



Departamento de Química e Farmácia

Aplicações terapêuticas de compostos com capacidade quelante: perspetivas futuras

Marta Filipa Fernandes dos Santos

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2016



Departamento de Química e Farmácia

Aplicações terapêuticas de compostos com capacidade quelante: perspetivas futuras

Marta Filipa Fernandes dos Santos

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2016

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Universidade do Algarve, 29 de setembro de 2016

© 2016 Marta Filipa Fernandes dos Santos

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

Dedico este trabalho ao meu querido avô,

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho ao meu avô João Fernandes, que infelizmente já não está ao meu lado, mas sempre foi o grande impulsionador do meu percurso académico. Sempre acreditou que um dia eu iria alcançar os meus objetivos e o seu maior desejo era cá estar para ver-me concluir esta etapa. “Esta é para ti avô!”.

Gostaria de agradecer a todos aqueles que sempre me apoiaram no decorrer da realização desta dissertação, com plena consciência de que não existem agradecimentos que expressem o verdadeiro valor dos seus contributos.

À professora Maria de Lurdes Cristiano, por quem tenho uma grande consideração e estima, um grande obrigado por todo o auxílio e motivação que me deu durante este longo caminho. Sempre se mostrou disponível para me ajudar a resolver as questões que iam surgindo.

À minha família que sempre esteve ao meu lado e que sempre me deu os meios para que eu pudesse realizar esta fase da minha vida. Sei que em certos momentos não pareceu, mas eu gosto muito de vocês!

Às minhas melhores amigas gostaria de agradecer pela amizade que me dão todos os dias e que me faz ser quem sou, por todo o apoio que me deram ao longo destes anos e em particular no decorrer destes últimos meses. Podia ser possível sem vocês? Podia, mas não era a mesma coisa. Vocês sabem quem são.

Aos meus colegas de curso quero agradecer por me terem acompanhado nesta jornada, pelas imensas vezes que partilhámos o conhecimento e nos ajudámos mutuamente. Desejo-lhes a maior sorte do mundo na vida pessoal e profissional, que um dia mais tarde os nossos caminhos se voltem a cruzar.

RESUMO

Os metais desempenham um papel importante em diversos processos biológicos. Assim, a sua homeostasia, que é controlada através de mecanismos de absorção, armazenamento e eliminação, é fundamental ao bom funcionamento do organismo e apresenta limites estritamente definidos. O cobre, por exemplo, é cofator enzimático em diversas reações redox e a sua relevância em processos patológicos tem sido extensamente investigada.

A doença de Wilson, caracterizada pela acumulação tóxica de cobre no organismo, é um exemplo clássico da aplicação dos compostos com capacidade quelante. Os fármacos aprovados para a destoxificação do metal nesta patologia são a D-penicilamina, a trientina e os sais de zinco. O tetratiomolibdato tem-se revelado benéfico nesta situação, mas está em fase de investigação para posterior desenvolvimento.

Estudos recentes relacionam a rotura da homeostasia do ferro e do cobre com a etiologia de distúrbios neurológicos como o Alzheimer. Outros estudos associam a presença de elevadas concentrações de cobre em células tumorais ao elevado nível de stress oxidativo. Estas investigações sugerem a utilização de compostos com capacidade quelante como potencial terapêutica nestas patologias.

As células neoplásicas apresentam maior teor em Cu(II) do que as células normais, por isso o desenho de compostos quelantes, seletivos para este metal, tem sido o foco de vários projetos de investigação. Ismael et al. sintetizaram ligandos seletivos para Cu(II) que apenas se mostraram citotóxicos quando complexados com o metal nas células neoplásicas, abrindo perspectivas para o desenvolvimento de quelantes com potencial contra neoplasias.

Esta monografia aborda a importância dos quelantes de cobre e o seu potencial no desenvolvimento de compostos farmacologicamente ativos e com propriedades melhoradas, que possam ser usados no tratamento de várias patologias.

Palavras-chave: agentes quelantes; doença de Wilson; cancro; doença de Alzheimer; terapêuticas baseadas na sequestração de cobre.

ABSTRACT

Metals play a major role in biological pathways. Their homeostasis, controlled by absorption, storage and elimination mechanisms, is fundamental to the correct functioning of organisms and operates within strictly defined limits. Copper, for example, is cofactor of many enzymes and its role in pathological processes has been widely investigated.

Wilson's disease, characterized by excessive copper deposition, is a classic example for applications of compounds with chelating properties. The drugs approved for this disease are D-penicillamine, trientine, known as chelating agents, and zinc salts. Tetrathiomolybdate is a compound under development for application in the treatment of Wilson's disease, also acting as a chelating agent.

Recent works in brain diseases found a relation between disruption of iron and copper homeostasis and the etiology of neurological disorders like Alzheimer Disease. In parallel, recent investigations in carcinogenesis mechanisms link the increased concentration of copper in tumour cells, compared to corresponding normal cells, to high levels of oxidative stress. So, these results suggest the use of metal chelators as potential therapeutic agents against these diseases.

It is commonly accepted that neoplastic cells have a higher content of Cu (II) than corresponding normal cells. Recently, the design of chelating compounds with selectivity for this metal has been the focus of intense research. Ismael et al. synthesized selective and non-toxic Cu(II) ligands that become cytotoxic when complexed to Cu(II). Thus, the non-toxic ligand may bind to metal inside tumour cells, generating highly cytotoxic species *in situ*. These results, concerning the development of chelating compounds with potential for the treatment of neoplasms, open new perspectives in cancer chemotherapy.

This manuscript describes the importance of copper chelators, emphasising their potential on the development of pharmacologically active compounds with optimized properties, for effective treatment of various diseases.

Keywords: chelating compounds, Wilson's disease, cancer, Alzheimer's disease, therapeutic drugs based on copper sequestration.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE QUADROS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
I. Introdução.....	1
1.1. Os metais: relevância e efeitos nocivos no organismo humano	2
II. Compostos com capacidade quelante	8
2.1. Notas históricas da utilização terapêutica de agentes quelantes	8
2.2. O conceito de agente quelante.....	10
2.3. A química de coordenação	13
2.4. Características ideais dos ligandos para aplicações terapêuticas	15
III. Aplicações terapêuticas dos compostos com capacidade quelante	17
3.1. Doença de Wilson (DW).....	17
3.1.1. Diagnóstico	19
3.1.2. Tratamento	21
3.2. Doença de Alzheimer	25
3.2.1. Diagnóstico	27
3.2.2. Tratamento	28
3.2.3. Os metais na doença de Alzheimer	29
3.3. Cancro	32

3.3.1.	Tratamento	34
3.3.2.	Influência do cobre na fisiopatologia do cancro	35
3.4.	Outras patologias	45
IV.	Conclusão	47
V.	Referências Bibliográficas	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I-1. Representação das estruturas dos agentes quelantes BAL, EDTA, DPA e DMSA.....	2
Figura I-2. Representação da reação de Fenton.	6
Figura I-3. Representação da formação de ROS e do processo de peroxidação lipídica.....	7
Figura II-1. Representação da reação entre Lewisite e BAL, que forma um complexo estável com estrutura em anel de cinco membros.	9
Figura II-2. Representação da estrutura do quelato formado entre o metal e a etilenodiamina.	12
Figura II-3. Representação da substituição de duas moléculas de água por duas moléculas de amónia num complexo metálico.....	14
Figura II-4. Representação da substituição de seis moléculas de água por uma molécula de EDTA num complexo metálico	14
Figura III-1. Representação do anel Kayser-Fleischer	19
Figura III-2. Representação da estrutura da trientina.....	22
Figura III-3. Representação do complexo formado entre a trientina e o cobre	23
Figura III-4. Representação do anião $[\text{MoS}_4]^{2-}$	25
Figura III-5. Representação do complexo formado entre o TM e vários átomos de cobre.....	25
Figura III-6. Representação da estrutura da desferroxamina B	30
Figura III-7. Representação da estrutura do composto quelante DP-109	30
Figura III-8. Representação da estrutura do composto XH1.....	31
Figura III-9. Representação da estrutura do clioquinol.....	32
Figura III-10. Representação dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de uma neoplasia	33
Figura III-11. Representação da estrutura do complexo $\text{Cu}(\text{TMCPMP-TS})(\text{Phen})$	38
Figura III-12. Representação da estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{dppt})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{PF}_6)_2$	39
Figura III-13. Representação do ligando elesclomol e do complexo que este forma com o cobre $[\text{Cu}(\text{II})\text{-elesclomol}]$	41
Figura III-14. Representação da estrutura dos complexos formados na reação do TS (1) e o 2MTS (2) com $\text{Cu}(\text{II})$	43
Figura III-15. Representação do ligando e do seu complexo com $\text{Cu}(\text{II})$	44

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I-1. Enumeração das principais funções biológicas afetadas pelos diversos metais....	3
Quadro I-2. Resumo das principais consequências da intoxicação por metais no funcionamento do organismo humano.	5
Quadro II-1. Exemplos de diversos ligandos e respectivas estruturas. ²⁸	11
Quadro II-2. Atributos de um agente quelante ideal, com a máxima eficácia e a mínima toxicidade	16
Quadro III-1. Principais sinais e sintomas da Doença de Wilson	18
Quadro III-2. Principais sinais e sintomas presentes na Doença de Alzheimer	27

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE- produtos finais de glicosilação avançada

ANG- angiogenina

APP- proteína precursora amiloide

A β - proteína β -amiloide

BAL- 2,3-dimercaptopropanolol

BHE- barreira hematoencefálica

BSA- albumina sérica bovina

CVD- doença cardiovascular

DM- diabetes mellitus

DMPS- ácido 2,3-dimercapto-1-propanossulfônico

DMSA- ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico

DPA- D-penicilamina

DW- Doença de Wilson

EASL- Associação Europeia para o Estudo do Fígado

EB- brometo de etídio

EDTA- ácido etilenodiaminotetracético

EGF- fator de crescimento epidérmico

En- etilenodiamina

hCtr1- transportador humano de cobre

HepG2- células de carcinoma hepatocelular

HNE- 4-hidroxinonenal

HSA- albumina sérica humana

IL- interleucina

K_f- Constante de formação

MDA- malondialdeído

NFT- emaranhados neurofibrilares

NMDA- recetores N-metil-D-aspartato

ROS- espécies radicalares de oxigénio

TETA- trientina ou trietilenotetramina

TNF- α - fator de necrose tumoral

TTM- tetratiomolibdato

VEGF- fator de crescimento vascular endotelial

α -(b-FGF)- fator de crescimento fibroblástico

β - Constante global de formação do complexo

I. Introdução

Os metais integram um grande número de componentes estruturais e funcionais dos organismos vivos. No organismo humano, o seu papel ao nível fisiológico e patológico tem sido extensamente investigado, bem como o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que modulam a sua concentração em órgãos específicos ou, de um modo geral, em todo o sistema.¹

Neste contexto surgem os compostos com capacidade quelante, cujo mecanismo de ação passa por resgatar os iões metálicos em excesso, devido a desequilíbrios na homeostasia dos metais essenciais ou como consequência da exposição a metais pesados, facilitando a sua eliminação. Através da utilização controlada de compostos quelantes é possível que as concentrações de iões metálicos em excesso diminuam, aproximando-se dos valores fisiológicos tidos como normais.^{1,2}

Os agentes quelantes foram tradicionalmente desenhados com o objetivo de atuarem como antídoto em intoxicação por metais. A primeira aplicação experimental de um agente quelante como antídoto foi protagonizada por Kety e Letonoff's, em 1941, através da utilização de um citrato na intoxicação por chumbo.² Contudo, com a evolução da ciência e em resultado da investigação dos processos biológicos, tem-se descoberto uma importante influência da concentração de metais em variados processos biológicos. O desequilíbrio na homeostasia de metais foi assim associado a alguns estados patológicos, como anemia, doença de Wilson, cancro, doenças do foro neurológico (i.e doença de Alzheimer e doença de Parkinson), entre outros.

Estão atualmente disponíveis para aplicação clínica várias moléculas com capacidade quelante, como por exemplo 2,3-dimercaptopropanolol (BAL), ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), D-penicilamina (DPA), ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), entre outros (**figura I-1**).

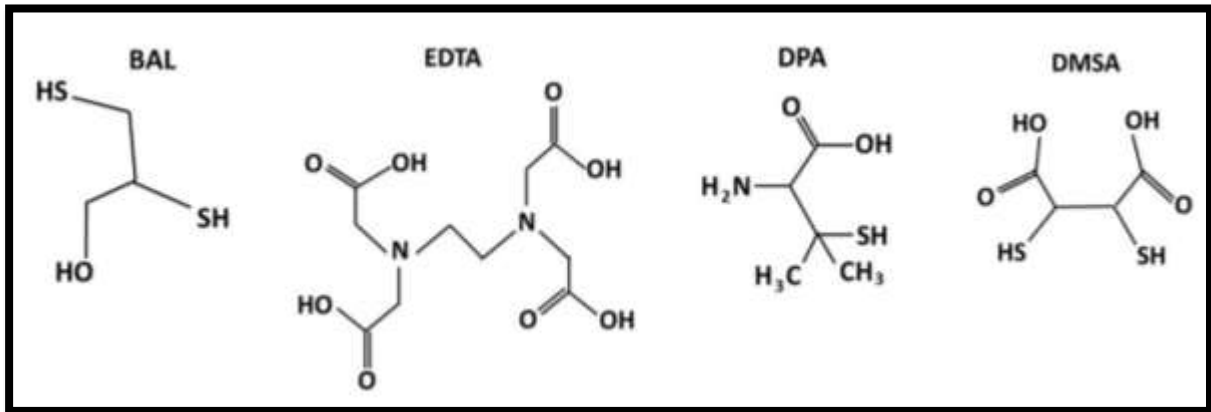


Figura I-1: Representação das estruturas dos agentes quelantes BAL, EDTA, DPA e DMSA.³

Contudo, estes compostos apresentam algumas limitações, incluindo graves reações adversas devidas por exemplo a falta de seletividade, sendo premente o desenvolvimento de quelantes com propriedades farmacológicas melhoradas.

A temática da presente monografia é focada nos compostos com capacidade quelante, referindo as suas aplicações terapêuticas já estabelecidas e as suas principais limitações, bem como as perspectivas futuras da sua utilização, com base em trabalhos levados a cabo pelos diferentes atores da comunidade científica.

1.1. Os metais: relevância e efeitos nocivos no organismo humano

Os metais são constituintes fundamentais da crosta terrestre, apresentando-se principalmente na forma de sais inorgânicos. Por este motivo, encontram-se entre as mais antigas substâncias tóxicas de origem natural conhecidas pelo Homem. A contaminação ambiental e a exposição humana a estes compostos provêm essencialmente de atividades antropogénicas, como os processos industriais e a utilização de compostos metálicos em meio doméstico e na agricultura. Por outro lado, também existe um relevante contributo dos fenómenos naturais para a contaminação ambiental por metais, de que são exemplos a deterioração das rochas e a atividade vulcânica. A absorção de metais pelo organismo pode ocorrer através da dieta, da utilização de fármacos, da exposição a ambientes poluídos por

metais, do contacto com metais no âmbito de atividades profissionais que os envolvam, entre outros.^{4,5}

Contudo, e para além de serem constituintes da natureza, os metais são necessários e mesmo essenciais ao funcionamento do organismo humano, ainda que por vezes em quantidades vestigiais, pois fazem parte de componentes celulares estruturais e funcionais, participando em diversos processos fisiológicos, como documentado no **quadro I-1**. Assim, a sua carência pode conduzir a diversas patologias, de que são exemplos a anemia, por défice de ferro, e a diabetes, por défice de crómio.⁶

Quadro I-1: Enumeração das principais funções biológicas afetadas pelos diversos metais.

Metal	Funções biológicas
Cobre(Cu)^{5,7}	<ul style="list-style-type: none">• Participa no transporte de eletrões;• É cofator enzimático (citocromo C oxidase, ascorbato oxidase e superóxido dismutase) em reações redox.
Crómio (Cr)^{5,7}	<ul style="list-style-type: none">• Potencia o efeito da insulina e é necessário para o metabolismo normal da glucose.
Cobalto (Co)⁷	<ul style="list-style-type: none">• Faz parte da vitamina B12, sendo essencial para o Homem.
Ferro (Fe)⁸	<ul style="list-style-type: none">• É essencial para a síntese de DNA, para a produção de ATP, para o transporte do oxigénio, para diversas atividades enzimáticas, para a mielinização dos neurónios e para a regulação da resposta do sistema imunitário.
Zinco (Zn)⁷	<ul style="list-style-type: none">• É um componente de metaloproteínas envolvidas na proteção do organismo contra o stress oxidativo;• Contribui para o bom funcionamento do sistema imunitário;• Tem propriedades neuroprotetoras;• Tem influência na ação da insulina e na concentração sanguínea de glucose;

	<ul style="list-style-type: none"> • Atua como antioxidante, pois reduz a formação de espécies radicalares de oxigénio (ROS) e como anti-inflamatório, pois reduz a produção de citocinas inflamatórias.
Manganês (Mn)⁸	<ul style="list-style-type: none"> • Necessário à formação óssea e ao metabolismo dos hidratos de carbono e dos lípidos. • É essencial ao funcionamento da superóxido dismutase (MnSOD) Mn-dependente, que é uma importante enzima antioxidante. • Funciona como cofator em enzimas envolvidas na neurotransmissão, como é o caso da glutamina.
Mercúrio (Hg)	<ul style="list-style-type: none"> • Sem funções biológicas conhecidas.^{7,8}
Chumbo (Pb)	
Cádmio (Cd)	
Arsénio (As)	

A comunidade científica define “metal pesado” como um elemento do grupo dos metais que ocorre naturalmente e que tem um elevado peso atómico, com uma densidade pelo menos cinco vezes superior à da água ($\geq 5\text{g/cm}^3$).⁵ Esta categoria é protagonizada, geralmente, pelos elementos arsénio (As), chumbo (Pb), mercúrio (Hg), cádmio (Cd) e crómio (Cr) pois, dada a sua elevada toxicidade, podem provocar danos nos órgãos mesmo quando presentes em quantidades residuais.^{5,9}

O grau de toxicidade dos metais depende da sua biodisponibilidade, sendo esta influenciada por fatores físicos (i.e. temperatura, adsorção e destoxificação), químicos (i.e. o metal em questão e a sua espécie química, a cinética de complexação, solubilidade) e biológicos (i.e. a dose absorvida, se a exposição é aguda ou crónica, a idade da pessoa e a sua capacidade de adaptação, a via de absorção).⁵

Os principais efeitos conhecidos provocados por intoxicação pelos diversos metais estão apresentados no **quadro I-2**. A maioria destas substâncias exibe a capacidade de gerar

stress oxidativo nas células, conduzindo a alterações do DNA e classificando-se, por isso, como carcinogénicas.

Quadro I-2: Resumo das principais consequências da intoxicação por metais no funcionamento do organismo humano.

Metal	Efeitos tóxicos
Crómio (Cr)^{5,7}	<ul style="list-style-type: none">• Dermatite• Disfunção renal• Asma• Cancro no trato respiratório
Mercúrio (Hg)⁵	<ul style="list-style-type: none">• Nefrotoxicidade• Neurotoxicidade• Toxicidade gastrointestinal
Chumbo (Pb)^{7,10,11}	<ul style="list-style-type: none">• Inibição da hematopoiese• Encefalopatia, défice cognitivo e neuropatia periférica• Hipertensão
Cádmio (Cd)⁵	<ul style="list-style-type: none">• Alterações pulmonares• Diminuição do olfato• Diminuição da mineralização óssea e osteoporose• Depressão
Arsénio (As)⁵	<ul style="list-style-type: none">• Doenças cardiovasculares• Anomalias no crescimento• Problemas neurológicos e de comportamento• Diabetes• Perda de audição• Problemas hematológicos• Cancro das células epiteliais

Os metais possuem eletrões livres que facilmente podem formar ligações covalentes com os grupos electrodoadores, de que são exemplo os grupos tiol (-SH) de resíduos de cisteína das proteínas celulares, conduzindo à sua modificação química. Por outro lado, estas moléculas são capazes de induzir stress oxidativo nas células, sendo este um dos principais processos pelos quais os metais exercem na sua toxicidade.⁴ Assim, é importante que exista um equilíbrio das suas concentrações, pois o défice ou excesso prolongado de metais no organismo pode estar associado a diversas patologias.⁵

Nas duas últimas décadas tem-se observado que alguns catiões metálicos derivados dos metais ferro, cobre, cadmio, mercúrio, níquel e chumbo têm capacidade de originar radicais livres centrados em oxigénio, frequentemente designados por ROS, que provocam, conseqüentemente, stress oxidativo. As principais espécies formadas são o radical superóxido e o radical hidroxilo, via Reação de Fenton (**figura I-2**), que posteriormente resultam em espécies mutagénicas e carcinogénicas, como o malondialdeído (MDA), o 4-hidroxinonenal (HNE) e outros adutos exocíclicos de DNA. A proteção antioxidante celular é insuficiente para neutralizar a ação dessas espécies, que provocam interações com o DNA, peroxidação lipídica, modificação de proteínas e outros efeitos caraterísticos, responsáveis por patologias como cancro, doença cardiovascular, doenças neurológicas, diabetes, entre outros.^{7,12,13}

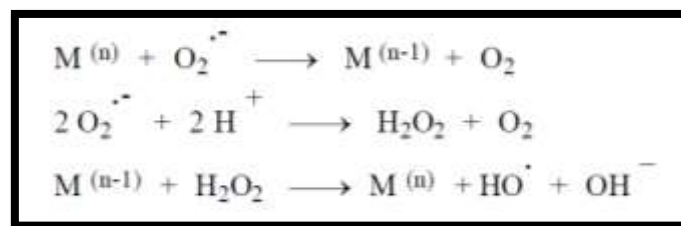


Figura I-2: Representação da reação de Fenton. Adaptado de Barbusinski et al.¹⁴

O processo de peroxidação lipídica (**figura I-3**) é catalisado por iões metálicos e origina radicais peróxido (ROO·). Após a sua produção, estes sofrem isomerização através de reações de ciclização e formam-se endoperóxidos que dão origem ao MDA e ao HNE. O MDA reage

com as bases azotadas guanina, adenina e citosina, formando adutos mutagênicos e carcinogênicos.⁷

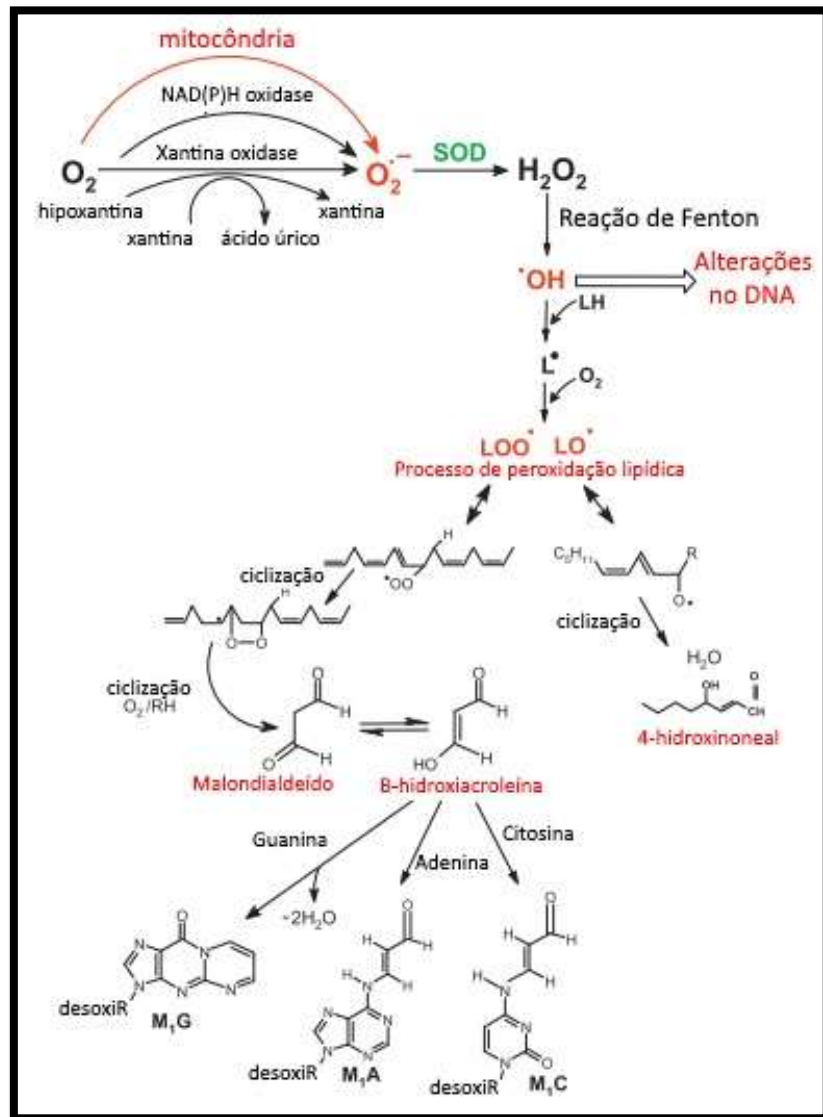


Figura 1-3: Representação da formação de ROS e do processo de peroxidação lipídica. Adaptado de Jomova et al.⁷

II. Compostos com capacidade quelante

2.1. Notas históricas da utilização terapêutica de agentes quelantes

A terapia quelante é utilizada desde do século XX, no tratamento de intoxicação por metais pesados. Uma das suas primeiras aplicações em medicina foi no controlo da toxicidade apresentada pelos compostos de arsénio, utilizados no tratamento da sífilis. A primeira demonstração experimental da capacidade quelante de um composto foi realizada por Kety e Letonoff, em 1941, e consistiu na administração de citrato a indivíduos que haviam sofrido intoxicação por chumbo.¹⁵

Também na década de 40 do século passado, procedeu-se à síntese do primeiro composto com capacidade quelante, em resposta à necessidade de combater uma potente arma química utilizada na segunda guerra mundial, 2-clorovinildicloroarsina, vulgarmente denominado Lewisite.¹⁶ Este composto, produzido por Lewis em 1917, é um potente gás tóxico, com arsénio na sua composição, que apresenta uma grande afinidade para o grupo tiol (-SH) das proteínas.¹⁷

Após exposição ao Lewisite, os sinais e sintomas imediatos são irritação da pele e dos olhos, alterações respiratórias, distúrbios gastrointestinais e diminuição da pressão arterial. Após exposição prolongada ocorrem queimaduras na pele, patologias respiratórias crónicas e cegueira.¹⁸ Dada a toxicidade desta arma química, no início da segunda grande guerra o governo britânico incentivou a investigação e o desenvolvimento de um antídoto. Assim, um grupo de bioquímicos da Universidade de Oxford produziu o composto 2,3-dimercaptopropanol, cognominado pelos americanos como British Anti-Lewisite (BAL).¹⁹ Na **figura II-1** está representada a reação entre o Lewisite e o BAL. Este composto é um ditiol instável em meio aquoso e, por isso, é formulado numa base oleosa, geralmente óleo de amendoim, o que aumenta a probabilidade da ocorrência de reações alérgicas. É administrado por via intramuscular e apresenta um cheiro intenso.^{20,21}

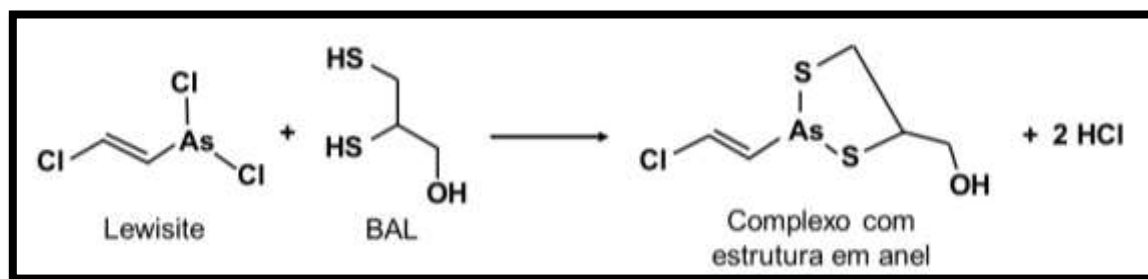


Figura II-1: Representação da reação entre Lewisite e BAL, que forma um complexo estável com estrutura em anel de cinco membros. Adaptado de Flora et al.²²

Mais tarde foram descobertas diversas aplicações do BAL em medicina, nomeadamente no tratamento de intoxicações por arsénio, ouro, mercúrio e chumbo. BAL é usado, em conjunto com CaNa₂EDTA, no tratamento de intoxicações por chumbo em crianças, e foi utilizado pela primeira vez como tratamento na Doença de Wilson em 1951.¹⁹

Em 1950 foram desenvolvidos o ácido 2,3-dimercapto-1-propanossulfónico (DMPS) e o ácido meso-2,3- dimercatossuccínico (DMSA), que apresentam vantagens relativamente ao BAL, pois são biologicamente mais estáveis, menos tóxicos e podem ser administrados por via oral.²³

A terapia intravenosa com ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) foi iniciada na urgência do hospital da Universidade de Georgetown, em 1952, quando surgiu uma criança com intoxicação por chumbo.²⁴ Em 1956 foi desenvolvida a D-Penicilamina, que passou a ser utilizada como terapêutica preferencial na Doença de Wilson, conduzindo a bons resultados terapêuticos.²⁵ Contudo, mais tarde revelou vários efeitos adversos, incluindo intolerância a este fármaco, deixando de ser a primeira linha terapêutica nos doentes que manifestavam reação de hipersensibilidade.²⁶

Os compostos com capacidade quelante aqui referidos foram desenvolvidos e utilizados para fins terapêuticos desde do século passado. Todavia, as limitações destes compostos, ao nível dos efeitos secundários adversos que provocam, limitam a sua utilização. Assim, afigura-se urgente desenvolver investigação que conduza à seleção de

moléculas com eficácia quelante e com propriedades farmacológicas melhoradas, sobretudo ao nível da seletividade e toxicidade.

2.2. O conceito de agente quelante

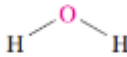
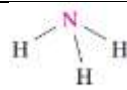

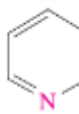
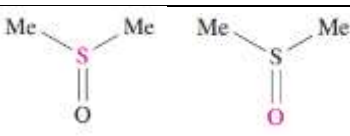
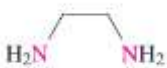

No contexto da química de coordenação é importante definir alguns conceitos:


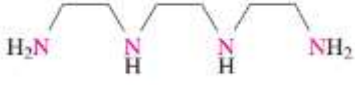
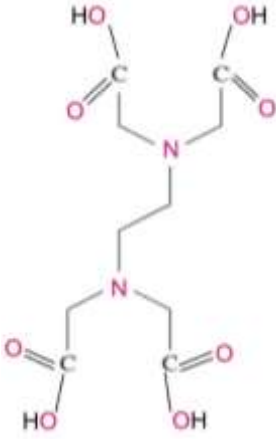
- **Composto de coordenação** é uma molécula neutra ou iónica em que pelo menos um dos seus iões é um complexo.
- **Complexo** é uma espécie química que resulta da combinação de um ácido de Lewis (o átomo ou catião metálico central) com um determinado número de bases de Lewis (os ligandos).
- **Ligando** é um ião ou molécula que pode existir por si só. O ligando possui pelo menos um átomo que forma a ligação com o átomo ou catião metálico central, denominado como átomo doador porque fornece/partilha o par de eletrões utilizado na formação da ligação com a espécie aceitadora. Geralmente, nos ligandos, os átomos doadores são oxigénio, azoto e/ou enxofre.
- **Número de coordenação** do metal corresponde ao número de ligandos que se podem ligar diretamente ao átomo central. Este número depende do tamanho do átomo central, das interações entre os ligandos e das interações eletrónicas entre o átomo central e os ligandos. Assim:
 - ✓ Raios iónicos mais elevados favorecem maiores números de coordenação;
 - ✓ Ligandos com maior volume conduzem a menores números de coordenação, especialmente se tiverem carga, o que aumenta as interações electrostáticas;
 - ✓ Iões metálicos com poucos eletrões favorecem maiores números de coordenação, pois um menor número de eletrões de valência permite/favorece que o ião aceite mais eletrões da base de Lewis.²⁷

Os ligandos que apresentam apenas um par de eletrões livre, e que só têm um local de ligação com o metal, são denominados “monodentados”. Os que têm dois pontos de ligação são “bidentados”, e por aí em diante. Assim, os que apresentam vários pontos de ligação com o ião metálico podem ser designados de ligandos “polidentados” (**quadro II-1**).²⁸

A junção pode ser constituída por duas ligações covalentes, uma covalente e uma coordenada, ou duas coordenadas. Considera-se que na ligação coordenada os dois eletrões são provenientes de um só átomo, enquanto que na ligação covalente há contributo de ambos os átomos. A sua intensidade depende das espécies envolvidas e da sua estereoquímica.²⁹

Quadro II-1: Exemplos de diversos ligandos e respetivas estruturas.²⁸

Nome do ligando	Abreviatura (se definido)	Denticidade	Estrutura (átomo doador com cor vermelha)
Água		Monodentado	
Amoníaco		Monodentado	
Tetrahidrofurano	THF	Monodentado	
Piridina	py	Monodentado	
Dimetilsulfóxido	DMSO	Monodentado	
Etilenodiamina	en	Bidentado	
Oxalato	[ox] ²⁻	Bidentado	

1,4,7-Triazaheptano	dien	Tridentado	
1,4,7,10-Tetraazadecano	trien	Tetradentado	
Ácido etilenodiaminotetraacético	[EDTA]	Hexadentado	

Os ligandos polidentados podem formar um quelato, isto é, um complexo em que se forma um anel que inclui o átomo metálico e o ligando. Um exemplo é o ligando bidentado etilenodiamina (en) que forma um anel de cinco membros, pois ambos os átomos de azoto se ligam ao metal (**figura II-2**).²⁷

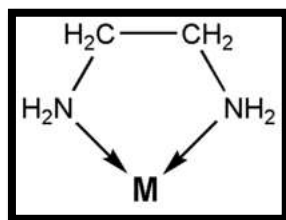


Figura II-2: Representação da estrutura do quelato formado entre o metal e a etilenodiamina. Adaptado de Atkins et al.²⁷

Depois de formados os quelatos no organismo, parte segue a via renal e é excretado na urina, enquanto que o restante segue pela via hepática, sendo excretado na bÍlis. Contudo, a destoxificação dos metais é limitada pela recirculação entero-hepática e pela reabsorção intestinal, diminuindo a quantidade de metal excretada.

2.3. A química de coordenação

A reação entre o agente quelante e o ião metálico (**equação 1**) é regida pelas leis do equilíbrio e, por isso, tem associada uma constante que, geralmente, é designada por “constante de formação”.³⁰ Este parâmetro expressa a força de interação do ligando com o catião metálico, em comparação com a sua interação com as moléculas de solvente, que normalmente se consideram moléculas de água. Cada passo da reação de complexação, que corresponde à substituição de cada molécula de solvente pela molécula de ligando, tem atribuída uma constante de formação (K_f). Um valor elevado de K_f significa que a interação entre o ligando e o ião metálico é superior à interação do ião com a molécula de solvente, e vice-versa.³¹

De forma a interpretar a interação dos ligandos com o átomo metálico, considera-se a constante global de formação do complexo (β). Esta é o produto das constantes correspondentes a cada substituição das moléculas de solvente (K_{f_n}).³²



M representa o metal; L representa o ligando; n é o número de ligandos que complexam o metal.

A constante global de formação β é expressa por:

$$\beta = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n} \quad (2)$$

Dado que os valores de β são muito elevados é comum ser expresso pelo seu logaritmo. Por exemplo, a diferença de uma unidade em $\log\beta$ significa uma diferença de 10 vezes na constante de formação.³³ Assim, quanto maior for $\log(\beta)$ mais deslocado à direita está o equilíbrio e maior é a estabilidade do complexo.³¹

O efeito de quelação ocorre quando se substituem moléculas de água (ou de outros ligandos simples), ligados ao ião metálico central, por ligandos polidentados, como é exemplo o EDTA, aumentando a estabilidade do complexo. O aumento da estabilidade no

processo de quelação está relacionado com o balanço energético, sendo este muito influenciado pelo aumento da entropia do sistema. Assim, considerando por exemplo a substituição de duas moléculas de água por duas moléculas de amoníaco (**figura II-3; equação 3**) e por uma molécula de EDTA (**figura II-4; equação 4**), pode verificar-se que há um elevado aumento de entropia na **figura II-4**, o que faz com que a estabilidade do sistema aumente, comparativamente à do estado representado na **figura II-3**.^{33,34}

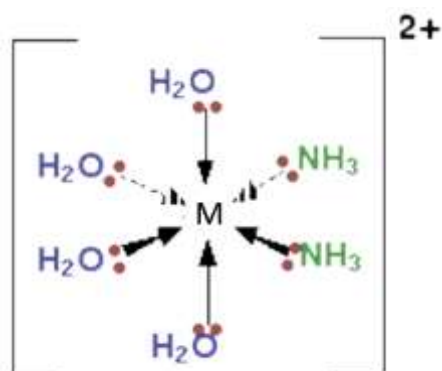


Figura II-3: Representação da substituição de duas moléculas de água por duas moléculas de amónia num complexo metálico. Fonte: Clark et al.³³

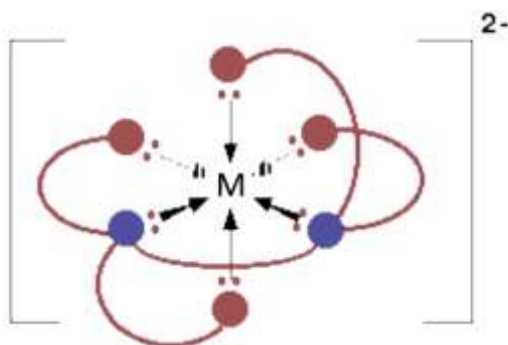
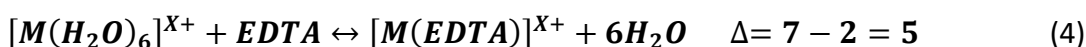
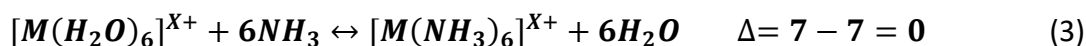


Figura II-4: Representação da substituição de seis moléculas de água por uma molécula de EDTA num complexo metálico. Fonte: Clark et al.³³

O aumento entrópico deve-se ao maior número de partículas livres em solução (Δ)³⁴:



Em que Δ é a diferença entre o número de moléculas no lado direito da reação e o número de moléculas no lado esquerdo. Quando mais elevado é o valor de Δ maior é o aumento entrópico no decorrer da reação.³⁴

Desta forma, os complexos com ligandos multidentados são geralmente mais estáveis do que os que contêm apenas ligandos monodentados, e quanto maior o número de ligações estabelecidas entre o ligando e o íão metálico maior a estabilidade do complexo. Se o ligando multidentado substituir mais do que uma molécula de água, conduz a um maior número de espécies no sistema e, conseqüentemente, ao aumento da entropia. Por sua vez, o aumento da entropia favorece a formação do quelato.³⁴

2.4. Características ideais dos ligandos para aplicações terapêuticas

A eficácia *in vivo* dos compostos com capacidade quelante requer que grande parte do composto administrado se ligue, de fato, ao metal que se pretende eliminar. O cumprimento desta condição depende do metal, do agente quelante e de características relacionadas com o próprio organismo. É importante ter em conta a toxicidade do composto quelante, assim como do complexo resultante.³⁵

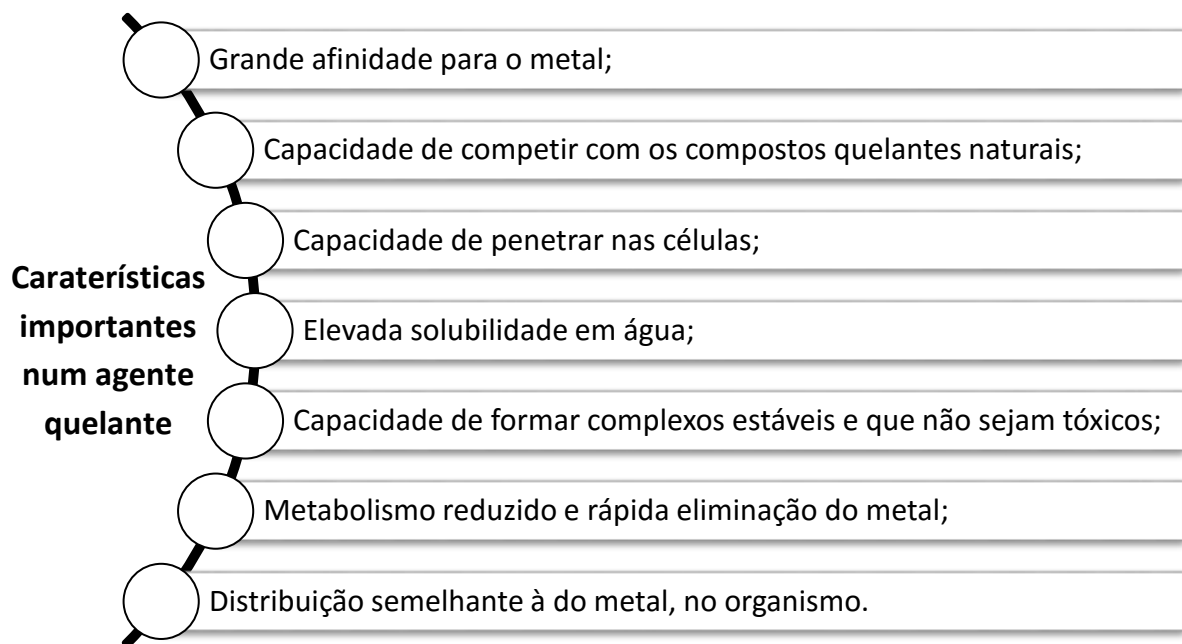
Os compostos hidrofílicos promovem a excreção renal, mas têm dificuldade em aceder ao metal no meio intracelular. Por outro lado, uma molécula com caráter lipofílico mobiliza facilmente a fração intracelular, mas conduz a uma maior redistribuição do metal, incluindo no sistema nervoso central.³⁵

Nas patologias que carecem de uma terapia crónica com compostos quelantes, os variados efeitos adversos são um fator limitante. Um dos pontos críticos é a seletividade para o metal, pois é importante não complexar as reservas dos metais essenciais ao funcionamento do organismo.²⁹

Desta forma, as características ideais de um composto quelante incluem uma boa solubilidade em água, resistência à biotransformação, capacidade para aceder aos locais

onde está armazenado o metal que se pretende eliminar, capacidade para manter a sua capacidade quelante nos diferentes fluídos biológicos, resistindo a variações de pH fisiológico e capacidade para formar complexos menos tóxicos do que o ião metálico livre (**quadro II-2**). A estabilidade do complexo é principalmente determinada pela capacidade de deslocalização dos eletrões doados e aceites e pelo efeito de quelação.²⁹

Quadro II-2: Atributos de um agente quelante ideal, com a máxima eficácia e a mínima toxicidade. Fonte: Srivastava et al.²⁹



A administração oral de agentes quelantes, que formam complexos hidrofílicos, nos momentos após ingestão do metal tóxico, quando grande parte deste ainda permanece no sistema gastrointestinal, reduz tanto a toxicidade local como a reabsorção ao nível intestinal. Desta forma, há redução dos efeitos tóxicos, localmente e ao nível sistémico.²

III. Aplicações terapêuticas dos compostos com capacidade quelante

A utilização de compostos com capacidade quelante como terapia de diversas patologias tem sido intensamente investigada e desenvolvida. Neste caso, são discutidos especialmente os quelantes de cobre, pois este metal tem revelado especial interesse em doenças muito presentes nos dias que correm, como o cancro e a doença de alzheimer por exemplo.

3.1. Doença de Wilson (DW)

O consumo de cobre na dieta é geralmente superior à quantidade metabólica necessária, sendo a sua homeostasia assegurada pela excreção biliar do metal em excesso.

A Doença de Wilson, também designada por degeneração hepatolenticular, é uma patologia genética autossómica recessiva em que há alteração da eliminação do cobre devido a mutações no gene *ATP7B*, localizado no cromossoma 13. A diminuição da eliminação de cobre provoca a sua acumulação, principalmente no fígado e no cérebro. Esta patologia pode afetar pessoas com qualquer idade, mas manifesta-se maioritariamente em pessoas entre os 5 e os 35 anos. Estima-se que 1 em cada 30000 pessoas em todo o mundo sofre de DW.³⁶

O gene *ATP7B* codifica uma proteína transmembranar, ATPase tipo-P, localizada no complexo de Golgi dos hepatócitos. Esta proteína é responsável pelo transporte ativo dos catiões de cobre, desde as proteínas chaperone até à sua via de eliminação, podendo esta ocorrer no complexo de Golgi, onde integra a apo-ceruloplasmina para formar ceruloplasmina funcional, ou no transporte para a bÍlis, de forma a eliminar o excesso armazenado. Já foram descritas mais de 500 mutações no gene *ATP7B*, das quais 380 estão comprovadamente envolvidas na patogénese da doença.³⁷

A DW manifesta-se essencialmente através de sintomas hepáticos, como hepatite crónica, cirrose ou falha hepática fulminante, observando-se também sintomas neurológicos, psiquiátricos e oftálmicos, como descrito no **quadro III-1**.³⁸

Quadro III-1: Principais sinais e sintomas da Doença de Wilson. Fonte: Ala et al.³⁸

Hepáticos	<ul style="list-style-type: none">•Hepatite crónica•Cirrose•Falha hepática fulminante
Neurológicos	<ul style="list-style-type: none">•Dificuldades na fala e na deglutição (Distonia dos músculos bulbares)•Dificuldades em escrever e caminhar•Tremores e rigidez
Psiquiátricos	<ul style="list-style-type: none">•Alteração da performance intelectual•Défice de atenção e hiperatividade•Psicose obsessiva e paranóica•Depressão e pensamento suicida
Oftálmicos	<ul style="list-style-type: none">•Anel Kayser-Fleischer (figura III-1)•Cataratas

O anel de Kayser-Fleischer resulta da acumulação de cobre na membrana de Descemet da córnea e é o principal sinal da patologia, manifestando-se em cerca de 95% dos doentes que apresentam sintomas neurológicos.^{37,38}

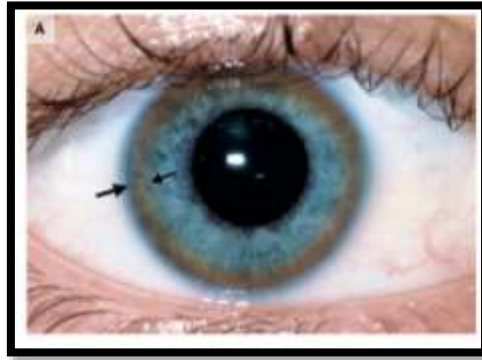


Figura III-1: Representação do anel Kayser-Fleischer. Adaptado de Schrang et al.³⁹

As consequências ao nível hepático podem variar: assintomáticas; apenas com variações bioquímicas; cirrose; falha hepática fulminante, associada a anemia hemolítica Coombs-negativa (não auto-imune); e falha renal aguda.³⁷

Os distúrbios neurológicos podem ser classificados em quatro grupos: (1) Síndrome acinéutico, semelhante à doença de Parkinson; (2) Pseudosclerose com, predominantemente, tremor; (3) Ataxia; e (4) Distonia. Contudo, em muitos doentes é difícil classificar a DW com base apenas numa categoria, pois apresentam vários distúrbios com intensidade variada.³⁸

Podem surgir outros sintomas menos comuns, como gigantismo, alterações renais (aminoacidúria e nefrolitíase), cardiomiopatia, osteoartrite, hipoparatiroidismo, pancreatite e infertilidade.³⁶

3.1.1. Diagnóstico

É difícil estabelecer o diagnóstico da DW, pois a patologia afeta vários órgãos e apresenta sintomas pouco específicos, que se podem confundir com os de outras doenças. Torna-se assim mais simples diagnosticar quando o doente apresenta anéis K-F, sintomas neurológicos e baixa concentração sérica de ceruloplasmina. Por outro lado, em doentes que

apresentam sintomas hepáticos, o diagnóstico pode ser mais complicado, devendo o diagnóstico da DW deve ser baseado numa combinação de métodos. Os mais utilizados são:

Concentração sérica de ceruloplasmina: A ceruloplasmina é o maior transportador de cobre no sangue. Os níveis séricos desta proteína podem ser medidos enzimaticamente, ou através de testes imunológicos, contudo estes últimos não distinguem entre apoceruloplasmina e holoceruloplasmina. Quando a concentração de ceruloplasmina é inferior a 0,1g/L pode diagnosticar-se a DW. Este método apresenta algumas limitações porque podem existir “falsos negativos” (concentração dentro dos parâmetros normais), associados a situações de inflamação aguda, na gravidez e na suplementação com estrogénio. Por outro lado, estados de hipoproteinémia, doença de Menke e aceruloplasminémia podem provocar redução da concentração sérica de ceruloplasmina e gerar “falsos positivos” (concentração inferior aos limites normais).⁴⁰

Concentração de cobre no fígado: em doentes homozigóticos, esta deverá ser superior a 250µg/g. Este é um método de diagnóstico importante da DW, embora deva ser interpretado num contexto histológico, clínico e bioquímico, pois as concentrações de cobre inferiores a 250 µg/g não excluem a possibilidade de existir a patologia e também podem ser verificadas concentrações mais elevadas em indivíduos sem esta patologia.⁴⁰

Excreção urinária de cobre: A excreção urinária de cobre consiste em espécies livres, isto é, o cobre que não está ligado à ceruloplasmina. Este método é útil no diagnóstico e na monitorização do tratamento. Em doentes com a patologia, a quantidade excretada durante 24h deverá ser superior a 100 µg (1,6 µmol).⁴⁰

Podem ser realizados outros testes, tais como biópsia hepática, análise da história familiar e análise genética.⁴⁰

Assim que é estabelecido o diagnóstico deve iniciar-se imediatamente o tratamento, pois quanto mais cedo se combater a patologia menores serão as consequências e maior será a esperança de vida do indivíduo. Se a doença não for detetada e tratada a tempo, pode ser fatal.⁴¹

3.1.2. Tratamento

O objetivo terapêutico na DW é prevenir o aparecimento de sintomas em doentes assintomáticos e evitar o agravamento do quadro clínico em indivíduos sintomáticos. Na ausência de sintomas o tratamento passa por sais de zinco ou por compostos quelantes em dosagem reduzida. No caso de existirem sintomas são utilizados apenas compostos quelantes ou a sua combinação com sais de zinco. Em casos graves, quando a função hepática está bastante afetada, pode ser necessário recorrer ao transplante de fígado.⁴²

O primeiro tratamento oral da DW foi a D-penicilamina, em 1956. Este fármaco promove a excreção urinária de cobre e estimula a produção de metalotioneína, que se combina com o metal formando compostos não tóxicos e facilmente eliminados. Segundo as recomendações da Associação Europeia para o Estudo do Fígado (EASL), a posologia em adultos deverá variar entre 700 e 1500 mg/dia, repartida em duas ou três tomas, e em crianças deverá ser até 20mg/kg/dia, repartida em duas ou três tomas. A D-penicilamina deve ser administrada uma hora antes, ou duas horas após as refeições, pois a sua absorção é diminuída pelos alimentos. O aumento progressivo da dose administrada pode aumentar a tolerância ao fármaco. Dado que este fármaco interfere com a ação da piridoxina (vitamina B₆) deverá ser feita a suplementação com 25-50 mg/dia de piridoxina durante o tratamento.

37

O tratamento com D-penicilamina deverá ser monitorizado quinzenalmente nos primeiros seis meses, e posteriormente a cada dois meses. A monitorização é realizada através da quantificação da excreção urinária de cobre em 24h, que deverá ser máxima imediatamente após o início da terapêutica, assumindo valores superiores a 1000µg. A ceruloplasmina sérica deve diminuir com o início do tratamento.⁴³

A D-penicilamina tem associados diversos efeitos adversos, que poderão ser graves e limitar a sua utilização, incluindo hipersensibilidade, manifestada principalmente por febre e erupções cutâneas, linfadenopatia, nefrotoxicidade, depressão da medula óssea, síndrome semelhante a lúpus caracterizado por hematúria, proteinúria, artralgia e aparecimento de

anticorpos antinucleares. Pode ser observado o agravamento dos sintomas neurológicos no início do tratamento, devido à rápida mobilização do cobre. Em alguns casos o tratamento deve ser interrompido nesta situação.⁴²

Em 1969, como alternativa à D-penicilamina, foi introduzida a trientina (**figura III-2**) para o tratamento da DW em doentes intolerantes àquele fármaco. Apesar de apresentar um custo elevado, e de os ensaios clínicos serem limitados, este fármaco apresenta um bom perfil de segurança e eficácia que lhe confere uma potencial utilização como tratamento inicial na DW, e não só como alternativa à D-penicilamina.⁴⁴

A trientina ou trietilenotetramina (TETA) tem estrutura semelhante a uma poliamina e quelata o cobre através da formação de um complexo estável que inclui os quatro átomos de azoto num anel planar (**figura III-3**). Neste caso, também há promoção da excreção urinária de cobre.⁴⁰

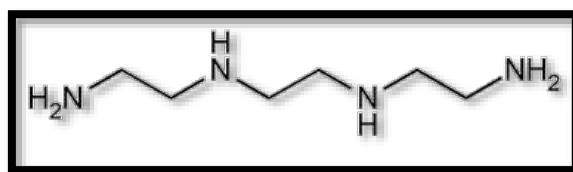


Figura III-2: Representação da estrutura da trientina. Adaptado de Kodama et al.⁴⁵

Apesar de existir pouca informação sobre a farmacocinética deste composto, sabe-se que é pouco absorvido no trato gastrointestinal e que a pequena quantidade que é absorvida, é transformada em metabolitos inativos.³⁷

A dosagem utilizada no início do tratamento é entre 900 e 2700 mg/dia, administrada em duas ou três tomas. Na fase de manutenção, a posologia diminui para 900-1500 mg/dia. Na população pediátrica, a dose a administrar ronda os 20 mg/kg/dia, em duas ou três tomas. Devido a interação com os alimentos, a administração deve ser efetuada 1h antes, ou 3h após as refeições. Os comprimidos de trientina não são estáveis por longos períodos de tempo, a temperaturas elevadas, o que limita as condições de conservação deste fármaco.³⁷

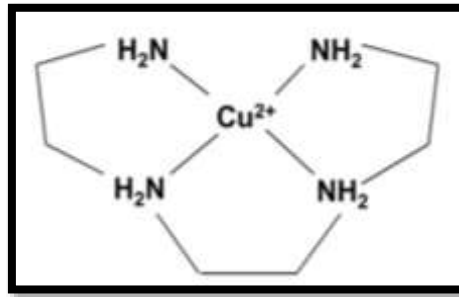


Figura III-3: Representação do complexo formado entre a trientina e o cobre. Adaptado de Kodama et al.⁴⁵

Os efeitos adversos da trientina reportados foram: agravamento neurológico, sendo, contudo, menos comum do que com D-penicilamina; neurotoxicidade; aumento de toxicidade quando se coadministra Fe (II), pelo que esta associação deve ser evitada; anemia sideroblástica reversível; acumulação de ferro no fígado, como acontece na sequência do tratamento com a D-penicilamina; dispepsia; espasmos musculares e distonia.⁴⁰

A eficácia do tratamento é monitorizada pela quantificação da excreção urinária de cobre em 24 horas, isto é, do metal que não está ligado à ceruloplasmina.⁴⁰

Nos anos 60, os sais de zinco demonstraram eficácia no tratamento da DW e têm sido utilizados como terapêutica de manutenção, ou em doentes assintomáticos. O seu mecanismo de ação consiste em aumentar a síntese de metalotioneína, que favorece o aprisionamento de cobre, ingerido através da dieta, nas células epiteliais intestinais e, conseqüentemente, a sua eliminação nas fezes.⁴⁶ Por outro lado, o zinco também estimula a metalotioneína intra-hepática, o que confere proteção adicional a este órgão, inibe a peroxidação lipídica e aumenta a glutatona nos hepatócitos, reduzindo os danos provocados pelo stress oxidativo. Visto que o zinco não provoca uma mobilização brusca de cobre, como os agentes quelantes supracitados, o seu efeito neurotóxico é menos acentuado, pelo que a estratégia terapêutica que envolve a utilização de sais de zinco é particularmente útil em doentes com sintomas de distúrbios neurológicos.⁴⁴

A dose recomendada de zinco em adultos é 150mg/dia, dividida em três tomas, e na população pediátrica é 75mg/dia, igualmente repartida em três administrações. Como acontece com os compostos quelantes utilizados na DW, os sais de zinco também devem ser administrados fora das refeições, pois os alimentos diminuem a sua absorção, comprometendo a eficácia da terapêutica.³⁷ Dado que o pico de indução das metaloproteínas intestinais ocorre três semanas após o início do tratamento com sais de zinco, deve continuar a ser administrado um dos compostos quelantes supra indicados durante esse período, garantindo um intervalo de pelo menos uma hora entre a administração dos dois fármacos.⁴²

Comparativamente às alternativas terapêuticas, o zinco apresenta poucos efeitos adversos. Estes incluem irritação gástrica, intolerância ao álcool, dores de cabeça, aumento da sudorese, anemia sideroblástica e aumento transitório da lipase plasmática, da amilase e da fosfatase alcalina. Assim, as orientações europeias recomendam a combinação de um agente quelante e de zinco no tratamento da DW.^{37,42}

Existem diversos alimentos ricos em cobre, como são exemplo o chocolate, frutos secos, cogumelos, soja, gelatina, bivalves, fígado, entre outros, que devem ser evitados como medida complementar ao tratamento farmacológico.⁴⁷

Nos últimos anos têm-se realizado diversos estudos para averiguar o potencial do tetratiomolibdato (TTM) no tratamento da DW (**figura III-4**). Este composto forma um complexo com o cobre (**figura III-5**) e com a proteína, atuando através de dois mecanismos: no plasma, forma complexos com os iões de cobre, quando administrado entre as refeições; no intestino, quando administrado durante as refeições, induz a síntese de metaloproteínas e assim diminui a absorção deste metal.⁴⁸

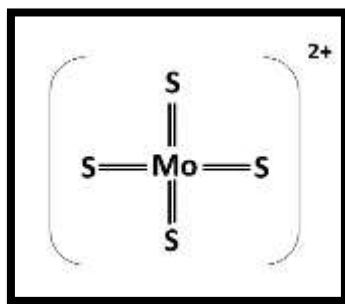


Figura III-4: Representação do anião $[MoS_4]^{2-}$. Adaptado de Kodama et al.⁴⁵

O TM demonstrou controlar os níveis de cobre livre mais eficazmente do que a trientina. Os efeitos adversos podem ser toxicidade da medula óssea, hepatotoxicidade e neurotoxicidade. Este composto também apresenta efeito anti-angiogénico, pelo que tem sido investigado para o tratamento do cancro.⁴⁹

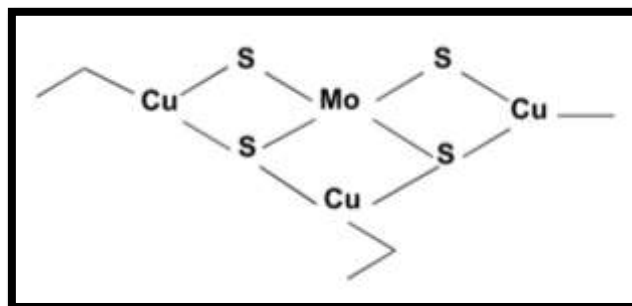


Figura III-5: Representação do complexo formado entre o TM e vários átomos de cobre. Adaptado de Kodama et al.⁴⁵

3.2. Doença de Alzheimer

A Doença de Alzheimer é a forma mais comum de demência (mais de 70% dos casos), e manifesta-se através da deterioração geral, progressiva e irreversível das funções cognitivas (memória, atenção, concentração, linguagem, pensamento, entre outras) devido à perda de neurónios no hipocampo e no córtex. A progressão da patologia conduz a

alterações no comportamento, na personalidade e na capacidade funcional da pessoa, comprometendo a realização das suas atividades quotidianas e limitando a sua independência.^{50,51}

No parênquima cerebral de doentes com DA encontram-se depósitos fibrilares amiloidais nas paredes vasculares, placas senis e emaranhados neurofibrilares (NFT). As placas senis apresentam um núcleo amiloide constituído, predominantemente, por proteína β -amiloide ($A\beta$), um péptido derivado da clivagem da proteína precursora amiloide (APP). Os NFT encontram-se no citoplasma dos neurónios e resultam da deposição de filamentos anormais de proteína tau hiperfosforilada.^{52,53} Consequentemente, a comunicação cerebral fica comprometida e as conexões entre os neurónios ficam danificadas, o que provoca a morte destas células, ativação da glia e inflamação.⁵⁴

Existem dois tipos de DA: a esporádica, que pode afetar adultos de qualquer idade, mas geralmente ocorre a partir dos 65 anos, e é a forma mais comum da patologia; a familiar, que é de origem genética, é muito rara e manifesta-se antes dos 65 anos.⁵⁵

A etiologia da DA ainda não é consensual na comunidade científica, permanecendo sob intenso debate e sendo alvo de diversos estudos.

Esta patologia é progressiva e os seus sintomas agravam com o avançar do tempo. Os principais sinais e sintomas da DA estão apresentados no **quadro III-2**.

Quadro III-2: Principais sinais e sintomas presentes na Doença de Alzheimer.⁵⁶

Sinais e sintomas da DA
Perda de memória – a perda de memória recente é um dos primeiros sintomas;
Distúrbios da linguagem – perda da fluência verbal e da nomeação;
Perda da função visual-espacial;
Perda da função cognitiva;
Depressão, psicose (alucinação, delírio), alteração da personalidade, mudanças comportamentais;
Apraxia – dificuldade na execução de gestos;
Perda da independência;
Morte.

3.2.1. Diagnóstico

O desafio no diagnóstico da DA é que seja diferencial, não se confundindo com outras etiologias de demência.

No início da doença são poucas as características visíveis através de ressonância magnética ou TAC. Com o progresso da patologia surge, geralmente, a atrofia cortical posterior e das estruturas responsáveis pela memória. Este método auxiliar de diagnóstico é particularmente útil no despiste de outros tipos de doença, como neoplasias, demência vascular, entre outros.⁵⁷

No líquido cefalorraquidiano, a concentração de A β ₄₂ é baixa enquanto os níveis de proteína tau hiperfosforilada são elevados. Contudo, estes valores podem também verificar-se na população mais envelhecida, pelo que não são muito úteis no diagnóstico.⁵⁷

Muitas vezes o diagnóstico é confirmado através de autópsia.⁵⁷

3.2.2. Tratamento

Atualmente, o tratamento convencional da DA não promove a cura da doença, mas sim o alívio sintomático. O objetivo terapêutico consiste em melhorar alguns aspetos cognitivos e reduzir sintomas neuropsiquiátricos e comportamentais, para aliviar o sofrimento dos doentes e dos seus cuidadores.⁵⁶

A terapêutica de primeira linha da doença nas fases leve a moderada envolve a utilização de inibidores da colinesterase, que aumentam a concentração de acetilcolina na fenda sináptica e promovem a evolução positiva das funções cognitivas, mitigando os sintomas neuropsiquiátricos. Os fármacos aprovados são o donepezilo (Aricept®), a rivastigmina (Exelon®) e a galantamina (Reminyl®).⁵⁷ Os principais efeitos adversos desta classe farmacológica são cefaleias, dores generalizadas, fadiga, náuseas, vômitos, anorexia, câibras, insónia, tonturas, depressão, sonhos anormais, aumento da secreção gástrica, convulsões.^{58,59}

A memantina, que é um antagonista não competitivo dos recetores N-metil-D-aspartato (NMDA), está aprovada no tratamento da patologia moderada a grave. Pode ser utilizada em monoterapia, ou em combinação com os fármacos inibidores da acetilcolinesterase supracitados. As reações adversas descritas, apesar de pouco comuns, são sonolência, tonturas, cefaleias e obstipação.^{58,59}

Tendo em conta os sintomas da doença, também se podem utilizar⁶⁰:

- ✓ Antidepressivos, como a sertralina;
- ✓ Anti-psicóticos, como a risperidona, o haloperidol, a olanzapina e a quetiapina;
- ✓ Anti-convulsionantes, como a carbamazepina;
- ✓ Benzodiazepinas, pontualmente.

3.2.3. Os metais na doença de Alzheimer

O cérebro é um órgão especializado que necessita dos metais para diversos processos celulares, por isso, apresenta concentrações relativamente elevadas de catiões de Fe, Zn e Cu. A homeostasia destas espécies é assegurada por um conjunto de proteínas, que regulam a sua absorção, transporte e efluxo.

A relação entre a homeostasia do cobre e a doença de Alzheimer ainda não está elucidada. Diversos autores referem que no cérebro de doentes com DA há aumento dos níveis extracelulares de cobre e diminuição dos níveis intracelulares, contudo a concentração total do metal no cérebro diminui.⁶¹ O cobre aparenta estar envolvido na agregação de A β nas placas senis. Ao ligar-se a A β o Cu(II) é reduzido a Cu(I) e há produção de ROS, provocando stress oxidativo que agrava a neurodegeneração e culmina em morte dos neurónios.⁶²

O desequilíbrio do conteúdo de cobre no sistema nervoso central demonstrou ser um fator relevante na agregação amiloide, na neurotoxicidade e na hiperfosforilação da proteína tau. Desta forma, os compostos com capacidade quelante são uma potencial solução terapêutica da neurotoxicidade causada pela rotura da homeostasia dos metais.⁶³

Por outro lado, adicionalmente, **Yu et al.**⁶⁴ demonstraram que o Cu(II) promove o efeito de A β na ativação da microglia e conseqüente neurotoxicidade. Neste processo há ativação do fator de transcrição NF- κ B e produção de mtROS (ROS mitocondrial). Com base nos estudos realizados, os autores sugerem que a agregação de A β induzida por iões metálicos é importante na neuroinflamação mediada pela microglia.⁶⁴ Para que a terapia doenças neurodegenerativas com compostos quelantes tenha sucesso, é necessário que estes apresentem características específicas. Por exemplo, devem ser de baixo peso molecular e eletricamente neutros, de forma a favorecer a passagem na barreira hematoencefálica (BHE). Devem ser seletivos para determinados iões metálicos, evitando a eliminação indiscriminada de metais. Depois de conseguir atingir o cérebro, a molécula deve ter capacidade de complexar os metais em excesso nos agregados de proteínas, de modo a

permitir a sua dissolução e eliminação. Por fim, a toxicidade deve ser mínima assim como os efeitos adversos.⁶²

O primeiro composto com capacidade quelante a ser experimentado na DA foi a desferroxamina B (**figura III-6**), que demonstrou reduzir as limitações cognitivas e comportamentais em doentes com DA. Contudo, este composto apresenta algumas desvantagens: (i) o seu caráter hidrofílico e iónico limita a sua passagem na BHE; (ii) a desferroxamina B é rapidamente degradada in vivo; (iii) a elevada afinidade do quelante para Fe(II) e para outros catiões divalentes provoca diversos efeitos adversos, incluindo anemia.⁶⁵ Estas limitações suscitam o interesse no desenvolvimento de agentes quelantes específicos e seletivos para aplicação na terapia da DA.

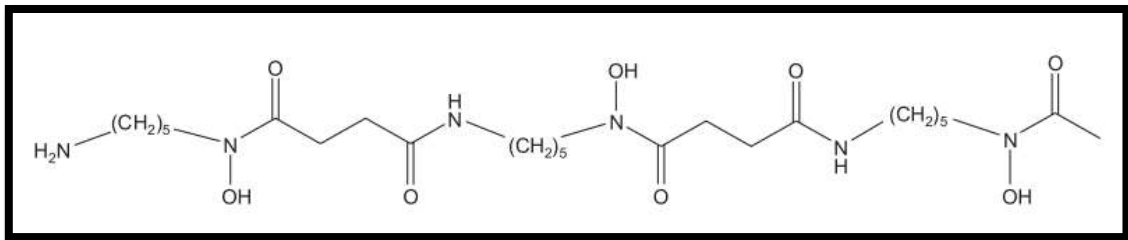


Figura III-6: Representação da estrutura da desferroxamina B. Fonte: McLachlan et al.⁶⁵

Lee et al.⁶⁶ testaram o composto quelante lipofílico DP-109 (**figura III-7**) em cérebros de ratos transgênicos com APP humana. Verificaram que a administração do composto durante três meses reduziu as placas amiloides, estimulando a conversão de A β da forma insolúvel para a forma solúvel.⁶⁶

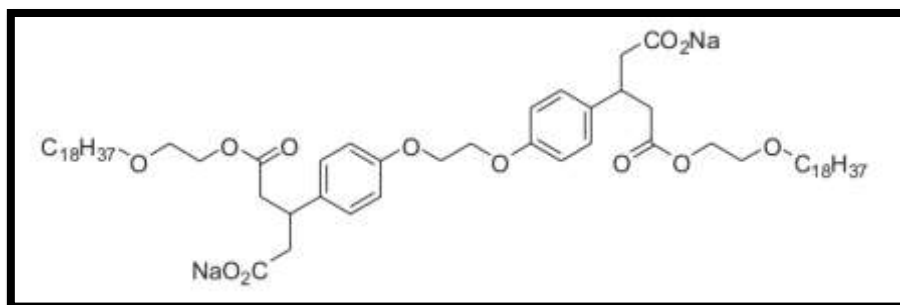


Figura III-7: Representação da estrutura do composto quelante DP-109. Adaptado de Budimir.⁶²

Dedeoglu et al.⁶⁷ desenharam e sintetizaram o composto XH1 que é capaz de ultrapassar a BHE, cuja estrutura está apresentada na **figura III-8**. Esta molécula é bifuncional, pois apresenta locais de ligação ao metal e à proteína amiloide. Estudos *in vitro* mostraram que o composto XH1 reduz a precipitação de A β induzida pelo Zn(II) e a expressão de APP em ratos transgênicos PS1/APP. O composto não revelou toxicidade significativa nas doses testadas.⁶⁷

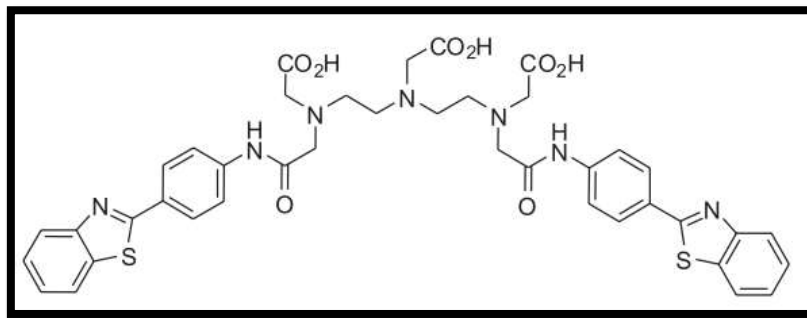


Figura III-8: Representação da estrutura do composto XH1. Adaptado de Budimir.⁶²

Cherny et al.⁶⁸ estudaram o efeito da 5-cloro-7-iodo-8-hidroxiquinolina, ou clioquinol (**figura III-9**), na deposição A β em ratos geneticamente modificados, verificando-se inibição da agregação A β induzida por metais. Entre os diversos compostos estudados com esta finalidade, o clioquinol protagonizou o primeiro ensaio clínico de fase II e demonstrou a capacidade de retardar a degradação cognitiva provocada pela patologia.⁶⁹ Contudo, a utilização deste ligando na DA foi suspensa e outros análogos têm sido desenvolvidos.⁷⁰

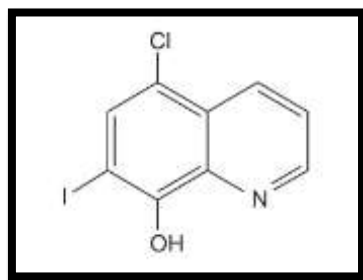


Figura III-9: Representação da estrutura do clioquinol. Fonte: Budimir.⁶²

Os trabalhos referidos servem como exemplo dos diversos estudos realizados nesta área, que permanece sob intensa investigação.

3.3. Cancro

Segundo a OMS, o cancro é resultante do “(...) *crescimento e proliferação descontrolada das células. Pode afetar qualquer parte do organismo. O crescimento muitas vezes invade as áreas vizinhas e pode metastizar para o resto do corpo*”.⁷¹

O cancro deriva de uma única célula e a transformação desta em cancerígena é um processo com diversas etapas que resulta da interação entre componentes genéticos e agentes externos. Os mecanismos moleculares do desenvolvimento de uma neoplasia estão esquematizados na **figura III-10**.⁷²

Tendo em conta a sua agressividade, as **neoplasias** podem classificar-se em:

- ✓ **Neoplasias benignas:** as suas características micro e macroscópicas são inofensivas, não têm capacidade de invadir outras partes do organismo e, geralmente, podem ser removidas por cirurgia local. Contudo, é necessário vigiar pois podem adquirir carácter maligno.

- ✓ **Neoplasias malignas:** a lesão pode invadir e danificar estruturas adjacentes, assim como disseminar-se no organismo, isto é, metastizar-se, e podem causar a morte.

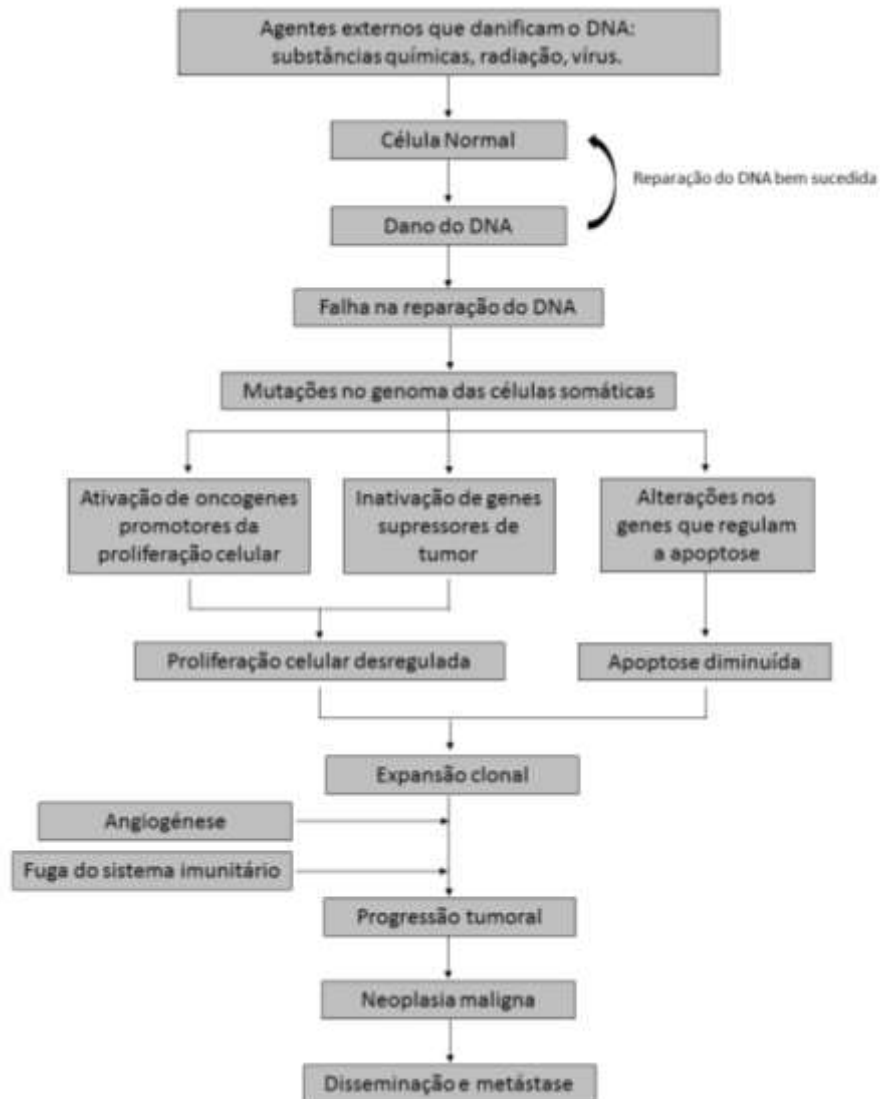


Figura III-10: Representação dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de uma neoplasia. Adaptado de Stricker et. al.⁷²

3.3.1. Tratamento

O alvo terapêutico da maioria dos agentes antineoplásicos são os ácidos nucleicos, levando à destruição das células e/ou inibindo a proliferação celular. De um modo geral, os fármacos utilizados no tratamento das neoplasias pertencem a três grandes classes: citotóxicos propriamente ditos, hormonas e anti-hormonas e imunomoduladores.⁵⁸

Inicialmente assumiu-se que a maior diferença no comportamento das células normais, relativamente ao das células neoplásicas, era a elevada taxa de divisão. Hoje em dia sabe-se que outras diferenças as distinguem, como por exemplo a resistência à apoptose e ao envelhecimento celular, entre outros aspetos igualmente relevantes. Este conhecimento revelou-se fundamental para a descoberta de fármacos mais seletivos e menos tóxicos. Diversos estudos têm refletido o papel da angiogénese no desenvolvimento tumoral, o que originou o aparecimento do fármaco bevacizumab, que consiste num anticorpo que atua através da inibição do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).⁷³ Por outro lado, os inibidores das cinases tirosínicas bloqueiam o local de ligação de adenosina trifosfato (ATP) nestas enzimas, inibindo a fosforilação e bloqueando a proliferação celular. A atividade de algumas cinases está aumentada, ou é específica, em determinados tipos de neoplasias, o que faz com que esta classe de fármacos seja relativamente seletiva. Um exemplo de fármaco seletivo que atua em cinases tirosínicas é o ImatinibTM.⁷⁴

De forma a otimizar a terapêutica anticancerígena, utilizam-se associações de citotóxicos em vários ciclos, com frequência variável. A posologia é dependente da área corporal, sendo necessário ajustar a dose administrada em casos de insuficiência hepática ou renal.⁵⁸

Na sua maioria, os fármacos disponíveis para a quimioterapia do cancro não são seletivos para as células neoplásicas, pelo que, frequentemente, afetam os tecidos normais, apresentando uma margem terapêutica (índice de segurança) estreita. Para além disso, originam efeitos adversos graves, que muitas vezes comprometem a adesão à terapêutica. Outra limitação é o desenvolvimento de resistência aos fármacos por parte das células

neoplásicas. Desta forma, é premente desenvolver novas estratégias terapêuticas, que sejam potentes mas mais seletivas para as células cancerígenas, e menos agressivas.⁵⁸

3.3.2. Influência do cobre na fisiopatologia do cancro

Como referido anteriormente, o cobre é um elemento essencial e apresenta um papel importante na bioquímica de todos os seres vivos. A sua absorção ocorre, principalmente, no intestino delgado e é transportado para o fígado pela à albumina sérica. No processo de entrada para a célula, o Cu(II) é reduzido a Cu(I) e o seu transporte é realizado através de transportadores de membrana, por exemplo o transportador humano de cobre (hCtr1).⁷⁵ O transporte intracelular é assegurado pela glutatona e por proteínas chaperone, de que são exemplos Atox1, Cox 17 e CCS. O complexo Cu(I)-Glutaciona funciona como veículo na destoxificação do metal por parte das metalotioneínas, enquanto que as proteínas chaperones transportam o metal para compartimentos celulares específicos.⁷⁶

É consensual que o excesso de cobre intracelular promove stress oxidativo e aumenta a produção de ROS na célula, por isso tem sido estudada a sua contribuição na etiologia e no crescimento de neoplasias. Para além disso, a sua distribuição aparenta estar alterada em tecidos tumorais. Vários estudos indicam que os níveis de cobre sérico e no tecido tumoral são significativamente mais elevados em doentes com cancro do que em pessoas saudáveis. A concentração de ceruloplasmina também se tem revelado mais elevada em determinados tipos de neoplasia, e tem sido reconhecida como um estimulante endógeno da angiogénese em células tumorais.⁷⁷

O papel do cobre na angiogénese tumoral

A angiogénese consiste na génese de novos vasos sanguíneos. Os fatores angiogénicos atuam inicialmente através da ativação dos fatores de crescimento e, posteriormente, estimulando a imigração de células endoteliais e inibindo a apoptose celular.

Os estimulantes endógenos da angiogénese são: (i) fatores de crescimento, como o fator endotelial de crescimento vascular (VEGF), angiogenina (ANG), fator de crescimento

fibroblástico (α -(b-FGF)), fator de necrose tumoral (TNF- α), fator de crescimento epidérmico (EGF); (ii) citocinas, como interleucinas (IL) 1, 6 e 8; (iii) elementos vestigiais, como o cobre. Os inibidores endógenos da angiogénese incluem citocinas, como IL 10 e 12, e moduladores, como angiotensina, endostatina e angiopoetina-2.⁷⁷

As células neoplásicas apresentam capacidade de produzir os seus próprios estimulantes da angiogénese ou, por outro lado, de estimular outras células para que o façam por si.

O cobre, como estimulante da angiogénese, desempenha um importante papel no desenvolvimento de neoplasias. Por outro lado, o zinco está associado à apoptose e, conseqüentemente, à redução das células tumorais.⁷⁸ Desta forma, há maior concentração de cobre e menor concentração de zinco nas células tumorais, comparativamente a células saudáveis.⁷⁹ Assim, o desenvolvimento de quelantes que seletivamente sequestram o cobre em células cancerígenas, sem interferir com os níveis de zinco, pode ser uma via para novas terapêuticas anticancerígenas.

Diversos estudos têm referido a influência do cobre na angiogénese:

- ✓ Estímulo da migração de células endoteliais;^{80,81}
- ✓ Indução da síntese de fibronectina, uma glicoproteína de matriz relacionada com a produção de novos vasos;⁸²
- ✓ Regulação do crescimento e da regressão de novos vasos sanguíneos;⁸³
- ✓ Diminuição da expressão de fatores de crescimento e de citocinas angiogénicas na ausência de cobre.^{84,85}

Em situação de hipoxia há ativação do fator HIF-1 e, conseqüentemente, há expressão do VEGF regulada por este fator de transcrição. Contudo, esse processo é inibido na ausência de cobre, o que sugere que este metal é necessário à ativação do fator de transcrição HIF-1.⁸⁶

A angiogenina (ANG) é uma proteína que participa na indução da angiogénese e a sua expressão está aumentada em células cancerígenas. Foi demonstrado que o cobre aumenta a expressão da ANG e influencia diferentes ações desta proteína.⁸⁷

Assim, parece ser consensual que a concentração de cobre está relacionada com o desenvolvimento, incidência, regressão e possibilidade de recidiva de diversos tumores. Em conformidade, a utilização de compostos quelantes na privação de cobre em ambiente tumoral é, atualmente, alvo de investigação científica, uma vez que pode ser promissor no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.^{88,89}

O papel do cobre no stress oxidativo e na produção de ROS

As células mantêm um equilíbrio entre as espécies oxidantes e antioxidantes, que são essenciais às inúmeras funções intra- e extracelulares. O stress oxidativo conduz à quebra do equilíbrio supracitado, prevalecendo o ambiente oxidativo.

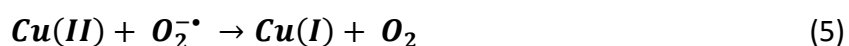
As células cancerígenas apresentam maior nível de stress oxidativo do que as células normais, uma vez que a sua rápida proliferação necessita de grandes quantidades de energia produzidas pela mitocôndria, o que conduz à elevada génese de ROS.

A maioria do cobre presente no organismo encontra-se na forma oxidada Cu(II), denominado ião cúprico, e na forma reduzida Cu(I), ião cuproso.

O cobre pode provocar stress oxidativo através de dois mecanismos: catálise da formação de ROS através da reação de Fenton e, por outro lado, diminuição da concentração de glutatona.^{90,91}

Uma das funções da glutatona é participar no metabolismo e destoxificação do cobre, ao complexar diretamente o metal, ou mantendo-o num estado de oxidação reduzido e, por isso, indisponível para participar em reações redox.

O ião cúprico, na presença de uma espécie redutora, como a glutatona ou o radical superóxido, é reduzido ao ião cuproso (**equação 5**). Por sua vez, o Cu(I) pode reagir com o peróxido de hidrogénio (H₂O₂) e formar radicais hidroxilo, ou seja, ocorre a reação de Fenton (**equação 6**).¹⁴



O radical hidroxilo é extremamente reativo e consegue interagir com a maioria das moléculas biológicas, incluindo o DNA. A sua interação com esta molécula pode conduzir a quebra da dupla cadeia e oxidação das bases azotadas.⁹² A membrana interna da mitocôndria e as membranas lipídicas também são alvos do stress oxidativo.

Dada a influência do cobre na produção de ROS e o papel destes na carcinogénese, os compostos com capacidade quelante têm sido investigados em dois sentidos: por um lado pela capacidade de formar complexos com o metal, diminuindo a sua disponibilidade para gerar stress oxidativo; por outro lado, na formação de complexos citotóxicos, que conduzam à apoptose celular.

A influência de ROS na carcinogénese e na apoptose celular têm sido alvo de diversos estudos, perspectivando também um critério de seletividade entre células neoplásicas e células saudáveis. Existem inúmeros trabalhos publicados recentemente sobre a ação de quelantes e correspondentes complexos de cobre, de entre os quais foram selecionados alguns, que serão seguidamente referidos de forma a ilustrar a importância destes compostos na patologia.

Vyas et al.⁹³ sintetizaram o composto TMCPMP-TS ((Z)-2-((1-(3-clorofenil)-3-metil-5-oxo-4,5-dihidro-1H-pirazol-4-yl)(p-tolyl)metileno) carbotioamido-hidrazina) e testaram a capacidade citotóxica do seu complexo com Cu(II) [Cu(TMCPMP-TS)(Phen)] (**figura III-11**) em células de carcinoma pulmonar humano (A549).⁹³

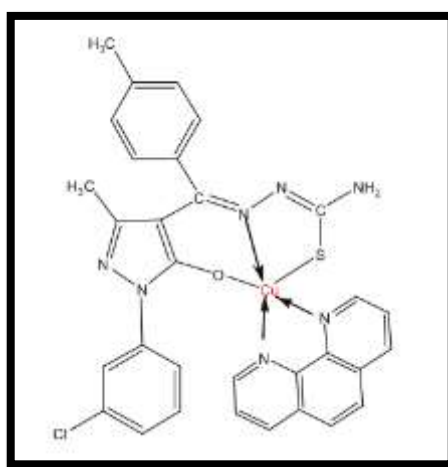


Figura III-11: Representação da estrutura do complexo Cu(TMCPMP-TS)(Phen). Adaptado de Vyas et al.⁹³

De forma a averiguarem se ocorria a ligação do complexo ao DNA, analisaram as alterações no espectro de absorção do complexo aquando da adição de quantidades de DNA. Verificaram-se alterações nas bandas de absorção do complexo e aumento da coloração devido às transições $\pi \rightarrow \pi^*$, o que sugere que o complexo apresenta tendência para se ligar ao DNA. Também se verificou que o complexo se liga à albumina sérica bovina (BSA), que é estruturalmente semelhante à albumina sérica humana (HSA).⁹³

A atividade anticancerígena foi determinada *in vitro* através do teste MTT e do LDH, que avalia a presença de células lesadas. O complexo mostrou atividade antiproliferativa dependente da dose quando testado na linha celular A549, e as lesões celulares foram demonstradas através da quantificação de LDH no meio de cultura. O ciclo celular foi mantido na fase G_0/G_1 . A sua atividade citotóxica poderá dever-se a alterações conformacionais ou clivagem do DNA induzidas pelo complexo e/ou à ligação deste a proteínas necessárias ao desenvolvimento tumoral, comprometendo a sua função.⁹³

Os estudos demonstraram também que os complexos de cobre (II) referidos exibem menor toxicidade e maior potência que a cisplatina e seus análogos de 2ª e 3ª geração, revelando-se assim como potenciais compostos líder para o desenvolvimento de agentes antineoplásicos otimizados.⁹³

Anjomshoa et al.⁹⁴ sintetizaram e caracterizaram o complexo $[\text{Cu}(\text{dppt})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{PF}_6)_2$ representado na **figura III-12**. A complexação do ligando dppt com zinco⁹⁵ e com níquel⁹⁶ havia sido previamente estudada.

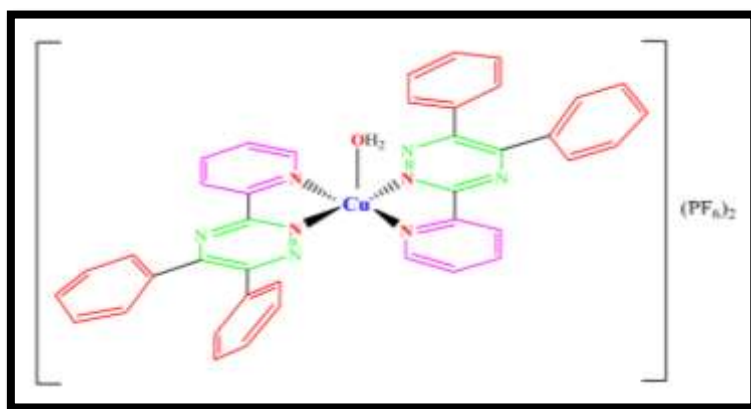


Figura III-12: Representação da estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{dppt})_2(\text{H}_2\text{O})](\text{PF}_6)_2$. Fonte: Anjomshoa et al.⁹⁴

A ligação do complexo ao FS-DNA foi analisada através de variações na absorção, na gama espectral de UV-visível, desnaturação térmica e eletroforese. Depois de adicionar quantidades crescentes do complexo à solução de DNA a sua banda no espectro aumentou de intensidade, embora sem deslocamento. Foi proposto que a interação do complexo com o DNA provoca a alteração da conformação deste e expõe as suas bases azotadas, o que resulta num aumento da intensidade de absorção.⁹⁴

Analisou-se a ligação competitiva do complexo com brometo de etídio (EB) através de espectroscopia de fluorescência e verificou-se que a intensidade de emissão do sistema DNA-EB diminuiu significativamente com a adição do complexo de cobre. Isto significa que o complexo compete com o EB na ligação ao DNA e consegue retirá-lo do sistema, intercalando-se no DNA.⁹⁴

A interação entre o complexo e a BSA foi estudada através de diversos métodos. Calcularam-se as constantes de associação em diversas condições e os resultados deram indicação clara de que o complexo apresenta afinidade significativa para a BSA.⁹⁴

De forma a caracterizar a atividade citotóxica do complexo foram utilizadas várias linhagens de células de carcinoma humano (MCF-7, A-549e HT-29). As células foram tratadas com diversas concentrações de complexo e a sua viabilidade foi determinada através do teste MTT. Observou-se microscopicamente a diminuição do número de células neoplásicas, o que sugere que o composto apresenta capacidade de induzir a apoptose celular. O seu efeito mostrou-se dependente da dose, e mais eficaz nas células HT-29 (IC₅₀: 4,5 µM) do que em MCF-7 (IC₅₀: 9,8 µM) e em A-549 (IC₅₀: 7,8 µM). Os valores IC₅₀ obtidos são, contudo, bastante próximos, situam-se na gama micromolar baixa e são inferiores aos exibidos pela cisplatina (usada como controlo), nas mesmas linhagens celulares e em condições experimentais idênticas. Claramente, as linhagens celulares referidas mostraram maior susceptibilidade ao complexo de cobre que à cisplatina.⁹⁴

Recentemente foi sintetizado e caracterizado, por **Vo et al.**⁹⁷ um composto que se revelou promissor na terapia anticancerígena: o elesclomol. **Hasinoff et al.**^{98,99} investigaram os possíveis mecanismos subjacentes ao efeito citotóxico, comparando o ligando e o seu

complexo de cobre. Na sequência destes estudos o elesclomol foi proposto para desenvolvimento, como um novo fármaco antineoplásico, protagonizando atualmente diversos ensaios clínicos em variados tipos de neoplasia maligna.¹⁰⁰

A reação entre o ligando elesclomol e o Cu(II) (**figura III-13**) apresenta estequiometria 1:1 e a constante de estabilidade é bastante elevada ($\beta=10^{24.2}M^{-1}$), o que indica que a interação entre as duas espécies é muito forte.¹⁰¹

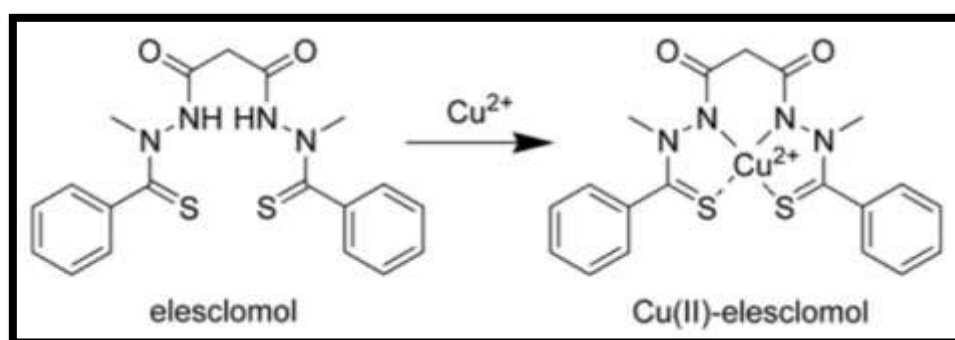


Figura III-13: Representação do ligando elesclomol e do complexo que este forma com o cobre [Cu(II)-elesclomol]. Fonte: Hasinoff et al.⁹⁸

Relativamente ao modo de ação, sabe-se que o elesclomol complexa o cobre (II) sérico, formando um complexo com capacidade de atravessar a membrana celular. Depois de entrar na célula, a evidência experimental indica que o complexo é transportado para o interior da mitocôndria, onde o elesclomol se separa do metal, levando à acumulação deste no interior do organelo. Este passo é importante, pois o ligando fica disponível para voltar a importar metal para o interior da mitocôndria. Posteriormente ocorre a redução do Cu(II) a Cu(I), gerando stress oxidativo que provoca a morte da célula.¹⁰² De forma a comprovar a contribuição do cobre no mecanismo de ação do elesclomol, verificou-se que compostos quelantes com grande afinidade para o cobre diminuem a atividade citotóxica deste composto.⁹⁸

No decorrer de estudos para avaliar o efeito antiproliferativo do elesclomol e do seu complexo de cobre, mediante análise do crescimento celular na presença destas espécies,

verificou-se que tanto o ligando como o seu complexo com Cu(II) inibem o crescimento celular. Os compostos também mostraram capacidade de influência no ciclo celular, aumentando o número de células em fase sub-G₀/G₁ e inibindo o progresso do seu ciclo celular, o que é indicativo de ativação dos mecanismos conducentes a apoptose.⁹⁹

O complexo revelou inibir a atividade da topoisomerase I a concentrações mais elevadas, não se tendo observado este efeito quando foi testado o ligando livre. Nenhum dos compostos apresentou efeito na topoisomerase II α . Estes resultados parecem indicar que nenhuma destas proteínas é o alvo principal do ligando, ou do correspondente complexo de cobre.⁹⁹

Em suma, ambos os compostos inibiram imediatamente o crescimento celular, bloqueando o ciclo em G₁, o que conduziu a apoptose. Foi demonstrado que os compostos provocam quebra da cadeia dupla de DNA e o seu mecanismo de ação inclui o influxo de complexo para o interior da mitocôndria.⁹⁹

Em trabalhos levados a cabo por **Ismael et al.**,¹⁰³ no grupo de investigação em Reatividade Orgânica e Química Medicinal do Centro de Ciências do Mar do Algarve, onde também foi efetuada a investigação que conduziu ao presente relatório, foram sintetizados dois compostos, o tetrazol 5-aminosacarinato (TS) e o 2-metiltetrazol-5-aminosacarinato (2MTS) e avaliada a sua capacidade quelante em presença de catiões divalentes de cobre.

A análise por difracção de raios X aos cristais de 2MTS-CuII obtidos revelou a estrutura do complexo, que inclui duas moléculas de ligando bidentado e uma molécula de água ligadas ao catião metálico e ainda uma molécula de água não coordenada, que desempenha um importante papel no arranjo supramolecular do cristal, organizado com base numa rede de pontes de hidrogénio. No caso do TS verificou-se, através de titulação usando métodos espectrofotométricos, na zona espectral do UV-visível, que a estequiometria da reação é de 1:1.¹⁰³ As estruturas dos complexos formados entre os dois compostos e o Cu(II) estão representadas na **figura III-14**.

A capacidade quelante dos compostos TS e 2MTS foi testada em soluções de Cu²⁺, Fe²⁺ e Ca²⁺, a diversas concentrações, e comparada com a capacidade quelante exibida pelo EDTA

(no caso do Ca^{2+} a comparação foi efectuada com o EGTA). A atividade quelante foi determinada através da **equação 7**.¹⁰³

$$\text{Capacidade quelante (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorvância da amostra a } \lambda \text{ (nm)}}{\text{Absorvância do controlo a } \lambda \text{ (nm)}}\right) \times 100 \quad (7)$$

Os compostos demonstraram grande afinidade para o Cu(II) e a sua interação com os restantes catiões não foi significativa. Relativamente à complexação com cobre, o TS apresentou aproximadamente 92% de atividade quelante e o 2MTS revelou cerca de 74%, para a concentração de 5mM. Estes valores são elevados, quando comparados com os obtidos com o EDTA (88% a 3.4 mM).¹⁰³

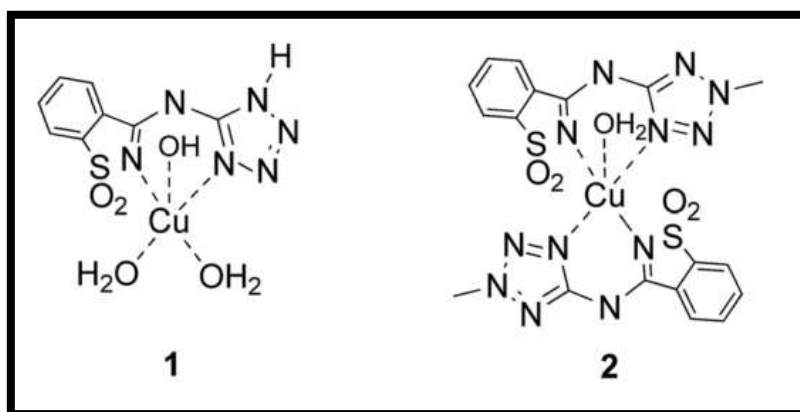


Figura III-14: Representação da estrutura dos complexos formados na reação do TS (1) e o 2MTS (2) com Cu(II). Fonte: *Ismael et al.*¹⁰³

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados em linhagens de células de carcinoma hepatocelular (HepG2) e foi utilizado o kit de proliferação celular MTT. Os ligandos livres TS e 2MTS não revelaram qualquer atividade citotóxica enquanto que os correspondentes complexos de cobre exibiram elevada capacidade citotóxica.¹⁰³

A elevada citotoxicidade dos complexos em células hepáticas neoplásicas humanas, mesmo com concentrações reduzidas, e a elevada seletividade dos ligandos para o Cu(II),

sugerem perspectivas promissoras na terapêutica de neoplasias, principalmente por estas apresentarem uma elevada concentração de Cu(II).¹⁰³ Prosseguem os estudos com este quimiotipo de agentes quelantes para explorar a possibilidade de desenvolvimento de novas ferramentas para o combate a neoplasias malignas.

Vutey et al.¹⁰⁴ demonstraram que o ligando HPyCT4BrPh e o seu complexo de Cu(II) [Cu(PyCT4BrPh)Cl] exibem citotoxicidade em diversas linhagens de células neoplásicas. As estruturas do ligando e do correspondente complexo de cobre encontram-se apresentadas na **figura III-15**.

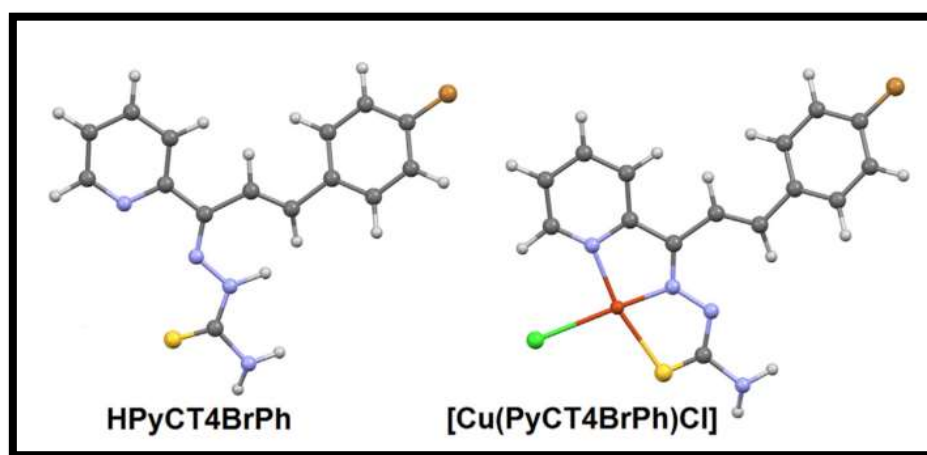


Figura III-15: Representação do ligando e do seu complexo com Cu(II). C: cinzento escuro; H: cinzento claro; N: azul; Cl: verde; Cu: cor-de-laranja; S: amarelo; Br: castanho. Fonte: Vutey et al.¹⁰⁴

Verificou-se que o complexo é mais eficaz do que o ligando isolado, exibindo potente capacidade inibidora da topoisomerase I e impedindo o passo de clivagem do ciclo catalítico da enzima. Assim, considera-se que a complexação com o cobre é essencial para que o composto adquira uma estrutura favorável à sua interação com o sitio ativo da enzima, apresentando potencial utilização na terapia antineoplásica.¹⁰⁴

Outros trabalhos têm demonstrado que complexos de Cu(II) podem interferir no ciclo celular das células neoplásicas e conduzir a apoptose.¹⁰⁵

Como se pode concluir, os complexos de cobre (II) têm sido extensamente investigados por apresentarem boa capacidade citotóxica e maior seletividade para as células neoplásicas. Os compostos de Cu(II) supracitados servem como exemplos, pois a publicação de novos trabalhos é constante e os resultados são promissores.^{106–110}

3.4. Outras patologias

Para além das aplicações na doença de Wilson, na doença de Alzheimer e no cancro, os complexos de cobre têm-se mostrado úteis noutras patologias, nomeadamente: doenças cardiovasculares, diabetes, talassemia, entre outras.

Os compostos com capacidade quelante demonstraram ser eficazes na diminuição da sobrecarga de ferro em doentes com talassemia.¹¹¹ **Lal et al.**¹¹² avaliaram o efeito da combinação de desferraxirox e desferroxamina, dois compostos quelantes conhecidos, e observaram que houve uma rápida redução do ferro a nível sistémico e no miocárdio, assim como o controlo das espécies tóxicas de ferro plasmático, sem aumentar a toxicidade.¹¹²

Os benefícios dos compostos quelantes na doença cardiovascular (CVD) ainda são controversos. Em 2013, **Lamas et al.**¹¹³ realizaram o primeiro grande ensaio (TACT) para determinar se a terapia com compostos quelantes, isoladamente ou em conjunto com elevadas doses de vitaminas e minerais, é benéfica em doentes que sofreram de enfarte do miocárdio. Os autores do trabalho concluíram que, em doentes estáveis com história de enfarte do miocárdio, a utilização de um regime de EDTA intravenoso reduziu a ocorrência de complicações vasculares, em comparação com o placebo. Estes resultados são impulsionadores para novos estudos e revelam um potencial alvo terapêutico nesta patologia, contudo não são conclusivos por si só.¹¹³

Na diabetes mellitus (DM), a influência dos metais e dos compostos com capacidade quelante está pouco explorada. Aparentemente, a alteração da homeostasia do cobre e do

ferro é uma característica da DM, demonstrada pela acumulação destes metais no coração, rins e outros tecidos.¹¹⁴ Há assim muito trabalho a desenvolver nesta área.

Os produtos finais de glicosilação avançada (AGEs) são um grupo de compostos produzidos a partir da glicosilação não enzimática, ou glicoxidação, de proteínas, lípidos e ácidos nucleicos. A formação destes compostos tem sido associada ao desenvolvimento de complicações em doentes com diabetes e depende da contribuição de diversos metais.^{115,116,117} Por outro lado, alguns dos medicamentos utilizados na redução das complicações da diabetes têm demonstrado inibir a reação de Maillard e a formação de AGEs, através da complexação e eliminação de metais, o que sugere a contribuição dos metais e do stress oxidativo nas complicações. Contudo, a utilização dos compostos com capacidade quelante nesta patologia é imatura e tem de ser mais investigada, de forma a esclarecer dúvidas e mecanismos.¹¹⁸

Nestas áreas, a investigação ainda é prematura e poucos são os estudos realizados. Contudo, os resultados já obtidos indicam claramente que existem perspectivas futuras de desenvolvimento na utilização dos complexos de cobre em diversas patologias.

IV. Conclusão

Os metais desempenham um papel essencial ao normal funcionamento do organismo e a rotura da sua homeostasia está intimamente ligada a vários processos patológicos.

Atualmente, a investigação sobre o cobre e a sua influência em diversas patologias é alvo de grande interesse e tem sido objeto de estudos detalhados. Neste trabalho foram recolhidas diversas perspetivas acerca da influência dos metais em patologias como o cancro, a doença de Alzheimer, a doença de Wilson e noutras patologias, ainda que pouco exploradas neste âmbito, como diabetes, doenças cardiovasculares e talassemia. A perspectiva é investigar a viabilidade da utilização de compostos com capacidade quelante no tratamento das doenças referidas.

Diversos trabalhos de investigação mostraram que o cobre se comporta como fator pro-angiogénico, favorecendo a criação de novos vasos sanguíneos que sustentam o crescimento de células tumorais. Por outro lado, foi demonstrado que a redução de Cu(II) a Cu(I) promove o stress oxidativo, resultando este na produção de ROS que interagem com as proteínas celulares. Assim, a utilização de compostos com capacidade quelante no controlo de neoplasias pode cumprir 2 objectivos que concorrem sinergicamente para a eliminação do tumor: (i) reduzir o cobre disponível, necessário para estimular a angiogénese, inibindo assim o crescimento tumoral; (ii) aumentar o nível de stress oxidativo e a produção de ROS de forma a induzir os processos conducentes a apoptose, através da formação de complexos citotóxicos. As células neoplásicas apresentam maior concentração de Cu(II) do que as células normais, o que permite a produção de compostos seletivos para esta espécie e, consequentemente, menos tóxicos para tecidos normais. Assim, o grande objetivo dos estudos mais recentes é o desenvolvimento de ligandos que não são tóxicos *de per se*, mas que após complexarem o Cu(II) intracelular formam um complexo citotóxico.

Na doença de Alzheimer, o cobre, o zinco e o ferro apresentam funções relevantes. Muitos autores acreditam que a degradação neurológica se deve à deposição de agregados de proteína β -amiloide e foi demonstrado que o Cu(II) contribui para esse processo. Quando

o cobre se liga a esta proteína é reduzido a Cu(I), conduzindo à produção de ROS. Por outro lado, acredita-se que o cobre promove a ativação da microglia, gerando um processo inflamatório que leva a neurotoxicidade e morte neuronal.

Foram referidas neste trabalho outras patologias, como as doenças cardiovasculares, talassemia e diabetes mellitus, que representam potenciais aplicações dos compostos quelantes, pois têm sido investigadas no sentido de compreender a influência dos metais na sua fisiopatologia.

Atendendo ao caso específico do cancro, uma vez que as células neoplásicas apresentam características muito próprias, há possibilidade de desenvolver alternativas terapêuticas personalizadas, de forma a reduzir os efeitos tóxicos dos compostos em células normais e a aumentar a sua eficácia citotóxica em células neoplásicas. As terapias convencionais apresentam limitações à sua utilização, como a diversidade e severidade dos efeitos adversos e o desenvolvimento de resistências, sendo premente descobrir novas estratégias terapêuticas.

Dada a importância dos diversos metais, especialmente do cobre, nos processos fisiopatológicos supracitados, pode concluir-se que os compostos com capacidade quelante são prometedores, na perspectiva do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. A meu ver, é muito importante que se desenvolvam terapêuticas alternativas às já comercializadas, com melhores propriedades.

V. Referências Bibliográficas

1. Flora, S. J. S. & Pachauri, V. Chelation in metal intoxication. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 2745–2788 (2010).
2. Andersen, O. Chemical and biological considerations in the treatment of metal intoxications by chelating agents. *Mini-Reviews Med. Chem.* 4, 11–21 (2004).
3. Sigma-Aldrich. Sigma-Aldrich. (2013). Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/portugal.html>. (Acedido: 9 de setembro de 2016)
4. Ercal, N., Gurrer-Orhan, H. & Aykin-Burns, N. Toxic metals and oxidative stress part I: Mechanisms involved in metal induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 529–539 (2001).
5. Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K. & Sutton, D. J. Heavy metals toxicity and the environment. *EXS* 101, 133–164 (2012).
6. Tutic, A., Novakovic, S., Lutovac, M., Biocanin, R., Ketin, S. & Omerovic, N. The heavy metals in agrosystems and impact on health and quality of life. *Maced. J. Med. Sci.* 3, 345–355 (2015).
7. Jomova, K. & Valko, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology* 283, 65–87 (2011).
8. Menon, A. V., Chang, J. & Kim, J. Mechanisms of divalent metal toxicity in affective disorders. *Toxicology* 339, 58–72 (2016).
9. Jan, A. T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I. & Mohd, Q. Heavy metals and human health: Mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 29592–29630 (2015).
10. Patrick, L. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern. Med. Rev.* 11, 2–22 (2006).

11. Simões, M. R., Preti, S. C., Azevedo, B. F., Fiorim, J., Freire, D. D., Covre, E. P., Vassallo, D. V. & Santos, L. Low-level chronic lead exposure impairs neural control of blood pressure and heart rate in rats. *Cardiovasc. Toxicol.* (2016).
12. Flora, S. J. S., Mittal, M. & Mehta, A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J. Med. Res.* 128, 501–523 (2008).
13. Zhang, S., Yang, H. & Singh, L. Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Mol. Cell. Biochem.* 222, 3–9 (2001).
14. Barbusinsky, K. Fenton Reaction - Controversy concerning the chemistry. *Ecol. Chem. Eng.* 16, 347–358 (2009).
15. Jones, C. & Thornback, J. em *Medicinal applications of coordination chemistry*. 201–323 (The Royal Society of Chemistry, 2007).
16. Peters, R. *Development and theoretical significance of british anti-lewisite (BAL)*. (1948).
17. Ord, M. G. & Stocken, L. A. A contribution to chemical defence in World War II. *Trends Biochem. Sci.* 25, 253–256 (2000).
18. Frieden, T. Centers for Disease Control and Prevention. *Facts About Lewisite* (2013). Disponível em: <http://emergency.cdc.gov/agent/lewisite/basics/facts.asp>. (Acedido: 23 de julho de 2016)
19. Vilensky, J. A. & Redman, K. British anti-Lewisite (dimercaprol): An amazing history. *Ann. Emerg. Med.* 41, 378–383 (2003).
20. Klaassen, C. em *As bases farmacológicas da terapêutica* 1389–1407 (McGraw-Hill, 2005).
21. Sears, M. E. Chelation: Harnessing and enhancing heavy metal detoxification - A review. *Sci. World J.* (2013).
22. Flora, S. J. S. & Pachauri, V. Chelation in metal intoxication. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 7, 2745–2788 (2010).

23. Aposhian, H. V. DMSA and DMPS-water soluble antidotes for heavy metal poisoning. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 193–215 (1983).
24. Trowbridge, J. P. Chelation therapy: Stepping into the next 60 years - A Historical Commentary. *Townsend Lett.* 1–12 (2013).
25. Walshe, J. M. Penicillamine: The treatment of first choice for patients with Wilson ' s disease. *Mov. Disord.* 14, 545–550 (1999).
26. Brewer, G. J. Penicillamine should not be used as initial therapy in Wilson's disease. *Mov. Disord.* 14, 551–554 (1999).
27. Atkins, P., Overton, T., Rourke, J., Weller, M., Armstrong, F. & Hagerman, M. em *Inorganic Chemistry* 199–220 (Oxford University Press, 2010).
28. Housecroft, C. E. & Sharpe, A. G. em *Inorganic Chemistry* 162–191 (Pearson Education Limited, 2005).
29. Srivastava, S. & Goyal, P. em *Novel biomaterials - Decontamination of toxic metals from wastewater* 11–20 (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010).
30. Simões, T., Queirós, M. & Simões, M. em *Química em Contexto* (ed. Porto Editora) 117–128 (2005).
31. Dabrowiak, J. C. em *Metals in medicine* 1–48 (2009).
32. Lancashire, R. The Department of Chemistry, University of the West Indies. (2015). Disponível em: <http://wwwchem.uwimona.edu.jm/courses/chelate.html>. (Acedido: 17 de julho de 2016)
33. Clark, J. Chemguide. (2009). Disponível em: <http://www.chemguide.co.uk/inorganic/complexions/stabconst.html>. (Acedido: 17 de julho de 2016)
34. Dias, A. em *Ligação Química* 413–431 (IST PRESS, 2006).
35. Andersen, O. & Aaseth, J. Molecular mechanisms of in vivo metal chelation:

- Implications for clinical treatment of metal intoxications. *Environ. Health Perspect.* 110, (2002).
36. Graper, M. Wilson Disease Association. (2016). Disponível em: <http://wilsonsdisease.ca/>. (Acedido: 14 de agosto de 2016)
 37. Czlonkowska, A., Stremmel, W., Houwen, R., Rosenberg, W. & Schilsky, M. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J. Hepatol.* 56, 671–685 (2012).
 38. Ala, A., Walker, A. P., Ashkan, K., Dooley, J. S. & Schilsky, M. L. Wilson's disease. *Lancet* 369, 397–408 (2007).
 39. Schrang, A. & Schott, J. Kayser–Fleischer rings in Wilson's disease. *N. Engl. J. Med.* 366, (2012).
 40. Roberts, E. A. & Schilsky, M. L. Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology* 47, 2089–2111 (2008).
 41. Wu, F., Wang, J., Pu, C., Qiao, L. & Jiang, C. Wilson's disease: A comprehensive review of the molecular mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 6419–6431 (2015).
 42. Rodriguez-Castro, K. I., Hevia-Urrutia, F. J. & Sturniolo, G. C. Wilson's disease: A review of what we have learned. *World J. Hepatol.* 7, 2859–2870 (2015).
 43. Das, S. K. & Ray, K. Wilson's disease: an update. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* 2, 482–493 (2006).
 44. Patil, M., Sheth, K. A., Krishnamurthy, A. C. & Devarbhavi, H. A review and current perspective on wilson disease. *J. Clin. Exp. Hepatol.* 3, 321–336 (2013).
 45. Kodama, H., Fujisawa, C. & Bhadhprasit, W. Inherited copper transport disorders: biochemical mechanisms, diagnosis, and treatment. *Curr. Drug Metab.* 13, 237–50 (2012).
 46. Bandmann, O., Weiss, K. H. & Kaler, S. G. Wilson's disease and other neurological copper disorders. *Lancet Neurol.* 14, 103–113 (2016).

47. Ma, J. & Betts, N. M. Zinc and copper intakes and their major food sources for older adults in the 1994-96 Continuing survey of food intakes by individuals (CSFII). *J. Nutr.* 130, 2838–2843 (2000).
48. Brewer, G. J. em *Medicinal Inorganic Chemistry* 252–262 (American Chemical Society, 2005).
49. Brewer, G. J. Raulin Award Lecture : Wilson’s disease therapy with zinc and tetrathiomolybdate. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 13, 51–61 (2000).
50. A Doença de Alzheimer | Associação Alzheimer Portugal. (2016). Disponível em: <http://alzheimerportugal.org/pt/text-0-9-30-14-a-doenca-de-alzheimer>. (Acedido: 4 de setembro de 2016)
51. Sarkar, A., Irwin, M., Singh, A., Riccetti, M. & Singh, A. Alzheimer’s disease: the silver tsunami of the 21 st century. *Neural Regen. Res.* 11, 693–697 (2016).
52. Selkoe, D. J. Alzheimer’s disease: Genes , proteins , and therapy. *Physiological Rev.* 81, 741–766 (2001).
53. Sereniki, A; Vital, M. A. B. F. A doença de Alzheimer: aspectos fisiopatológicos e farmacológicos. *Rev. Psiquiatr.* 30, (2008).
54. Frosch, M., Anthony, D. & Girolami, U. em *Pathologic Basis of Disease* 1279–1344 (Saunders Elsevier, 2010).
55. Alzheimer’s Australia | Alzheimer’s disease. (2016). Disponível em: <https://www.fightdementia.org.au/about-dementia/types-of-dementia/alzheimers-disease>. (Acedido: 4 de setembro de 2016)
56. Alves, L., Correia, A. S. A., Miguel, R., Alegria, P. & Bugalho, P. Alzheimer’s disease: A clinical practice-oriented review. *Front. Neurol.* 3, 1–20 (2012).
57. Seeley, W. W. & Miller, B. L. em *Harrison’s - Principles of internal medicine* (eds. Longo, D. et al.) 3300–3316 (The McGraw-Hill Companies, 2012).

58. Caramona, M., Esteves, A. P., Gonçalves, J., Macedo, T., Mendonça, J., Osswald, W., Pinheiro, R. L., Rodrigues, A., Sepodes, B. & Teixeira, A. A. *Prontuário Terapêutico 11*. (Infarmed, 2012).
59. Mendiola-Precoma, J., Berumen, L. C., Padilla, K. & Garcia-Alcocer, G. Therapies for prevention and treatment of Alzheimer's disease. *Biomed Res. Int.* 2016, 1–17 (2016).
60. Gauthier, S. *et al.* Management of behavioral problems in Alzheimer's disease. *Int. Psychogeriatrics* 22, 346–72 (2010).
61. Maynard, C. J., Bush, A. I., Masters, C. L., Cappai, R. & Li, Q.-X. Metals and amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 86, 147–159 (2005).
62. Budimir, A. Metal ions, Alzheimer's disease and chelation therapy. *Acta Pharm.* 61, 1–14 (2011).
63. Gamez, P. & Caballero, A. B. Copper in Alzheimer's disease: Implications in amyloid aggregation and neurotoxicity. *AIP Adv.* 5, (2015).
64. Yu, F. *et al.* Cu(II) enhances the effect of Alzheimer's amyloid- β peptide on microglial activation. *J. Neuroinflammation* 12, 122–133 (2015).
65. McLachlan, D. R. C., Kruck, T. P. A., Kalow, W., Andrews, D. F., Dalton, A. J., Bell, M. Y. & Smith, W. L. Intramuscular desferrioxamine in patients with Alzheimer's disease. *Lancet* 337, 1304–1308 (1991).
66. Lee, J. Y., Friedman, J. E., Angel, I., Kozak, A. & Koh, J. Y. The lipophilic metal chelator DP-109 reduces amyloid pathology in brains of human beta-amyloid precursor protein transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 25, 1315–1321 (2004).
67. Dedeoglu, A., Cormier, K., Payton, S., Tseitlin, K. A., Kremsky, J. N., Lai, L., Li, X., Moir, R. D., Tanzi, R. E., Bush, A. I., Kowall, N. W., Rogers, J. T. & Huang, X. Preliminary studies of a novel bifunctional metal chelator targeting Alzheimer's amyloidogenesis. *Exp. Gerontol.* 39, 1641–1649 (2004).

68. Cherny, R. A., Atwood, C. S., Xilinas, M. E., Gray, D. N., Jones, W. D., McLean, C. A., Barnham, K. J., Volitakis, I., Fraser, F. W., Kim, Y. S., Huang, X., Goldstein, L. E., Moir, R. D., Lim, J. T., Beyreuther, K., Zheng, H., Tanzi, R. E., Masters, C. L. & Bush, A. I. Treatment with a copper-zinc chelator markedly and rapidly inhibits B-amyloid accumulation in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neuron* 30, 665–676 (2001).
69. Ritchie, C. W., Bush, A. I., Mackinnon, A., Macfarlane, S., Mastwyk, M., MacGregor, L., Kiers, L., Cherny, R., Li, Q. X., Tammer, A., Carrington, D., Mavros, C., Volitakis, I., Xilinas, M., Ames, D., Davis, S., Beyreuther, K., Tanzi, R. E. & Masters, C. L. Metal-protein attenuation with iodochlorhydroxyquin (Clioquinol) targeting A-beta amyloid deposition and toxicity in Alzheimer Disease - A pilot phase 2 clinical trial. *Arch Neurol* 60, 1685–1691 (2003).
70. Fu, C.-L., Hsu, L.-S., Liao, Y.-F. & Hu, M.-K. New hydroxyquinoline-based derivatives as potent modulators of amyloid- β aggregations. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. 349, 327–341 (2016).
71. WHO. WHO | Cancer. (2015).
72. Stricker, T. & Kumar, V. em *Robbins & Cotran - Bases Patológicas das Doenças* 259–330 (Elsevier Editora, 2010).
73. Haleel, A., Mahendiran, D., Veena, V., Sakthivel, N. & Rahiman, A. K. Antioxidant, DNA interaction, VEGFR2 kinase, topoisomerase I and in vitro cytotoxic activities of heteroleptic copper(II) complexes of tetrazolo[1,5-a]pyrimidines and diimines. *Mater. Sci. Eng. C* 68, 366–382 (2016).
74. Puvanenthiran, S., Essapen, S., Seddon, A. & Modjtahedi, H. Impact of the putative cancer stem cell markers and growth factor receptor expression on the sensitivity of ovarian cancer cells to treatment with various forms of small molecule tyrosine kinase inhibitors and cytotoxic drugs. *Int. J. Oncol.* 1–14 (2016).
75. Maryon, E. B., Molloy, S. A., Ivy, K., Yu, H. & Kaplan, J. H. Rate and regulation of copper

- transport by human copper transporter 1 (hCTR1). *J. Biol. Chem.* 288, 18035–18046 (2013).
76. Valko, M., Morris, H. & Cronin, M. Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr. Med. Chem.* 12, 1161–1208 (2005).
 77. Brewer, G. J. Anticopper therapy against cancer and diseases of inflammation and fibrosis. *Drug Discov. Today* 10, 1103–1109 (2005).
 78. Powell, S. R. Zinc and health : Current status and future directions the antioxidant properties of zinc. *J. Nutr.* 130, 1447S–1454S (2000).
 79. Kuo, H. W., Chen, S. F., Wu, C. C., Chen, D. R. & Lee, J. H. Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biol. Trace Elem. Res.* 89, 1–11 (2002).
 80. Hu, G. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *J. Cell. Biochem.* 69, 326–335 (1998).
 81. Lowndes, S. A. & Harris, A. L. The role of copper in tumour angiogenesis. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 10, 299–310 (2005).
 82. Ahmed, Z., Briden, A., Hall, S. & Brown, R. A. Stabilisation of cables of fibronectin with micromolar concentrations of copper: In vitro cell substrate properties. *Biomaterials* 25, 803–812 (2004).
 83. Parke, A., Bhattacharjee, P., Palmer, R. M. & Lazarus, N. R. Characterization and quantification of copper sulfate-induced vascularization of the rabbit cornea. *Am. J. Pathol.* 130, 173–178 (1988).
 84. Brem, S. S., Zagzag, D., Tsanaclis, A. M., Gately, S., Elkouby, M. P. & Brien, S. E. Inhibition of angiogenesis and tumor growth in the brain. Suppression of endothelial cell turnover by penicillamine and the depletion of copper, an angiogenic cofactor. *Am. J. Pathol.* 137, 1121–1142 (1990).
 85. Brem, S. Angiogenesis and cancer control: from concept to therapeutic trial. *Cancer*

Control 6, 436–458 (1999).

86. Feng, W., Ye, F., Xue, W., Zhou, Z. & Kang, Y. J. Copper regulation of hypoxia-inducible factor-1 activity. *Mol. Pharmacol.* 75, 174–182 (2008).
87. Giacomelli, C., Trincavelli, M. L., Satriano, C., Hansson, Ö., La Mendola, D., Rizzarelli, E. & Martini, C. Copper (II) ions modulate Angiogenin activity in human endothelial cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 60, 185–96 (2015).
88. Nasulewicz, A., Mazur, A. & Opolski, A. Role of copper in tumour angiogenesis - clinical implications. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 18, 1–8 (2004).
89. Wei, H., Zhang, W.-J., Leboeuf, R. & Frei, B. Copper induces - and copper chelation by tetrathiomolybdate inhibits - endothelial activation in vitro. *Redox Rep.* 19, (2013).
90. Liochev, S. I. & Fridovich, I. The Haber-Weiss cycle - 70 years later: an alternative view. *Redox Rep.* 7, 54–57 (2002).
91. Speisky, H., Gómez, M., Burgos-Bravo, F., López-Alarcón, C., Jullian, C., Olea-Azar, C. & Aliaga, M. E. Generation of superoxide radicals by copper-glutathione complexes: Redox-consequences associated with their interaction with reduced glutathione. *Bioorganic Med. Chem.* 17, 1803–1810 (2009).
92. Moriwaki, H., Osborne, M. R. & Phillips, D. H. Effects of mixing metal ions on oxidative DNA damage mediated by a Fenton-type reduction. *Toxicol. Vitr.* 22, 36–44 (2008).
93. Vyas, K. M., Jadeja, R. N., Patel, D., Devkar, R. V. & Gupta, V. K. A new pyrazolone based ternary Cu(II) complex: Synthesis, characterization, crystal structure, DNA binding, protein binding and anti-cancer activity towards A549 human lung carcinoma cells with a minimum cytotoxicity to non-cancerous cells. *Polyhedron* 65, 262–274 (2013).
94. Anjomshoa, M., Hadadzadeh, H., Fatemi, S. J. & Torkzadeh-Mahani, M. A mononuclear Cu(II) complex with 5,6-diphenyl-3-(2-pyridyl)-1,2,4-triazine: Synthesis, crystal

- structure, DNA-and BSA-binding, molecular modeling, and anticancer activity against MCF-7, A-549, and HT-29 cell lines. *Eur. J. Med. Chem.* 96, 66–82 (2015).
95. Anjomshoa, M., Fatemi, S. J., Torkzadeh-Mahani, M. & Hadadzadeh, H. DNA- and BSA-binding studies and anticancer activity against human breast cancer cells (MCF-7) of the zinc(II) complex coordinated by 5,6-diphenyl-3-(2-pyridyl)-1,2,4-triazine. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 127, 511–520 (2014).
96. Anjomshoa, M., Hadadzadeh, H., Fatemi, S. J. & Torkzadeh-Mahani, M. A mononuclear Ni(II) complex with 5,6-diphenyl-3-(2-pyridyl)-1,2,4-triazine: DNA- and BSA-binding and anticancer activity against human breast carcinoma cells. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 136 Pt B, 205–215 (2015).
97. Vo, N. H., Xia, Z., Hanks, J., Yun, T., Bloom, S., Shen, J., Koya, K., Sun, L. & Chen, S. Synthesis, crystallographic characterization and electrochemical property of a copper(II) complex of the anticancer agent elesclomol. *J. Inorg. Biochem.* 130, 69–73 (2014).
98. Hasinoff, B. B., Yadav, A. A., Patel, D. & Wu, X. The cytotoxicity of the anticancer drug elesclomol is due to oxidative stress indirectly mediated through its complex with Cu(II). *J. Inorg. Biochem.* 137, 22–30 (2014).
99. Hasinoff, B. B., Wu, Xing., Yadav, A. A., Patel, D., Zhang, H., Wang, D. S., Chen, Z. S. & Yalowich, J. C. Cellular mechanisms of the cytotoxicity of the anticancer drug elesclomol and its complex with Cu(II). *Biochem. Pharmacol.* 93, 266–276 (2014).
100. ClinicalTrials.gov. (2013). Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>. (Acedido: 5 de setembro de 2016)
101. Yadav, A. A., Patel, D., Wu, X. & Hasinoff, B. B. Molecular mechanisms of the biological activity of the anticancer drug elesclomol and its complexes with Cu(II), Ni(II) and Pt(II). *J. Inorg. Biochem.* 126, 1–6 (2013).
102. Nagai, M., Shin Ogawa, L., Chimmanamada, D., Inoue, T., Chu, J., Beaudette-Zlatanova,

- B. C., Lu, R., Blackman, R. K., Barsoum, J., Koya, K. & Wada, Y. The oncology drug elesclomol selectively transports copper to the mitochondria to induce oxidative stress in cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 2142–2150 (2012).
- 103.** Ismael, A. L., Henriques, M. S. C., Marques, C. F. S., Rodrigues, M. J., Barreira, L. A., Paixão, J. A., Fausto, R. & Cristiano, M. L. S. Exploring saccharinate-tetrazoles as selective Cu (II) ligands: structure, magnetic properties and cytotoxicity of copper (II) complexes based on 5-(3-aminosaccharyl)-tetrazoles. *R. Soc. Chem.* 6, 71628–71637 (2016).
- 104.** Vutey, V., Castelli, S., D'Annessa, I., Sâmia, L. B. P., Souza-Fagundes, E. M., Beraldo, H. & Desideri, A. Human topoisomerase IB is a target of a thiosemicarbazone copper(II) complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 606, 34–40 (2016).
- 105.** Li, R., Cui, B., Li, Y., Zhao, C., Jia, N., Wang, C., Wu, Y. & Wen, A. A new synthetic Cu(II) compound, $[Cu_3(p-3-bmb)2Cl_4 \cdot (CH_3OH)_2]_n$, inhibits tumor growth in vivo and in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* 724, 77–85 (2014).
- 106.** Křikavová, R., Vančo, J., Trávníček, Z., Hutýra, J. & Dvořák, Z. Design and characterization of highly in vitro antitumor active ternary copper(II) complexes containing 2'-hydroxychalcone ligands. *J. Inorg. Biochem.* 163, 8–17 (2016).
- 107.** Sarigul, M., Sari, A., Kose, M., McKee, V., Elmastas, M., Demirtas, I. & Kurtoglu, M. New bio-active azo-azomethine based Cu(II) complexes. *Inorganica Chim. Acta* 444, 166–175 (2016).
- 108.** Yue, X., Chen, Y., Yang, G., Yue, S. & Su, Z. Synthesis, crystal structures and DNA-binding properties of Cd(II), Cu(II) and Ni(II) complexes with 2-(2-pyridyl)benzothiazole. *Synth. Met.* 200, 1–6 (2015).
- 109.** Fernandes, A. S., Florido, A., Saraiva, N., Cerqueira, S., Ramalhete, S., Cipriano, M., Cabral, M. F., Miranda, J. P., Castro, M., Costa, J. & Oliveira, N. G. Role of the Copper (

- II) Complex Cu [15]pyN5 in Intracellular ROS and Breast Cancer Cell Motility and Invasion. *Chem Biol Drug* 86, 578–588 (2015).
- 110.** Gou, Y., Qi, J., Ajayi, J., Zhang, Y., Zhou, Z., Wu, X., Yang, F. & Liang, H. Developing Anticancer Copper(II) Pro-drugs Based on the Nature of Cancer Cells and the Human Serum Albumin Carrier IIA Subdomain. *Mol. Pharm.* 12, 3597–609 (2015).
- 111.** Saliba, A. N., Harb, A. R. & Taher, A. T. Iron chelation therapy in transfusion-dependent thalassemia patients: current strategies and future directions. *J. Blood Med.* 6, 197–209 (2015).
- 112.** Lal, A., Porter, J., Sweeters, N., Ng, V., Evans, P., Neumayr, L., Kurio, G., Harmatz, P. & Vichinsky, E. Combined chelation therapy with deferasirox and deferoxamine in thalassemia. *Blood Cells, Mol. Dis.* 50, 99–104 (2013).
- 113.** Lamas, G. A., Goertz, C., Boineau, R., Mark, D. B., Rozema, T., Nahin, R. L., Lindblad, L., Lewis, E. F., Drisko, J. & Lee, K. L. Effect of disodium EDTA chelation regimen on cardiovascular events in patients with previous myocardial infarction: the TACT randomized trial. *JAMA* 309, 1241–1250 (2013).
- 114.** Flores, C. R., Puga, M. P., Wrobel, K., Garay Sevilla, M. E. & Wrobel, K. Trace elements status in diabetes mellitus type 2: Possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 91, 333–341 (2011).
- 115.** Peguero, J. G., Arenas, I. & Lamas, G. A. Chelation therapy and cardiovascular disease: Connecting scientific silos to benefit cardiac patients. *Trends Cardiovasc. Med.* (2014).
- 116.** Manigrasso, M. B., Juranek, J., Ramasamy, R. & Schmidt, A. M. Unlocking the biology of RAGE in diabetic microvascular complications. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 15–22 (2014).
- 117.** Yamagishi, S. *et al.* Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative

stress in vascular complications in diabetes. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 663–71 (2012).

- 118.** Nagai, R., Murray, D. B., Metz, T. O. & Baynes, J. W. Chelation: A fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications. *Diabetes* 61, 549–559 (2012).