Gojo, S. D. Gore, M. J. Levis, H. E. Carraway, J. M. Greer, S. Percy Ivy, K. W. Pratz and M. A. McDevitt, A phase II trial of sequential ribonucleotide reductase inhibition in aggressive myeloproliferative neoplasms, *Haematologica*, 2014, **99**, 672–678.
- 90 A. Martin-Bastida, R. J. Ward, R. Newbould, P. Piccini, D. Sharp, C. Kabba, M. C. Patel,

- M. Spino, J. Connelly, F. Tricta, R. R. Crichton and D. T. Dexter, Brain iron chelation by deferiprone in a phase 2 randomised double-blinded placebo controlled clinical trial in Parkinson's disease, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 1–9.
- 91 M. A. Jakupec, M. Galanski, V. B. Arion, C. G. Hartinger and B. K. Keppler, Antitumour metal compounds: More than theme and variations, *Dalt. Trans.*, 2008, 183–194.
- 92 G. Süß-Fink, Arene ruthenium complexes as anticancer agents, *Dalt. Trans.*, 2010, **39**, 1673–1688.
- 93 C. G. Hartinger, M. A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessler, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P. J. Dyson and B. K. Keppler, KP1019, a new redox-active anticancer agent - Preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients, *Chem. Biodivers.*, 2008, **5**, 2140–2155.
- 94 E. Alessio, Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2017, **2017**, 1549–1560.
- 95 E. Alessio and L. Messori, Anticancer drug candidates face-to-face: a case story in medicinal inorganic chemistry, *Molecules*, 2019, **24**, 1–20.
- 96 R. Trondl, P. Heffeter, C. R. Kowol, M. A. Jakupec, W. Berger and B. K. Keppler, NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 2925–2932.
- 97 A. Bergamo and G. Sava, Ruthenium anticancer compounds: Myths and realities of the emerging metal-based drugs, *Dalt. Trans.*, 2011, **40**, 7817–7823.
- 98 G. S. and A. Bergamo, *Platinum and Other Heavy Metal Compounds*, vol. 148.
- 99 A. Bergamo and G. Sava, Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 8818–8835.
- 100 J. Jassem, M. Krzakowski, K. Roszkowski, R. Ramlau, J. Marek Słomiński, A. Szczęśna, K. Krawczyk, B. Mozejko-Pastewka, J. Lis and K. Miracki, A phase II study of gemcitabine plus cisplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer: Clinical outcomes and quality of life, *Lung Cancer*, 2002, **35**, 73–79.
- 101 S. Leijen, S. A. Burgers, P. Baas, D. Pluim, M. Tibben, E. Van Werkhoven, E. Alessio, G. Sava, J. H. Beijnen and J. H. M. Schellens, Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy, *Invest. New Drugs*, 2015, **33**, 201–214.
- 102 P. Therasse, S. G. Arbuck, E. A. Eisenhauer, J. Wanders, R. S. Kaplan, L. Rubinstein, J. Verweij, M. Van Glabbeke, A. T. Van Oosterom, M. C. Christian and S. G. Gwyther, New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors, *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, **92**, 205–216.
- 103 C. G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M. A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas and B. K. Keppler, From bench to bedside - preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A), *J. Inorg. Biochem.*, 2006, **100**, 891–904.
- 104 H. A. Burris, S. Bakewell, J. C. Bendell, J. Infante, S. F. Jones, D. R. Spigel, G. J. Weiss, R. K. Ramanathan, A. Ogden and D. Von Hoff, Safety and activity of IT-139, a ruthenium-based compound, in patients with advanced solid tumours: A first-in-human, open-label, dose-escalation phase i study with expansion cohort, *ESMO Open*, 2016, **1**, 1–8.
- 105 T. Fuereder and W. Berger, Metal drugs become targeted, *ESMO Open*, 2017, **2**, 1–3.
- 106 G. Gasser, I. Ott and N. Metzler-Nolte, Organometallic anticancer compounds, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 3–25.
- 107 P. C. A. Bruijninx and P. J. Sadler, Controlling platinum, ruthenium, and osmium reactivity for anticancer drug design, *Adv. Inorg. Chem.*, 2009, **61**, 1–62.

- 108 C. A. Puckett, R. J. Ernst and J. K. Barton, Exploring the cellular accumulation of metal complexes, *Dalt. Trans.*, 2010, **39**, 1159–1170.
- 109 Targeting Large Kinase Active Site with Rigid, Bulky Octahedral Ruthenium Complexes.
- 110 L. Ronconi and P. J. Sadler, Using coordination chemistry to design new medicines, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, **251**, 1633–1648.
- 111 M. Hanif, S. M. Meier, W. Kandioller, A. Bytzeck, M. Hejl, C. G. Hartinger, A. A. Nazarov, V. B. Arion, M. A. Jakupec, P. J. Dyson and B. K. Keppler, From hydrolytically labile to hydrolytically stable RuII-arene anticancer complexes with carbohydrate-derived co-ligands, *J. Inorg. Biochem.*, 2011, **105**, 224–231.
- 112 F. Schmitt, K. Donnelly, J. K. Muenzner, T. Rehm, V. Novohradsky, V. Brabec, J. Kasparkova, M. Albrecht, R. Schobert and T. Mueller, Effects of histidin-2-ylidene vs. imidazol-2-ylidene ligands on the anticancer and antivasular activity of complexes of ruthenium, iridium, platinum, and gold, *J. Inorg. Biochem.*, 2016, **163**, 221–228.
- 113 K. J. Kilpin, S. Crot, T. Riedel, J. A. Kitchen and P. J. Dyson, Ruthenium(II) and osmium(II) 1,2,3-triazolylidene organometallics: A preliminary investigation into the biological activity of ‘click’ carbene complexes, *Dalt. Trans.*, 2014, **43**, 1443–1448.
- 114 A. M. Pizarro, M. Melchart, A. Habtemariam, L. Salassa, F. P. A. Fabbiani, S. Parsons and P. J. Sadler, Controlling the reactivity of ruthenium(II) arene complexes by tether ring-opening, *Inorg. Chem.*, 2010, **49**, 3310–3319.
- 115 F. Martínez-Peña and A. M. Pizarro, Control of Reversible Activation Dynamics of $[\text{Ru}\{\eta^6\text{-}\kappa^1\text{-C}_6\text{H}_5(\text{C}_6\text{H}_4)\text{NH}_2\}(\text{XY})]_{n+}$ and the Effect of Chelating-Ligand Variation, *Chem. - A Eur. J.*, 2017, **23**, 16231–16241.
- 116 A. L. Noffke, A. Habtemariam, A. M. Pizarro and P. J. Sadler, Designing organometallic compounds for catalysis and therapy, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 5219–5246.
- 117 A. Renfrew, Ruthenium(II) arene compounds as versatile anticancer agents, *Chimia (Aarau)*, 2009, **63**, 217–219.
- 118 J. Iida, E. T. Bell-Loncella, M. L. Purazo, Y. Lu, J. Dorchak, R. Clancy, J. Slavik, M. Lou Cutler and C. D. Shriver, Inhibition of cancer cell growth by ruthenium complexes, *J. Transl. Med.*, 2016, **14**, 3616–3621.
- 119 A. Bergamo, A. Masi, A. F. A. Peacock, A. Habtemariam, P. J. Sadler and G. Sava, In vivo tumour and metastasis reduction and in vitro effects on invasion assays of the ruthenium RM175 and osmium AFAP51 organometallics in the mammary cancer model, *J. Inorg. Biochem.*, 2010, **104**, 79–86.
- 120 A. Casini, F. Edefe, M. Erlandsson, L. Gonsalvi, A. Ciancetta, N. Re, A. Ienco, L. Messori, M. Peruzzini and P. J. Dyson, Rationalization of the inhibition activity of structurally related organometallic compounds against the drug target cathepsin B by DFT, *Dalt. Trans.*, 2010, **39**, 5556–5563.
- 121 P. P. Hsu and D. M. Sabatini, Cancer cell metabolism: Warburg and beyond, *Cell*, 2008, **134**, 703–707.
- 122 Z. Chen, W. Lu, C. Garcia-Prieto and P. Huang, The Warburg effect and its cancer therapeutic implications, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2007, **39**, 267–274.
- 123 U. Jungwirth, C. R. Kowol, B. K. Keppler, C. G. Hartinger, W. Berger and P. Heffeter, Anticancer activity of metal complexes: Involvement of redox processes, *Antioxidants Redox Signal.*, 2011, **15**, 1085–1127.
- 124 D. A. Tennant, R. V. Durán and E. Gottlieb, Targeting metabolic transformation for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer*, 2010, **10**, 267–277.
- 125 G. Chena, F. Wanga, D. Trachoothama and P. Huanga, Preferential killing of cancer cells with mitochondrial dysfunction by natural compounds.
- 126 E. O. Hileman, J. Liu, M. Albitar, M. J. Keating and P. Huang, Intrinsic oxidative stress

- in cancer cells: A biochemical basis for therapeutic selectivity, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 2004, **53**, 209–219.
- 127 G. Kroemer, Mitochondria in cancer, *Oncogene*, 2006, **25**, 4630–4632.
- 128 L. Galluzzi, N. Larochette, N. Zamzami and G. Kroemer, Mitochondria as therapeutic targets for cancer chemotherapy, *Oncogene*, 2006, **25**, 4812–4830.
- 129 J. Watson, Oxidants, antioxidants and the current incurability of metastatic cancers, *Open Biol.*
- 130 J. D. Pennington, T. J. C. Wang, P. Nguyen, L. Sun, K. Bisht, D. Smart and D. Gius, Redox-sensitive signaling factors as a novel molecular targets for cancer therapy, *Drug Resist. Updat.*, 2005, **8**, 322–330.
- 131 I. Romero-Canelón and P. J. Sadler, Next-generation metal anticancer complexes: Multitargeting via redox modulation, *Inorg. Chem.*, 2013, **52**, 12276–12291.
- 132 S. J. Dougan, A. Habtemariam, S. E. McHale, S. Parsons and P. J. Sadler, Catalytic organometallic anticancer complexes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, **105**, 11628–11633.
- 133 I. Romero-Canelón, L. Salassa and P. J. Sadler, The contrasting activity of iodido versus chlorido ruthenium and osmium arene azo- and imino-pyridine anticancer complexes: Control of cell selectivity, cross-resistance, p53 dependence, and apoptosis pathway, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 1291–1300.
- 134 Y. Fu, A. Habtemariam, A. M. Pizarro, S. H. Van Rijt, D. J. Healey, P. A. Cooper, S. D. Shnyder, G. J. Clarkson and P. J. Sadler, Organometallic osmium arene complexes with potent cancer cell cytotoxicity, *J. Med. Chem.*, 2010, **53**, 8192–8196.
- 135 I. Romero-Canelón, M. Mos and P. J. Sadler, Enhancement of Selectivity of an Organometallic Anticancer Agent by Redox Modulation, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 7874–7880.
- 136 A. Ballesta, F. Billy, J. P. C. Coverdale, J. I. Song, C. Sanchez-Cano, I. Romero-Canelón and P. J. Sadler, Kinetic analysis of the accumulation of a half-sandwich organo-osmium pro-drug in cancer cells, *Metallomics*, 2019, **11**, 1648–1656.
- 137 R. J. Needham, C. Sanchez-Cano, X. Zhang, I. Romero-Canelón, A. Habtemariam, M. S. Cooper, L. Meszaros, G. J. Clarkson, P. J. Blower and P. J. Sadler, In-Cell Activation of Organo-Osmium(II) Anticancer Complexes, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2017, **56**, 1017–1020.
- 138 C. Sanchez-Cano, I. Romero-Canelón, Y. Yang, I. J. Hands-Portman, S. Bohic, P. Cloetens and P. J. Sadler, Synchrotron X-Ray Fluorescence Nanoprobe Reveals Target Sites for Organo-Osmium Complex in Human Ovarian Cancer Cells, *Chem. - A Eur. J.*, 2017, **23**, 2512–2516.
- 139 S. D. Shnyder, Y. Fu, A. Habtemariam, S. H. Van Rijt, P. A. Cooper, P. M. Loadman and P. J. Sadler, Anti-colorectal cancer activity of an organometallic osmium arene azopyridine complex, *Medchemcomm*, 2011, **2**, 666–668.
- 140 J. M. Hearn, I. Romero-Canelón, A. F. Munro, Y. Fu, A. M. Pizarro, M. J. Garnett, U. McDermott, N. O. Carragher and P. J. Sadler, Potent organo-osmium compound shifts metabolism in epithelial ovarian cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015, **112**, E3800–E3805.
- 141 G. Süss-Fink, Water-soluble arene ruthenium complexes: From serendipity to catalysis and drug design, *J. Organomet. Chem.*, 2014, **751**, 2–19.
- 142 I. Romero-Canelón and P. J. Sadler, Systems approach to metal-based pharmacology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015, **112**, 4187–4188.
- 143 C. Sanchez-Cano, I. Romero-Canelón, K. Geraki and P. J. Sadler, Microfocus x-ray fluorescence mapping of tumour penetration by an organo-osmium anticancer complex, *J. Inorg. Biochem.*, 2018, **185**, 26–29.

- 144 B. Balaji, B. Balakrishnan, S. Perumalla, A. A. Karande and A. R. Chakravarty, Mitochondria-targeting photocytotoxic ferrocenyl conjugates of N-alkylpyridinium salts, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2015, **2015**, 1398–1407.
- 145 U. Basu, I. Khan, A. Hussain, P. Kondaiah and A. R. Chakravarty, Photodynamic effect in near-IR light by a photocytotoxic iron(III) cellular imaging agent, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 2012, **51**, 2658–2661.
- 146 U. Basu, I. Pant, I. Khan, A. Hussain, P. Kondaiah and A. R. Chakravarty, Iron(III) catecholates for cellular imaging and photocytotoxicity in red light, *Chem. - An Asian J.*, 2014, **9**, 2494–2504.
- 147 U. Basu, I. Pant, P. Kondaiah and A. R. Chakravarty, Mitochondria-Targeting Iron(III) Catecholates for Photoactivated Anticancer Activity under Red Light, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2016, **2016**, 1002–1012.
- 148 F. Heinemann, J. Karges and G. Gasser, Critical Overview of the Use of Ru(II) Polypyridyl Complexes as Photosensitizers in One-Photon and Two-Photon Photodynamic Therapy, *Acc. Chem. Res.*, 2017, **50**, 2727–2736.
- 149 C. Gabbiani, G. Mastrobuoni, F. Sorrentino, B. Dani, M. P. Rigobello, A. Bindoli, M. A. Cinellu, G. Pieraccini, L. Messori and A. Casini, Thioredoxin reductase, an emerging target for anticancer metallodrugs. Enzyme inhibition by cytotoxic gold(III) compounds studied with combined mass spectrometry and biochemical assays, *Medchemcomm*, 2011, **2**, 50–54.
- 150 E. Schuh, C. Pflüger, A. Citta, A. Folda, M. P. Rigobello, A. Bindoli, A. Casini and F. Mohr, Gold(I) carbene complexes causing thioredoxin 1 and thioredoxin 2 oxidation as potential anticancer agents, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 5518–5528.
- 151 L. Salassa, Polypyridyl metal complexes with biological activity, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2011, 4931–4947.
- 152 G. Shi, S. Monroe, R. Hennigar, J. Colpitts, J. Fong, K. Kasimova, H. Yin, R. DeCoste, C. Spencer, L. Chamberlain, A. Mandel, L. Lilge and S. A. McFarland, Ru(II) dyads derived from α -oligothiophenes: A new class of potent and versatile photosensitizers for PDT, *Coord. Chem. Rev.*, 2015, **282–283**, 127–138.
- 153 A. Zamora, G. Viguera, V. Rodríguez, M. D. Santana and J. Ruiz, Cyclometalated iridium(III) luminescent complexes in therapy and phototherapy, *Coord. Chem. Rev.*, 2018, **360**, 34–76.
- 154 I. Romero-Canelón and A. Vessieres, *Metal-based Anticancer Agents*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2019.