

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA**  
Programa de Pós-Graduação em Química

JULIA TIEMY LEAL KONNO

**Reposicionamento de antirreabsortivos para tratamento da  
sobrecarga de ferro**

**Versão Corrigida**

São Paulo

Data de Depósito na SPG

14/08/2023

JULIA TIEMY LEAL KONNO

**Reposicionamento de antirreabsortivos para tratamento da sobrecarga de ferro**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestra em Ciências (Química).

Orientador: Prof. Dr. Breno Pannia Espósito

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

K82r Konno, Julia Tiemy Leal  
Reposicionamento de antirreabsortivos para  
tratamento da sobrecarga de ferro / Julia Tiemy  
Leal Konno. - São Paulo, 2023.  
107 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da  
Universidade de São Paulo. Departamento de Química  
Fundamental.

Orientador: Espósito, Breno Pannia

1. Reposicionamento de fármacos. 2.  
Antirreabsortivos. 3. Bisfosfonatos. 4. Quelante.  
5. Sobrecarga de Ferro. I. T. II. Espósito, Breno  
Pannia , orientador.



Universidade de São Paulo  
**Instituto de Química**

"Reposicionamento de antirreabsortivos para tratamento da sobrecarga de ferro"

**JULIA TIEMY LEAL KONNO**

Dissertação de Mestrado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências - no Programa de Química.

**APROVADO(A) POR:**

---

**Prof. Dr. Breno Pannia Esposito**  
(Orientador e Presidente)

---

**Profa. Dra. Cristina Helena dos Reis Serra**  
FCF - USP

---

**Prof. Dr. Adelino Vieira de Godoy Netto** *(por videoconferência)*  
IQ - UNESP - ARARAQUARA

**SÃO PAULO**  
29 de agosto de 2023

Para meus pais, Carlos e Adriana;

Meu irmão Gustavo;

E meus amiguinhos, que através do amor me fizeram renascer várias vezes durante a realização desse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo e por todas as bênçãos em minha vida.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Breno Pannia Espósito, a quem admiro tanto. Muito obrigada por seus ensinamentos desde minha iniciação científica até aqui. Graças a sua paciência, dedicação, senso de humor e sensibilidade, pude desenvolver esse trabalho com muita felicidade. Muito obrigada por todas as conversas científicas (e não científicas) que me ajudaram a concretizar esse sonho. Sou eternamente grata por sua ilustre orientação.

Ao anjo Alejandro García Ríos, que esteve ao meu lado, acompanhando cada passo meu durante esse trabalho. Muito obrigada por ter me ensinado tanto, pelas extensas discussões sobre meus experimentos, pelo treinamento na sala de cultura, pela nossa colaboração, pelos vários conselhos, pelo apoio e por ser tão especial.

À minha família, especialmente meus pais, Carlos e Adriana, por seu apoio, amor, cuidado e pelos sacrifícios vividos para chegar até aqui. Esse sonho existe graças a vocês.

Aos meus colegas de laboratório, Ana Rita, Beatriz, Ernani, Gabriel, Hector, Lúcio, Monalisa, Pedro, Rachel, Tatiana, Thiago e Vasílii, pela amizade e pelas conversas mais divertidas que se pode encontrar em um laboratório. Sou grata por cada um que compartilhou seu conhecimento comigo. Obrigada especialmente a Tatiana, pela ajuda na sala de cultura, e aos queridos do grupo “*sabores dos complexos*”.

Ao querido amigo, Alejandro Herrera, por me mostrar que o cultivo celular é fantástico. Suas preciosas dicas me ajudaram muito.

Aos meus maravilhosos amigos Bianca, Monique, Gabriel, Heitor, Juliana, Miguel e Rodrigo pelo carinho, pelos momentos de descontração e desabafos, e por todo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Mauro Bertotti, e seu aluno de doutorado, Leonardo Ribeiro, pela realização das análises de voltametria cíclica.

A todos os professores, técnicos e funcionários da Universidade de São Paulo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2021/02165-3, e ao Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Ontem eu tive esse sonho  
Nele encontrava com você  
Não sei se sonhava o meu sonho  
Ou se o sonho que eu sonhava era seu

Um sonho dentro de um sonho  
Eu ainda nem sei se acordei  
Desse sonho, quero imagem e som  
Pra saber o que foi que aconteceu

Nação Zumbi

## RESUMO

KONNO, J. T. L. Reposicionamento de antirreabsortivos para tratamento de sobrecarga de ferro. 2023. 108p. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O ferro é o metal de transição mais abundante do corpo humano e sem sua presença em diversos processos celulares, a vida não seria possível. Entretanto, a sobrecarga de ferro é uma condição nociva para os pacientes, que apresentam significativo decréscimo de qualidade de vida. Como tratamento, a terapia de quelação conta com apenas três medicamentos aprovados, que possuem fortes efeitos adversos que dificultam sua adesão terapêutica. A busca por novos quelantes pode se beneficiar da reposição de fármacos, estratégia que visa identificar novas aplicações para fármacos já aprovados em testes clínicos para uma outra indicação. Antirreabsortivos são fármacos que atuam inibindo a reabsorção óssea, utilizados no tratamento da osteoporose e doença de Paget. Para esse trabalho, foram escolhidos quatro fármacos da classe dos bisfosfonatos (etidronato, alendronato, tiludronato e zoledronato) e o ranelato de estrôncio. Considerando os ambientes de coordenação com características favoráveis à coordenação do Fe(III) presentes em suas moléculas, objetivou-se estudar as propriedades de ligação a ferro, efeito antioxidante, permeação celular e atividade antiproliferativa, na presença e na ausência de cálcio, com vistas a um reposicionamento para uso em terapia de quelação da sobrecarga de ferro. Os complexos antirreabsortivo-ferro foram sintetizados e caracterizados por espectroscopia eletrônica UV-visível, no qual se constatou sua formação pelo aparecimento de uma banda própria em 260 nm com todos os ligantes exceto tiludronato e ranelato de estrôncio. Testes de voltametria cíclica foram feitos para complementar a caracterização dos complexos, que demonstraram perfil único de redução e oxidação. Teste de competição entre os antirreabsortivos e a calceína férrica demonstrou moderada capacidade de sequestrar ferro. Os bisfosfonatos foram capazes de sequestrar pequena parte do ferro ligado à transferrina, porém não tem capacidade de transferi-lo de seu complexo para a proteína. A reação com hemina indicou que os antirreabsortivos não quelaram o ferro da porfirina e mantiveram sua estrutura intacta. Os bisfosfonatos apresentaram atividade antioxidante contra espécies reativas geradas pela reação entre ferro e ascorbato. Nos ensaios celulares com linhagens HeLa e HepG2, os antirreabsortivos e seus complexos com ferro demonstraram pouca capacidade de permeação celular, porém, no meio extracelular, os bisfosfonatos etidronato e tiludronato auxiliaram na prevenção da morte por estresse oxidativo dependente de ferro. Nas concentrações testadas (5 – 160  $\mu$ M) não foi observada atividade antiproliferativa com HeLa. Os bisfosfonatos formam complexos solúveis e tem atividade antioxidante em meio fisiológico. O cálcio não alterou de modo significativo as reações dependentes de ferro. E apesar de não serem permeáveis a essas células, podem ser utilizados para prevenir morte por estresse oxidativo em situação de sobrecarga de ferro.

**Palavras-chave:** Reposicionamento de fármacos, Antirreabsortivos, Bisfosfonatos, Quelante, Sobrecarga de Ferro.

## ABSTRACT

KONNO, J. T. L. Repositioning of antiresorptive agents for the treatment of iron overload. 2023. 108p. Masters Thesis. Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Iron is the most abundant transition metal in the human body and without its presence in several cellular processes, life would not be possible. However, iron overload is a harmful condition for patients, who experience a significant decrease in quality of life. As a treatment, chelation therapy has only three approved drugs, which have strong adverse effects that hinder therapeutic adherence. The search for new chelators may benefit from drug repositioning, a strategy that aims to identify new applications for drugs already approved in clinical trials for another indication. Antiresorptives are drugs that act by inhibiting bone resorption, used in the treatment of osteoporosis and Paget's disease. For this work, four drugs of the bisphosphonate class (etidronate, alendronate, tiludronate, and zoledronate) and strontium ranelate were chosen. Considering the coordination environments with characteristics favorable to the coordination of Fe(III) present in their molecules, we aimed to study the iron-binding properties, antioxidant effect, cell permeation, and antiproliferative activity with a view to repositioning for use in iron overload chelation therapy. The antiresorptive-iron complexes were synthesized and characterized by UV-visible electron spectroscopy, in which their formation was verified by the appearance of a proper band at 260 nm with all ligands except tiludronate and strontium ranelate. Cyclic voltammetry tests were performed to complement the characterization of the complexes, which showed unique reduction and oxidation profiles. Competition test between the antiresorptives and ferric calcein demonstrated a moderate ability to sequester iron. Bisphosphonates were able to sequester a small part of the iron bound to transferrin but were not able to transfer it from their complex to the protein. The reaction with hemin indicated that the antiresorptives did not chelate iron from porphyrin and kept its structure intact. Bisphosphonates showed antioxidant activity against reactive species generated by the reaction between iron and ascorbate. In cellular assays with HeLa and HepG2 cell lines, the antiresorptive agents showed little cell permeation capacity, however, in the extracellular medium, the bisphosphonates etidronate and tiludronate helped to prevent death by iron-dependent oxidative stress. At the concentrations tested (5 - 160  $\mu\text{M}$ ), no antiproliferative activity was observed with HeLa. Bisphosphonates form soluble complexes and have antioxidant activity in physiological medium. Calcium did not significantly alter iron-dependent reactions. Although they are not permeable to these cells, they can be used to prevent death due to oxidative stress in situations of iron overload.

**Keywords:** Drug repositioning, Antiresorptive, Bisphosphonates, Chelator, Iron overload.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Esquema do enterócito duodenal e as principais proteínas relacionadas com a absorção e exportação do ferro. Dcytb: redutase citocromo b duodenal; DMT-1: transportador de metal divalente-1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína reguladora homeostática de ferro; TfR: receptor da transferrina. Fonte: Grotto, 2008.

**Figura 2:** Metabolismo sistêmico do ferro. Um ciclo conservativo entre quatro células principais: enterócitos duodenais, eritrócitos, macrófagos reticuloendoteliais e hepatócitos, regulado por hepcidina. Adaptado de Fleming e Ponka, 2012.

**Figura 3:** Únicos quelantes de ferro aprovados no mundo para uso clínico.

**Figura 4:** Estrutura do ácido pirofosfórico (esquerda) e bisfosfônico (direita). Fonte: Adaptado de Widler et al., 2002.

**Figura 5:** Estruturas dos bisfosfonatos selecionados para estudo: (1) Ácido etidrônico; (2) Ácido alendrônico; (3) Ácido tiludrônico e (4) Ácido zolendrônico. Elaborado com ChemDraw.

**Figura 6:** Estrutura do ranelato de estrôncio. Elaborado com ChemDraw.

**Figura 7:** Diagrama do gráfico do experimento após adição dos antirreabsortivos.

**Figura 8:** Reação para obter o conjugado apo-transferrina fluoresceína.

**Figura 9:** Diagrama do experimento da recuperação da fluorescência de transferrina após adição dos antirreabsortivos visando sequestro do ferro presente.

**Figura 10:** Diagrama do experimento após adição dos complexos com ferro.

**Figura 11:** Diagrama do experimento indicando o surgimento de espécies reativas de oxigênio geradas pela presença de ferro livre.

**Figura 12:** Diagrama do experimento. Recuperação da fluorescência é observada caso quelante penetre na célula e sequestre o ferro da calceína.

**Figura 13:** Diagrama do experimento. Supressão da fluorescência indica permeação do complexo na célula e posterior preferência do ferro do complexo pela calceína.

**Figura 14:** Espectro UV-Visível dos diferentes sais de ferro (200  $\mu\text{M}$ ) em água, utilizados para formação dos complexos dos antirreabsortivos-ferro.

**Figura 15:** Espectro UV-Vis do ácido etidrônico 1 mM após adição de sais de ferro a 200  $\mu\text{M}$  em água.

**Figura 16:** Espectro UV-Vis do alendronato 1 mM após adição de sais de ferro a 200  $\mu\text{M}$  em água.

**Figura 17:** Espectro UV-Vis do tiludronato 1 mM após adição de sais de ferro a 200  $\mu\text{M}$  em água.

**Figura 18:** Destaque do espectro UV-Vis do tiludronato 1 mM com sais de ferro a 200  $\mu\text{M}$  em água.

**Figura 19:** Espectro UV-Vis do ácido zoledrônico 1 mM após adição de sais de ferro a 200  $\mu\text{M}$  em água.

**Figura 20:** Espectro UV-Vis do ranelato de estrôncio 1 mM após adição de sais de ferro a 200  $\mu\text{M}$  em água.

**Figura 21:** Possível estrutura do complexo de ácido ranélico com ferro.

**Figura 22:** Voltamograma do etidronato e seu respectivo complexo, em PBS como eletrólito de suporte. Velocidade de varredura 50 mV/s.

**Figura 23:** Voltamograma do alendronato e seu respectivo complexo, em PBS como eletrólito de suporte. Taxa de varredura 50 mV/s.

**Figura 24:** Voltamograma do zoledronato e seu respectivo complexo, em PBS como eletrólito de suporte. Taxa de varredura 50 Mv/s.

**Figura 25:** Relação entre calceína, ferro e quelante. Íons de ferro suprimem a fluorescência de calceína, enquanto um quelante é capaz de recuperá-la.

**Figura 26:** Capacidade de sequestro do ferro pelos antirreabsortivos em diferentes concentrações (0 – 32  $\mu\text{M}$ ) e DFO (0 – 2  $\mu\text{M}$ ) da calceína férrica 1  $\mu\text{M}$  após 12h.

**Figura 27:** Recuperação de fluorescência de calceína (1  $\mu\text{M}$ ) por A. etidronato; B. alendronato; C. tiludronato; D. zoledronato a (32  $\mu\text{M}$ ) com e sem adição de cálcio (2,5 mM) durante 12 horas.

**Figura 28:** Recuperação de fluorescência de calceína (1  $\mu\text{M}$ ) por ranelato de estrôncio (32  $\mu\text{M}$ ) com e sem adição de cálcio (2,5 mM) durante 12 horas.

**Figura 29:** Recuperação de fluorescência de transferrina (1  $\mu\text{M}$ ) por antirreabsortivos (0,6  $\mu\text{M}$ ), após adição de 2  $\mu\text{M}$  de ferro, durante 245 minutos (4h). r.u.: relative fluorescence units.

**Figura 30:** Recuperação de fluorescência de transferrina (1  $\mu\text{M}$ ) por antirreabsortivos (40  $\mu\text{M}$ ), após adição de 2  $\mu\text{M}$  de ferro, durante 245 minutos (4h). r.u.: relative units.

**Figura 31:** Recuperação de fluorescência de transferrina (1  $\mu\text{M}$ ) por antirreabsortivos (40  $\mu\text{M}$ ), após adição de 2  $\mu\text{M}$  de ferro, em meio com cálcio (2,5 mM) durante 175 minutos (~3h). r.u.: relative units.

**Figura 32:** Cinética da fluorescência de transferrina (1  $\mu\text{M}$ ) após a adição de complexos de ferro com antirreabsortivos (2  $\mu\text{M}$ ), durante 165 minutos (2,75h). r.u.: relative units.

**Figura 33:** Cinética da fluorescência de transferrina (1  $\mu\text{M}$ ) após a adição de complexos de ferro-antirreabsortivos (2  $\mu\text{M}$ ) em meio com cálcio, durante 168 minutos (2,8h). r.u.: relative units.

**Figura 34:** Estrutura da hemina.

**Figura 35:** Espectro UV-Vis da Hemina 80  $\mu\text{M}$  em DMSO. Fonte: Mandal, 2015.

**Figura 36:** Espectro de absorbância da hemina (75  $\mu\text{M}$ ) com adição dos antirreabsortivos (75  $\mu\text{M}$ ), após 1h.

**Figura 37:** Espectro de absorbância da hemina (75  $\mu\text{M}$ ) com adição dos antirreabsortivos (75  $\mu\text{M}$ ), após 24h.

**Figura 38:** Atividade antioxidante dos antirreabsortivos em diferentes concentrações (0 - 40  $\mu\text{M}$ ) durante 1h. A concentração de Fe é 10  $\mu\text{M}$ . r.u.: relative units.

**Figura 39:** Atividade antioxidante dos antirreabsortivos em diferentes concentrações (0 - 40  $\mu\text{M}$ ) com adição de cálcio 2,5 mM, durante 1h. A concentração de Fe é 10  $\mu\text{M}$ . r.u.: relative units.

**Figura 40:** Desempenho dos ligantes a 2,5  $\mu\text{M}$  na recuperação da fluorescência da calceína no meio intracelular (HeLa).

**Figura 41:** Desempenho dos ligantes a 2,5  $\mu\text{M}$  na recuperação da fluorescência da calceína no meio intracelular (HepG2).

**Figura 42:** Comparação dos valores de fluorescência dos ligantes testados em HeLa. Os valores de fluorescência dos antirreabsortivos são similares ao do controle negativo, água, e indicam a não quelação de ferro intracelular.

**Figura 43:** Comparação dos valores de fluorescência dos ligantes testados em HepG2. Os valores de fluorescência dos antirreabsortivos são similares ao do controle negativo, água, e indicam a não quelação de ferro intracelular.

**Figura 44:** Complexos de antirreabsortivos e ferro em contato com as células HeLa. A fluorescência da calceína intracelular não foi suprimida.

**Figura 45:** Complexos de antirreabsortivos e ferro em contato com as células HepG2. A fluorescência da calceína intracelular não foi suprimida.

**Figura 46:** Comparação dos valores de fluorescência dos complexos antirreabsortivos-ferro em células HeLa. Os valores altos de fluorescência indicam a presença de calceína livre e uma não liberação de ferro para o meio intracelular.

**Figura 47:** Comparação dos valores de fluorescência dos complexos antirreabsortivos-ferro em células HepG2. Os valores altos de fluorescência indicam a presença de calceína livre e uma não liberação de ferro para o meio intracelular.

**Figura 48:** Viabilidade celular de células HeLa após exposição a diferentes concentrações de ferro e concentração fixa de ácido ascorbico.

**Figura 49:** Porcentagem de sobrevivência de células HeLa com três concentrações dos antirreabsortivos testados. Todas as colunas representadas com os fármacos foram expostas a FeNTA 500  $\mu\text{M}$  e HAsc 40  $\mu\text{M}$ . Controles: 1. Blank: sem células; 2. Cell medium: crescimento normal das células; 3. DFO: quelante de ferro padrão ouro (para comparação).

**Figura 50:** Porcentagem de sobrevivência de células HepG2 com três concentrações dos antirreabsortivos testados. Todas as colunas representadas com os fármacos foram expostas a FeNTA 500  $\mu\text{M}$  e HAsc 40  $\mu\text{M}$ . Controles: 1. Blank: sem células; 2. Cell medium: crescimento normal das células; 3. DFO: quelante de ferro para comparação.

**Figura 51:** Viabilidade celular (HeLa) após tratamento de 24h com os cinco antirreabsortivos testados em seis concentrações.

## Lista de Abreviaturas

<b>5-DTAF</b>	5-(4,6-diclorotriazinil)aminofluoresceína
<b>apo-Tf-FI</b>	apo-Transferrina fluoresceína
<b>ART</b>	Antirreabsortivo
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CAFe</b>	Complexo calceína-ferro(III)
<b>CAL</b>	Calceína
<b>CAL-AM</b>	Acetometoxi-calceína
<b>D10</b>	Meio DMEM suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino
<b>Dcytb</b>	Citocromo B duodenal
<b>DFO</b>	Desferroxamina
<b>DFP</b>	Deferiprona
<b>DFX</b>	Deferasirox
<b>DHR</b>	Dihidrorodamina
<b>DMEM</b>	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>DMSO</b>	Dimetilsufóxido
<b>DMT-1</b>	Proteína transportadora de metal divalente 1
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTPA</b>	Ácido dietilenotetraminopentaacético
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>FAS</b>	<i>ferrous ammonium sulfate</i> (sulfato ferroso amoniacal)
<b>Fe(ART)</b>	Complexo antirreabsortivo-ferro
<b>Fe(DFO)</b>	Complexo DFO-ferro
<b>Fe(DFP)</b>	Complexo DFP-ferro
<b>Fe(HQ)</b>	Complexo ferro-8-hidroxiquinolina
<b>FeNTA</b>	Complexo ferro-nitrilotriacético

<b>FPN1</b>	Ferroportina
<b>HBS</b>	<i>Hepes Buffered Saline</i>
<b>HCP-1</b>	Proteína transportadora do heme 1
<b>HeLa</b>	Células de câncer de cérvix humano
<b>HepG2</b>	Células de câncer de fígado humano
<b>HFE</b>	Proteína reguladora homeostática de ferro
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>LIP</b>	<i>Labile iron pool</i> (ferro lábil celular)
<b>LPI</b>	<i>Labile plasma iron</i> (ferro lábil plasmático)
<b>NTBI</b>	<i>Non-transferrin-bound-iron</i> (Ferro Não-Ligado à Transferrina)
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>p[Fe]</b>	Logaritmo negativo da concentração de ferro para uma temperatura dada
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampão fosfato-salino)
<b>SIH</b>	Salicilaldeído isonicotinil hidrazona
<b>TF</b>	Transferrina
<b>TfR</b>	Receptor da transferrina

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	19
1.1	Ferro: da essencialidade à toxicidade	19
1.2	Sobrecarga de Ferro	24
1.3	Terapia de Quelação	27
1.4	Reposicionamento e Antirreabsortivos	29
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	36
2.1	Objetivos gerais e justificativa	36
2.2	Objetivos específicos	36
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	38
3.1	Reagentes	38
3.2	Instrumentos	40
3.3	Síntese e caracterização dos complexos por UV-vis	40
3.4	Voltametria Cíclica	41
3.5	Avaliação da capacidade quelante dos antirreabsortivos	41
	I) Estudos de competição com calceína	41
	II) Estudos de competição com apo-Transferrina fluorescente	42
	III) Estudos de competição com hemina	45
3.6	Estudos de atividade antioxidante dependente de ferro	46
3.7	Ensaio Celulares	47
	I) Estudos de competição intracelular com calceína	47
	II) Estudo de proteção da morte por estresse oxidativo	49
	III) Estudos antiproliferativos	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	52
4.1	Síntese e caracterização dos complexos por UV-vis	52
4.2	Voltametria Cíclica	58
4.3	Avaliação da capacidade quelante dos antirreabsortivos	62
	I) Estudos de competição com calceína	62
	II) Estudos de competição com apo-Transferrina fluorescente	67
	III) Estudos de competição com hemina	73
4.4	Estudos de atividade antioxidante dependente de ferro	76
4.5	Ensaio Celulares	79
	I) Estudos de competição intracelular com calceína	79
	II) Estudos de proteção contra morte por estresse oxidativo	85
	III) Estudos antiproliferativos	90

5	<b>CONCLUSÕES</b> .....	94
6	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	96
7	<b>SÚMULA CURRICULAR</b> .....	105

# 1

## Introdução

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Ferro: da essencialidade à toxicidade

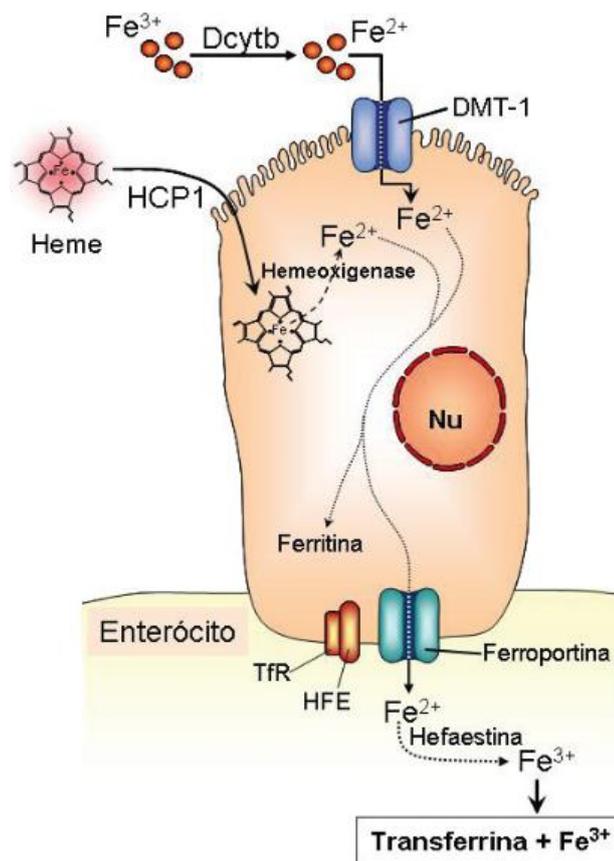
A importância dos elementos inorgânicos para a vida é uma das áreas de estudo da química bioinorgânica, sendo os elementos classificados de acordo com sua quantidade e necessidade para funcionamento do corpo. Em primeiro lugar, estão H, C, N e O, que dão origem aos compostos orgânicos e são cruciais para a composição de seres vivos, contribuindo com quase 60% em massa. Após eles, encontram-se os macroatômicos, Na, K, Mg, Ca, Cl, P e S, que, em quantidades menores, 0,01% a 1%, constituem principalmente componentes iônicos dos fluidos biológicos. Existe também um grande grupo chamado de traço essenciais, formado majoritariamente por metais de transição como Mn, Fe, Cu, Zn, Co e Mo presentes em teores abaixo de 0,01%, mas fundamentais para a vida, principalmente por suas funções enzimáticas (Toma, 2015; Zoroddu *et al.*, 2019).

O ferro é o metal de transição mais abundante do corpo humano, com cerca de 5g distribuídos em diferentes compartimentos. Sem sua presença em diversos processos celulares, a vida não seria possível, já que participa de reações enzimáticas essenciais como o transporte e armazenamento de oxigênio, produção de energia e síntese de DNA. Esse destaque todo pode ser justificado pela sua habilidade em aceitar e doar elétrons, além de elevada afinidade pelo oxigênio. O ferro tem orbitais d semipreenchidos e devido a isso possui diferentes valências, sendo os estados de oxidação +2 ( $\text{Fe}^{2+}$ , ferroso,  $3d^6$ ) e +3 ( $\text{Fe}^{3+}$ , férrico,  $3d^5$ ) mais comumente encontrados em meios biológicos. É possível obter ambos estados devido seu potencial redox, adequado para uma vasta gama de reações metabólicas graças a característica de intercambialidade (Liu e Hider, 2002; Zoroddu *et al.*, 2019).

Outros metais de transição como Cu e Mn são capazes de participar de reações redox no meio biológico, porém, diferentes razões fizeram que os organismos selecionassem o ferro durante a evolução. Primeiro, sua disponibilidade no ambiente – é 2º metal mais abundante na crosta terrestre, estando atrás apenas do alumínio; segundo, possui múltiplos estados de oxidação – fundamental para transferência de elétrons e coordenação a ligantes biológicos; terceiro, seu potencial redox – cujo intervalo de +1000 mV e -550 mV é maior do que outros elementos de transição; quarto, os sistemas biológicos podem se ajustar a reatividade química do ferro ao explorarem seus estados de oxidação, potencial redox e estado de rotação dos elétrons, de acordo com sua necessidade (Pantopoulos *et al.*, 2012).

A maior parte do ferro (1,5 a 3g) se encontra ligado ao grupo heme da hemoglobina, proteína responsável pela oxigenação de tecidos, e grande parte do restante está armazenada sob forma de ferritina ou hemossiderina, em locais como fígado, medula óssea e baço. Esse tipo de armazenamento garante reserva interna além de prevenir que o ferro participe de reações oxidativas danosas para o corpo, uma vez que tem elevada reatividade (Cançado, 2007; Cançado e Chiattoni, 2010). Quatro tipos celulares são principais em determinar o teor e a distribuição de ferro corpóreo, que são: enterócitos duodenais, eritrócitos, macrófagos reticuloendoteliais e hepatócitos. Cada uma dessas células tem um papel na homeostase sistêmica do ferro, que é regulada pela hepcidina, um hormônio peptídico sintetizado pelo fígado. Sua função principal é controlar a disponibilização de ferro para os tecidos, fazendo uma comunicação entre os locais de absorção, utilização e estoque (Fleming e Ponka, 2012; Grotto, 2008).

A aquisição do ferro pode ser feita de três maneiras, da absorção alimentar, da reciclagem de eritrócitos senescentes ou da liberação de ferro armazenado nos hepatócitos, mecanismos especialmente desenvolvidos para conservação do metal (Ganz e Nemeth, 2012). Uma dieta normal pode conter de 13 a 18 mg de ferro, entretanto, apenas 1 a 2 mg são absorvidos por dia no duodeno. O ferro do alimento pode estar na forma inorgânica (não heme)  $\text{Fe}^{3+}$ , encontrado em cereais e vegetais, ou na forma heme, oriundo da quebra da hemoglobina e mioglobina proveniente da carne vermelha. Essa forma é mais bem absorvida do que a inorgânica, pois a forma férrica apresenta baixa solubilidade e biodisponibilidade. A figura 1 mostra as principais proteínas envolvidas da absorção do ferro nos enterócitos. Na membrana apical, localizam-se duas proteínas principais nesse processo, a transportadora de metal divalente 1 (DMT-1) e a proteína transportadora do heme 1 (HCP-1). Para ser transportado pela DMT-1, o  $\text{Fe}^{3+}$  deve ser reduzido a  $\text{Fe}^{2+}$  através da redutase citocromo b duodenal (Dcytb), facilitada pelo ascorbato. Já o ferro do heme é transportado pela HCP-1, e no citoplasma, o heme absorvido é liberado pela hemioxigenase e fará parte do *pool* de ferro não heme, e dependendo da necessidade do organismo, poderá ser usado nos processos celulares, armazenado como ferritina ou exportado pela membrana basolateral para entrega sistêmica (Dev e Babitt, 2017; Grotto, 2008).



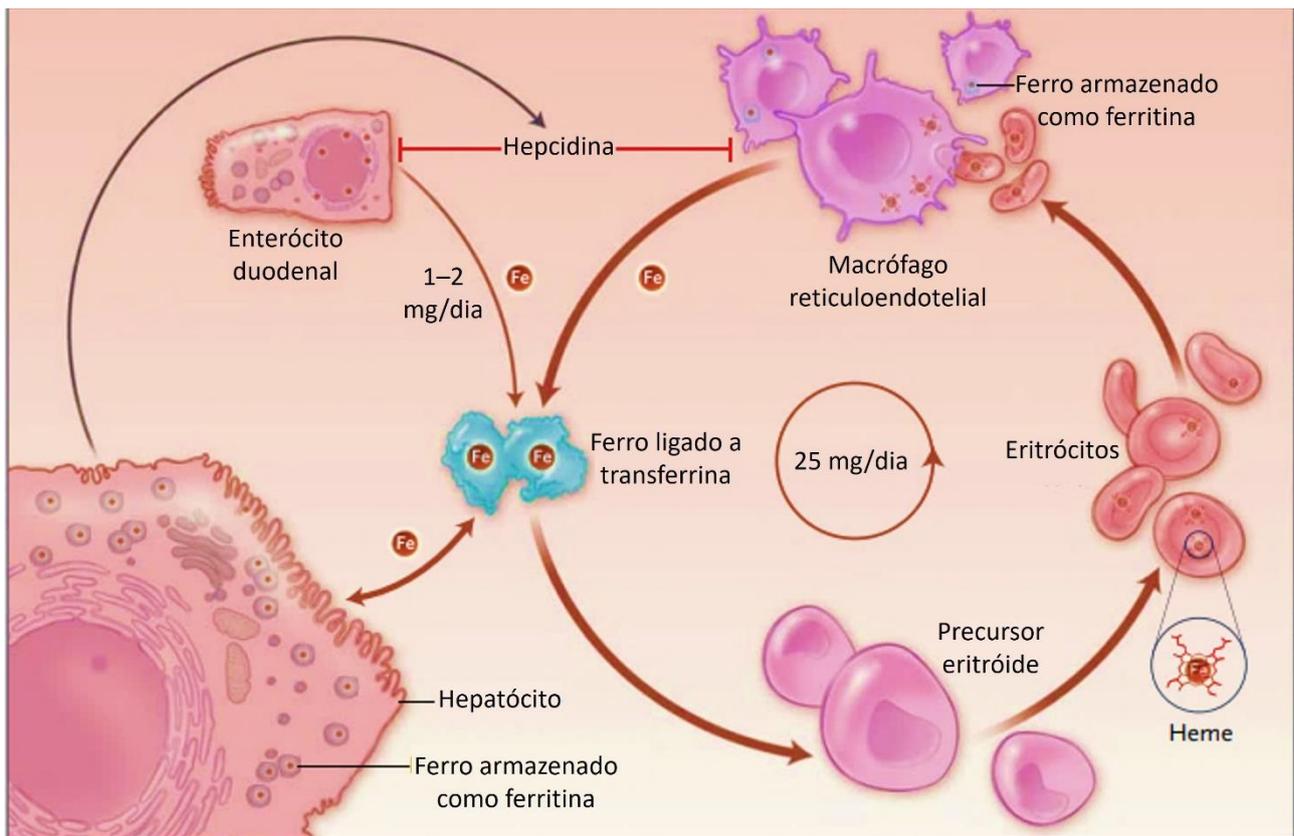
**Figura 1:** Esquema do enterócito duodenal e as principais proteínas relacionadas com a absorção e exportação do ferro. Dcytb: redutase citocromo b duodenal; DMT-1: transportador de metal divalente-1; HCP-1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína reguladora homeostática de ferro; TfR: receptor da transferrina. Fonte: Grotto, 2008.

O exportador de ferro para o plasma é a ferroportina (FPN1), proteína presente em várias células, como enterócitos duodenais, hepatócitos, macrófagos e sinciciotrofoblastos placentários. Assim como a DMT-1, a ferroportina também tem seletividade por  $\text{Fe}^{2+}$ , que, após o efluxo, sofrerá oxidação a  $\text{Fe}^{3+}$  pela hefaestina ou ceruloplasmina, para captação pela transferrina. Esse mecanismo de efluxo tem auxílio da proteína reguladora homeostática de ferro (HFE), responsável por controlar a absorção intestinal e, ao interagir com receptor de transferrina (TfR), detecta o grau de saturação, e controla a necessidade de absorção de ferro no intestino. É importante ressaltar que o papel da ferroportina é crucial, pois é o único mecanismo de efluxo de ferro, além de ser também receptor da hepcidina, que ao se ligar a ela, induz sua degradação e diminuição da transferência de ferro para a circulação (Grotto, 2008; Grotto, Helena Z. W., 2010).

O ferro liberado para o plasma liga-se à transferrina, proteína cuja principal função é transportar ferro e entregá-lo a tecidos que o necessitam. Ela possui dois sítios homólogos, que em pH neutro transportam até dois átomos de Fe. Além de solubilizar o ferro, a ligação

com o metal atenua sua reatividade e facilita sua liberação para as células. Em condições normais, apenas 30% da transferrina está saturada. O ferro ligado à transferrina é a única fonte fisiológica de ferro disponível para a maioria das células, que controlam sua absorção por alteração da expressão dos receptores de transferrina (TfRs) (Fleming e Ponka, 2012; Gomme, McCann e Bertolini, 2005; Grotto, Helena Z. W., 2010).

É por meio da ligação da transferrina com seu receptor (TfR1) que os eritrócitos obtêm ferro, utilizando-o principalmente nas mitocôndrias para a síntese do grupo heme da hemoglobina. Quando velhos ou danificados, os eritrócitos são fagocitados pelos macrófagos reticuloendoteliais, onde a hemoglobina é degradada e o ferro é liberado, podendo ser armazenado como ferritina ou ser reutilizado nos precursores dos eritrócitos, na medula óssea. Normalmente, essas células podem liberar aproximadamente 25 mg de ferro por dia. Já em caso de uma maior absorção do que o necessário, o armazenamento de ferro pode ocorrer nos hepatócitos, em células da medula óssea e do baço, na forma de ferritina ou hemossiderina (Figura 2) (Fleming e Ponka, 2012; Silva e Faustino, 2015).



**Figura 2:** Metabolismo sistêmico do ferro. Um ciclo conservativo entre quatro células principais: enterócitos duodenais, eritrócitos, macrófagos reticuloendoteliais e hepatócitos, regulado por hepcidina. Adaptado de Fleming e Ponka, 2012.

O armazenamento de ferro é um componente essencial para a homeostase celular, pois, quando necessário, a célula utilizará uma forma não tóxica para seus processos metabólicos futuros. O maior depósito intracelular de ferro é a proteína ferritina, sendo que uma única molécula pode armazenar mais de 4500 átomos de ferro. Quando as concentrações de ferritina estão elevadas, acumulam-se e formam-se agregados dentro da célula, que acabam se fundindo com lisossomos, processo que leva à sua degradação e ao surgimento uma mistura de núcleos de  $Fe^{3+}$  e peptídeos, conhecida como hemossiderina. Essa forma de armazenamento é particularmente encontrada em pacientes com sobrecarga de ferro (Anderson e Frazer, 2017).

Distúrbios na absorção, transporte, distribuição, armazenamento ou conservação do ferro podem gerar deficiência ou acúmulo de ferro no organismo. A manifestação clínica mais reconhecida de ferro é a sua deficiência, chamada de anemia ferropriva. De acordo com a OMS, casos de anemia (definida como a diminuição nos níveis de glóbulos vermelhos) afetam quase um quarto da população mundial, sendo 50% desses casos de anemia ferropriva. No caso de deficiência, ocorre um desequilíbrio entre absorção e/ou consumo/perdas, que geram uma redução do estoque de ferro corpóreo, levando a algum grau de deficiência tissular. Os sintomas mais conhecidos são: fadiga, palidez, dor de cabeça e baixa tolerância ao exercício físico. As principais consequências para a saúde são risco aumentado da morbimortalidade de mulheres e crianças, prejuízo do desenvolvimento cognitivo e físico em crianças, diminuição do desempenho físico e da produtividade de trabalho em adultos, e declínio cognitivo em idosos. Normalmente, o tratamento consiste em fornecer ferro, geralmente por meio de uma alimentação enriquecida ou por meio de suplementação suficiente para normalizar as concentrações de hemoglobina e assim melhorar a qualidade de vida do paciente (Andrews, 1999; Dev e Babitt, 2017; Grotto, Helena Z.W., 2010; Lopez et al., 2016; Worwood e May, 2012).

Por outro lado, quando se trata de excesso de ferro, a situação se torna mais complexa. A sobrecarga de ferro é caracterizada pelo seu acúmulo no plasma e em vários órgãos em decorrência a um aumento da absorção ou a recorrentes transfusões de sangue que pacientes com anemias crônicas refratárias necessitam. Sendo um metal tão pouco disponível, não existe um mecanismo biológico dedicado a excretar excesso de ferro, e para evitar seu acúmulo, apenas a absorção intestinal é regulada. Perdas ocorrem através da descamação da pele, pela urina, menstruação, e explicam a necessidade de se repor os estoques do organismo. O ferro, mesmo sendo indispensável para diferentes processos fisiológicos, em excesso é tóxico, pois produz espécies reativas de oxigênio principalmente

através da reação de Fenton (Equação 1), e causam graves lesões, principalmente no coração, cérebro, fígado e glândulas endócrinas (Datz, Müller e Aigner, 2017; Hoffbrand, Moss, 2017; Porter, 2001).



No citoplasma, a liberação de  $\text{Fe}^{2+}$ , na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , leva à conversão a  $\text{Fe}^{3+}$ , e produz radicais  $\text{OH}^\bullet$  (reação de Fenton), que possui elevado potencial de redução (+2,3V), podendo, portanto, oxidar indistintamente qualquer espécie presente no meio reacional. As reações são inespecíficas e muito rápidas, da ordem  $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , podendo danificar proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, além de induzir a peroxidação lipídica. Quando utilizado  $\text{Fe}^{3+}$  ao invés de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  em excesso, ocorre formação de radicais como hidroperoxila ( $\text{HO}_2^\bullet$ ) e ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), que, apesar de serem menos reativos que radicais hidroxila, também causam danos celulares (Aguiar *et al.*, 2007; Cançado, 2007). Isso significa que espécies de ferro “livre” (ou seja, de quelação pouco controlada) podem dar origem a um radical capaz de oxidar, com extrema rapidez, qualquer substrato biológico.

## 1.2 Sobrecarga de Ferro

A sobrecarga de ferro pode ter diferentes etiologias, podendo ser primária, causada por fatores genéticos, ou secundária, causada por excesso de ferro exógeno. A primária é mais associada à hemocromatose hereditária, proveniente de mutações em genes que são importantes na absorção, transporte e regulação de ferro. Já a secundária é associada a recorrentes transfusões de sangue que são necessárias principalmente em pacientes com distúrbios nos eritrócitos, com eritropoiese ineficiente e/ou também a outras doenças hepáticas (Labranche *et al.*, 2018; Nairz e Weiss, 2006).

A hemocromatose hereditária é uma doença autossômica que acomete principalmente caucasianos do Norte da Europa. Essa condição resulta de mutações em genes que estão envolvidos no transporte ou regulação do ferro. Cinco tipos são conhecidos, os tipos 1, 2A, 2B e 3 interferem na regulação feita pela hepcidina. Nessas condições ocorre uma expressão inadequada ou muito baixa desse peptídeo, o que leva ao aumento de ferroportina nas membranas dos enterócitos, elevando a absorção intestinal

de ferro e a liberação mediada pelos macrófagos, causando uma sobrecarga tecidual de ferro. No tipo 4, a mutação ocorre no gene da ferroportina, que causa perda de sua atividade com consequente acúmulo de ferro intracelular (Anderson e Frazer, 2017; Cançado e Chiattonne, 2010; Piperno, Pelucchi e Mariani, 2020).

Nos casos de hemocromatose não há comprometimento da eritropoiese, porém a quantidade de ferro plasmático excede a capacidade da transferrina, e esse acaba sendo depositado em células parenquimatosas do fígado, coração e glândulas endócrinas. Os sintomas incluem desde fadiga, escurecimento da pele, artralgias a diabetes, hepatomegalia, cirrose hepática, hipogonadismo e cardiopatias. O tratamento normalmente é realizado através de sangrias terapêuticas (flebotomia), um procedimento seguro e eficaz que, por meio da retirada de sangue, remove em torno de 200 – 250 mg de ferro a fim de diminuir os valores de ferritina sérica até a normalidade ( $\leq 20 - 50 \mu\text{g/L}$ ) e saturação da transferrina a ( $\leq 30\%$ ). A frequência das sangrias depende da tolerância e do quadro do paciente, que se normalizado, pode ser realizada também como forma de prevenção da sobrecarga de ferro (Andrews, 1999; Pietrangelo, 2010).

Já na sobrecarga de ferro secundária, a maioria é oriunda de hemoglobinopatias que dependem de recorrentes transfusões de sangue. É o caso de pacientes com anemia sideroblástica, síndromes mielodisplásicas, esferocitose hereditária e principalmente talassemias e anemia falciforme, doenças cuja eritropoiese é ineficiente. Estando entre as doenças monogênicas mais comuns no mundo, as hemoglobinopatias são provenientes de mutações genéticas que podem alterar a estrutura da hemoglobina ou sua síntese. A anemia falciforme é uma hemoglobinopatia importante clinicamente devido à sua alta prevalência. Nesse caso, os eritrócitos rígidos, em formato de foice, acumulam-se nos vasos e provocam hipóxia, além de causar hemólise crônica. Já as talassemias decorrem da diminuição ou ausência da síntese de uma ou mais cadeias de globina. Esse desequilíbrio entre as cadeias leva à precipitação e causa hemólise. As talassemias são classificadas de acordo com a cadeia de globina prejudicada, sendo as mais frequentes os tipos  $\alpha$  e  $\beta$  (Gattermann, 2009; Sonati, De e Costa, 2008).

Aos pacientes com casos moderados a graves, que sofrem com a destruição precoce dos eritrócitos, são recomendadas transfusões de sangue para fornecer eritrócitos saudáveis. No caso da  $\beta$ -talassemia maior, transfusões periódicas acontecem ao longo da vida toda. Os pacientes acabam desenvolvendo sobrecarga de ferro pela própria fisiopatologia da doença, que eleva a absorção de ferro intestinal e piora essa condição pelas repetidas transfusões. Com o tratamento, a sobrecarga se torna inevitável, já que em

uma unidade de concentrado de hemácia encontram-se 200 a 250 mg de ferro, enquanto a eliminação diária é de 1 a 2 mg. Se o paciente recebe duas unidades desse concentrado por mês, serão 4,8 a 6 g de ferro por ano, superando o teor de ferro corporal (Cançado, 2007; Coates e Wood, 2017; Souto, 2006; Taher e Saliba, 2017).

O organismo vê em pouco tempo sua capacidade ferroquelante (de armazená-lo em formas quimicamente seguras) superada. O ferro acaba por sair dos macrófagos para a circulação e, uma vez superada a capacidade de saturação da transferrina, surgem os reservatórios de ferro lábil, que são deposições de espécies pouco definidas de ferro com elevada reatividade, em sítios biológicos não preparados para acondicioná-lo (Cançado, 2007) (Cabantchik *et al.*, 2013).

Os reservatórios de ferro lábil podem ser plasmáticos ou citossólicos, sendo os reservatórios plasmáticos conhecidos por NTBI (*Non-Transferrin-Bound Iron*; Ferro Não-Ligado à Transferrina). A composição química não é inteiramente conhecida (Shvartsman *et al.*, 2007), porém envolvem espécies monoméricas ou oligoméricas de ferro com albumina, citrato, aminoácidos ou outros ligantes séricos (Breuer, Hershko e Cabantchik, 2000; Evans *et al.*, 2008). Dentre todas as espécies de ferro que compõem o NTBI, existe uma parcela que é redox-ativa, denominada LPI (*Labile Plasma Iron*; Ferro Lábil Plasmático), e é essa parcela que deve ser o alvo de qualquer tipo de terapia de remoção do excesso do metal. O LPI surge em quadros de siderose quando a saturação da transferrina atinge por volta de 85% (Cabantchik *et al.*, 2005; Esposito *et al.*, 2003; Rachmilewitz *et al.*, 2005). Já são conhecidas correlações entre índices elevados de LPI e diferentes quadros clínicos como danos neurológicos provocados por isquemia (Carbonell e Rama, 2007), disfunção endotelial em crianças talassêmicas (Kukongviriyapan *et al.*, 2008), defeitos cognitivos em pacientes com doença de Alzheimer (Lavados *et al.*, 2008) e complicações da síndrome mielodisplástica (Mahesh, Ginzburg e Verma, 2008); além de morbidade aumentada em pacientes transfundidos (Ozment e Turi, 2009) ou diabéticos (Sulieman *et al.*, 2004).

O ferro lábil plasmático adentra as células através de transportadores de cátions bivalentes que não são específicos para ferro, pois também transportam cálcio e zinco, não sendo regulados pelo nível de ferro celular. O influxo de ferro continua à medida que a concentração citossólica aumenta, criando reservatórios de ferro lábil celular (LIP, *Labile Iron Pool*). O excedente desse metal causa estresse oxidativo nas células do coração, pâncreas, fígado e de glândulas endócrinas, locais onde transportadores de cátions bivalentes são mais abundantes (Coates e Wood, 2017; Ozment e Turi, 2009).

O dano oxidativo causado por essas espécies de ferro lábil é irreversível e pode provocar disfunções, apoptoses e necroses que afetam o funcionamento normal de órgãos vitais como coração, fígado e pâncreas. A siderose no coração pode causar arritmia e insuficiência cardíaca, no fígado, pode elevar o risco de desenvolvimento de carcinoma hepático e cirrose. Já no pâncreas pode acarretar surgimento de diabetes tipo 2 (Labranche et al., 2018; Taher e Saliba, 2017).

Apesar do panorama sombrio, destaca-se a importância do diagnóstico precoce da sobrecarga e, sobretudo, o emprego da terapia de quelação adequada a fim de prevenir danos teciduais e disfunções orgânicas graves. A utilização da ferroquelação também se mostra útil para reverter ou impedir disfunções já em andamento, evitando sua progressão e consequente piora (Cançado, 2007).

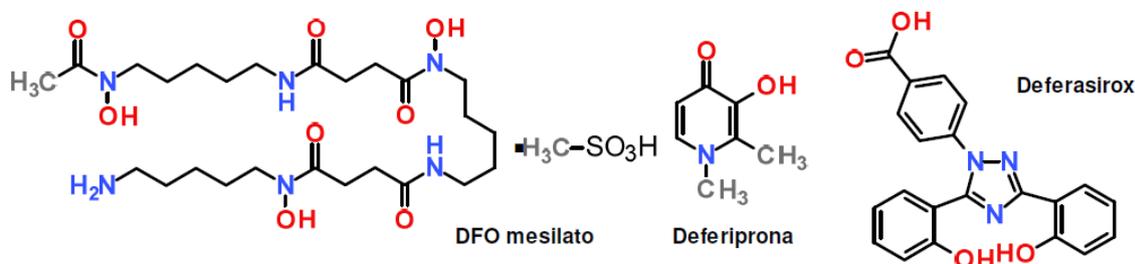
### **1.3 Terapia de Quelação**

Os quelantes, do grego antigo *χηλή* (*khili*; garra ou casco), são moléculas multidentadas com múltiplos sítios de ligação. Possuem elétrons disponíveis que ao se ligarem a íons metálicos carregados positivamente, desviam a constante de equilíbrio a favor da ligação do metal devido a um ganho entrópico no sistema (Efeito Quelato), formando complexos. Um quelante ideal deve ser atóxico, hidrossolúvel e ter uma alta afinidade e especificidade ao metal-alvo. Além disso, espera-se que seu complexo tenha uma eliminação rápida (Golan, 2014). A terapia com quelantes possui alguns objetivos: a) diminuir as concentrações teciduais de ferro a fim de manter um nível adequado, evitando seu acúmulo e consequente toxicidade; b) desintoxicação do ferro; e c) larga faixa terapêutica (Kushner, Porter e Olivieri, 2001).

O objetivo da terapia está relacionado com a capacidade dos quelantes acessarem os reservatórios de ferro livre citossólicos e manterem um balanço negativo de ferro, ou seja, que a quantidade de excretada por meio da quelação seja maior que a transfundida. Através da terapia, é possível atingir concentrações de ferro toleráveis e evitar os efeitos nocivos do NTBI, mesmo que apenas uma pequena parcela seja acessível aos quelantes, já que a maior está em sítios de armazenamento ou ligadas a outras moléculas de transporte (Angelucci *et al.*, 2000; Gattermann, 2009; Kushner, Porter e Olivieri, 2001).

O tratamento é feito pela administração de um quelante por via intravenosa com desferroxamina (DFO), ou via oral com deferiprona (DFP) e/ou deferasirox (DFX) (Figura 3), únicos três quelantes aprovados para uso clínico. As células são permeáveis aos

quelantes deferiprona e deferasirox, mas muito pouco à desferrioxamina, portanto esses medicamentos podem ser usados para a diminuição dos reservatórios de ferro lábil citossólicos (Mair e Weiss, 2009). Muitas vezes, o tratamento envolve uma combinação de quelantes, com os citossólicos removendo o metal para o meio extracelular, que será depois transferido para a desferrioxamina (estratégia de *shuttling*) (Cabantchik *et al.*, 2005).



**Figura 3:** Únicos quelantes de ferro aprovados no mundo para uso clínico.

A desferrioxamina é de origem natural, proveniente da bactéria *Streptomyces pilosus* e introduzida na década de 1970. Segue sendo até hoje o tratamento padrão em pacientes com  $\beta$ -talassemia maior. Possui elevado peso molecular (657 g/mol) e é hexadentada, se ligando ao ferro nos seus seis sítios de coordenação, com uma razão 1:1 (ligante:metal). É uma molécula hidrofílica ( $\log P = -2,2$ ), com curta meia vida circulatória (20 a 30 minutos), e deve, portanto, ser administrada continuamente através de aparelho infusor. Já a deferiprona, desenvolvida nos anos 90, possui peso molecular de 139 g/mol e é bidentada, formando um complexo na proporção de 3:1 (ligante:metal). É bem absorvida no trato gastrointestinal e sua meia vida é de 45 minutos a 2h, sendo necessária a administração de 3 comprimidos diários, podendo sofrer ajuste de acordo com a condição do paciente. O último quelante, deferasirox surgiu no início dos anos 2000. Seu peso molecular é 373 g/mol, é uma molécula tridentada, e forma complexo na razão de 2:1 (ligante:metal). Tem caráter lipofílico ( $\log P = 3,52$ ) e por isso pouco solúvel em água, sendo administrado como suspensão oral (Cançado, 2007; Gattermann, 2009; Hershko, 2010; Kushner, Porter e Olivieri, 2001; Meerpohl *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2012).

No entanto, o uso desses quelantes apresenta alguns problemas. Inicialmente, deve-se notar que a desferrioxamina não é absorvida via oral, dada sua elevada hidrossolubilidade. Também seu tempo de depuração renal é muito rápido, o que significa que tem que ser aplicada por infusão intravenosa durante horas, normalmente de 8h a 12h, muitas vezes por vários dias da semana, o que prejudica a adesão terapêutica e aumenta a possibilidade de infecção local, diminuindo a qualidade de vida do paciente. Já o

deferasirox, o próprio paciente deve preparar a suspensão oral, o que sujeita a erros de manipulação. Além disso, os três quelantes apresentam efeitos colaterais importantes, que muitas vezes limitam seu uso. A desferrioxamina pode causar danos na visão e audição, reações alérgicas, defeitos ósseos e, em doses elevadas, danos neurológicos e pulmonares. No caso da deferiprona, se observaram distúrbios gastrintestinais, urina descolorida, dores musculares e em articulações, hepatotoxicidade e neutropenia/agranulocitose. Já deferasirox pode causar distúrbios gastrintestinais, erupção cutânea, falência hepática e renal (Anderson *et al.*, 2002; Blanusa *et al.*, 2005; Kushner, Porter e Olivieri, 2001; Kwiatkowski, 2011). Além disso, foi relatada uma preocupação de que os testes clínicos do deferasirox não foram executados cuidadosamente, o que poderia estar na raiz de alguns óbitos associados a pacientes que também fizeram uso desse medicamento (Kontoghiorghes, GJ, 2013; Kontoghiorghes, George J, 2013). A intolerância à terapia de quelação é um fator que contribui para a morte de pacientes com siderose, principalmente aqueles com talassemia maior (Fabron Jr e Tricta, 2003)

Esse cenário preocupante evidencia a importância da busca por novas moléculas que tenham afinidade por ferro, alta tolerabilidade, que formem complexos solúveis, estáveis e redox-inativos. Tendo em vista essas características, buscam-se moléculas que possam servir como alternativa no tratamento da quelação de ferro, terapia tão importante para a sobrevivência de pacientes que dependem das transfusões sanguíneas.

#### **1.4 Reposicionamento e Antirreabsortivos**

A busca por novos quelantes para a terapia de remoção e/ou redistribuição de ferro pode se beneficiar da reposição de fármacos, uma estratégia que visa identificar novas aplicações de fármacos que já foram aprovados em testes clínicos para uma outra indicação. Embora tenha exemplos históricos, é um conceito relativamente novo, que pode ter surgido em 2004 com artigo de Ashburn e Thor, que o definiram como “processo de encontrar novos usos fora do escopo da indicação médica original”. O termo passou por atualizações com o passar dos anos, porém, se exclui qualquer possibilidade de modificação estrutural da molécula, apenas visa-se estudar novas aplicações para o fármaco já aprovado. Desde então, o número de trabalhos publicados com os termos “drug repositioning” e “drug repurposing” cresceu exponencialmente a partir de 2010, tendo um auge nos últimos dois anos e meio (2020 – 2023) quando mais de 12 mil artigos foram publicados apenas neste intervalo, sendo um terço relacionado com a covid-19 (com base em pesquisa do PubMed em julho de 2023). (Ashburn e Thor, 2004; Jourdan *et al.*, 2020) .

Introduzir no mercado um fármaco previamente aprovado possibilita simplificar os procedimentos regulatórios, levando em consideração os dados adquiridos previamente, como de perfil farmacológico, segurança e toxicidade do medicamento. Isso torna as fases iniciais de desenvolvimento de um fármaco reposicionado consideravelmente mais rápidas, portanto, mais baratas (em mais de 80%) e aumenta as chances de introduzi-lo no mercado (em 150% em comparação a um novo fármaco). Entretanto, algo que deve ser ressaltado é que os efeitos colaterais devem ser menos aceitáveis quando reposicionados para uma doença menos grave do que sua indicação original. Apesar de se conhecer dose, forma farmacêutica, farmacocinética, farmacodinâmica e toxicidade, qualquer alteração na formulação, dosagem ou via de administração exige reexame do perfil de segurança do novo medicamento (Jourdan *et al.*, 2020).

Na literatura científica não faltam exemplos de fármacos reposicionados, alguns deles com muito sucesso e reconhecimento. Cinco exemplos são: 1) aspirina, usado como analgésico, é utilizado em doses baixas como antiagregante plaquetário para evitar eventos cardiovasculares, e, recentemente, empregado também para prevenir câncer colorretal; 2) minoxidil, um anti-hipertensivo, usado amplamente para perda capilar; 3) sildenafil, originalmente indicado para tratamento de hipertensão e angina, é utilizado para disfunção erétil; 4) zidovudina, um antitumoral, que em 1987 foi aprovado para ser utilizado como antirretroviral, sendo um dos primeiros fármacos para tratamento do HIV; e 5) raloxifeno, usado para tratamento e prevenção da osteoporose, e hoje é empregado também para reduzir o risco de câncer de mama (Jourdan *et al.*, 2020; Parvathaneni *et al.*, 2019; Pushpakom *et al.*, 2018).

A estratégia de reposicionamento de fármacos consiste em três etapas antes de levar o fármaco adiante: 1) identificação do fármaco correto para uma determinada indicação de interesse (geração de hipótese); 2) avaliação do mecanismo do efeito do fármaco em modelos pré-clínicos e 3) avaliação da eficácia em ensaios clínicos de fase II. A primeira etapa é crítica, pois nela podem ser utilizadas abordagens sistêmicas (computacional ou/e experimental) para geração de hipóteses (Pushpakom *et al.*, 2018).

Com base nessa estratégia, buscaram-se fármacos com átomos com caráter de bases duras (=O, -OH) que fossem capazes de doar pares de elétrons para a formação de ligações coordenadas com ferro. Esses átomos usualmente são encontrados em biomoléculas como carboidratos, aminoácidos, ácidos nucleicos e fosfatos (Kontoghiorghe e Kontoghiorghe, 2020). O pirofosfato é uma substância endógena conhecida por ser um regulador fisiológico da calcificação e inibidor natural da reabsorção óssea devido à sua alta

afinidade aos cristais da hidroxiapatita (Castro *et al.*, 2004; Drake, Clarke e Khosla, 2008). É um subproduto do metabolismo de adenosina trifosfato (ATP), sendo encontrado tanto no sangue quanto na urina, e sua estrutura composta por dois fosfatos ligados por um átomo de oxigênio (Diab, Watts e Miller, 2013; Drake, Clarke e Khosla, 2008). É um poderoso quelante com baixa toxicidade que possui diversas aplicações em cremes dentais e na indústria alimentícia (Levine, 2020), porém, devido às ligações P-O-P, sofre hidrólise enzimática e não pode ser utilizado para tratamento de doenças ósseas (Fernandes, Leite e Lanças, 2005). Quando ocorre substituição do átomo de oxigênio por um de carbono (P-C-P), cria-se seu análogo sintético, o bisfosfonato (Figura 4), resistente à degradação e poderoso influente no metabolismo ósseo (Fernandes, Leite e Lanças, 2005).



**Figura 4:** Estrutura do ácido pirofosfórico (esquerda) e bisfosfônico (direita). Fonte: Adaptado de Widler et al., 2002.

Propostos na década de 60, os bisfosfonatos são a classe de agentes antirreabsortivos mais utilizada mundialmente, sendo primeira escolha para tratamento de doenças ósseas como osteoporose, doença de Paget, hipercalcemia maligna e doença metastática osteolítica. Essa classe apresenta benefícios de longo prazo no tratamento e prevenção da osteoporose, pois promove inibição da reabsorção óssea através da semelhança estrutural com pirofosfato (Castro *et al.*, 2004; Fernandes, Leite e Lanças, 2005). Possuem uma estrutura comum, sendo as cadeias laterais R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> (Figura 4) responsáveis por alterar sua afinidade e aderência à hidroxiapatita, melhorar perfil terapêutico (potência, seletividade, toxicidade) e adquirir novas atividades farmacológicas e alterar a biodisponibilidade da molécula (Castro *et al.*, 2004; Diab, Watts e Miller, 2013).

O sistema P-C-P possui baixa toxicidade, alta termoestabilidade e resistência à degradação enzimática. Propriedades que, somadas à poderosa capacidade de se ligar a íons metálicos, possibilitou o emprego dessas moléculas como quelantes para cálcio nas

diversas doenças ósseas citadas. Os fosfonatos possuem três propriedades principais: são agentes quelantes efetivos de íons metálicos bi e trivalentes; inibem crescimento de cristais; e são bastante estáveis sob condições químicas adversas (Masoud *et al.*, 2022). No setor industrial, os fosfonatos (moléculas que contém um ou mais grupos  $R-PO(OH)_2$ , com boa estabilidade química e solubilidade em água) são usados em produção de óleo, formulação de detergentes, inibição de corrosão e formação de incrustações. Além disso, tem capacidade de formar fortes complexos com metais e desempenham um papel importante no destino e transporte desses metais no ambiente (Barja, Herszage e Santos Afonso, dos, 2001).

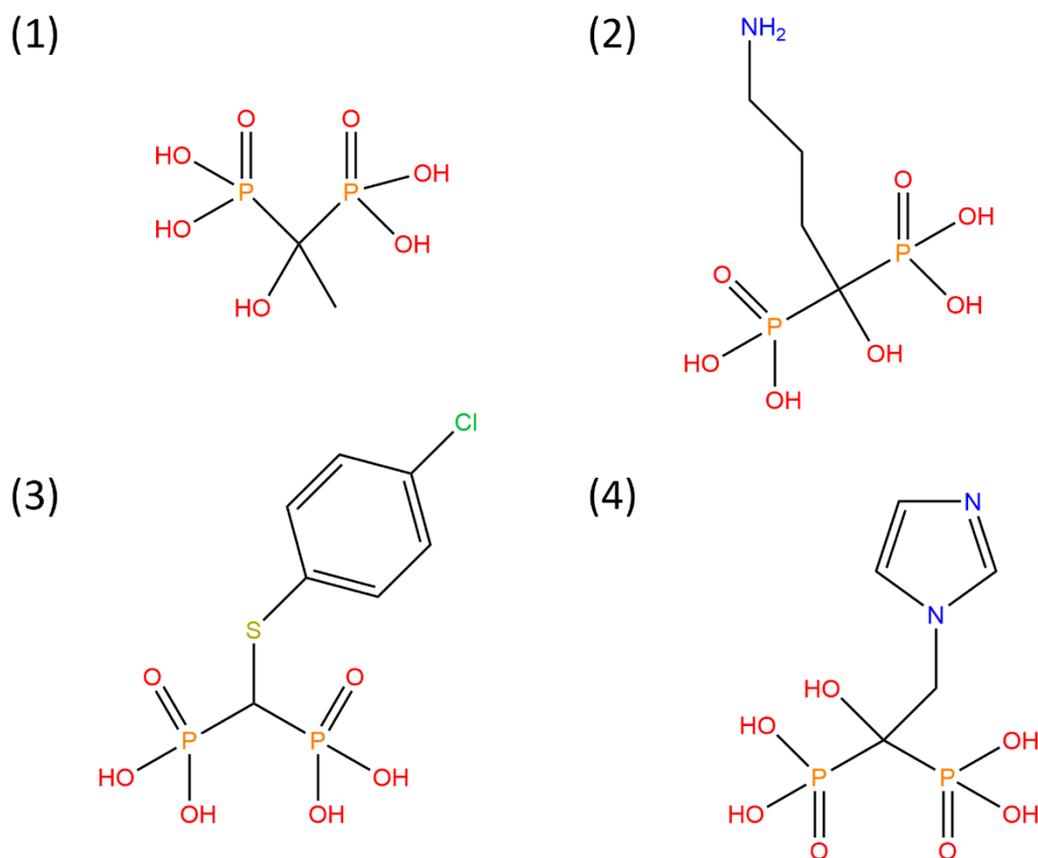
Um estudo realizado com análogos de bisfosfonatos demonstrou alta eficiência na ligação a cátions metálicos como alumínio e ferro em pH 7,4, tendo  $pFe(III)$  ( $pFe = -\log [Fe^{3+}]_{livre}$ ) 19.76 e 20.50, respectivamente. No que se refere ao  $Fe(III)$ , essa afinidade é inferior à da desferroxamina ( $pFe(III)$  26.60), porém superior à da deferiprona ( $pFe(III)$  18.31) (Gumienna-Kontecka *et al.*, 2002).

Os bisfosfonatos têm uma alta afinidade pelos ossos e são pouco absorvidos por via oral, devido à sua elevada carga negativa. Reduzem fraturas vertebrais, não-vertebrais e de quadril, sendo considerados excepcionalmente seguros (Diab, Watts e Miller, 2013). Alguns estudos demonstraram outros benefícios como diminuição do risco de acidente vascular cerebral (Kang, Keller e Lin, 2012), e diminuição do câncer de mama (Gnant, 2010; Ou *et al.*, 2017) e colorretal (Rennert *et al.*, 2011). Entretanto, seu potencial como quelante na terapia de quelação de sobrecarga de ferro (plasmática ou citossólica) nunca foi verificado.

Uma das doenças envolvidas com a sobrecarga de ferro, a talassemia maior, é uma causa comum de morbidade esquelética, sendo o risco de fraturas elevado para pacientes talassêmicos devido ao aumento da renovação óssea com excessiva reabsorção óssea e remodelação. A etiologia é multifatorial, sendo os fatores como deficiência hormonal, expansão da medula óssea, aumento das reservas de ferro, toxicidade da desferroxamina e deficiência de cálcio e vitamina D contribuírem para o desenvolvimento da osteoporose. O avanço das transfusões sanguíneas e da terapia de quelação contribuíram significativamente para a sobrevivência de pacientes talassêmicos, entretanto, a osteoporose representa uma importante causa de morbidade em adultos, sendo os bisfosfonatos uma classe de escolha para o tratamento (Morabito *et al.*, 2002).

Baseando-se em propriedades como indicação terapêutica, forma farmacêutica e  $\log P$ , foram selecionados os fármacos etidronato, tiludronato, alendronato e zoledronato

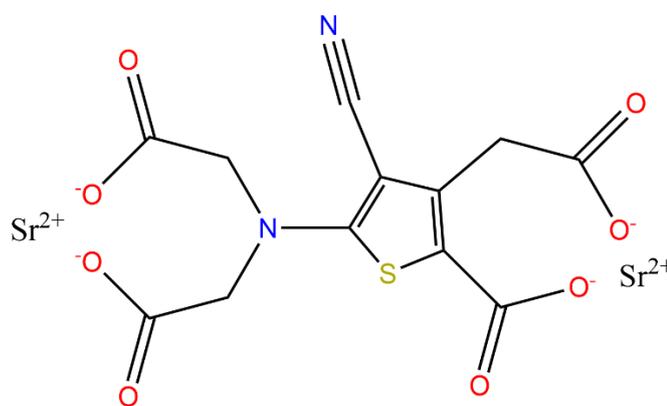
(Figura 5) para reposicionamento. Etidronato (logP -2,3) (Wishart *et al.*, 2018) e tiludronato (logP 1,3) (Wishart *et al.*, 2018) são componentes da primeira geração dos bisfosfonatos, usados para tratamento da Doença de Paget e ativos por via oral (Roux *et al.*, 1995). Além disso, apresentam extremos de lipofilicidade, o que é interessante para acessar diferentes reservatórios de ferro lábil. Alendronato (logP 4,2) (Wishart *et al.*, 2018) é o fármaco mais utilizado da classe, sendo da segunda geração, majoritariamente indicado para tratamento da osteoporose, e administrado por via oral (Black e Rosen, 2016). Já zoledronato (logP -3,9) (Wishart *et al.*, 2018) é da terceira geração, é o bisfosfonato mais potente conhecido, sendo indicado para prevenção e tratamento da osteoporose e utilizado por via intravenosa (Black e Rosen, 2016; Castro *et al.*, 2004).



**Figura 5:** Estruturas dos bisfosfonatos selecionados para estudo: (1) Ácido etidrônico; (2) Ácido alendrônico; (3) Ácido tiludrônico e (4) Ácido zolendrônico. Elaborado com ChemDraw.

O uso de complexos metálicos pode facilitar a entrada dos fármacos (ligantes) na célula, pois se é verdade que os antirreabsortivos são em princípio pouco permeáveis a membranas fisiológicas, por conta de sua elevada carga (-3), a coordenação a íons como p. ex. Fe(III) neutraliza essas cargas e torna o sistema todo mais lipofílico.

Outro fármaco selecionado para este projeto foi ranelato de estrôncio (Figura 6), que apesar de não ser da classe dos bisfosfonatos, é um agente antirreabsortivo indicado para tratamento da osteoporose grave, que, diferentemente dos bisfosfonatos, aumenta a formação óssea ao passo que também inibe a reabsorção. Estruturalmente, é composto de dois átomos de estrôncio e uma molécula de ácido ranélico. No trato gastrointestinal sofre dissociação: enquanto os íons estrôncio(II) são captados devido à sua semelhança ao cálcio(II) (sendo, portanto, o agente terapêutico), o ácido ranélico não possui atividade farmacológica evidente, sendo efetivamente um transportador de Sr(II) (Barbu *et al.*, 2015). Entretanto, devido à presença de diversos átomos doadores de caráter de base dura, o ácido ranélico torna-se um interessante candidato para ser quelante de ferro.



**Figura 6:** Estrutura do ranelato de estrôncio. Elaborado com ChemDraw.

# 2

## Objetivos

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais e justificativa**

Ampliar o leque de oportunidades para o tratamento de sobrecarga de ferro através do reposicionamento de fármacos já aprovados, como os bisfosfonatos e ranelato de estrôncio.

Para o presente estudo, escolheram-se cinco fármacos da classe dos antirreabsortivos: etidronato, alendronato, tiludronato, zoledronato e ranelato de estrôncio para estudar sua quelação com ferro no meio extra e intracelular.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Obter e caracterizar os complexos entre antirreabsortivos e Fe(III)
- Estudar a afinidade relativa dos antirreabsortivos por ferro em modelos de sítios biológicos de alta afinidade (calceína, transferrina e hemina), na presença ou ausência de Ca(II).
- Estudar a atividade antioxidante (dependente de ferro) extracelular dos antirreabsortivos, na presença ou ausência de Ca(II).
- Estudar a permeabilidade celular dos antirreabsortivos e seus complexos em modelos de sobrecarga de ferro.
- Estudar a viabilidade celular após exposição aos antirreabsortivos

# 3

## **Materiais e Métodos**

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes

Para a execução desse trabalho, foram utilizadas as seguintes substâncias químicas:

Tabela 1. Materiais (reagentes, solventes e kits) utilizados

<b>Antirreabsortivos</b>	<b>Procedência</b>	<b>Pureza</b>
Ácido Etidrônico Monohidratado ( $C_2H_8O_7P_2 \cdot H_2O$ )	Aldrich	$\geq 95\%$
Ácido Zoledrônico ( $C_5H_{10}N_2O_7P_2 \cdot H_2O$ )	Sigma Aldrich	99%
Alendronato sódico ( $C_4H_{12}NaNO_7P_2 \cdot 3 H_2O$ )	Sigma Aldrich	99%
Ranelato de Estrôncio ( $C_{12}H_6N_2O_8SSr_2$ )	Sigma	$\geq 98\%$
Tiludronato dissódico ( $C_7H_7ClNa_2O_6P_2S \cdot 2H_2O$ )	Sigma	$\geq 96\%$
<b>Quelantes</b>	<b>Procedência</b>	<b>Pureza</b>
Deferiprona (DFP)	Apopharma	99,8%
Mesilato de desferrioxamina (DFO)	Cristália	99%
<b>Tampão HBS/Chelex</b>	<b>Procedência</b>	<b>Pureza</b>
Cloreto de sódio (NaCl)	Sigma Aldrich	99%
HEPES ( $C_8H_{18}N_2O_4S$ )	Sigma Aldrich	99%
Chelex-100 Sódico	Sigma Aldrich	-
<b>Cultivo Celular</b>	<b>Procedência</b>	<b>Pureza</b>
CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega	-
L – Glutamina 200 mM	Vitrocell	-
Meio Dubelcco MEM Alta Glicose	Vitrocell	-
Meio Dulbelcco MEM Alta Glicose sem fenol red	Vitrocell	-

Penicilina/Estreptomicina com Antimicótico	Vitrocell	-
Resazurina sódica (C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> NNaO <sub>4</sub> )	Sigma Aldrich	Analítico
Solução Tripsina EDTA 250mg	Vitrocell	-
Soro Fetal Bovino	Vitrocell	-
Trypan Blue	Sigma Aldrich	Analítico
<b>Sondas Fluorescentes</b>	<b>Procedência</b>	<b>Pureza</b>
5-DTAF (C <sub>23</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> . HCl)	Sigma Aldrich	≥ 90%
Calceína (C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>13</sub> )	Sigma Aldrich	Analítico
Calceína-AM (C <sub>46</sub> H <sub>46</sub> N <sub>2</sub> O <sub>23</sub> )	Invitrogen	Analítico
Dihidrorodamina (C <sub>21</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	Biotium	Analítico
<b>Solventes</b>	<b>Procedência</b>	<b>Pureza</b>
Dimetilsufóxido (DMSO)	Sigma Aldrich	99%
<b>Sais Inorgânicos</b>	<b>Procedência</b>	<b>Pureza</b>
Bicarbonato de Sódio (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma Aldrich	99%
Carbonato de Sódio (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Cromoline	99%
Cloreto de Cálcio (CaCl <sub>2</sub> )	Cromoline	99%
Cloreto férrico (FeCl <sub>3</sub> )	Cromoline	≥ 97%
Cloreto ferroso (FeCl <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich	99%
Nitrato de ferro(III) nonahidratado (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> · 9H <sub>2</sub> O)	Vetec	98%
Sulfato ferroso amoniacal (FeH <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub> S <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich	98%

Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich	99%
<b>Sais Orgânicos</b>	<b>Procedência</b>	<b>Pureza</b>
Nitilotriacetato de sódio (NTA)	Vetec	Analítico
<b>Ácidos e Bases</b>	<b>Procedência</b>	<b>Pureza</b>
Ácido Clorídrico (HCl)	Merck	99%
Ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA)	Sigma Aldrich	99%
Hidróxido de sódio (NaOH)	Synth	99%
<b>Reagentes Bioquímicos</b>	<b>Procedência</b>	<b>Pureza</b>
8-Hidroxiquinolina	Cromoline	98%
Apo-Transferrina humana	Sigma Aldrich	98%
Hemina Bovina	Merck	≥90%
L-lisina (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Sigma Aldrich	98%

### 3.2 Instrumentos

Leitor de microplacas SpectraMax M4 da Molecular Devices (EUA).

Leitor de microplacas BMG Fluostar Optima da BMG LabTech (Alemanha).

### 3.3 Síntese e caracterização dos complexos por UV-vis

Os antirreabsortivos (etidronato, alendronato, tiludronato, zoledronato e ranelato de estrôncio) foram adquiridos da Sigma Aldrich. Uma solução estoque em água foi feita para cada um dos fármacos, cuja concentração variou de 2 mM a 50 mM. Seguindo as concentrações utilizadas no artigo de Marinkovic (Kuljanin, Jankovicá, *et al.*, 2002), os complexos foram sintetizados com sulfato ferroso amoniacal (FeH<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>14</sub>S<sub>2</sub>); nitrato de ferro(III) (Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>); cloreto ferroso (FeCl<sub>2</sub>) e cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>), nas concentrações de quelante 1 mM e metal 200 µM, em água, a 25°C. E, após 1h, foram caracterizados através espectroscopia eletrônica UV-Visível, no leitor de microplaca SpectraMax M4.

### 3.4 Voltametria Cíclica

A fim de obter caracterização por outro método em solução, foram realizados ensaios de voltametria cíclica para observar a diferenciação de ligante e complexo de ferro. As pastilhas de PBS foram dissolvidas em 200 mL de água ultrapura tipo 1 (Nanopure Infinity, Barnstead) e o pH foi ajustado em, aproximadamente, 4,0 com HCl 1 M. As massas dos ligantes e do ferro (sulfato ferroso amoniacal (FAS)) foram pesadas e dissolvidas para produzir soluções de 1 mM de cada ligante, FAS e respectivos complexos.

Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Mauro Bertotti do IQ-USP, em um potentiostato 128 (Eco Chemie, Utrecht, Netherlands) com a aquisição dos dados pelo Software Nova. Um sistema de três eletrodos foi usado, com um eletrodo de referência de Ag|AgCl (KCl sat) construído no laboratório (Pedrotti, Angnes e Gutz, 1996), uma barra de platina foi empregada como contra eletrodo, e como eletrodo de trabalho foi utilizado um eletrodo de carbono vítreo de 4 mm de diâmetro (Metrohm, Suíça).

### 3.5 Avaliação da capacidade quelante dos antirreabsortivos

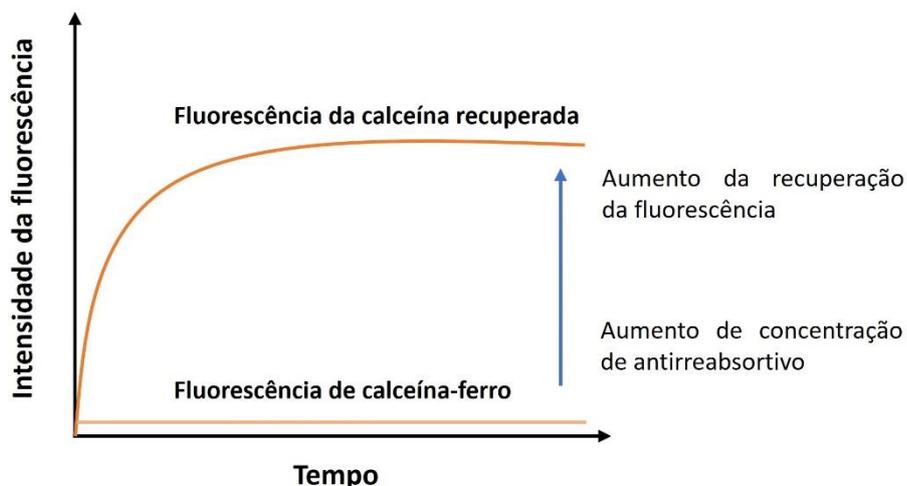
#### I) Estudos de competição com calceína

A calceína é uma sonda fluorescente estequiométrica para ferro(III), muito utilizada como modelo de biomoléculas de alta afinidade pelo metal. A capacidade quelante dos antirreabsortivos foi estudada a partir da recuperação de fluorescência da calceína, baseado no equilíbrio competitivo entre os ligantes e a calceína pelo metal (Baccan *et al.*, 2012; Espósito *et al.*, 2002). O experimento consistiu em aferir a recuperação da fluorescência do complexo calceína-ferro promovida pelos antirreabsortivos em diferentes concentrações. A recuperação da fluorescência indica que o fármaco testado possui afinidade superior pelo ferro em comparação à sonda fluorescente.

O ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços preta, onde foi adicionado 92  $\mu$ L do complexo calceína-ferro (concentração final 1  $\mu$ M) em tampão HBS/Chelex, e 8  $\mu$ L de antirreabsortivos (concentrações finais 0 - 32  $\mu$ M), e para o controle positivo, desferroxamina (DFO) de 0 - 2  $\mu$ M, todos em água. A leitura da fluorescência feita através do equipamento BMG Fluostar Optima;  $\lambda_{exc}/\lambda_{emis}$  = 485/520 nm a 37°C, em seis replicatas. A intensidade de fluorescência de cada poço foi medida em intervalos de trinta minutos (1800 s) durante 12 horas (Figura 7).

O experimento foi repetido da mesma maneira na presença de concentrações fisiológicas de cálcio (CaCl<sub>2</sub> ~2,5 mM) adicionadas no tampão HBS/Chelex, a fim de avaliar

a interferência desse metal na quelação do ferro dos antirreabsortivos. Escolheu-se trabalhar apenas com a maior concentração de ligante ( $32 \mu\text{M}$ ).



**Figura 7:** Diagrama do gráfico do experimento após adição dos antirreabsortivos.

## II) Estudos de competição com apo-Transferrina fluorescente

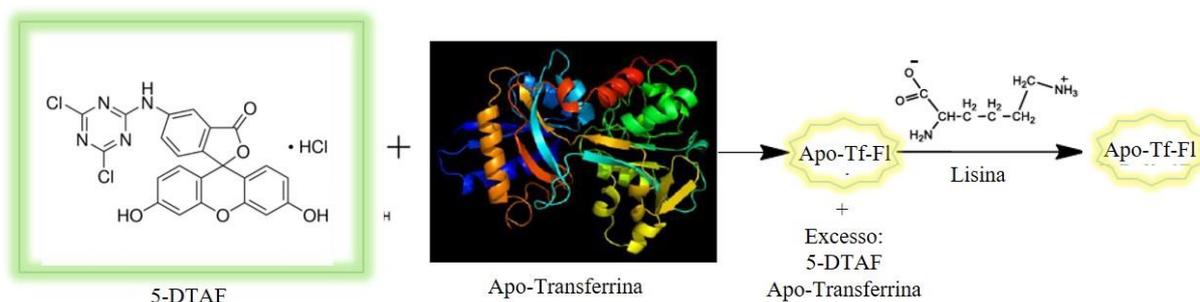
Para que os antirreabsortivos sejam utilizados para uma terapia de redistribuição de ferro, os complexos ferro-quelante podem transferir o metal para a proteína transferrina (Baccan *et al.*, 2012; Espósito *et al.*, 2002), ou até mesmo, em uma eventual saturação da transferrina, podem ser capazes de sequestrar o metal da proteína (Sohn *et al.*, 2008). A avaliação do complexo frente à transferrina foi feita através de dois ensaios. Utilizando uma apo-transferrina marcada com fluoresceína (apo-Tf-FI), avaliaram-se: 1) Capacidade de sequestro do ferro ligado à transferrina pelos antirreabsortivos (avaliada pela recuperação da fluorescência da Fe-Tf-FI pelos quelantes); e 2) Capacidade de transferência do ferro dos antirreabsortivos para a transferrina (avaliada pela supressão da fluorescência da apo-Tf-FI após adição dos complexos Fe-Q (ferro-quelante)).

### Síntese da apo-transferrina fluoresceína (apo-Tf-FI)

Em um microtubo, foram dissolvidos 16 mg de apo-transferrina em tampão  $\text{NaHCO}_3$  100 mM a pH 8,4 (0,084 g de  $\text{NaHCO}_3$  em 10 mL de água deionizada), e, após isso, adicionaram-se 20  $\mu\text{L}$  de 5-DTAF (5-(4,6-diclorotriazinil)aminofluoresceína) 10 mM (0,005 g de 5-DTAF em 1 mL de DMSO). A mistura foi incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 30 minutos, com agitação suave e ausência de luz. Por fim, adicionaram-se 20  $\mu\text{L}$  de lisina 0,5 M para

finalização da reação (0,073 g de L-lisina em 0,5 mL de tampão NaHCO<sub>3</sub> 100 mM a pH 8,4)(Breuer e Cabantchik, 2001) (Figura 8).

A solução foi transferida para microfiltros (cut-off de 10 kDa) em centrifuga nas seguintes condições: 18407 rcf, 4°C, 1 h. Após o término de um ciclo, foram feitas quatro lavagens, nas quais se ressuspendeu o retentato com 400 µL de NaHCO<sub>3</sub> e voltou a centrifugar nas condições: 18407 rcf, 4°C, 30 minutos. Ao final, se suspendeu o retentato com tampão HBS/Chelex e todos filtrados obtidos foram acondicionados em um único eppendorf, armazenado em freezer a temperatura de -20°C.



**Figura 8:** Reação para obter o conjugado apo-transferrina fluoresceína.

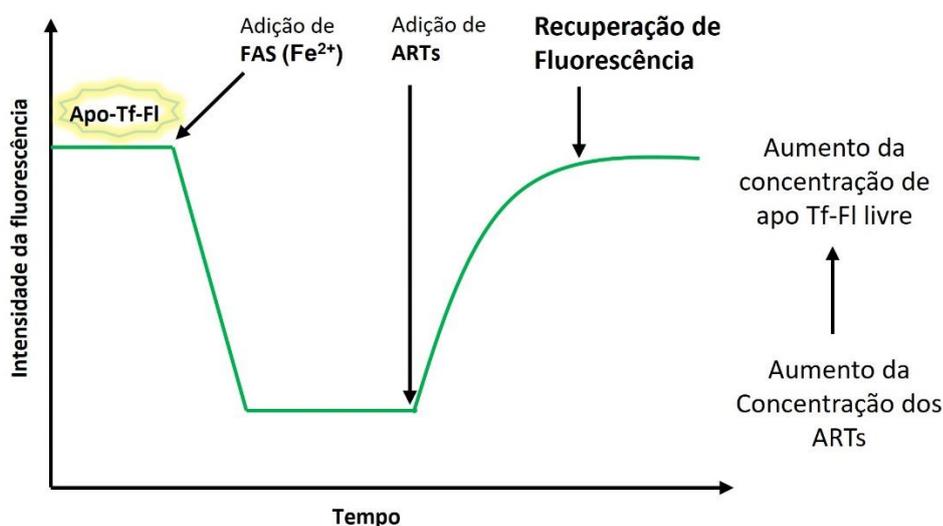
A determinação da porcentagem de apo-transferrina marcada com fluoresceína foi realizada por absorvância a 496 nm, usando padrões de 5-DTAF, em concentrações de 0 a 200 µM.

### Sequestro do ferro ligado à transferrina pelos antirreabsortivos

Preparou-se uma solução de apo-Tf-FI 1 µM em tampão HBS/Chelex com adição de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mM (solução de pH 7), e transferiu-se 80 µL dessa solução para poços de uma microplaca preta de 96 poços. Leu-se sua fluorescência, e, após 50 minutos, adicionaram-se 10 µL de sulfato ferroso amoniacal (FAS) 18 µM (concentração final 2 µM) e retomou-se a leitura. Após estabilização (~50 minutos), acrescentaram-se 10 µL das soluções dos antirreabsortivos e do controle positivo, deferiprona (DFP), com concentrações iniciais 0 - 400 µM, em água, e retomou-se a leitura (Figura 9). A concentração final dos antirreabsortivos e DFP foi de 0 a 40 µM. A leitura de fluorescência ocorreu através do aparelho BMG Fluostar Optima com  $\lambda_{exc}/\lambda_{emis} = 485/520$  nm a 37°C, por 4h, com ciclo de 300s, com seis replicatas.

Em paralelo, o efeito da concentração dos íons Ca(II) foi avaliado apenas com a maior concentração dos ligantes (40 µM). O tampão HBS/Chelex foi suplementado com CaCl<sub>2</sub> 2,5

mM, utilizado para preparo da solução da apo-Tf-FI. O restante do ensaio seguiu da mesma maneira.



**Figura 9:** Diagrama do experimento da recuperação da fluorescência de transferrina após adição dos antirreabsortivos visando sequestro do ferro presente

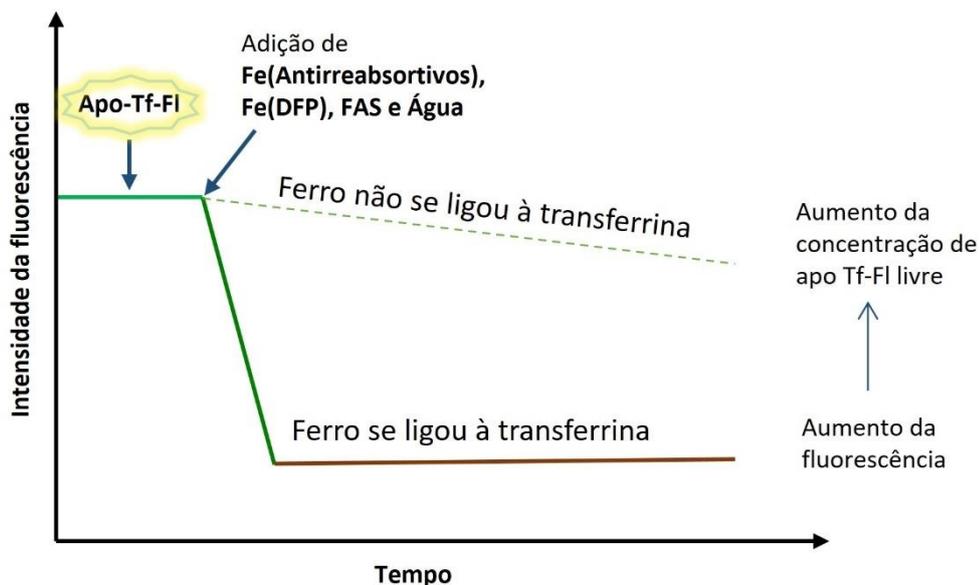
### **Transferência do ferro dos antirreabsortivos para a transferrina**

Para preparo dos complexos, foi adicionado 40  $\mu\text{L}$  de antirreabsortivos 100  $\mu\text{M}$  a 60  $\mu\text{L}$  de FAS 67  $\mu\text{M}$ . Como controle positivo, utilizou-se DFP. O preparo do seu complexo consistiu em adicionar 40  $\mu\text{L}$  de deferiprona 300  $\mu\text{M}$  a 60  $\mu\text{L}$  de FAS 67  $\mu\text{M}$ . Já como controle negativo utilizou-se FAS 40 $\mu\text{M}$ .

Preparou-se uma solução de apo-Tf-FI 1  $\mu\text{M}$  em tampão HBS/Chelex com adição de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 mM (solução com pH 7), e transferiu-se 95  $\mu\text{L}$  dessa solução para poços de microplaca preta de 96 poços. Leu-se sua fluorescência, e, após 50 minutos, adicionaram-se 5  $\mu\text{L}$  dos complexos de antirreabsortivos-ferro 40  $\mu\text{M}$  (concentração final 2  $\mu\text{M}$ ) e dos controles positivos e negativos, na mesma concentração, em água. Para o branco, foi estabelecido a adição 5  $\mu\text{L}$  de água

Após isso, retomou-se a leitura até o final (Figura 10). A leitura de fluorescência ocorreu através do aparelho BMG Fluostar Optima com  $\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{emis}} = 485/520$  nm a 37°C, por 2,75h, com ciclo de 15 minutos (900s), em seis replicatas.

O efeito da concentração dos íons  $\text{Ca}(\text{II})$  foi avaliado a partir da suplementação de  $\text{CaCl}_2$  2,5 mM no tampão HBS/Chelex onde foi preparada a solução de apo-Tf-FI. O restante do ensaio seguiu da mesma maneira.



**Figura 10:** Diagrama do experimento após adição dos complexos com ferro.

### III) Estudos de competição com hemina

Semelhantemente ao descrito para o complexo com calceína férrica, soluções dos antirreabsortivos foram adicionadas diretamente sob as de hemina, e o efeito sobre a formação dos derivados de ferro foi avaliado através de espectrofotometria UV-Visível.

Foi feita uma solução concentrada de hemina (1,5 mM) em DMSO e, após isso, diluída para 150  $\mu\text{M}$  no mesmo solvente. Foi armazenada em local escuro em vidraria. No dia seguinte, em uma microplaca de quartzo, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de hemina 150  $\mu\text{M}$  (em DMSO) e 100  $\mu\text{L}$  dos antirreabsortivos 150  $\mu\text{M}$  em água. A concentração final de ambos os compostos foi 75  $\mu\text{M}$ . Tiraram-se espectros após 1h e 24h, a 25°C. Para garantir que as soluções não perdessem volume, a microplaca foi envolvida por *parafilm* para a leitura das 24h.

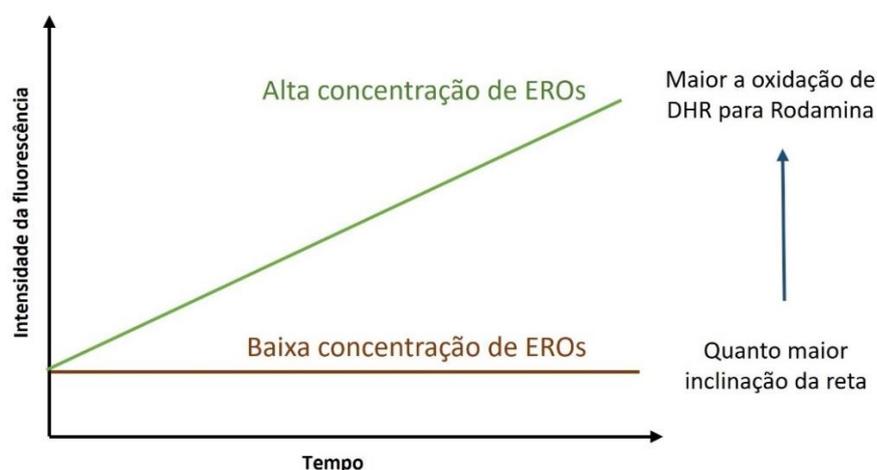
Os brancos utilizados foram: hemina + água; hemina + DMSO. Já o controle positivo foi hemina + DFO 150  $\mu\text{M}$ . O espectro foi obtido através do leitor de microplacas SpectraMax M4, fazendo uma varredura de comprimento de onda de 300 a 750 nm para monitorar possíveis modificações estruturais que poderiam ocorrer após adição dos antirreabsortivos sobre a banda de maior absorção (400 nm), chamada de Soret, e outras bandas em 500 nm e 620 nm, características da hemina (Orjih, Mathew e Cherian, 2012).

### 3.6 Estudos de atividade antioxidante dependente de ferro

As espécies reativas de oxigênio (EROs) podem ser geradas em meio fisiológico pela interação de ferro e ascorbato. Devido a isso, testou-se a capacidade dos quelantes de inibirem a oxidação do ascorbato mediada por Fe(III) a fim de avaliar o potencial de uma molécula em uma terapia de quelação de sobrecarga de ferro (Esposito *et al.*, 2003). Neste ensaio, utilizou-se a dihidrorodamina (DHR), um marcador fluorescente, que detecta a atividade oxidante causada por ferro. A reação entre Fe(III) e ascorbato origina EROs que convertem DHR (não fluorescente) em rodamina (fluorescente). A oxidação da sonda DHR pode ser impedida na presença de quelantes que bloqueiam os sítios de coordenação de Fe(III), ou que diminuam muito seu potencial de redução.

Para esse ensaio, preparou-se uma solução do meio fluorogênico a partir dos estoques congelados (100 mM DHR em DMSO; 8 mM de ácido ascórbico em água) em tampão HBS/Chelex (pH 7,4). Em uma microplaca preta de 96 poços, adicionaram-se 180  $\mu$ L do meio fluorogênico (50  $\mu$ M DHR; 40  $\mu$ M ácido ascórbico), 10  $\mu$ L de nitrilotriacetato férrico Fe(NTA) 200  $\mu$ M (concentração final 10 $\mu$ M) e 10  $\mu$ L dos antirreabsortivos 0 – 800  $\mu$ M. As concentrações finais dos antirreabsortivos foram de 0 - 40 $\mu$ M, mesma faixa de concentração testada para o controle positivo, DFO, e todas as soluções foram preparadas em água. A leitura da fluorescência foi feita através do equipamento BMG Fluostar Optima;  $\lambda_{exc}/\lambda_{emis}$  = 485/515 nm a 37°C, em seis replicatas. A intensidade de fluorescência de cada poço foi medida em intervalos de um minuto durante uma hora, e a inclinação da curva cinética indica o perfil de oxidação: quanto mais inclinada, maior a velocidade de oxidação da sonda e, conseqüentemente, mais fluorescente (Figura 11).

Em paralelo, o efeito da concentração dos íons Ca(II) foi avaliado a partir da suplementação de CaCl<sub>2</sub> 2,5 mM no tampão HBS/Chelex utilizado para preparo do coquetel fluorogênico.



**Figura 11:** Diagrama do experimento indicando o surgimento de espécies reativas de oxigênio geradas pela presença de ferro livre.

### **3.7 Ensaios Celulares**

As células das linhagens HeLa (câncer de cérvix humano) e HepG2 (câncer de fígado humano) foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina/antimicótico, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, em uma incubadora. Quando atingido 80% da conformação da garrafa, as células eram repicadas com solução de tripsina-EDTA 0,25% por 5 minutos a 37°C. Após esse período, a suspensão de células era centrifugada, ressuspensa, e o número de células contado em câmara de Neubauer. Uma solução com número de células definido era preparada e adicionada em microplaca de 96 poços.

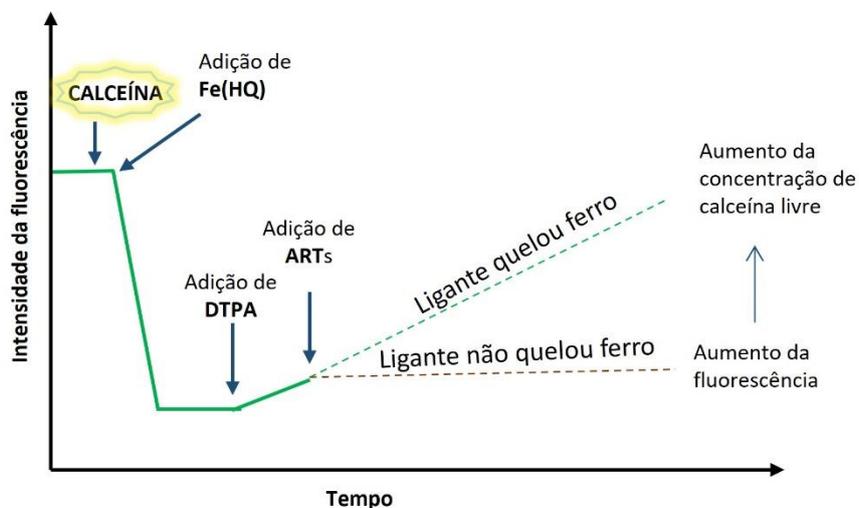
Os antirreabsortivos ou seus respectivos complexos foram adicionados sobre as células após seu tempo de aderência (1 dia), e a permeabilidade celular, a viabilidade após exposição a estresse oxidativo e a atividade antiproliferativa foram avaliados. O cultivo das células e seu tratamento foi realizado dentro do próprio laboratório.

#### **I) Estudos de competição intracelular com calceína**

##### **Sequestro de ferro intracelular pelos antirreabsortivos**

Esse experimento avaliou a capacidade dos antirreabsortivos de penetrar as células e complexar o ferro citossólico livre. As células HeLa e HepG2 foram repicadas e adicionadas em uma microplaca de 96 poços, respectivamente, ( $5 \times 10^4$  células/poço), e após aderidas na placa, foram incubadas com acetometoxi-calceína (CAL-AM; 0,5  $\mu$  M; 20 min), a forma esterificada e não-fluorescente da calceína. Após a incubação, iniciou-se a leitura de fluorescência até estabilização. No citosol, a CAL-AM é clivada por esterases e convertida à forma fluorescente, calceína (CAL). Entretanto, com excesso de ferro(III), ocorre a formação intracelular de complexo entre CAL e o metal, e não há fluorescência. Para suprimir a fluorescência da calceína, foi adicionado 2  $\mu$ L de Fe(HQ) (ferro-8-hidroxiquinolina 1:1) 125  $\mu$ M (concentração final 2,4  $\mu$ M), e esperou-se a estabilização. Após isso, foi adicionado 1  $\mu$ L de ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) 2,5 mM em tampão HBS para quelar o metal não internalizado (Epsztejn *et al.*, 1997), e retomou-se a leitura. Após estabilização, as células foram tratadas com 2  $\mu$ L dos antirreabsortivos nas concentrações de 2,5 mM e 5 mM. As concentrações finais foram de 50  $\mu$ M e 95  $\mu$ M. Foi utilizado o composto SIH (salicilaldeído isonicotinil hidrazona), 2,5 mM (concentração final 50  $\mu$ M), um quelante intracelular de ferro, como controle positivo e água como negativo.

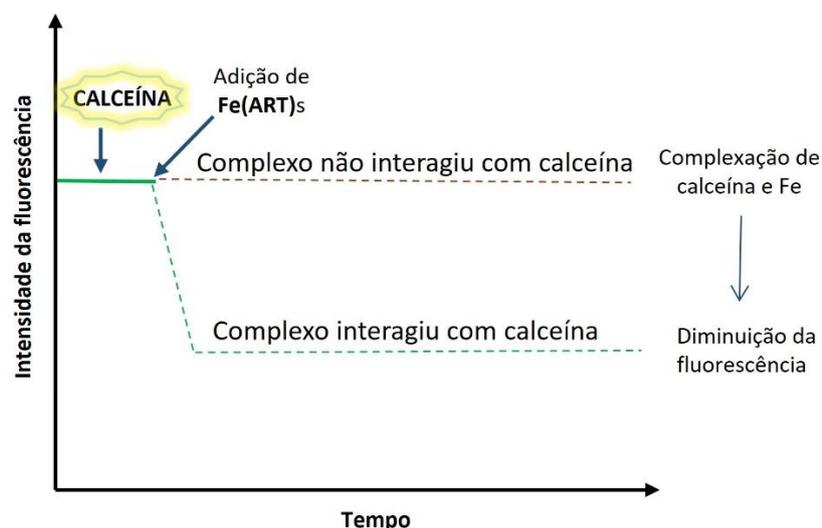
Caso os antirreabsortivos fossem permeáveis a célula, seria observado a recuperação da fluorescência de CAL por meio do sequestro do ferro (Figura 12).



**Figura 12:** Diagrama do experimento. Recuperação da fluorescência é observada caso quelante penetre na célula e sequestre o ferro da calceína.

### Transferência de ferro dos antirreabsortivos para calceína intracelular

Esse experimento avaliou a capacidade dos complexos antirreabsortivos-ferro de penetrar a célula e sua possível estabilidade intracelular. As células HeLa e HepG2 foram repicadas e adicionadas a uma microplaca de 96 poços ( $5 \times 10^4$  células/poço), e após aderidas na placa, foram incubadas com acetometoxi-calceína (CAL-AM;  $0,5 \mu\text{M}$ ; 20 min). Após incubação, iniciou-se a leitura de fluorescência até estabilização. Logo em seguida, adicionaram-se  $2 \mu\text{L}$  dos complexos nas concentrações de  $125 \mu\text{M}$  e  $250 \mu\text{M}$ . As concentrações finais foram  $2,5 \mu\text{M}$  e  $5 \mu\text{M}$ . Foi utilizado  $\text{Fe}(\text{HQ})$   $2,5 \mu\text{M}$  como controle positivo,  $\text{FeCl}_3$   $2,5 \mu\text{M}$  como negativo e água como branco. Caso penetrassem na célula e fosse observada a supressão da fluorescência da sonda, pode-se inferir que o ferro do complexo foi quelado pela calceína intracelular (Figura 13).



**Figura 13:** Diagrama do experimento. Supressão da fluorescência indica permeação do complexo na célula e posterior preferência do ferro do complexo pela calceína.

## II) Estudo de proteção da morte por estresse oxidativo

As células tiveram seu meio de cultura sobrecarregado com ferro e ascorbato, com intuito que houvesse geração EROs que poderiam levá-las a morte por estresse oxidativo. Para proteger as células, os antirreabsortivos foram adicionados e a viabilidade celular avaliada.

As células HeLa e HepG2 foram adicionadas em microplaca de 96 poços ( $3 \times 10^4$  células/poço), e após aderidas, foram tratadas com antirreabsortivos nas concentrações finais de 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$ , e logo em seguida, com uma alta concentração de ferro-nitrilotriacético (FeNTA) 500  $\mu\text{M}$  na presença de ácido ascórbico 40  $\mu\text{M}$ , no meio DMEM. Após 24h de tratamento, lavou-se a placa e houve repetição do tratamento, para mais 24h de incubação, totalizando 48h de tratamento. Depois desse período, a placa foi lavada com soro fisiológico e incubada por duas horas com solução de resazurina 0,4 mg/mL (Riss, Moravec e Niles, 2013), indicador redox permeável às células. Células viáveis com metabolismo ativo reduzem a resazurina (de cor azul escuro e não fluorescente) em resorufina (de rosa e fluorescente), sendo a quantidade de resorufina produzida proporcional ao número de células viáveis, que são quantificadas através de fluorômetro de microplaca com uma excitação de 560 nm/emissão de 590 nm (Riss, Moravec e Niles, 2013).

Os controles utilizados foram: branco (sem células); meio DMEM; meio DMEM com ácido ascórbico 40  $\mu\text{M}$ , meio DMEM com FeNTA 500  $\mu\text{M}$ ; e o quelante DFO 500  $\mu\text{M}$ .

### III) Estudos antiproliferativos

As células HeLa foram adicionadas em microplaca de 96 poços ( $3 \times 10^4$  células/poço), e após aderidas, foram tratadas com antirreabsortivos nas concentrações finais de 5  $\mu\text{M}$  a 160  $\mu\text{M}$ . As células viáveis foram quantificadas após 24h de tratamento. Para avaliação da viabilidade celular, foi utilizado o ensaio de MTS, no qual consiste na adição de um sal de tetrazólio capaz de permear as células. Ao entrar em contato com as redutases mitocondriais, o sal de tetrazólio é reduzido a um sal de formazana com comprimento de onda distinto, cuja absorbância é medida (490 nm) e quantificada (Riss, Moravec, Niles, *et al.*, 2016). Foram utilizados os controles: taxol (positivo) e água (negativo).

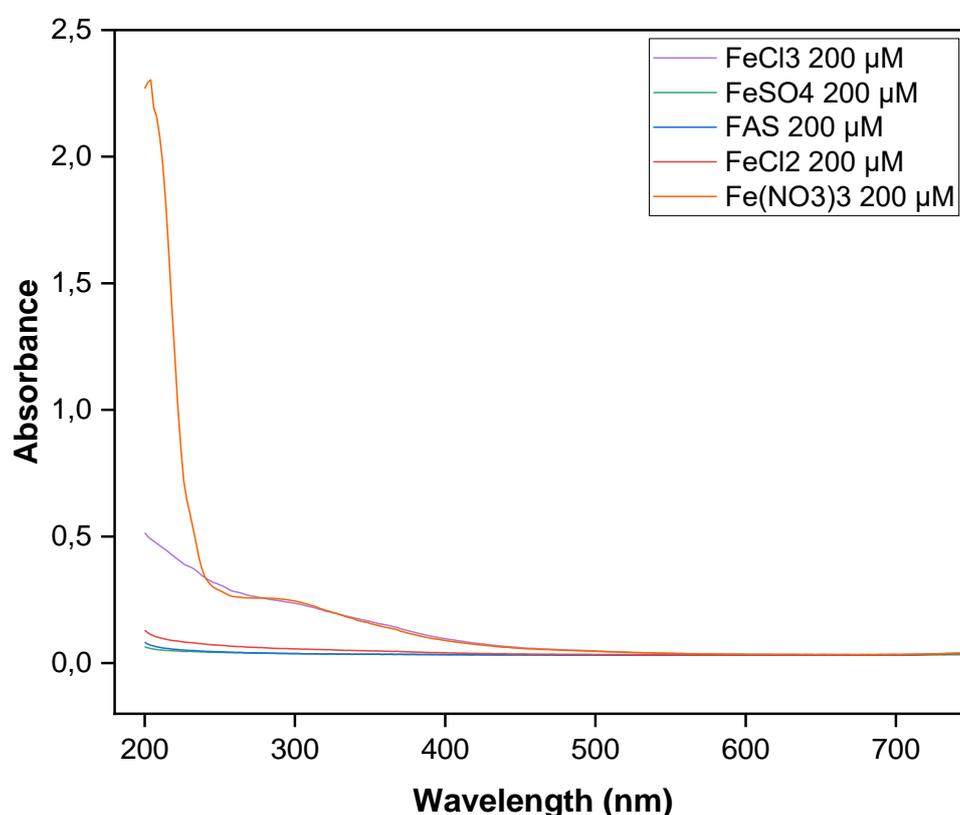
# 4

## Resultados e Discussão

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Síntese e caracterização dos complexos por UV-vis

Para a caracterização dos complexos de antirreabsortivos-ferro foram testados diferentes sais de Fe(II) e Fe(III) em busca de sinais que demonstrassem de maneira qualitativa a formação de um complexo quelante-metal, a partir de sinais próprios do complexo. Para isso, foram obtidos espectros separados dos sais de ferro livre e dos ligantes para que houvesse diferenciação dos sinais de ligante, metal e complexo. Para o metal, a Figura 14 traz o espectro de absorção dos sais utilizados para a síntese. Os sais de Fe(II) não absorveram em nenhum comprimento de onda, tendo valores inferiores a 0,05 de absorção na concentração trabalhada (200  $\mu\text{M}$ ). Já os sais de Fe(III),  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$  possuem dois sinais, um em 205 nm e outro próximo de 300 nm, enquanto  $\text{FeCl}_3$  apresenta apenas um sinal em 300 nm.

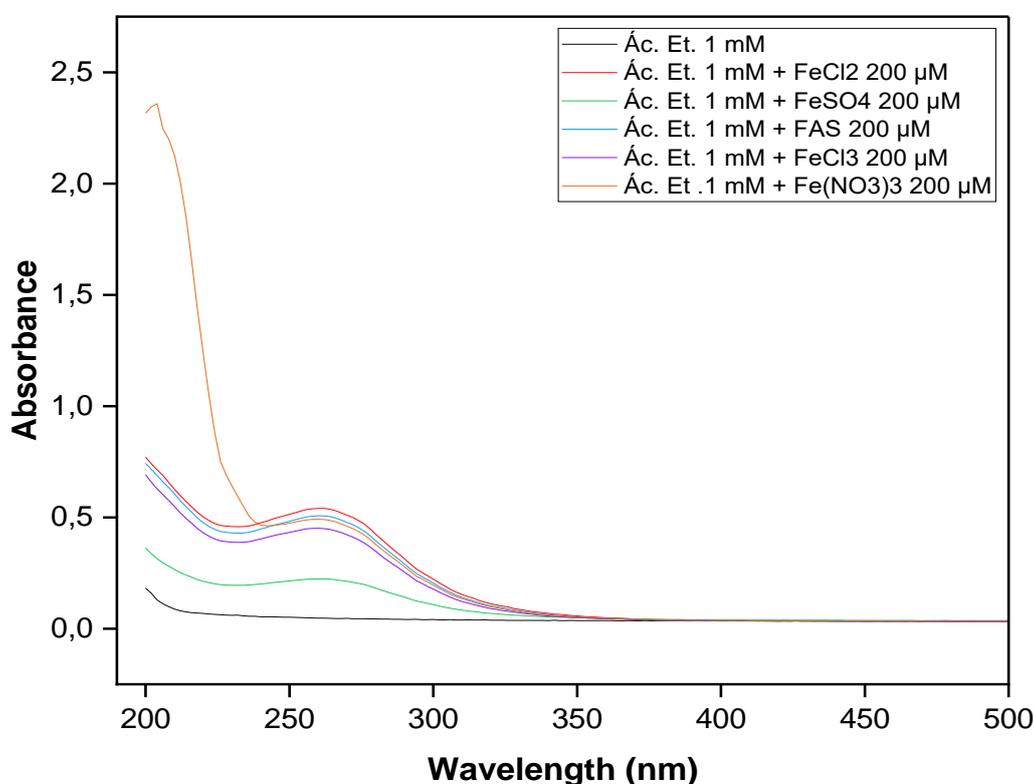


**Figura 14:** Espectro UV-Visível dos diferentes sais de ferro (200  $\mu\text{M}$ ) em água utilizados para formação dos complexos dos antirreabsortivos-ferro.

### Ácido Etidrônico

O ácido etidrônico não apresenta absorbância no espectro UV-Visível (200 – 750 nm), pois não apresenta grupos cromóforos em sua estrutura. Ao adicionar os sais de ferro para síntese dos complexos, observou-se a formação de um sinal em 260 nm, com todos os sais utilizados. A única diferença foi que o complexo com  $\text{FeSO}_4$  apresentou menor absorbância

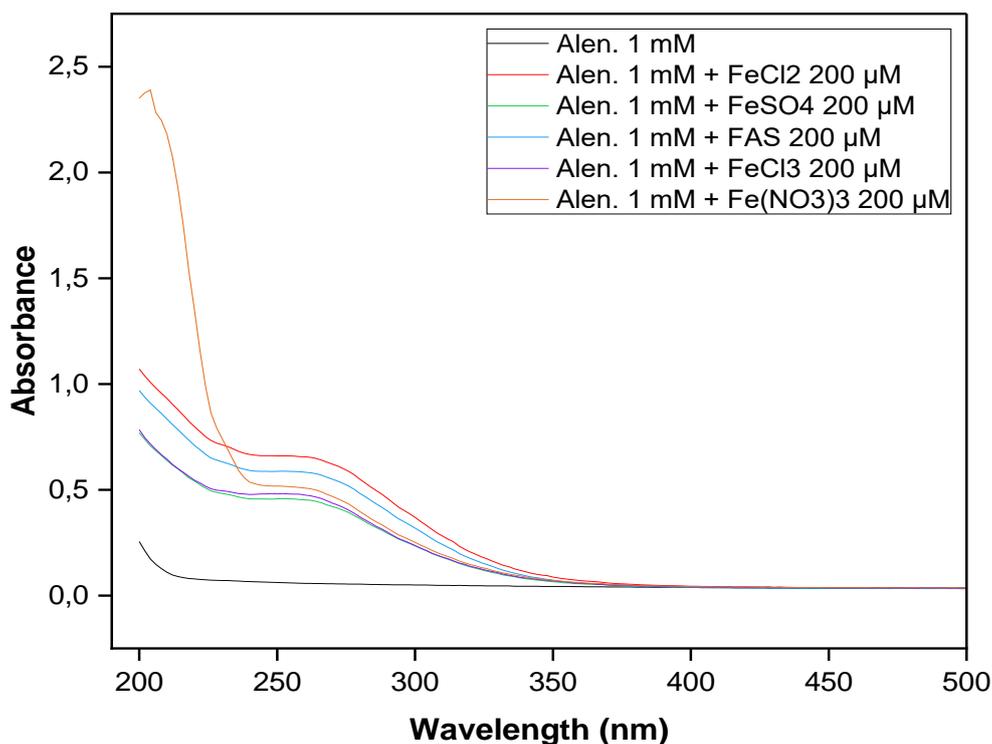
quando comparado com outras fontes de ferro, inclusive com  $\text{FeCl}_2$ , possivelmente devido à necessidade da oxidação a  $\text{Fe(III)}$  para formar um complexo com absorção. Os complexos formados a partir de sais de  $\text{Fe(III)}$  apresentaram valores de absorbância semelhante, indicando possivelmente uma maior afinidade do ligante ao  $\text{Fe(III)}$  (Figura 15). Isso é esperado devido à presença de bases duras ( $\text{OH}$ ), que de acordo com o princípio HSAB (Hard and Soft Acids and Bases),  $\text{Fe(III)}$ , um ácido duro, com alta densidade eletrônica devida à alta carga e pequeno raio iônico, se liga de maneira mais estável a ligantes com bases duras, como átomos de oxigênio. Por outro lado,  $\text{Fe(II)}$  é considerado um ácido intermediário, pois tem menor densidade eletrônica, preferindo ligantes com bases intermediárias, como átomos de nitrogênio (Atkins, 2010).



**Figura 15:** Espectro UV-Vis do ácido etidrônico 1 mM após adição de sais de ferro a 200 µM em água.

### Alendronato

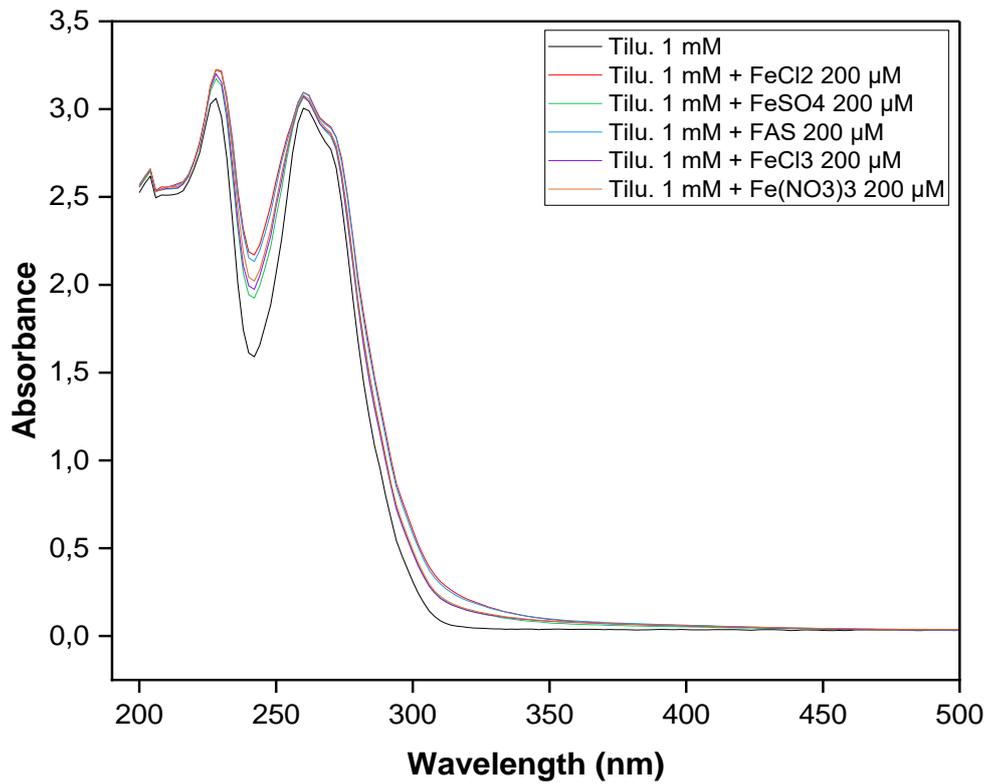
Alendronato não absorve em comprimento de onda específico no UV-Visível, pois também não possui grupos cromóforos (como p. ex. anéis aromáticos). Em contato com os sais de ferro, apresentou um sinal de maior absorbância próximo a 260 nm, e com poucas diferenças entre os sais de  $\text{Fe(II)}$  e  $\text{Fe(III)}$  (Figura 16). Essa banda sugere que houve coordenação.



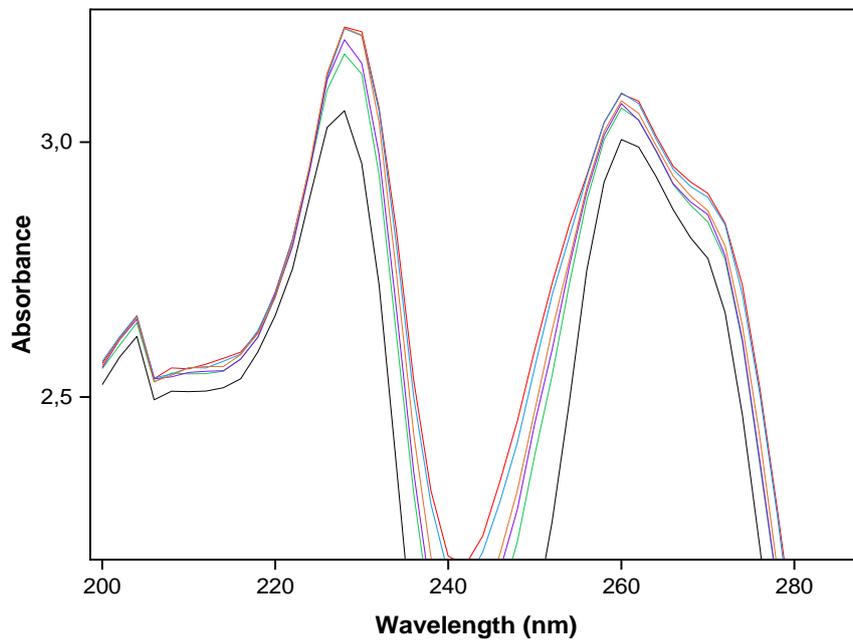
**Figura 16:** Espectro UV-Vis do alendronato 1 mM após adição de sais de ferro a 200 μM em água.

### Tiludronato

Diferente dos bisfosfonatos anteriores, tiludronato possui cadeia lateral aromática, com um clorobenzeno, o que possivelmente justifica a presença de bandas na região do UV. Este ligante apresentou mínimas mudanças em seu espectro depois de entrar em contato com sais de ferro, fato que dificultou a caracterização do complexo (Figura 17). Após a adição de Fe(II) e Fe(III), se observou um pequeno aumento de absorção nos dois picos já presentes na região do UV, em 228 nm e 260 nm (Figura 18), e diferente dos demais, não houve formação de um sinal característico apenas do complexo. Como as diferenças no espectro do suposto complexo de ferro foram pouco pronunciadas, não é possível confirmar, através desse ensaio, a formação de um complexo.



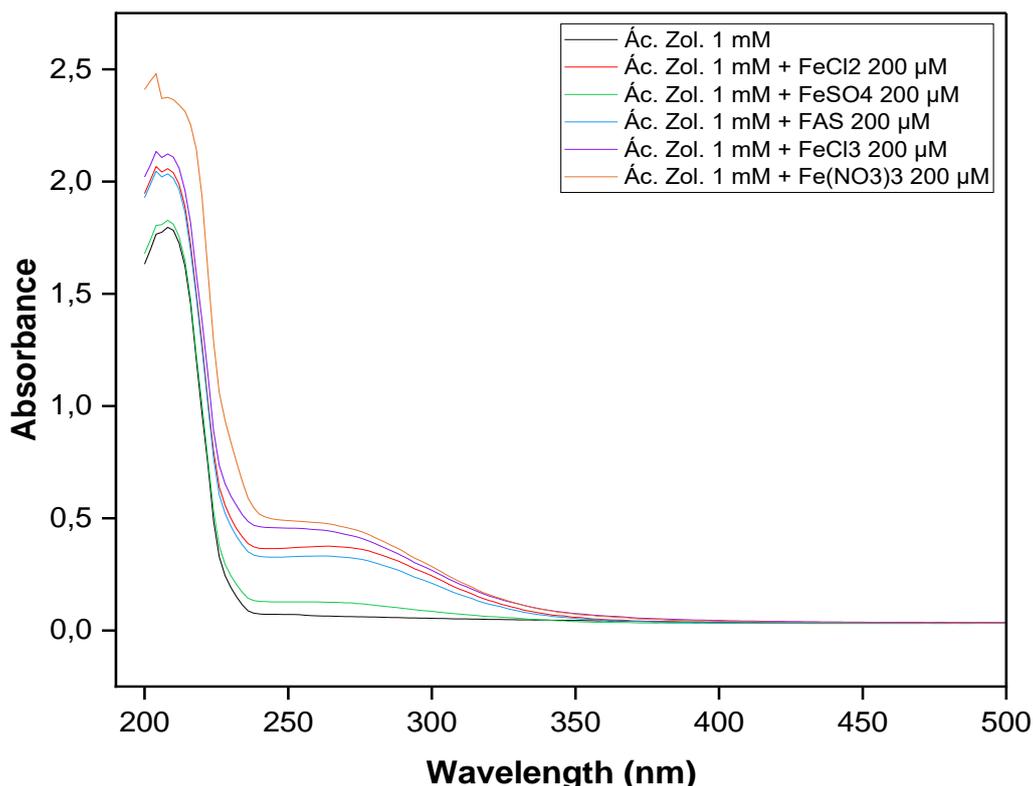
**Figura 17:** Espectro UV-Vis do tiludronato 1 mM após adição de sais de ferro a 200  $\mu\text{M}$  em água.



**Figura 18:** Destaque do espectro UV-Vis do tiludronato 1 mM com sais de ferro a 200  $\mu\text{M}$  em água.

## Ácido Zoledrônico

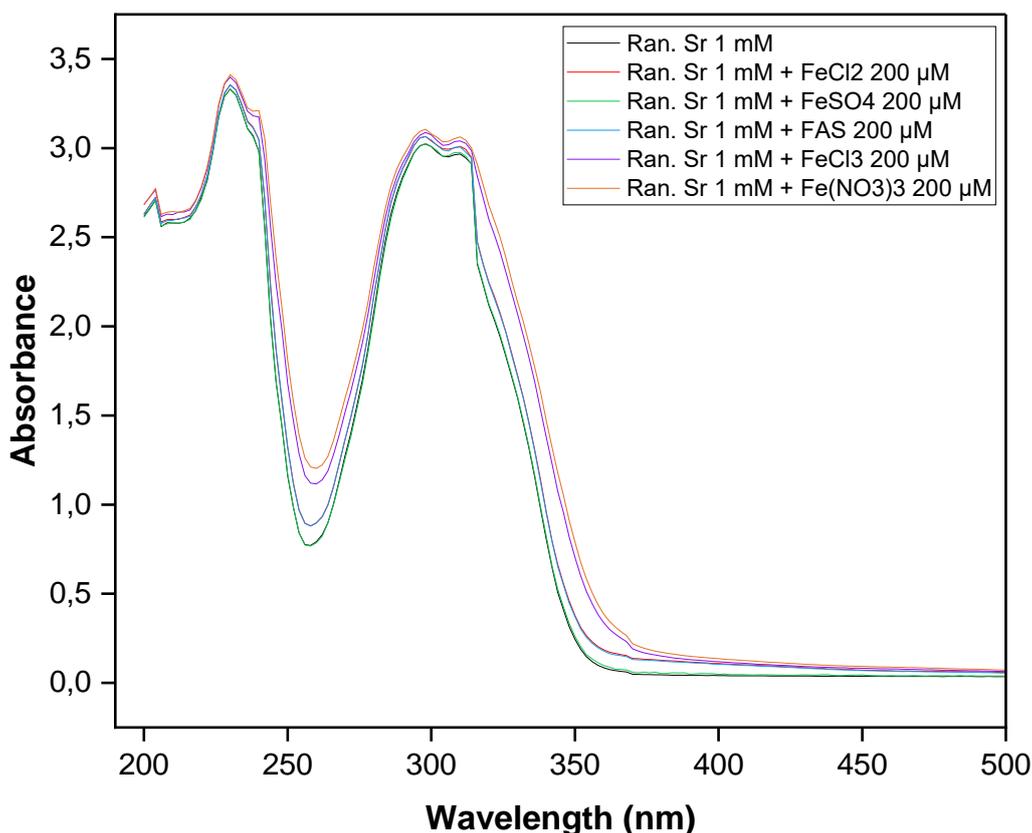
Semelhante ao tiludronato, o ácido zoledrônico possui uma cadeia lateral aromática, com um imidazol, e por isso possui uma banda de absorbância na região do UV, próximo a 208 nm. Após entrar em contato com Fe(III), houve a formação de um sinal próximo à região de 260 nm (Figura 19). Notou-se que com FeSO<sub>4</sub> não houve formação desse sinal, possivelmente pela necessidade de oxidação a Fe(III). Também houve um aumento da banda de 208 nm depois do acréscimo de ferro.



**Figura 19:** Espectro UV-Vis do ácido zoledrônico 1 mM após adição de sais de ferro a 200 µM em água.

## Ranelato de Estrôncio

Ranelato de estrôncio possui sinais em 230 nm e cerca de 300 nm, e com o acréscimo dos sais de ferro, não teve seu espectro de absorção alterado maneira relevante (Figura 20). Semelhante ao caso do tiludronato, não é possível afirmar que houve formação de complexo apenas por esse ensaio. O fato do Sr estar presente na estrutura no fármaco pode dificultar a ligação do ferro ao ácido ranélico.



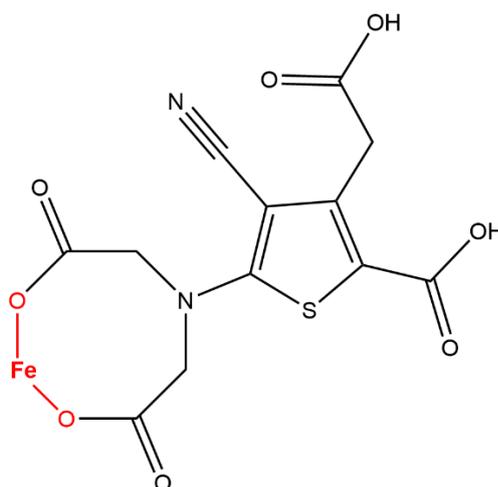
**Figura 20:** Espectro UV-Vis do ranelato de estrôncio 1 mM após adição de sais de ferro a 200 µM em água.

Para etidronato, alendronato e zoledronato, o surgimento de um sinal na altura de 260 nm após adição de ferro confirma que uma nova molécula foi formada, já que os perfis de absorção obtidos foram diferentes dos ligantes e do metal livre. É importante ressaltar que o ambiente de coordenação dos bisfosfonatos é o mesmo, o que justifica o repetido sinal no mesmo comprimento de onda. De modo semelhante ao pirofosfato, os bisfosfonatos formam estruturas tridimensionais capazes de ligar metais divalentes como  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  de maneira bidentada, coordenando o cátion divalente através de um oxigênio de cada grupo fosfonato (Rogers *et al.*, 2000). Já para  $\text{Fe}^{3+}$ , Kuljanin, Janković, et al., (2002) descreveram que o complexo entre alendronato-Fe(III) teve sua absorção máxima em 238 e 260 nm, e sua razão estequiométrica de 1:1, determinada através de Job's Plot.

Estudos feitos por Barja et al., (2001) demonstraram que outras moléculas do grupo dos fosfonatos (ácido metilfosfônico e ácido aminometilfosfônico) formaram complexos com ferro na mesma proporção (1:1), e sugerem que os átomos de ferro se coordenam através dos átomos de oxigênio. Espectros UV-Vis de ácido metilfosfônico com Fe(III), em uma mistura equimolar, em água, foram obtidos e a absorção máxima ocorreu em 265 nm, de

maneira semelhante a observada no nosso estudo. Os autores ainda sugerem que esses resultados indicam fortemente que a presença de um grupo fosfonato na molécula ligante garante a formação de um complexo com Fe(III), mesmo que o ligante possua outros grupos de coordenação (por ex. amino) em sua molécula.

Foram feitas tentativas para retirar o Sr do ácido ranélico, porém, sem sucesso. Como havia pouca quantidade desse composto (50 mg), decidiu-se realizar esse e os seguintes experimentos com a molécula original para evitar grandes perdas. Caso fossem feitos ensaios com o ácido ranélico para quelar o ferro, a estrutura do possível complexo (Figura 21) não seria muito estável, pois seria formado um anel de oito membros com os dois oxigênios e o ferro coordenado, com ângulos entre os átomos a  $135^\circ$ , não comum para a hibridização  $sp^3$  ou  $sp^2$  de carbono.



**Figura 21:** Possível estrutura do complexo de ácido ranélico com ferro. Elaborado por ChemDraw.

## 4.2 Voltametria Cíclica

Essa técnica é comumente utilizada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. Sua eficiência resulta de sua característica de fornecer rapidamente informações sobre termodinâmica de processos redox, cinética de reações de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos (Pacheco *et al.*, 2013).

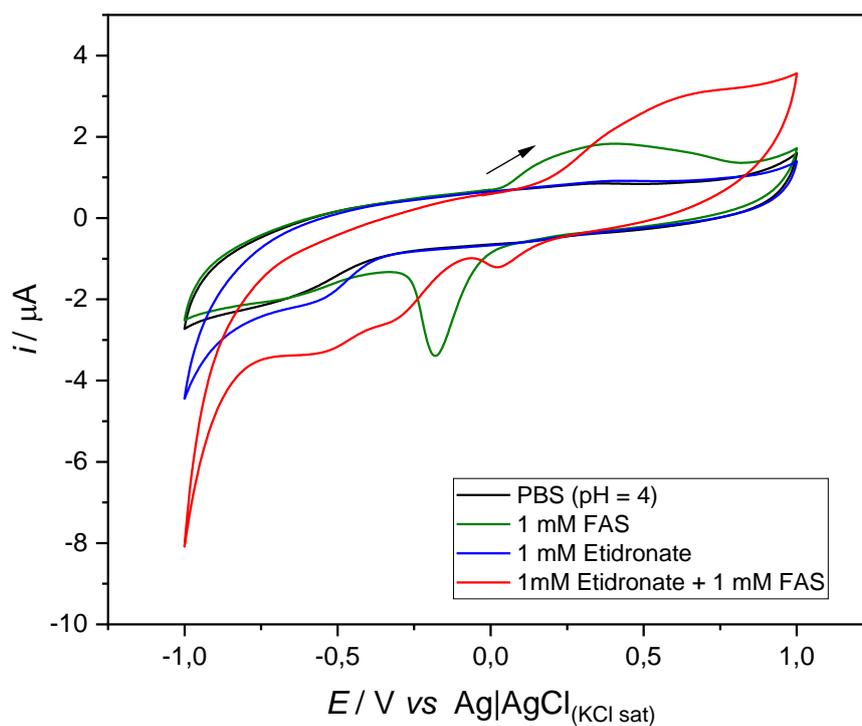
Um experimento voltamétrico começa com a aplicação de um potencial em um valor no qual que nenhum processo de redução ou oxidação ocorrem, e, com a variação de potencial para regiões mais negativas, ocorre a redução do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração utilizada do composto. Quando o potencial atingir valores no qual nenhuma reação acontece, o potencial é varrido no sentido inverso

até o valor inicial; nesse caso, os picos gerados correspondem à oxidação do composto. Os tipos de voltamogramas são dependentes do tipo de mecanismo redox que o composto sofre no eletrodo (Pacheco *et al.*, 2013).

Exploraram-se de maneira qualitativa os voltamogramas dos ligantes, do metal livre e dos complexos sintetizados, a fim de confirmar a formação dos complexos.

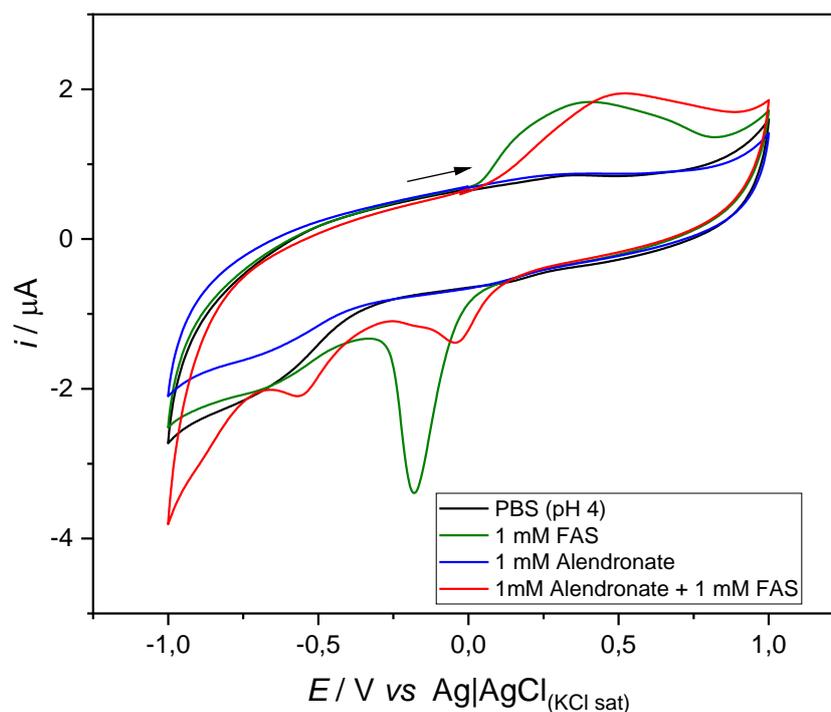
O potencial de redução padrão do  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  em meio aquoso é  $E^\circ +0,11 \text{ V}$ , enquanto FAS solubilizado em tampão PBS pH 4 apresentou seu potencial de redução diminuído para  $-0,2 \text{ V}$  (Figura 23). Fato interessante, pois o tampão PBS contém fosfato, que ao entrar em contato com o ferro adicionado, pode formar fosfato de ferro, espécie muito parecida com a maneira que o ferro é mineralizado na ferritina (Desilva, Guo e Aust, 1993). O potencial de redução de  $\text{Fe}^{3+}$ -ferritina/ $\text{Fe}^{2+}$ -ferritina é  $E^\circ -0,19 \text{ V}$ , praticamente idêntico ao potencial encontrado neste ensaio. Esse valor é indicativo que o ferro em tampão PBS formou fosfato férrico e está sendo reduzindo a  $\text{Fe}^{2+}$ , em um potencial muito semelhante ao da ferritina (Halliwell e Gutteridge, 2007).

O complexo etidronato-ferro apresentou potencial de redução de  $+0,023 \text{ V}$  (Figura 22), muito próximo ao potencial de redução do  $\text{Fe}^{3+}$ -DETAPAC/ $\text{Fe}^{2+}$ -DETAPAC (ácido dietilenotriaminopentaacético; DTPA) de  $+0,03 \text{ V}$ , e semelhante ao potencial de redução do ferro(III) ligado a outros ligantes endógenos como o ADP ( $\sim +0,11 \text{ V}$ ). As diferenças de potenciais tanto de redução quanto de oxidação demonstram que o complexo foi formado, uma vez que o pico de redução do FAS em tampão ( $-0,181 \text{ V}$ ) foi deslocado no complexo ( $-0,31 \text{ V}$  e  $-0,574 \text{ V}$ ). Quanto aos potenciais de oxidação, ocorre distorção da banda, que sugere dificuldade da oxidação ocorrer (Halliwell e Gutteridge, 2007).



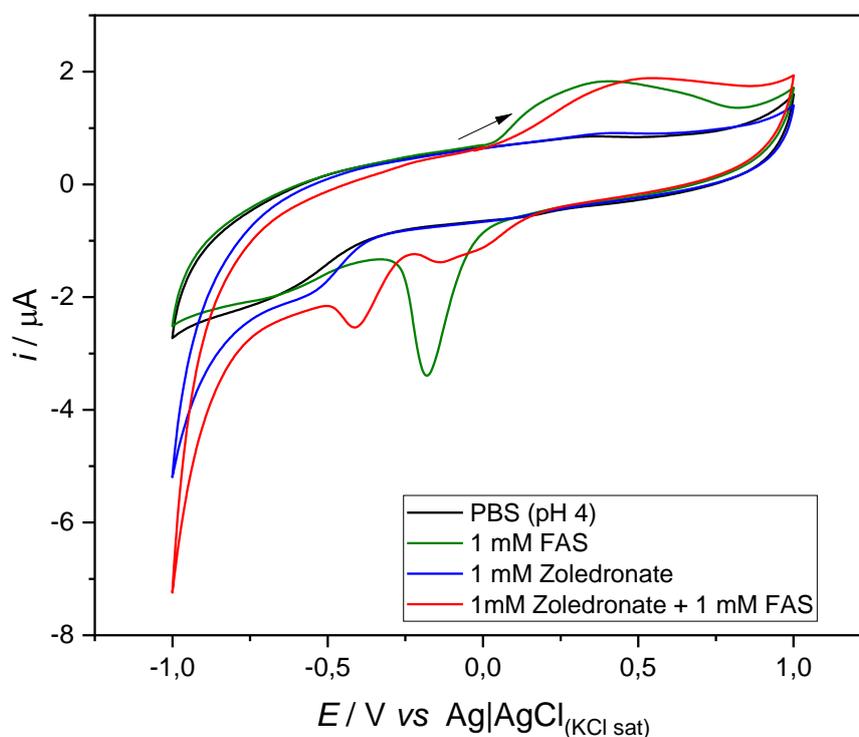
**Figura 22:** Voltamograma do etidronato e seu respectivo complexo, em PBS como eletrólito de suporte. Velocidade de varredura 50 mV/s.

Para o complexo de alendronato-ferro (Figura 23), os potenciais de redução obtidos foram -0,042 V e -0,56 V, deslocando o pico de redução do FAS ( $E^\circ$  -0,181 V) e apresentando um perfil único, comprovando a formação do complexo.



**Figura 23:** Voltamograma do alendronato e seu respectivo complexo, em PBS como eletrólito de suporte. Taxa de varredura 50 mV/s.

O complexo zoledronato-ferro (Figura 24) apresentou o potencial de redução a -0,41 V, valor muito próximo ao potencial de redução de  $\text{Fe}^{3+}$ -transferrina/ $\text{Fe}^{2+}$ -transferrina (-0,40 V), outra fonte endógena de ferro (Halliwell e Gutteridge, 2007).



**Figura 24:** Voltamograma do zoledronato e seu respectivo complexo, em PBS como eletrólito de suporte. Taxa de varredura 50 mV/s.

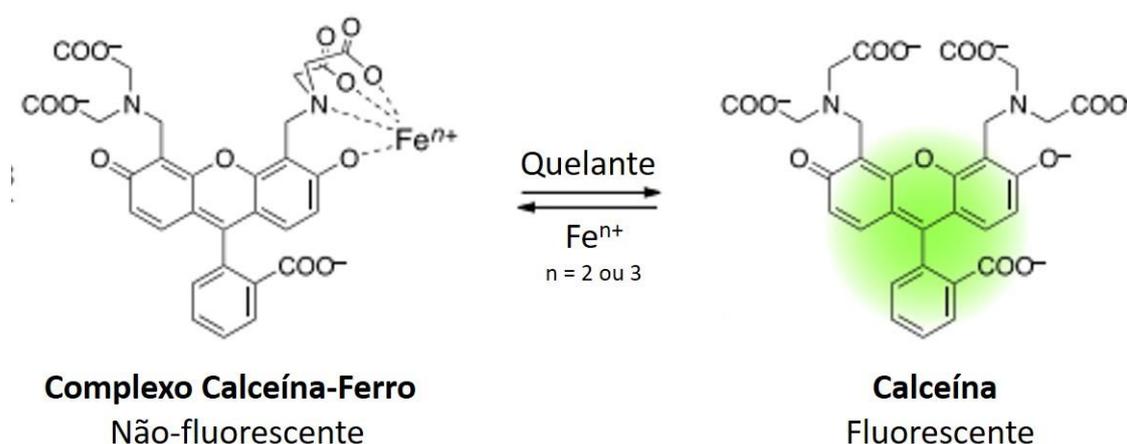
Esse experimento foi feito apenas com três dos cinco ligantes desse estudo, pois todo o estoque de tiludronato e ranelato de estrôncio foi consumido para a realização do restante dos experimentos, sendo esse o último ensaio feito nesse trabalho. Futuramente, a realização do voltamograma do complexo tiludronato-ferro seria muito interessante para a confirmação de sua formação

### 4.3 Avaliação da capacidade quelante dos antirreabsortivos

#### I) Estudos de competição com calceína

##### Sem Cálcio

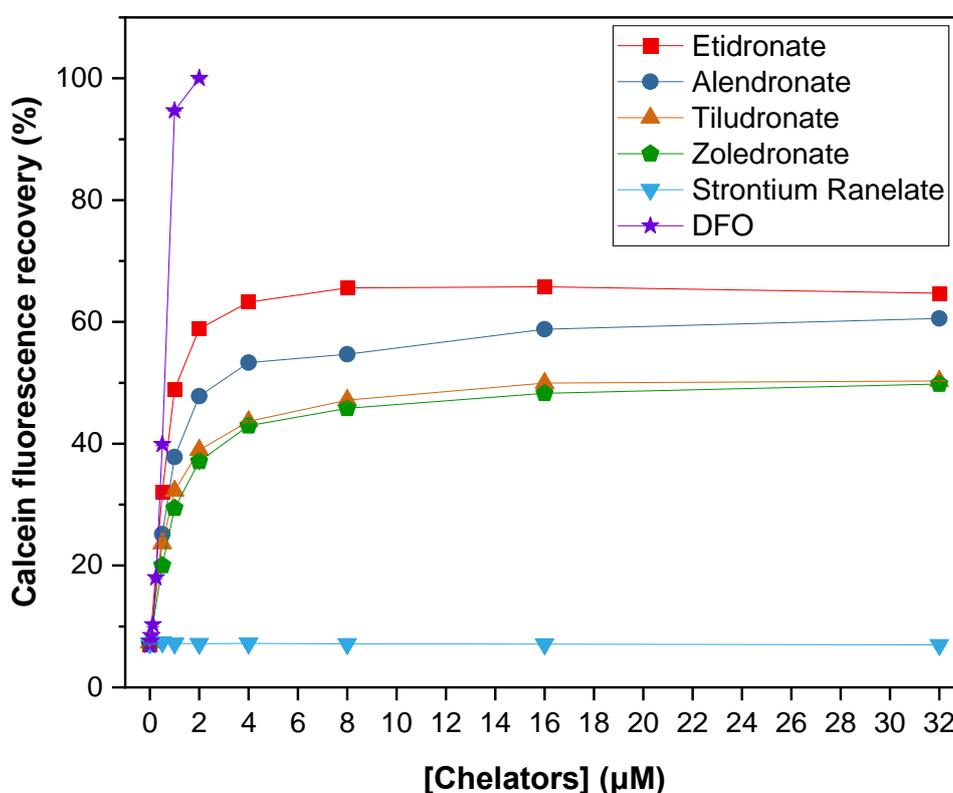
A calceína tem sua fluorescência suprimida ao se coordenar a íons ferro (especialmente Fe(III)), e a recuperação de sua fluorescência indica afinidade quelante das moléculas testadas por ferro (Figura 25) (Hirayama e Nagasawa, 2017).



**Figura 25:** Relação entre calceína, ferro e quelante. Íons de ferro suprimem a fluorescência de calceína, enquanto um quelante é capaz de recuperá-la.

A Figura 26 mostra a recuperação realizada pelos antirreabsortivos em oito diferentes concentrações (0 a 32  $\mu\text{M}$ ), ao longo de 12 h. Os dados foram normalizados em relação aos respectivos brancos (sem quelantes). Foi demonstrado que os bisfosfonatos (etidronato, alendronato, tiludronato e zoledronato) apresentaram atividade quelante satisfatória, recuperando de 50% a 65% a fluorescência da calceína. O antirreabsortivo que apresentou melhor resultado foi etidronato (65%), seguido de alendronato (60%), e, por fim, tiludronato e zoledronato (50% ambos). Observou-se uma estabilização a partir da concentração de 4  $\mu\text{M}$ , com pequeno aumento nas concentrações superiores. Apenas o ranelato de estrôncio não demonstrou recuperação da fluorescência, comportamento que pode ser justificado devido aos dois átomos de estrôncio ligados ao ácido ranélico, que

competem com e/ou inibem a quelação do ferro. Para o controle positivo, o sideróforo de alta afinidade DFO, escolheu-se trabalhar na faixa de 0 – 2  $\mu\text{M}$  devido à relação de quelação de DFO com ferro de 1:1, portanto, com 2  $\mu\text{M}$  o sistema estaria saturado. Estes resultados demonstram atividade quelante a concentrações que podem ser utilizadas fisiologicamente, embora também atestem a menor estabilidade dos bisfosfonatos em comparação tanto com o trishidroxamato DFO como com o aminopolicarboxilato calceína. De maneira demonstrada por Kuljanin, Janković, et al., (2002), a constante de estabilidade condicional de Fe-Alendronato seria de ( $\log K_{ave} = 4.50$ ), um complexo de estabilidade média, algo que se pode estendido para os bisfosfonatos restantes, devido à sua semelhança estrutural.



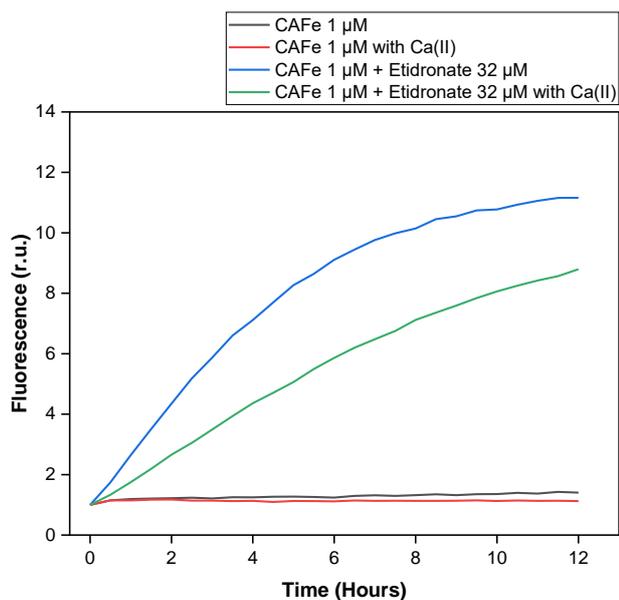
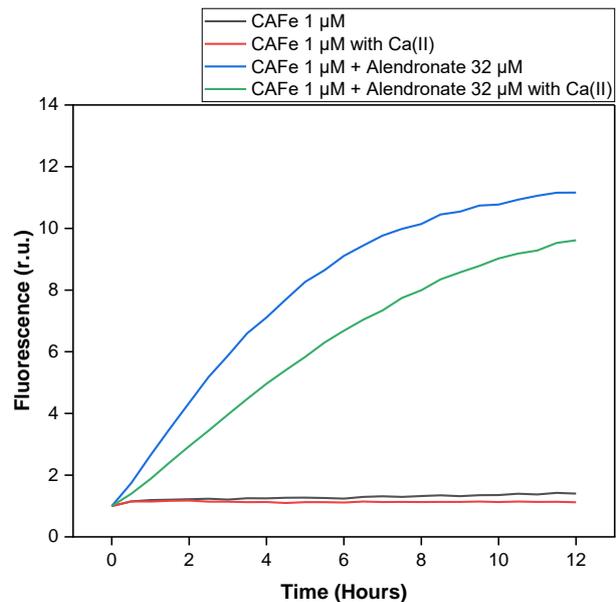
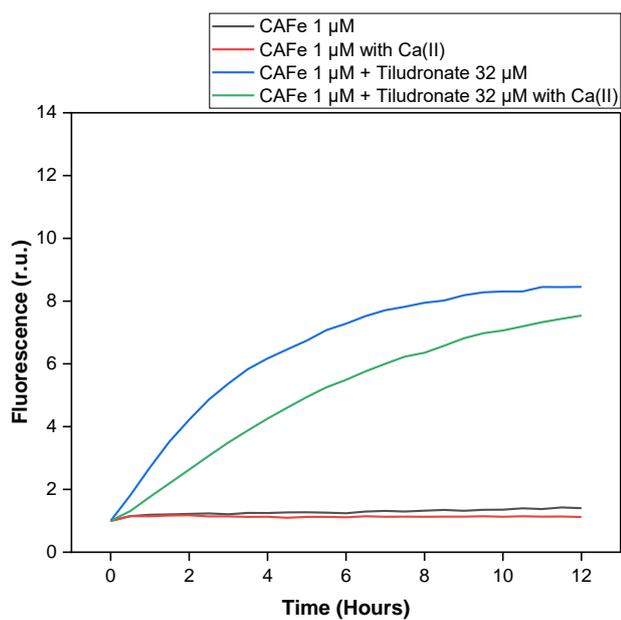
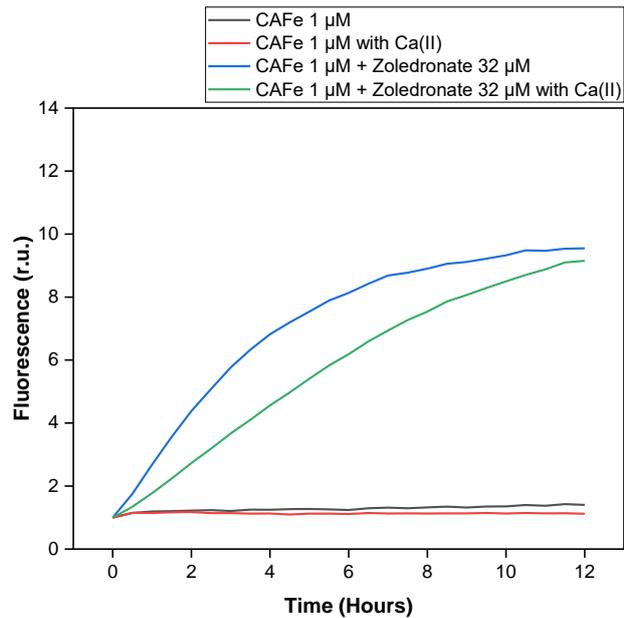
**Figura 26:** Capacidade de sequestro do ferro pelos antirreabsorptivos em diferentes concentrações (0 – 32  $\mu\text{M}$ ) e DFO (0 – 2  $\mu\text{M}$ ) da calceína férrica 1  $\mu\text{M}$  após 12h.

### Com Cálcio

Os ensaios com adição de cálcio visaram simular uma possível interação fisiológica que os antirreabsorptivos teriam no corpo humano, já que a alta afinidade dos bisfosfonatos por íons de cálcio é a base da propriedade de direcionamento ósseo desses compostos (Rogers *et al.*, 2000). Nesse ensaio, a capacidade de quelação dos antirreabsorptivos foi avaliada com o intuito de verificar se a afinidade por ferro se manteria mesmo na presença

de níveis fisiológicos de cálcio. O experimento foi realizado com uma concentração fixa dos ligantes (32  $\mu\text{M}$ ) em tampão com e sem adição de cálcio, para fins comparativos. Os resultados obtidos foram normalizados em relação a primeira leitura realizada durante as 12h (Figura 27).

De maneira surpreendente, constatou-se que com a adição das altas concentrações de cálcio, os bisfosfonatos recuperaram a fluorescência da calceína, indicando que o sequestro de ferro ainda é realizado mesmo quando o outro metal se faz presente (Figura 27). Observa-se que o desempenho decaiu um pouco quando comparado com o meio isento de cálcio, porém a quelação continuou acontecendo, indicando que a afinidade por ferro ainda existe, mesmo quando cálcio está disponível.

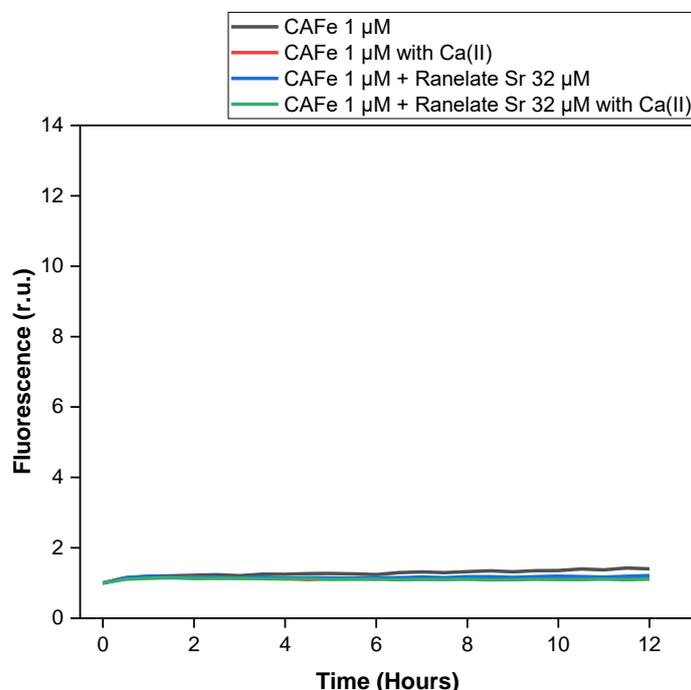
**A****B****C****D**

**Figura 27:** Recuperação de fluorescência de calceína (1 μM) por A. etidronato; B. alendronato; C. tiludronato; D. zoledronato a (32 μM) com e sem adição de cálcio (2,5 mM) durante 12 horas.

Nesse experimento, todos os bisfosfonatos recuperaram a fluorescência da calceína de forma mais eficiente no meio sem acréscimo de cálcio, indicando que a presença do metal perturba o sistema. Semelhante ao experimento de competição com calceína com diferentes concentrações dos bisfosfonatos (Figura 26), etidronato e alendronato tiveram perfis de recuperação melhores que tiludronato e zoledronato. Os últimos dois possuem uma cadeia lateral aromática que possivelmente favorece um impedimento estérico e maior rigidez molecular, dificultando o sequestro do ferro.

Nos bisfosfonatos, a afinidade por cálcio é aumentada de acordo com a característica das cadeias laterais. A presença de (-OH) ou (-NH<sub>2</sub>) em R1 permite a formação de uma conformação tridentada capaz de ligar o Ca(II) de maneira mais eficaz, caso de alendronato e zoledronato (Rogers *et al.*, 2000).

No caso de ranelato de estrôncio, não é possível dizer que houve quelação de ferro pois os valores obtidos nas soluções com o fármaco são semelhantes àqueles atingidos pelos brancos (Figura 28). A quelação vinda desse fármaco é impedida, uma vez que a presença dos dois estrôncios não possibilita que o ácido ranélico capture os ferros, ou talvez pelo fato de que o ácido ranélico não consiga estabelecer a geometria correta para formar um complexo estável com Fe(III).



**Figura 28:** Recuperação de fluorescência de calceína (1 µM) por ranelato de estrôncio (32 µM) com e sem adição de cálcio (2,5 mM) durante 12 horas.

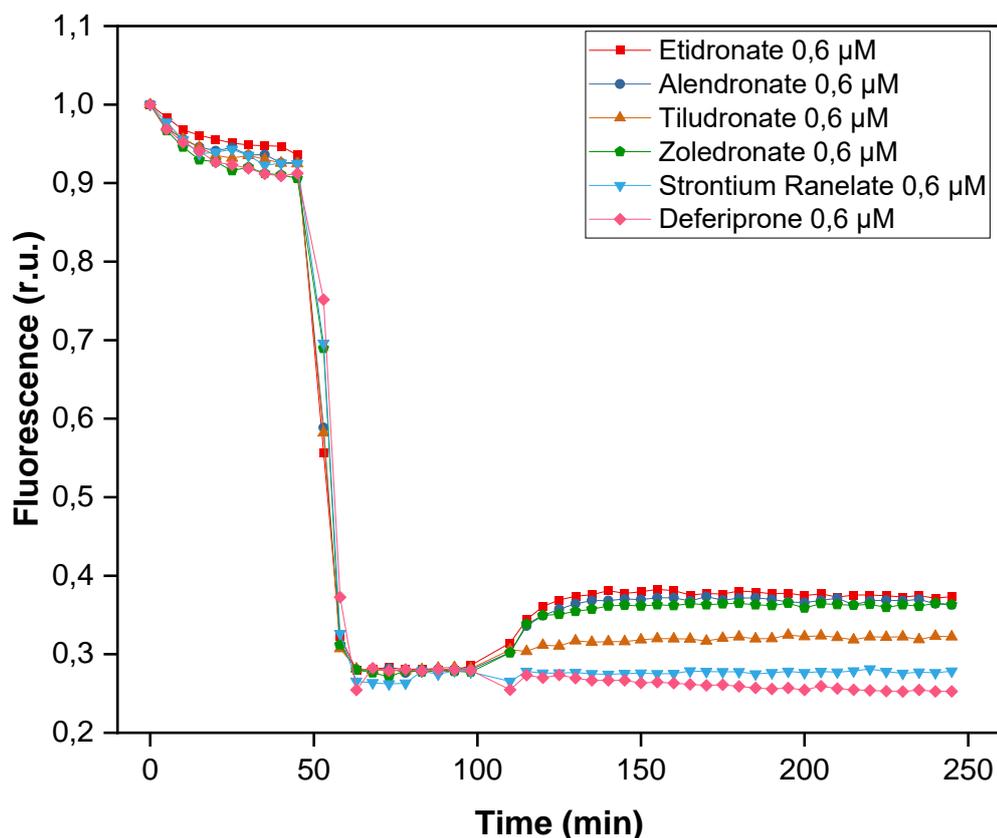
## II) Estudos de competição com apo-Transferrina fluorescente

### Sequestro do ferro ligado à transferrina pelos antirreabsortivos

#### Sem Cálcio

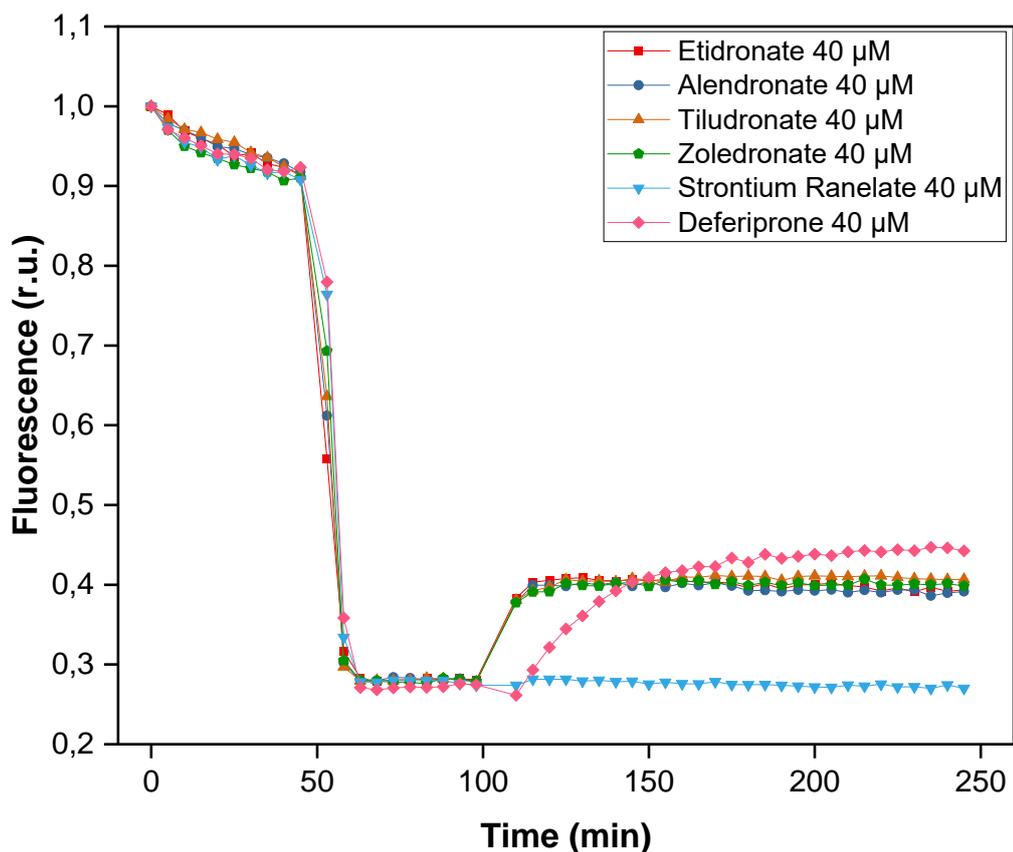
A mobilização de ferro da transferrina é um dos métodos de triagem mais importantes para a seleção de quelantes destinados ao uso na sobrecarga de ferro secundária. A quelação pode diminuir ou prevenir a saturação da transferrina e o surgimento de NTBI no plasma e a deposição de ferro nos tecidos. Foi relatado que quelantes que mobilizam ferro da transferrina, possivelmente podem mobilizar ferro da ferritina e da hemossiderina, desde que tenham acesso aos *pools* de ferro intracelular (Kontoghiorghes, 2006).

Nesse experimento, a fluorescência da transferrina era de 100% no início, e, após 1h, notou-se uma pequena diminuição dessa fluorescência possivelmente a degradação do conjugado com o tempo. Ao adicionar ferro, a fluorescência diminuiu para 27% e, a partir disso, adição de quelantes nesse sistema proporciona uma competição por ferro entre a proteína feita justamente para carregar ferro e as moléculas quelantes. Testou-se uma baixa concentração de quelantes (0,6  $\mu\text{M}$ ), e a recuperação da fluorescência foi superior ao do controle deferiprona, na mesma concentração (Figura 29). Deve-se salientar que a concentração dos antirreabsortivos (0,6  $\mu\text{M}$ ) era menor que a de ferro (2  $\mu\text{M}$ ), e mesmo assim, observou-se sequestro do ferro pelos bisfosfonatos. Os valores de recuperação de fluorescência foram semelhantes para etidronato, alendronato e zoledronato, com cerca de 10% de recuperação da fluorescência após supressão. Já tiludronato, recuperou menos (3%), possivelmente pela presença do clorobenzeno, que poderia dificultar adentrar na estrutura da transferrina. Ranelato de estrôncio demonstrou baixa ou nula capacidade quelante, mantendo baixos valores de fluorescência, mantendo o perfil de supressão pelo ferro. O baixo desempenho de recuperação de deferiprona é justificado pelo fato que o quelante é bidentado, sendo necessário o triplo de concentração de deferiprona em relação ao ferro para que a quelação seja eficiente.



**Figura 29:** Recuperação de fluorescência de transferrina (1  $\mu\text{M}$ ) por antirreabsortivos (0,6  $\mu\text{M}$ ), após adição de 2  $\mu\text{M}$  de ferro, durante 245 minutos (4h). r.u.: relative fluorescence units.

Com uma concentração maior de antirreabsortivos (40  $\mu\text{M}$ ) (Figura 30), notou-se uma uniformidade entre os bisfosfonatos, tendo todos praticamente o mesmo desempenho na recuperação da fluorescência da transferrina (13% de recuperação da fluorescência). Houve pouco aumento de fluorescência em relação à menor concentração testada, demonstrando certa estabilização e saturação do sistema já na concentração de 0,6  $\mu\text{M}$ . O aumento de concentração para o fármaco ranelato de estrôncio não alterou o perfil de sua ligação, que continuou demonstrando capacidade nula de quelação. Já para o controle positivo, deferiprona, uma concentração maior mostrou-se efetiva na recuperação, superando os bisfosfonatos (17% de recuperação), porém, com maior tempo para estabilização, cerca de 40 minutos.

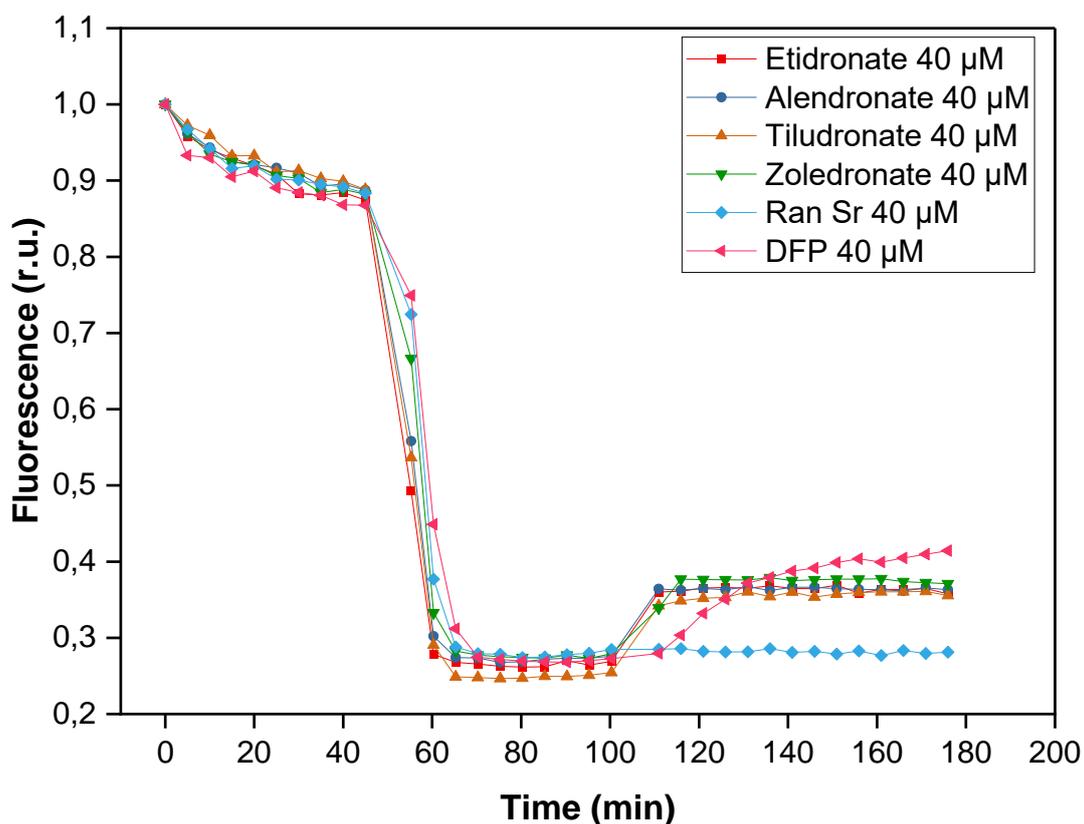


**Figura 30:** Recuperação de fluorescência de transferrina (1 µM) por antirreabsortivos (40 µM), após adição de 2 µM de ferro, durante 245 minutos (4h). r.u.: relative units.

### Com Cálcio

Assim como feito no experimento de competição com calceína (Figura 27 e 28), também foi realizado o ensaio em presença de cálcio, com o intuito de simular interações fisiológicas entre antirreabsortivos, ferro, transferrina e cálcio.

Comparando com o ensaio da mesma concentração dos antirreabsortivos (40 µM) na ausência de cálcio (Figura 30), foi observado que o acréscimo do metal não modificou significativamente o sistema, mantendo praticamente perfis idênticos (Figura 31). A fluorescência do conjugado de apo-Tf-FI se manteve igual à início, a supressão de fluorescência pelo ferro obteve o mesmo valor, de 27%, e a porcentagem de recuperação dos bisfosfonatos foi de 10%, tendo os quatro bisfosfonatos curvas equivalentes. Ranelato de estrôncio manteve seu perfil nulo de quelação, e o controle positivo, deferiprona, superou os bisfosfonatos após 40 minutos. A partir desse ensaio, pode-se inferir que mesmo na presença de cálcio fisiológico (2,5 mM), o perfil de quelação do ferro dos bisfosfonatos se manteve inalterado.



**Figura 31:** Recuperação de fluorescência de transferrina (1 µM) por antirreabsortivos (40 µM), após adição de 2 µM de ferro, em meio com cálcio (2,5 mM) durante 175 minutos (~3h). r.u.: relative units.

### Transferência de ferro dos antirreabsortivos para a apo-transferrina-fluorescente

#### Sem Cálcio

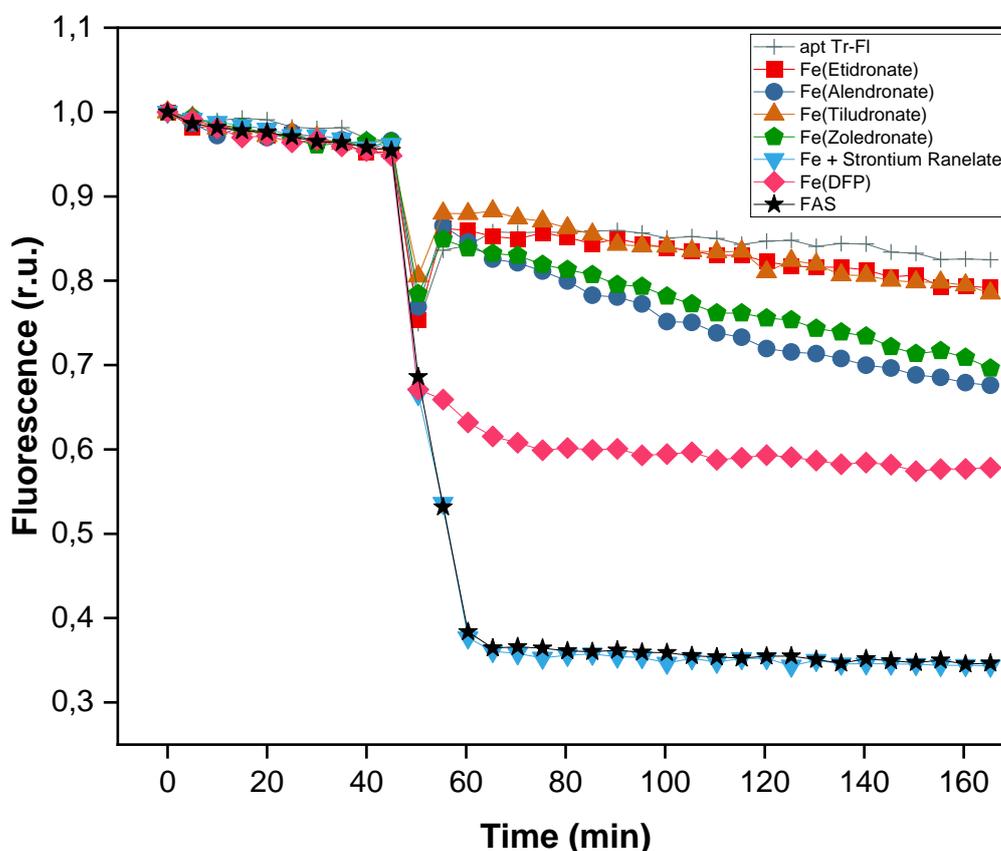
Esse ensaio consistiu em verificar a capacidade do complexo ferro-antirreabsortivo (2 µM) transferir o ferro para a transferrina (1 µM). Dessa maneira, esperava-se uma possível supressão da fluorescência da proteína. A Figura 32 mostrou que os complexos formados pelos bisfosfonatos se mantiveram relativamente estáveis, não liberando todo o ferro para se ligar à transferrina e conseqüentemente suprimir a fluorescência, dentro do intervalo de tempo do experimento. Apresentaram também uma menor capacidade de entrega de ferro que a deferiprona. Como branco, o parâmetro adotado foi a fluorescência do conjugado sozinho com adição de água, e notou-se que, com o passar do tempo, houve diminuição de cerca de 20% da fluorescência, que se deve à degradação do conjugado. Os bisfosfonatos etidronato e tiludronato tiveram perfil cinético semelhante, mantendo cerca de 78% dos valores de fluorescência iniciais. Já alendronato e zoledronato, também similares, terminaram com valores de fluorescência menores que os anteriores (67%), indicando que

houve maior perda do ferro do complexo para a transferrina. Esse resultado é coerente com o que foi descrito no ensaio de competição com calceína em presença de cálcio, nos quais os bisfosfonatos com grupos amino em suas cadeias laterais tem a afinidade por cálcio aumentada (Rogers *et al.*, 2000).

O controle positivo, o complexo de ferro formado com deferiprona, liberou ferro na presença de transferrina, um comportamento já descrito na literatura. Kontoghiorghes (2006), relatou que deferiprona, em baixas concentrações, pode transferir o ferro do seu complexo para a transferrina insaturada. Em uma condição como a sobrecarga de ferro, esse comportamento é desejável, já que se pode retirar ferro de locais tóxicos e entregá-lo a uma forma de armazenamento segura.

Por fim, ranelato de estrôncio mostrou novamente que sua capacidade de quelar ferro é nula, uma vez que seu perfil se equivaleu ao controle negativo, ferro livre (FAS).

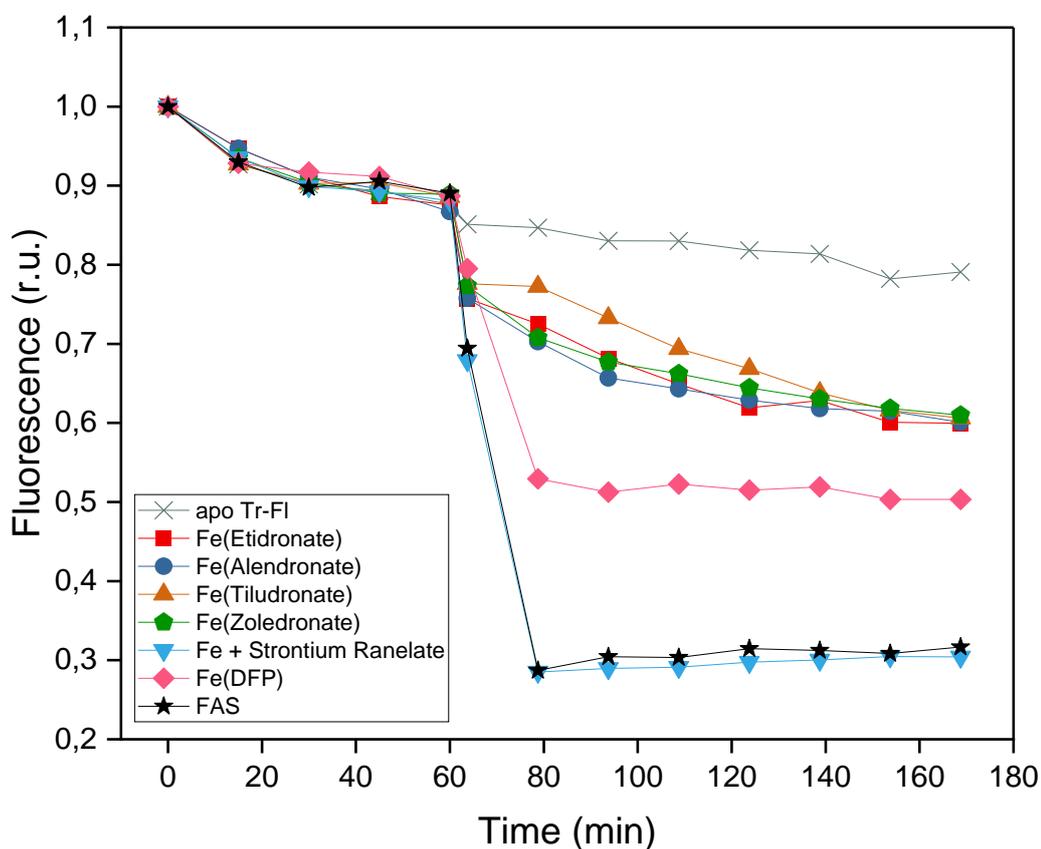
Esses dados estão de acordo com o perfil apresentado para o sequestro de ferro da transferrina pelos bisfosfonatos (Figura 30), uma vez que mostram que os compostos apresentam uma estabilidade termodinâmica ou cinética para a ligação com ferro, significativa em relação àquelas da proteína.



**Figura 32:** Cinética da fluorescência de transferrina (1  $\mu$ M) após a adição de complexos de ferro com antirreabsortivos (2  $\mu$ M), durante 165 minutos (2,75h). r.u.: relative units

### Com Cálcio

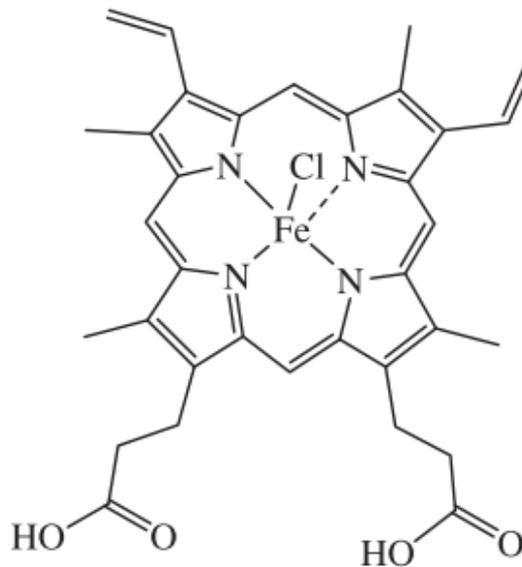
De acordo com a Figura 33, observou-se que a adição de cálcio interferiu na estabilidade dos complexos de ferro-antirreabsortivos, prejudicando a quelação de ferro pelos fármacos, assim como nos experimentos observados com calceína férrica em presença de cálcio (Figuras 27 e 28). A fluorescência do conjugado decaiu no decorrer do experimento para cerca de 21% a menos, semelhante ao ensaio realizado na ausência de cálcio (Figura 32). Para os bisfosfonatos, notou-se uma diminuição gradual da fluorescência, que terminou com valores iguais para os quatro bisfosfonatos, com 60% de fluorescência inicial. O controle positivo deferiprona também apresentou valores inferiores quando comparados com o experimento realizado no meio sem cálcio, finalizando o experimento com metade da fluorescência inicial. Ranelato de estrôncio manteve o perfil nulo de quelação, equivalente ao controle negativo, ferro livre (FAS).



**Figura 33:** Cinética da fluorescência de transferrina (1  $\mu\text{M}$ ) após a adição de complexos de ferro-antirreabsortivos (2  $\mu\text{M}$ ) em meio com cálcio, durante 168 minutos (2,8h). r.u.: relative units.

### III) Estudos de competição com hemea

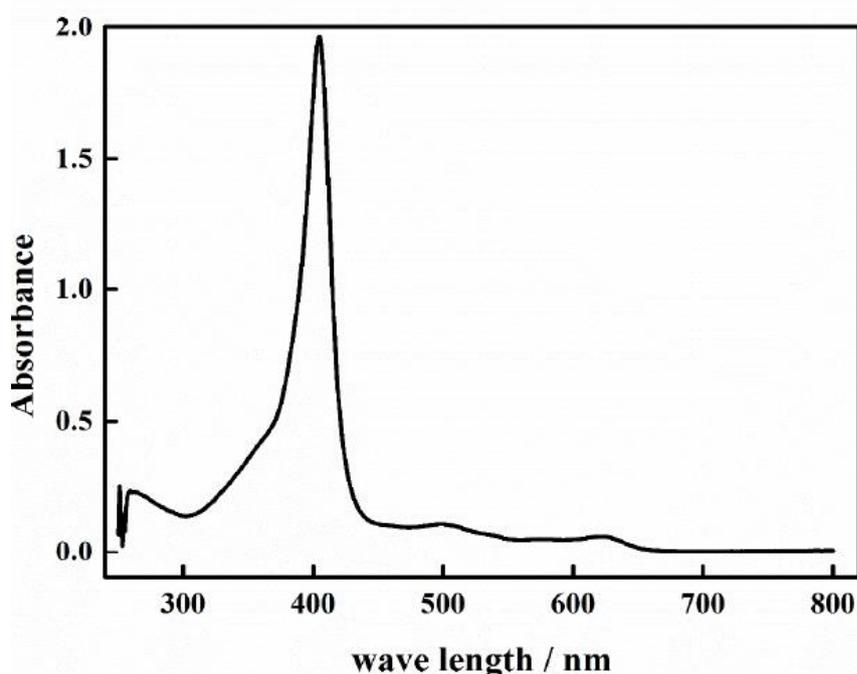
A hemoglobina é uma proteína globular e contém quatro porções de heme, que consiste em um anel porfirínico com  $\text{Fe}^{2+}$  no centro. Em uma situação como hemorragia, os eritrócitos lisam e liberam a hemoglobina que pode ser degradada em hemea ( $\text{Fe}^{3+}$  protoporfirina IX), forma oxidada do heme ( $\text{Fe}^{2+}$  protoporfirina IX), com a presença de um cloreto como contra íon (Figura 34) (Robinson *et al.*, 2009) (Mandal, 2015).



**Figura 34:** Estrutura da hemea.

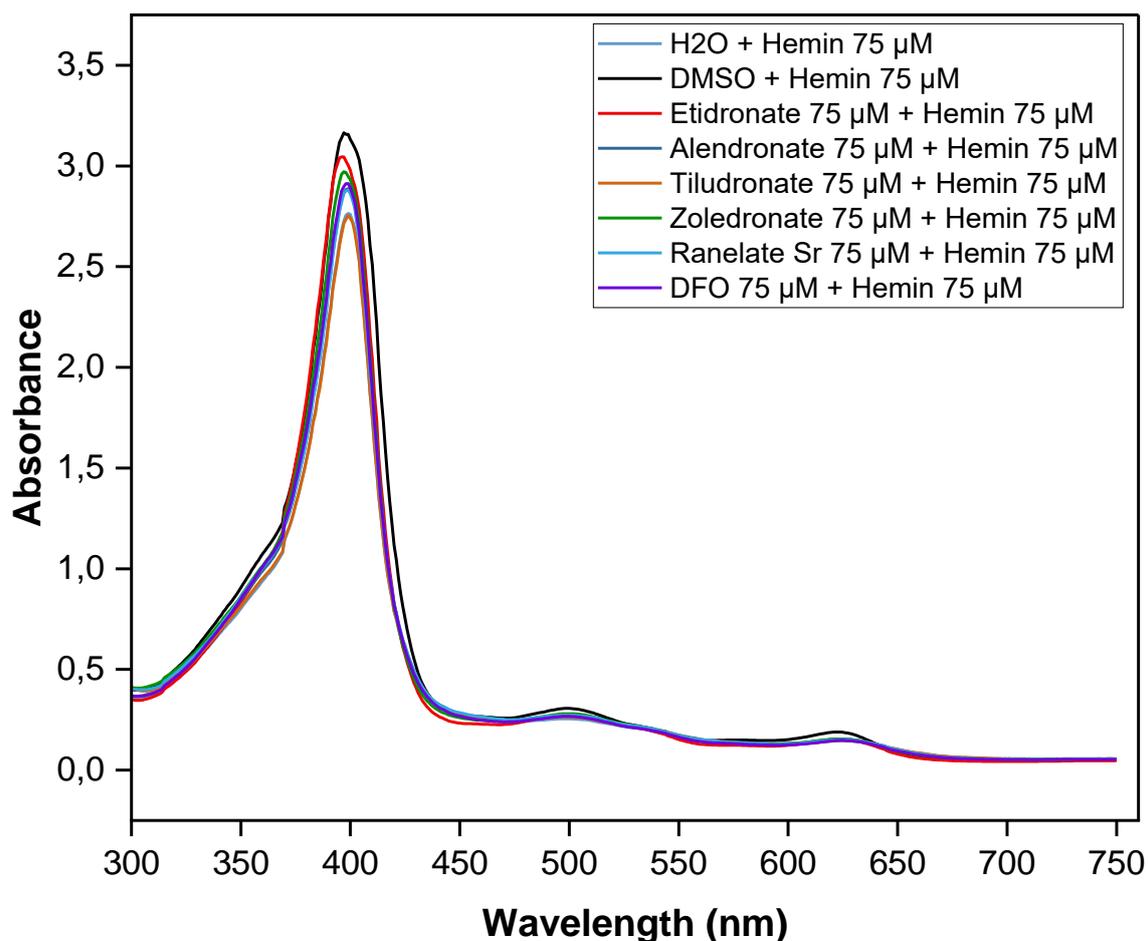
Em soro de pacientes talassêmicos, a hemea é encontrada em uma concentração de 50 a 280  $\mu\text{M}$ , e foi apontada como um fator responsável pelo estresse oxidativo na circulação sanguínea (Phumala *et al.*, 2003). Diversos estudos estão sendo realizados para elucidação dos mecanismos de citotoxicidade da hemea, que além de ser hemolítica, é também um potente oxidante, capaz de causar peroxidação lipídica e gerar espécies reativas de oxigênio (EROs). Os danos estão presente em células do cérebro, como neurônios e astrócitos, que sequestram e internalizam a hemea através da HCP-1 (proteína transportadora do heme 1). No citosol dessas células, a hemea é degradada pelas hemioxigenases e o ferro é liberado, causando estresse oxidativo (Dang *et al.*, 2011; Robinson *et al.*, 2009). Essa visão é apoiada por evidências que os quelantes de ferro podem limitar o estresse oxidativo e evitar a morte celular após exposição de neurônios e astrócitos à hemea (Regan, Chen e Benvenisti-Zarom, 2004). Estudos de Sullivan, Baysal e Stern, (1992) demonstraram que DFO se liga à hemea através da porção do ferro, e devido a isso, reduz a hemólise. Outro estudo realizado por Lu *et al.*, (2012), também indicou que DFO reduziu efeitos das lesões provocadas por hemea, principalmente devido

à sua quelação de ferro, na qual hemina foi encontrada ligada em DFO, como um complexo. A fim de estudar esse fenômeno, foi elaborado um experimento para avaliar a capacidade dos antirreabsortivos de quelar o ferro da hemina, a partir da avaliação do seu espectro UV-Vis, comparando suas bandas características antes e depois da adição dos quelantes. A Figura 35 é um espectro de hemina em DMSO. A banda de absorção de hemina a 400 nm surge predominantemente devido à transferência de carga, enquanto a bandas na região de 500 a 600 nm surgem devido a transições  $\pi$ - $\pi^*$  do anel de porfirina modulado pelo íon férrico (Nath et al., 2017).



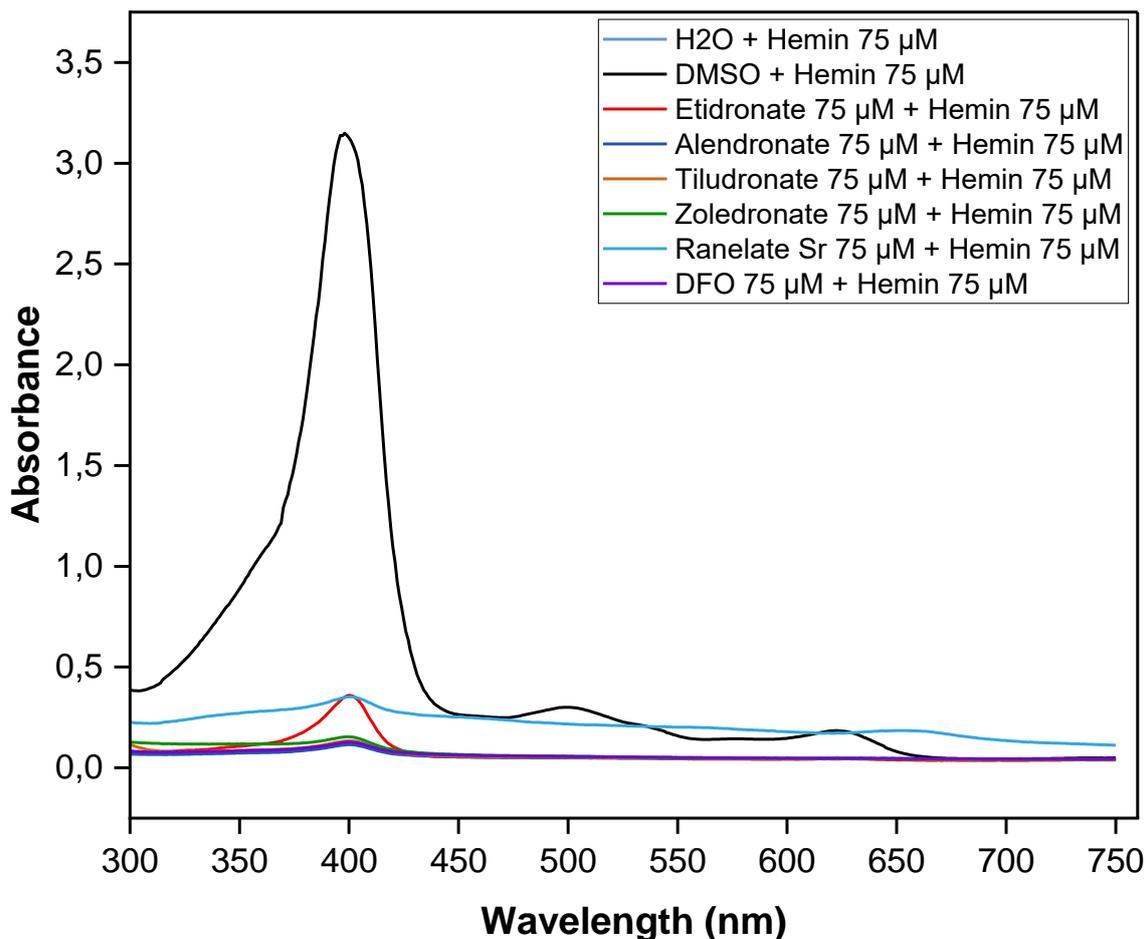
**Figura 35:** Espectro UV-Vis da Hemina 80  $\mu$ M em DMSO. Fonte: Mandal, 2015.

A solubilidade da hemina é limitada, sendo necessário solubilizá-la em DMSO (1 mg/mL). Os espectros observados após 1h da adição dos antirreabsortivos (Figura 36) demonstram que não houve alteração da hemina, mantendo a banda de Soret, em 400 nm, e as bandas em 500 nm e 625 nm, características da hemina praticamente intactas. Um perfil esperado, pois o ferro presente na hemina encontra-se pouco disponível para quelação, estando altamente protegido na estrutura da porfirina.



**Figura 36:** Espectro de absorvância da hemina (75 μM) com adição dos antirreabsorvivos (75 μM), após 1h.

Já no espectro UV-Vis após 24h (Figura 37), observou-se ausência total dos sinais característicos da hemina. Antes da leitura do espectro, foi observado que no fundo da placa havia se formado um precipitado marrom (cor da hemina) em todos os poços que tiveram adição de água. Dessa maneira, o espectro sem bandas características da hemina se deve à sua precipitação na placa.



**Figura 37:** Espectro de absorvância da hemina (75 µM) com adição dos antirreabsortivos (75 µM), após 24h.

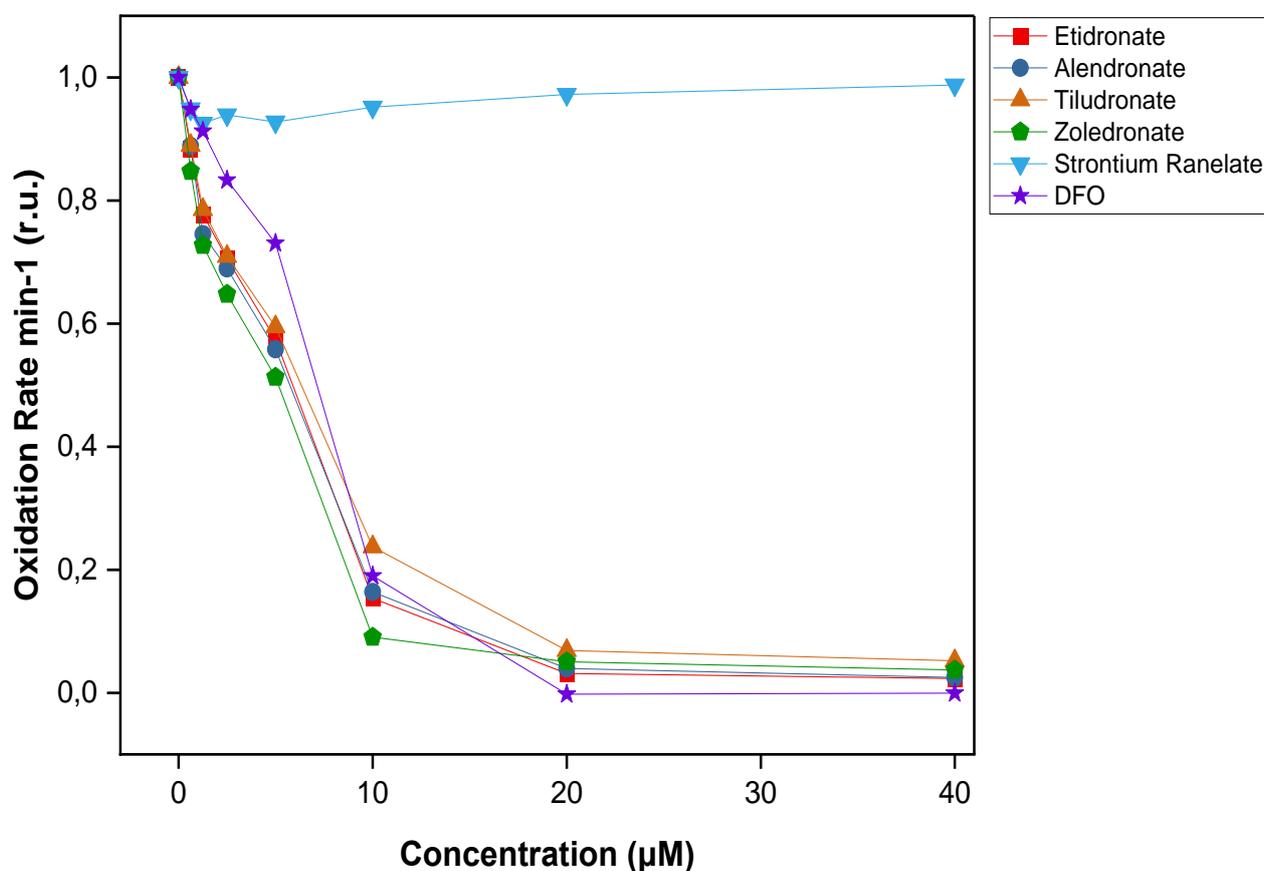
A avaliação do espectro de hemina após adição dos antirreabsortivos foi uma maneira simples de avaliar a formação de um possível complexo entre metal e ligante. Um ensaio de viabilidade celular poderia fornecer informações para complementar esse resultado, avaliando principalmente a morte por estresse oxidativo provocado pela hemina, e o efeito protetor após adição de quelantes.

#### 4.4 Estudos de atividade antioxidante dependente de ferro

##### Sem Cálcio

A Figura 38 demonstra a oxidação da sonda DHR com diferentes concentrações dos antirreabsortivos testados. Quanto menor a intensidade de taxa de oxidação da sonda DHR, maior a capacidade da molécula de quelar o ferro e impedir a participação deste em tal reação. A partir desse ensaio, pode-se observar que à medida que a concentração aumenta, todos os bisfosfonatos tiveram o mesmo comportamento, sendo eficazes em

diminuir a geração de EROs no sistema, com conseqüente redução da produção de fluorescência. Ressalta-se que os bisfosfonatos tiveram atividade antioxidante em quantidades equimolares às de ferro (10  $\mu\text{M}$ ), e seus resultados foram similares ao do controle DFO. Em contrapartida, ranelato de estrôncio demonstrou fraca ou nula capacidade de impedir a oxidação de DHR, fato que pode ser explicado devido a presença dos dois átomos de estrôncio que provavelmente atrapalham o desempenho desse fármaco em quelar  $\text{Fe(III)}$ . Estes resultados são um indicativo que os bisfosfonatos possuem uma das propriedades necessárias que um bom quelante de ferro requer para ser empregado na terapia de quelação, a capacidade antioxidante.

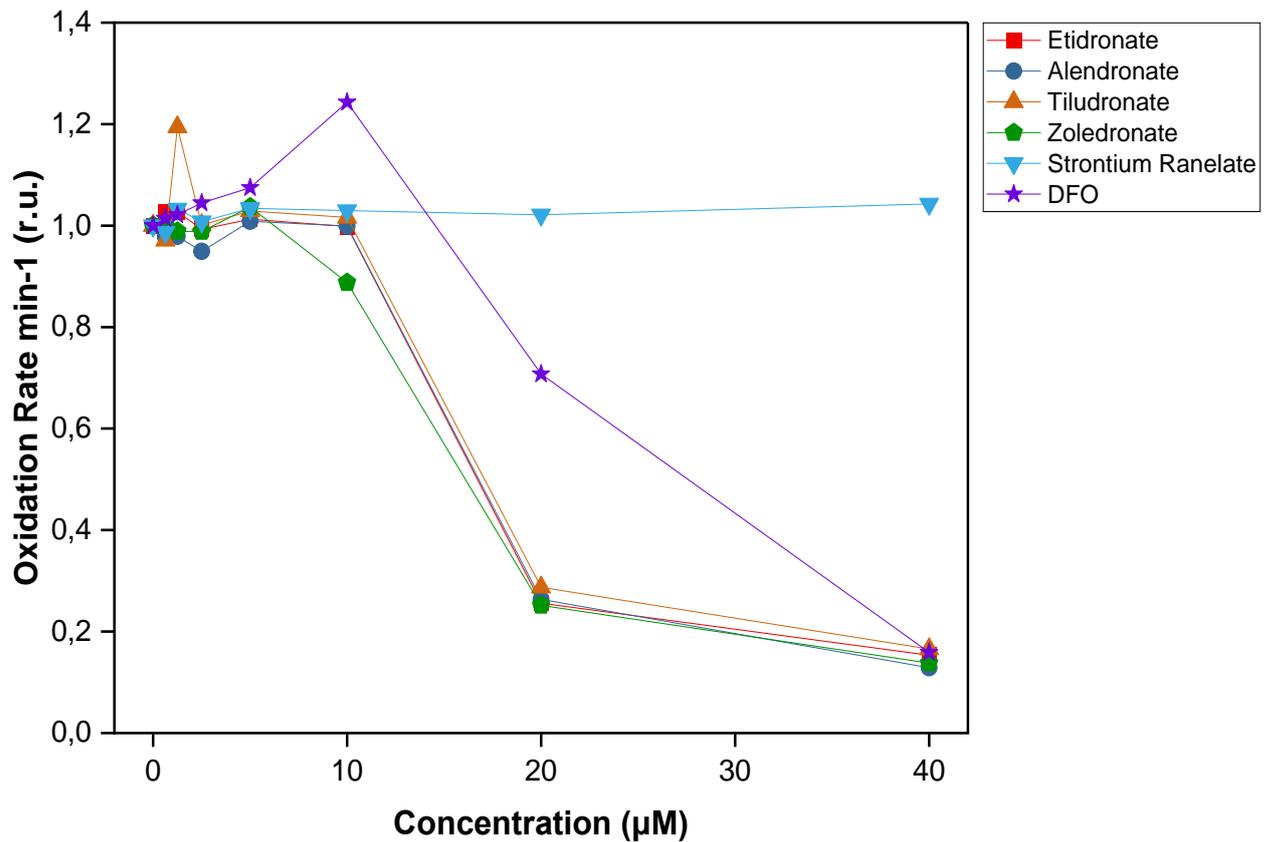


**Figura 38:** Atividade antioxidante dos antirreabsortivos em diferentes concentrações (0 - 40  $\mu\text{M}$ ) durante 1h. A concentração de Fe é 10  $\mu\text{M}$ . r.u.: relative units

### Com Cálcio

No experimento com adição de cálcio (Figura 39), observou-se uma perturbação maior do sistema, com os perfis instáveis dos bisfosfonatos, principalmente nas concentrações menores (0,6 a 5  $\mu\text{M}$ ), fato não observado no sistema sem adição de cálcio (Figura 38). A partir da concentração de 10  $\mu\text{M}$ , que equivale à concentração de ferro, notou-

se uma estabilização da oxidação e, posteriormente, nas concentrações seguintes (20 e 40  $\mu\text{M}$ ) verificou-se uma diminuição brusca da oxidação. A desferrioxamina teve sua capacidade antioxidante significativamente diminuída em todas as concentrações, exceto na maior (40  $\mu\text{M}$ ). E ranelato de estrôncio demonstrou a mesma capacidade antioxidante que o meio sem cálcio, ou seja, nula.



**Figura 39:** Atividade antioxidante dos antirreabsorptivos em diferentes concentrações (0 - 40  $\mu\text{M}$ ) com adição de cálcio 2,5 mM, durante 1h. A concentração de Fe é 10  $\mu\text{M}$ . r.u.: relative units.

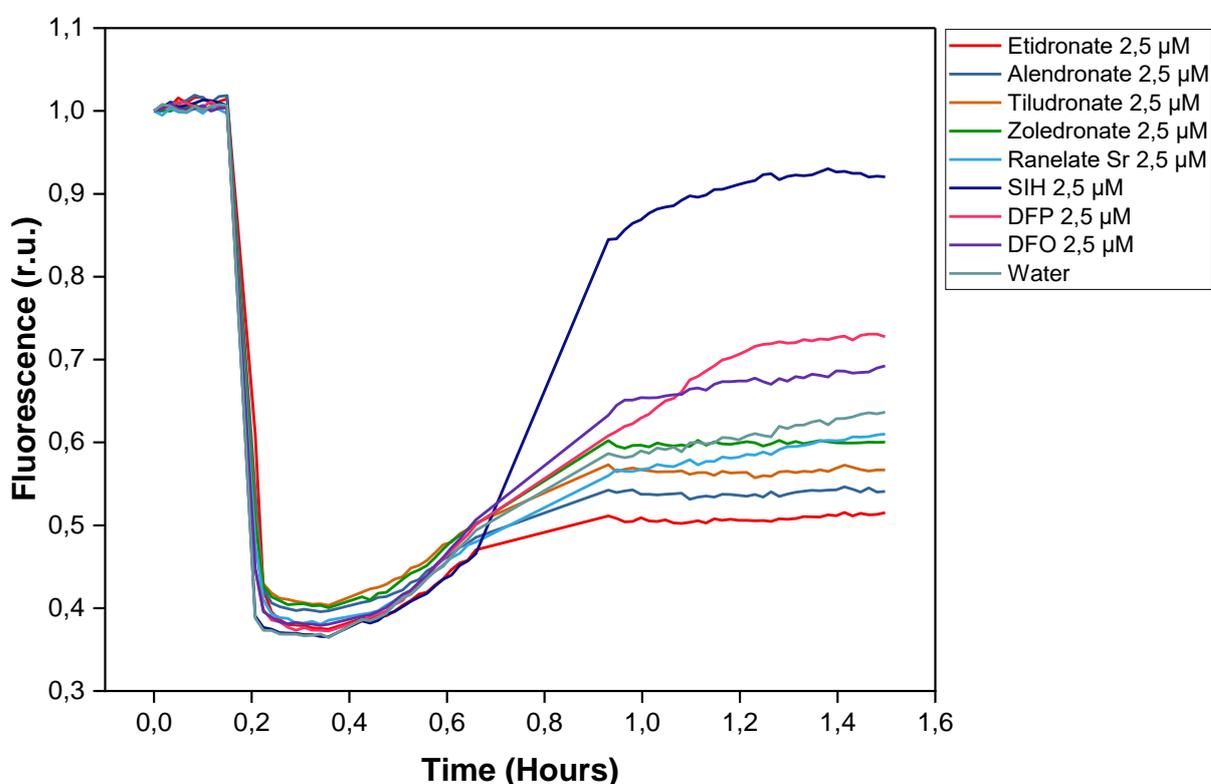
## 4.5 Ensaios Celulares

### I) Estudos de competição intracelular com calceína

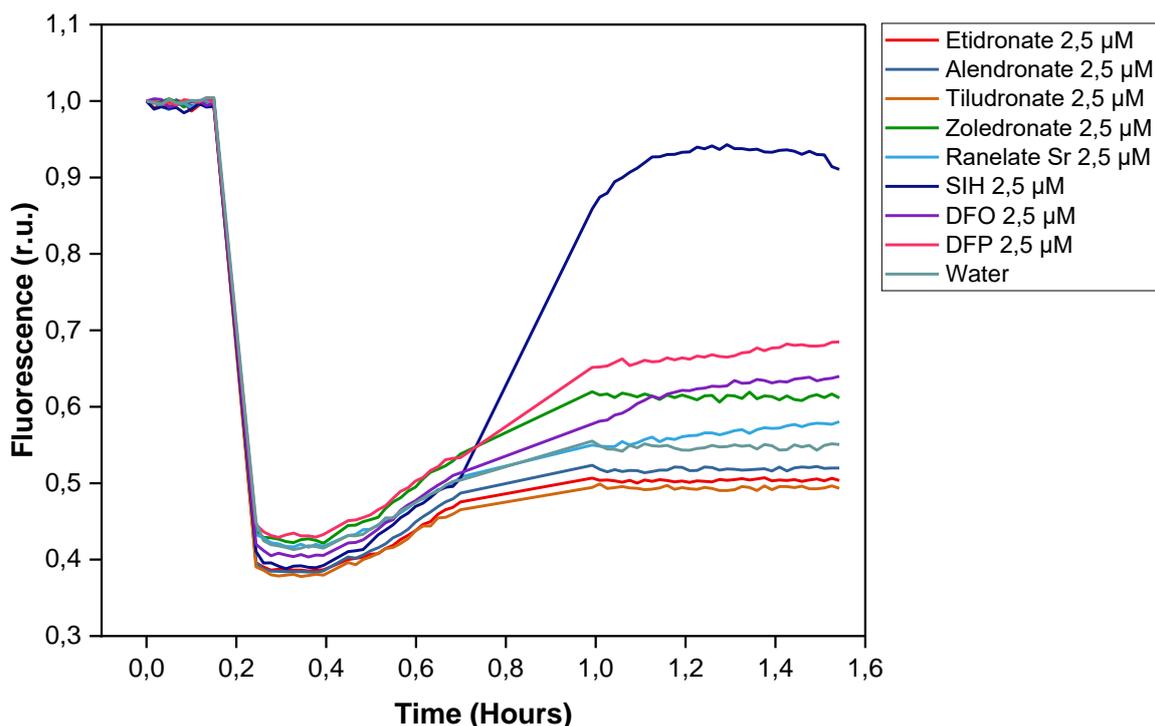
#### Sequestro de ferro intracelular pelos antirreabsortivos

O experimento competição intracelular com a calceína-AM fornece informações a respeito da capacidade do ligante de permear a célula e quelar o ferro no citossol. Características muito apreciadas para um candidato a quelante de ferro, uma vez que um dos problemas que envolvem a sobrecarga de ferro são os altos níveis de LPI (reservatórios de ferro livre) e LCI (reservatórios de ferro lábil celular) que geram altos níveis de EROs, que causam danos oxidativos graves às organelas (Coates, Thomas D e Wood, 2017).

Nas duas linhagens celulares, HeLa (Figura 40) e HepG2 (Figura 41), foi observado um desempenho similar para os cinco antirreabsortivos, com pouca variação da fluorescência após adição de DTPA, indicando pouca ou nula quelação de ferro intracelular, já que o perfil obtido foi semelhante ao do controle negativo, água. O DTPA é um ácido poliaminocarboxílico com pouca absorção celular, sendo usado neste experimento apenas para sequestrar o excesso de ferro não internalizado na célula. Desse modo, os quelantes-teste (antirreabsortivos) não reagiriam com ferro antes de (eventualmente) entrarem na célula.

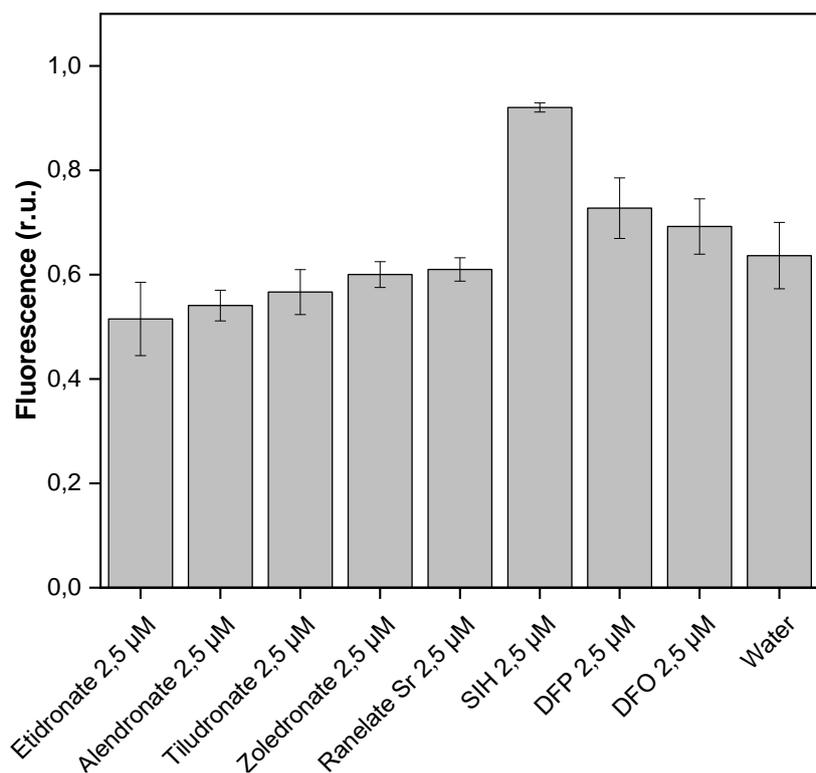


**Figura 40:** Desempenho dos ligantes a 2,5 µM na recuperação da fluorescência da calceína no meio intracelular (HeLa).

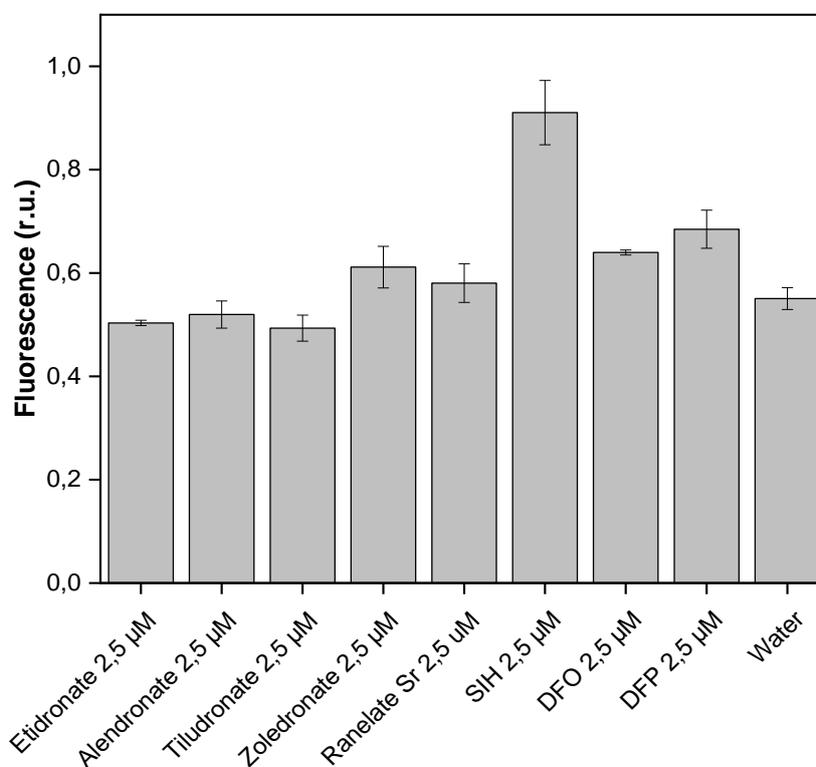


**Figura 41:** Desempenho dos ligantes a 2,5 μM na recuperação da fluorescência da calceína no meio intracelular (HepG2).

Em ambas as situações, a diferença do comportamento em relação ao controle positivo SIH, que recuperou 92% da fluorescência, é evidente. O SIH (salicilaldeído isonicotinil hidrazona) é utilizado como padrão por ser um quelante lipofílico, com alta capacidade de penetração celular e afinidade por ferro intracelular. Mesmo com aumento da concentração dos ligantes para 5 μM, o resultado não foi alterado. A fim de comparação, foram testados também os quelantes já utilizados na terapia, DFP e DFO. Na literatura, foi relatada rápida capacidade de quelação intracelular de DFP, entretanto seu desempenho neste ensaio não foi tão satisfatório como esperado. E para DFO, já se conhece sua baixa capacidade em ingressar nas células (Glickstein *et al.*, 2005). As Figuras 42 e 43 trazem uma melhor visualização dos valores de fluorescência e seus desvios padrão ao término da cinética, onde essa comparação é mais clara.



**Figura 42:** Comparação dos valores de fluorescência dos ligantes testados em HeLa. Os valores de fluorescência dos antirreabsorptivos são similares ao do controle negativo, água, e indicam a não quelação de ferro intracelular.

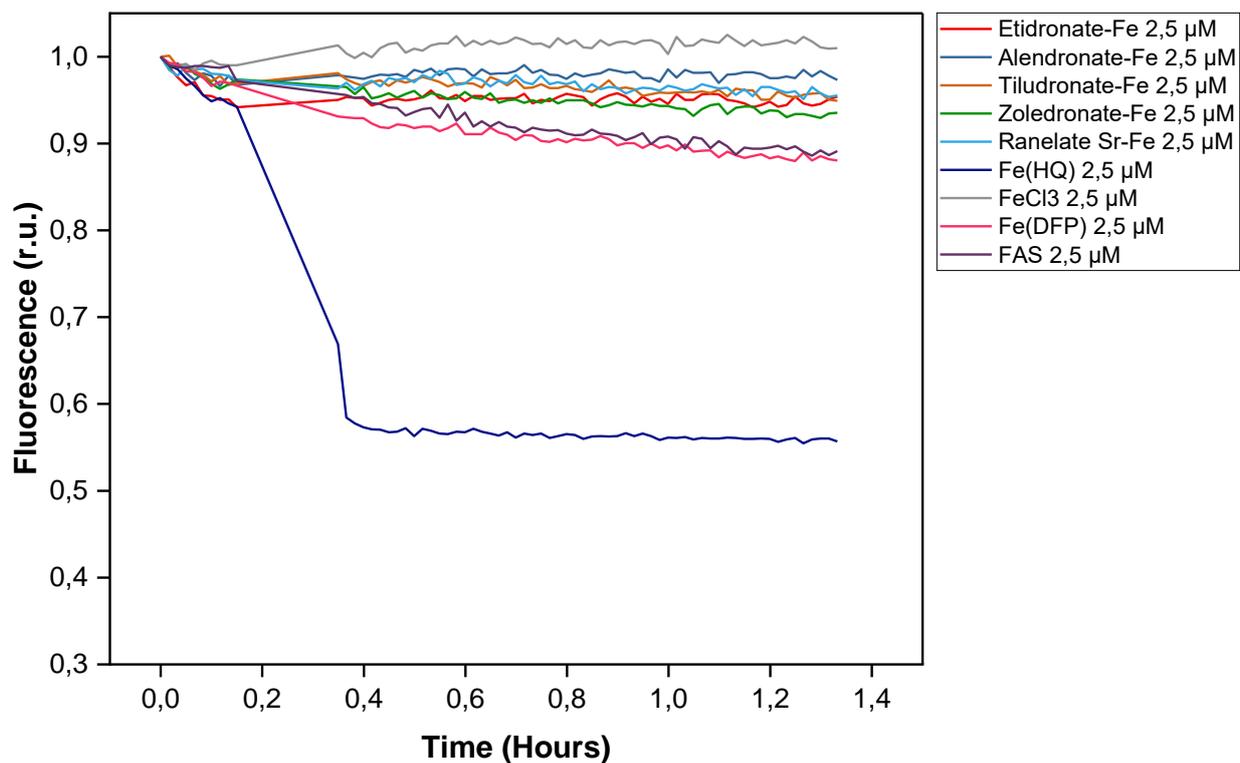


**Figura 43:** Comparação dos valores de fluorescência dos ligantes testados em HepG2. Os valores de fluorescência dos antirreabsorptivos são similares ao do controle negativo, água, e indicam a não quelação de ferro intracelular.

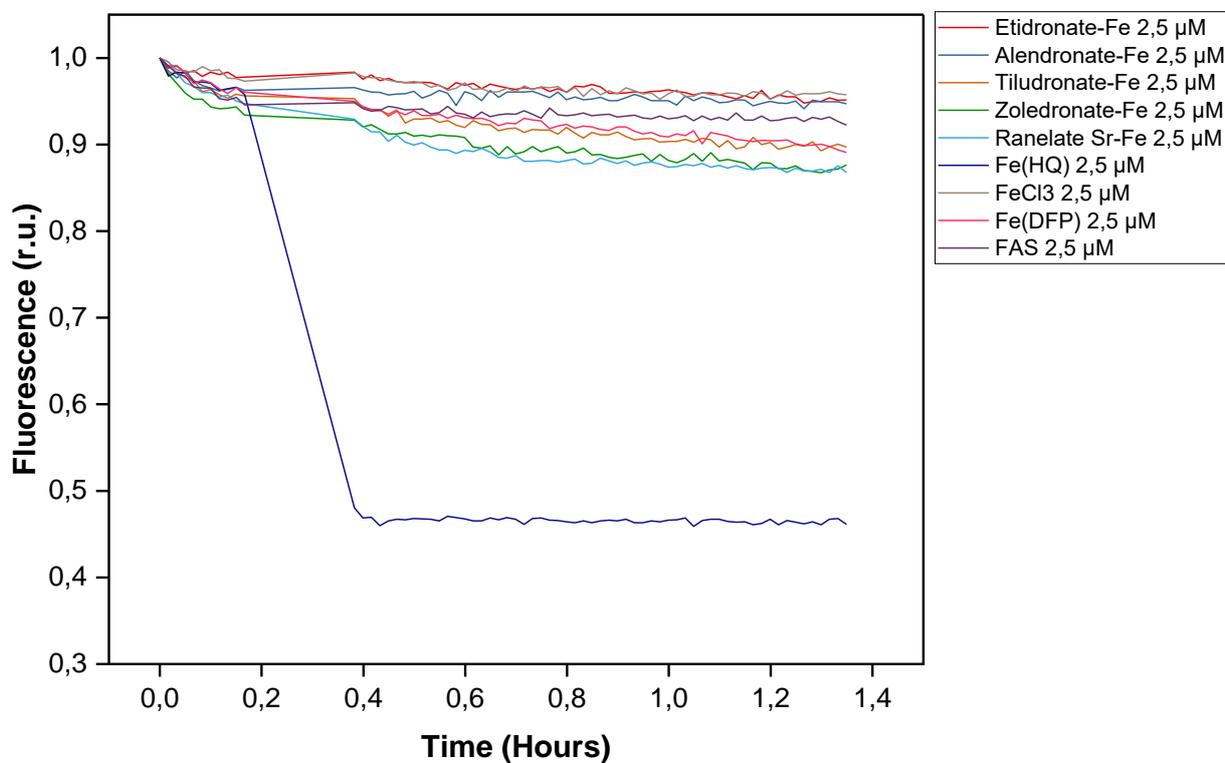
O comportamento dos antirreabsortivos levanta duas hipóteses: 1) ligantes não permearam a célula; 2) houve permeação dos ligantes, porém em quantidade limitada e, portanto, incapaz de competir eficientemente com a calceína pelo ferro nessas baixas concentrações. A primeira possibilidade parece mais sustentável, pois, como visto no estudo de competição com calceína, foi verificada a capacidade dos bisfosfonatos de sequestrar ferro ligado à calceína mesmo a relativamente baixas concentrações (Figura 26). Possivelmente, e de forma semelhante ao que ocorre com semelhante a DFO, a hidrofobicidade dos bisfosfonatos e do ranelato de estrôncio, somada à presença de cargas, impossibilita sua permeação celular e a quelação intracelular de ferro, porém isso não impede seu uso na terapia para equilibrar os níveis plasmáticos de ferro (Glickstein et al., 2005).

### **Transferência de ferro dos antirreabsortivos para a calceína**

Após os resultados de não permeação dos antirreabsortivos livres em ambas as linhagens de células, foram avaliados seus complexos com ferro, a fim de investigar se a coordenação com o metal poderia modificar sua polaridade a ponto de possibilitar a permeação celular. E, ao mesmo tempo, avaliou-se a estabilidade do complexo frente às células. Caso a fluorescência da calceína fosse suprimida, poder-se-ia inferir que o complexo se desfez, para o ferro coordenar-se com a sonda e, formar calceína-ferro, de maneira semelhante ao teste de competição com transferrina feito em tampão HBS/Chelex (Figura 32). O perfil obtido indica que as moléculas não foram capazes de permear as células HeLa (Figura 44) e HepG2 (Figura 45), de maneira similar ao experimento anterior.

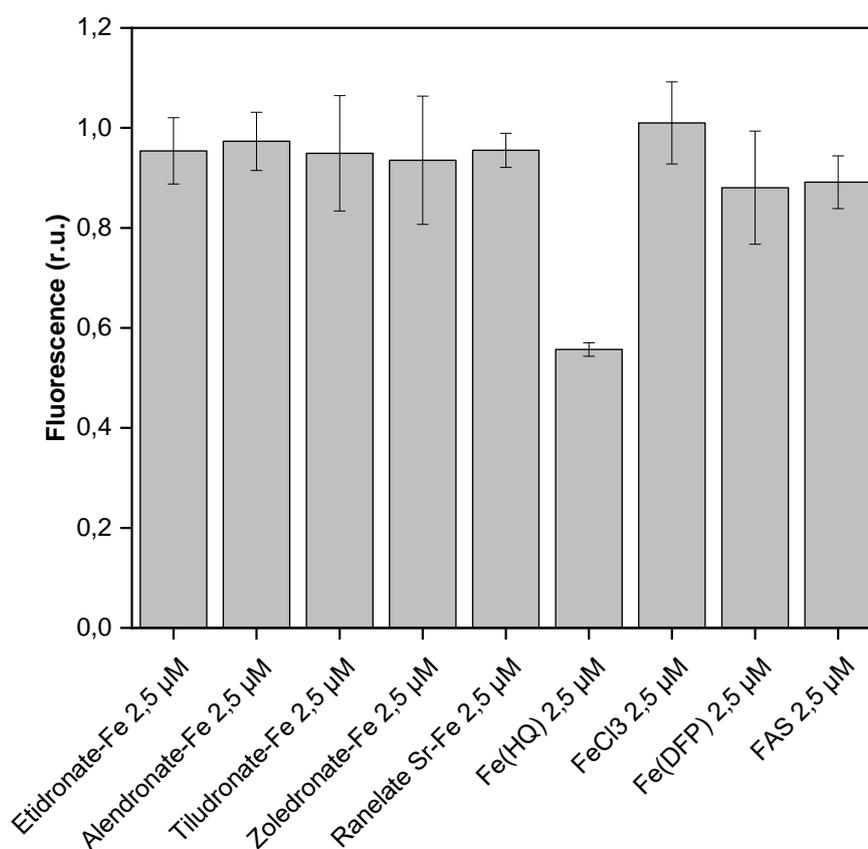


**Figura 44:** Complexos de antirreabsorptivos e ferro em contato com as células HeLa. A fluorescência da calceína intracelular não foi suprimida.

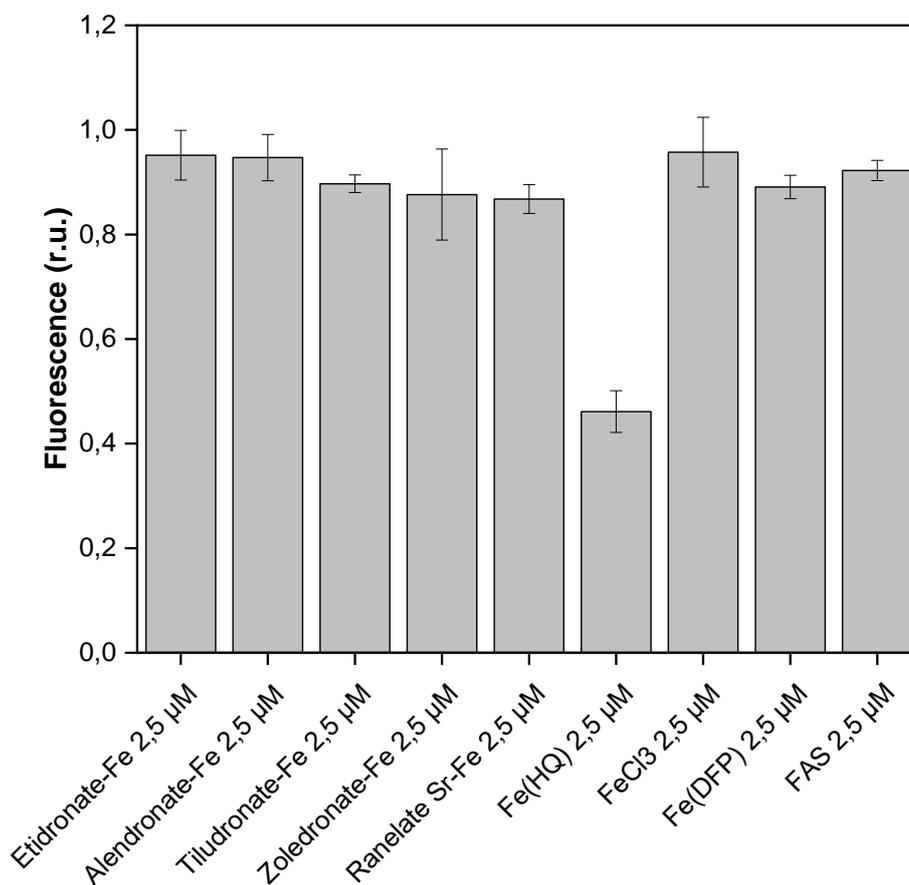


**Figura 45:** Complexos de antirreabsorptivos e ferro em contato com as células HepG2. A fluorescência da calceína intracelular não foi suprimida.

Os cinco antirreabsortivos tiveram perfis semelhantes nas duas linhagens celulares e mantiveram-se estáveis durante todo o tempo do experimento. A fluorescência alta garante que grande parte da calceína permaneceu livre no meio intracelular, sem evidência de intensa complexação com ferro presente nos complexos dos antirreabsortivos, resultado semelhante ao controle negativo, FeCl<sub>3</sub>. Em comparação, o controle positivo Fe(HQ), um complexo lipofílico, permeou a célula e suprimiu cerca de metade da fluorescência da calceína nas duas linhagens. Os valores da última leitura dos experimentos mostram de maneira mais clara os comportamentos encontrados e seus desvios padrão (Figura 46) e (Figura 47).



**Figura 46:** Comparação dos valores de fluorescência dos complexos antirreabsortivos-ferro em células HeLa. Os valores altos de fluorescência indicam a presença de calceína livre e uma não liberação de ferro para o meio intracelular.



**Figura 47:** Comparação dos valores de fluorescência dos complexos antirreabsortivos-ferro em células HepG2. Os valores altos de fluorescência indicam a presença de calceína livre e uma não liberação de ferro para o meio intracelular

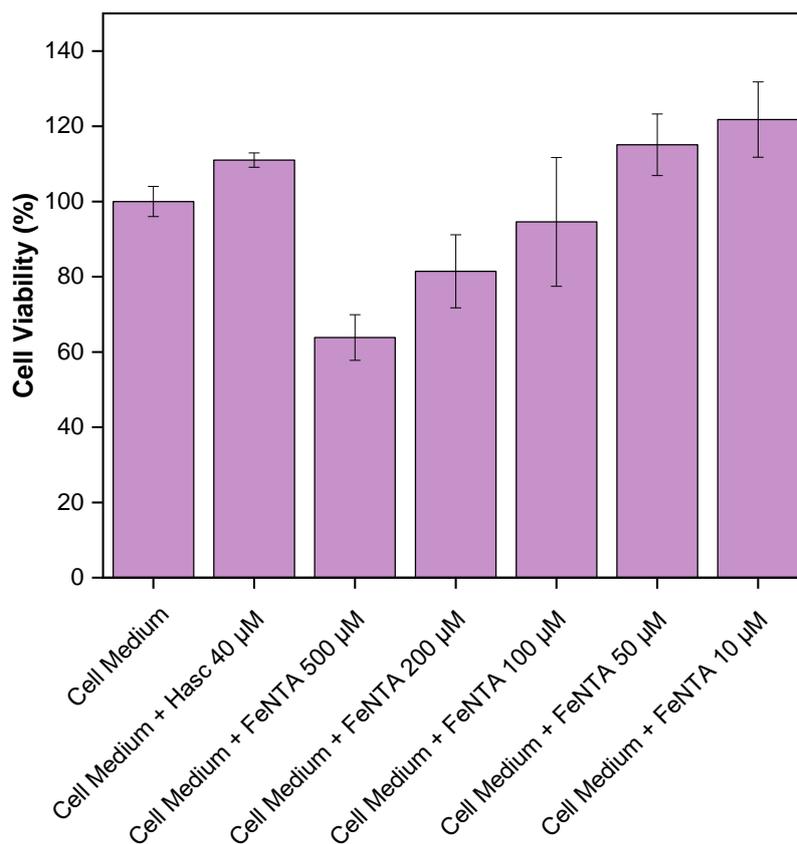
Esses resultados corroboram a hipótese da não permeabilidade por conta da alta polaridade e carga dos compostos testados. Embora quelados com ferro, os bisfosfonatos não tiveram alteração de comportamento e provavelmente se mantiveram no meio extracelular, sem liberar o ferro. Ranelato de estrôncio também teve um comportamento similar, não indicando sua penetração na célula, provavelmente pelas cargas que possui. O complexo Fe(DFP) foi utilizado como controle positivo, e devido à sua alta estabilidade, não era esperado supressão de fluorescência.

## II) Estudos de proteção contra morte por estresse oxidativo

O excesso de ferro está correlacionado ao dano celular devido ao aumento de reservatórios de ferro plasmáticos e citossólicos que promovem a geração de espécies reativas de oxigênio que superam a capacidade celular de defesa e ameaçam sua integridade (Glickstein *et al.*, 2005). Após obter resultados que constataram a não permeabilidade celular dos antirreabsortivos, foi simulado um sistema de excesso de ferro

extracelular, avaliando a capacidade dos antirreabsortivos de proteger as células contra EROs.

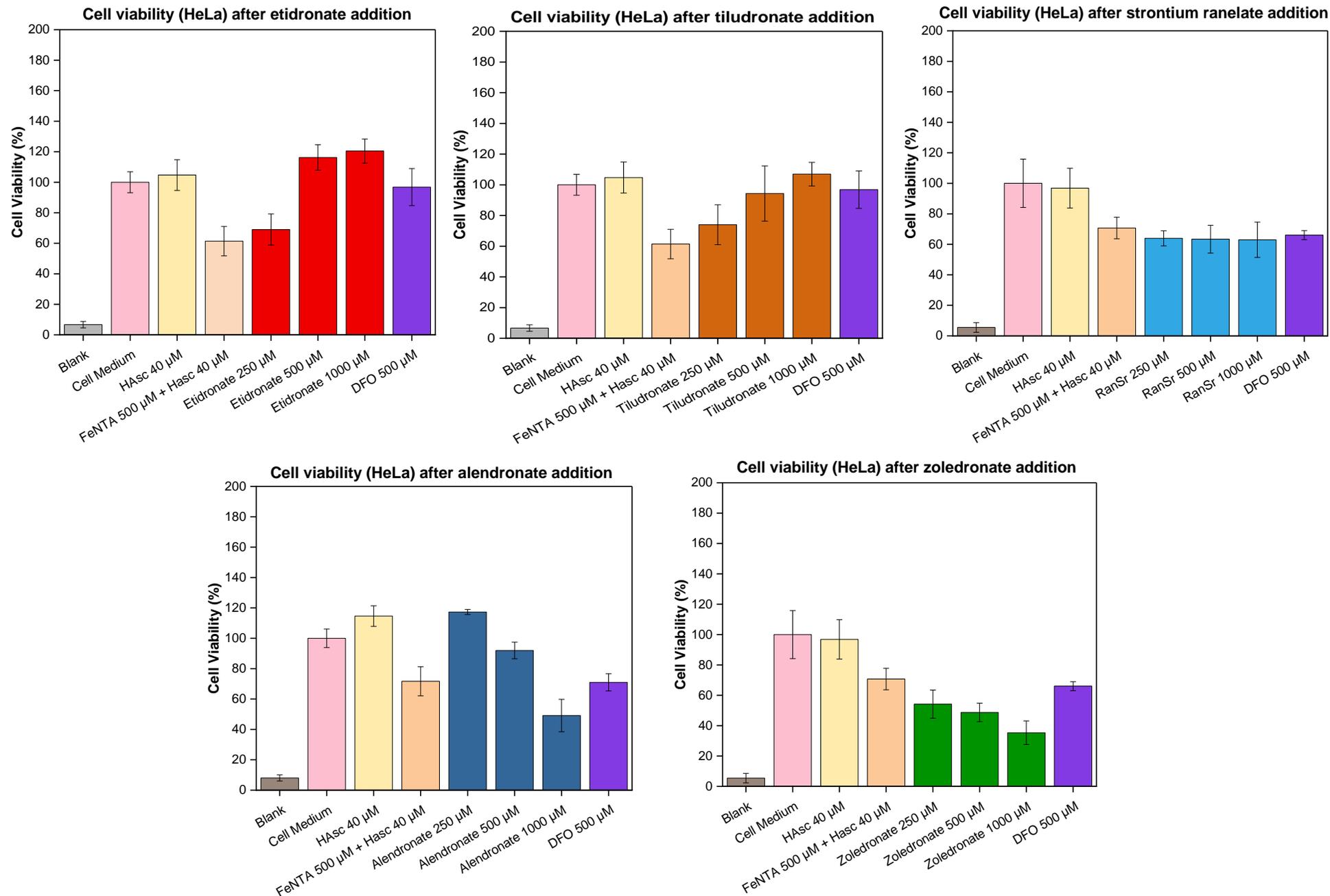
O excesso de FeNTA no meio extracelular induz a produção de EROs que levam à morte celular. Para evitar esse fenômeno, os antirreabsortivos foram adicionados no meio extracelular para quelar ferro e assim proteger as células dos danos oxidativos. Esse ensaio é semelhante ao experimento de atividade antioxidante dependente de ferro (Figura 38), no qual foi verificada a capacidade dos bisfosfonatos de evitarem a formação de radicais livres em tampão. Neste caso, as células foram expostas ao estresse oxidativo provocado pelo ferro. Para isso, foi necessário testar diferentes concentrações de FeNTA que superassem a capacidade antioxidante do meio D10 em que as células são cultivadas. Foram utilizadas as concentrações finais de 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  e 500  $\mu\text{M}$  e escolheu-se trabalhar com 500  $\mu\text{M}$  devido à maior morte celular, com cerca de 40% de redução de viabilidade (Figura 48). Importante ressaltar que todas as concentrações de ferro foram testadas em conjunto com ácido ascórbico 40  $\mu\text{M}$ .



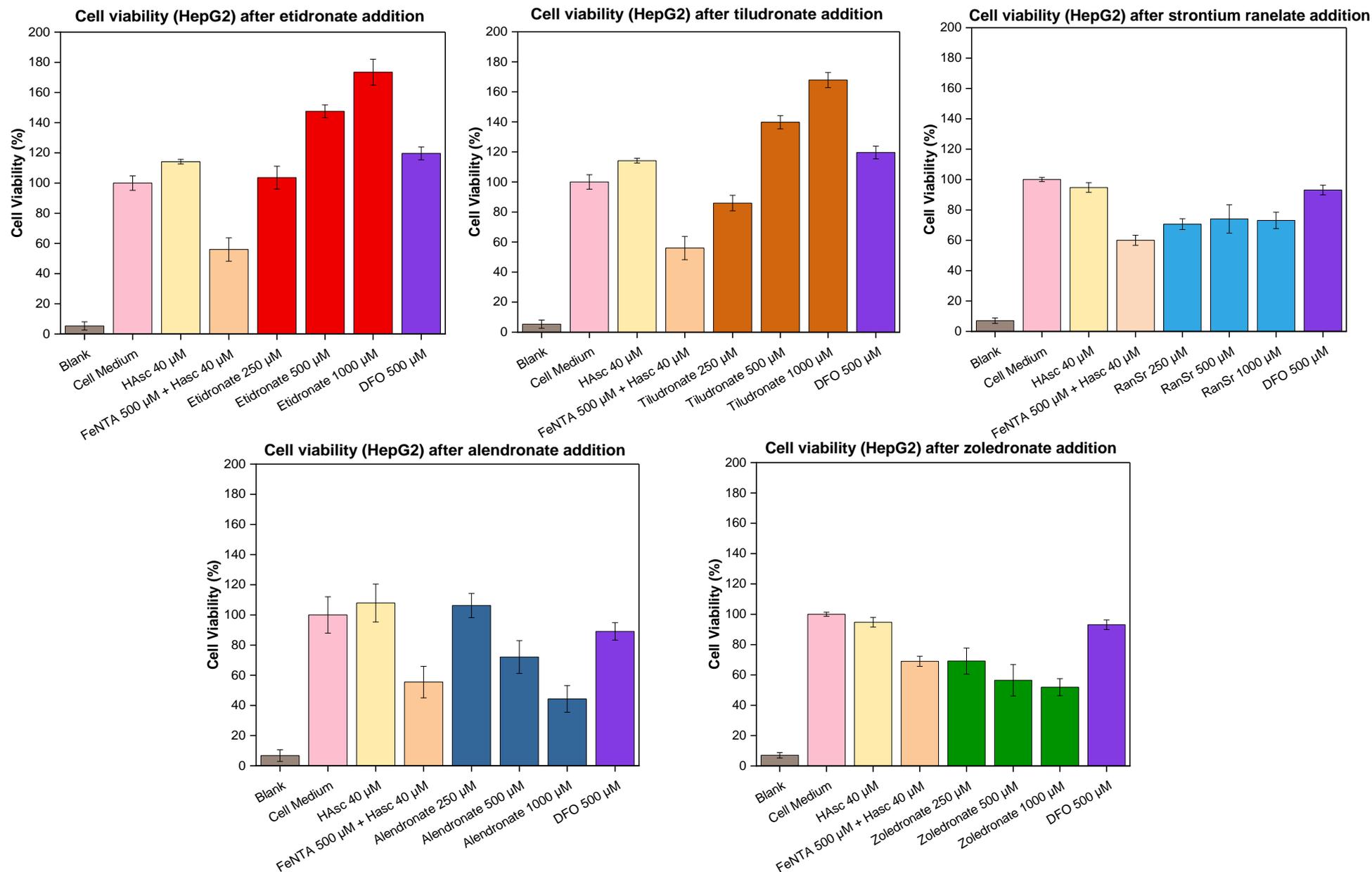
**Figura 48:** Viabilidade celular de células HeLa após exposição a diferentes concentrações de ferro e concentração fixa de ácido ascórbico.

Após estabelecida a concentração de ferro que causou maior letalidade, as concentrações finais de 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$  e 1000  $\mu\text{M}$  de cada antirreabsortivo foram avaliadas em ambas as linhagens celulares HeLa (Figura 49) e HepG2 (Figura 50).

Os comportamentos dos antirreabsortivos puderam ser divididos em dois grupos: 1) os que tiveram ação protetora e 2) os que não tiveram.



**Figura 49:** Porcentagem de sobrevivência de células HeLa com três concentrações dos antirreabsorptivos testados. Todas as colunas representadas com os fármacos foram expostas a FeNTA 500 µM e HAsc 40 µM. Controles: 1. Blank: sem células; 2. Cell medium: crescimento normal das células; 3. DFO: quelante de ferro padrão ouro (para comparação).



**Figura 50:** Porcentagem de sobrevivência de células HepG2 com três concentrações dos antirreabsorptivos testados. Todas as colunas representadas com os fármacos foram expostas a FeNTA 500 µM e HAsc 40 µM. Controles: 1. Blank: sem células; 2. Cell medium: crescimento normal das células; 3. DFO: quelante de ferro para comparação.

Do grupo de ligantes que protegeram as células, encontram-se etidronato e tiludronato, ambos bisfosfonatos de primeira geração, que não contêm nitrogênio em sua estrutura. O efeito protetor foi semelhante nos dois casos, sendo observado um efeito dose-dependente que possibilitou maior número de células viáveis à medida que a concentração aumentou. A proteção pode ocorrer por meio da quelatação de ferro no meio extracelular, que evitou a formação de radicais livres que prejudicam a sobrevivência celular. Nesse caso em específico, os ligantes não demonstraram ser tóxicos para as células nem na concentração mais alta. Esse efeito foi ainda mais evidente para a linhagem HepG2, que quase duplicaram o valor de viabilidade, em comparação ao controle com apenas meio celular.

Os bisfosfonatos alendronato e zoledronato, com nitrogênio na estrutura, demonstraram certa toxicidade às células, diminuindo o número de células viáveis à medida que as concentrações aumentaram. Alendronato, especificamente, demonstrou um efeito protetor apenas na concentração menor, de 250  $\mu\text{M}$ , porém nas outras duas passou a ser tóxico, matando as células. Diferentemente de zoledronato, que se mostrou tóxico em todas as concentrações e nas duas linhagens, não sendo útil para proteção contra o estresse oxidativo. Esse resultado de zoledronato é de extrema relevância pois, coincide com a atividade antiproliferativa relada na literatura (Panagiotakou *et al.*, 2020).

Por fim, o ranelato de estrôncio não demonstrou diferença da viabilidade celular com a variação de concentração, parecendo não alterar o sistema. O controle positivo adotado, DFO, teve certa variação de viabilidade dependendo da placa analisada, porém observou-se um pequeno efeito protetor.

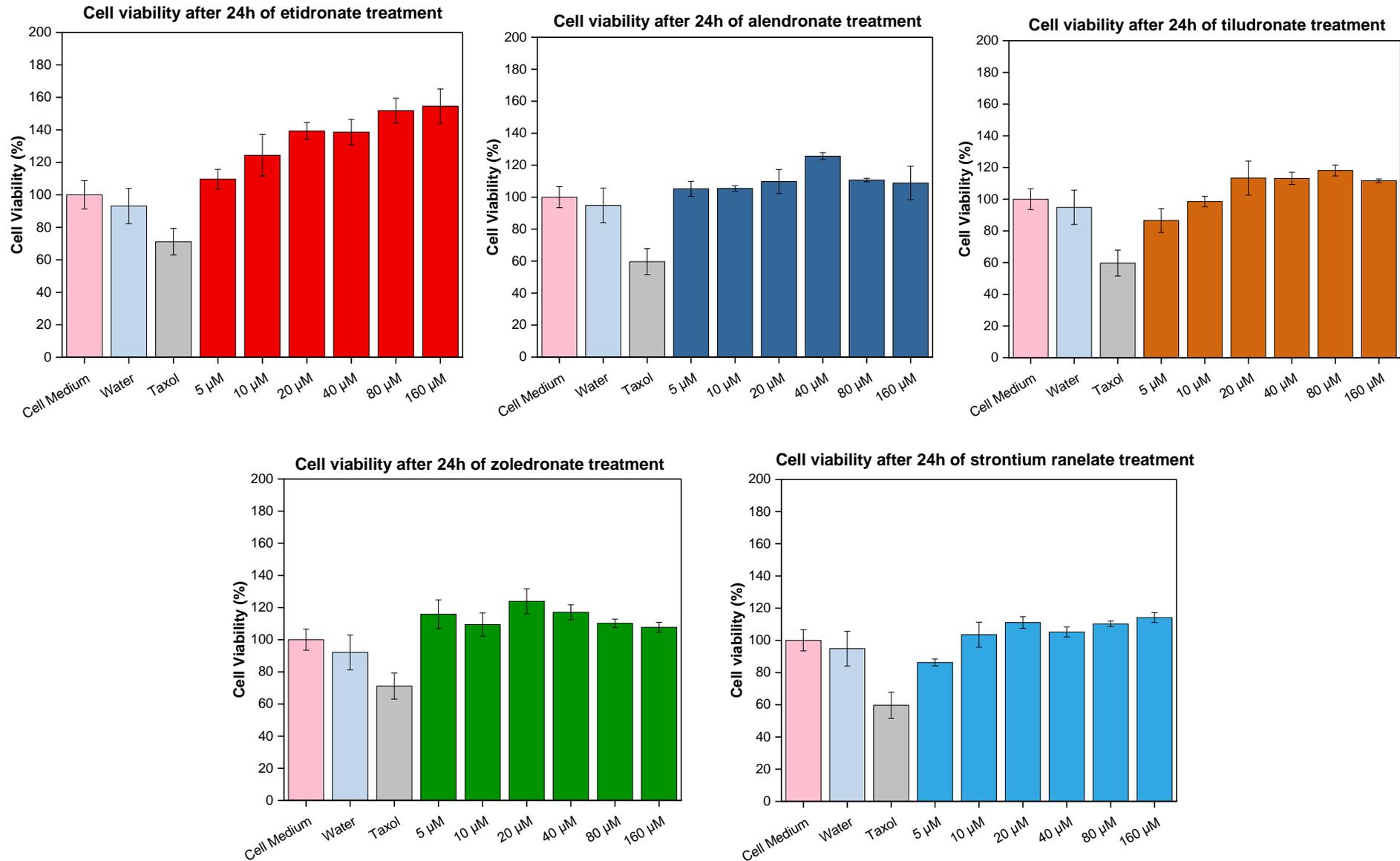
### **III) Estudos antiproliferativos**

Na literatura, existem muitos artigos relatando atividade antiproliferativa dos bisfosfonatos, com relatos de diminuição de câncer de mama (Gnant, 2010; Ou *et al.*, 2017; Panagiotakou *et al.*, 2020), de câncer de colorretal (Rennert *et al.*, 2011) e de câncer próstata (Panagiotakou *et al.*, 2020), entretanto carecem estudos avaliando o desempenho dos bisfosfonatos nas linhagens HeLa e HepG2. Além disso, esse experimento complementa os resultados obtidos no estudo de proteção contra morte por estresse oxidativo, avaliando sua toxicidade.

Vários estudos *in vitro* demonstraram que bisfosfonatos causam efeitos citostáticos e pró-apoptóticos em diferentes linhagens de células tumorais humanas, como de mieloma, mama, próstata e pâncreas (Boissier *et al.*, 2000; Derenne *et al.*, 1999; Senaratne *et al.*,

2000; Shipman *et al.*, 1997; Tassone *et al.*, 2003) de maneira dependente da concentração e do tempo. Nesses estudos utilizaram-se concentrações na faixa de 5 - 2000  $\mu\text{M}$ , que embora pareçam elevadas em comparação com os níveis plasmáticos máximos alcançados pela infusão intravenosa de bisfosfonatos, estão dentro da faixa de concentração que se acredita conter um osso cujo processo de reabsorção está ativo (Green, 2003).

Levando em consideração essas concentrações, os resultados obtidos na faixa de concentração de 5 – 160  $\mu\text{M}$  (24h de tratamento) em células da linhagem HeLa tiveram perfis relativamente semelhantes, sem resultados conclusivos (Figura 47). Nesta faixa de concentração, não se observou nenhuma atividade antiproliferativa contra essa linhagem. Para etidronato, observou-se aumento da viabilidade celular, assim como visto no experimento proteção contra morte por estresse oxidativo (Figura 51).



**Figura 51:** Viabilidade celular (HeLa) após tratamento de 24h com os cinco antirreabsortivos testados em seis concentrações.

# 5

## Conclusões

## 5 CONCLUSÕES

Os experimentos realizados indicam que os bisfosfonatos possuem características importantes de quelantes úteis para terapia de quelação de ferro. São capazes de quelar ferro de maneira relevante, formar complexos solúveis, e tem atividade antioxidante em meio fisiológico. E, apesar de terem sido desenhados para interferir com o metabolismo de  $\text{Ca(II)}$ , este cátion não alterou de modo significativo as reações dependentes de ferro, o que indica que a estratégia de reposicionamento parece se sustentar. Os experimentos celulares demonstram fraca capacidade de permeação celular, impossibilitando o seu uso para quelação de ferro intracelular, entretanto, podem ser úteis em prevenir morte por estresse oxidativo em situação de sobrecarga plasmática de ferro. Por outro lado, a atividade antiproliferativa não foi observada na faixa de concentração testada.

O último antirreabsortivo testado, ranelato de estrôncio, demonstrou não ter propriedades interessantes como quelante de ferro, em nenhum dos experimentos realizados, muito provavelmente devido à presença dos íons de estrôncio que competem com o metal-alvo.

# 6

## **Referências bibliográficas**

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, A.; FERRAZ, A.; CONTRERAS, D.; RODRÍGUEZ, J. Mecanismo e aplicações da reação de fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 623–628, 2007.
- ANDERSON, G. J.; FRAZER, D. M. Current understanding of iron homeostasis. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, p. 1559S-1566S, 2017.
- ANDERSON, L. J.; WONKE, B.; PRESCOTT, E.; HOLDEN, S.; WALKER, J. M.; PENNELL, D. J. Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassaemia. **Lancet**, v. 360, n. 9332, p. 516–520, 2002.
- ANDREWS, N. C. Disorders of Iron Metabolism. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 26, p. 10, 1999.
- ANGELUCCI, E.; BRITTENHAM, G. M.; MCLAREN, C. E.; RIPALTI, M.; BARONCIANI, D.; GIARDINI, C.; GALIMBERTI, M.; POLCHI, P.; LUCARELLI, G. Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 327–331, 2000.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 673–683, ago. 2004.
- ATKINS, P. W. **Shriver & Atkins Inorganic Chemistry**. 5 ed. Oxford University Press. Nova Iorque. 2010.
- BACCAN, M. M.; CHIARELLI-NETO, O.; PEREIRA, R. M. S.; ESPÓSITO, B. P. Quercetin as a shuttle for labile iron. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 107, n. 1, p. 34–39, 2012.
- BARBU, H. M.; ANDREESCU, C. F.; COMANEANU, M. R.; LOREAN, A.; PODARIU, A. C.; BECHIR, A. Effect of strontium ranelate on maxillary bone density. **Revista de Chimie**, v. 66, n. 2, p. 244–246, 2015.
- BARJA, B. C.; HERSZAGE, J.; SANTOS AFONSO, M. DOS. Iron(III)–phosphonate complexes. **Polyhedron**, v. 20, n. 15–16, p. 1821–1830, jun. 2001.
- BLACK, D. M.; ROSEN, C. J. Clinical Practice. Postmenopausal Osteoporosis. **The New England journal of medicine**, v. 374, n. 3, p. 254–62, 2016.
- BLANUSA, M.; VARNAI, V.; PIASEK, M.; KOSTIAL, K. Chelators as Antidotes of Metal Toxicity: Therapeutic and Experimental Aspects. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 23, p. 2771–2794, 1 nov. 2005.
- BOISSIER, S.; FERRERAS, M.; PEYRUCHAUD, O.; MAGNETTO, S.; EBETINO, F. H.; COLOMBEL, M.; DELMAS, P.; DELAISSÉ, J. M.; CLÉZARDIN, P. Bisphosphonates inhibit breast and prostate carcinoma cell invasion, an early event in the formation of bone metastases. **Cancer research**. v. 60, n. 11, p. 2949–54, 1 jun. 2000.

- BREUER, W.; CABANTCHIK, Z. I. A fluorescence-based one-step assay for serum non-transferrin-bound iron. **Analytical Biochemistry**, v. 299, n. 2, p. 194–202, 2001.
- BREUER, W.; HERSHKO, C.; CABANTCHIK, Z. I. The importance of non-transferrin bound iron in disorders of iron metabolism. **Transfusion Science**, v. 23, n. 3, p. 185–192, 2000.
- CABANTCHIK, Z. I.; BREUER, W.; ZANNINELLI, G.; CIANCIULLI, P. LPI-labile plasma iron in iron overload. **Best Practice and Research: Clinical Haematology**, v. 18, n. 2 SPEC. ISS., p. 277–287, 2005.
- CABANTCHIK, Z. I.; SOHN, Y. S.; BREUER, W.; ESPÓSITO, B. P. The molecular and cellular basis of iron toxicity in Iron Overload (IO) disorders. Diagnostic and therapeutic approaches. **Thalassemia Reports**, v. 3, n. 1s, p. 3, 2013.
- CANÇADO, R. D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 316–325, 2007.
- CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C. S. Visão atual da hemocromatose hereditária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 6, p. 469–475, 2010.
- CARBONELL, T.; RAMA, R. Iron, Oxidative Stress and Early Neurological Deterioration in Ischemic Stroke. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 8, p. 857–874, 2007.
- CASTRO, L. F.; SILVA, A. T. DE A.; CHUNG, M.-C.; FERREIRA, A. G.; FERREIRA, E. I. Bifosfonatos (BFs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. **Química Nova**, v. 27, n. 3, p. 456–460, 2004.
- COATES, THOMAS D.; WOOD, J. C. How we manage iron overload in sickle cell patients. **British Journal of Haematology**, v. 177, n. 5, p. 703–716, 2017.
- COATES, THOMAS D; WOOD, J. C. How we manage iron overload in sickle cell patients. **British Journal of Haematology**, v. 177, n. 5, p. 703–716, 2017.
- DANG, T. N.; BISHOP, G. M.; DRINGEN, R.; ROBINSON, S. R. The metabolism and toxicity of hemin in astrocytes. **GLIA**, v. 59, n. 10, p. 1540–1550, out. 2011.
- DATZ, C.; MÜLLER, E.; AIGNER, E. Iron overload and non-alcoholic fatty liver disease. **Minerva Endocrinologica**, v. 42, n. 2, p. 173–183, 2017.
- DERENNE, S.; AMIOT, M.; BARILLÉ, S.; COLLETTE, M.; ROBILLARD, N.; BERTHAUD, P.; HAROUSSEAU, J. L.; BATAILLE, R. Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 12, p. 2048–2056, 1999.
- DESILVA, D.; GUO, J. H.; AUST, S. D. Relationship between Iron and Phosphate in Mammalian Ferritins. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 451–455, jun. 1993.
- DEV, S.; BABITT, J. L. Overview of iron metabolism in health and disease. **Hemodialysis International**, v. 21, p. S6–S20, 2017.

- DIAB, D. L.; WATTS, N. B.; MILLER, P. D. Bisphosphonates. *Em: Osteoporosis*. Fourth Edition. Elsevier, 2013. p. 1859–1872.
- DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: Mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 83, n. 9, p. 1032–1045, 2008.
- EPSZTEJN, S.; KAKHLON, O.; GLICKSTEIN, H.; BREUER, W.; CABANTCHIK, Z. I. Fluorescence analysis of the labile iron pool of mammalian cells. **Analytical Biochemistry**, v. 248, n. 1, p. 31–40, 1997.
- ESPOSITO, B. P.; BREUER, W.; SIRANKAPRACHA, P.; POOTRAKUL, P.; HERSHKO, C.; CABANTCHIK, Z. I. Labile plasma iron in iron overload: Redox activity and susceptibility to chelation. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2670–2677, 2003.
- ESPÓSITO, B. P.; EPSZTEJN, S.; BREUER, W.; CABANTCHIK, Z. I. A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 304, n. 1, p. 1–18, 2002.
- EVANS, R. W.; RAFIQUE, R.; ZAREA, A.; RAPISARDA, C.; CAMMACK, R.; EVANS, P. J.; PORTER, J. B.; HIDER, R. C. Nature of non-transferrin-bound iron: Studies on iron citrate complexes and thalassemic sera. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 57–74, 2008.
- FABRON JR, A.; TRICTA, F. Terapia quelante oral com deferiprona em pacientes com sobrecarga de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 25, n. 3, p. 177–188, 2003.
- FERNANDES, C.; LEITE, R. S.; LANÇAS, F. M. Bisfosfonatos: Síntese, análises químicas e aplicações farmacológicas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 274–280, 2005.
- FLEMING, R. E.; PONKA, P. Iron overload in human disease. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 4, p. 12, 2012.
- GANZ, T.; NEMETH, E. **Hepcidin and iron homeostasis** *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, set. 2012.
- GATTERMANN, N. Therapie der sekundären hämochromatose. **Deutsches Arzteblatt**, v. 106, n. 30, p. 499–504, 2009.
- GLICKSTEIN, H.; EL, R. BEN; SHVARTSMAN, M.; CABANTCHIK, Z. I. Intracellular labile iron pools as direct targets of iron chelators: A fluorescence study of chelator action in living cells. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3242–3250, 2005.
- GOLAN, D. E. et al. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2014
- GNANT, M. Can Oral Bisphosphonates Really Reduce the Risk of Breast Cancer in Healthy Women? **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 22, p. 3548–3551, 1 ago. 2010.
- GOMME, P. T.; MCCANN, K. B.; BERTOLINI, J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 4, p. 267–273, fev. 2005.

- GREEN, J. R. Antitumor effects of bisphosphonates. **Cancer**, v. 97, n. S3, p. 840–847, 1 fev. 2003.
- GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, 2008.
- GROTTO, HELENA Z.W. Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. SUPPL. 2, p. 22–28, 2010.
- GROTTO, HELENA Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. SUPPL. 2, p. 08–17, jun. 2010.
- GUMIENNA-KONTECKA, E.; SILVAGNI, R.; LIPINSKI, R.; LECOUYEY, M.; CESARE MARINCOLA, F.; CRISPONI, G.; NURCHI, V. M.; LEROUX, Y.; KOZLOWSKI, H. Bisphosphonate chelating agents: Complexation of Fe(III) and Al(III) by 1-phenyl-1-hydroxymethylene bisphosphonate and its analogues. **Inorganica Chimica Acta**, v. 339, p. 111–118, 2002.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford University Press, 2007.
- HERSHKO, C. Pathogenesis and management of iron toxicity in thalassemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1202, p. 1–9, 2010.
- HIRAYAMA, T.; NAGASAWA, H. Chemical tools for detecting Fe ions. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 60, n. 1, p. 39–48, 2017.
- HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H.; PETTIT, J. E. Fundamentos em hematologia**. 6 ed. Porto Alegre. Artmed, 2008.
- JOMOVA, K.; VALKO, M. Importance of Iron Chelation in Free Radical-Induced Oxidative Stress and Human Disease. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 31, p. 3460–3473, 2011.
- JOURDAN, J.-P.; BUREAU, R.; ROCHAIS, C.; DALLEMAGNE, P. Drug repositioning: a brief overview. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1145–1151, 10 ago. 2020.
- KANG, J.-H.; KELLER, J. J.; LIN, H.-C. A population-based 2-year follow-up study on the relationship between bisphosphonates and the risk of stroke. **Osteoporosis International**, v. 23, n. 10, p. 2551–2557, 20 out. 2012.
- KONTOGHIORGHES, G. J. Iron Mobilization From Transferrin And Non-Transferrin-Bound-Iron by Deferiprone. Implications in the Treatment of Thalassemia, Anemia of Chronic Disease, Cancer and Other Conditions. **Hemoglobin**, v. 30, n. 2, p. 183–200, 7 jan. 2006.
- KONTOGHIORGHES, GJ. Turning a blind eye to deferasirox's toxicity? **The Lancet**, v. 381, n. 9873, p. 1183–1184, abr. 2013.

- KONTOGHIORGHES, GEORGE J. A record number of fatalities in many categories of patients treated with deferasirox: loopholes in regulatory and marketing procedures undermine patient safety and misguide public funds? **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 12, n. 5, p. 605–609, 21 set. 2013.
- KONTOGHIORGHES, G. J.; KONTOGHIORGHE, C. N. Iron and Chelation in Biochemistry and Medicine: New Approaches to Controlling Iron Metabolism and Treating Related Diseases. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1–43, 2020.
- KUKONGVIRIYAPAN, V.; SOMPARN, N.; SENGGUNPRAI, L.; PRAWAN, A.; KUKONGVIRIYAPAN, U.; JETSRISUPARB, A. Endothelial dysfunction and oxidant status in pediatric patients with hemoglobin E- $\beta$  thalassemia. **Pediatric Cardiology**, v. 29, n. 1, p. 130–135, 2008.
- KULJANIN, J.; JANKOVIĆ, I.; NEDELJKOVIĆ, J.; PRSTOJEVIĆ, D.; MARINKOVIĆ, V. Spectrophotometric determination of alendronate in pharmaceutical formulations via complex formation with Fe(III) ions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 28, n. 6, p. 1215–1220, jun. 2002.
- KULJANIN, J.; JANKOVIĆ, I. J.; NEDELJKOVIĆ, J. N.; PRSTOJEVIĆ, D.; PRSTOJEVIĆ, P.; MARINKOVIĆ, V.; MARINKOVIĆ, M. **Spectrophotometric determination of alendronate in pharmaceutical formulations via complex formation with Fe(III) ions. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/jpba](http://www.elsevier.com/locate/jpba)>.
- KUSHNER, J. P.; PORTER, J. P.; OLIVIERI, N. F. Secondary Iron Overload. **Hematology**, v. 2001, n. 1, p. 47–61, 1 jan. 2001.
- KWIATKOWSKI, J. L. Real-world use of iron chelators. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2011, p. 451–8, 2011.
- LABRANCHE, R.; GILBERT, G.; CERNY, M.; KIM, N. V.; SOULIÈRES, D.; OLIVIÉ, D.; BILLIARD, J.-S.; YOKOO, T.; TANG, A. Liver Iron Quantification with MR Imaging: A Primer for Radiologists 1. **RadioGraphics**, v. 38, p. 392–412, 2018.
- LAVADOS, M.; GUILLÓN, M.; MUJICA, M. C.; ROJO, L. E.; FUENTES, P.; MACCIONI, R. B. Mild cognitive impairment and Alzheimer patients display different levels of redox-active CSF iron. **Journal of Alzheimers Disease**, v. 13, n. 2, p. 225–232, 2008.
- LEVINE, R. S. Pyrophosphates in toothpaste: a retrospective and reappraisal. **British Dental Journal**, v. 229, n. 10, p. 687–689, 2020.
- LIU, Z. D.; HIDER, R. C. Design of iron chelators with therapeutic application. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 232, n. 1–2, p. 151–171, 2002.
- LOPEZ, A.; CACOUB, P.; MACDOUGALL, I. C.; PEYRIN-BIROULET, L. Iron deficiency anaemia. **The Lancet**, v. 387, n. 10021, p. 907–916, 2016.
- LU, N.; YI, L.; DENG, Q.; LI, J.; GAO, Z.; LI, H. The interaction between desferrioxamine and hemin: A potential toxicological implication. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 5, p. 732–735, ago. 2012.

MAHESH, S.; GINZBURG, Y.; VERMA, A. Iron overload in myelodysplastic syndromes. **Leukemia & Lymphoma**, v. 49, n. 3, p. 427–438, 2008.

MAIR, S. M.; WEISS, G. New pharmacological concepts for the treatment of iron overload disorders. **Curr Med Chem**, v. 16, n. 5, p. 576–590, 2009.

MANDAL, S. *Electrochemical Behaviour of Hemin*. 2015.

MASOUD, A. M.; KMAEL, M. F.; TAHA, M. H.; EL-ZAHHAR, A. A. Phosphonates-based chelating materials for optimization iron removal from industrial wastewater experimental methodology and modeling. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 31, p. 2779–2789, mar. 2022.

MEERPOHL, J. J.; SCHELL, L. K.; RÜCKER, G.; FLEEMAN, N.; MOTSCHALL, E.; NIEMEYER, C. M.; BASSLER, D. Deferasirox for managing iron overload in people with myelodysplastic syndrome. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2017, n. 8, 28 out. 2014.

MORABITO, N.; LASCO, A.; GAUDIO, A.; CRISAFULLI, A.; PIETRO, C. DI; MEO, A.; FRISINA, N. Bisphosphonates in the treatment of thalassemia-induced osteoporosis. **Osteoporosis International**, v. 13, n. 8, p. 644–649, 2002.

NAIRZ, M.; WEISS, G. Molecular and clinical aspects of iron homeostasis: From anemia to hemochromatosis. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 118, n. 15–16, p. 442–462, 2006.

NATH, A.; DHARMADHIKARI, J. A.; DHARMADHIKARI, A. K.; MATHUR, D.; MAZUMDAR, S. Ultrafast dynamics of hemin aggregates. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 19, n. 39, p. 26862–26869, 2017.

ORJIH, A. U.; MATHEW, T. C.; CHERIAN, P. T. Erythrocyte membranes convert monomeric ferriprotoporphyrin IX to  $\beta$ -hematin in acidic environment at malarial fever temperature. **Experimental Biology and Medicine**, v. 237, n. 8, p. 884–893, 1 ago. 2012.

OU, Y. J.; CHIU, H. F.; WONG, Y. H.; YANG, C. C.; YANG, Y. H. Bisphosphonate use and the risk of breast cancer: a meta-analysis of observational studies. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v. 26, n. 10, p. 1286–1295, 2017.

OZMENT, C. P.; TURI, J. L. Iron overload following red blood cell transfusion and its impact on disease severity. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1790, n. 7, p. 694–701, 2009.

PACHECO, W. F. ; SEMAAN, F. S. ; ALMEIDA, V. G. K. ; RITTA, A. G. S. L. ; AUCÉLIO, R. Q. **Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos Voltammetry: A Brief Review About Concepts**Rev. Virtual Quim. Disponível em: <<http://www.uff.br/rvq>>.

PANAGIOTAKOU, A.; YAVROPOULOU, M.; NASIRI-ANSARI, N.; MAKRAS, P.; BASDRA, E. K.; PAPAVALASSILIOU, A. G.; KASSI, E. N. **Extra-skeletal effects of bisphosphonates**Metabolism: Clinical and ExperimentalW.B. Saunders, , 1 set. 2020.

- PANTOPOULOS, K.; PORWAL, S. K.; TARTAKOFF, A.; DEVIREDDY, L. Mechanisms of mammalian iron homeostasis. **Biochemistry**, v. 51, n. 29, p. 5705–5724, 2012.
- PARVATHANENI, V.; KULKARNI, N. S.; MUTH, A.; GUPTA, V. Drug repurposing: a promising tool to accelerate the drug discovery process. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 10, p. 2076–2085, 1 out. 2019.
- PEDROTTI, J. J.; ANGNES, L.; GUTZ, I. G. R. Miniaturized Reference Electrodes with Microporous Polymer Junctions. **Electroanalysis**, v. 8, n. 7, p. 673–675, 1996.
- PHUMALA, N.; PORASUPHATANA, S.; UNCHERN, S.; POOTRAKUL, P.; FUCHAROEN, S.; CHANTHARAKSRI, U. Hemin: A possible cause of oxidative stress in blood circulation of  $\beta$ -thalassemia/hemoglobin E disease **Free Radical Research**, 1 fev. 2003.
- PIETRANGELO, A. Hereditary hemochromatosis: Pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Gastroenterology**, v. 139, n. 2, p. 393- 408.e2, 2010.
- PIPERNO, A.; PELUCCHI, S.; MARIANI, R. Inherited iron overload disorders. **Translational Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, p. 1–23, 2020.
- PORTER, J. B. Practical Management of Iron Overload. **British Journal of Haematology**, v. 115, p. 239–252, 2001.
- PUSHPAKOM, S. *et al.* Drug repurposing: Progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 2018.
- RACHMILEWITZ, E. A.; WEIZER-STERM, O.; ADAMSKY, K.; AMARIGLIO, N.; REHAVI, G.; BREDA, L.; RIVELLA, S.; CABANTCHIK, Z. I. Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: Can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1054, p. 118–123, 2005.
- REGAN, R. F.; CHEN, J.; BENVENISTI-ZAROM, L. Heme oxygenase-2 gene deletion attenuates oxidative stress in neurons exposed to extracellular hemin. **BMC Neuroscience**, v. 5, 17 set. 2004.
- RENNERT, G.; PINCHEV, M.; RENNERT, H. S.; GRUBER, S. B. Use of bisphosphonates and reduced risk of colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 9, p. 1146–1150, 2011.
- RISS, TERRY L; MORAVEC, RICHARD A; NILES, ANDREW L; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. **Cell Viability Assays**. 2016.
- ROBINSON, S. R.; DANG, T. N.; DRINGEN, R.; BISHOP, G. M. Hemin toxicity: a preventable source of brain damage following hemorrhagic stroke. **Redox Report**, v. 14, n. 6, p. 228–235, 2 dez. 2009.
- ROGERS, M J; GORDON, S.; BENFORD, H. L.; COXON, F. P.; LUCKMAN, S. P.; MONKKONEN, J.; FRITH, J. C. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. **Cancer**, v. 88, n. 12 Suppl, p. 2961–78, 15 jun. 2000.

- ROUX, C.; GENNARI, C.; FARRERONS, J.; DEVOGELAER, J. P.; MULDER, H.; KRUSE, H. P.; PICOT, C.; TITEUX, L.; REGINSTER, J. Y.; DOUGADOS, M. Comparative prospective, double-blind, multicenter study of the efficacy of tiludronate and etidronate in the treatment of paget's disease of bone. **Arthritis & Rheumatism**, v. 38, n. 6, p. 851–858, 1995.
- SENARATNE, S. G.; PIRIANOV, G.; MANSI, J. L.; ARNETT, T. R.; COLSTON, K. W. Bisphosphonates induce apoptosis in human breast cancer cell lines. **British Journal of Cancer**, v. 82, n. 8, p. 1459–1468, 2000.
- SHIPMAN, C. M.; ROGERS, M. J.; APPERLEY, J. F.; RUSSELL, R. G. G.; CROUCHER, P. I. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: A novel anti-tumour activity. **British Journal of Haematology**, v. 98, n. 3, p. 665–672, 1997.
- SHVARTSMAN, M.; KIKKERI, R.; SHANZER, A.; CABANTCHIK, Z. I. Non-transferrin-bound iron reaches mitochondria by a chelator-inaccessible mechanism: biological and clinical implications. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 293, n. 4, p. C1383–C1394, 2007.
- SILVA, B.; FAUSTINO, P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 7, p. 1347–1359, 2015.
- SOHN, Y. S.; BREUER, W.; MUNNICH, A.; CABANTCHIK, Z. I. Redistribution of accumulated cell iron: A modality of chelation with therapeutic implications. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1690–1699, 2008.
- SONATI, M. F. DE; COSTA, F. F. The genetics of blood disorders: Hereditary hemoglobinopathies. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 4 SUPPL., p. 40–51, 2008.
- SOUTO, E. X. Tratamento de suporte e quelatção de ferro em pacientes com síndromes mielodisplásicas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 28, n. 3, p. 204–209, 2006.
- SULIEMAN, M.; ASLEH, R.; CABANTCHIK, Z. I.; BREUER, W.; ARONSON, D.; SULEIMAN, A.; MILLER-LOTAN, R.; HAMMERMAN, H.; LEVY, A. P. Serum chelatable redox-active iron is an independent predictor of mortality after myocardial infarction in individuals with diabetes. **Diabetes Care**, v. 27, n. 11, p. 2730–2732, 2004.
- SULLIVAN, S. G.; BAYSAL, E.; STERN, A. Inhibition of hemin-induced hemolysis by desferrioxamine: binding of hemin to red cell membranes and the effects of alteration of membrane sulfhydryl groups. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1104, n. 1, p. 38–44, fev. 1992.
- TAHER, A. T.; SALIBA, A. N. Taher A.T., Saliba A.N.: Iron overload in thalassemia: different organs at different rates. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2017, 2017(1): 265–271. p. 265–271, 2017.

TASSONE, P.; TAGLIAFERRI, P.; VISCOMI, C.; PALMIERI, C.; CARAGLIA, M.; D'ALESSANDRO, A.; GALEA, E.; GOEL, A.; ABBRUZZESE, A.; BOLAND, C. R.; VENUTA, S. Zoledronic acid induces antiproliferative and apoptotic effects in human pancreatic cancer cells in vitro. **British Journal of Cancer**, v. 88, n. 12, p. 1971–1978, 16 jun. 2003.

**TOMA, H. E. Química Bioinorgânica e Ambiental.** Coleção Química Conceitual – Vol 5. 1. Ed. São Paulo: Blucher, 2015.

WIDLER, L. *et al.* Highly potent geminal bisphosphonates. From pamidronate disodium (Aredia) to zoledronic acid (Zometa). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 17, p. 3721–3738, 15 ago. 2002.

WISHART, D. S. *et al.* DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D1074–D1082, 2018.

WORWOOD, M.; MAY, A. Iron deficiency anaemia and iron overload. *Em: Dacie and Lewis Practical Haematology*. 10 Ed ed. Elsevier, 2012. p. 175–200.

ZHOU, T.; MA, Y.; KONG, X.; HIDER, R. C. The therapeutic potential of metal-based antimalarial agents: Implications for the mechanism of action. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 21, p. 6335–6349, 2012.

ZORODDU, M. A.; AASETH, J.; CRISPONI, G.; MEDICI, S.; PEANA, M.; NURCHI, V. M. The essential metals for humans: a brief overview. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 195, n. March, p. 120–129, 2019.

## 7 SÚMULA CURRICULAR

### **DADOS PESSOAIS**

Nome: Julia Tiemy Leal Konno

Local e Data de Nascimento: São Paulo, SP, Brasil – 21/11/1997

E-mail: [juhtiemy.my@gmail.com](mailto:juhtiemy.my@gmail.com)

CV Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0169970715266317>

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-9555-568X>

### **EDUCAÇÃO**

**2014**

**Ensino Fundamental e Médio**

Colégio Magno/Mágico de Oz, São Paulo, Brasil

**2016 – 2020**

**Graduação em Farmácia**

Centro Universitário São Camilo, USC, Brasil.

Título do Trabalho de Conclusão de Curso: Avaliação da capacidade de aciclovir como quelante de ferro.

Orientador: Fredson Torres Silva

**2019 – 2020**

**Iniciação Científica**

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título do projeto: Desferrioxamina-caféina: permeabilidade e interação com biopolímeros.

Orientador: Breno Pannia Espósito

Bolsista da: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

## **FORMAÇÃO COMPLEMENTAR**

- 2020** Radiofármacos e Suas Aplicações  
(Carga horária: 15h)  
Universidade Federal do Maranhão, UFMA, Brasil.
- 2021** Introdução ao Software R  
(Carga horária: 12h)  
Experimental Analytics Corporation, EAC, Brasil.
- 2023** Espectrometria de Massas – MALDI-TOF/TOF  
(Carga horária: 24h)  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
- 2023** Fundamentos teóricos e práticos de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
(Carga horária: 10h)  
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

## **ATIVIDADES PROFISSIONAIS**

- 2019** Estagiária em Farmácia Comunitária  
Igreja Nossa Senhora do Rosário da Pompéia, São Paulo, Brasil.
- 2019 – 2020** Estagiária na Clínica PROMOVE São Camilo  
São Paulo, Brasil.
- 2019 – 2020** Presidente da Liga Acadêmica de Química Medicinal  
Centro Universitário São Camilo, USC, São Paulo, Brasil.
- 2019 – 2020** Representante Discente no Colegiado do Curso de Farmácia  
Centro Universitário São Camilo, USC, São Paulo, Brasil.
- 2019 – 2020** Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.

**2020** Estagiária no Hospital São Camilo Pompéia  
São Paulo, Brasil.

**2021 – 2023** Bolsista da Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São  
Paulo, FAPESP, Brasil.

## **PUBLICAÇÕES**

### **Resumos**

45ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. The possibility of repositioning bisphosphonates for the treatment of iron overload. 2022. (Congresso).