

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Metais e sistema hepático: efeitos
adversos e potencialidades em
diagnóstico e terapêutica**

Iara Fernandes Oliveira

*Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas*

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João Paulo Gil Lourenço

2019

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

**Metais e sistema hepático: efeitos
adversos e potencialidades em
diagnóstico e terapêutica**

Iara Fernandes Oliveira

*Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências
Farmacêuticas*

Trabalho efetuado sob a orientação do Professor Doutor João Paulo Gil Lourenço

2019

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.

Iara Fernandes Oliveira

(Iara Fernandes Oliveira)

Copyright © 2019 Iara Fernandes Oliveira

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar 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 a minha dissertação em especial ao meu Pai,
pois um Carcinoma Hepatocelular roubou-o de nós.

AGRADECIMENTOS

Passados 5 anos chegou o momento que me tornará oficialmente Farmacêutica. Foi uma caminhada com alguns altos e baixos mas nem teria o mesmo gosto chegar aqui se tivesse sido de outra forma.

Quero agradecer a todos aqueles que cruzaram o meu caminho durante estes anos, aos que me estenderam a mão para que pudéssemos caminhar juntos e até mesmo aos que fizeram questão de não o fazer. Tudo aquilo por que passamos molda a pessoa que nos tornamos, e sinto-me muito grata por tudo.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Universidade do Algarve por ter sido a instituição que me proporcionou viver os melhores anos da minha vida. Criar amizades para a vida, tornar-me a pessoa que sou hoje e proporcionar-me todo conhecimento que possui-o. Quero agradecer também à Universidade de Salamanca onde estive ao abrigo do programa ERASMUS+ , pelo acolhimento e por todos os ensinamentos que me foram transmitidos durante os 5 meses em que lá estive.

Ao meu orientador, o Professor Doutor João Lourenço quero deixar um enorme agradecimento por toda a paciência e dedicação ao longo da realização deste trabalho. Sinto que não podia ter feito melhor escolha e agradeço o facto de me ter aceite para sua orientanda.

Um grande agradecimento também a todos os docentes pela aprendizagem e partilha de conhecimentos.

À Professora Doutora Isabel Ramalinho, pela dedicação na formação de melhores profissionais.

À minha mãe, quero agradecer por me incentivar sempre a lutar pelos meus sonhos e me amparar quando tudo parece estar a desmoronar-se. Por acreditar sempre em mim e nas minhas capacidades. E por ter feito tudo aquilo que podia e não podia para que eu conseguisse entrar para a Universidade e a concluísse. Por ser mãe e pai.

À minha irmã Dalila, por estar sempre lá para mim e ser a pessoa que me consegue fazer acreditar que sou capaz de conquistar tudo aquilo que sonho. E demonstra sempre ter orgulho em mim, em tudo o que eu faça.

Aos meus avós, Renato e Maria de Jesus, os maiores pilares da minha vida. Criaram-me desde pequena e ensinaram-me que a humildade é a melhor qualidade que alguém pode ter. Nunca conseguirei expressar por palavras o amor, admiração e gratidão que sinto para com eles.

À minha família de coração, ao meu Padrasto Jorge, à minha irmã Bruna e aos meus avós Germana e António, quero agradecer por terem aparecido na minha vida e a terem tornado melhor. Obrigada por estarem sempre lá para mim.

À Jéssica António, a primeira amiga de curso que fiz. Que se manteve ao meu lado desde do dia 1 e continua, e certamente será uma amizade para a vida. Um obrigada nunca chegará para agradecer toda a amizade, cumplicidade e companheirismo. E todas as vezes em que nos aparavamos uma na outra.

À Rita Bernardo, aquela amiga que se revelou quase no final. Foi companheira de noites de estudo e noites de farra. Uma pessoa de uma inteligência e bom coração gigante. Mil e um obrigadas.

Ao Pedro Guiomar, o maior mau feitio mas o maior coração. Obrigada por me fazer rir e por ter feito questão de estar sempre presente. E valorizar a nossa amizade, levo-o para a vida.

À Catarina Oliveira, por ter sido uma irmã e companheira. Desejo que tenha sempre o dobro do que faz e deseja aos outros. Obrigada por tudo.

Aos restantes colegas e amigos de curso, obrigada pelas noites de estudo e as noites académicas vividas. Obrigada por terem feito parte da minha vida académica.

Ao Henrique Tiago, o Padrinho de Crisma e melhor amigo de uma vida. Obrigada por mesmo longe ter sido um apoio fundamental neste percurso como em todos.

Às minhas melhores amigas, Catarina Martins, Inês Leite, Leonor Duarte e Marta Maria, por toda a paciência para as minhas ausências e por terem estado sempre lá para mim.

A todos os meus familiares e amigos que não foram mencionados de forma directa, quero agradecer por terem feito parte deste percurso.

RESUMO

O fígado é considerado um órgão de extrema importância no nosso organismo por todas as funções que desempenha, como a metabolização e excreção dos fármacos e metais. Assim sendo é muito importante conhecer como e em que condições os metais podem provocar hepatotoxicidade, seja pelo desequilíbrio da quantidade dos metais normalmente presentes no organismo, seja pela administração de metais incorporados em fármacos para diagnóstico ou tratamento.

No caso da deficiência de metais com influência sobre o fígado, refere-se a anemia ferropénica por deficiência em Fe e a síndrome de Menkes por deficiência em Cu. Em excesso, a hemocromatose causada pelo Fe e a cirrose indiana infantil e a doença de Wilson provocadas pelo Cu. O reestabelecimento do equilíbrio nestes casos é obtido através da administração dos metais em falta ou da quelatação com posterior remoção, consoante o caso.

Os metais têm um papel importante quer na imagiologia do fígado quer como potenciais agentes terapêuticos do carcinoma hepatocelular. Na imagiologia do fígado, são utilizados na ressonância magnética nuclear e na tomografia computadorizada por emissão de fóton único, e devem permitir a análise sem que exista acumulação que pode levar a efeitos secundários indesejados. Na terapêutica, diversos metais (na forma de nanopartículas) têm demonstrado potencial no tratamento de um dos cancros mais severos, considerado em 2000 a terceira causa de morte por cancro.

Neste âmbito, o presente trabalho centrou-se na análise bibliográfica da influência de metais, em particular de metais de transição, no fígado. Inclui a abordagem de patologias devido a excesso ou deficiência de metais específicos e em que o fígado tem um papel importante e o uso de fármacos com base em metais de transição, quer com ação terapêutica quer de diagnóstico, direcionados a este órgão.

Palavras-chave: fígado, hepatotoxicidade, metais, imagiologia, quimioterapia, carcinoma hepatocelular.

ABSTRACT

The liver is a very important organ in the body due to the functions it performs. It is responsible for drug metabolism and metals excretion and, it is then of paramount importance to understand how the metals may exert hepatotoxicity, either by the unbalance of those normally present in the body or by metal incorporation in drugs for diagnosis or treatments.

In the case of deficiency of metals with influence on the liver, it is described the Fe deficiency that results in anemia and Menkes syndrome resulting from the deficiency in Cu. In excess, hemochromatosis caused by Fe and indian childhood cirrhosis and wilson's disease caused by Cu. Providing the missing metals or quelation of metals that are in excess using adequate drugs, are the usual therapeutic ways to restore the metals balance in the body.

Metals also play an important role both in liver imaging and as potential drugs for the treatment of the hepatocellular carcinoma. Concerning the liver imaging, metals are used in magnetic resonance imaging and computed tomography single photon emission tomography. They should allow the imaging without being irreversibly accumulated, which could result in undesired side effects. Several metals (in the form of nanoparticles) have also shown interesting potential as drugs for the treatment of hepatocellular carcinoma, one of the most serious cancers that was identified in 2000 as the third leading cause of death by cancer.

In this context, the present work aims at the bibliographical analysis of the influence of metals, in particular of transition metals, in the liver. It includes the pathologies due to excess or deficiency of specific metals and in which the liver has an important role, and the use of drugs based on transition metals, either with therapeutic or diagnostic action, directed to this organ.

Keywords: liver, hepatotoxicity, metals, imaging, chemotherapy, hepatocellular carcinoma.

ÍNDICE REMISSIVO

ÍNDICE REMISSIVO	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	X
I. INTRODUÇÃO	11
II. EFEITOS DO FERRO E COBRE NO FÍGADO	13
2.1. O FERRO E O COBRE	13
2.2. EXCESSO DE FERRO E COBRE	14
2.2.1. HEMOCROMATOSE	14
2.2.2. CIRROSE INDIANA INFANTIL	17
2.2.3. DOENÇA DE WILSON	19
2.3. DEFICIÊNCIA EM FERRO E COBRE	22
2.3.1. ANEMIA FERROPÉNICA	22
2.3.2. SÍNDROME DE MENKES	26
III. METAIS EM DIAGNÓSTICO	29
3.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	29
3.1.1. AGENTES DE CONTRASTE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	30
3.1.2. IMAGIOLOGIA HEPÁTICA	34
3.2. TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA POR EMISSÃO DE FOTÃO ÚNICO	43
IV. UTILIZAÇÃO DE METAIS NA TERAPÊUTICA	48
4.1. CARCINOMA HEPATOCELULAR	48
4.1.1. NANOPARTÍCULAS DE PRATA	48
4.1.2. NANOPARTÍCULAS DE CÁDMIO	51
4.1.3. NANOCOMPOSTOS DE Fe_3O_4 -ZIF-8	52
V. CONCLUSÃO	55
VI. BIBLIOGRAFIA	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura II-1. Deferoxamina: estrutura de um fármaco quelante utilizado na terapêutica da hemocromatose.....	16
Figura II- 2. Deferiprona: estrutura de um fármaco quelante utilizado na terapêutica da hemocromatose.....	16
Figura II-3. Deferasirox: estrutura de um fármaco quelante utilizado na terapêutica da hemocromatose.....	17
Figura II-4. (A) Características histológicas típicas da cirrose indiana infantil (ICC) na apresentação: fibrose pericelular, necrose hepatocítica e infiltrado de células inflamatórias. Ampliação X 400. (B) ICC após 6 meses de terapia com D-penicilamina, mostrando formação de pseudobóbulos e redução de lesão hepatocelular. Ampliação X 400.(C) Fase de cirrose micronodular inativa com septos finos e dano parenquimal mínimo, 1 ano após a terapia. Ampliação X 40. (D) Biópsia praticamente normal mostrando fibrose mínima (reversão da cirrose). Ampliação X 100. Todos os painéis com coloração com hematoxilina-eosina.....	19
Figura II-5. Anéis de Kayser-Fleischer: refletem a deposição de cobre na córnea e tem uma cor acastanhada	20
Figura II-6. O couro cabeludo mostra “cabelo crespo”	27
Figura II-7. A inserção mostra “pili torti” e um fio de cabelo normal sob um microscópio de alta potência	27
Figura III-1. Exemplo de realização de um exame de RMN.....	29
Figura III-2. Num gradiente de campo magnético as diferenças de energia ΔE_1 e ΔE_2 correspondem a diferente distâncias d_1 e d_2 a partir da origem	29
Figura III-3. Gd-BOPTA(Multihance®).....	35
Figura III-4. Gd-EOB-DTPA (Eovist®/ Primovist®).....	36
Figura III-5. Estruturas químicas de dendrímeros de (a) PAMAM e (b) de PPI.	37
Figura III-6. Imagens do fígado axiais de RM com contraste ao nível das veias hepáticas (A) e as veias portal (B) de DAB-Am64-(1B4M-Gd)64	38
Figura III-7. Mn-DPDP (Teslascan®).....	39
Figura III-8. 10 complexos derivados de Mn-PyC3A. (A) Estruturas de complexos derivados de Mn-PyC3A e Mn-PyC3A, (B) derivados de variada lipofilicidade foram preparados através de modificações no braço de 2-metilpiridina dos quelatos de Mn. 40	
Figura III-9. Esquema de uma nanopartícula magnética envolvida em dextrano	41
Figura III-10. Uma representação esquemática da criação de uma imagem usando tomografia computadorizada para emissão de fóton único (SPECT).....	44
Figura III-11. Um scanner usado para imagens combinadas de SPECT e TC. As duas unidades retangulares acima e abaixo do objeto são câmaras usadas para imagens SPECT e a estrutura circular nos pés do sujeito é o tomógrafo computadorizado (foto de cortesia da Siemens Medical Solutois®).....	44
Figura III-12. Representação esquemática de nanopartículas de Fe ₃ O ₄ -DMSA-SMCC-BCZM	46
Figura IV-1. Imagem TEM das NPs Ag preparadas	49

Figura IV-2. Expressão génica relacionada à apoptose: (A) BAX, (B) caspase 8, (C) caspase 3 e (D) caspase 9 nos controles tratados (NPs Ag 50 e 75 µg/mL) e controle não tratado em células HepG2 por 48 horas 50

Figura IV-3. Estrutura do ZIF-8. Corresponde a iões zinco coordenados a 4 iões imidazolato 53

Figura IV-4. Análise de apoptose celular em células MHCC97H determinadas por citometria de fluxo após incubação com Fe₃O₄-ZIF-8, DOX e DOX@Fe₃O₄-ZIF-8 por 24 horas. Taxa de apoptose celular de células MHCC97H com diferentes tratamentos. As células na fase tardia da apoptose foram selecionadas como células apoptóticas. ** p <0,001, n = 3..... 54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela II-1. Parâmetros que avaliam o estado do ferro. 24

LISTA DE ABREVIATURAS

AC- Agentes de contraste

AF- Anemia ferropénica

Ag NPs- Silver nanoparticles (Nanopartículas de prata)

ATP- Adenosine triphosphate (Adenosina trifosfato)

ATP7B- Copper-transporting P-type ATPase (ATPase que transporta o cobre)

BCZM- Bevacizumab humanized recombinant monoclonal antibody (anticorpo monoclonal recombinante humanizado Bevacizumab)

CCK-8- Cell counting kit-8 (Ensaio de contagem de células 8)

CHC- Carcinoma hepatocelular

CLSM- Confocal laser scanning microscopy (Microscopia confocal de varredura a laser)

COMMD1- Copper Metabolism Domain Containing 1 (Proteína da tuberculose)

CT- Computed tomography (Tomografia computadorizada)

CTR1- Copper transporter 1 (Transportador de cobre 1)

DAB- Polypropyleneimine–diaminobutane (Polipropilenoimina-diaminobutano)

DLS- Dynamic light scattering (Espalhamento dinâmico de luz)

DMSA- Dimercaptosuccinic acid (Ácido dimercaptosuccínico)

DOX- Doxorubicina

DP- D-penicillamine (D-penicilamina)

EMA- European medicines agency (Agência europeia do medicamento)

FDA- Food and drug administracion (Administração de comida e fármacos)

Hb- Hemoglobina

HepG2- Hepatocellular adenocarcinoma cell line (linhagem de células do carcinoma hepatocelular)

HFE- Human homeostatic iron regulator protein (Proteína reguladora do ferro homeostático humano)

HL7702- Normal human liver cells (células normais do fígado)

ICC- Indian childhood cirrhosis (*Cirrose indiana infantil*)

IV- Intravenosa

MHCC97H- Hepatocarcinoma cell line (*Linhagem celular de hepatocarcinoma*)

MOF- Metal-organic framework (*Estrutura metálica-orgânica*)

MRP- Multidrug resistance proteins (*Proteínas de resistência a múltiplos fármacos*)

NADPH- Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (*Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina*)

OATP- Organic Anion Transporting Polypeptides (*Proteínas transportadoras de aniões orgânicos*)

PAMAM- Poly(amidoamine) (*Poli(amidoamina)*)

PDI- Polydispersity index (*Índice de polidispersividade*)

Pilli torti- *Estrutura anormal do cabelo*

PPI-G5- *Poli (propileno-imina) de quinta geração*

r₁- *relaxividade*

RMN- *Ressonância magnética nuclear*

SCO- *Síndrome do corno occipital*

SER- *Sistema do retículo endotelial*

SI- Signal intensity (*Intensidade do sinal*)

SM- *Síndrome de Menkes*

SOD- Superoxide dismutase (*superóxido dismutase*)

SPECT- Single photon emission computed tomography (*Tomografia computadorizada por emissão de fóton único*)

SPIOs- Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (*Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro*)

ROS- Reactive oxygen species (*Espécies que reagem ao oxigênio*)

T₁- *Tempo de relaxação “longitudinal”*

T₂- *Tempo de relaxação “transverso”*

TEM- Transmission electron microscopy (*Microscopia eletrónica de transmissão*)

Trientina- Cloridrato de trietilenotetramina

VEGF- Vascular endothelial growth factor (*Fator de crescimento endotelial vascular*)

WD- Wilson's Disease (*Doença de wilson*)

I. INTRODUÇÃO

O fígado é considerado o maior órgão interno do corpo humano e o principal órgão metabólico.¹ Encontra-se localizado no quadrante superior direito do abdómen, apoiado contra a face inferior do diafragma. O fígado desempenha um papel decisivo num elevado número de funções vitais ao nosso organismo dado que tem funções digestivas e excretoras, armazena e metaboliza nutrientes, produz novas moléculas e tem ainda funções importantes na transformação de químicos nocivos^{2,3}. Este órgão é também responsável pela metabolização e excreção dos fármacos e metais que quando atingem concentrações muito elevadas podem provocar hepatotoxicidade³⁻⁵.

Os fármacos são metabolizados nos retículos endoplasmáticos lisos dos hepatócitos em duas fases, sendo que a primeira é uma oxidação catalisada pelo citocromo P-450, citocromo b5 e NADPH. A segunda fase, é uma conjugação com glutathione e uma glucuronidação.⁶ No caso de armazenamento de metais em excesso, podem ser desencadeadas algumas patologias como por exemplo a hemocromatose, cirrose indiana infantil e doença de Wilson, pela acumulação de ferro e cobre⁷⁻⁹. No entanto, inúmeros metais como o Cr, Mn, Cu, Fe, Se, Zn e Mo quando em quantidades insuficientes podem também provocar distúrbios no corpo humano, como seja a anemia ferropénica no caso da deficiência em Fe e o síndrome de Menkes que resulta de deficiência em Cu. Estes metais podem ser fornecidos ao nosso organismo através da dieta.¹⁰⁻¹³

Os metais de transição são também designados como elementos de transição, e segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada, são elementos cujo átomo tem uma subcamada d incompleta, ou pode dar origem a catiões com uma subcamada incompleta¹⁴. Estes desempenham um papel fundamental em diversos processos biológicos devido a propriedades específicas resultantes das suas configurações eletrónicas que incluem as orbitais de valência d e/ou f¹⁵.

O excesso de determinado metal no organismo, e em particular no fígado, podem causar diversas patologias, como já referido acima, no entanto o efeito combinado de diversos metais parece mais complexo do que a simples sinergia dos efeitos adversos de cada um. De facto, foi observado num estudo envolvendo células normais do fígado (HL 7702) que existe efeito aditivo mas no caso de determinados metais o efeito resultante parece ser inferior aos efeitos separados dos metais envolvidos¹⁶.

Diversos metais radioativos têm também mostrado uma utilidade farmacológica significativa, uma vez que podem ser usados quer no diagnóstico médico quer na terapêutica. No entanto, é necessário lidar com o envenenamento acidental que pode ser causado por estes metais. Nestes casos, como a toxicidade dos metais radioativos é quase inteiramente consequência da radiação ionizante, o objetivo terapêutico após a exposição é a quelação dos metais e a sua remoção do corpo tão rápida e completamente quanto possível, visto que a eficácia do tratamento diminui com o aumento do intervalo entre a exposição e o início da terapia⁵.

Atualmente é reconhecida a importância biológica de diversos metais, quer em termos da participação nos processos inerentes ao regular funcionamento do organismo e na indução de patologias quando existe desequilíbrio nas quantidades presentes, quer em termos da importância em terapêutica e diagnóstico. Por outro lado, o sistema hepático com as suas funções de metabolização, excreção e armazenamento está envolvido em diversos processos biológicos envolvendo metais. Assim, o objetivo da presente monografia é análise bibliográfica da influência de metais, em particular de metais de transição, no fígado. Será apresentada uma revisão bibliográfica o mais completa possível e que incluirá patologias devido a excesso ou deficiências de metais específicos e em que o fígado tem um papel importante, o uso de fármacos com base em metais de transição, quer com ação terapêutica quer de diagnóstico, direcionados a este órgão.

II. EFEITOS DO FERRO E COBRE NO FÍGADO

Os metais são fundamentais no nosso organismo, mas é necessário que estejam em equilíbrio, porque quando assim não é, levam ao desenvolvimento de patologias. Deste modo, vamos focarmo-nos no efeito de alguns metais, como o ferro e o cobre no fígado.

2.1. O FERRO E O COBRE

O ferro (Fe) é fundamental no organismo humano e intervém em diversos processos fisiológicos, com particular destaque para a formação do grupo heme da hemoglobina é responsável pela oxigenação dos tecidos, sendo armazenado na forma de ferritina ou hemossiderina nas células do sistema mononuclear fagocitário. Um adulto deve ter cerca de 3,5 a 4 g de ferro no seu organismo. O facto do ferro em excesso no sistema fisiológico humano ser prejudicial e gerar posteriormente algumas patologias, resulta da incapacidade que o organismo tem de aumentar os processos de excreção de Fe para fazer frente ao aumento da sua concentração.¹⁷⁻²⁰

O cobre (Cu) é outro elemento essencial e as suas funções vão desde influenciar a expressão genética, a ser cofator vital para enzimas envolvidas numa ampla gama de funções, tais como o stress oxidativo (superóxido dismutase (SOD)), a pigmentação (tirosinase) ou a produção de energia (citocromo c oxidase). A sua utilidade vital está relacionada com a capacidade de ter dois estados de oxidação, o cúprico (Cu (II)) e cuproso (Cu (I)). Uma alimentação equilibrada fornece 1 a 10 mg de cobre, geralmente de 2 a 5 mg/dia, variando com quantidade de carne, legumes, marisco e chocolate consumidos. A dose diária recomendada é de 0,9 mg/dia. Este é distribuído pelo organismo em duas etapas; na primeira é absorvido na superfície apical dos eritrócitos do intestino delgado (55 a 75%) para ser exportado para a circulação ligado a proteínas séricas e na segunda etapa, é absorvido pelo fígado, onde se liga ao soro ceruloplasmina, à albumina ou à transcupreína e é exportado novamente para a circulação para ser utilizado pelos tecidos periféricos. Após sua captação hepática, o Cu pode ser armazenado no interior dos hepatócitos, excretado no plasma ou na bilis. No caso em que o Cu é armazenado nos hepatócitos forma-se uma ligação específica de metal-proteína,

principalmente metalotioneína, ou a incorporação em várias cuproenzimas. O principal transportador celular de Cu é o CTR1 (transportador de cobre 1), que pertence a uma família de pequenas proteínas com três domínios transmembranares. Antes de ser transportado pelo CTR1, o Cu (II) é reduzido a Cu (I) por redutases na membrana plasmática. Sendo que a ingestão diária de Cu é tipicamente superior à dose recomendada e que sendo a absorção intestinal elevada e não regulada, o equilíbrio normal de cobre é mantido pela regulação da excreção. A exportação para a bilis de Cu e a posterior eliminação na forma de fezes, demonstram que a via hepatobiliar é a via predominante de excreção de Cu.²¹⁻²³

2.2. EXCESSO DE FERRO E COBRE

Como foi referido anteriormente, o armazenamento excessivo de metais no fígado pode dar origem a algumas patologias, entre as quais serão descritas com maior detalhe a hemocromatose, cirrose indiana infantil e doença de Wilson.

2.2.1. HEMOCROMATOSE

A hemocromatose é uma doença hereditária e causada pelo aumento da absorção intestinal de ferro, o que provoca conseqüentemente a acumulação deste em vários órgãos e tecidos como fígado, coração, pâncreas, pele e articulações. Como pode resultar em lesões celulares e teciduais, fibrose e insuficiência funcional, esta patologia leva a outro tipo de complicações tais como cirrose hepática, diabetes mellitus e hiperpigmentação. É uma doença autossômica recessiva e está associada à mutação no gene HFE, que se encontra no braço curto do cromossoma 6.^{18-20,24}

Esta patologia é um dos distúrbios genéticos mais comuns em indivíduos de descendência europeia, polimorfismos genéticos do gene HFE rs1800562, rs1799945 e rs1800730. Os polimorfismos genéticos acabam por afetar também a atividade normal de outra proteína, a hepcidina, que é a hormona reguladora de ferro que inibe a ferroportina, a proteína exportadora de ferro dos eritrócitos e macrófagos. A existência de defeitos na expressão da hepcidina é a causa da maioria dos tipos de hemocromatose hereditária

podendo levar ao aumento da morbidade e eventual morte.^{25,26} Deste modo, a verificação genótipica é essencial para detetar esta patologia. A expressão genótipica é influenciada por fatores ambientais e epigenéticos.

A sintomatologia clínica mais comum é fadiga e hepatomegalia. Os sintomas de início clínico são detetáveis mais facilmente numa idade precoce nos homens comparativamente com as mulheres, dada a perda mensal de fluxo menstrual, razão pela qual a deteção após a menopausa é mais fiável. A hemocromatose provoca predisposição para infeções causadas por *Vibrio Vulnificus*, *Listeina* e vírus da hepatite C.

A principal forma de tratamento para a doença é a flebotomia terapêutica combinada com a ação de quelantes e deve ser iniciada ainda na fase assintomática da doença.^{26,27} A flebotomia terapêutica consiste na remoção duas vezes por semana de 450 a 500 mL de sangue, que provoca a eliminação de 200 a 250 mg de ferro.^{20,28}

A terapia quelante foi desenvolvida para tratar eventuais problemas de saúde relacionados com intoxicação por excesso de metais. Começou por ser utilizada no tratamento da talassémia, que é a forma hereditária mais comum de anemia dependente de transfusão sanguínea regular. No quadro clínico da hemocromatose, a desferroxamina e a deferiprona são utilizadas como quelantes de ferro devido ao aumento excessivo de ferro, provocando toxicidade.^{19,29-34} A quelação é muitas vezes associada à flebotomia, não só pela eficácia redobrada mas também nos casos de HFE com cardiopatia e em pacientes que não toleram a terapia da flebotomia isolada.

Atualmente também existe a possibilidade de realizar quelação como terapêutica, mas o uso isolado da desferroxamina não é comum, por ser uma terapia de elevado custo, de difícil administração, com vários efeitos secundários e com uma excreção diária de apenas 20 a 90 mg de ferro.³⁵ Outra opção é a utilização da deferiprona, um agente quelante absorvido pela via gastrointestinal, administrada numa dose total de 75 mg/kg/dia, por ter um tempo de semi-vida curto, cerca de 1,5 horas tem menos efeitos secundários.²⁹ É necessário proceder-se também a uma orientação dietética dos pacientes, evitando a ingestão de alimentos à base de ferro e de vitamina C e de bebidas alcoólicas porque estes provocam uma maior absorção de ferro.²⁶ Existe também uma nova opção, a deferasirox, que provoca o aumento da excreção de ferro e diminui o ferro hepático. A dose diária recomendada de deferasirox é 20-40 mg/kg/dia por via oral, e não é

recomendada em pacientes com valores de ferro elevados com ferritina sérica menor que 500 µg/L. Pode levar ao aumento da morbidade e em alguns casos pode até provocar a morte. É necessária também uma monitorização regular da função renal dos pacientes através dos valores de creatinina serica e da taxa de filtração glomerular.

Todos estes fármacos (**Figura II-1, 2 e 3**) levam a formas diferentes de excretar o ferro. O complexo com desferroxamina é excretado pela via urinária e pelas fezes, sendo que o complexo com deferiprona é excretado exclusivamente através da urina e o complexo com deferasirox apenas nas fezes.³⁶ Deste modo, concluímos que muitos dos fármacos utilizados na talassémia, para corrigir o excesso de ferro que é causado pelas frequentes transfusões sanguíneas, tem utilidade na hemocromatose e são frequentemente utilizados.

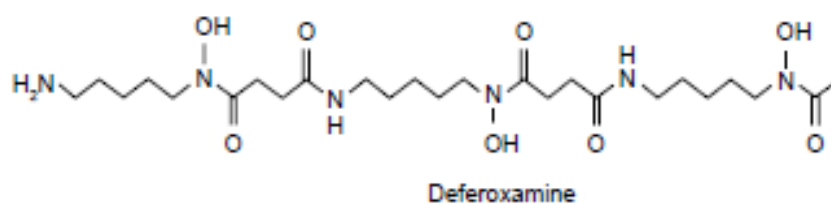


Figura II-1. Deferoxamina: estrutura de um fármaco quelante utilizado na terapêutica da hemocromatose.³⁶

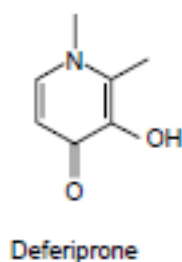


Figura II- 2. Deferiprona: estrutura de um fármaco quelante utilizado na terapêutica da hemocromatose.³⁶

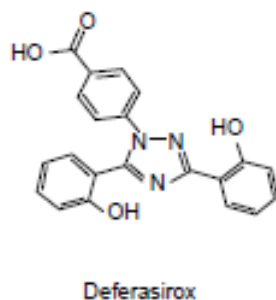


Figura II-3. Deferasirox: estrutura de um fármaco quelante utilizado na terapêutica da hemocromatose.³⁶

2.2.2. CIRROSE INDIANA INFANTIL

A cirrose hepática, também chamada de doença hepática crônica, caracteriza-se pela morte das células do fígado, aparecimento de fibrose e alteração da estrutura, ficando com uma consistência muito dura e com nódulos. Podem existir inúmeras causas para a cirrose hepática mas nesta monografia será apenas referida a cirrose indiana infantil (ICC). A ICC é provocada pela intoxicação hepática por cobre. Os valores de Cu no fígado de crianças com ICC são geralmente superiores a 1000 µg/g, sendo que a quantidade de Cu no fígado de crianças normais é menor do que 50 µg/g.^{37,38}

O Cu é ingerido em alimentos e água em quantidades baixas e normalmente não resulta em toxicidade porque a homeostasia do Cu é mantida por uma combinação da diminuição da absorção e aumento da excreção. São conhecidos alguns casos de intoxicação em crianças por ingestão acidental de sulfato de cobre, que é usado como fungicida para certas culturas (calda bordalesa), o que geralmente resulta em hemólise e que pode ser fatal.^{7,37-39}

A toxicidade do Cu resulta do facto deste metal ser propenso a produzir radicais livres de oxigénio dentro dos hepatócitos, resultando em graves danos intranucleares e citoplasmáticos. Em consequência, provocará uma ação do sistema imunológico e das células do tecido conjuntivo para reparar os danos. A toxicidade a longo prazo, portanto, é tipicamente manifestada no desenvolvimento de cirrose hepática, juntamente com hemólise e danos nos túbulos renais, cérebro e outros órgãos.³⁷

A ICC apresenta maior taxa de incidência numa faixa etária dos 6 meses aos 5 anos (com um média de 18 meses), no sexo masculino e está ainda associada a altas taxas

de consanguinidade parental, e 20 a 22% dos filhos fruto de consanguinidade parental são afetados.^{7,37}

A doença inicia-se lentamente com sintomas pouco específicos como distensão abdominal, febre irregular, choro excessivo e apetite alterado. Podem existir outros sintomas como cólicas, náuseas e vômitos, diarreia e insuficiência renal. Em algumas crianças começa a manifestar-se com a icterícia, mas na maioria a icterícia é um sintoma tardio. Quando a doença não é tratada, o progresso é implacável e dentro de poucos meses a criança está muito doente com hepatoesplenomegalia, ascite, edema e icterícia. A morte ocorre geralmente devido a hemorragia, infecção secundária ou coma hepático.^{7,13}

Muitos estudos epidemiológicos e histórias de alimentação apoiam fortemente a teoria da ingestão de Cu na ICC. Na Índia, têm sido amplamente utilizados vasilhas de cobre e latão (uma liga de 70% Cu e 30% de Zn), especialmente por famílias tradicionais hindus. Em estudos laboratoriais verificou-se que fervendo e armazenando o leite em latão não estanhado ou vasilhas de Cu aumenta a sua concentração no leite em 60 vezes. O Cu liga-se predominantemente à caseína, que é uma proteína constituinte do leite. Quando comparado com o leite, armazenar água para consumo numa vasilha de Cu aumenta a concentração de Cu cerca de 6 vezes. A combinação de fatores na etiopatogenia da acumulação de Cu na ICC parece ser: falta de leite materno levando a introdução precoce de grandes quantidades de leite de origem animal e uso de vasilhas de latão/Cu para ferver ou armazenar leite. As crianças parecem particularmente suscetíveis ao Cu devido ao aumento fisiológico do conteúdo de Cu hepático no feto e recém-nascido com uma dieta que consiste em leite. Em face dos estudos efectuados foi desaconselhado o uso de Cu ou latão na constituição de materiais utilizados para alimentação com leite.^{7,37}

No tratamento da ICC, o fármaco quelante de Cu é a D-penicilamina que, embora ineficaz nos casos tardios, mostra uma remissão em até 60% da ICC precoce. A remissão está associada à recuperação clínica, redução do Cu hepático para os níveis normais e à reversão histológica da cirrose em poucos anos de terapia (*Figura II-4*). Os sobreviventes de ICC continuaram bem apesar da retirada da D-penicilamina após 3-6 anos de terapia. O bem-estar continuado dos sobreviventes da ICC sem penicilamina, vem fortalecer a evidência de que a acumulação de Cu no ICC é um fenómeno adquirido, e não uma deficiência no metabolismo do Cu.^{37,38}

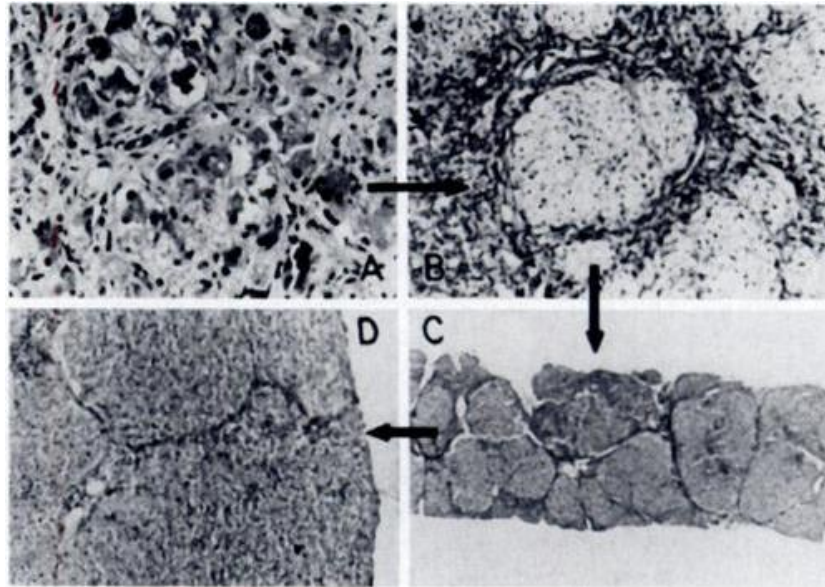


Figura II-4. (A) Características histológicas típicas da cirrose indiana infantil (ICC) na apresentação: fibrose pericelular, necrose hepatocítica e infiltrado de células inflamatórias. Ampliação X 400.

(B) ICC após 6 meses de terapia com D-penicilamina, mostrando formação de pseudobólbulos e redução de lesão hepatocelular. Ampliação X 400.

(C) Fase de cirrose micronodular inativa com septos finos e dano parenquimal mínimo, 1 ano após a terapia. Ampliação X 40.

(D) Biópsia praticamente normal mostrando fibrose mínima (reversão da cirrose). Ampliação X 100.

Todos os painéis com coloração com hematoxilina-eosina.⁷

2.2.3. DOENÇA DE WILSON

A doença de Wilson (WD) ou degeneração hepatolenticular é uma doença hereditária autossômica recessiva que provoca a acumulação tóxica de cobre nos tecidos. Afeta o gene ATP7B presente no cromossoma 13 que codifica a ATPase do tipo P, a proteína transportadora de cobre. Este gene é expresso em hepatócitos, rins e placenta. A ligação de cobre ao ATP7B provoca a hidrólise da adenosina trifosfato (ATP), que fornece energia para o transporte de cobre para o lisossoma, onde o cobre é incorporado na ceruloplasmina sendo então libertado na circulação. Os níveis de cobre são então regulados pela ATP7B, que provoca a sua excreção pela bilis por exocitose quando este se encontra em excesso.

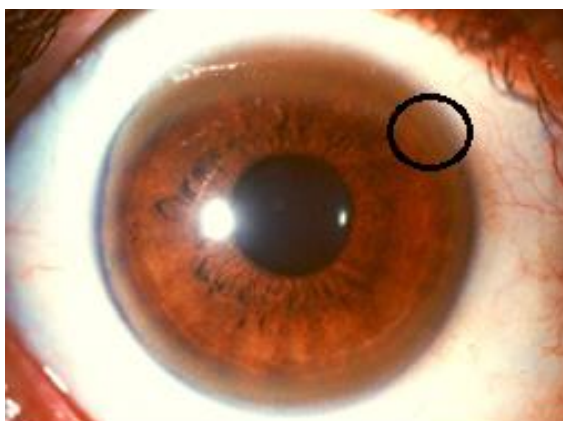
Quando ocorrem mutações na ATP7B, há diminuição da síntese de ceruloplasmina ligada ao cobre, a excreção de cobre é afetada e aumentam os níveis

mitocondriais e nucleares do cobre. A acumulação de cobre ocorre em vários tecidos e órgãos, como o fígado, cérebro, córnea e rins.

Esta patologia manifesta-se tanto no início da infância como em idade adulta avançada, entre os 3 e os 85 anos de idade. As manifestações clínicas mais comuns são neuropsiquiátricas e hepáticas, variando muito com a idade, o que dificulta o diagnóstico desta patologia. Podem existir também manifestações a nível ósseo e muscular, hematológicas, oculares e renais.⁴⁰⁻⁴²

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a incidência da WD no mundo em 2017 era de 1/10 000 a 1/30 000.⁴⁰

Inicialmente, o diagnóstico era feito através de uma combinação da deteção da ceruloplasmina sérica, anéis de Kayser-Fleischer e do cobre na urina de 24 horas.^{40,43} Os anéis de Kayser-Fleischer refletem a deposição de cobre na córnea e tem uma cor acastanhada (*Figura II-5*).⁴⁴



*Figura II-5. Anéis de Kayser-Fleischer: refletem a deposição de cobre na córnea e tem uma cor acastanhada.*⁴⁴

A biópsia hepática e a estimativa de cobre seco só eram usadas quando o método de diagnóstico anterior tinha resultados duvidosos. Actualmente, já estão disponíveis estudos de diagnóstico de mutações genéticas. Na Europa Central, foram identificadas cerca 500 mutações diferentes no gene ATP7B e a mutação prevalente é a H1069Q.⁴¹

Esta patologia é tratada com medicamentos que reduzem a absorção de cobre, suplementos de zinco, ou com agentes quelantes orais que removem o excesso de Cu.

A D-penicilamina (DP) é a terapia padrão desta doença, devido ao seu efeito quelante eficaz, fácil disponibilidade e baixo custo. A DP absorvida rapidamente pelo intestino liga-se a proteínas plasmáticas conseguindo-se excretar mais de 80% do cobre na urina. Cada grama desta molécula promove a excreção de 200 mg de cobre, através da formação de um complexo que forma com este. A administração de penincilamina induz também metalotioneína hepática, uma ligação citoplasmática metal-proteína que impede que o cobre se torne tóxico quando em excesso. Ocorrem melhorias clínicas nos pacientes ao fim de um ano de tratamento mas a função hepática podem levar até 10 anos para normalizar. Deve ser iniciada numa dose baixa e ser progressivamente aumentada. A dose recomendada de DP é de 20 mg/kg/dia em crianças e nos adultos de 750-1500 mg/dia em 2 ou 3 doses fracionadas de estômago vazio. Os alimentos reduzem a absorção de DP para 50%, sendo que a ingestão de alimentos deve ocorrer 1 hora antes da toma e só 2 horas após a toma.

A trietina (cloridrato de trietilenotetramina) é um agente quelante com um mecanismo de acção semelhante a DP mas com menos reações adversas, devendo também ser tomado de estômago vazio. A dose para adultos é de 750-1500 mg/dia em 3 tomas divididas e para crianças 20 mg/kg/dia. Este fármaco foi utilizado inicialmente para intolerantes a DP mas atualmente já é terapêutica de primeira linha sendo o seu custo o entrave no crescimento da sua utilização.

O zinco (Zn) induz a produção de metalotioneína nos enterócitos nos quais o Cu é preferencialmente absorvido. Como os enterócitos são naturalmente excretados nas fezes, desta forma o Cu é sequestrado e impedido de entrar na corrente sanguínea. O Zn também induz este processo nos hepatócitos protegendo-os da toxicidade de Cu. A ação do Zn é mais lenta que os quelantes referidos anteriormente. É utilizado na forma de sais, como acetato, sulfato e gluconato. O acetato de zinco é o preferido devido a apresentar menos efeitos adversos a nível gástrico. Também deve ser tomado de estômago vazio e nos adultos é utilizada uma posologia de cerca de 150 mg/dia divididas em 3 tomas enquanto que uma criança com menos de 50 kg têm a posologia diária de 75 mg.

O tetratiomolibdato de amónio é utilizado para tratar o envenenamento por cobre em animais, e é um fármaco quelante com propriedades anti-angiogénicas. Quando tomado de estômago vazio forma um complexo com o cobre livre na circulação sanguínea e impede a sua captação celular, acabando por ser excretado na urina. A posologia é de 20

mg, 3 vezes ao dia entre as refeições. Pode provocar graves efeitos adversos, no entanto, afirmam ser inferiores aos de trientina.

Estes tipos de tratamentos têm de ser mantidos toda a vida e o transplante hepático é reservado a pessoas que não respondam a nenhum tratamento e se encontrem nos estágios tardios.^{40,41}

2.3. DEFICIÊNCIA EM FERRO E COBRE

Como se verificou, o armazenamento excessivo de metais no fígado é responsável por várias patologias. No entanto, a sua deficiência é também causadora de distúrbios no organismo; são o caso da anemia ferropénica (carência de Fe) e a síndrome de Menkes (deficiência de Cu).

2.3.1. ANEMIA FERROPÉNICA

Fala-se em anemia ferropénica (AF) quando há diminuição do número de glóbulos vermelhos no sangue, ou se verifica que a concentração de hemoglobina se encontra abaixo do desvio padrão da média para idade e sexo. É a causa mais frequente de anemia em crianças. Os valores normais de hemoglobina são nas mulheres acima de 12 g/dL, em caso de menstruação acima de 11 g/dL, e nos homens acima de 13,5 g/dL.⁴⁵⁻⁴⁷

Os glóbulos vermelhos produzidos na medula óssea são os responsáveis pela hemoglobina, pois esta proteína encontra-se dentro destes. O oxigénio liga-se à hemoglobina para ser transportado na corrente sanguínea e posteriormente ser utilizado pelos diferentes tecidos do corpo. Quando os níveis de hemoglobina no sangue são baixos, há uma série de sintomas que são comuns como o cansaço, palidez, irritação constante, diminuição da capacidade de tolerar o exercício físico e o aceleração dos batimentos cardíacos.

A necessidade nutricional de ferro varia de pessoa para pessoa, depende do conteúdo da dieta, biodisponibilidade, as perdas e exigências do crescimento. Desta forma, percebemos que os requisitos do nosso organismo em relação à quantidade de

ferro ingerida na dieta varia com a idade. Quando o equilíbrio entre o ferro ingerido e o necessário é negativo, o organismo recorre as reservas de ferro para manter a eritropoiese e aumenta o risco de desenvolver esta patologia. Existem períodos da vida em que é mais comum o desenvolvimento desta patologia, como no primeiro ano de vida, adolescência e gravidez. As mulheres são mais suscetíveis devido às perdas menstruais e ao facto de durante a gravidez as necessidades de ferro estarem em constante aumento.

A quantidade de ferro assimilada pelo organismo está relacionada com a forma como o ferro está disponível, se se encontra na forma de hemoglobina ou não, e da sua relação com outros componentes da dieta. Na dieta existem componentes facilitadores de absorção como os ácidos cítrico e láctico, e inibidores como fosfatos, fibras e cálcio, entre outros.⁴⁶

Segundo, a Sociedade Americana de Hematologia a anemia por deficiência de ferro afeta cerca de 1,2 biliões de indivíduos em todo o mundo, sendo que o sexo feminino apresenta maior incidência.¹²

O diagnóstico desta patologia é feito com base numa série de questões, exame físico, exames laboratoriais e terapêutica teste. As questões têm o objetivo de esclarecer o tipo de dieta que a pessoa faz, a existência de antecedentes de prematuridade e défice múltiplo de ferro na gravidez, antecedentes de patologia perinatal, perda de sangue, distúrbios gastrointestinais e cognitivos e origem geográfica. O exame físico dado existirem algumas situações características como a palidez, alterações dos tecidos epiteliais das unhas e língua e alterações ósseas. Os exames laboratoriais realizados são o hemograma e parâmetros que avaliam o estado do ferro, que estão discriminados na **Tabela II-1**. A terapêutica teste consiste em administrar sulfato ferroso em doses terapêuticas de 3-6 mg/kg/dia e avaliar a resposta eritropoética, podendo ser considerado positivo com a existência de pico de reticulócitos após 5-10 dias ou um aumento da hemoglobina maior ou igual a 1 g/dL ao fim de 30 dias.^{46,47}

*Tabela II-1. Parâmetros que avaliam o estado do ferro.*⁴⁶

<i>Parâmetro de estudo</i>	<i>Anemia Ferropénica</i>
<i>Ferremia</i>	Diminuído
<i>Capacidade total de saturação</i>	Aumentado
<i>Percentagem de saturação</i>	Diminuído
<i>Ferritina sérica</i>	Diminuído
<i>Protoporfirina eritrocitária livre</i>	Aumentado
<i>Hemoglobina A₂</i>	Normal/ Diminuído
<i>Hemoglobina F</i>	Normal
<i>Hemossiderina em médula óssea</i>	Diminuído
<i>Terapêutica teste</i>	Positivo

O objetivo principal do tratamento é atuar sobre a anemia e corrigir a causa primária. No entanto, também tem como objetivo o armazenamento de ferro no organismo. O tratamento da causa primária assenta sobre iniciar uma dieta apropriada, realizar tratamento no caso de parasitose, refluxo gastroesofágico ou síndrome da má absorção e o controlo das perdas ocultas como nas fezes.⁴⁶

O tratamento da anemia ferropénica com ferro pode ser feito de várias formas, por via oral ou parentérica.

A via oral é a mais escolhida e a dose de ferro é de cerca de 3 a 6 mg/kg/dia, divididos em 1 toma ou 2 ou 3 tomas diárias. O sulfato ferrosol é o mais utilizado e deve se administrado 30 minutos antes ou 2 horas depois das refeições para evitar que os alimentos interajam e diminuam a absorção para 40-50%. Isto porque o ferro é absorvido principalmente nas primeiras porções do intestino delgado, duodeno e jejuno. Sabe-se que a vitamina C aumenta a absorção de ferro, enquanto o chá, café, cereais, antiácidos e dietas ricas em fibras podem diminuir a sua absorção de ferro. O ferro de polimaltose é utilizado quando existe intolerância ao sulfato ferroso, que é a primeira linha de terapêutica. O tempo de tratamento varia, pois para atingir valores normais de hemoglobina deve continuar-se e assim, conseguirmos o armazenamento de ferro. Os efeitos adversos habituais são náuseas, constipação, diarreia, vômitos, dor abdominal e

escurecimento dos dentes. A alteração da coloração dos dentes pode ser revertida com o fim da medicação.

A via parentérica é utilizada quando existe intolerância do ferro oral, causada por alguma patologia adjacente ou por este ser insuficiente para o tratamento e a indicação deve ser sempre dada por um hematologista. Esta via de administração não está relacionada com uma resposta mais rápida ao tratamento, mas sim com o benefício que tem em pacientes com patologias que alteram a absorção de ferro. É o caso da doença inflamatória intestinal, colite ulcerativa ou doença de Crohn, em que geralmente a deficiência de ferro se deve à perda de sangue pelas fezes e o tratamento por via oral provoca sintomas gastrointestinais.

A dose de administração para o tratamento da AF e armazenamento de ferro, é calculada através da **Fórmula II-1**.^{12,45-47}

$$\frac{(Hb\ teórica\ \left[\frac{g}{dL}\right] - Hb\ real\ \left[\frac{g}{dL}\right])}{100} \times volémia\ (mL) \times 3,4 \times 1,5$$

Fórmula II-1. Cálculo da quantidade de ferro a administrar no tratamento de AF.⁴⁶

3,4- Fator de conversão de gramas de hemoglobina em miligramas de ferro.

1,5- Fator para calcular o armazenamento de ferro.

A quantidade total de miligramas de ferro para administração deve ser fracionada em doses que não excedam 1,5 mg/kg/dia, para ser administrado a cada 2-3 dias. O sorbitol de ferro é o fármaco recomendado para a administração intramuscular e na administração intravenosa pode ser utilizado sacarato de ferro ou gluconato de ferro. Os efeitos adversos poderão ser a dor no local da injeção, linfadenite regional, hipotensão, choque anafilático, dor de cabeça, mal-estar, urticária, febre, mialgias e artralgia.

O controlo do tratamento deve ser feito através de um hemograma independentemente da via de administração. Os pacientes que têm valores de hemoglobina inferiores a 8 g/dL devem realizar um hemograma a cada 7 dias até atingir esse valor e depois uma vez por mês até atingirem valores normais para a sua idade. Os pacientes com valores superiores a 8 g/dL só verificam uma vez por mês.

Quando os valores de hemoglobina estão normalizados, é mantido um tratamento com doses profiláticas para prevenir recidivas e a realização do hemograma de controlo após 3 meses após a conclusão do tratamento.

Os casos de insucesso da terapêutica devem-se a erros de diagnóstico, incumprimento do tratamento, prescrição inadequada, a causa primária não ter sido tratada e a existência de má absorção ocultada.

A transfusão de sangue é a indicação em último caso. Normalmente, é porque os níveis de hemoglobina se encontram abaixo de 7 g/dL e nos casos, em que é superior serve para tratar hipoxemia em pacientes com insuficiência respiratória ou descompensação cardiovascular.⁴⁶

Os resultados da terapêutica são visíveis ao final de 15 dias, que é o tempo necessário para a maturação dos reticulócitos em glóbulos vermelhos, de modo a que se consiga aumentar os níveis de hemoglobina. A terapia é normalmente mantida entre 3 a 5 meses.⁴⁵

2.3.2. SINDROME DE MENKES

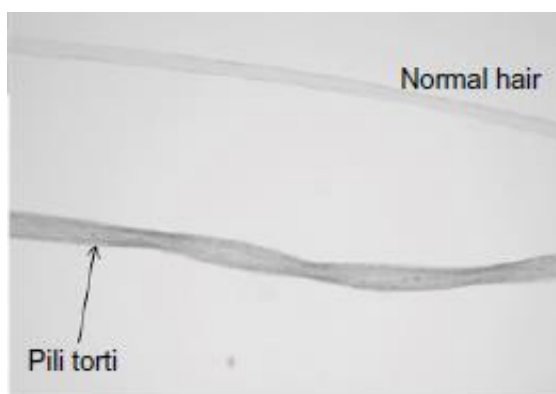
A síndrome de Menkes (SM) ou vulgarmente conhecida como a doença do “cabelo crespo” é neurodegenerativa e de carácter recessivo. É causada por uma mutação no metabolismo de cobre, mais precisamente no gene ATP7A ligado ao cromossoma X. Este gene codifica uma enzima transportadora de Cu chamada ATPase do tipo P, esta é essencial ao metabolismo e transporte do cobre intracelular.^{13,48-52} É mais comum em crianças do sexo masculino e é transmitido à descendência familiar. A incidência de crianças masculinas nascidas vivas com o SM entre 1976 e 1987, na Dinamarca, França, Países Baixos, Reino Unido e Alemanha Ocidental, é estimada entre 1:40 000 e 1:350 000.^{50,53}

O cobre está presente em vários fluidos do nosso organismos devido ao facto de a sua absorção ocorrer em duas fases. Na primeira fase, através da absorção intestinal o cobre chega ao fígado e rins e assim, inicia a segunda fase em que é colocado na corrente sanguínea ligado à ceruloplasmina para chegar aos restantes órgãos.⁵¹

As manifestações clínicas são consequência do funcionamento deficiente das cuproenzimas. Estas compreendem a estrutura anormal do cabelo (pili torti) (*Figura II-6 e 7*), o atraso do desenvolvimento neuropsicomotor, a hipopigmentação, as convulsões e as alterações ósseas, no tecido conjuntivo e arteriais. A maioria das crianças portadoras não apresentam sintomas durante os primeiros meses de vida, e no período neonatal as alterações podem ser inespecíficas.^{13,48,50}



*Figura II-6. O couro cabeludo mostra “cabelo crespo”.*⁵⁴



*Figura II-7. A inserção mostra “pili torti” e um fio de cabelo normal sob um microscópio de alta potência.*⁵⁴

O diagnóstico inicial de SM é suportado pelas manifestações clínicas visíveis e apoiado pelos níveis reduzidos de cobre sérico e ceruloplasmina. A ceruloplasmina é alvo de análise porque pelo menos 70% do cobre sérico é incorporado nela. No período neonatal, os níveis reduzidos também são característicos de recém-nascidos saudáveis. A análise de catecolaminas plasmáticas é indicativa de deficiência de dopamina β -hidroxilase que pode ser usada como um teste diagnóstico de confirmação quando o diagnóstico clínico sugere SM. Outros exames como a análise do cabelo através do

microscopico óptico, servem para determinar a presença de alguns dos sintomas, como alterações capilares e as radiografias para detetar os cornos occipitais. O diagnóstico molecular permite identificar a presença da mutação quer no período neo-natal, quer em indivíduos adultos. Nas famílias em que existe casos de SM existem dois polimorfismos que podem ser utilizados como marcadores genéticos, o polimorfismo de repetição GT e o polimorfismo Val767Leu.

Estão descritas várias formas de SM, sendo a síndrome do corno occipital (SCO) a forma mais leve, sendo caracterizado por problemas neurodegenerativos e existência de cornos occipitais. É a forma mais comum de SM em que as crianças acabam por falecer ainda com pouco tempo de vida.

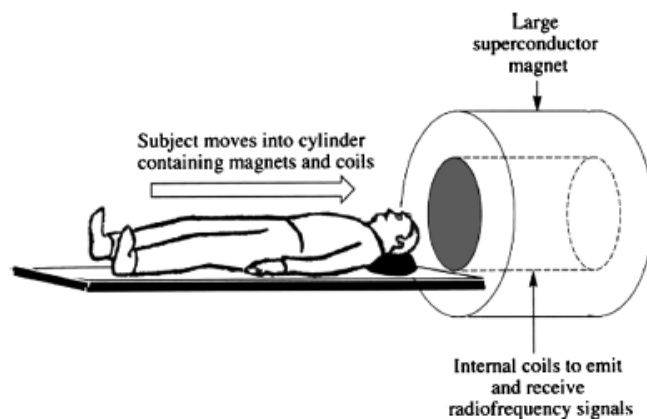
O objectivo do tratamento prende-se com a reposição dos níveis de cobre. No entanto, a terapêutica oral não é uma opção, pois o Cu é capturado no intestino, e impedido de chegar à corrente sanguínea. Desta forma, é necessário recorrer à administração por via parentérica ou subcutânea. Para tal, são utilizados compostos de cobre. A cobre-histidina provou ser eficaz na modificação substancial da progressão da doença, melhora no retardamento neurológico e inexistência de convulsões. Este tratamento não consegue, no entanto, resolver as anomalias esqueléticas que se desenvolveram em pacientes com SCO. O tratamento com cobre-histina não pode, ainda assim ser considerada a cura para a síndrome de Menkes. A proteína da turberculose (COMMD1) mostrou num estudo restaurar a expressão, localização e atividade de transporte de cobre em portadores da mutação em ATP7A, pelo que, poderá vir a ser considerada uma alternativa terapêutica.⁵²

III. METAIS EM DIAGNÓSTICO

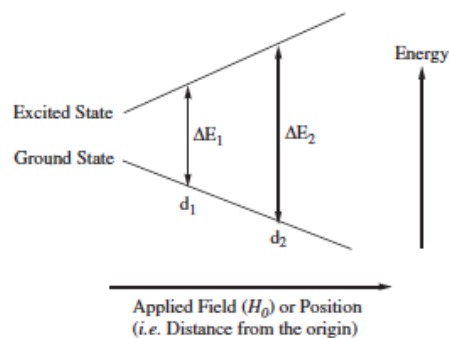
3.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A ressonância magnética nuclear (RMN) cria uma imagem em forma de tomografia computadorizada com base no efeito que o campo magnético provoca no núcleo dos átomos de hidrogénio das moléculas de água existentes no corpo humano.

Para obter uma imagem de RMN, o sujeito é colocado dentro de uma câmara circular de modo a que um gradiente de campo magnético seja aplicado no local de interesse (*Figura III-1*). Depois de localizar o campo magnético na região a analisar, são aplicados pulsos de radiação na gama das radiofrequências que levam à excitação dos núcleos de hidrogénio (inversão dos momentos magnéticos) e de cujo decaimento resulta o sinal de RMN. A frequência da radiação eletromagnética a aplicar depende da intensidade do campo magnético (*Figura III-2*).



*Figura III-1. Exemplo de realização de um exame de RMN.*³³



*Figura III-2. Num gradiente de campo magnético as diferenças de energia ΔE_1 e ΔE_2 correspondem a diferentes distâncias d_1 e d_2 a partir da origem.*³³

Assim, com a adequada sequência de pulsos e uma particular configuração física do equipamento, é possível obter uma imagem tridimensional da distribuição das moléculas de água na zona analisada. O contraste resulta maioritariamente da concentração de água nos diferentes tecidos, no entanto, outros factores que têm um efeito sobre a relaxação dos prótons também condicionam a imagem obtida. Na prática, e para efeitos de análise o sujeito é dividido em inúmeros elementos de volume (ca. 1mm x 1mm x 5 mm) cujo sinal é medido.³³

Os prótons podem relaxar do seu estado de maior energia quer através da interação com a vizinhança, quer por transferência de energia para outros prótons. Assim, são definidos dois tempos de relaxação: T_1 (tempo de relaxação “longitudinal”) que está associado à transferência de energia dos prótons excitados para a vizinhança, e T_2 (tempo de relaxação “transverso”), que está associado à transferência de energia entre os estados excitado e fundamental dos prótons. Para cada elemento de volume, o sinal de RMN é dado pela seguinte equação, (**Equação III-1**).

$$SI = [H]Hv \left[\exp\left(-\frac{SE}{T_2}\right) \left[1 - \exp\left(-\frac{PR}{T_1}\right) \right] \right] \quad (\text{III-1})$$

em que Hv está relacionado com a troca de moléculas de água entre elementos de volume e PR e SE são parâmetros definidos pelo operador que estão associados à sequência de pulsos utilizada. Assim, além da concentração de moléculas de água, o sinal de RMN pode ser consideravelmente alterado se os tempos de relaxação dos prótons, T_1 e/ou T_2 , forem alterados. É sobre estes parâmetros que actuam os agentes de contraste de RMN sendo que a alteração depende do campo magnético aplicado e da natureza do agente.³³

3.1.1. AGENTES DE CONTRASTE DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Os agentes de contraste podem ser categorizados, de acordo com as seguintes características: propriedades magnéticas, composição química, presença de átomos metálicos, via de administração, efeito na imagem de ressonância magnética, biodistribuição e aplicação.⁵⁵

Agentes de contraste paramagnéticos são aqueles cujos átomos contêm elétrons desemparelhados podendo assim produzir um efeito significativo nos valores de T_1 e/ou T_2 .

Alguns compostos não-metálicos desse tipo, conhecidos como radicais, podem ser altamente reativos e tóxicos. Em contraste, compostos de metais de transição cujo metal tem mais de um elétron desemparelhado podem actuar como agentes de contraste sem a reatividade associada aos radicais. Estes compostos, que apresentam um momento magnético significativo, podem, através desse momento magnético interferir nos processos de relaxação dos prótons que se encontram na sua vizinhança (alteração de T_1 e/ou T_2). Estes metais são administrados na forma de complexos, normalmente com ligandos polidentados de modo a saturar quase na totalidade a coordenação, de modo a limitar a sua reactividade e conseqüente toxicidade. É também comum a presença de uma ou duas moléculas de água, as quais são trocadas muito rapidamente com a vizinhança e deste modo é transmitido o efeito do momento magnético do metal a um maior número de prótons. O tipo de ligando nestes complexos é crucial para estabilidade e comportamento in vivo podendo também influenciar a forma como o metal interfere nos tempos de relaxação dos prótons.^{33,55}

A maioria dos agentes de contrastes de RMN aprovados para uso clínico são complexos de Gd(III), que têm 7 elétrons desemparelhados, e de Mn (II) com 5 elétrons desemparelhados bem como nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro.

Vamos abordar à frente a utilização de agentes de contraste de RMN específicos para o fígado.

Os complexos de gadolínio são amplamente utilizados para a imagiologia do fígado e de outros órgãos, e, sendo assim, é importante abordar algumas particularidades que podem melhorar ou prejudicar o contraste que é obtido em RMN.

Existem duas propriedades bastante importantes para garantir que o complexo escolhido como agente de contraste (AC) provoca o maior contraste possível: a relaxividade (r_1) e a capacidade de ficar retido na corrente sanguínea.⁵⁶

A velocidade de relaxação longitudinal de prótons da água, $\frac{1}{T_1}$, é linearmente dependente da concentração de gadolínio complexado. A capacidade de provocar

aumento da velocidade de relaxação é expressa através de r_1 , com unidades $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$ (**Equação III-2**). O r_1 é determinado pela seguinte fórmula.^{56,57}

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{\text{observado}} = \left(\frac{1}{T_1}\right)_d + r_1[Gd] \quad (\text{III-2})$$

As alterações na velocidade de relaxação (que por sua vez darão origem a um aumento do contraste) resultantes da relaxação paramagnética podem ser divididas em efeitos de esfera interna e de esfera externa (**Equação III-3**). A esfera interna está relacionada com a relaxação dos prótons das moléculas de água coordenadas ao metal de transição e a esfera externa com a relaxação dos prótons das moléculas de água na segunda esfera de coordenação^{56,57}

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_p = \left(\frac{1}{T_1}\right)_{\text{esfera interna}} + \left(\frac{1}{T_1}\right)_{\text{esfera externa}} \quad (\text{III-3})$$

A contribuição da relaxação longitudinal resultante do mecanismo de esfera interna é determinado pelo número de moléculas de água coordenadas ao Gd^{3+} , a taxa de permuta das moléculas entre água coordenadas com águas da vizinhança, e o tempo de relaxação dos prótons das moléculas de águas coordenadas (**Equação III-4**).^{56,57}

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{\text{esfera interna}} = \frac{P_M q}{T_{1M} - \tau_M} \quad (\text{III-4})$$

Na equação 4, P_M representa a fração molar de Gd^{3+} , T_{1M} é o tempo de relaxação dos prótons das moléculas de água coordenadas ao Gd^{3+} , τ_M é ao tempo de residência das moléculas de água coordenadas. T_{1M} é dado pelas equações de Solomon-Bloembergen, que representam a soma das contribuições dipolar (“através do espaço”) e escalar, ou contato (**Equação III-5**).^{56,57}

$$\frac{1}{T_{1M}} = \frac{2}{15} \frac{\gamma_I^2 g^2 S(S+1) \beta^2}{r^6} \left[\frac{7\tau_c}{(1+\omega_s^2\tau_c^2)} + \frac{3\tau_c}{(1+\omega_s^2\tau_c^2)} \right] + \frac{2}{3} S(S+1) \left(\frac{A}{h}\right)^2 \frac{\tau_e}{(1+\omega_s^2\tau_c^2)} \quad (\text{III-5})$$

O γ_I é a relação giromagnética do próton, g é o fator eletrónico, S é o spin total do eletrão do metal, β é o Magneton de Bohr, r é a distância próton-metal, ω_I e ω_s são as

frequências de Larmor de precessão eletrónica e do próton, respectivamente, e A/h é a constante de acoplamento hiperfino eletrões-núcleo. Os mecanismos de relaxação dipolar e escalar são modulados pelos tempos de correlação τ_c e τ_e (**Equação III-6 e 7**).^{56,57}

$$\frac{1}{\tau_c} = \frac{1}{T_{1e}} + \frac{1}{\tau_M} + \frac{1}{\tau_R} \quad \text{(III-6)}$$

$$\frac{1}{\tau_e} = \frac{1}{T_{1e}} + \frac{1}{\tau_M} \quad \text{(III-7)}$$

O T_{1e} é o tempo de relaxação longitudinal do spin do eletrão, τ_M é o tempo de permanência da água (H_2O) como mencionado acima, e τ_R é o tempo rotacional de toda a unidade metal- H_2O . A rotação é talvez a variável mais crítica nessas equações.^{56,57}

Reconheceu-se precocemente que o tempo de correlação rotacional de complexos de Gd (III) pequenos é o fator dominante no tempo de correlação efetivo τ_c . A combinação de AC em RMN com uma macromolécula pode, de forma eficiente, retardar o movimento de rotação do complexo e aumentar τ_r e, assim, τ_c , elevar substancialmente r_1 . Em relação às propriedades dos polímeros, a rigidez é afetada de forma significativa a relaxividade dos AC, aumentando-a. Devido ao facto dos polímeros rígidos retardarem o movimento rotacional do complexo de forma mais eficiente, podem, portanto, aumentar o r_1 dos AC de forma significativa em relação aos polímeros flexíveis. A conjugação com polímeros pode também reduzir o número de moléculas de H_2O coordenadas (q) e tornar mais lenta a taxa de troca entre a H_2O coordenada e H_2O da segunda esfera de coordenação em grandes quantidades, aumentando a τ_M de AC. E portanto, podem diminuir assim o r_1 .^{56,58-64}

Em relação à retenção na circulação sanguínea, as moléculas pequenas de AC são rapidamente distribuídas para o fluído extracelular e excretadas por filtração glomerular rapidamente após a administração. No entanto, as ressonâncias magnéticas exigem uma retenção prolongada na circulação sanguínea, e a retenção prolongada no corpo para assim fornecer um período de tempo mais amplo para a análise. A combinação de AC com macromoléculas pode aumentar os tempos de retenção na circulação sanguínea dos ACs, uma vez que o facto de apresentarem um tamanho maior dificulta a sua saída para dos vasos sanguíneos para o líquido extracelular e desta forma diminui a depuração renal.

Geralmente, o incremento do tempo de circulação sanguínea é proporcional ao peso molecular das macromoléculas. O $t_{1/2}$ de um AC pode ser facilmente adaptado, alterando os pesos moleculares da molécula transportadora. Além disso, a hidrofiliicidade, a modificação da superfície, a forma e a flexibilidade dos AC também afetam grandemente sua farmacocinética no sangue. Em virtude da variabilidade das estruturas poliméricas, a farmacocinética e a biodistribuição dos AC podem ser adaptadas. de acordo com várias aplicações.^{56,65}

3.1.2. IMAGIOLOGIA HEPÁTICA

Para a imagiologia do fígado estão aprovados (segundo a Food and Drug Administration (FDA) e a European Medicines Agency (EMA)) 2 complexos de Gd, Gd-BOPTA (Multithance®) e Gd-EOB-DTPA (Eovist®/Primovist®), 3 complexos de Mn, Mn-DPDP (Teslascan®), MnCl₂ (Lumenhance®) e Mn-PyC3A-3-OBn, e ainda agentes constituídos por nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIO) como o ferumóxido (Feridex®/Endorem®) e ferucarbotran (Resovist®/Cliavist®).

Com os avanços no hardware e software de imagens de ressonância magnética, tornou-se possível obter imagens de alta resolução do fígado. Para esta imagiologia em particular, foram utilizados vários grupos para aumentar a relaxividade e a retenção do AC no fígado e corrente sanguínea. A existência de grupos hidrofóbicos nos complexos de Gd³⁺ promove a captação hepática e excreção a nível dos ductos biliares, vesícula biliar e intestinos, tendo como resultado a visualização do fígado “brilhante” na RMN. Sendo assim, os grupos hidrofóbicos dos AC aumentam o sinal do parênquima hepático.^{33,56}

O Gd-BOPTA (Multithance®) é derivado do Gd-DTPA (usado para a imagiologia dos vasos sanguíneos) com a adição de uma porção benzoilmetilo, que permite a captação hepatocelular (**Figura III-3**). Dado a sua farmacocinética ser semelhante ao espaço extracelular permite uma vascularização precoce e uma rápida difusão na parte exterior do espaço extracelular, no entanto não atravessa a barreira hematoencefálica. Nos estudos realizados em ratos, concluiu-se que cerca de 3 a 5% é absorvido pelo hepatócitos. A excreção da dose que não é absorvida é realizada por filtração glomerular e a dose absorvida é posteriormente por excreção biliar, sendo que esta proporção pode variar em relação da função hepática e renal. Os hepatócitos de rato absorvem ativamente Gd-

BOPTA através de capilares sinusóides através de proteínas transportadoras de aniões orgânicos (OATP: rOATP1A1, rOATP1A4 e rOATP1B2) enquanto a excreção em canalículos biliares envolve proteínas de resistência a múltiplos fármacos (rMRP2). Em comparação com alguns AC extracelures, o Gd-BOPTA tem menos de 2 vezes a relaxividade no plasma e 6 vezes mais alto nos hepatócitos. Isso explica o alto sinal produzido pela quantidade relativamente pequena de agente de contraste nos hepatócitos na fase hepatoespecífica. É caracterizado por uma distribuição semelhante ao Gd-DTPA (Magnevist®) nos primeiros 5 minutos, enquanto o aumento máximo do fígado devido à captação hepática é alcançado em 60 minutos. A fase hepatoespecífica é adquirida entre 60 e 120 min após administração. O Gd-BOPTA está disponível numa concentração de 0,5 mmol [Gd]/mL, e a FDA recomenda uma dose de 0,1 mmol [Gd]/kg, resultando em 0,2 mL/kg de peso corporal. A FDA aprovou o Gd-BOPTA nos EUA em 2004, para imagiologia do sistema nervoso central mas está aprovado especificamente para a imagiologia do fígado pela Agência Europeia do Medicamento (EMA). A técnica de injeção é semelhante ao AC extracelulares.^{33,66}

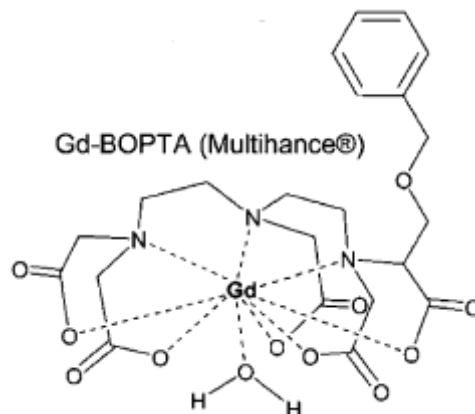


Figura III-3. Gd-BOPTA(Multihance®).⁵⁶

O Gd-EOB-DTPA (Eovist®/Primovist®) é derivado do Gd-DTPA com a adição de uma grupo etoxibenzilo e possui algumas particularidades em relação à sua farmacocinética (Figura III-4). Após injeção intravenosa, tem fraca ligação às proteínas plasmáticas, apenas 10%, resultando numa maior relaxividade do que um AC extracelular. Difunde-se no espaço extracelular e não atravessa a barreira hematoencefálica, sendo excretado em cerca de 50% por filtração glomerular e 50% por excreção hepatobiliar. Os hepatócitos capturam ativamente o Gd-EOB-DTPA dos capilares sinusóides via OATP1B1 e OATP1B3, enquanto as proteínas MRP estão

envolvidas no efluxo de Gd-EOB-DTPA dos hepatócitos. Em particular, o MRP2 é expresso no lado canalicular e transporta o Gd-EOB-DTPA dos hepatócitos para os canalículos biliares, enquanto o MRP3 é expresso no lado sinusoidal. A expressão de MRP3 no parênquima hepático é baixa e pode estar aumentada no carcinoma hepatocelular ou na colestase. Vários fármacos e substâncias endógenas interferem com o Gd-EOB-DTPA devido a uma via comum de excreção hepática, como é o caso de hiperbilirrubinemia (≥ 2 mg/dL) em que a excreção hepatobiliar é significativamente reduzida. A fraca ligação a proteínas no citoplasma hepatocelular aumenta a relaxividade do Gd-EOB-DTPA, sendo aproximadamente três vezes maior que o AC extracelular. Uma diferença importante é a captação hepatocelular, o Gd-BOPTA leva quase 40 minutos e o Gd-EOB-DTPA começa ao fim de 35-40 segundos. Esse aspecto tem uma importante consequência clínica: após 3 a 5 minutos, o aumento do parênquima hepático é significativamente influenciado pela captação hepática de Gd-EOB-DTPA. O Gd-EOB-DTPA está comercialmente disponível numa concentração de 0,25 mmol [Gd]/ml, e o FDA aprovou na União Europeia (UE) 2004 nos uma dose de 0,025 mmol [Gd]/kg de peso corporal, igual a 0,1 ml/kg.^{33,66}

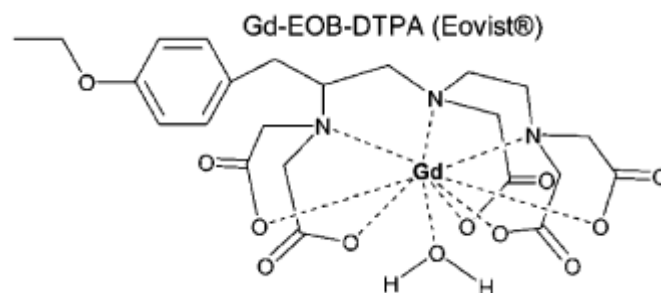


Figura III-4. Gd-EOB-DTPA (Eovist®/ Primovist®).⁵⁶

Em 2017, e em consequência de uma avaliação dos riscos do uso de agentes de contraste de Gd, a EMA fez uma reavaliação das autorizações destes fármacos sendo que algumas foram mesmo suspensas. No entanto, manteve a recomendação do uso do Primovist® e a recomendação do Multihance® para uso específico em imagiologia do fígado.⁶⁷

Além dos complexos de Gd aprovados para uso clínico muitos outros têm sido desenvolvidos ao longo dos anos tentando compreender e/ou melhorar a forma de actuação dos agentes de contraste de Gd, com o objectivo final de obter fármacos mais

específicos e com menos efeitos secundários. Entre estes estudos podem ser referidos os trabalhos de H. Kobayashi et al. envolvendo dendrímeros em que se verificou que um AC à base de dendrímeros de poli (propileno-imina) de quinta geração (PPI-G5) acumula no fígado 50% da dose injetada no espaço de 15 minutos após a injeção. Os AC baseados em PPI são mais hidrofóbicos acumulado-se mais no fígado e menos no sangue comparativamente com os AC baseados em dendrímeros de poli (amidoamina) (PAMAM) que são menos hidrofóbicos (**Figura III-5**).⁵⁶

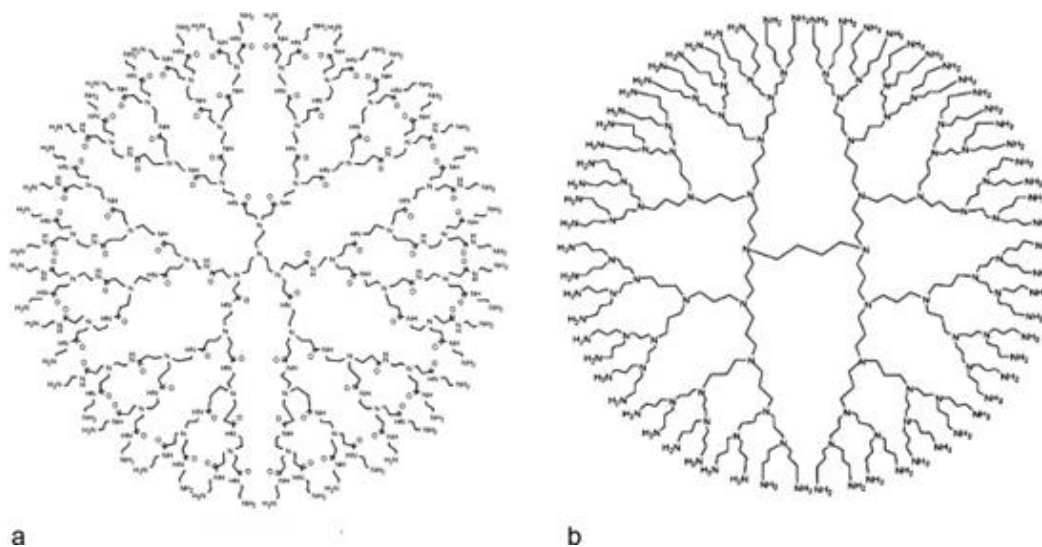


Figura III-5. Estruturas químicas de dendrímeros de (a) PAMAM e (b) de PPI.⁶⁸

A ressonância magnética reforçada pelo AC com dendrímero-PPI foi capaz de visualizar o parênquima hepático e ambas as veias porta e hepática de 0,5 mm de diâmetro em ratos. Foi realizada a experiência num carcinoma do cólon num rato com metástase hepática e esta indicou que a dinâmica micro-RMN com PPI-G5-dendrímero-AC poderia aumentar homogeneamente a imagem do parênquima hepático normal e visualizar os tumores micrometastáticos de 0,3 mm de diâmetro no fígado de ratos com um contraste melhor do que com Gd- DTPA.⁵⁸

O DAB-Am64-(1B4M-Gd)64 é um novo agente de contraste macromolecular para RM para o diagnóstico de micro-metástase hepática, consistindo num dendrímero de polipropilenoimina diaminobutano (DAB) conjugado com um derivado bifuncional de DTPA complexando o Gd (III). Este é capaz de provocar contraste após 20 minutos de ser injetado numa quantidade de 0,033 mmol/kg (**Figura III-6**).⁶⁹

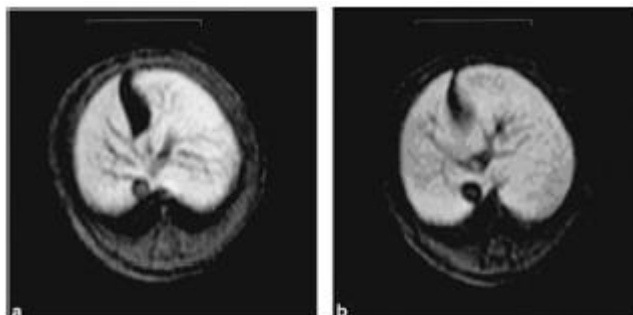


Figura III-6. Imagens do fígado axiais de RM com contraste ao nível das veias hepáticas (A) e as veias portal (B) de DAB-Am64-(1B4M-Gd)^{64, 68}

Desenvolveram-se AC específicos para o fígado, introduzindo D-galactose nos conjugados polilisina-DTPA/DOXA para melhorar preferencialmente a imagem do fígado. Prepararam-se também AC dendríticos direccionados ao fígado através da introdução de múltiplos grupos galactosil. Os AC dendríticos proporcionaram melhor realce da intensidade do sinal (SI) no fígado de ratos, especialmente nos 60 min pós-injeção, sendo que o realce mais eficiente foi obtido com os compostos contendo grupos galatosil.⁵⁶

Sendo o Mn um metal que forma complexos paramagnéticos pode ser usado como agente de contraste em RM. Além disso, o Mn é um elemento nutricional que o corpo humano pode incorporar ou excretar conforme necessário, em princípio, evitando preocupações de acumulação de longo prazo, ao contrário de Gd. Um dos primeiros complexos aprovados pela EMA em 2002 foi o Mangafodipir trissódico (Mn-DPDP), de nome comercial Teslascan® (**Figura III-7**). O complexo sofre transmetalção com Zn plasmático após injeção intravenosa, libertando iões Mn^{2+} que são depois absorvidos preferencialmente pelos hepatócitos saudáveis, aumentando a intensidade do sinal do parênquima hepático. Assim, na presença de uma lesão hepática focal, existe um alto contraste entre a lesão e o fígado saudável e, portanto, proporciona melhor detecção, caracterização e avaliação das lesões. No entanto, verificou-se que ao se dissociar produzindo iões livres de Mn(II) leva à existência de toxicidade, mais concretamente a síndrome de manganismo. Este provoca sintomas semelhantes à doença de Parkinson, devido à acumulação de manganês no cérebro. E pode também causar depressão na função cardíaca. Por estes motivos foi retirado o mercado (FDA em 2003 e EMA em 2012).⁷⁰



Figura III-7. Mn-DPDP (Teslascan®).⁷¹

O MnCl₂ (Lumenhance®) é um agente de contraste oral que foi avaliado e aprovado para uso médico, apesar de apresentar uma grande desvantagem que é usar o manganês na forma iônica como agente de contraste, pois este provoca toxicidade celular. Descobriu-se que o manganês (II) aquoso confere neurotoxicidade a uma LD₅₀ em ratos injetados por via IV com uma concentração de 0,3 mmol/kg e por via intraperitoneal com 1,0 mmol/kg. A administração oral deste AC melhora a sua toxicidade devido às baixas taxas de absorção do metal e eliminação pré-sistêmica. Além disso, o manganês na sua forma iônica tem uma meia-vida muito curta no plasma e, portanto, não pode ser considerado como um agente efetivo da corrente sanguínea. Portanto, fundamental para o sucesso da aplicação de agentes à base de manganês é a sua capacidade de atingir o local de interesse usando uma dose menor, mantendo a detectabilidade por RMN. Este agente de contraste teve aprovação da FDA em 1997 mas encontra-se atualmente descontinuado.⁷²

Diversos estudos têm sido realizados no sentido de desenvolver agentes de contraste à base de Mn que não apresentem os inconvenientes dos compostos referidos acima. Um exemplo desses complexos que foram alvo de investigação é o Mn-PyC3A (**Figura III-8A**) e derivados (**Figura III-8B**).⁷³

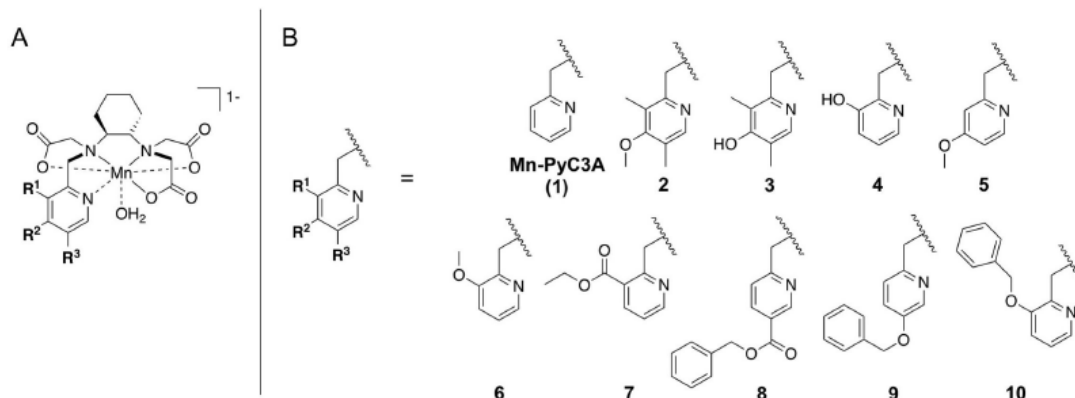


Figura III-8. 10 complexos derivados de Mn-PyC3A. (A) Estruturas de complexos derivados de Mn-PyC3A e Mn-PyC3A, (B) derivados de variada lipofilicidade foram preparados através de modificações no braço de 2-metilpiridina dos quelatos de Mn.⁷³

Pretende-se que o complexo de Mn possa ser administrado com segurança como uma injeção em bólus IV (intravenosa) sendo assim necessário comprovar que é inerte. Também tem de exibir uma combinação de depuração sanguínea rápida e captação preferencial de hepatócitos, para proporcionar um realce diferenciado entre os tecidos benigno e maligno nos minutos seguintes à injeção. O complexo também deve ser rapidamente eliminado, pois a probabilidade de exposição a íons metálicos dissociados aumenta com o tempo de permanência.⁷³

O complexo Mn-PyC3A-3-OBn (10) surgiu como o principal candidato devido a uma combinação de alta relaxividade sem que exista libertação do íon Mn²⁺ in vivo, depuração sanguínea rápida e captação hepatocelular eficiente por via lipofílica. A depuração plasmática renal lenta diminui a capacidade de um agente de direcionamento do fígado em diagnósticos diferenciais ou prolonga o tempo para obtenção de imagens em fase retardada. O Mn-PyC3A-3-OBn tornou os tumores do fígado visivelmente hipointensos em ratos e é totalmente eliminado em 24 horas após a injeção.⁷³

Para além dos complexos de gadolínio e de manganês, existem também agentes que incorporam nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIOs). Estas nanopartículas são agentes T₂ e apresentam usualmente tamanhos compreendidos entre 50 e 150 nm. Alguns exemplos de SPIOs, que estão ou estiveram aprovados para uso clínico em imagiologia hepática, são o ferumóxido (Feridex®/Endorem®) e ferucarbotran (Resovist®/Cliavist®).

Partículas de óxido de ferro superparamagnéticas como magnetite (Fe_3O_4) ou maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são estruturas cristalinas de óxido de ferro insolúveis em água e com um diâmetro de 4 a 10 nm. Estes cristais são revestidos com dextrano ou outro polissacarídeo biodegradável que impede a agregação de partículas.

Estas nanopartículas ao contrário do Gd provocam um contraste negativo, designado contraste hipotenso, reduzindo o tempo de relaxação T_2 . As nanopartículas de ferro interagem umas com as outras através de interações de Van der Waals, provocando a sua agregação a qual pode ser alterada com o revestimento. A agregação dificulta a imagiologia pois a marcação de células fica comprometida, podendo ser evitada pela previsão do potencial zeta das nanopartículas. O potencial zeta das nanopartículas é o potencial que mede a magnitude da repulsão ou da atração eletrostática das cargas entre nanopartículas. Quando os potenciais zeta são opostos não existe agregação porque estas repelam-se. A introdução das nanopartículas em células pode alterar o potencial tanto de umas como de outras, portanto o facto de o revestimento ser de carga positiva não garante que o potencial zeta da nanopartícula seja positivo.

O revestimento das nanopartículas também define o tempo de meia-vida destas na corrente sanguínea, sendo que os revestimentos hidrofóbicos normalmente levam a tempos de meia-vida curtos. As nanopartículas são também revestidas por razões de citotoxicidade, pois sem o revestimento aumenta a produção de espécies reativas de oxigénio, diminui a proliferação celular e pode até induzir a morte celular. O dextrano é o revestimento mais utilizado para estas nanopartículas e parece contribuir para uma melhor captação (**Figura III-9**). Este revestimento modifica o comportamento biológico das partículas de óxido de ferro e torna o tamanho total substancialmente maior.^{70,74}

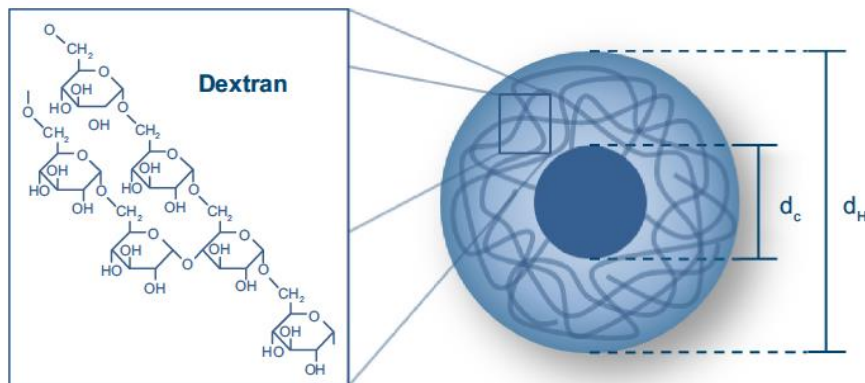


Figura III-9. Esquema de uma nanopartícula magnética envolvida em dextrano.⁷⁵

Quando os SPIOs entram na corrente sanguínea são fagocitados pelo sistema do retículo endotelial (SRE) que os remove por endocitose mediada por receptores da corrente sanguínea. Estas nanopartículas são absorvidas por macrófagos e células fagocíticas no fígado, medula óssea e baço. Os compartimentos lisossômicos dos macrófagos degradam gradualmente as nanopartículas de ferro, e desta forma o ferro é então, integrado na concentração de ferro já existente no organismo. A taxa de biodegradação dessas partículas pode variar, dependendo do tamanho e do revestimento.

As semi-vidas destas nanopartículas são da ordem de minutos a horas. SPIOs menores tendem a ter semi-vida mais longa. As semi-vidas na corrente sanguínea de humanos são significativamente mais longas que as dos pequenos mamíferos. Por exemplo, a meia-vida do feromoxitol em humanos é de 24 a 36 horas, enquanto que em ratos é de 2 a 3 horas. A flexibilidade das partículas de óxido de ferro não deve ser subestimada, tendo sido verificado que podem ser usadas para direcionar moléculas específicas, rastrear e distribuir fármacos, rotular células contra o cancro, rastrear a inflamação, visualizar órgãos e os vasos sanguíneos e destruir o cancro.^{70,74}

Dois agentes que incorporam partículas de óxido de ferro superparamagnéticas foram aprovados para imagens de ressonância magnética: ferumóxido (Feridex®/Endorem®) e ferucarbotran (Resovist®/Cliavist®).

O ferumóxido (Feridex®/Endorem®) foi o primeiro agente de contraste específico para o fígado clinicamente aprovado na Europa. Tem um tamanho de partícula compreendido entre 50 e 180 nm com um revestimento fino e incompleto de dextrano, o que faz com que partículas individuais formem agregados policristalinos e estes se comportem em soluções ou dentro das células como partículas grandes. É administrado em infusão intravenosa lenta ao longo de 30 a 60 minutos, com imagens realizadas passadas 1 a 4 horas da infusão. A solução administrada tem uma concentração de 11,2 mg Fe/mL. É usada a fórmula de 0,56 mg Fe/kg (0,05 mL/kg) em 100 mL de dextrose 5% numa infusão IV durante 30 minutos. A quantidade de ferro contida numa dose única é de aproximadamente 39 mg para 70 kg individuais. Isso é menos que 1/5 da quantidade de ferro contida numa unidade de sangue total.

Os agentes de partículas superparamagnéticas de óxido de ferro são preferencialmente retido pelas células de Kupffer do fígado e baço, e reduzem o tempo

de relaxamento T2. Assim, o fígado normal aparece escuro nas imagens ponderadas em T2 nas primeiras 24 horas após a infusão. A intensidade do sinal do fígado retorna ao normal dentro de 7 a 14 dias na maioria dos casos, mas o metabolismo completo requer 14 a 28 dias. Uma dor lombar aguda grave é a complicação mais comum, que pode ser minimizada com uma infusão lenta.^{68,70,76-78}

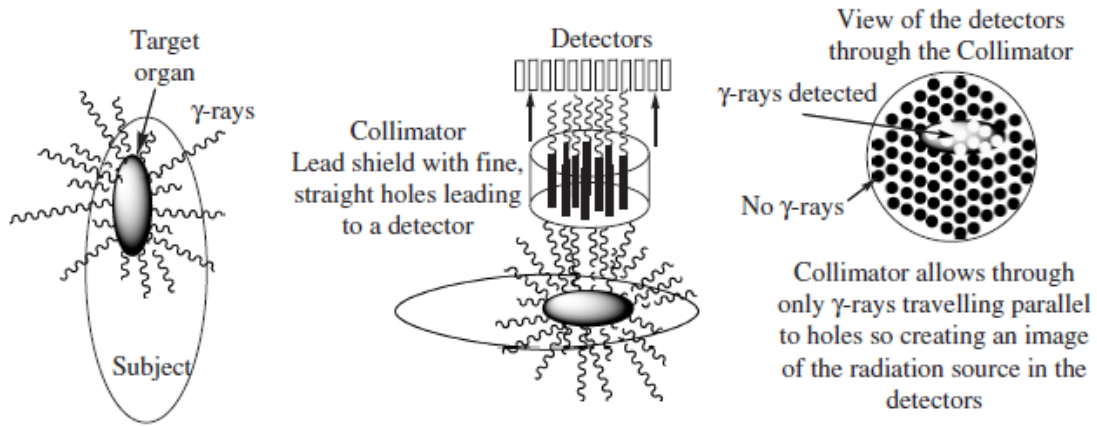
O ferucarbotran (Resovist®/Cliavist®) é o segundo óxido de ferro superparamagnético clinicamente aprovado para agente de contraste em ressonância magnética do fígado. Tem um tamanho de partícula de aproximadamente 60 nm e é revestido com carboxidextrano de baixo peso molecular. É administrado como um bólus rápido e é assim usado com imagens dinâmicas e com atraso. Os efeitos secundários mais comuns relatados são vasodilatação e parestesias.^{70,78}

3.2. TOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA POR EMISSÃO DE FOTÃO ÚNICO

A tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) é uma técnica tomográfica de imagem que faz uso da radiação γ emitida por fármacos radioactivos previamente administrados ao paciente. Esta técnica permite um outro tipo de imagiologia, imagiologia funcional, que está relacionada com a biodistribuição do fármaco radioactivo. O fármaco emite raios- γ que são detectados pelo tomógrafo. O computador regista as informações resultantes da emissão de raios- γ , podendo a imagem ser apresentada em 2D ou 3D. As energias típicas de raios- γ variam de algumas dezenas de keV até vários MeV, em comparação com cerca de 50 keV para a energia típica de raios-X usada em imagens anatómicas. Os radioisótopos tipicamente usados em SPECT em fármacos para este tipo de imagiologia são o tecnécio-99m, o iodo-123, o gadolínio-67 e o tálio-201, sendo que o mais comum é o tecnécio-99m na forma de complexos. O tipo de molécula ao qual o radionuclídeo está ligado e o próprio radionuclídeo dependem do órgão e patologia que se pretende visualizar.^{33,79,80}

Estes radioisótopos emitem apenas raios- γ como resultado do decaimento nuclear, sendo assim de uso particular para diagnóstico por imagem, já que os raios- γ não interagem de forma significativa com os tecidos o que os torna relativamente seguros. Os raios- γ emitidos são detectados por uma câmara- γ composta de um colimador de chumbo

de vários furos, um meio cintilante e uma matriz de fotomultiplicadores. Os dados captados são enviados para um computador onde se cria uma imagem da distribuição do emissor- γ uma região do corpo do paciente (*Figura III-10*).³³



*Figura III-10. Uma representação esquemática da criação de uma imagem usando tomografia computadorizada para emissão de fóton único (SPECT).*³³

Um sistema combinado de scanner SPECT-CT é mostrado na *Figura III-11*. Este permite que as imagens anatômicas da seção do scanner de CT de raios X sejam combinadas com imagens funcionais do scanner SPECT, oferecendo uma ferramenta de diagnóstico por imagem muito poderosa.³³



*Figura III-11. Um scanner usado para imagens combinadas de SPECT e TC. As duas unidades retangulares acima e abaixo do objeto são câmaras usadas para imagens SPECT e a estrutura circular nos pés do sujeito é o tomógrafo computadorizado (foto de cortesia da Siemens Medical Solutóis®).*³³

Através dos estudos de Hoffman et al.⁸¹ conseguiu-se perceber que uma sonda híbrida SPECT/RMN oferece informação biológica mais relevante do que a adquirida apenas na modalidade de imagem. Esta tem o potencial de fornecer melhor quantificação da concentração da sonda do sinal SPECT adquirido e maior resolução espacial do contraste da RMN, e pode destacar o valor da validação de diferentes métodos de imagem entre si. Assim, a combinação de SPECT/RMN pode oferecer vantagens sinérgicas e levar a mais interpretação *in vivo* com precisão de doenças e anormalidades.

Muitas moléculas e receptores estão envolvidos na regulação da angiogénese, fornecendo alvos importantes para diagnóstico e terapia tumoral. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é uma proteína sinalizadora que estimula a angiogénese, que pode contribuir para a carcinogénese quando é superexpressa. A família de glicoproteínas VEGF compreende cinco membros, sendo o VEGF-A o essencial para o crescimento e metástases tumorais. Segundo Los et al.⁸², o anticorpo monoclonal recombinante humanizado Bevacizumab (BCZM) é um inibidor da angiogénese que a bloqueia pela ligação ao VEGF-A. Foi desenvolvido a partir de um anticorpo murino (A 4.6.1) e humanizado, mantendo a especificidade da molécula original. O BCZM foi aprovado para o tratamento de uma variedade de tumores metastáticos e pode ser uma molécula ideal que pode ter como alvo locais de tumor de VEGF-A. No estudo referido no artigo, foi investigada a eficácia da conjugação de BCZM com nanopartículas de óxido de ferro (IONP) e a radiomarcagem dos nanosistemas funcionalizados com ^{99m}Tc, para a imagem de tumores e metástases que expressam VEGF, neste caso o cancro da mama e metástases nos pulmões, baço, fígado e rins. As nanopartículas de óxido de ferro (IONPs) foram revestidas com ácido dimercaptosuccínico (DMSA), para consequente funcionalização com o anticorpo monoclonal BCZM radiomarcado com ^{99m}Tc. As nanoformulações radiomarcadas foram avaliadas *in vitro* e *in vivo* em modelos de angiogénese tumoral. O alvo ativo proporcionado pelo Fe₃O₄-DMSA-SMCC-BCZM-^{99m}Tc foi avaliado em ratos os portadores de tumor M165, cancro da mama, em comparação com as IONPs não específicas de Fe₃O₄-DMSA-^{99m}Tc.⁸³

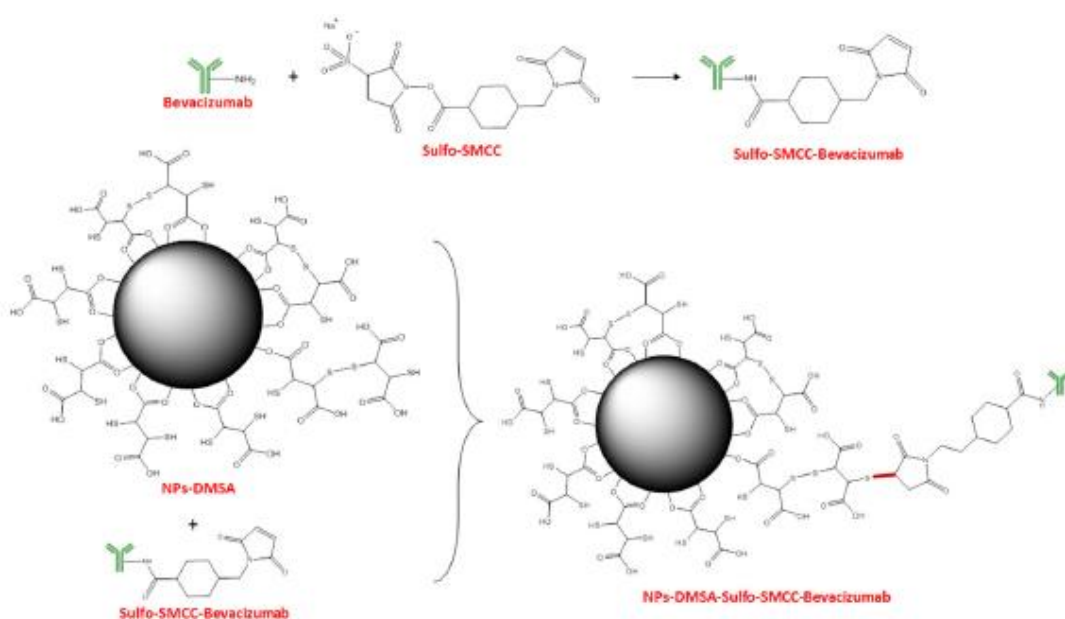


Figura III-12. Representação esquemática de nanopartículas de Fe_3O_4 -DMSA-SMCC-BCZM.⁸³

No sentido de comprovar a eficácia da abordagem direcionada, foram realizados estudos preliminares de imagem em animais com metástases utilizando ressonância magnética e cintigrafia de raios- γ , o que demonstra o potencial do Fe_3O_4 -DMSA-SMCC-BCZM-^{99m}Tc para imagens de dupla modalidade direcionadas. Foi demonstrado que a nanoconstrução não causa efeitos tóxicos em células normais e cancerígenas e tem a capacidade de se ligar à isoforma VEGF-165 superexpressa em células tumorais M165, quando marcadas com ^{99m}Tc, formando construções estáveis. Estudos de biodistribuição ex vivo mostraram que as proporções entre o tumor e o sangue, e entre tumor e músculo atingiram um máximo às 24 horas, confirmando a alta especificidade do marcador funcionalizado por anticorpo em relação à isoforma VEGF-165 superexpressa. As imagens in vivo dos estudos iniciais estavam de acordo com os resultados ex vivo, que foram comprovados pelo estudo histopatológico. O estudo histopatológico mostrou também a absorção por parte das metástases nos pulmões, baço, fígado e rins das nanopartículas.

Os resultados preliminares gerais encorajadores que foram obtidos merecem uma investigação mais aprofundada sobre as capacidades da dupla modalidade das sondas desenvolvidas. Visto que o constrato observado não é apenas no cancro da mama mas nas metástases, leva-nos a concluir que pode ter utilização na deteção de metástases nestes

órgãos em estudo. No entanto, outras modificações podem ser necessárias para melhorar o comportamento in vivo das nanopartículas. O Rhenium-188 (^{188}Re) é um isótopo terapêutico com propriedades químicas semelhantes ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e que pode ser um potencial radioisótopo para o substituir.⁸³

IV. UTILIZAÇÃO DE METAIS NA TERAPÊUTICA

Os metais de transição não têm apenas efeitos nocivos no organismo humano, podem ser grandes aliados na terapêutica de algumas patologias. Referem-se abaixo alguns exemplos de potenciais aplicações de compostos envolvendo metais em patologias do fígado.

4.1. CARCINOMA HEPATOCELULAR

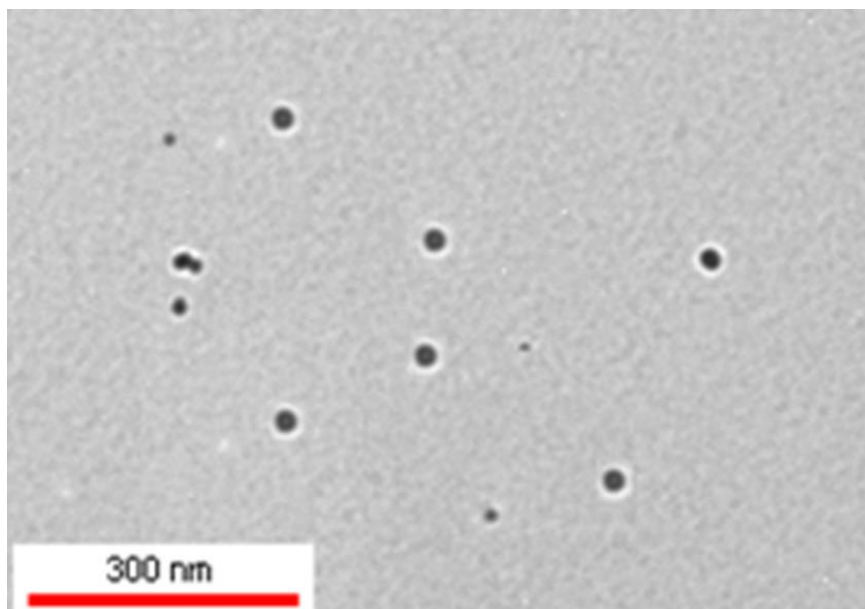
O carcinoma hepatocelular (CHC) foi considerado em 2000 como sendo a terceira causa de morte por cancro.⁸⁴

4.1.1. NANOPARTÍCULAS DE PRATA

A potencial utilização das nanopartículas de prata (Ag NPs) na terapêutica cancerígena surgiu dos seus efeitos antimicrobianos e propriedades físicas, bioquímicas e biológicas extraordinárias que as tornam agentes apropriados na cicatrização de feridas e em contraceptivos, bem como cosméticos, têxteis e aparelhos de tecnologia alimentar. Estudos demonstraram que o mecanismo da citotoxicidade das nanopartículas de prata envolve a interrupção da cadeia de transferência de elétrons mitocondriais, resulta na geração de espécies que reagem ao oxigênio (ROS) e interrupção da síntese de ATP, que por sua vez causa danos no DNA. Além disso, de acordo com algumas experiências *in vivo* e *in vitro*, as nanopartículas de prata induzem genotoxicidade.⁸⁵

As nanopartículas de prata tem efeitos citotóxicos que interferem no funcionamento das proteínas celulares e provocam alterações. Posto isto, foram investigados os efeitos anti-cancerígenos de Ag NPs na linhagem de células do carcinoma hepatocelular (HepG₂). Existem características que influenciam o grau de toxicidade das NPs que são a concentração, o tamanho, a carga superficial e a forma destas. Mas o tamanho acaba por ser o fator mais importante pois influencia a área de superfície das partículas e a sua difusão em células. O tamanho médio das partículas e a morfologia das nanopartículas preparadas foram determinadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS)

e microscopia eletrônica de transmissão (TEM) (**Figura IV-1**). As NPs Ag utilizadas neste estudo tinham um diâmetro de ca. 31 nm e apresentavam um índice de polidispersividade (PDI) de 0,21.⁸⁵



*Figura IV-1. Imagem TEM das NPs Ag preparadas.*⁸⁵

As proteases de cisteína-ácido aspártico (caspases) como reguladores da inflamação e apoptose, têm um papel crítico nas vias de morte celular em muitas células. Participam tanto na iniciação como no desenvolvimento da morte celular programada. Foram avaliadas por determinação da expressão relativa dos genes as caspase 3, caspase 8 e caspase 9 em células tratadas com IC₅₀ de NPs Ag durante 48 horas. E uma ativação significativa de caspase 3, 8 e 9 ocorreu a 75 µg/mL de NPs Ag após 24 horas de incubação.⁸⁵

Além disso, verificou-se que as NPs Ag regulavam positivamente os fatores pró-apoptóticos, como o Bax. Neste estudo, a expressão do gene Bax aumentou significativamente com NPs Ag após o tratamento dose-dependente. O gene de codificação pró-apoptótico de Bax interage com os lipídios da membrana mitocondrial externa e causa a formação de canais de transmissão de mitocôndrias o que leva à despolarização da membrana mitocondrial. Um aumento significativo na despolarização de mitocôndrias tem vários resultados desagradáveis, como desordem da cadeia de transporte de elétrons e diminuição da produção de ATP. Níveis elevados de expressão

de Bax indicam que as NPs Ag provocam apoptose celular em HepG₂ através de uma via de apoptose intrínseca.⁸⁵

Este estudo também mostrou que a preparação de nanopartículas de prata induz a liberação de citocromo c. O citocromo c é um componente da cadeia de transferência de elétrons mitocondrial que recruta e ativa a procaspase 9 que é iniciadora da via de formação de um apoptossoma funcional, um grande complexo multimérico de Apaf-1 e citocromo c. Após a ativação, a caspase 9 é separada do complexo e está disponível para lidar com caspases a jusante, como a caspase efectora 3. E dado que a caspase 3 tem papel essencial na quebra do DNA e alterações morfológicas durante a morte celular programada, desempenha então um papel influente na via de apoptose induzida por nanopartículas de prata.⁸⁵

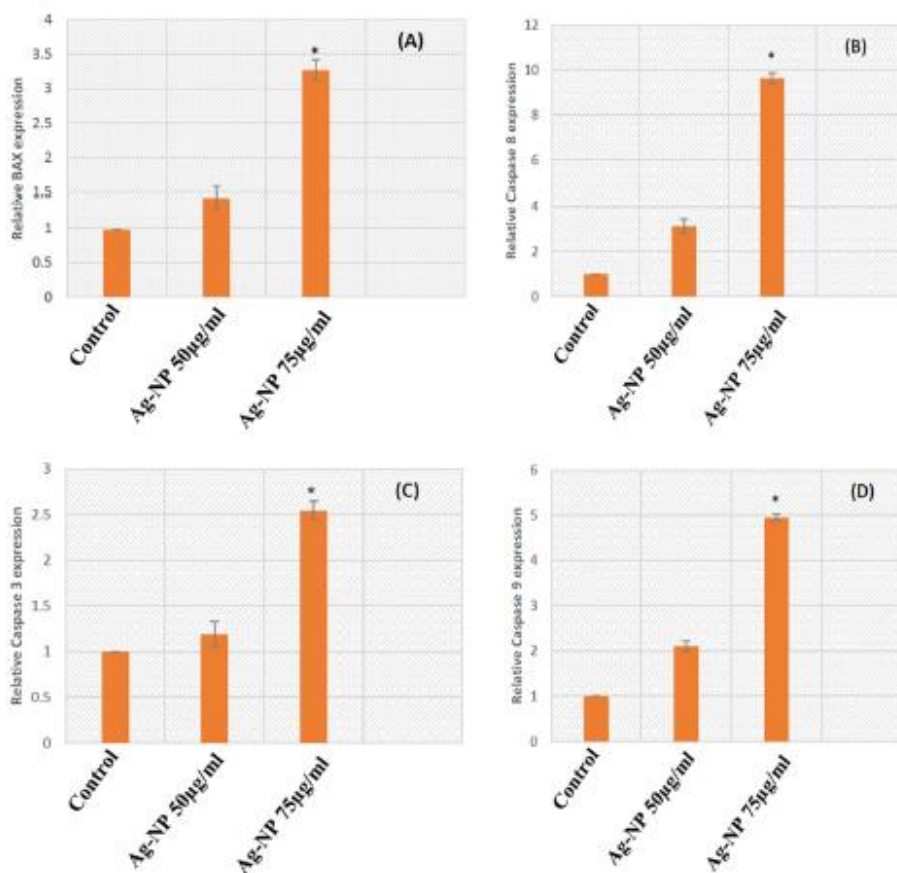


Figura IV-2. Expressão génica relacionada à apoptose: (A) BAX, (B) caspase 8, (C) caspase 3 e (D) caspase 9 nos controles tratados (NPs Ag 50 e 75 µg/mL) e controle não tratado em células HepG₂ por 48 horas.⁸⁵

Ag NPs biosintetizadas demonstraram efeitos citotóxicos, induziram a produção de ROS e a apoptose celular em HepG₂. Revelaram ser um possível candidato como agente quimioterapêutico no tratamento do carcinoma hepatocelular.⁸⁵

4.1.2. NANOPARTÍCULAS DE CÁDMIO

O cádmio é um metal de transição tóxico e carcinogénico que existe no solo e pode ser introduzido no ambiente por fontes antropogénicas. É facilmente absorvido pelas plantas do solo, portanto, a exposição humana é através da dieta. Além disso, os fumadores são expostos a altos níveis de cádmio do tabaco, cerca de 1,7 µg por cigarro. A maioria do cádmio acumula-se no fígado e nos rins de indivíduos com baixa exposição ambiental. A exposição ao cádmio tem sido associada a tumores de pulmão, próstata, rim, fígado, sistema hematopoiético, bexiga, pâncreas, testículos e estômago.^{86,87}

Acredita-se que o cádmio induza o stress oxidativo pela depleção de grupos sulfidril glutationa e ligada a proteínas, levando ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e apoptose. Segundo Wang et al.⁸⁸ o cádmio não é predominantemente genotóxico e, portanto, pode induzir a carcinogénese via mecanismos epigenéticos, alterando os níveis de expressão de vários genes críticos. Dado que a exposição ao cádmio também tem sido associada ao cancro e outras patologias do fígado, hipotetiza-se que tanto as exposições agudas quanto as crónicas induzirão mudanças de expressão génica em células HepG₂ de hepatocarcinoma humano.^{86,87}

Neste estudo, foi levantada a hipótese de que o stress oxidativo desempenha um papel-chave na toxicidade induzida por cloreto de cádmio na forma de nanopartículas, danos no DNA e apoptose de células de carcinoma hepático humano (HepG₂).⁸⁷ Para testar essa hipótese, foi realizado um ensaio de viabilidade celular. O teor de hidroperóxido lipídico foi estimado pelo ensaio de peroxidação lipídica. A lesão genotóxica foi testada por meio de eletroforese em gel de célula única alcalina (ensaio Cometa). A apoptose celular foi medida por avaliação de citometria de fluxo (Ensaio de anexina-V/PI). O resultado do teste de viabilidade indicou que o cloreto de cádmio induz toxicidade às células HepG₂ sendo variável consoante a concentração, mostrando um LD₅₀ de 48 horas de 3,6 g/mL. Os dados gerados a partir do ensaio de peroxidação lipídica resultaram em aumento significativo ($p < 0,05$) da produção de hidroperóxido,

especificamente na maior concentração testada. Dados obtidos a partir do ensaio Cometa, indicaram que o cloreto de cádmio causa danos no DNA em células HepG2 de uma maneira dependente da concentração. Uma forte relação concentração-resposta ($p < 0,05$) foi registada entre as células positivas para anexina V e a exposição ao cloreto de cádmio.⁸⁷

O presente estudo *in vitro* demonstrou que a exposição ao cloreto de cádmio diminui gradualmente a viabilidade das células HepG2, aumenta os níveis de hidroperóxido lipídico resultantes da formação de espécies reativas de oxigénio, induz danos ao DNA e desencadeia a apoptose programada de células HepG₂ através da externalização da fosfatidilserina. Deste modo, o cloreto de cádmio foi anteriormente associado ao aparecimento do carcinoma hepatocelular devido à sua toxicidade, no entanto com o controlo da sua toxicidade e o direcionamento da mesma, este pode ser utilizado no tratamento do carcinoma hepatocelular e não estar no foco da sua origem.⁸⁷

4.1.3. NANOCOMPOSTOS DE Fe₃O₄-ZIF-8

Existe uma necessidade urgente de desenvolver terapias altamente eficazes e como abordagem terapêutica predominante, a quimioterapia precisa ser mais estudada para melhor tratamento do CHC. A doxorrubicina (DOX) é um dos quimioterápicos mais utilizados. É um fármaco não específico e pode matar células tumorais em vários ciclos de crescimento. No entanto, o amplo espectro da DOX pode produzir uma ampla gama de efeitos bioquímicos e ter um forte efeito citotóxico, causando principalmente toxicidade cardíaca grave e inibindo a função hematopoiética da medula óssea. Como tal, estes efeitos colaterais limitaram a aplicação clínica da DOX.⁸⁹

Nos últimos anos, portadores de fármacos baseados em nanopartículas atraíram a atenção dos investigadores. As nanopartículas não só podem melhorar o processo de libertação do fármaco, a absorção, o metabolismo e a excreção, mas também podem aumentar a taxa de utilização de medicamentos e diminuir os efeitos colaterais dos medicamentos de alta concentração. As estruturas porosas do tipo MOF (estrutura metálica-orgânica), pelas suas características de porosidade e pela existência de grupos funcionais, têm sido consideradas com sucesso como suportes em sistemas de entrega de fármacos. Estas estruturas metálicas-orgânicas, o ZIF-8 e ZIF-8 modificado, apresentam

potencialidade para serem utilizadas como portadores de fármacos e utilizados para tratamento de cancro graças à sua alta capacidade de carga de fármacos e propriedades sensíveis ao pH.⁸⁹

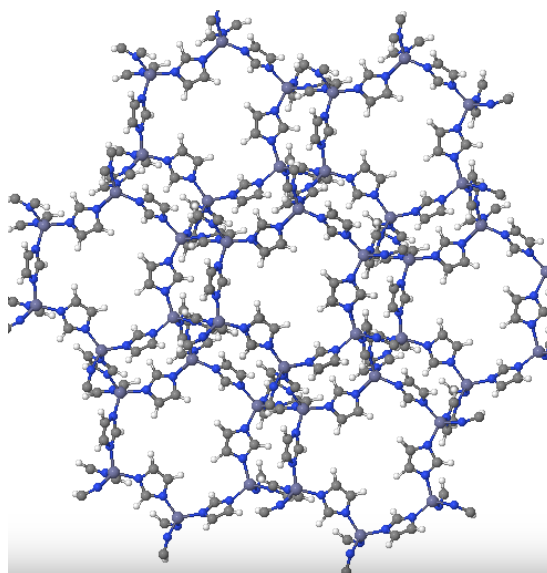


Figura IV-3. Estrutura do ZIF-8. Corresponde a iões zinco coordenados a 4 iões imidazolato.⁹⁰

Nos últimos anos, os nanocompostos de Fe₃O₄-ZIF-8 foram sintetizados e aplicados por muitos grupos de investigação. Foram fabricados e usados como transportadores do fármaco DOX para terapia do CHC. A morfologia, estrutura, tamanho de partícula, eficiência de carga de DOX e libertação acumulada de DOX de Fe₃O₄-ZIF-8 foram determinadas. Num trabalho de C. Cheng et al.⁸⁹ foram usados o ensaio de contagem de células 8 (CCK-8), a microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) e citometria de fluxo para avaliar e comparar a citotoxicidade, captação celular de drogas e apoptose celular de Fe₃O₄-ZIF-8, DOX livre e DOX@Fe₃O₄-ZIF-8 contra a linhagem celular de hepatocarcinoma (MHCC97H).⁸⁹

Devido à elevada capacidade de carga do fármaco do ZIF-8, 1 mg de nanocompósitos Fe₃O₄-ZIF-8 carregou 120 µg de DOX quando DOX@Fe₃O₄-ZIF-8 foi sintetizado em solução de DOX a 30 mg/mL. A curva cumulativa de libertação de DOX mostrou um padrão de libertação lenta e sustentada ao longo do tempo. Os resultados do ensaio de CCK-8 mostraram que o Fe₃O₄-ZIF-8 não é tóxico para células MHCC97H, e o DOX@Fe₃O₄-ZIF-8 apresentou efeito inibidor efetivo na viabilidade celular de células MHCC97H. O ensaio de captação celular mostrou que DOX@Fe₃O₄-ZIF-8 acumulou-

se no citoplasma e no núcleo. Além disso, devido à acumulação de fármaco válido, DOX@Fe₃O₄-ZIF-8 exibiu um bom efeito indutor na apoptose celular de células MHCC97H.⁸⁹

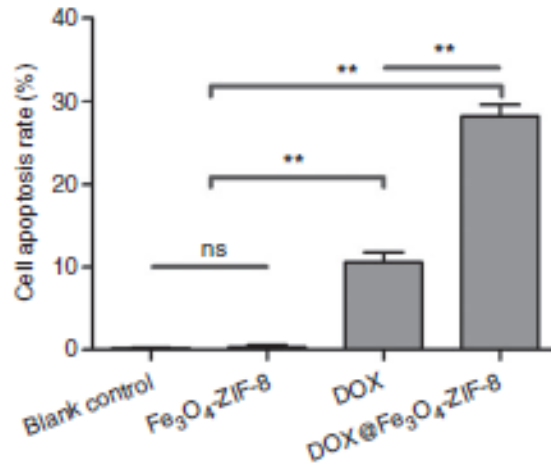


Figura IV-4. Análise de apoptose celular em células MHCC97H determinadas por citometria de fluxo após incubação com Fe₃O₄-ZIF-8, DOX e DOX@Fe₃O₄-ZIF-8 por 24 horas. Taxa de apoptose celular de células MHCC97H com diferentes tratamentos. As células na fase tardia da apoptose foram selecionadas como células apoptóticas. ** $p < 0,001$, $n = 3$.⁸⁹

Em conclusão, com base na capacidade não tóxica e alta carga de fármaco do Fe₃O₄-ZIF-8, o DOX@Fe₃O₄-ZIF-8 apresentou efeitos aumentados nas células CHC em comparação com a DOX livre, indicando seu potencial para quimioterapia do CHC.⁸⁹

V. CONCLUSÃO

O fígado é considerado o maior órgão interno do corpo humano e o principal órgão metabólico. Este órgão desempenha um papel decisivo num elevado número de funções vitais no nosso organismo, e é também responsável pela metabolização e excreção dos fármacos e metais que quando atingem concentrações muito elevadas podem provocar hepatotoxicidade.

Em virtude dos fatos mencionados, os metais são fundamentais no organismo humano, no entanto, é necessário que estes se encontrem em certas concentrações que permitam o equilíbrio. Quando em excesso ou em défice provocam alterações no organismo que podem levar ao desenvolvimento de patologias. No caso de deficiência de metais, foi abordada a anemia ferropénica no caso da deficiência em Fe e o síndrome de Menkes que resulta de deficiência em Cu. Em excesso, a hemocromatose causada pelo Fe e a cirrose indiana infantil e a doença de Wilson provocadas pelo Cu. Portanto, no caso do excesso de metais foi proposta a utilização da quelatação dos mesmos para que a sua remoção do corpo seja a mais rápida e completa possível. E no caso da deficiência de metais, as alternativas terapêuticas que foram ressaltadas passam pela administração dos próprios metais em falta.

Determinados compostos contendo metais estão aprovados para imagiologia do fígado, sendo que essa imagiologia está relacionada com o próprio metal. Neste caso não se pretende que os metais tenham interferência nos processos biológicos mas que apresentem um biodistribuição que permita a avaliação da existência e/ou a dimensão da patologia em estudo. Assim os agentes usados nestas técnicas devem ser inertes, o mais selectivos possível e excretados num tempo razoável (de preferência intactos) de modo a permitir a análise sem que exista acumulação que pode levar a efeitos secundários indesejados.

No diagnóstico, os dois métodos para imagiologia do fígado mencionados foram a ressonância magnética nuclear e a tomografia computadorizada por emissão de fóton único.

A ressonância magnética nuclear cria uma imagem em forma de tomografia computadorizada com base no efeito que o campo magnético provoca no núcleo dos átomos de hidrogénio das moléculas de água existentes no corpo humano. Este método de

diagnóstico utiliza agentes de contraste onde os metais acabam por ser fundamentais, pois a utilização destes visa a melhoria da imagem obtida.

Alguns dos agentes de contraste de ressonância magnética nuclear referidos, e que foram aprovados para o uso clínico, foram retirados porque o seu efeito nocivo se sobrepunha ao efeito benéfico do contraste que proporcionavam na imagem, sendo que outros ainda se encontram em testes. Nem todos os agentes abordados se encontram aprovados, no entanto, encontram-se em testes e com resultados promissores que visam a sua futura aprovação.

A tomografia computadorizada por emissão de fóton único é uma técnica de imagem que faz uso da radiação γ emitida pelo radiofármaco. Esta integra a tomografia computadorizada e um marcador radioativo. Aborda-se então, a utilização das nanopartículas de ferro revestidas com um ácido para funcionalização com um anticorpo monoclonal radiomarcado.

Na terapêutica, o foco foi na utilização de metais como grandes aliados na terapêutica do carcinoma hepatocelular que foi considerado em 2000 como sendo a terceira causa de morte por cancro. Na terapêutica desta patologia, como exemplo temos a quimioterapia utilizando nanopartículas de prata, nanopartículas de cádmio e os nanocompostos de Fe_3O_4 -ZIF-8.

Posto isto, o fígado é considerado um órgão de extrema importância no nosso organismo por todas as funções que desempenha e é fulcral garantir que a influência dos metais no fígado é segura.

Devido à existência de muita informação, tornou-se difícil recolher e sintetizar a informação concreta. No entanto, sinto que após muito trabalho de recolha e pesquisa conseguiu-se atingir o objetivo pretendido com esta monografia. Foram evidenciados papéis-chave dos metais quer na promoção, quer no diagnóstico e terapêutica de diversas patologias do fígado.

É imprescindível que se continue a realizar investigação neste campo, que tenha como objetivo reduzir os efeitos negativos dos metais e que visem tirar o maior partido do benefício que estes podem trazer no diagnóstico e terapêutica de patologias, especialmente do fígado.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. Paulsen, F. & Waschke, J. Sobotta– Atlas of Human Anatomy. (ELSEVIER HEALTH SCIENCES, 2011).
2. Seeley, R., Stephens, T. & Tate, P. Anatomia e Fisiologia. (2005).
3. Schinoni, M. I. Fisiologia Hepática. Gaz. Médica da Bahia 5–9 (2006).
4. Florez, J. Farmacología Humana. Manson, S.A (1993).
5. Gilman, G. Manual of Pharmacology and Therapeutics. Diseases of Sheep: Fourth Edition (2008).
6. van Bezooijen, C. Influence of age-related changes in rodent liver morphology and physiology on drug metabolism. Mech Ageing Dev **5**, 1–22 (1984).
7. Pandit, A. & Bhave, S. Present interpretation of the role of copper in Indian childhood cirrhosis. Am. J. Clin. Nutr. **63**, 830S-835S (1996).
8. Cançado, E., Barbosa, E. & Dias, M. Doença de Wilson. in Doenças do Fígado e Vias Biliares (ed. Gayotto e Alves, S.) 377–391 (Savvier, 2001).
9. Kutchi, H. The gastrointestinal secretion. in Physiology (ed. Berne RM, L. M.) 617–647 (Guanabara KOOGAN, 1998).
10. Długaszek, M. Studies on relationships between essential and toxic elements in selected body fluids, cells and tissues. Chem. Biol. Interact. **297**, 57–66 (2019).
11. Wang, Chia-Yu & L. Babitt, J. Liver iron sensing and body iron homeostasis. Aamerican Soc. Hematol. **133**, 18–29 (2019).
12. Camschella, C. Iron deficiency. Am. Soc. Hematol. **133**, 30–39 (2019).
13. Feoktistova, L., Yulia, V. & Feoktistova, C. El metabolismo del cobre . Sus consecuencias para la salud humana Metabolism of copper . Its consequences for human health. Medisur **16**, 6–9 (2018).
14. Mc Naught, A. D. & Wilkinson, A. Compendium of Chemical Terminology Gold Book. IUPAC Compendium of Chemical Terminology (2014).

15. Kwon, S., Naserifar, S., Lee, H. M. & Goddard, W. A. Polarizable Charge Equilibration Model for Transition-Metal Elements. *J. Phys. Chem. A* **122**, 9350–9358 (2018).
16. Lin, X., Gu, Y., Zou, Q., Mao, G., Zou, B. & Zhao, J. Combined toxicity of heavy metal mixtures in liver cells. *J. Appl. Toxicol.* **36**, 1163–1172 (2016).
17. Andrews, N. Forging a field: the golden age of iron biology. *Blood* **112**, 219–30 (2008).
18. Pietrangelo, A. Hereditary hemochromatosis- a new look at an old disease. *N Engl J Med* **350**, 2383–9 (2004).
19. Fix, O. & Kowdley, K. Hereditary hemochromatosis. *Minerva Med* **99**, 605–17 (2008).
20. Brissot, P. & de Bels, F. Current approaches to the management of hemochromatosis. *Hematol. Am Soc Hematol Educ Progr.* 36–41 (2006).
21. Calap-Quintana, P., González-Fernández, J., Sebastián-Ortega, N., Llorens, J. V. & Moltó, M. D. *Drosophila melanogaster* models of metal-related human diseases and metal toxicity. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
22. Luza, S. C. & Speisky, H. C. Liver copper storage and transport during development: implications for cytotoxicity. *Cu Metabolism and toxicity in developemt* (1996).
23. Tao, T. Y. & Gitlin, J. D. Hepatic copper metabolism: Insights from genetic disease. *Hepatology* **37**, 1241–1247 (2003).
24. Pietrangelo, A. Inherited metabolic disease of the liver. *Curr Opin Gastroenterol* **25**, 209–14 (2009).
25. Katsarou, M. S., Pappasavva, M., Latsi, R. & Drakoulis, N. Hemochromatosis: Hereditary hemochromatosis and HFE gene. *Vitam. Horm.* 1–22 (2019).
26. Cançado, R. D. & Chiattonne, C. S. Visão atual da hemocromatose hereditária. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* **32**, 469–475 (2011).
27. Bonini-domingos, C. R. Aumento de ferro , hemocromatose hereditária e defeitos

- no gene HFE . O que conhecemos na população brasileira? Conjugação de controle isotópico para citometria de fluxo. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* **29**, 339–343 (2007).
28. Gelbart, T., Beutler, E., Felitti, V. J. & Waalen, J. Screening for hemochromatosis by measuring ferritin levels: a more effective approach. *Blood* **111**, 3373–3376 (2008).
 29. Gattermann, N. The Treatment of Secondary Hemochromatosis. *Dtsch. Aertzblatt Online* (2018).
 30. Diretrizes da OMS para a tiragem de sangue: boas práticas em flebotomia.
 31. Tavassoli, H., Mahjoub, F., Jahanzad, E., Farahmand, F., Izadyar, M., Sani, M. N., Rashti, M. L. & Aramli, M. S. Introducing a new histologic scoring system for iron deposition in liver of thalassemic patients, compared with atomic absorption spectrometry. *Exp. Toxicol. Pathol.* **67**, 365–371 (2015).
 32. De, R. B. Visão atual da hemocromatose hereditária. (2009).
 33. Jones, C. & Thornback, J. *Medicinal Applications of Coordination Chemistry*. The Royal Society of Chemistry (2007).
 34. Angulo, I. L., Papa, F. V. & Cardoso, F. G. Sangria Terapêutica. *Med. (Ribeirao Preto. Online)* **32**, 290 (2013).
 35. Souza, A. F. M. de, Carvalho-Filho, R. J. & Chebli, J. F. HEMOCROMATOSE HEREDITÁRIA: Relato de caso e revisão da literatura. *Expert. Ultrasound Rev. Perspect.* **2**, 7–10 (2010).
 36. Kontoghiorghes, C. N. & Kontoghiorghes, G. J. Efficacy and safety of iron-chelation therapy with deferoxamine, deferiprone, and deferasirox for the treatment of iron-loaded patients with non-transfusion-dependent thalassemia syndromes. *Drug Design, Development and Therapy* **10**, 465–481 (2016).
 37. Pandit, A. N. & Bhave, S. A. Copper metabolic defects and liver disease: Environmental aspects. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, (2002).
 38. Tanner, M. S. Role of copper in Indian childhood cirrhosis. **67**, 1074–1081 (1998).

39. Andrezza, R., Anastácio de Oliveira Camargo, F., Antonioli, I., Silveira Quadro, M. & Antunes Barcelos, A. Biorremediação de áreas contaminadas com cobre. Sociedade de Ciências Agrárias de Portugal (2013).
40. Nagral, A., Sarma, M. S., Matthai, J., Kukkle, P. L., Devarbhavi, H., Sinha, S., Alam, S., Bavdekar, A., Dhiman, R. K., Eapen, C. E., Goyal, V., Mohan, N., Kandadai, R. M., Sathiyasekaran, M., Poddar, U., Sibal, A., Sankaranarayanan, S., Srivastava, A., Thapa, B. R., Wadia, P. M., Yachha, S. K. & Dhawan, A. Wilson's Disease: Clinical Practice Guidelines of the Indian National Association for Study of the Liver, the Indian Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, and the Movement Disorders Society of India. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology* **9**, 74–98 (2019).
41. Bruha, R., Marecek, Z., Pospisilova, L., Nevsimalova, S., Vitek, L., Martasek, P., Nevoral, J., Petrtyl, J., Urbanek, P., Jiraskova, A. & Ferenci, P. Long-term follow-up of Wilson Disease: Natural history, treatment, mutations analysis and phenotypic correlation. *Liver Int.* **31**, 83–91 (2011).
42. Roberts, E. & Sarkar, B. Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper. *Medline* **88**, 851–854 (2008).
43. Roberts, E. A. & Schilsky, M. L. Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology* **47**, 2089–2111 (2008).
44. Moreira, M. D., Moreira, R. S. J., Fritscher, G. L., de Garcia, G. R. & Rymer, S. Anéis de Kayser-Fleischer. *Arq Bras Oftalmol* **64**, 589–93 (2001).
45. Oreiro, M. B., Moreira, V. F., López, A. & Román, S. Anemia ferropénica. Tratamiento. *REV ESP ENFERM DIG (Madrid)* **101**, (2009).
46. Anemia ferropénica. Guía de diagnóstico y tratamiento. in Comité Nacional de Hematología 353–361 (2009).
47. Killip, S., Bennett, J. M. & Chambers, M. D. Iron Deficiency Anemia. (2007).
48. Reed, U. C., Rosemberg, S., Diament, A. J., Canelas, H. M. & Lefèvre, A. B. SÍNDROME DE MENKES REVISÃO DA PATOGENIA A PROPÓSITO DE UM CASO ANATOMO CLÍNICO.

49. Costa, L. S. de A., Pegler, S. P., Lellis, R. F., Krebs, V. L. J., Robertson, S., Morgan, T., Honjo, R. S., Bertola, D. R. & Kim, C. A. Menkes disease: importance of diagnosis with molecular analysis in the neonatal period. *Rev. Assoc. Med. Bras.* **61**, 407–410 (2015).
50. Luísa Casado Brasil Dozza, A., Dias Fernandes, G., Tiel Yuen, C., Aparecida Santanna, B., Sayão Souza, K. & Pruber de Queiroz Campos Araújo, A.. Doença de Menkes: Relato de Caso. *Revista Brasileira de Neurologia* **45**, (2008).
51. Pérez, E. Pérez, E., Iturre De Aguirre, L., Gómez, B., Obeid Pedemonte, R., Varela, A. & Romano, S. Enfermedad de Menkes. *Arch. Argent. Dermatol.* **54**, 57–63 (2004).
52. Tümer, Z. An Overview and Update of ATP7A Mutations Leading to Menkes Disease and Occipital Horn Syndrome. *Hum. Mutat.* **34**, 417–429 (2013).
53. Tønnesen, T., Kleijer, W. J. & Horn, N. Incidence of Menkes disease. *Hum. Genet.* **86**, 408–410 (1991).
54. Ojha, R. & Prasad, A. N. Menkes disease: What a multidisciplinary approach can do. *Journal of Multidisciplinary Healthcare* **9**, 371–385 (2016).
55. Xiao, Y. D., Xiao, Y. D., Paudel, R., Liu, J., Ma, C., Zhang, Z. S. & Zhou, S. K. MRI contrast agents: Classification and application (Review). *Int. J. Mol. Med.* **38**, 1319–1326 (2016).
56. Tang, J., Sheng, Y., Hu, H. & Shen, Y. Macromolecular MRI contrast agents: Structures, properties and applications. *Prog. Polym. Sci.* **38**, 462–502 (2013).
57. Villaraza, A. J., Bumb, A. & Brechbiel, M. W. Macromolecules, dendrimers, and nanomaterials in magnetic resonance imaging: The interplay between size, function, and pharmacokinetics. *Chem. Rev.* **110**, 2921–2959 (2010).
58. Kobayashi, H. & Brechbiel, M. W. Dendrimer-based macromolecular MRI contrast agents: Characteristics and application. *Mol. Imaging* **2**, 1–10 (2003).
59. Kobayashi, H. & Brechbiel, M. W. Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 2271–2286 (2005).

60. Langereis, S., Lussanet, Q. G. d., Genderen, M. H. P. van, Backes, W. H. & Meijer, E. W. Multivalent contrast agents based on Gd-DTPA-terminated poly (propylene imine) dendrimers for Magnetic Resonance Imaging. *Macromolecules* **37**, 3084–3091 (2004).
61. Caravan, P., Ellison, J. J., McMurry, T. J. & Lauffer, R. B. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: Structure, dynamics, and applications. *Chem. Rev.* **99**, 2293–2352 (1999).
62. Tóth, É., van Uffelen, I., Helm, L., Merbach, A. E., Ladd, D., Briley-Sæbø, K. & Kellar, K. E. Gadolinium-based linear polymer with temperature-independent proton relaxivities: a unique interplay between the water exchange and rotational contributions. *Magn. Reson. Chem.* **36**, S125–S134 (1998).
63. Doble, D. M. J., Botta, M., Wang, J., Aime, S., Barge, A. & Raymond, K. N. Optimization of the relaxivity of MRI contrast agents: Effect of poly(ethylene glycol) chains on the water-exchange rates of GdIII complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10758–10759 (2001).
64. Margerum, L. D., Campion, B. K., Koo, M., Shargill, N., Lai, J. J., Marumoto, A. & Sontum, P. C. Gadolinium(III) DO3A macrocycles and polyethylene glycol coupled to dendrimers: Effect of molecular weight on physical and biological properties of macromolecular magnetic resonance imaging contrast agents. *J. Alloys Compd.* **249**, 185–190 (1997).
65. Oksendal, A. N. & Hals, P. A. Biodistribution and toxicity of MR imaging contrast media. *J. Magn. Reson. Imaging* **3**, 157–165 (1993).
66. A, A., MF, K., R, D., A, B., S, M., A, G. & L, M. MR imaging of the liver (including biliary contrast agents): Part 1: technical considerations and Contrast Materials. *J Autism Dev Disord* **47**, 549–562 (2017).
67. Gadolinium- containing contrast agents. European Medicines Agency (2017). Available at:
<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/gadolinium-containing-contrast-agents>. (Accessed: 29th July 2019)
68. Gupta, U. & Perumal, O. Dendrimers and Its Biomedical Applications. Natural and

Synthetic Biomedical Polymers (Elsevier Inc., 2014).

69. Kobayashi, H., Saga, T., Kawamoto, S., Sato, N., Hiraga, A., Ishimori, T., Konishi, J., Togashi, K. & W. B., M. Dynamic micro-magnetic resonance imaging of liver micrometastasis in mice with a novel liver macromolecular magnetic resonance contrast agent DAB-Am64-(1B4M-Gd)64. *Cancer Res.* **61**, 4966–4970 (2001).
70. Bell, D. J. & Ballinger, R. Hepatobiliary MRI contrast. Available at: <https://radiopaedia.org/articles/hepatobiliary-mri-contrast-agents-1>. (Accessed: 1st August 2019)
71. Aime, S., Crich, S. G., Gianolio, E., Giovenzana, G. B., Tei, L. & Terreno, E. High sensitivity lanthanide(III) based probes for MR-medical imaging. *Coord. Chem. Rev.* **250**, 1562–1579 (2006).
72. Pan, D., Schmieder, A. H., Wickline, S. A. & Lanza, G. M. Manganese-based MRI contrast agents: past, present and future. *Tetrahedron* **67**, 8431–8444 (2011).
73. Wang, J., Wang, H., Ramsay, I. A., Erstad, D. J., Fuchs, B. C., Tanabe, K.K., Caravan, P. & Gale, E. M. Manganese-Based Contrast Agents for Magnetic Resonance Imaging of Liver Tumors: Structure-Activity Relationships and Lead Candidate Evaluation. *J Med Chem* **61**, 8811–8824 (2018).
74. Korchinski, D. J., Taha, M., Yang, R., Nathoo, N. & Dunn, J. F. Iron Oxide as an MRI Contrast Agent for Cell Tracking. **8**, 15–29 (2015).
75. Panagiotopoulos, N., Duschka, R. L., Ahlborg, M., Bringout, G., Debbeler, C., Graeser, M., Kaethner, C., Lüdtke-Buzug, K., Medimagh, H., Stelzner, J., Buzug, T. M., Barkhausen, J., Vogt, F. M., & Haegele, J. Magnetic particle imaging: Current developments and future directions. *Int. J. Nanomedicine* **10**, 3097–3114 (2015).
76. Feridex - FDA prescribing information, side effects and uses. Available at: <https://www.drugs.com/pro/feridex.html>. (Accessed: 5th August 2019)
77. Feridex (ferumoxides) dosing, indications, interactions, adverse effects, and more. Available at: <https://reference.medscape.com/drug/feridex-ferumoxides-343757#5>. (Accessed: 5th August 2019)

78. Reimer, P. & Balzer, T. Ferucarbotran (Resovist): A new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: Properties, clinical development, and applications. *Eur. Radiol.* **13**, 1266–1276 (2003).
79. Oliveira, R., Santos, D., Ferreira, D., Coelho, P. & Veiga, F. Preparações Radiofarmacêuticas e suas aplicações. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **42**, (2006).
80. Bell, D. J. & Smith, H. Single photon emission computed tomography (SPECT). Available at: <https://radiopaedia.org/articles/single-photon-emission-computed-tomography-spect><https://radiopaedia.org/articles/single-photon-emission-computed-tomography-spect>. (Accessed: 15th August 2019)
81. Hoffman, D., Sun, M., Yang, L., McDonagh, P. R., Corwin, F., Sundaresan, G., Wang, L., Vijayaragavan, V., Thadigiri, C., Lamichhane, N. & Zweit, J. Intrinsically radiolabelled [(59)Fe]-SPIONs for dual MRI/radionuclide detection. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **4**, 548–54860 (2014).
82. Los, M., Roodhart, J. M. L. & Voest, E. E. Target Practice: Lessons from Phase III Trials with Bevacizumab and Vatalanib in the Treatment of Advanced Colorectal Cancer. *Oncologist* **12**, 443–450 (2007).
83. Tsoukalas, C., Psimadas, D., Kastis, G. A., Koutoulidis, V., Harris, A. L., Paravatou-Petsotas, M., Karageorgou, M., Furenlid, L. R., Moulopoulos, L. A., Stamopoulos, D. & Bouziotis, P. A Novel Metal-Based Imaging Probe for Targeted Dual-Modality SPECT/MR Imaging of Angiogenesis. *Front. Chem.* **6**, 1–15 (2018).
84. Parkin, D. M. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* **2**, (2001).
85. Eftekhari, A., Ahmadian, H., Hasanzadeh, A., Halajzadeh, J., Dizaj, S. M., Ahmadian, E., Rahimpour, E. & Hosain zadegan, H. Effect of silver nanoparticles in the induction of apoptosis on human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. *Mater. Sci. Eng. C* **93**, 465–471 (2018).
86. Cartularo, L., Laulicht, F., Sun, H., Kluz, T., Freedman, J. H. & Costa, M. Gene expression and pathway analysis of human hepatocellular carcinoma cells treated

- with cadmium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **288**, 399–408 (2015).
87. Skipper, A., Sims, J. N., Yedjou, C. G. & Tchounwou, P. B. Cadmium chloride induces DNA damage and apoptosis of human liver carcinoma cells via oxidative stress. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **13**, 1–10 (2016).
88. Wang, B., Li, Y., Shao, C., Tan, Y. & Cai, L. Cadmium and Its Epigenetic Effects. *Curr. Med. Chem.* **19**, 2611–2620 (2012).
89. Cheng, C., Li, C., Zhu, X., Han, W., Li, J. & Lv, Y. Doxorubicin-loaded Fe₃O₄-ZIF-8 nano-composites for hepatocellular carcinoma therapy. *J. Biomater. Appl.* **33**, 1373–1381 (2019).
90. ZIF-8 Metal Organic Framework — ChemTube3D. Available at: <https://www.chemtube3d.com/mof-zif8>. (Accessed: 27th August 2019)