

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

Renata Mendes Moura

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTITUMORAL DO DENDRÍMERO DE POLIGLICEROL SALICILADO EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Materiais para
Engenharia como requisito parcial à
obtenção do título de *Mestre em Materiais
para Engenharia*

Orientador: Prof. Álvaro Antonio Alencar de Queiroz, Dr.

Itajubá

2011

Avaliação do potencial citotóxico e antitumoral do dendrímero de pliglicerol salicilo em diferentes linhagens celulares.

Renata Mendes Moura

O presente trabalho foi desenvolvido no Centro de Estudos e Inovação em Materiais Funcionais Avançados da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI) e Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo (IPEN/USP). O trabalho esteve sob orientação do Professor Alvaro Antonio Alencar de Queiroz na vigência dos auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Aprovado em

Olga Zazuco Higa

Centro de Biotecnologia - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN

Daniela Sachs

Centro de Estudos e Inovação em Materiais Funcionais Avançados da Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI

Álvaro Antonio Alencar de Queiroz

Centro de Estudos e Inovação em Materiais Funcionais Avançados da Universidade Federal de Itajubá - UNIFEI

Itajubá
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

Renata Mendes Moura

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTITUMORAL DO DENDRÍMERO DE POLIGLICEROL SALICILADO EM DIFERENTES LINHAGENS CELULARES

Dissertação aprovada por banca examinadora em 12 de abril de 2011, conferindo
ao autor o título de ***Mestre em Materiais para Engenharia***

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Álvaro Antonio Alencar de
Queiroz (Orientador)

Prof.Dra Daniela Sachs

Profa. Dra Olga Zazuco Higa

Itajubá

2011

Agradecimentos:

Em primeiro lugar a Deus que me deu determinação e saúde para que essa vitória fosse possível.

Ao professor Dr. Alvaro Antônio Alencar de Queiroz, meu orientador, que não mediu esforços para que este trabalho fosse realizado, por me guiar com sabedoria nessa etapa da minha vida acadêmica, pela compreensão, amizade e pelas oportunidades que me foram dadas.

À professora Dra Olga Zazuco Higa que gentilmente me recebeu no IPEN e possibilitou este trabalho.

À professora Dra Maria Aparecida Pires Camillo que com muita presteza me ensinou sobre cultura celular e ensaios de viabilidade, desenvolvendo meus conhecimentos práticos e científicos.

À Dra Andrea Cecília Dorion Rodas que prontamente ajudou nos testes de microscopia fluorescente.

À minha irmã Fernanda e meu cunhado Carlos que me apoiaram e acolheram com muito carinho em São Paulo e ao pequeno Fabrício que chegou trazendo muita felicidade.

À minha mãe Judite, meu pai Vitor e ao meu irmão Juninho que com amor sempre me incentivaram nesta jornada.

Aos professores do curso de mestrado em Materiais para Engenharia pelo conhecimento e embasamento científico.

Aos colegas do mestrado, pela amizade e companhia.

Aos funcionários da UNIFEI e do IPEN.

À CAPES pelo suporte financeiro.

Enfim, a todos que, com seus conhecimentos, incentivos e críticas colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

Lista de Figuras e Tabelas.....	viii
Lista de Abreviações.....	xii
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii
 CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1: Objetivos.....	3
1.2: Estrutura da dissertação.....	4
Referências Bibliográficas.....	5
 CAPÍTULO 2: CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	6
Referências Bibliográficas.....	18
 CAPÍTULO 3: INFLAMAÇÃO E CÂNCER.....	22
3.1. Epidemiologia do Câncer	22
3.2. O mecanismo da inflamação.....	26
3.3. A relação do câncer com o processo inflamatório.....	33
3.4. Antiinflamatórios não esteroidais (AINES) e câncer.....	41
3.4.1. Ácido Acetilsalicílico.....	43
3.5 Dendrímeros como transportadores de AINEs: Conjugação versus encapsulamento	48
3.5.1 Dendrimero de Poliglicerol.....	56
Referências Bibliográficas.....	58
 CAPÍTULO 4: MATERIAIS E METODOS.....	66

4.1. Materiais e equipamentos utilizados.....	66
4.2. Síntese do PGLD-AAS	68
4.3. Linhagens celulares utilizadas.....	69
4.3.1. Célula pulmonar humana de 14 semanas de gestação (MRC-5) de origem fibroblástica.....	69
4.3.2. Célula pulmonar tumoral (carcinoma) A-549.....	70
4.3.3. Célula óssea tumoral MG-63 (ECACC)	71
4.3.4. Célula CHO-k1	72
4.4. Metodologias utilizadas	73
4.4.1. Determinação da viabilidade celular.....	73
4.4.2. Preparo das linhagens celulares para cultura.....	74
4.4.3. Preparação do meio de cultura para o ensaio de bioatividade do PGLD-AAS.....	77
4.4.4. Preparação do PGLD e PGLD-AAS.....	77
4.4.5 Microscopia ótica por coloração diferencial fluorescente.....	79
Referências Bibliográficas.....	80
 CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
5.1. Síntese e caracterização físico-química.....	82
5.2. Estudo in vitro em linhagens tumorais da citotoxicidade do PGLD-AAS.....	89
5.3. Análise morfológica: Coloração diferencial por Laranja de Acridina/Brometo de Etídeo.....	94
Referências Bibliográficas.....	108

CAPÍTULO 6: CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
Referências Bibliográficas.....	116
CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES.....	118
CAPÍTULO 8: PERSPECTIVAS FUTURAS.....	120

Lista de Figuras e Tabela

Figura 1.1: Algumas proteínas globulares e sua função no organismo biológico.....	1
Figura 1.2: Ilustração da comparação entre a estrutura supramolecular de uma enzima (A) e de um dendrímero de geração 2.....	2
Figura 2.1- Campos de atuação em medicina dos sistemas nanométricos segundo Fundação Europeia de Ciência.....	7
Figura 2.2- Tamanho dos sistemas nanoscópicos de liberação controlada.....	8
Figura 2.3- Nanosistemas para a entrega local ou sistêmica de fármacos.....	9
Figura 2.4- Evolução temporal das arquiteturas de macromoléculas orgânicas.....	10
Figura 2.5- Esquema da estrutura dos dendrímeros.....	11
Figura 2.6- Ilustração das estruturas químicas dos dendrímeros PAMAM e PPID.....	11
Figura 2.7- Mecanismo de ação dos dendrímeros como antivirais.....	12
Figura 2.8- Dendrímero de poliglicerol (PGLD) de gerações 3 (G-3) e 4 (G-4).....	13
Figura 2.9- Estrutura do poli(etileno glicol) hiperramificado.....	14
Figura 2.10- Os professores Rainer Haag e Holger Frey.....	14
Figura 2.11- Ilustração do sulfato de poliglicerol.....	15
Figura 3.1: Estimativa de novos casos de neoplasia em e sua localização primária no Brasil no ano de 2010.....	24
Figura 3.2: Incidência dos tipos de câncer (A) e Mortalidade do câncer no Mundo (B) em 2008.....	25
Figura 3.3- Fases do processo inflamatório.....	27
Figura 3.4: Diapedese.....	28
Figura 3.5: Esquema simplificado do processo inflamatório.....	29

Figura 3.6. Ação da Ciclooxigenase:	31
Figura 3.7: Síntese de prostaglandina via ácido araquidônico.....	33
Figura 3.8: Inflamação normal e neoplásica.....	35
Figura 3.9: Formação de neovasos no processo angiogênico e massa tumoral nutrida por essa nova rede de capilares.....	38
Figura 3.10: Infiltrado inflamatório no carcinoma mamário.....	39
Figura 3.11: Metástase.....	40
Figura 3.12: Esquema do mecanismo de ação da Ciclooxigenase.....	42
Figura 3.13: Hoffmann e a árvore do salgueiro; manuscrito original sobre a síntese de ácido acetilsalicílico.....	44
Figura 3.14: Esquema Químico da síntese de Acido Acetilsalicílico a partir da casca do salgueiro.....	45
Figura 3.15: Fórmula estrutural do Acido Acetilsalicílico.....	47
Figura 3.16: Ilustração demonstrando um transportador de fármaco.....	49
Figura 3.17: Primeira tentativa da síntese dendrímica.....	50
Figura 3.18: Arquitetura de um Dendrímero.....	51
Figura 3.19: Representação do método de síntese divergente de dendrímeros.....	52
Figura 3.20: Representação do método de síntese convergente de dendrímeros.....	52
Figura 3.21: Formas de associação do agente bioativo com o dendrímeros.....	54
Figura 3.22: Dendrímero de Poliglicerol.....	57
Figura 4.1: Ilustração da estrutura do PGLD-AAS utilizado nesse trabalho.....	68
Figura 4.2: Micrografia Cultura da linhagem MRC-5.....	69
Figura 4.3: Micrografia da cultura da linhagem celular A-549.....	70
Figura 4.4: Micrografia da cultura da linhagem celular MG-63.....	71
Figura 4.5: Micrografia da cultura da linhagem celular MG-63.....	72

Figura 4.6: Vials com linhagem celular retirados do nitrogênio líquido e frasco contendo linhagem celular cultivada.....	74
Figura 4.7 Esquema da cultura celular.....	75
Figura 4.8: Ilustração Câmara de Neubauer demonstrando a pipetagem da suspensão celular.....	75
Figura 4.9: Ilustração da divisão em quadrantes de uma Câmara de Neubauer e Câmara de Neubauer.....	76
Figura 4.10: Amostras de AAS, PGLD e PGLD-AAS.....	78
Figura 5.1: - Nanopartículas isotrópicas que atuam como sistemas transportadores de fármacos.....	83
Figura 5.2: Nanocápsulas isotrópica (A) e anisotrópicas.....	83
Figura 5.3: Ilustração do processo de síntese do PGLD utilizando a rota sintética de Williamson.....	85
Figura 5.4: Espectros de ^1H -RMN (A) e ^{13}C -RMN (B).....	86
Figura 5.5: Espectro Maldi-Tof do PGLD (G3).....	87
Figura 5.6: Perfil cromatográfico CLAE do PGLD (G3).....	88
Figura 5.7: Comparação dos perfis de eluição por CLAE do AAS (A) e do conjugado PGLD-AAS (B).....	89
Figura 5.8: Mecanismo do ensaio de viabilidade celular utilizando-se o MTS.....	91
Figura 5.9: Ensaio de viabilidade celular para o PGLD-AAS e PGLD.....	92
Figura 5.10: Efeito da concentração do PGLD-AAS e ácido acetilsalicílico na viabilidade celular.....	93
Figura 5.11: Micrografias do controle da linhagem A-549, corada com laranja de acridina e brometo de etídio e a linhagem A-549 após incubação com PGLD	95
Figura 5.12: Linhagem celular A-549 na presença de AAS livre (A, B) e PGLD-AAS.....	96

Figura 5.13: Micrografias do controle da linhagem MG63, corada com laranja de acridina e brometo de etídio e a linhagem MG63 após incubação com PGLD	97
Figura 5.14: Linhagem celular MG63 na presença de AAS livre e PGLD AAS.....	98
Figura 5.15: Micrografias do controle da linhagem MRC-5, corada com laranja de acridina e brometo de etídio e a linhagem MRC-5 após incubação com PGLD	99
Figura 5.16: Linhagem celular MRC-5 na presença de AAS livre e PGLD AAS.....	100
Figura 5.17: Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose.....	101
Figura 5.18: Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por necrose.....	101
Figura 5.19: Efeitos do tratamento com PGLD-AAS sobre a frequência de células MG63, MRC-5 e A-549 nas vias de degeneração necrose e apoptose.....	103
Figura 5.20: Comparativo entre as linhagens MRC-5 fibroblástica normal e MG-63 fibroblastica tumoral.....	104
Figura 5.21 Comparativo entre as linhagens MRC-5 fibroblastica normal (A) e A-549 tumoral epitelial.....	104
Figura 5.22: Estrutura da membrana plasmática segundo o modelo de mosaico fluído.....	105
Figura 5.23: Representação esquemática das diferentes vias de endocitose.....	106
Figura 5.24: Microscopia de fluorescência das linhagens celulares A-549 (A) e MRC-5 (B) após exposição ao PGLD-AAS.....	107
Tabela 1: Preparo das diluições do controle positivo e das amostras de PGLD, PGLD-AAS e AAS em solução tampão PBS, pH 7.4.....	78

Lista de Abreviações

¹³C-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

15(*R*)-HETE – 15 (*R*)-hidroxieicosatetraenóico

¹H-RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Próton

A-549 – Linhagem de Célula pulmonar tumoral (carcinoma)

AA – Ácido Araquidônico

AAS – Ácido acetilsalicílico

a.C. – Antes de Cristo

AINEs – Antiinflamatórios Não Esteróides

ALP – Fosfatase alcalina

ATCC – Coleção de Cultura do Tipo Americana

bFGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos b

BE – Brometo de Etídio

BMP – Proteína óssea morfogenética

Ca- Cálcio

CAM – Molécula de adesão celular

CHO-k1 (CHO) – Cultura de Células de Ovário de Hamster Chinês

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLICS – Transportadores independente das vias da clatrina e dinamina

C¹⁸O₂ - Gás Carbônico

COX – Enzima ciclooxigenase

COX-1 – Enzima ciclooxigenase-1

COX-2 – Enzima ciclooxigenase-2

COX-3 – Enzima ciclooxigenase-3

DCIS – Carcinoma Ductal *in situ*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DMA – Dimetilaminopiridina

DMF – Dimetilformamida

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

ECACC – Coleção Européia de Cultura Celulare

ECM – Matriz extracelular

EDTA – Ácido etilenediaminotetraacético

EMEM – Meio mínimo essencial de Eagle

EPR – reforço da permeação e retenção

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

G1 – Fase Gap 1 do Ciclo Celular

G2 – Geração 2

G3 – Geração 3

G4 – Geração 4

GEEC – Proteína glicosil fosfatidilinositol ancorada nos compartimentos endossômicos

12-HETE – 12-Hidroxiácido eicosatetraenóico

HSV- herpes simplex virus

IARC - Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer

IC50% – Índice de Citotoxicidade de 50%

Ig – Imunoglobulina

IL-1 – Interleucina-1

IL-2 – Interleucina-2

IL-12 – Interleucina-12

Inca - instituto nacional do câncer

IPEN – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares

LA– Laranja de Acridina

LO – Lipoxigenase

LT **A₄** – Leucotrieno A4

LT **B₄** – Leucotrieno B4

LT **C₄** – Leucotrieno C4

LT **D₄** – Leucotrieno D4

LT **E₄** – Leucotrieno E4

LX – Lipoxina

LX **A₄** – Lipoxina A4

MCF-7 – Linhagem Celular do Câncer de Mama

MG-63- Célula óssea tumoral

MRC-5 - Célula pulmonar humana

MTS – Corante Supravital do Composto Tetrazólico

NIH- Instituto Nacional de Saúde (EUA)

NSCLC- Câncer de pulmão de não pequenas células

O₂ – Oxigênio

OMS – Organização Mundial de Saúde

p53 – Gene ou Proteína p53

PAF – Fator de agregação plaquetária

PAMAM – Poli(amido amina)

PBS – Solução Tampão Fosfato

PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta

PEAD – Polietileno de alta densidade

PEG – Poli(etileno glicol)

PGD₂ – Prostaglandina D2

PGE₂ – Prostaglandina E2

PGF₂ – Prostaglandina F2

PGF₂-α – Prostaglandina F-2 alfa

PGG – Prostaglandina G

PGG₂ – Prostaglandina G2

PGH – Prostaglandina H

PGI₂ – Prostaglandina I2

PGL – Poliglicerol Oligomérico

PGLD – Poliglicerol Dendrítico

PGLD-AAS – Poliglicerol Dendrítico conjugado com o Ácido Acetilsalicílico

PGs – Prostaglandinas

pH – Potencial Hidrogeniônico

PMS – Agente Acoplador de Elétrons

PPI – Poli(propileno imina)

PPID – Dendrímero Poli(propileno imina)

SFB – Soro Fetal Bovino

SH2 – Src homólogo 2

SPL 7435 – Dendrímeros que possuem atividade citotóxica

TAM – Macrófagos associados a tumores

Tg – Temperatura de Transição Vítrea

TGF – Fator de crescimento transformador

TGF-α – Fator de crescimento transformador alfa

TGF- β – Fator de crescimento transformador beta

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

Tx – Tromboxano

TX A₂ – Tromboxano A₂

TX B₂ – Tromboxano B₂

UNIFEI – Universidade Federal de Itajubá

USP – Universidade de São Paulo

VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial

RESUMO

O câncer é sem dúvida uma das doenças mais devastadoras deste século. Em 2007 causou 7,6 milhões de mortes. A necessidade de tratamentos mais eficazes tem motivado o trabalho de pesquisadores de todo o mundo. Dos inúmeros novos tratamentos e medicamentos, os dendrímeros, uma forma única de nanotecnologia surge como esperança. Esses promissores nanotransportadores têm a capacidade de detectar uma célula cancerosa e invadem a célula imitando vírus liberando potentes quimioterápicos no interior tumor. Os benefícios deste novo tratamento são o aumento do poder da droga na eliminação do câncer e a redução dos seus efeitos secundários tóxicos quando administrado regularmente. A síntese de derivados do ácido acetilsalicílico, como uma nova droga anticâncer tem crescido ao longo do tempo, pois compostos desta natureza tem muitas aplicações como anti-inflamatórios não-esteróides e como agente anticancerígeno. Neste trabalho, um dendrímero de poliglicerol salicilado (PGLD-AAS) foi sintetizado e caracterizado. Técnicas padronizadas foram utilizadas para caracterização do PGLD-AAS, entre eles a espectroscopia ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e Maldi-Tof. Além disso, ensaios in vitro foram realizados em três linhagens celulares: osteosarcoma humano (MG63), linhagem celular normal pulmonar humana de origem fibroblástica (MRC-5) e carcinoma de pulmão humano (A-549), para avaliar a citotoxicidade do, PGLD-AAS. O IC_{50} , que define a concentração do dendrímero salicilado capaz de inibir a reprodução de 50% das células encontrado foi superior ao IC_{50} do AAS livre na mesma condição experimental. A indução do apoptose pelo PGLD-AAS foi avaliada por microscopia diferencial de fluorescência observando a morfologia das células após o ensaio de coloração com brometo de etídio e laranja de acridina. A microscopia diferencial de fluorescência indicou que PGLD-AAS induziu alterações morfológicas na membrana citoplasmática das linhagens de células A549, MG-63 MRC-5, provavelmente associada à morte celular por apoptose ou necrose. Os resultados experimentais evidenciam que eventos apoptóticos podem ser iniciados pelo PGLD-AAS, fazendo desta droga um agente promissor para o tratamento em linhagens celulares de carcinoma alveolar humano e osteosarcoma.

ABSTRACT

MOURA, Renata Mendes. Dendrímero de poliglicerol salicilado com propriedades citotóxicas em células tumorais. Itajubá, 2011. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) – Centro de Estudos e Inovação em Materiais Funcionais Avançados, Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2011.

Cancer is undoubtedly one of the most devastating diseases of this century. Claiming 7.6 million lives in 2007, the need for more effective treatments is intensively sought after around the world by several researchers. From the myriad of new treatments, and medications, dendrimers, a unique form of nanotechnology arises as hope. These promising nano-carriers have the ability to detect a cancerous cell, invade the cell mimicking virus and release potent chemotherapeutic drugs inside the tumor. The benefits of this new treatment are the increase in the drug's cancer killing power, and the reduction of its toxic side effects when administered regularly. The synthesis of acetylsalicylic acid derivatives as new anticancer drugs has been increase along the time, since compounds of this kind has many applications as non-steroidal anti-inflammatory, among them, as anticancer agent. In this work a salicylated polyglycerol dendrimer (PGLD-AAS) was synthesized and characterized. Standard techniques were used for characterization of the PGLD-AAS, among them ^1H -NMR, ^{13}C -NMR and Maldi-Tof spectroscopy. Also, were made cytotoxicity experiments in cells of the type MRC-5, MG-63 and A-549 to evaluate the cytotoxicity of PGLD-AAS. The IC_{50} of PGLD-AAS in the cellular experiments with tumor cells lines was found to be higher than that IC_{50} of the free AAS in the same experimental condition. Induction of apoptosis by PGLD-AAS was assessed by differential fluorescence microscopy observing cell morphology after ethidium bromide and acridine orange staining assay. The differential fluorescence microscopy indicated that PGLD-AAS induced morphologic changes in cytoplasm cell membranes of A-549, MG-63 and MRC-5, probably associated with cell death by apoptosis or necrosis. The experimental results support evidence for apoptotic events that might be started by PGLD-AAS and makes this drug a promising agent for treatment of carcinomic human alveolar and human osteosarcoma cell lines.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O estudo e o desenvolvimento de dendrímeros é uma interessante área de pesquisa com grande potencial aplicativo em nanomedicina e que tem crescido rapidamente ao redor do mundo dado as propriedades mimetizantes das proteínas globulares dessa classe de macromoléculas.

A natureza levou quase 4 bilhões de anos para controlar a síntese de estruturas biológicas complexas como as proteínas globulares. Estas moléculas especiais realizam as mais variadas funções no nosso organismo, desde o transporte de nutrientes e metabólitos à catálise de reações biológicas (Figura 1.1) [1].

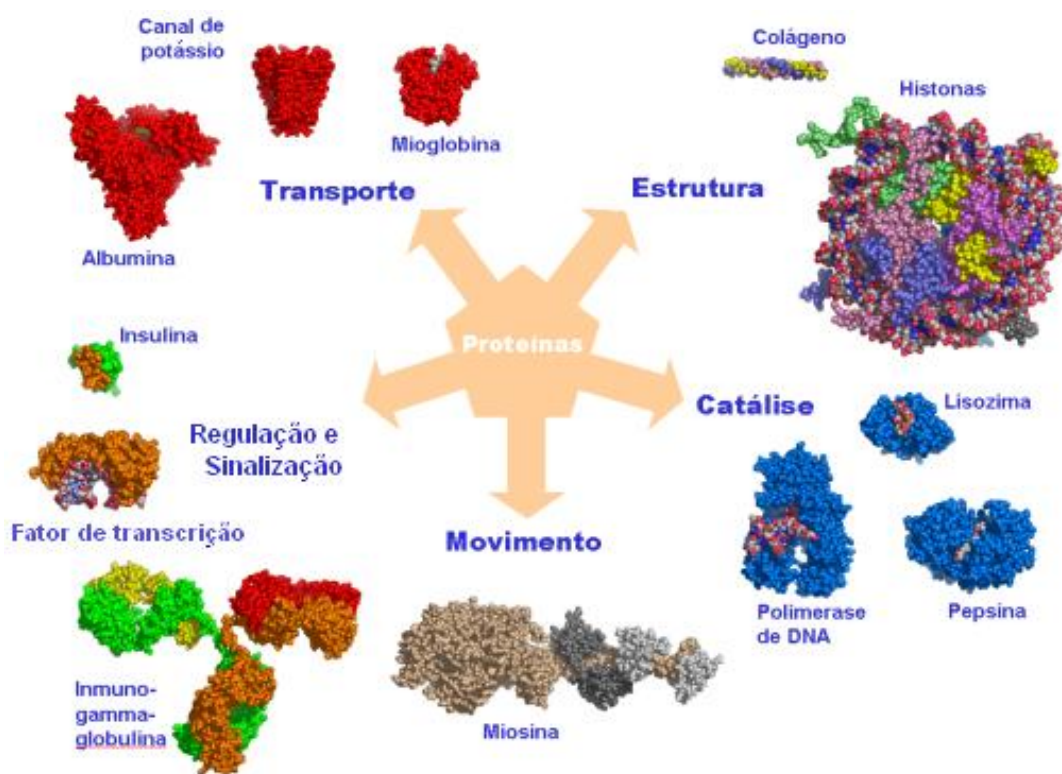


Figura 1.1: Algumas proteínas globulares e sua função no organismo biológico [1].

A grande maioria das proteínas biologicamente ativas são globulares, e sua atividade funcional é intrínseca à sua organização espacial. Exemplos são as enzimas, hormônios protéicos (que atuam como mensageiros químicos), proteínas de transporte

(como as lipo-proteínas, que podem carregar o colesterol) e imunoglobulinas (ou anticorpos), que protegem o corpo de microorganismos invasores. Muitas proteínas biologicamente ativas ficam na região da membrana celular, e atuam de diversas maneiras [2].

As enzimas são uma classe muito importante de proteínas biologicamente ativas. Elas são responsáveis pela catálise de diversas reações em nosso organismo. Reações que, sem o auxílio das enzimas, jamais aconteceriam ou, ainda, gerariam indesejados produtos colaterais. Em uma proteína enzimática, existe certo domínio chamado de "sítio ativo", que se liga ao substrato - a molécula reagente - e diminui a energia do estado de transição que leva ao produto desejado. A ligação entre o sítio ativo e o substrato é extremamente específica: a molécula precisa ter certas características eletrônicas e espaciais que permitam o seu "encaixe" com a proteína. No exemplo da Figura 1.2 ilustra-se a comparação entre as estruturas de uma enzima e de um dendrímero. No caso da enzima, uma determinada região da proteína - o módulo SH2 - liga-se à tirosina fosfatada, que se adapta ao sítio ativo da enzima tal como uma chave faz a sua fechadura [3].

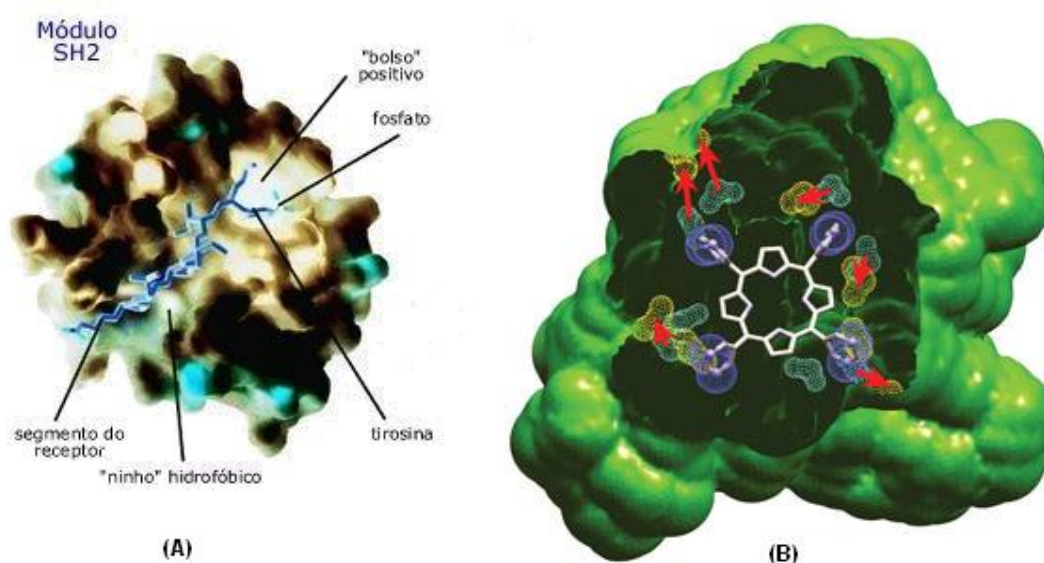


Figura 1.2: Ilustração da comparação entre a estrutura supramolecular de uma enzima (A) e de um dendrímero de geração 2 (G2) (B). As figuras representam as superfícies equipotenciais simuladas computacionalmente de ambas as macromoléculas [1-3].

Na década de 80 e 90, grandes desafios foram vencidos na preparação de dendrímeros, sendo hoje conhecidas várias estratégias de síntese que deram origem a diferentes famílias de dendrímeros. Nesta área, o atual desafio, consiste na

funcionalização dos dendrímeros tendo em vista aplicações tão diversas quanto na nanomedicina terapêutica, como o transporte de princípios bioativos, ou na nanomedicina diagnóstica, como na ressonância magnética nuclear de imagem.

Neste contexto, diversos dendrímeros têm sido estudados quanto à sua aplicação na medicina. A busca por dendrímeros mais compatíveis com o tecido celular humano, a exemplo da hemocompatibilidade, tem motivado pesquisadores de todo o mundo a desenvolver novos precursores, métodos de síntese e substituintes que podem dar ao dendrímero as características desejáveis, como boa solubilidade no fluido fisiológico e biocompatibilidade.

Entre os dendrímeros existentes na literatura e no catálogo Sigma-Aldrich, pode-se destacar o dendrímero de poliglicerol (PGLD) que se enquadra perfeitamente no perfil da nanomedicina devido à suas propriedades biocompatíveis. O PGLD tem sido intensamente estudado há cerca de uma década devido as suas promissoras aplicações em nanomedicina, podendo ser obtidos a partir da rota de síntese gliceroquímica, particularmente interessante para o Brasil, o maior produtor de biocombustível do mundo[5].

Os estudos iniciais acerca das propriedades bioquímicas do dendrímero de poliglicerol em nosso grupo de pesquisa na UNIFEI dirigiram o foco de nossa atenção para sua bioatividade contra células cancerígenas. Neste contexto, esta dissertação de mestrado dedicou-se especialmente ao estudo de dendrímeros PGLD conjugados com ácido acetilsalicílico (AAS) objetivando sua aplicação no tratamento de células tumorais consideradas malignas.

1.1: Objetivos desse trabalho.

O objetivo geral desse trabalho foi avaliar a citotoxicidade e viabilidade celular em condições *in vitro* do PGLD-AAS em cultura de células das linhagens de osteosarcoma humano (MG63), linhagem celular normal pulmonar humana de origem fibroblástica (MRC-5) e carcinoma de pulmão humano (A-549) e analisar sua ação como potencial agente antineoplásico. Os seguintes objetivos específicos dessa dissertação são apresentados abaixo:

- a) Observar o efeito da citotoxicidade do PGLD-AAS em células de mamífero da linhagem CHO-k1.

- b) Analisar os efeitos do PGLD-AAS sobre a viabilidade de células das linhagens MG-63, A-549 e MRC-5;
- c) Verificar as alterações morfológicas nas células das linhagens MG-63, A-549 e MRC-5 causados pelo PGLD-AAS;
- d) Avaliar o processo de internalização do PGLD-AAS nas linhagens celulares MG-63, A-549 e MRC-5.

1.2: Estrutura da dissertação:

No Capítulo 2 é apresentada uma revisão bibliográfica com as características principais dos dendrímeros de poliglicerol que motivaram esse trabalho e alguns conceitos fundamentais que interrelacionam o câncer e a inflamação, que facilitarão o entendimento dos estudos realizados nesse trabalho.

O Capítulo 3 apresenta a epidemiologia do câncer no Brasil, dissertando sobre a epidemiologia do câncer e uma descrição breve de sua fisiopatologia, referindo-se à oncogênese, detalhando a biologia tumoral e, dados importantes sobre a imunologia tumoral, esclarecendo a relação entre o tumor e o hospedeiro. Ainda no Capítulo 3 são contemplados os mecanismos envolvidos na inflamação e o câncer. A importância dos receptores de citocinas, seu papel no processo imunoinflamatório e sua ligação com o câncer são discutidos.

No Capítulo 4 são descritos os materiais e métodos de síntese e as técnicas de caracterizações físico-químicas e bioquímicas utilizadas nessa Dissertação.

No Capítulo 5 a síntese e a caracterização físico-química do dendrímero PGLD e de seu bioconjugado PGLD-AAS são apresentadas. Os resultados da citotoxicidade em células de mamíferos e a viabilidade celular resultante dos ensaios *in vitro* nas linhagens tumorais MG-63 e A-549 são discutidas. Ainda no capítulo 5 são apresentados os resultados da microscopia de fluorescência utilizando os corantes Brometo de Etídeo e Laranja de Acridina para análise dos processos de apoptose e/ou necrose celular bem como o processo de internalização celular do dendrímero PGLD-AAS nas linhagens celulares estudadas.

No capítulo 6 são tecidas algumas considerações finais sobre as possíveis interações entre o PGLD-AAS e as linhagens celulares estudadas nessa dissertação.

O Capítulo 7 aborda as principais conclusões obtidas a partir dos resultados experimentais sobre a interação entre o PGLD-AAS e as linhagens celulares MG-63, A-549 e MRC-5.

O Capítulo 8 aborda as perspectivas de trabalhos futuros.

Referências:

- [1] Disponível em: <www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/trabalhos_pos2003/const_microorg/enzimas.htm> Acessado em 12/02/2011.
- [2] Disponível em: < <http://pharma-world.org/forum/pharmaceutics/dendrimers-anoverview/>> acessado em 12/02/2011.
- [3] UK Royal Society and Royal Academy of Engineering (2004): Report on Nanoscience and nanotechnologies: Opportunities and uncertainties.
- [4] Commision of the European Communities Communication (2004).Towards a European Strategy for Nanotechnologies. Capturado de <www.cordis.lu/nanotechnology>.
- [5] De Queiroz, A.A.A.; Abraham, G. ; Roman, J. S. . Immobilization of a nonsL teiroidal anti-inflammatory drug onto commercial segmented polyurethane surface to improve haemocompatibility properties. *Biomaterials, Inglaterra*, v. 23, p. 1625-1638, 2002.

CAPÍTULO 2

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os grandes desafios da medicina contemporânea destacam a necessidade de uma intensa pesquisa para fornecer tratamentos para muitas enfermidades crônicas que afligem a população do século XXI tais como as doenças neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson), diabetes, doenças cardiovasculares e o câncer. Essas enfermidades se devem aos fenômenos demográficos atuais e o progressivo envelhecimento da população mundial.

De acordo com projeções da Organização Mundial de Saúde (OMS), até 2025 a população de idosos no Brasil crescerá 16 vezes. Com esse aumento da população de idosos o número de procedimentos médicos têm aumentado vertiginosamente tanto em complexidade como em seu custo, muitas vezes inacessível à população de países de economia emergente. Prevê-se que até o ano de 2025, a elevada demanda por atendimento médico deverá torna-se um grave problema de saúde pública. Nesse sentido, as respostas aos desafios da saúde pública, estão fortemente ligados à articulação, implementação, organização e desenvolvimento de novas bases entre as engenharias e as ciências da vida, especialmente a medicina [1].

Observa-se nos últimos anos um significativo crescimento da aplicação das nanotecnologias na medicina e, ao mesmo tempo, um crescente otimismo acerca do potencial dessas aplicações uma vez que o emprego da nanotecnologia significaria melhores oportunidades de diagnóstico e o desenvolvimento de terapias mais eficazes. Tal fato levou órgãos internacionais como NIH (EUA), Sociedade Real Inglesa e de Engenharia e a Fundação de Ciências Européia a introduzir a terminologia nanomedicina [1].

O objetivo primário da nanomedicina é a reparação e a melhora integral de todos os sistemas biológicos humanos, trabalhando ao nível molecular com dispositivos de engenharia e nanoestruturas para se obter benefícios médicos. Nesta definição de nanomedicina se incluem o uso de ferramentas analíticas para se elucidar as bases moleculares das enfermidades assim como o projeto de dispositivos terapêuticos em nanoescala que propiciem terapias mais eficazes [2].

Para atingir os objetivos primários da nanomedicina torna-se necessário se identificar precisamente as células e os receptores relacionados com as situações clínicas específicas e a eleição adequada de nanoveículos precisos para se obter as respostas clínicas adequadas minimizando assim os efeitos colaterais indesejáveis. Atualmente, fagócitos, células dendríticas, células tumorais e a neovascularização tumoral são os principais alvos da nanomedicina [2].

As recomendações da Fundação Europeia de Ciência e acatadas pela Comissão Europeia, criaram as chamadas plataformas em nanomedicina cujas áreas de atuação são apresentadas na figura 2.1.

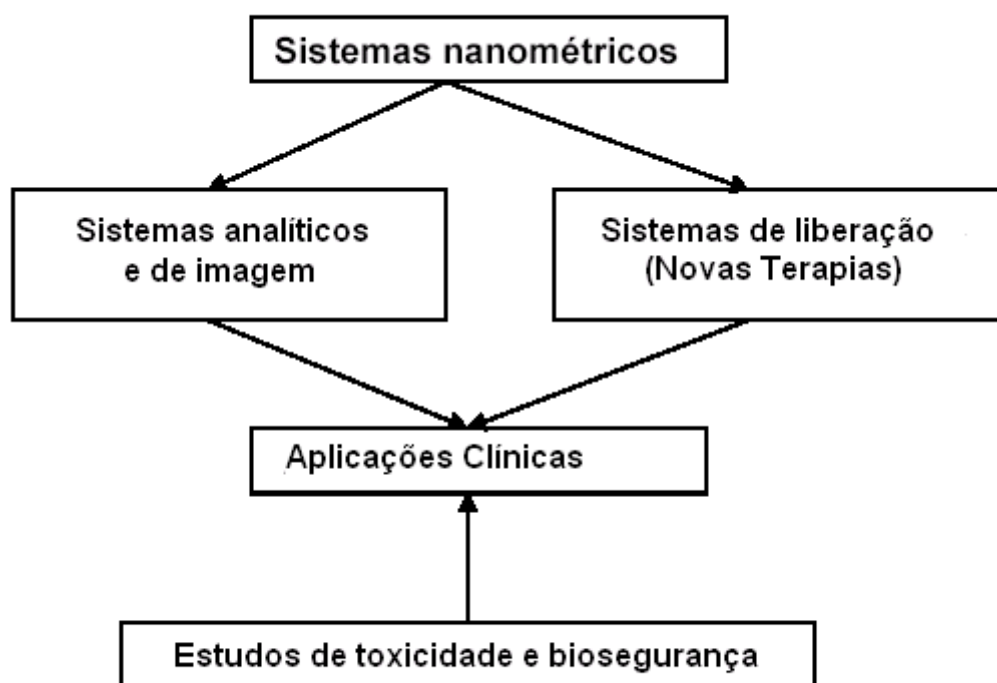


Figura 2.1: Campos de atuação em medicina dos sistemas nanométricos segundo a Fundação Europeia de Ciência.

No período de 2002 a 2004 o número de patentes originadas no campo da nanotecnologia a nível mundial foi de 8.528 sendo 5.500 dos EUA, 1.300 do Japão e 600 da Alemanha sendo que o maior número de patentes corresponde às áreas de informática e ciências biomédicas.

Na área de produção de novos fármacos e produtos terapêuticos tanto cientistas europeus como dos EUA têm promovido o projeto de desenvolvimento de nanomedicamentos de primeira geração. Neste sentido, a nanotecnologia tem desenvolvido sistemas nanométricos que atuam como transportadores do princípio ativo (moléculas ou fragmentos de moléculas). Em escala nanométrica o fármaco pode atravessar as diferentes barreiras biológicas imposta pelo organismo humano. Vale ressaltar que os sistemas de liberação de fármacos convencionais possuem mobilidade limitada no organismo humano uma vez que os processos envolvidos em tais sistemas são regidos essencialmente por suas propriedades físico-químicas tais como a absorção e biodistribuição (Figura 2.2).

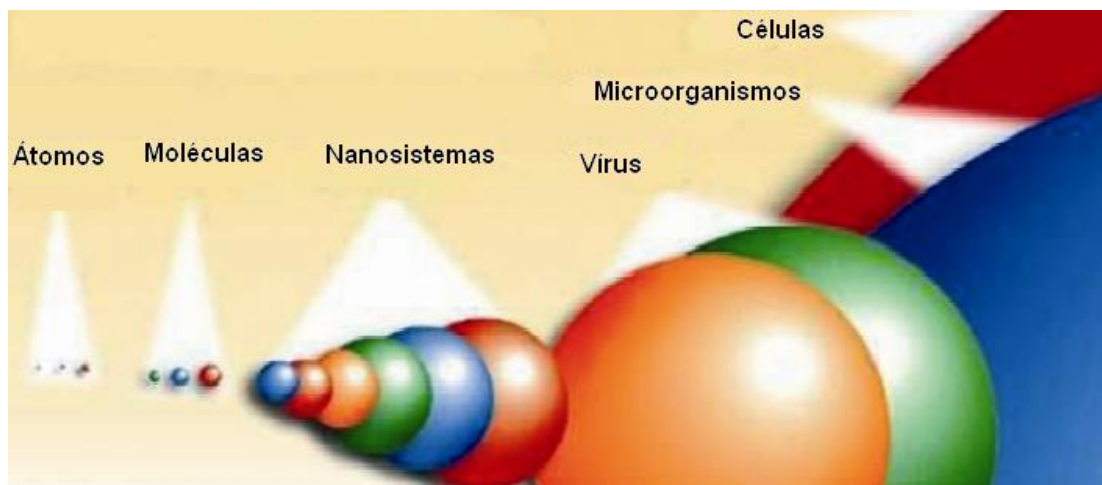


Figura 2.2: Os sistemas nanoscópicos de liberação controlada são maiores que as moléculas típicas e alguns são menores que os vírus. O tamanho dos sistemas nanoscópicos de liberação são similares a muitas proteínas o que constitui uma das razões pelas quais podem interagir dentro das células.

Um notável desenvolvimento foi atingido nas duas últimas décadas quanto ao desenvolvimento de nanosistemas para a vetorização de medicamentos, genes ou células em diferentes tecidos do corpo humano destacando-se as nanoesferas, nanocápsulas, lipossomas, micelas e dendrímeros (Figura 2.3) [3]. Acredita-se de modo geral que os sistemas nanoscópicos bioativos irão revolucionar drasticamente a forma como a medicina é praticada atualmente.

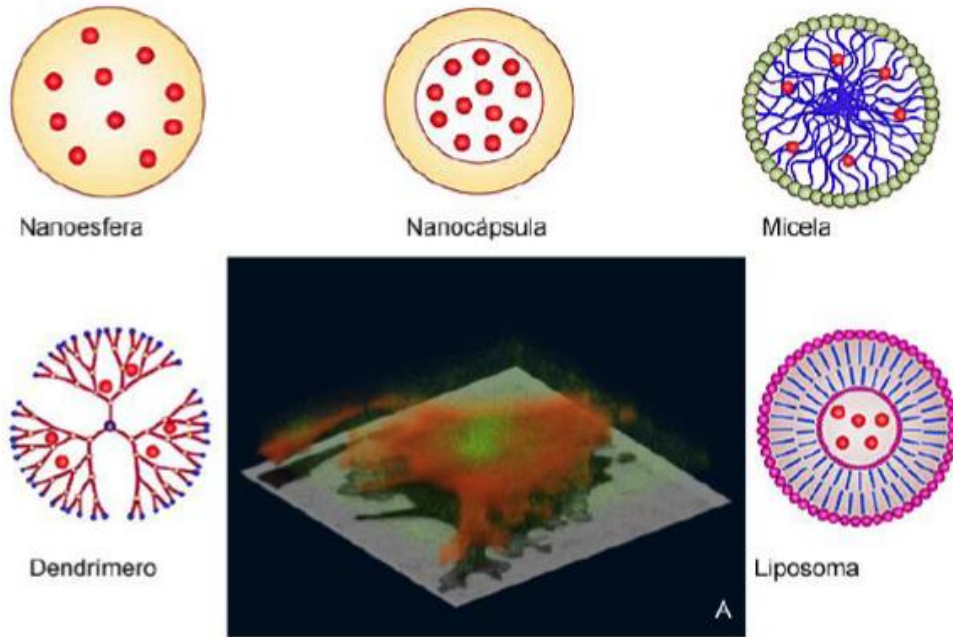


Figura 2.3: Nanosistemas para a entrega local ou sistêmica de fármacos. **A.** Imagem tridimensional do processo de endotelização favorecido pelo uso da sequência de peptídeos CWQPPRARI. Observa-se a superfície de teflon (em branco) e sobre esta as células endoteliais aderidas. Graças ao uso destes biomateriais se prolonga a vida média de uma prótese arterial [3].

Os Dendrímeros, também conhecidos como “árvores moleculares”, representam uma nova classe de macromoléculas com estrutura globular, monodispersa e hiper-ramificada que adquiriram uma grande importância no meio acadêmico e industrial devido às suas potenciais aplicações em diversas áreas da medicina. São sistemas macromoleculares de quarta geração com relação à sua arquitetura molecular (Figura 2.4).

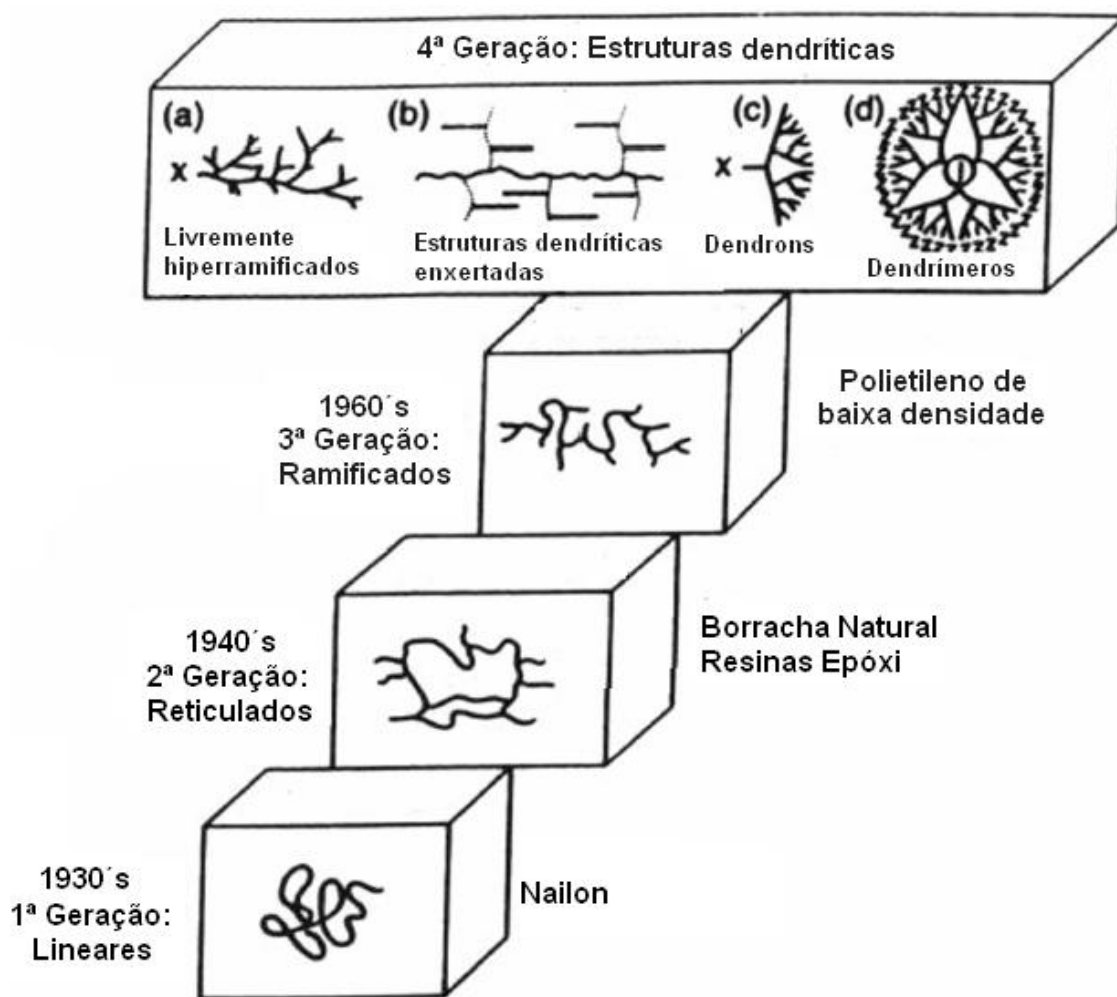


Figura 2.4: Evolução temporal das arquiteturas de macromoléculas orgânicas.

Na década de 80 e 90, grandes desafios foram vencidos quanto à rota sintética para o preparo destas novas moléculas, sendo hoje conhecidas várias estratégias de síntese que deram origem a diferentes famílias de dendrímeros. Nesta área, o atual desafio, consiste na funcionalização dos dendrímeros tendo em vista suas aplicações tão diversas tais como nanoreatores ou nanofármacos.

Cada uma das camadas existentes entre o núcleo e a superfície da estrutura arborescente de um dendrímero determina o que se conhece com o nome de geração da estrutura dendrítica. Assim, à medida que se vão produzindo reações de polimerização se aumenta consecutivamente o número de gerações de um dendrímero e se modifica também sua estrutura e a distância entre os grupos superficiais. O aumento do número de gerações de um dendrímero aumenta em aproximadamente em 1 nm o diâmetro da

estrutura de um dendrímero além de duplicar sua massa molecular e o número de grupos funcionais (Figura 2.5).

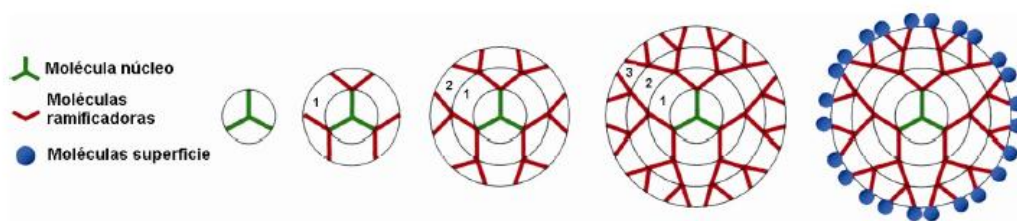


Figura 2.5: Esquema da estrutura dos dendrímeros. Cada número indica a geração da estrutura polimérica.

O principal dendrímero comercializado atualmente é o dendrímeros poli(amido amina) (PAMAM), conhecido pelo nome de Starburst e o dendrímero de poli(propileno imina) (PPI) conhecido com o nome de Astromol (Figura 2.6). A firma australiana Starpharma desenvolveu um gel (VivaGel) para o tratamento da herpes cujo componente ativo é um dendrímero de polilisina que se fixa a proteínas da herpes simplex vírus 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), o que impede sua fixação aos receptores CD4 (Figura 2.7) [4]. Em 2004 o produto foi aprovado pela FDA para iniciar o estudo clínico Fase I, tornando-se assim o primeiro dendrímero utilizado em humanos. A mesma empresa está desenvolvendo atualmente dendrímeros para o tratamento de síndromes respiratórias causadas por vírus como o coronavírus.

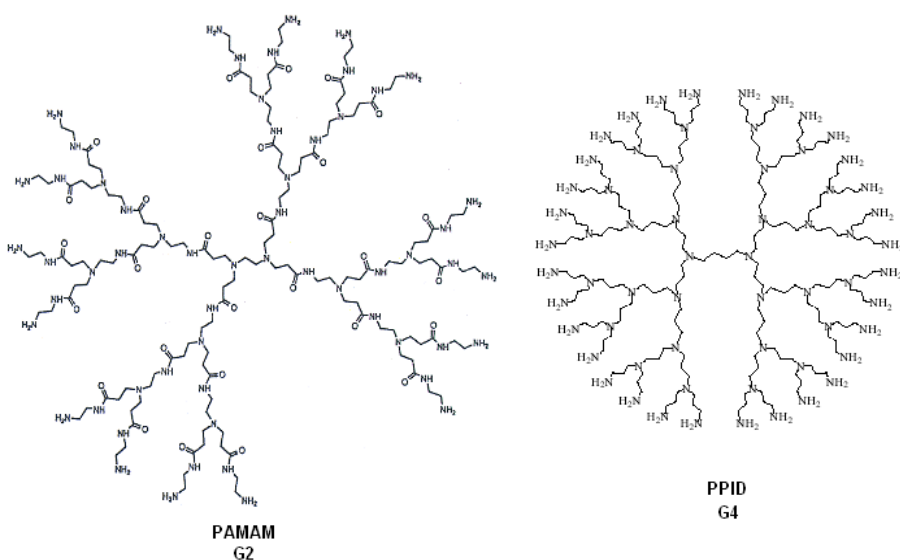


Figura 2.6: Ilustração das estruturas químicas dos dendrímeros PAMAM e PPID.

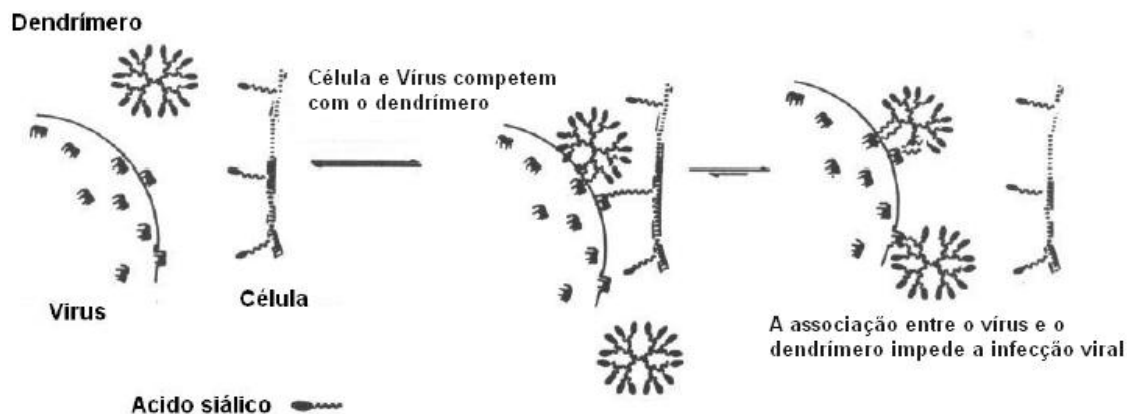


Figura 2.7: Mecanismo de ação dos dendrímeros como antivirais [4].

Com relação à sua aplicação no tratamento do câncer, existem alguns trabalhos que descrevem o encapsulamento molecular por dendrímeros de agentes citostáticos como adriamicina, metotrexato, 5-fluoruracil, paclitaxel ou; a síntese de dendrímeros que possuem atividade citotóxica como o SPL 7435 da empresa Starpharma que, através de estudos comparativos *in vitro*, demonstrou uma atividade análoga ao ABT75 (da firma Abbott) que se encontra atualmente em fase clínica II em pacientes com câncer de cólon refratário a taxanos [5-6].

Atualmente, as melhores perspectivas de aplicação dos dendrímeros em oncologia estão centradas na terapia fotodinâmica e na terapia de captura de nêutrons pelo boro [7-8]. Na terapia fotodinâmica se faz a conjugação entre o dendrímero PAMAM e o ácido 5-aminolevulínico [6-7] ou protoporfirina que absorvem radiação eletromagnética levando à formação de um estado triplete fotoativo com a conseqüente geração de radicais livres que reagem com o oxigênio molecular formando produtos citotóxicos para a célula neoplásica. A fase seguinte no desenvolvimento da terapia fotodinâmica com dendrímeros seria a inclusão de compostos geradores de luz tais como a luciferina-luciferase realizando-se sua ativação uma vez que o nanosistema é capturado pelas células alvo.

Um dendrímero particularmente interessante para a ciência dos biomateriais é o dendrímero de poliglicerol (Figura 2.8).

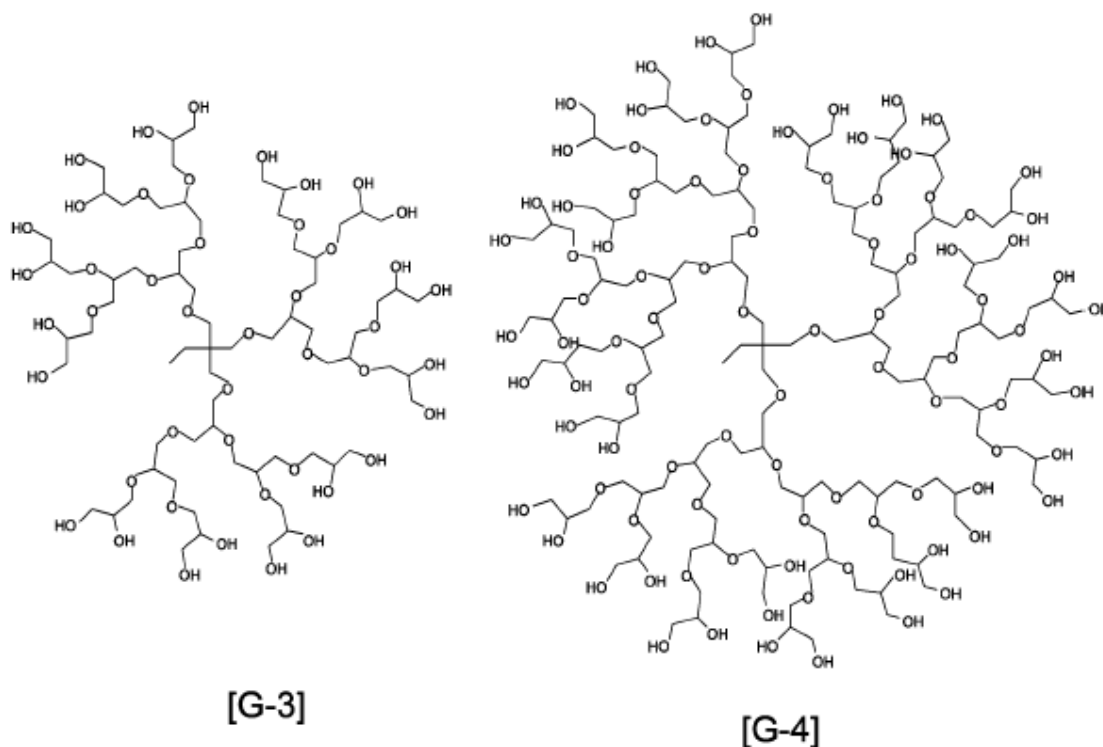


Figura 2.8: Dendrímero de poliglicerol (PGLD) de gerações 3 (G-3) e 4 (G-4) [9].

O dendrímero PGLD possui um esqueleto baseado na função éter onde cada ramificação termina em uma função hidroxila, o que torna o material altamente funcional, por exemplo, uma molécula com um peso molecular de 5.000 g/mol possui 68 grupos hidroxila terminais.

Ao mesmo tempo, é fato reconhecido na literatura de que poliéteres alifáticos tendem a ser biocompatíveis o que torna o PGLD um dendrímero adequado para aplicações como um agente de entrega de compostos biologicamente ativos. A observação da estrutura do PGLD recorda a estrutura dos poli(etileno glicóis) (PEG) (Figura 2.9), materiais aprovados pelo FDA para uma grande variedade de aplicações médicas e biomédicas. O poli (etileno glicol) (PEG) e seus derivados têm encontrado uma variedade enorme de aplicações na indústria farmacêutica e medicina, devido à sua biocompatibilidade, inércia química e excelente solubilidade em ambos os meios orgânicos e aquosos [10].

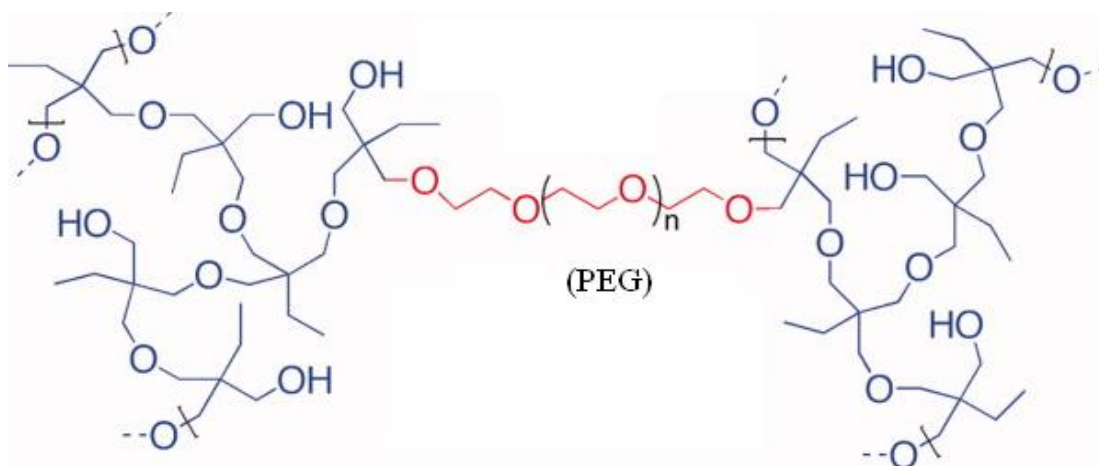


Figura 2.9: Estrutura do poli(etileno glicol) hiperramificado.

A síntese de dendrímeros de poliglicerol e seus derivados tem origem essencialmente nos trabalhos de Rainer Haag da Universidade Livre de Berlin e Holger Frey da Universidade de Mainz (Figura 2.10) conforme podem ser observados nos vários trabalhos a respeito da síntese e caracterização de dendrímeros do glicerol e suas estruturas hiper-ramificadas [11-22].

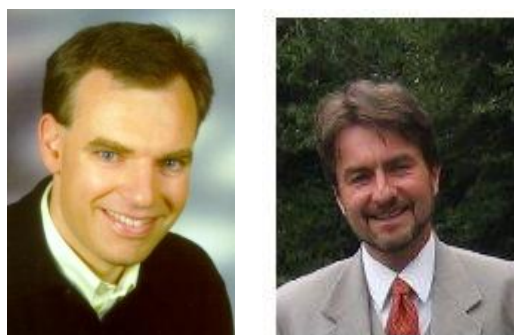


Figura 2.10: Os professores Rainer Haag e Holger Frey das universidades de Berlin e Mainz, respectivamente.

Embora a síntese de estruturas dendríticas do poliglicerol não ultrapasse cerca de uma década, suas potenciais aplicações na medicina são muito promissoras. Como exemplo pode-se citar seus derivados sulfatados para aplicações como inibidores da inflamação ou como agentes antirombóticos como análogos da heparina (Figura 2.11) [22-23].

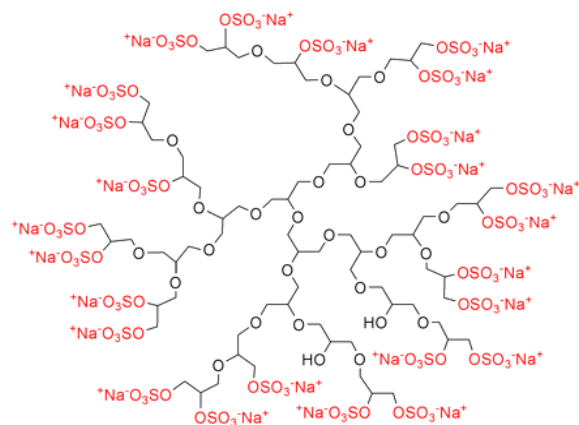


Figura 2.11: Ilustração do sulfato de poliglicerol, análogo da heparina e potente inibidor da inflamação [23-24].

O sulfato de poliglicerol parece atuar na cascata de inflamação inibindo a interação entre leucócitos e o endotélio ativado, atuação proporcionada por sua multifuncionalidade periférica que mimetiza os receptores de adesão [25-26]. O mecanismo da inflamação ocorre através de uma complexa cascata na qual os leucócitos interagem com o endotélio ativado, seguida por transmigração através da parede do vaso sanguíneo e migração posterior para o tecido extravascular. Cada passo deste processo é regulado por citocinas e quimiocinas e por várias famílias de moléculas de adesão, incluindo as selectinas, integrinas e Ig-CAMs [25-26]. A ligação com as selectinas faz com que os leucócitos desacelerem seu movimento ("*rolling*") sobre o endotélio. Com isto os leucócitos podem ser ativados por quimiorreceptores aumentando a afinidade de seus receptores de adesão (integrina β_2) para os ligantes do endotélio ativado. Um sinal quimiotático induz os leucócitos a se "espremerem" entre as células endoteliais do vaso e migrarem para o centro da inflamação.

Estudos recentes têm apontado a relação entre o desenvolvimento de câncer e a superexpressão anormal das enzimas formadoras de eicosanóides, tais como as ciclooxigenases (COX) 1 e 2 e lipooxigenases em uma grande variedade de tumores animais e em humanos [26-28]. Atualmente estudos têm sido focados na enzima pró-inflamatória ciclooxigenase 2 (COX-2) cuja superexpressão parece estar relacionada a eventos considerados chave no processo da carcinogênese tais como a hiperproliferação celular, inibição da apoptose (morte celular programada) e a angiogênese tumoral [27-30].

A aspirina é um agente antiinflamatório não esteroide (AINE), seu mecanismo de ação envolve a supressão do processo inflamatório pela inibição da ciclooxygenase (COX), impedindo assim a síntese de prostaglandinas. A aspirina promove inibição irreversível da atividade da ciclooxygenase pela ligação covalente com uma molécula de serina do local ativo [35-38].

Embora haja uma extensa literatura sobre a utilização da aspirina no tratamento do câncer, seu mecanismo de atuação ainda não está devidamente elucidado e os sérios efeitos colaterais atribuídos à baixa especificidade de inibição destes compostos sobre a COX-2 têm gerado muitas controvérsias ao longo de pelo menos quase quatro décadas [39-41].

A necessidade de uma elevada dosagem do AAS para atuação contra o câncer e o período prolongado de tempo necessário para conseguir atingir melhoras no quadro clínico são fatores limitantes no uso desse medicamento como quimiopreventivo ou quimioterápico. Portanto, as propriedades do dendrímero de poliglicerol como sua elevada funcionalidade periférica e a possibilidade da entrega controlada e vetorizada do princípio bioativo ao local alvo e por um período de tempo prolongado tornam o conjugado PGLD-AAS um sistema potencialmente atrativo para o tratamento do câncer.

Uma primeira motivação para o desenvolvimento dessa dissertação baseia-se na capacidade produtiva pelo Brasil de glicerina. O Brasil tem se destacado significativamente no panorama mundial do biodiesel, devido à sua grande diversidade de produção de grãos, de onde é extraído o óleo vegetal, e sua extensa criação de animais bovinos que fornecem gordura animal ou sebo. Assim, dentro deste cenário da produção de biodiesel nacional, o Brasil produz atualmente em torno de 2 bilhões de litros de biodiesel. Por volta de 10% de todo produto resultante da fabricação do biocombustível é transformado em glicerina, ou seja, cerca de 160 mil toneladas de glicerol são produzidas a cada ano [42]. A elevada demanda na produção da glicerina e a limitada capacidade de absorção do produto pelo mercado tradicional do glicerol (indústria de cosméticos, de resinas, farmacêutica, têxtil, alimentícia) têm levado ao desenvolvimento de rotas gliceroquímicas voltadas à utilização do volume excedente de glicerol. Desta forma, uma aplicação atualmente promissora deste poliálcool seria utilizá-lo na produção do PGLD e/ou polióis hiperramificados para aplicações na indústria farmacêutica e na medicina gerando, portanto, produtos de elevado valor agregado.

A segunda motivação para o desenvolvimento desse trabalho baseia-se no fato de que nossos estudos iniciais sobre dendrímeros PGLD com atividade fibrinolítica e

antiagregante plaquetária constataram que o conjugado PGLD-AAS possui uma significativa bioatividade contra células de carcinoma mamário humano do tipo MCF-7. Essa observação nos motiva a indagar se o PGLD-AAS possui atividade contra outras linhagens celulares carcinogênicas.

Uma vez que o fracasso de muitos fármacos para o tratamento do câncer é atribuído à baixa concentração que alcança os alvos terapêuticos, torna-se pertinente saber se as características de polaridade permitem que o PGLD-AAS difunda através das membranas celulares das células selecionadas para estudo, a saber: células fibroblásticas de pulmão (MRC-5), carcinoma de pulmão (A-549) e osteossarcoma (MG-63).

Referências Bibliográficas:

- [1] Disponível em: <<http://portaldeextensao.wikidot.com/crescimento-da-populacao-idosa>> Acessado em: 18/12/2010
- [2] Ye, Z.; Mahato, R.I. Role of nanomedicines in cell-based therapeutics. *Nanomedicine* v.3 n.1, p. 5-8, 2008.
- [3] Gagné, L.; Rivera, G.; Laroche, G. Micropatterning with aerosols: Application for biomaterials. *Biomaterials*. v.27 n.31, p 5430-5439, 2006.
- [4] Disponível em: <<http://www.mtnstopshiv.org/node/1847>> Acessado em: 18/12/2010.
- [5] Boas, U.; Heegaard, P.M.H. Dendrimers in drug research. *Chem. Soc. Rev.* v. 33; p. 43-63, 2004.
- [6] Battah, S.H.; Chee C.E.; Nakanishi, H.; Gerscher, S.; MacRobert, A.J.; Edwards C. Synthesis and biological studies of 5 aminolevulinic acid containing dendrimers for photodynamic therapie. *Bioconjugate Chem.* v. 12, p.980-988, 2004.
- [7] Nishiyama, N.; *et al.* Light-harvesting ionic dendrimers porphyrines as new photosensitizers for photodynamic therapy: *Bioconjugate Chem.* v. 14, p. 58- 66, 2003.
- [8] Qualmann, B.; *et al.* Synthesis of boron rich lysine dendrimers as protein labels in electron microscopy: *Angew. Chem. Int. Ed Engl*, v. 35, p. 909–911, 1996.
- [9] Capala, J.; Barth, R.F.; Bendayana, M.; Lauzon, M., Adams, D.M., Soloway AH., Fenstermaker, R.A.; Carlsson, J. Boronated epidermal growth factor as potential targeting agent for boron neutron capture therapy of brain tumors: *Bioconjugate Chem.* v. 7, p.7 – 15, 1996.
- [10] Stiriba, S.E.; Frey, H.; Haag, R. Dendritic polymers in biomedical applications: from potential to clinical use in diagnostics and therapy. *Angew. Chem. Int.* v. 41, 1.329 – 1.334, 2002.
- [11] Haag, R.; Sunder, A.; Hebel, A.; Roller, S. Dendritic Aliphatic Polyethers as High-loading Soluble Supports for Carbonyl Compounds and Parallel Membrane Separation Techniques, *J. Combinatorial Chem.* n.4, p.112-119, 2002,
- [12] Frey, H.; Haag, R. Dendritic Polyglycerol: A New Versatile Biocompatible Material, *Rev. Mol. Biotech.* v. 90, p. 257-267, 2002.
- [13] Türk, H., Haag, R., Alban, S. Dendritic Polyglycerol Sulfates as New Heparin Analogues and Potent Inhibitors of the Complement System, *Bioconjugate Chem.* v v.15, p.162-167, 2002.

- [14] Hebel, A.; Haag, R. Polyglycerol as High-Loading Support for Boronic Acids with Application in Solution-Phase Suzuki Cross-Couplings, *J. Org. Chem.* v. 67, p. 9452-9455, 2002.
- [15] Roller, S.; Siegers, C.; Haag, R. Dendritic Polyglycerol as High-Loading Support for Parallel Multistep Synthesis of GABA Lactam Analogues, *Tetrahedron* v.60, 8711-8720, 2004
- [16] Sunder, A.; Quincy, M.-F.; Mülhaupt, R., Frey, H. Hyperverzweigte Polyetherpolyole mit flüssigkristallinen Eigenschaften, *Angew. Chem.*, v. 111, n. 38, p. 2928- 3107, 1999.
- [17] Haag, R.; Sunder, A.; Stumbé, J.-F. An approach to glycerol dendrimers and pseudo-dendritic polyglycerols, *J. Am. Chem. Soc.*, v.122, p.2954-2955, 2000.
- [18] Stumbé, J. F.; Sunder, A.; Haag, R., Pseudo-Dendrimers as an Alternative to Perfect Dendrimers: A General Concept, *Poly. Mat. Sci. Eng.* v.84, p.1023-1024, 2001.
- [19] Sunder, A.; Mülhaupt, R. Frey, H. Polyether-Polyols Based on Hyperbranched Polyglycerol: Polarity Design by Block Copolymerization with Propylene Oxide; *Macromolecules*, v.33, p.309, 2000.
- [20] Knischka, R.; Lutz, P. J.; Sunder, A.; Mülhaupt, R.; Frey, H. Functional PEO-Multiarm Star Polymers: Core-First Synthesis Using Hyperbranched Polyglycerol Initiators, *Macromolecules*, v. 33, p. 315, 2000.
- [21] Sunder, A.; Bauer, T.; Mülhaupt, R.; Frey, H. Synthesis and Thermal Behavior of Esterified Aliphatic Hyperbranched Polyether Polyols, *Macromolecules*, v. 33, p.1330, 2001.
- [22] Burgath, A.; Sunder, A.; Mülhaupt, R.; Neuner, I.; Frey, H.; PCL-Multiarm star polymers based on polyglycerol; *Macromol. Chem. Phys.*, v. 201, p.792, 2000.
- [23] Dervede J., Rausch A., Weinhart M., Enders S., Tauber R., Licha K., Schirner M., Zugel U., von Bonin A., Haag R. Dendritic polyglycerol sulfates as multivalent inhibitors of inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.107, n.46, p.19679-19684, 2010.
- [24] Turk, H.; Haag, R.; Alban, S. Dendritic polyglycerol sulfates as new heparin analogues and potent inhibitors of the complement system. *Bioconjug Chem.* v.15, n.1, p.162-167, 2004.
- [25] Bevilacqua, M P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* v. 11, p.767, 1993.

- [26] Frenette, P.S; Wagner, D.D. Adhesion molecules—Part II: Blood vessels and blood cells. *New Engl J Med*, p.335-343, 1996.
- [27] Slow, R .A; *et al.* COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic and mammary tumors. *Cancer* v.12, p.2637-2645, 2000.
- [28] Muscat, J.E.; Stellman, S.D; Wynder, E.L. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and colorectal cancer. *Cancer* v.74, n.7, p. 1847-1854, 1994.
- [29] Ulrich, C.M.; Bigler, J.; Potter, J.D. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention: promise, perils and pharmacogenetics. *Nature*, v.6, p.130-140, 2006.
- [30] Moore, B.C.; Simmons, D.L. COX-2 Inhibition, Apoptosis, and Chemoprevention by Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Current Medicinal Chemistry*, v.7: p. 1131-1144, 2000.
- [31] Breddin, H.K. Aspirin and platelet function. *J Thromb Haemost* v.2, p.1216–1218, 2004.
- [32] Undas, A.; Brummel-Ziedins, K.E.; Mann, K.G. Review: Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. *Blood*, v.109, n.6, p.2285- 2292, 2007.
- [33] Forucci, S.; Distrutti, E.; de Lima, M.; Romano M.; Mencarelli, A.; Barbanti, M.; Palazzini, E.; Morelli, A. Relative contribution of acetylated cyclo-oxygenase (COX)-2 and 5-lipoxygenase (LOX) in regulating gastric mucosal integrity and adaptation to aspirin¹. *FASEB J.* v.10, p.1096, 2003.
- [34] Flower, R.J. The development of COX2 inhibitors. *Nature Reviews-Drugdiscovery*, v.2, p. 179-191, 2003.
- [35] Weksler, B. B; Pett, S.B.; Alonso, D. *et al.* Differential inhibition by aspirin of vascular and platelet prostaglandin synthesis in atherosclerotic patients. *N Engl J Med* v. 308, p.800-805, 1983.
- [36] Clarke, R.J.; Mayo, G.; Price, P.; FitzGerald, G.A. Suppression of thromboxane A₂ but not of systemic prostacyclin by controlled release aspirin. *N Engl J Med* v. 325, p.1137-1141, 1991.
- [37] Pedersen, A.K, FitzGerald, G.A. Dose-related kinetics of aspirin. Presystemic acetylation of platelet cyclooxygenase. *N Engl J Med*, v. 311, p.1206-1211, 1984.

- [38] Hennekens, C.H; Buring, J.E.; Sandercock, P.; Collins, R.; Peto, R. Aspirin and other antiplatelet agents in the secondary and primary prevention of cardiovascular disease. *Circulation*. v.80. p.749-756, 1989.
- [39] Serebruany, V.L. *et al.* Analysis of risk of bleeding complications after different doses of aspirin in 192,036 patients enrolled in 31 randomized controlled trials. *Am J Cardiol* . v. 95 , p.1218 –1222, 2005.
- [40] Martínez, M.E.; Greenberg, E.R. More Aspirin for Less Cancer? *JNCI*. v.99, n.8 p. 582-583, 2007.
- [41] Henschke,U.K.; Luande, G.J.; Choppala, J.D. Aspirin for reducing cancer metastases? *J.Nat.Med.Assoc.*, v. 69, n.8, p. 581-584, 1977.
- [42] Disponível em: <http://www.anp.gov.br/>>. Acessado em 12/02/2011.

CAPÍTULO 3

INFLAMAÇÃO E CÂNCER

3.1. Epidemiologia do Câncer

O câncer não é uma única doença, mas uma coleção inteira de transtornos que constituem, pelo menos, 300 diferentes tipos histológicos. Estes tipos podem ser agrupados em uma série de classes, baseada principalmente sobre a origem embriológica das células do tumor inicial. Os carcinomas são de origem epitelial (ectodérmica e endodérmica); sarcomas são derivados de tecido conjuntivo (mesodérmica), leucemias são a partir de células formadoras de sangue; melanomas derivam de células de pigmento (melanócitos) e teratomas surgem a partir de células germinais ou de tecido gonadal [1].

Os tumores são os resultados de crescimento anormal de células localizadas. Para um tumor se tornar maligno, as células devem começar a metástase (movimento), e invadem outros tecidos. O tumor original é chamado de tumor primário. Na metástase as novas colônias, ou focos, são referidos como tumores secundários ou centros de metástase. Cada centro vai surgir a partir de uma célula inicial diferente, mas todos derivam da única célula fundadora do tumor primário [1].

Os tipos de câncer são classificados pelo tipo de célula que se assemelha ao tumor e, portanto, o tecido que se presume ser a origem do tumor. Estes são relacionados à histologia e ao local, respectivamente. Exemplos de categorias gerais incluem [1]:

- **Carcinoma:** Os tumores malignos derivados de células epiteliais ocorrendo na pele, tecidos internos e órgãos, incluindo as formas mais comuns de câncer de mama, próstata, pulmão e cólon. Este grupo representa o tipo de câncer mais comum.
- **Sarcoma:** Os tumores malignos derivados de tecido conjuntivo, ou células mesenquimais. São tumores relacionados a ossos, músculos ou tecidos conectivos.

- Linfoma e leucemia: neoplasias derivadas hematopoiéticas (formadoras de sangue) de células. Envolvem medula e glóbulos brancos do sangue, representando um tipo especial de sarcoma formado por células individuais mantidas em suspensão no sangue. Os Linfomas são associados aos linfonodos.
- O tumor de células germinativas: Os tumores derivados das células totipotentes. Em adultos mais freqüentemente encontrados no testículo e ovário; em fetos, bebês e crianças pequenas freqüentemente encontrados na linha média do corpo.
- Blastoma: Um tumor (geralmente maligno) que se assemelha a um tecido embrionário ou imaturo. Muitos desses tumores são mais comuns em crianças.

Dependendo do sistema de classificação usado, há 100 ou mais tipos de câncer, e eles podem surgir em qualquer parte do corpo [1].

Os tumores malignos (cânceres) são geralmente nomeados com carcinoma, sarcoma ou blastoma como um sufixo, com a raiz da palavra originada do termo grego ou latim para o órgão de origem. Por exemplo, um câncer de fígado é chamado de hepatocarcinoma, um câncer das células de gordura é chamado de lipossarcoma [1].

Alguns tipos comuns de câncer têm sua nomenclatura relacionada à suas características. Por exemplo, o tipo mais comum de câncer de mama é o carcinoma ductal de mama. Aqui, o adjetivo ductal refere-se ao aspecto do câncer sob o microscópio, assemelhando-se ductos mamários normais [1].

O Instituto Nacional do Câncer (Inca) define a enfermidade como um grupo de doenças ocasionadas por desordens celulares desencadeadas por fatores genéticos e ambientais. Sua característica principal, presente em todo tipo de câncer é a proliferação celular sem controle com capacidade de invasão de outros tecidos [2].

Dados publicados do Inca sobre a estimativa de novos casos de câncer em 2010 mostram que podem ser esperados 489.270 casos novos de câncer neste ano, números válidos também para o ano seguinte. As neoplasias de maior importância em homens serão as de próstata e de pulmão, e em mulheres, as de mama e colo do útero. Essa

estatística não considera câncer de pele não-melanoma, valores que acompanham os dados observados na América Latina [2].

Dentre 236.240 casos novos de câncer masculinos e 253.030 femininos, os tumores mais incidentes em homens serão pele não-melanoma (53 mil casos novos), próstata (52 mil), pulmão (18 mil), estômago (14 mil) e cólon e reto (13 mil). Tumores de pele não-melanoma (60 mil casos novos), mama (49 mil), colo do útero (18 mil), cólon e reto (15 mil) e pulmão (10 mil) serão os mais significativo para as mulheres. As estimativas citadas estão representadas na Figura 3.1.

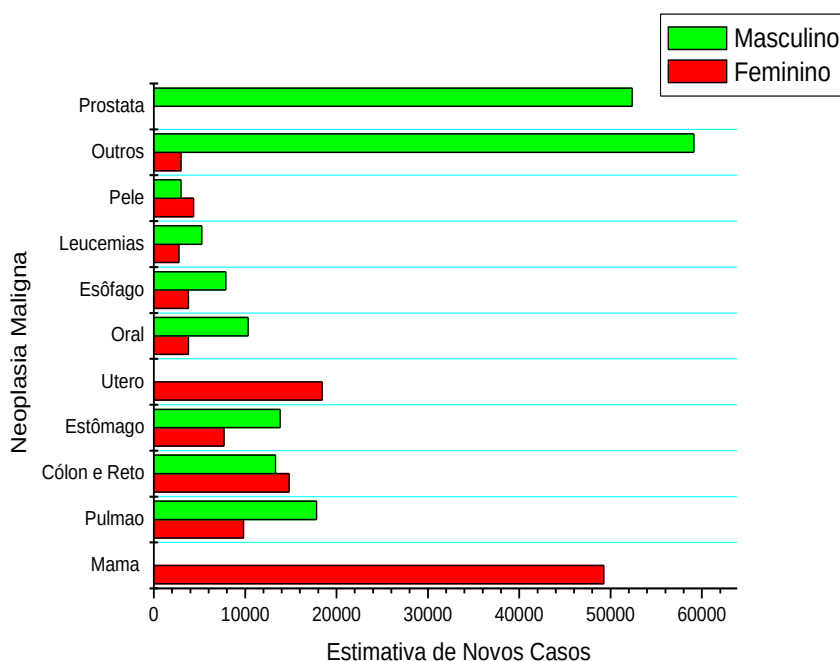


Figura 3.1: Estimativa de novos casos de neoplasia em e sua localização primária no Brasil no ano de 2010.

A Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC) projeta que em 2030 quase 21,4 milhões de novos casos serão diagnosticados anualmente. Em 2008, último ano para o qual existem dados disponíveis, um número estimado de 12,7 milhões de novos casos foram diagnosticados e 7,6 milhões de mortes por câncer ocorreram.

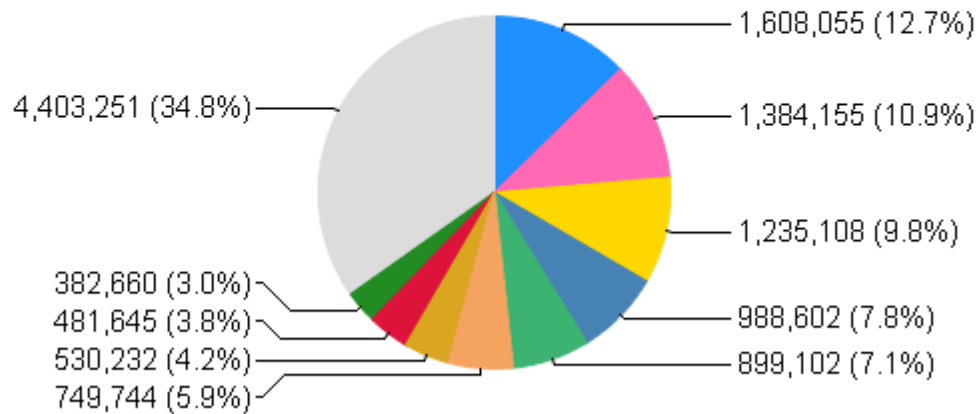
Os países em desenvolvimento tiveram uma maior proporção da incidência de câncer, 56 % dos novos casos a nível mundial e 63 % das mortes por câncer. Os cânceres mais comumente diagnosticados mundialmente em 2008 foram o câncer de pulmão, com 1.610 mil casos e cerca de 13 % do total e o câncer de mama, com 1.380 mil casos, cerca de 11%. Os principais fatores que explicam essa projeção é o

envelhecimento da população [3]. A Figura 3.2 ilustra a distribuição global da incidência de câncer e sua taxa de mortalidade no ano de 2008.

International Agency for Research on Cancer



Incidência

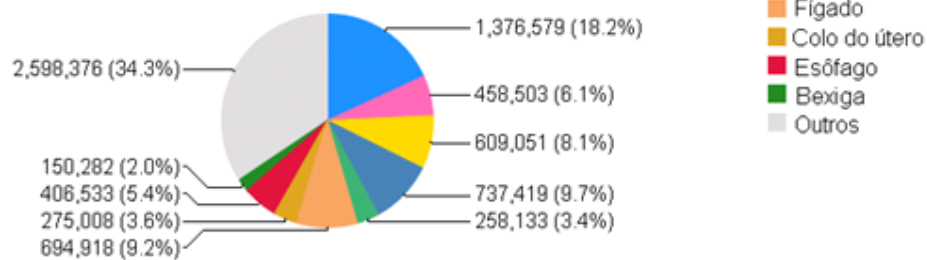


A

International Agency for Research on Cancer



Mortalidade



B

Figura 3.2: Incidência dos tipos de câncer (A) e Mortalidade do câncer no Mundo (B) em 2008 [3].

3.2: O mecanismo da inflamação

Entende-se como inflamação a reação local dos tecidos vascularizados a algum tipo de agressão ou trauma. A alteração da homeostase e morfostase leva o organismo a reagir com o objetivo de minimizar os efeitos causados pela injúria por meio de uma rede de sinais químicos e reações teciduais, principalmente vasculares. Esses fatores desencadeiam uma resposta adaptativa que se denomina "processo inflamatório", isto porque se refere a um fenômeno dinâmico, constituído por fases evolutivas, inter-relacionadas entre si dependendo uma da outra. A inflamação, portanto, é uma reação de defesa local do organismo [4].

A inflamação, com seus sinais clínicos clássicos, é conhecida desde a época da Grécia antiga (*phlogosis* em grego e *inflammatio* em latim). Celsus, no século II, descreveu os quatro sinais clássicos da inflamação: rubor (eritema), calor (temperatura elevada), tumor (edema) e dor (algia) [5].

Uma das respostas inflamatórias é a vasodilatação que resulta no rubor da área inflamada, o tumor é resultado do acúmulo de líquido no local. A percepção de calor vem do rápido acúmulo de sangue arterial com temperatura mais elevada na região. A dor apresenta um mecanismo mais complexo que envolve a distensão dos tecidos, a estimulação de terminações nervosas livres e a lesão direta tecidual pelo agente agressor.

O processo inflamatório passa por diferentes momentos, a inflamação pode, então, ser dividida em diferentes fases:

A primeira fase é a irritativa onde ocorrem alterações morfológicas ou funcionais dos tecidos, causadas pelo agente de agressão ou por razões características de determinados tecidos. A fase seguinte, denominada fase vascular envolve as alterações vasculares no que se referem a todos os seus elementos: fluxo, calibre, pressão e distribuição sangüínea na área inflamada [4].

Na fase exsudativa, ocorre a migração dos componentes inflamatórios do interior do vaso sanguíneo para o interstício. A fase reacional ou exsudativa da inflamação se inicia na presença dos mediadores químicos, caracterizada pela resposta vascular e celular que se manifesta pelos sinais clássicos de Celsus [6]. As alterações funcionais e anatômicas ocorridas até este ponto originam células com características degenerativas que podem ser reversíveis ou acarretar em um material necrótico irreversivelmente, caracterizando a fase degenerativa-necrótica. Com o intuito de repor os tecidos

danificados, a inflamação entra então na fase produtivo-reparativa, que envolve a proliferação celular [7].

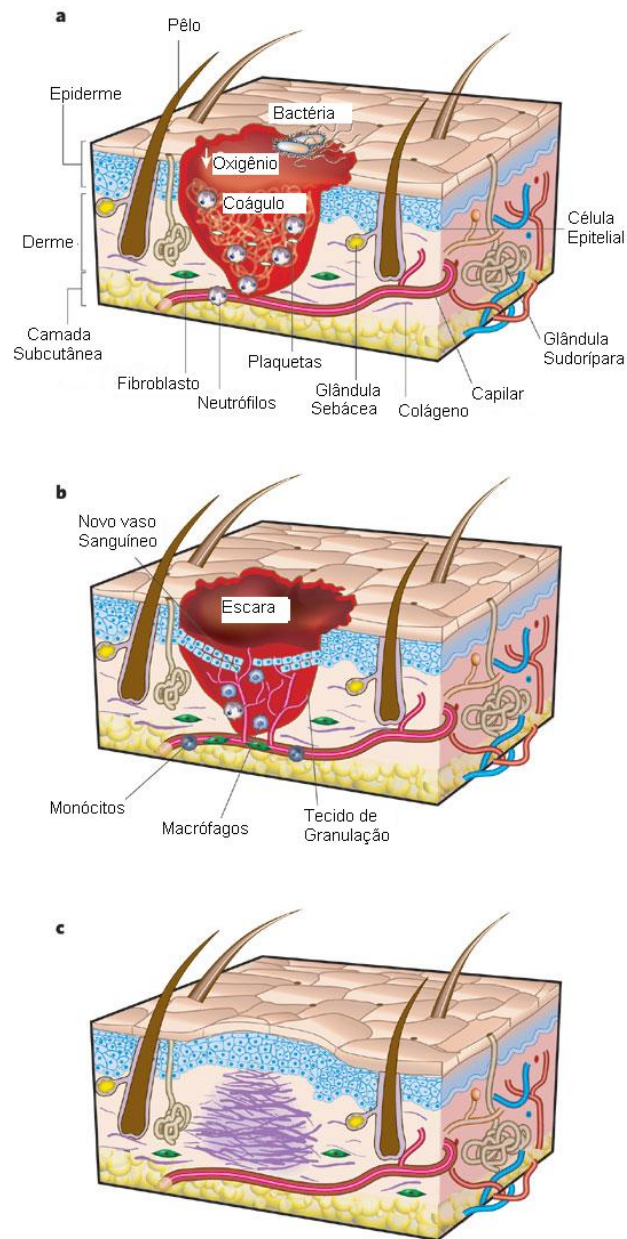


Figura 3.3- Fases do processo inflamatório.

A - A ferida é caracterizada por um ambiente isquêmico em que um coágulo de fibrina se formou. As bactérias, neutrófilos e plaquetas são abundantes e anexos da pele normais (tal como folículos pilosos e glândulas sudoríparas) ainda estão presentes na pele fora da ferida.

B- Uma escara (crosta) é formada na superfície da ferida. A maioria das células do estágio anterior de reparo migraram da ferida, novos vasos sanguíneos agora povoam a área. A migração das células epiteliais pode ser observada sob a escara.

C- Colágeno desorganizado foi estabelecido por fibroblastos que migraram para a ferida. A ferida re-epitelizada é ligeiramente maior do que a superfície circundante, e a região cicatrizada não contém anexos da pele [8].

Estabelecendo a inflamação como um fenômeno essencialmente defensivo, seu papel essencial seria diluir fatores químicos nocivos ou excitar a fagocitose e os mecanismos imunitários, tendentes à eliminação do agente fagocitário [6].

Para isso ela mobiliza sua capacidade de movimentação, adesão e englobamento de partículas. Nesse sentido o fenômeno maior importância é o deslocamento de leucócitos (neutrófilos, monócitos e eosinófilos) da luz vascular para o local da injúria.

O mecanismo de recrutamento dos leucócitos envolve a ativação dos membros de uma família de moléculas de adesão denominada selectina (selectina P, L e E) que facilitam o deslocamento ao longo do endotélio vascular. Além disso, ocorre o desencadeamento dos sinais que ativam e regulam as integrinas dos leucócitos, mediada por moléculas de citocinas. Essas integrinas são responsáveis pela imobilização de neutrófilos na superfície do endotélio vascular. O passo seguinte é a transmigração através do endotélio para os locais da lesão [6].

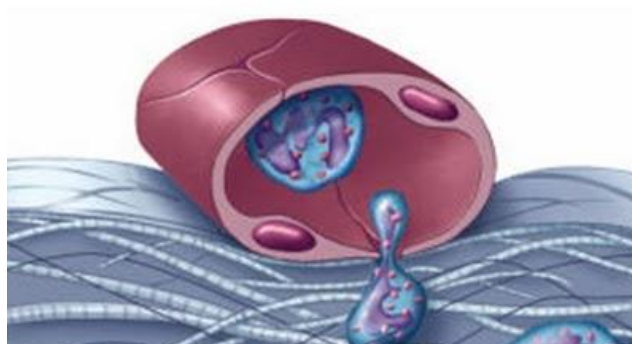
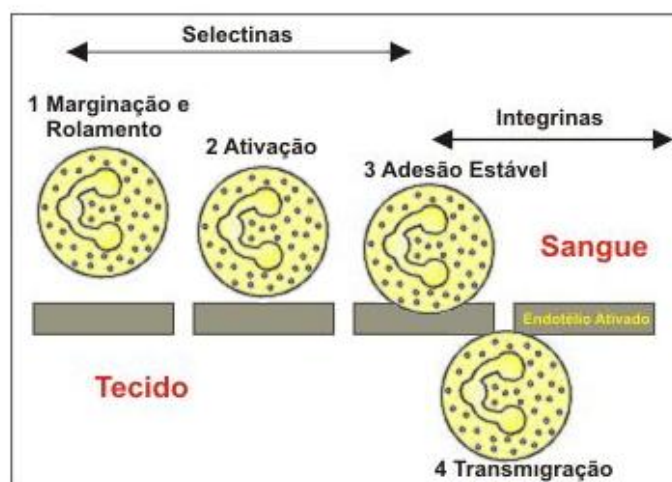


Figura 3.4: Diapedese Mecanismo normal de migração dos linfócitos para o local de infecção [9].

Isso acontece na presença de prostaglandinas que contribuem para a permeabilidade capilar e também atuam na quimiotaxia, atraindo células polimorfonucleadas, neutrófilos e macrófagos que fagocitam os elementos que estão na origem da inflamação [10].

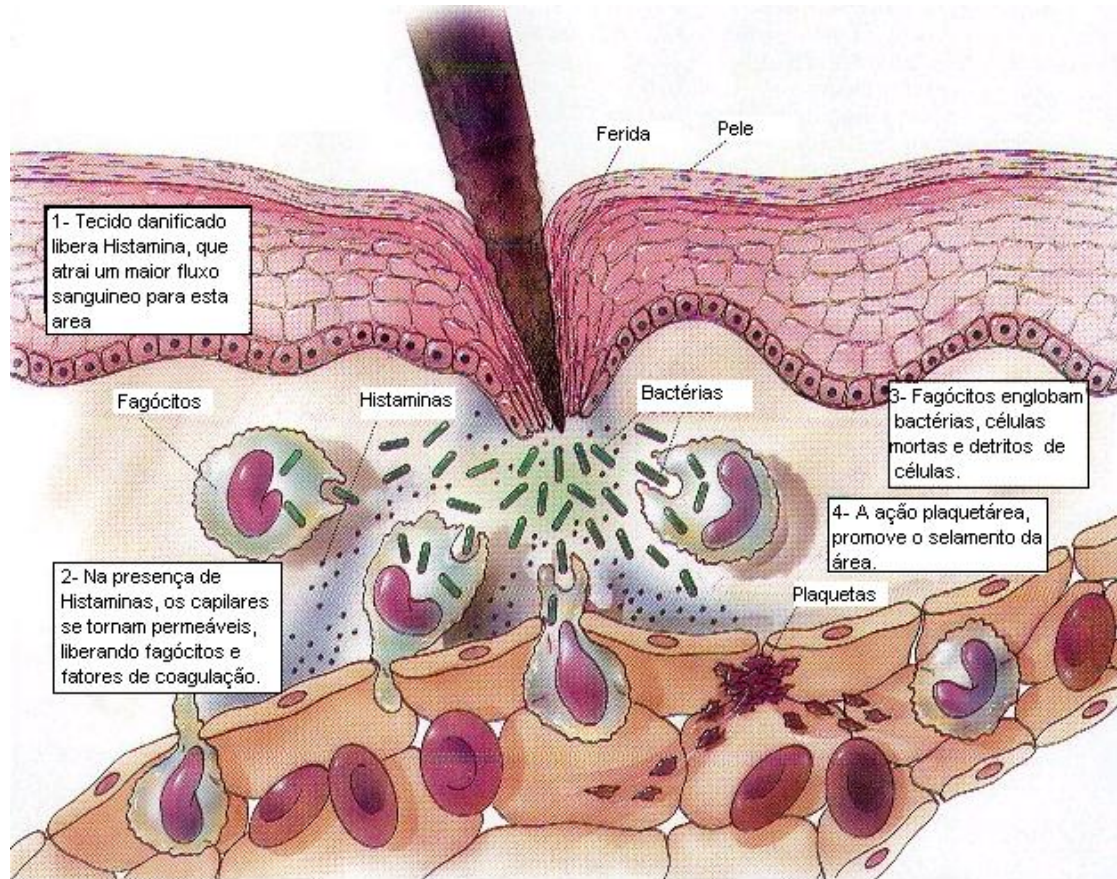


Figura 3.5: Esquema simplificado do processo inflamatório [11].

Com o tempo decorrido do processo inflamatório há uma variação qualitativa e quantitativa dos diferentes elementos celulares presentes, caracterizando uma inflamação aguda ou crônica. Nesse sentido, os seguintes tipos celulares podem ser distinguidos [12]:

1) Inflamação aguda:

- Neutrófilos: granulócitos típicos da fase aguda, devido a sua capacidade de diapedese e alta velocidade de migração. Têm ação fagocítica e podem provocar necrose tecidual ao liberar suas enzimas lisossômicas para o interstício quando mortos.

- Eosinófilos: estão relacionados a fenômenos alérgicos e em alguns processos neoplásicos. Tem capacidade de fagocitose inferior aos neutrófilos [13].

2) Inflamação crônica

- Basófilos e Mastócitos: granulócitos encontrados em maior quantidade em processos crônicos. Os basófilos contêm grânulos de heparina e histamina; os mastócitos, de histamina [13].
- Macrófagos: originados dos monócitos, essas células mononucleares tem alta capacidade de fagocitose, tendo ação sobre ampla variedade de antígenos. Observados mais comumente em estágios de cronicidade e granulomas [13].
- Linfócitos e plasmócitos: migram mais lentamente que os neutrófilos para o foco inflamatório, tendo ação coadjuvante nas atividades macrofágicas. Reconhecem antígenos e desenvolvem respostas para eliminá-los, principalmente em quadros inflamatórios crônicos e granulomatosos [13].

Uma família de citocinas quimiotáticas, chamadas quimiocinas, se mostra fundamental para a evolução natural da resposta inflamatória. Elas possuem um grau relativamente elevado de especificidade para a quimiotaxia de leucócitos. O perfil das quimiocinas que persiste em um sítio inflamatório determina o desenvolvimento da doença crônica. As citocinas pró-inflamatórias $\text{TNF-}\alpha$ (fator de necrose tumoral- α) controla as populações de células inflamatórias, além de mediar muitos dos outros aspectos do processo inflamatório. O fator de crescimento transformador, $\text{TGF-}\beta 1$, também é importante por influenciar tanto positiva como negativamente os processos de inflamação e reparo [14].

O processo de reparação e cicatrização está intimamente associado à inflamação. A ativação plaquetária e a agregação, além de acelerarem a coagulação, fornecem proteínas secretadas e conteúdo granulocítico, os quais ajudam a iniciar e acelerar a resposta inflamatória do hospedeiro. Exemplos de tais proteínas secretadas incluem metabólitos da ciclooxigenase, heparina, serotonina, a trombina, fatores de coagulação (Fator V), as proteínas adesivas (fibrinogênio e fator de von Willebrand), proteínas plasmáticas (imunoglobulina e albumina), fatores de crescimento celular (fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de angiogênese derivado de plaquetas, $\text{TGF-}\alpha$, $\text{TGF-}\beta$ e fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF)), enzimas (heparanase e fator XIII) e inibidores da protease (inibidor do ativador de

plasminogênio-1, $\alpha 2$ -macroglobulina e $\alpha 2$ -antiplasmina). Na sequência, temos a hemostasia e liberação de TGF- $\beta 1$ e PDGF, a formação de tecido de granulação é facilitada pela quimiotaxia de neutrófilos, monócitos, fibroblastos e miofibroblastos, bem como pela síntese de matriz extracelular (ECM) e neoangiogênese [14].

Quando ocorre uma lesão na membrana celular, receptores de membrana, acoplados a uma proteína regulatória (proteína G) são ativados. Como a composição da membrana celular é essencialmente de fosfolípidos, a enzima fosfolipase A₂, presente nos leucócitos e plaquetas, é acionada por citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina (IL)-1. Acredita-se também que estímulos físicos, ao alterarem a membrana celular produzam um influxo de Ca^{+2} , que ativa a fosfolipase A₂ [15-16].

Esse processo leva a degradação dos fosfolípidos, particularmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina e catalisa a liberação do ácido araquidônico.

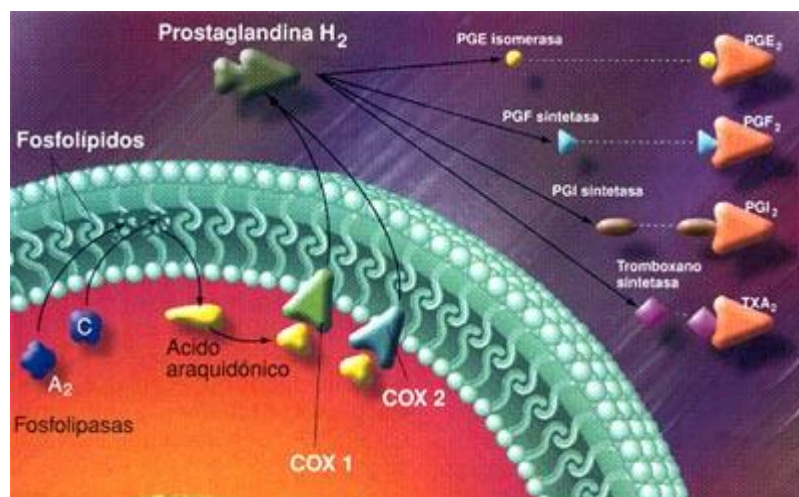


Figura 3.6. Ação da Ciclooxigenase: após algum estímulo as fosfolipases A₂ liberam o ácido araquidônico, o qual metabolizado pela via das ciclooxigenases, irá formar compostos instáveis PGG e depois PGH. Dependendo do complexo de enzimas presentes no tecido serão formadas as diferentes prostaglandinas como PGE₂, PGF₂, PGI₂ e TXA₂ [17].

O ácido araquidônico (AA) é um dos precursores de eicosanóides, os quais atuam como moduladores químicos em diversos processos biológicos, como resposta inflamatória, agregação plaquetária, permeabilidade vascular e na formação de sinalizadores biológicos. Ele é o ponto de formação de prostaglandinas (PGs) que agem como mediadores secundários da inflamação, criando um ambiente favorável para a continuidade da inflamação [18].

A responsável pela síntese de prostaglandinas a partir de ácido araquidônico é chamada de enzima araquidonato ciclooxigenase (COX), também chamada de

prostaglandina H sintase. Sendo assim, o ácido araquidônico liberado servirá como substrato para duas vias enzimáticas distintas: a via das ciclooxigenases (COXs), que desencadeia a biossíntese das prostaglandinas (PGs) e dos tromboxanos (Tx) [19].

Atualmente, existem duas isoformas conhecidas: ciclooxigenase-1 (COX-1) (constitutiva) e a ciclooxigenase-2 (COX-2) (indutiva). As duas isoformas têm estrutura protéica primária similar e catalisam essencialmente a mesma reação. A COX-1 e a COX-2 são proteínas integrais que se localizam dentro da bicamada lipídica de fosfolípidos da membrana. O número de aminoácidos que compõem as duas enzimas é bastante semelhante, variando de 599 aminoácidos para a COX-1 e de 604 aminoácidos para a COX-2 [20].

A COX-1 está presente em grande quantidade na maioria dos tecidos. Ela está relacionada com inúmeras funções fisiológicas, como a modulação da formação de secreções gástricas protetoras [21].

A COX-2 aparece em níveis muito baixos sob condições fisiológicas, entretanto, em situação de dano tecidual, a COX-2 pode ser induzida por vários estímulos celulares (fatores de crescimento mitógenos, endotoxinas e citocinas), sendo superexpressa nos locais de inflamação. Estudos recentes sugerem a existência de uma terceira variante catalítica, a ciclooxigenase-3 (COX-3). A COX-3, possivelmente uma variante da COX-1, encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração [20].

As COXs possuem duas atividades distintas. Uma atividade de endoperoxídeo redutase que oxida e cicliza o ácido graxo precursor não-esterificado, para formar o endoperoxídeo cíclico prostaglandina G (PGG), e outra atividade de peroxidase que converte o PGG em prostaglandina H (PGH) [16].

A segunda via enzimática do qual o ácido araquidônico é precursor é a via das lipoxigenases, responsável pela síntese de leucotrienos, lipoxinas e outros compostos [43]. Os compostos da família das PGs e dos leucotrienos são denominados de eicosanóides, em virtude de serem derivados de ácidos graxos essenciais de vinte carbonos esterificados em fosfolípidos da membrana celular. Os eicosanóides são substâncias biologicamente ativas, com meia-vida curta [22-23].

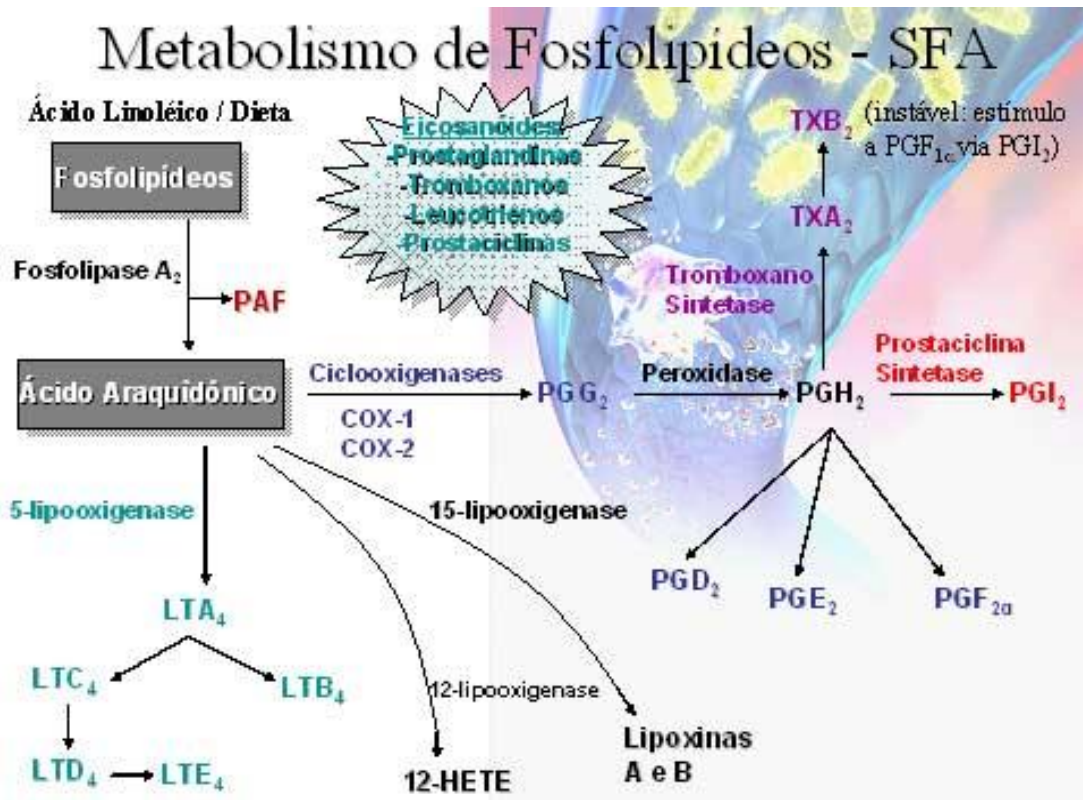


Figura 3.7: Síntese de prostaglandina via ácido araquidônico [24].

O conceito chave é que a inflamação normal, por exemplo, a inflamação associada com a cura da ferida, é geralmente auto-limitada, porém, a desregulação de qualquer um dos fatores convergentes pode levar a alterações e, finalmente, patogênese. Este parece ser o caso durante a progressão neoplásica.

3.3. A relação do câncer com o processo inflamatório.

A carcinogênese passa por vários estágios antes de chegar ao tumor: estágio de iniciação, onde agentes carcinógenos alteram a célula geneticamente; estágio de promoção em que a célula alterada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual; e estágio de progressão que é a multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas, nesse estágio, o câncer já está instalado [25].

A associação funcional entre inflamação e câncer foi feita inicialmente por Virchow em 1983, que sustentou a teoria de que o câncer se inicia em locais acometidos por inflamações decorrentes de lesões e irritações por um longo período de tempo, levantando a hipótese de que a resposta inflamatória favorecia a proliferação celular.

Hoje entendemos que nem toda proliferação celular resulta em câncer, no entanto, esta proliferação associada a um ambiente rico em células inflamatórias e fatores de crescimento, agentes danosos ao DNA e favorável a angiogênese se torna propício para o desenvolvimento e progressão da doença [26].

Uma explicação para a participação de células inflamatórias no processo neoplásico é que neoplasias surgem nas áreas de infecção e inflamação, simplesmente como parte da resposta normal do hospedeiro. Funcionalmente, muitos agentes promotores, que direta ou indiretamente, induzem a proliferação celular, recrutam células inflamatórias.

Quando a homeostase do tecido é perturbada, macrófagos e mastócitos secretam no local os complementos solúveis da inflamação, tais como citocinas, quimiocinas, mediadores bioativos e proteínas remodeladoras da matriz extracelular, que recrutam leucócitos adicionais para circularem no tecido danificado (isto é, inflamação) [27].

A inflamação normal é auto-limitada, porque a produção de citocinas antiinflamatórias acompanha as citocinas pró-inflamatórias. No entanto, a resposta inflamatória permanece nos tumores, pois as células tumorais produzem várias citocinas e quimiocinas que atraem leucócitos [28].

O componente inflamatório do desenvolvimento neoplásico pode incluir uma diversidade de leucócitos, por exemplo: linfócitos, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos e mastócitos [29].

As células dendríticas migram para tecidos periféricos inflamados onde eles capturam os antígenos e, após a maturação, migram para linfonodos para estimular a ativação de linfócitos T. Curiosamente, as células dendríticas encontradas em infiltrados neoplásicos são freqüentemente imaturas e deficientes na capacidade estimuladora de linfócitos T [29].

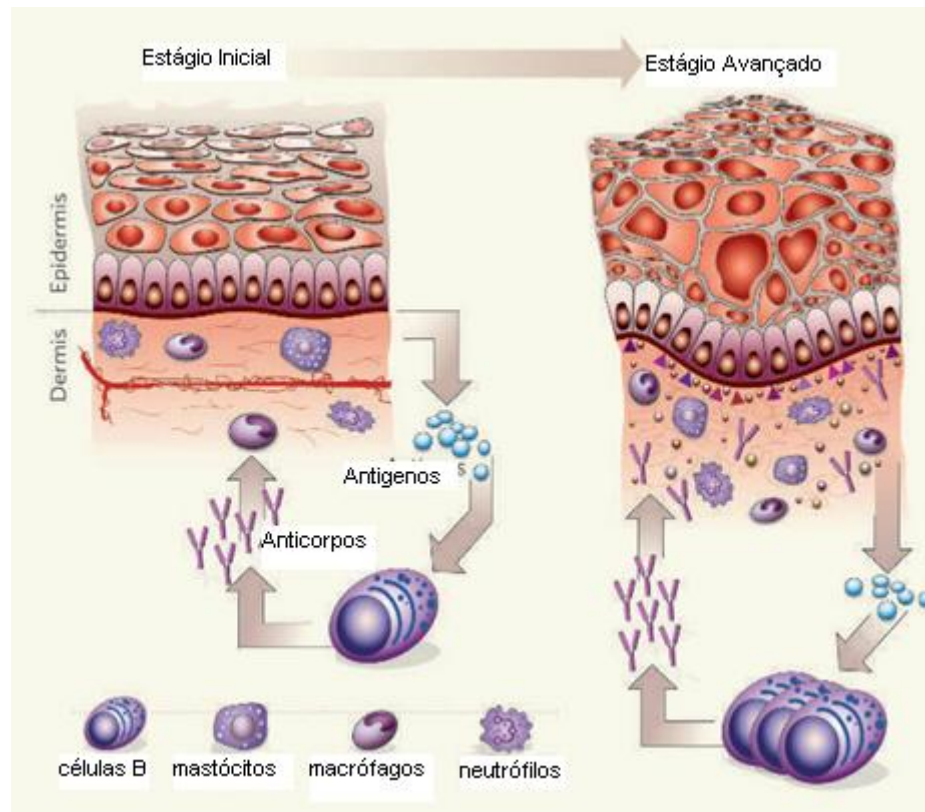


Figura 3.8: Inflamação normal e neoplásica: A figura mostra que células do sistema imune adaptativo, chamadas células B produzem o sinal de que inicia a inflamação na camada epidérmica da pele. Um modelo de como isso pode funcionar é que um antígeno no ambiente do tumor estimula as células B para liberar anticorpos que alvejam células imunes inatas (como neutrófilos, macrófagos e mastócitos), que criam e mantêm a inflamação. Uma vez ativadas, células liberam fatores inatos (triângulos), que pode promover o crescimento e a propagação do tumor [30].

Os leucócitos e outras células fagocíticas como os linfócitos, são capazes de produzir um conjunto variado de citocinas, mediadores citotóxicos, incluindo espécies oxigênio-reativas como as prostaglandinas, serina e cisteína proteases, e agentes perfurantes da membrana, além de TNF, interleucinas e interferons [29].

Estas espécies reagem como um agente mutagênico do DNA nas células em proliferação, através da geração de oxigênio e nitrogênio reativos que formam o peroxinitrito, que são normalmente produzidos por essas células para combater a infecção, mas leva a danos oxidativos do DNA e prejudica sua reparação. A subversão da morte celular e/ou programas de reparação ocorre em tecidos cronicamente inflamados, resultando na replicação do DNA e na proliferação de células que perderam o controle do crescimento normal [29].

Embora os fatores ambientais do processo inflamatório na fase aguda possam inibir o desenvolvimento e matar as células neoplásicas após a ativação por IL-2,

interferon e IL-12, exercendo um efeito paradoxal durante o desenvolvimento do câncer [31]. Repetidos danos teciduais e regeneração de tecidos (inflamação crônica), na presença de espécies altamente reativas de nitrogênio e oxigênio liberadas pelas células inflamatórias, resultam em alterações genômicas permanentes, tais como mutações pontuais, deleções ou rearranjos [28].

A hipótese mais plausível para essa relação entre câncer e processo inflamatório está na presença de prostaglandinas, associadas à ciclooxygenase, principalmente da isoforma COX-2, liberada na inflamação. O papel da COX nas neoplasias foi sugerido após a demonstração de que alguns processos neoplásicos possuem altos níveis de metabólitos do ácido araquidônico, como a prostaglandina E2 (PGE2) [32].

Além da ação das espécies reativas de nitrogênio e oxigênio, a superexpressão de COX-2 favorece mecanismos de promoção tumoral, como aumento da angiogênese, inibição da apoptose, modulação da resposta imune, maior capacidade de invasão e metástase [33-34]. Sendo que a presença de COX-2 pode ser essencial para a vascularização e crescimento do tumor.

A neoformação de capilares a partir de vasos sanguíneos pré-existent é denominada angiogênese. Esse fenômeno depende da motilidade, proliferação e formação de células endoteliais. O desenvolvimento embrionário, reprodução, regeneração e remodelação tecidual são processos fisiológicos onde existe uma importante participação da angiogênese [35].

No entanto esse desenvolvimento de novos vasos sanguíneos também é fundamental no desenvolvimento de patologias, como a carcinogênese. Folkman (1971) propôs no princípio da década de setenta a importante participação do desenvolvimento de microcirculação no processo de crescimento tumoral. A angiogênese tem sido demonstrada como um fator de grande relevância, uma vez que o desenvolvimento de novos vasos sanguíneos é necessário para o suporte de oxigênio, de nutrientes, e também para remover moléculas tóxicas [36].

Quando os tumores sólidos atingem um volume de 1 a 2 mm³, seu crescimento passa a ser diretamente dependente da angiogênese, pois esse é o tamanho limite para a simples difusão de nutrientes e gases como CO₂ e O₂ [37-38].

Como o processo de diferenciação do endotélio desses neovasos não é perfeito, estes exibem uma estrutura desorganizada e tortuosa, com paredes relativamente finas e com menos células musculares lisas. As células endoteliais associadas ao tumor são

anormais em formato, crescem umas sobre as outras e permanecem em um ambiente rico em fatores pró-angiogênicos e citocinas inflamatórias [38].

A angiogênese tumoral envolve a superexpressão de fatores angiogênicos e a baixa expressão de inibidores de angiogênese, ou seja, sua indução é regulada por várias moléculas que podem ser liberadas por células tumorais, ou células normais, incluindo células endoteliais, células epiteliais, células mesoteliais, leucócitos e seus fatores de secreção, que podem atuar como promotores ou inibidores do processo. Os promotores de angiogênese enviam sinal para os tecidos normais circundantes, em que a ativação de genes específicos e a expressão de proteínas estimulem o crescimento e proliferação de novos vasos sanguíneos [39].

Dentre estas moléculas está um grupo de proteínas chamadas de VEGF (*vascular endothelial growth factor*), sendo considerado um dos mais importantes fatores de crescimento endotelial e indutor da angiogênese. O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) contém proteínas específicas que através da ligação às quinases receptoras de tirosinas específicas, agem no aumento da permeabilidade vascular, crescimento, proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais. Assim, esta molécula pró-angiogênica poderá ser um indicador do comportamento biológico do tumor, associando-se a sua superexpressão a um fenótipo agressivo [40-41].

A expressão de um fenótipo angiogênico é anterior à demonstração de propriedades invasivas pelo tumor, o que indica sua importância para o crescimento local do tumor, bem como para o desenvolvimento de metástase [35].

A ciclooxigenase-2 possui papel vital na regulação da angiogênese associada com a proliferação das células neoplásicas. O aumento na expressão de COX-2 está relacionado à produção do fator de crescimento endotelial, determinando a habilidade para estimular o desenvolvimento de células endoteliais e promover a angiogênese.[42-43].

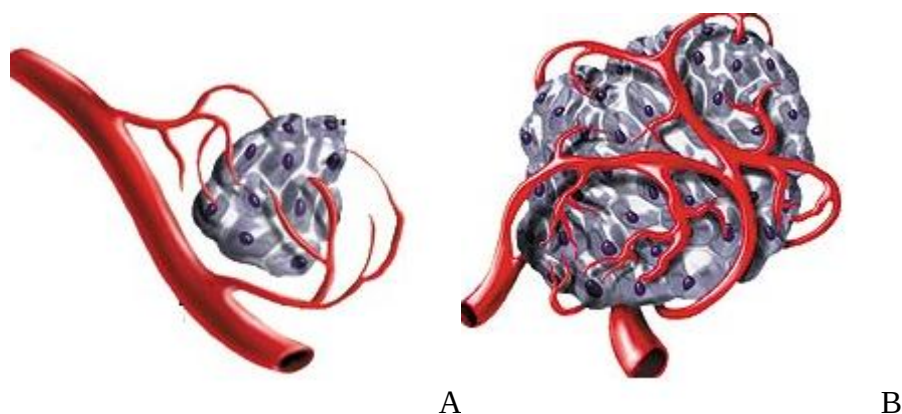


Figura 3.9: A: Formação de neovasos no processo angiogênico. B: Massa tumoral nutrida por essa nova rede de capilares [44].

Os macrófagos associados a tumores (TAM) são o componente inflamatório encontrado mais significativamente na maioria dos infiltrados tumorais. Monócitos precursores originam estes componentes que são atraídos para os tumores pela ação de quimiocinas. Os TAM produzem uma série de potentes fatores de crescimento angiogênicos, citocinas e proteases linfangiogênicas, que são mediadores que potencializam a progressão neoplásica [45].

Vários estudos relatam a superexpressão de COX 2 em neoplasias mamárias. Essa superexpressão é mais comum em tumores que apresentam características associadas a um prognóstico muito ruim [46-47].

Na mama, demonstrou-se que a atividade da COX-2 pode induzir a oxidação de estrogênio a dietilestilbestrol, com significativa toxicidade ao gene. Além disso, a presença de níveis elevados de COX-2 esta associada à resistência a terapia hormonal, possivelmente por meio do aumento da expressão da aromatase pelas células estromais no tumor mamário induzido por PGE2 [48].

Um exemplo é o aumento do infiltrado leucocitário paralelo a carcinogênese mamária. A ativação aguda do linfócito B pode desempenhar um papel na erradicação precoce das células neoplásicas, ou pode participar na regressão espontânea de tumores através de mecanismos mediados por imunoglobulinas, no entanto quando ativado de forma crônica o linfócito B pode ter, paradoxalmente, um papel na potencialização no desenvolvimento do carcinoma [49-50].

Quando comparadas a pacientes saudáveis os linfonodos de pacientes com câncer de mama contêm uma rica população de linfócitos B proliferativos e sua presença está relacionada a aumentos no estágio da doença (fase I versus fase II) [50].

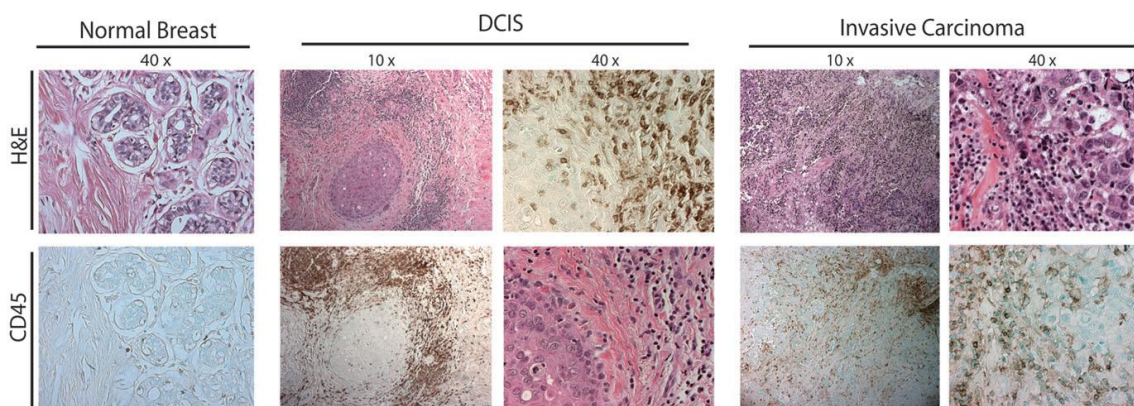


Figura 3.10: O desenvolvimento de carcinoma de mama humano é caracterizada por infiltração abundante de células do sistema imunológico. As Seções representam o tecido mamário normal, pré-maligno, e tecido mamário maligno. Corados com hematoxilina e eosina (H & E) (painéis superiores), e após imunodeteção de CD45 (antígeno comum para leucócitos, de coloração marrom). A sigla DCIS, representa carcinoma ductal in situ [50].

Diferentes tipos de tumores também apresentam a superexpressão da COX-2, como por exemplo, o câncer de pulmão. Um estudo feito com 89 pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (NSCLC) submetidos à ressecção curativa, analisaram por PCR em tempo real amostras tumorais e constataram a expressão de COX-2 em 100% dos casos, relacionando a expressão da COX-2 e sobrevida limitada dos pacientes [51].

A metástase é definida como o comprometimento à distância, por uma parte do tumor que não guarda relação direta com o foco primário. Ao longo desse processo, fatores mecânicos e imunológicos devem ser superados para que as células neoplásicas consigam implantar-se em um novo órgão e terem crescimento autônomo em relação ao tumor primário [52].

A metástase por via hematogênica acomete principalmente os órgãos mais vascularizados como pulmão, fígado e cérebro. Geralmente com origem venular, devido ao fato que as veias e vênulas possuem paredes mais frágeis, são mais facilmente penetradas do que artérias e arteríolas. As metástases por via arterial podem ocorrer, por exemplo, quando células metastáticas cruzam o leito capilar pulmonar, quando

atravessam comunicações arteriovenosas ou quando as próprias metástases pulmonares funcionam como foco de novas células tumorais capazes de metastatizar [52].

As ramificações dos vasos pré-existentes se comunicam com a rede vascular imatura, possibilitando a migração das células. Estas seguem, assim, na circulação sanguínea, podendo originar metástases à distância.

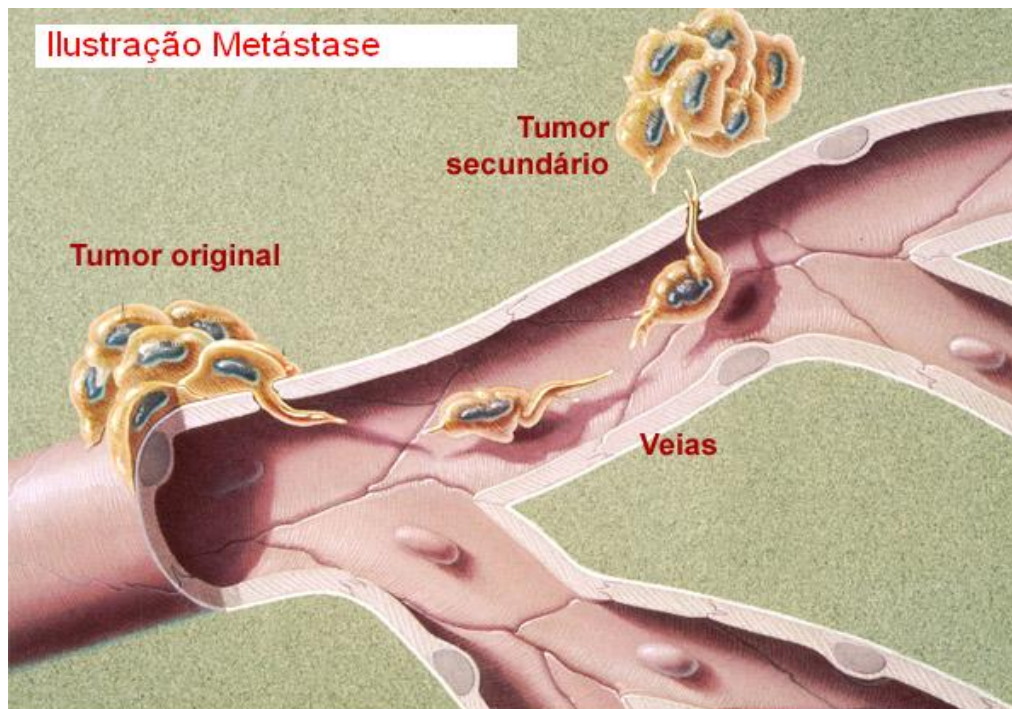


Figura 3.11: Imagem mostra como ocorre o processo da metástase, quando as células cancerígenas se reproduzem e se espalham pelo corpo, formando novos tumores [53].

Outra via de disseminação sistêmica de um tumor maligno é estabelecida pelo sistema vascular linfático. Os capilares linfáticos são caracterizados por sua descontinuidade da membrana basal, o que facilita a permeação de células tumorais. Além disso, a baixa velocidade do fluxo linfático e a composição da linfa (semelhante à do fluido intersticial) favorecem a viabilidade celular (nos vasos sanguíneos, pelo contrário, a toxicidade celular é elevada). Como tal, a corrente linfática é preferencial para a disseminação de muitos tipos de tumores malignos, principalmente os que apresentam histogênese epitelial [52].

3.4. Antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) e câncer.

Os avanços no conhecimento sobre as bases moleculares do câncer têm criado uma boa expectativa de terapias mais apuradas e eficazes para o tratamento da doença. Embora se tenha atingido um sucesso razoável através da utilização da radioterapia e da cirurgia, duas das terapias mais utilizadas no tratamento do câncer, na maioria dos casos o sucesso da utilização dessas técnicas só é contemplado se o câncer estiver em estágio inicial [54].

A utilização da quimioterapia teve início na década de 40, com o uso da mostarda nitrogenada e hormônios, e foi introduzida na clínica na década de 50.

A terapêutica quimioterápica tem obtido muito sucesso nos casos de alguns tipos de leucemia aguda infantil e subgrupos da doença de Hodgkin e alguns linfomas. A melhoria na expectativa de vida nesses casos torna essa terapia recomendável. Além disso, a quimioterapia como adjuvante no tratamento cirúrgico, principalmente nos casos de câncer de mama, cólon e pulmão apresenta uma grande eficiência, aumentando a longevidade de pacientes acometidos por essa doença [54].

Recentemente, muitos pesquisadores têm enfatizado a utilização de medicina complementar para prevenção e tratamento do Câncer, utilizando agentes quimioprotetores e antioxidantes.

Um dos caminhos apontados no tratamento quimioterápico está associado à relação entre o câncer e a inflamação, como mencionado anteriormente. Sob essa perspectiva, a via das prostaglandinas no processo inflamatório, mais especificamente a enzima COX desponta como um caminho farmacológico promissor na prevenção e tratamento do câncer. Sendo assim a utilização de Antiinflamatórios não-esteroidais (AINES) com finalidade quimioterápica vem sendo uma possibilidade amplamente estudada.

Os AINES compõem um grupo variado de substâncias que compartilham das mesmas propriedades farmacêuticas. Estes compostos possuem uma variedade química, que em sua maioria, consistem de um ou mais anéis aromáticos ligados a um grupamento ácido funcional. Geralmente são ácidos orgânicos fracos que atuam principalmente nos tecidos inflamados apresentando ação analgésica, antitérmica e antiinflamatória em doses terapêuticas. Sua absorção é rápida e completa depois da administração oral (exceto as preparações entéricas e de liberação lenta). Não

atravessam imediatamente a barreira hematoencefálica e são metabolizados principalmente pelo fígado e predominantemente excretados pela urina [55].

O principal mecanismo de ação dos AINEs ocorre através da inibição específica da COX e conseqüente redução da conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas. O resultado desta reação é a produção de PGG₂, que por sua vez ao interagir com a enzima peroxidase configura a PGH₂, convertendo às prostaglandinas, prostaciclinas e tromboxanos (TXs) [56].

Os agentes antiinflamatórios não esteroidais convencionais (não seletivos, os quais inibem tanto a enzima cicloxigenase-1 (COX-1), quanto a cicloxigenase-2 (COX-2), podem provocar efeitos colaterais, como distúrbios gastrintestinais e renais decorrentes da inibição da COX-1. Atualmente, com o intuito de reduzir os efeitos colaterais promovidos pelos AINEs convencionais, foram desenvolvidos compostos que apresentam seletividade pela inibição da enzima COX-2, fato que justifica a melhor tolerabilidade a este tipo de medicamento, evitando reações adversas. Esse tipo de antiinflamatório tem sido utilizado, de maneira rotineira, por pacientes com dor crônica e desconfortos associados, por exemplo, à osteoartrite e artrite reumatóide [57].

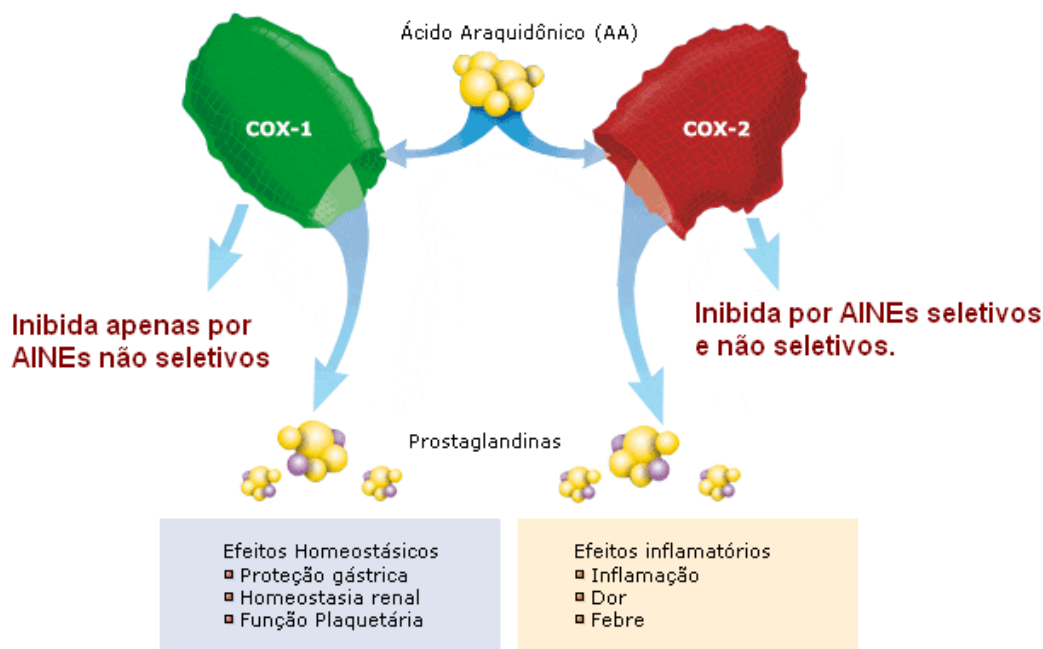


Figura 3.12 Esquema do mecanismo de ação da Ciclooxygenase. adaptado de [58].

Uma vez que a COX-2 parece atuar na carcinogênese de várias formas, incluindo efeitos sobre apoptose, proliferação celular, imunomodulação, agressão do tumor, neoangiogênese e invasão tumoral, provavelmente mediado pela PGE₂, a inibição da enzima COX e da catálise de prostaglandinas (PG) inibe a atuação destas neste processo.

Estudos epidemiológicos indicam que a utilização desses medicamentos reduz o risco de câncer de 40-50%, podendo ser preventiva para o câncer de pulmão [57]. O ácido acetilsalicílico demonstrou ação preventiva para câncer colorretal que superexpressam a COX-2 e sua influência no controle da doença já estabelecida [59-60]. O uso prolongado de antiinflamatórios não esteroidais reduz o risco de câncer de cólon [61-62]. Além disso o ácido acetilsalicílico pode reduzir a incidência de câncer de pulmão [51] e mama [26].

3.4.1. Ácido Acetilsalicílico.

No século V a.C. Hipócrates, médico grego e pai da medicina científica, escreveu que o pó ácido da casca do salgueiro ou chorão (que contém salicilatos mas é potencialmente tóxico) aliviava dores e diminuía a febre [63].

Foi em Chipping Norton, no Condado de Oxford, Reino Unido, que o reverendo Edmund Stone, em 1973 redescobriu as propriedades antipiréticas da casca do salgueiro e as descreveu na literatura científica. O princípio ativo da casca, a salicina ou ácido salicílico, do nome latino do salgueiro *Salix alba*, foi isolado na sua forma cristalina em 1828 pelo farmacêutico francês Henri Leroux e por Raffaele Piria, químico italiano [63].

A partir do ácido salicílico, Felix Hoffman sintetizou a aspirina (ácido acetilsalicílico) em 1897 (Figura 3.13-3.14). Este novo medicamento mantinha a propriedade analgésica desejada do ácido salicílico, porém com uma menor acidez. O ácido acetilsalicílico foi obtido a partir da esterificação do ácido salicílico com anidrido acético em presença do ácido sulfúrico que atua como catalisador [64].

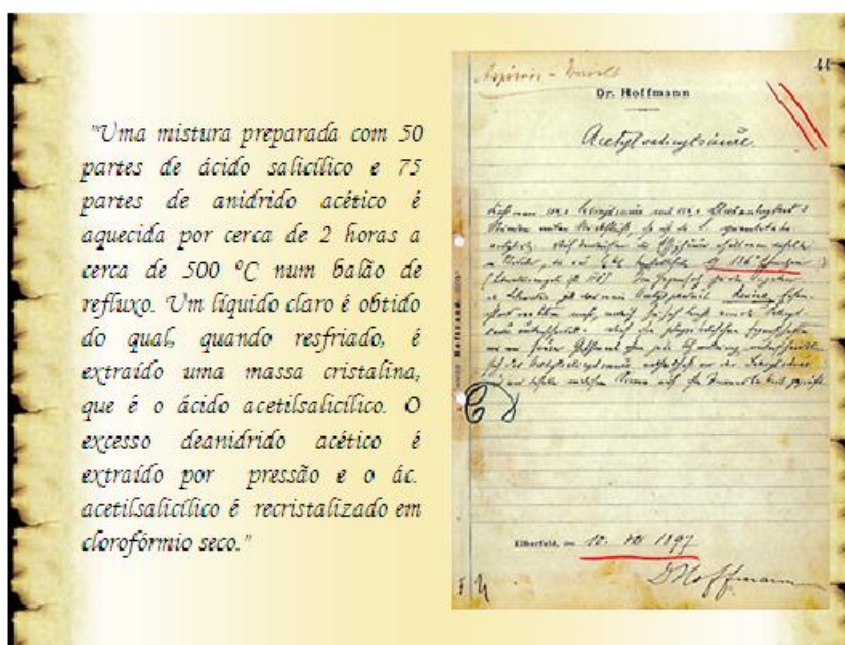


Figura 3.13: Acima: Hoffmann e a árvore do salgueiro, de onde é extraído o princípio ativo salicilina. Abaixo, manuscrito original sobre a síntese de ácido acetilsalicílico assinado por Hoffmann [65].

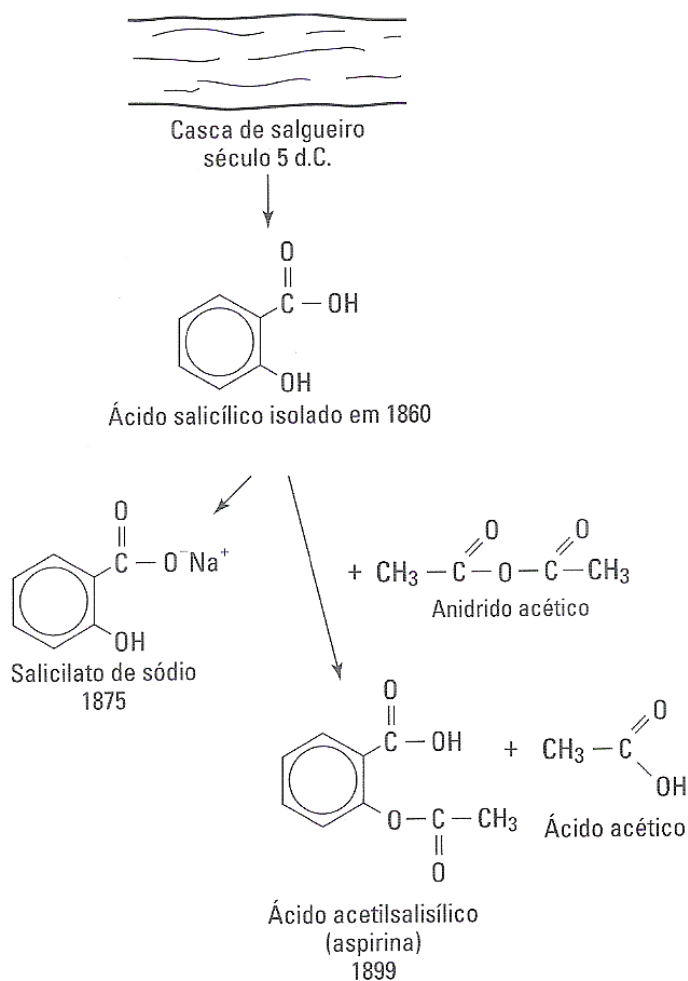


Figura 3.14: Esquema Químico da síntese de Ácido Acetilsalicílico a partir da casca do salgueiro [64]

O ácido acetilsalicílico foi o primeiro fármaco a ser sintetizado na história da farmácia e não recolhido na sua forma final da natureza, primeira criação da indústria farmacêutica e o primeiro fármaco vendido em tabletes [40-57]. A Bayer perdeu a marca registrada Aspirina em muitos países após a Primeira Guerra Mundial, como reparação de guerra aos países aliados.

O mecanismo de ação do ácido acetilsalicílico foi demonstrado em Londres, em 1971, por John Vane, do Royal College of Surgeons e viria a receber o Prêmio Nobel da Medicina e Fisiologia pela sua descoberta em 1982. Após a demonstração dos seus efeitos antiinflamatórios, esse composto foi introduzido na medicina em 1899 [55].

O ácido acetilsalicílico administrado por via oral sofre absorção no estômago e intestino, sua distribuição é rápida e para todas as partes do organismo, sendo metabolizado no fígado. Com absorção oral, alcança concentração plasmática

considerável em 30 minutos, com pico máximo em 2 horas, apresentando uma biodisponibilidade de 70%. Pode, no entanto, sob altas doses, atingir concentrações sanguíneas detectáveis por períodos de até 30 horas [64-65].

A biotransformação ocorre em diversos tecidos, principalmente no fígado. Por estar ligado às proteínas plasmáticas (albumina), pode produzir toxicidade em casos de hipoalbuminemia. Ácido Acetilsalisílico apresenta meia vida plasmática em torno de 15 minutos e é excretado basicamente pelos rins, principalmente na forma de ácidos salicílico, salicílico e gentísico, ou glicuronatos, sendo outra parte excretada sem sofrer alterações. A excreção renal envolve filtração glomerular, secreção tubular ativa e reabsorção ativa [64].

A cinética da eliminação do ácido salicílico depende da dose, uma vez que o metabolismo é limitado pela capacidade das enzimas hepáticas. Desse modo, a meia-vida de eliminação varia de 2 a 3 horas após doses baixas até cerca de 15 horas com doses altas. O ácido salicílico e seus metabólitos são excretados principalmente por via renal [67].

Apesar do ingresso de um grande número de diferentes fármacos novos no mercado, o ácido acetilsalicílico (AAS) continua sendo o analgésico-antipirético e antiinflamatório mais amplamente prescrito. É o princípio ativo em mais de 50 medicações sendo um dos analgésicos mais confiáveis do mundo, com mais de 100 anos de comprovada eficiência como analgésico, antipirético e antiinflamatório. Outra vantagem é o baixo custo e o fácil acesso a essa medicação. O ácido acetilsalicílico representa um dos fármacos mais consumidos no mundo e neste ano completou 112 anos de sua descoberta [67].

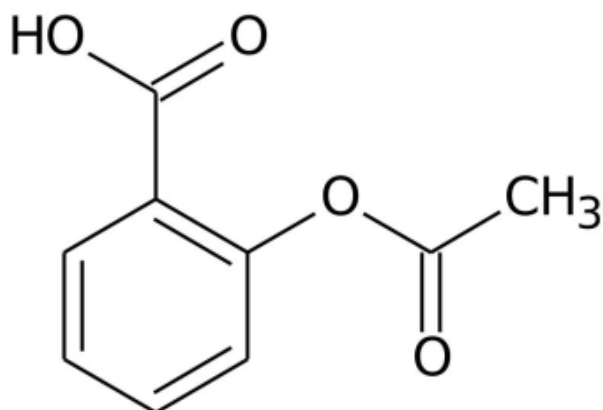


Figura 3.15: Fórmula estrutural do Acido Acetilsalicílico [68].

A aspirina é um AINE não seletivo, pois caracteriza-se por inibir a atividade dos dois sub-tipos da ciclooxigenase. A inibição da função plaquetária por acetilação irreversível e inativação COX-1 e COX-2 impede a síntese plaquetária de prostaglandinas, endoperóxidos e Tromboxano A₂ [39].

O mecanismo de ação do AAS está baseado acetilação de compostos bloqueando a ligação do ácido araquidônico no local ativo da enzima. A aspirina modifica covalentemente a COX-1 e a COX-2, resultando desta forma na inibição irreversível da atividade das ciclooxigenases. Assim, a duração dos seus efeitos está relacionada à taxa de renovação das ciclooxigenases nos diversos tecidos-alvo. Na estrutura da COX-1, a aspirina acetila a serina 530 impede a ligação do ácido araquidônico ao local ativo da enzima [69].

Na COX-2, o AAS acetila uma serina homóloga na posição 516, através de uma modificação covalente da que também impede a atividade de ciclooxigenase dessa isoforma. Sendo assim, resultados significantes podem ser esperados na área da quimioprevenção com o uso da aspirina [70].

No entanto, o caráter não seletivo do AAS, além da inibição da COX-2 no processo inflamatório, também impede processos fisiológicos importantes como citoproteção da mucosa gástrica e algumas funções da coagulação sanguínea.

Sendo assim, o ácido acetilsalicílico (AAS) apresenta alguns efeitos colaterais, especialmente para pacientes que necessitam de tratamentos por longo período de tempo, restringindo a utilização deste tratamento.

3.5 Dendrímeros como transportadores de AINEs: conjugação versus encapsulamento

Em geral, toda substância que entra em contato com o organismo apresenta certo nível de toxicidade, afetando o sistema biológico. Desta forma, quando uma terapia medicamentosa se torna necessária, existe o compromisso de controlar a quantidade do fármaco a ser administrada, evitando causar danos ao organismo, e ao mesmo tempo, proporcionar um tratamento eficiente, que alcance as células alvo, com absorção, metabolização e excreção adequadas.

Em alguns casos, isto pode ser alcançado pela administração do fármaco em forma livre por via oral. No entanto, cerca de 40% das moléculas farmacologicamente ativas descobertas são rejeitadas, devido principalmente, à reduzida solubilidade e biodisponibilidade. Para contornar tais problemas, transportadores ou carreadores, capazes de modularem a liberação com alto grau de reprodutibilidade, surgiram como alternativas eficazes [71-72].

O transportador é empregado para apurar a farmacocinética e a biodistribuição do fármaco, além de fornecer uma cinética de liberação modificada e direcionada para o alvo. Ou seja, disponibilizar o fármaco em concentração adequada, de forma vetorizada, agindo em locais específicos conforme a necessidade do organismo, na dosagem apropriada e no tempo mais eficiente, reduzindo sua degradação e a ocorrência de efeitos adversos [73].

Outra importante consideração, do ponto de vista dos pacientes, é facilitar o tratamento diminuindo o número de doses do medicamento, de modo a simplificar o processo terapêutico, aumentando a adesão ao medicamento. Considerando o intervalo estreito de concentração terapêutica, acima do qual se torna tóxico e abaixo do qual é considerado ineficaz. O sistema de liberação controlada de fármacos elucida uma grande parte das limitações na utilização de muitos fármacos, permitindo a manutenção de sua concentração em nível ótimo por um tempo prolongado, sendo administrado, se possível, em apenas uma dosagem [41].

A maior parte desses sistemas caracteriza-se pelo tamanho diminuído das partículas, sendo atualmente desenvolvidos principalmente em escala nanométrica e pela compartimentação de fármacos em ambientes restritos, podendo, com isso, direcioná-lo para as regiões pretendidas favorecendo a interação com os sistemas biológicos [74].

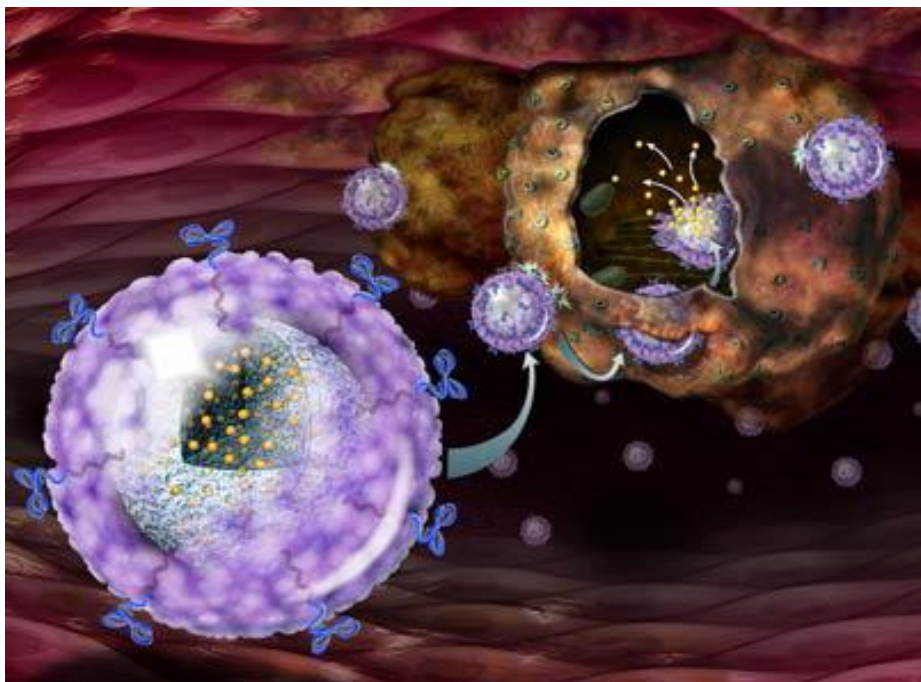


Figura 3.16: Ilustração demonstrando a ação de um transportador de fármaco em uma célula tumoral [75].

Na quimioterapia antineoplásica, a obtenção de moléculas alvo-específicas, isto é, que tenham alta especificidade para determinada componente celular, possibilitando o transporte e a liberação do agente terapêutico apenas em sítios apropriados, aumentando sua eficácia e diminuindo seus efeitos colaterais, se torna particularmente benéfica.

Além de melhorar as propriedades do fármaco como solubilidade e tempo de circulação no plasma, transportadores poliméricos facilitam o direcionamento da droga ao tumor sólido. Quando se utiliza transportadores com um tamanho que permite a absorção dessas moléculas pela microvasculatura do tumor, com a ausência de drenagem linfática, temos um acúmulo seletivo de macromoléculas no tecido tumoral, um fenômeno denominado '*Enhanced Permeation and Retention*' (EPR) [76].

Para que um biomaterial possa ser utilizado como um sistema liberador de fármacos além de biocompatibilidade e baixa citotoxicidade, uma série de atributos singulares são necessários. Neste campo, os polímeros dendriméricos ou dendrímeros têm atraído grande interesse por exibirem características como monodispersividade, alta capacidade de carga, possibilidade de produção em larga escala e capacidade bioconjugação [76].

Como relatado anteriormente, os dendrímeros são macromoléculas sintéticas monodispersas, que possuem uma arquitetura dividida em núcleo e periferia, e tem

como característica a intensa presença de grupos reativos. Esta estrutura apresenta alto peso molecular, que pode ser perfeitamente controlado e grande área superficial com elevado grau de ramificação e de simetria, o que permite a síntese de micelas unimoleculares [77].

Essas macromoléculas tridimensionais são dotadas de pontos de ramificação em cada unidade monomérica, isto torna possível a síntese de estruturas com definidos números de geração e grupos funcionais terminais [77].

O primeiro relato de síntese de dendrímeros foi em 1978, feito por Vögtle, onde os monômeros empregados foram o acrilonitrilo. A síntese foi feita através de reações de adição, seguida de uma redução dos grupos nitrilos a aminas primárias.

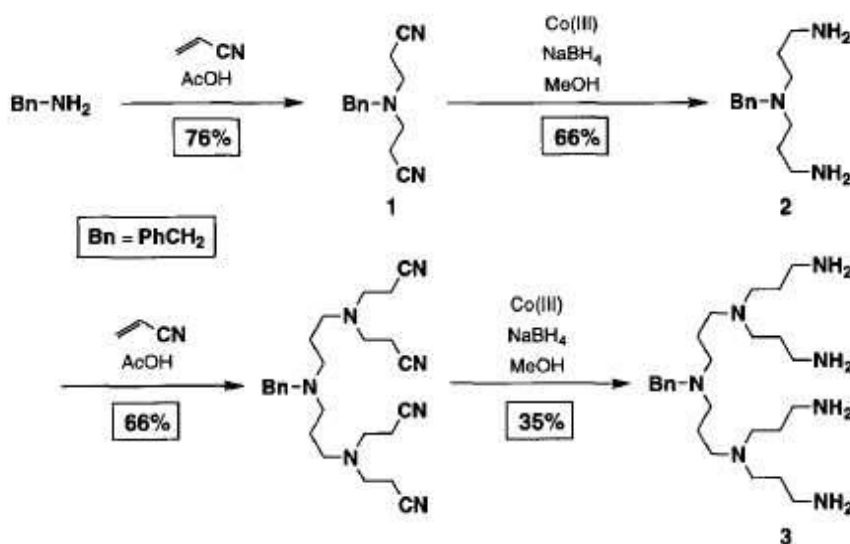


Figura 3.17: Primeira tentativa da síntese dendrímica [78].

Atualmente podemos contar com uma grande variedade de dendrímeros, tanto em número de núcleos iniciadores, ou seja, a molécula central ou o núcleo do dendrímero, bem como nas unidades finais.

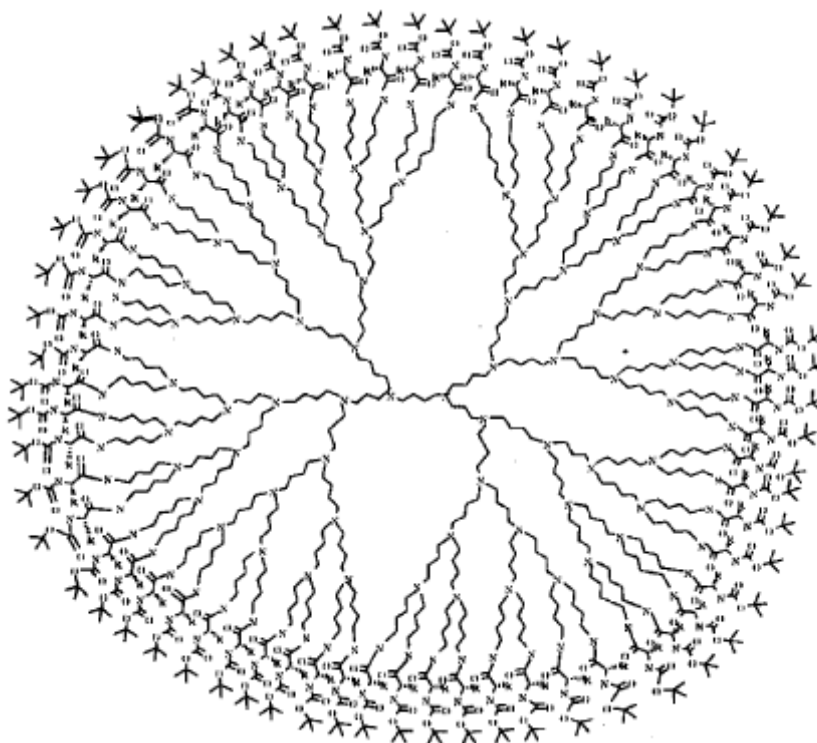


Figura 3.18: Arquitetura de um Dendrímero [77].

Os dendrímeros são preparados através de uma síntese tridimensional repetitiva controlada. A síntese tridimensional envolve o uso de núcleos polifuncionais que acumulam unidades monoméricas repetitivas de modo radial e exponencial, capaz de construir "braço-sobre-braço" até que uma topologia semelhante a uma árvore seja estabelecida [79].

Os grupos terminais na síntese dendrímica são usados no próximo estágio do "crescimento" molecular e, para cada nova geração que é formada o número de grupos terminais irá, pelo menos, dobrar. Através de um planejamento cuidadoso, a natureza e o número de grupos terminais podem ser controlados precisamente. Esta característica é importante na arquitetura dendrímica, já que muitas aplicações potenciais podem e utilizam esta propriedade [79- 80].

Fundamentalmente existem dois modos de sintetizar dendrímeros:

O primeiro seria o método divergente, em que se inicia com o núcleo adicionando-se a este sucessivas camadas de monômeros até se obter o dendrímero desejado. Este método tem como principal desvantagem a possibilidade de ocorrerem

reações incompletas dos grupos terminais, uma vez que estes defeitos estruturais se acumulam com a construção das gerações seguintes [81-82].

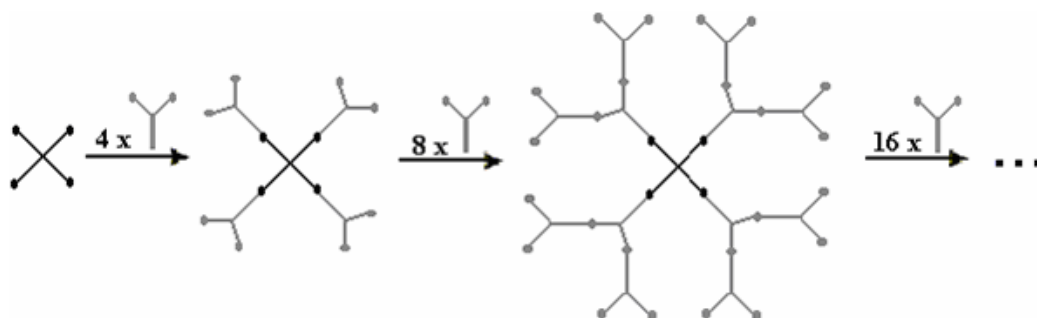


Figura 3.19: Representação do método de síntese divergente de dendrímeros [41].

No método convergente utiliza-se o processo contrário, onde os ramos são sintetizados e só depois unidos ao núcleo para produzir o dendrímero. Ou seja, um segmento cresce com cada passo reacional e é acoplado com apenas uma unidade ramificada. Os efeitos da reação de esterificação dos segmentos e núcleo limita o número de gerações obtidas por este método [81-82].

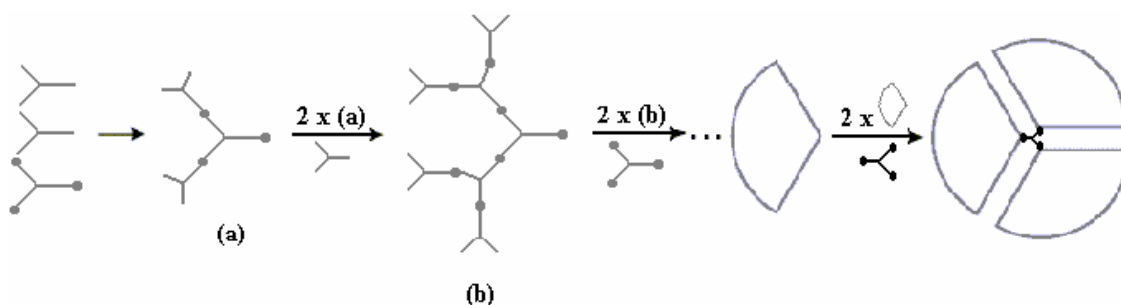


Figura 3.20: Representação do método de síntese convergente de dendrímeros [41].

Os dendrímeros exigem apenas um passo por geração realizado em um volume mínimo de solvente, permitem fácil purificação e produzem subprodutos ambientalmente benignos como água e nitrogênio. O diâmetro aumenta sistematicamente a uma taxa de aproximadamente 1 nm por geração [41].

Os recentes sucessos em simplificar e aperfeiçoar a síntese de dendrímeros fornecem uma grande variedade de estruturas e ao mesmo tempo reduzem os custos da sua produção [83].

Além disso, o processo de síntese desses compostos permite um domínio rigoroso de sua arquitetura. Outro fator que propicia a utilização dos dendrímeros como

sistema liberador de fármaco são as diferentes estruturas funcionais de sua superfície, que são passíveis de modificação para marcação com moléculas célula-específica. Outras propriedades exibidas pelos dendrímeros são adesão celular, endocitose e tráfico celular apropriado, dependendo dos grupamentos de sua superfície [84].

Diversas formas de intercâmbio entre a arquitetura dendrítica e moléculas hospedeiras tem sido propostas. Inicialmente, o estudo de dendrímeros como sistema liberador de fármacos era focado no seu uso como micela unimolecular e “caixas dendríticas” para o confinamento de fármacos em seu interior (envolvendo interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio). O controle da incorporação de moléculas permite que fármaco e outros solutos sejam protegidos em seu interior, promovendo o seu isolamento em nível molecular durante o trânsito para células alvo, em espécies de nichos quimicamente determinados que funcionam como nanoarcaloço [85 -86-87].

Uma vantagem das micelas unimoleculares dendriméricas em relação às micelas poliméricas convencionais é que a estrutura micelar fica mais estável uma vez que os segmentos hidrofóbicos estão ligados covalentemente. Atualmente, novas abordagens para o controle da liberação da droga do compartimento micelar envolvem a utilização de poli(oxietileno), PEO, híbrido e de dendrímeros com grupos hidrofóbicos acetil sensíveis ao pH [86].

Outra forma de unir o princípio ativo ao dendrímero seria conjugando covalentemente para formar um pró-fármaco macromolecular, promovendo a interação entre o fármaco e a superfície dendrítica, explorando a multivalência das ligações covalentes do fármaco ligando-o a periferia do dendrímero (interações eletrostáticas e covalentes) [86-87].

Nestes casos, o carregamento da droga pode ser controlado com a variação do número de gerações e a liberação da droga pode ser ajustada com a inclusão de ligações degradáveis entre ela e o dendrímero. Os grupos presentes na superfície podem ser seletivamente construídos e transformados para originar um preciso espaçamento na superfície das moléculas, o que muitas vezes não é possível com nanopartículas convencionais. Os conjugados promovem o aumento da solubilidade e o acúmulo seletivo em tumores sólidos (EPR) e diminuem a toxicidade sistêmica [88-89]. Esta abordagem tem sido utilizada, por exemplo, para sintetizar dendrímeros de poliéster como carreador do medicamento antineoplásico doxorubicin [90].

Uma segunda maneira de conjugar um agente bioativo covalentemente ao dendrímero é a sua conjugação em um ponto focal, moléculas corantes foram acopladas a um ponto focal de grupos aminas de diferentes tipos de dendrímeros para estudar sua captação celular. Um ligante dissulfeto também foi utilizado para acoplar dendrímeros a base de guanidina a anticorpos e nanopartículas poliméricas. Estes conjugados foram internalizadas pelas células de mamíferos [91-92].

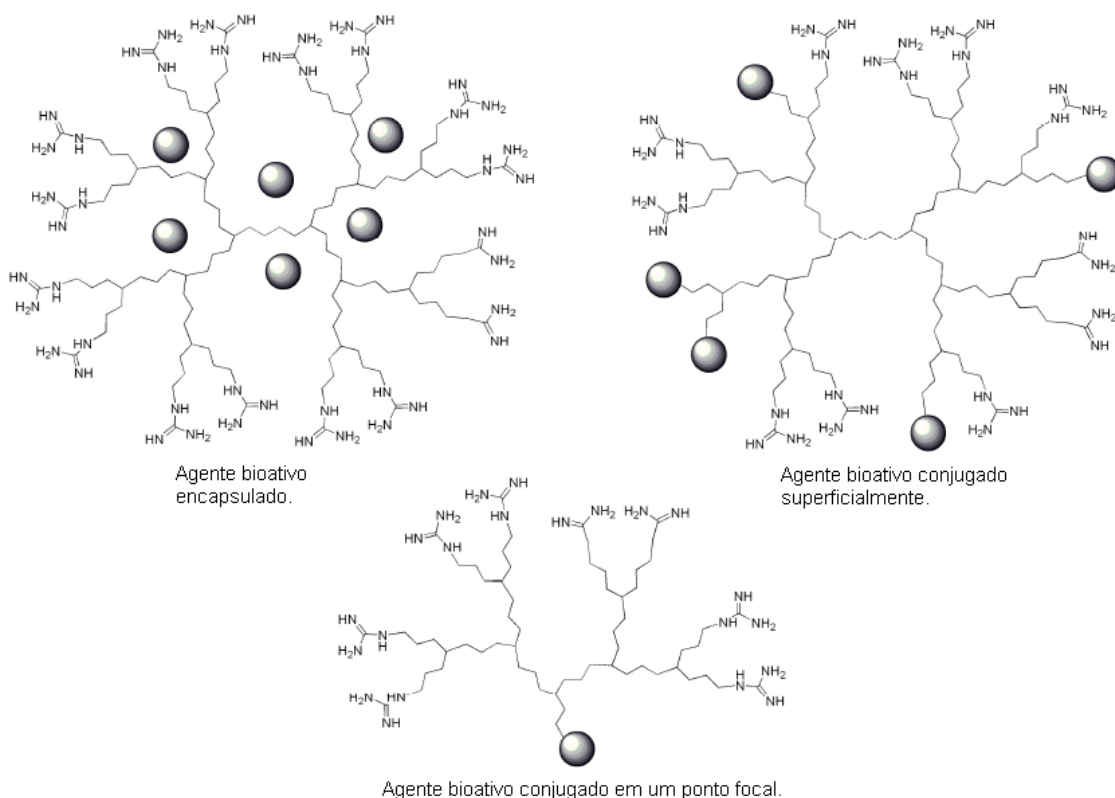


Figura 3.21: Formas de associação do agente bioativo com o dendrímeros [93].

No caso de fármacos encapsulados eles são liberados através da difusão da matriz droga/dendrímero, em fármacos conjugados aos dendrímeros a liberação vem através da clivagem das ligações covalentes que unem o pró-farmaco ao dendrímero. A sua alta solubilidade em um grande número de solventes orgânicos favorece o processamento e a rápida dissolução [85].

Comparado com lipossomas e micelas, os conjugados de medicamentos com dendrímeros demonstram maior estabilidade, devido às suas estruturas unimoleculares, sendo portanto, mais fáceis de manusear (formulação e esterilização). No entanto, em adição ao desafio para a síntese de dendrímeros monodispersos de alta

geração, a conjugação de um alto índice de drogas insolúveis na superfície dos dendrímeros podem resultar em aumento significativo da hidrofobicidade periférica. Isso pode levar a agregação do polímero e a um aumento na sua polidispersividade [76].

Uma análise comparativa entre os compostos encapsulados e conjugados foi feita por Patri, *et al.* (2005) com dendrímeros PAMAM de geração 5 e demonstrou que o complexo de inclusão melhorou a solubilidade em água mas apresentou uma liberação prematura da molécula bioativa, já os dendrímeros conjugados covalentemente se mantiveram estáveis, sendo considerados adequados para a liberação de fármacos em um sítio específico em condições biológicas [76].

O emprego de dendrímeros com o propósito de originar a solubilização de fármacos insolúveis ou pouco solúveis tem sido muito explorado. Um exemplo seria a utilização de dendrímeros PAMAM, que foi capaz a melhorar as propriedades de solubilização da Dimetoxicurcumina, um fármaco conhecido por sua significativa atividade contra várias linhagens celulares de câncer que possui uso restrito devido a sua baixa solubilidade em água [94]. De acordo com Kurniasih *et al.* (2010) a solubilidade em água de corantes não polares (pireno, vermelho do nilo, corante perfluoro diazo) e da droga Nimodipina foi melhorada [95].

Diversos fármacos antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) como cetoprofeno, ibuprofeno, diflunisal e naproxeno apresentaram um aumento significativo na sua solubilidade quando encapsulados por dendrímeros PAMAM. Os resultados mostraram que a solubilidade dos AINEs foi aproximadamente proporcional a concentração e geração dos dendrímeros utilizados. A ação da doxorrubicina também foi mais eficiente no tratamento do câncer de cólon em ratos quando associada ao transporte polimérico [96].

Devido à capacidade de permitir um domínio preciso sobre sua arquitetura e a apresentação de características favoráveis para essa finalidade, podemos presumir que estas moléculas ainda têm muito a oferecer para a terapêutica sendo ferramentas formidáveis para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos mais seguros e eficazes.

3.5.1 Dendrímero de Poliglicerol

O dendrímero de poliglicerol (PGLD) exibe características favoráveis para utilização como carreador farmacológico. Este biomaterial tem como principal característica a presença de grupos hidroxilas e ligações éter. Devido a sua arquitetura núcleo-casca ele apresenta propriedades anfipáticas que permitem sua utilização no processo de encapsulamento e transporte de moléculas polares (tais como corantes e drogas) em ambientes hidrofílicos e hidrofóbicos. Seus grupos hidroxilas funcionais podem ser transformados e utilizados como sítios para imobilização de substâncias de interesse biológico.

O PGLD apresenta baixa temperatura de transição vítrea (T_g) e solubilidade em água. Sua sintetização é feita através do método divergente, que possibilita um melhor controle da técnica [41-97].

O dendrímero poliglicerol altamente ramificado tem sido utilizado no processo de encapsulamento e transporte de moléculas polares (tais como corantes e drogas) e, também, na criação de microambientes especiais no seu núcleo. Afinal, a síntese de dendrímeros permite gerar arquiteturas moleculares similares às observadas em sistemas biológicos e, devido a isso, essas macromoléculas são conhecidas como proteínas artificiais [95].

O poliglicerol dendrítico faz parte dessa classe de materiais versáteis e, por isso, apresenta um futuro promissor na área de aplicações biomédicas. Recentes progressos foram feitos na aplicação de dendrímeros biocompatíveis como transportadores de fármaco para o tratamento do câncer [41].

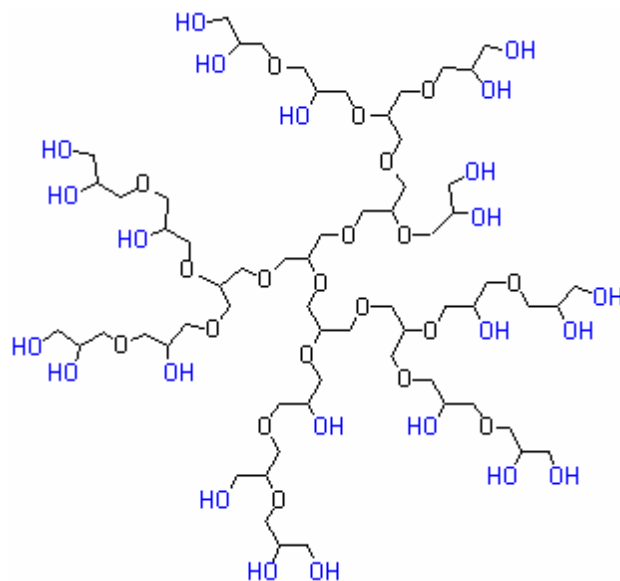


Figura 3.22: Dendrímero de poliglicerol. Observa-se em destaque a elevada quantidade de grupos hidroxilas na periferia da macromolécula.

O grupo de biomateriais da Unifei tem estudado as propriedades bioquímicas do bioconjugado de dendrímero de poliglicerol associado ao ácido acetilsalicílico, o PGLD-AAS, apresentando em trabalhos anteriores sucesso na síntese desse composto e uma avaliação favorável de suas propriedades bioquímicas, no que se relaciona a biocompatibilidade, propriedades hemocompatíveis e de citotoxicidade adequadas para o contato com o sangue. Logo, o sistema PGLD-AAS pode atuar como transportador do agente antitumoral diretamente na corrente sanguínea[41].

Desta forma, este material apresenta características adequadas relacionadas à biocompatibilidade, e funcionalidade como sistema carreador do ácido acetilsalicílico, tornando a utilização deste fármaco favorável ao tratamento antineoplásico.

Referências Bibliográficas:

- [1] Spence, R. A. J.; Johnston, E. G. *Oncologia*. Primeira edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2003
- [2] Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2009/lancamento_estimativa_2010>. Acessado em 25/04/2010
- [3] Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900>>. Acessado em 10/11/2010.
- [4] Neville, B.; Damm, D. D.; Allen, C. M.; Bouquot, J. E. *Patologia Oral & Maxilofacial*, Terceira edição . Guanabara Koogan, 2003.
- [5] Disponível em: <<http://www.clinicadefraturaszonanorte.com.br/infomedico/default.asp?id=23>> Acessado em 27/08/2010.
- [6] Balbino, C. A. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* vol. 41, n. 1, jan./mar., 2005
- [7] Disponível em: <<http://www.fo.usp.br/lido/patoartegeral/patoarteinfl3.htm>> Acessado em 27/08/2010.
- [8] Disponível em: <http://www.nature.com/nature/journal/v453/n7193/fig_tab/nature07039_F1.html> Acessado em 11/02//2011.
- [9] Disponível em: <<http://vetimunodeficiencia.blogspot.com/2010/08/deficiencia-na-adesao-de-leucocitos.html>>. Acessado em 11/02//2011.
- [10] Disponível em: <http://www.brasilcirurgioplastica.com.br/conteudo/index2.php?option=com.content&do_pdf=1&id=146> Acessado em 27/08/2010.
- [11] Disponível em: <<http://www.goodpsych.com/stress-psychology>> Acessado em 11/02//2011.
- [12] Grivicich, I.; Regner, A.; Rocha, A.B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia* v. 53, n.3, p. 335-343.
- [13] Guidugli-Neto, J. *Elementos de Patologia Geral*. Editora Santos, São Paulo, 1997.
- [14] Baron, J. A.; Sandler, R.S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med* v.51, p.511–523, 2000.
- [15] Millen, E. C.; *et al.* Correlação entre COX-2 e ciclina D-1 após administração de tamoxifeno neoadjuvante em curto prazo no tratamento de carcinoma de mama . *Rev Bras Mastol.* v.19, n.2 , p.47-52, 2009.

- [16] Gilman, A. G.; Hardman, J. G.; Limbird, L. E. Goodman & Gilman *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Décima edição, McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 2003.
- [17] Disponível em: <http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Odontologia/posgrados/acadendo/i_a_revision34.html>. Acessado em 12/02/2011.
- [18] Rose, D. P.; Conolly, J. M. Omega-3 fatty acids as cancer chemopreventive agents. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 83, p. 217-244, 1999.
- [19] Vane, J. R., Botting, R. M. New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*. p. 1-10, 1995.
- [20] Hla, T; Neison, K. Human cyclooxygenase-2 cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; v. 89, n.8 73-84.
- [21] Carvalho, W. A.; et . al. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos. *Rev Bras Anesthesiol*, v.54, n. 3, p.448 – 464; 2004.
- [22]Disponível em: < <http://revistaepoca.globo.com/Revista/Epoca/0,,EMI50282-15223,00-OS+DESAFIOS+DO+CANCER.html>> Acessado em 28/09/2010.
- [23] Lee, C.; Macgregor, P.F. "Drug Resistance and microarrays, how far are we from personalized cancer treatment", *Mod. Drug Discovery*, v 7 p.45-49, 2004.
- [24] Disponível em: <http://www.uff.br/mfl/outras_disciplinas/med_integral_infancia_adolescente/cox2.htm> Acessado em 12/02/2011.
- [25] Pollock, R. E. Manual de Oncologia Clínica. 8ª ed. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, 2006 p.10
- [26] Leibovici, D.; et al. Polymorphisms in inflammation genes and bladder cancer: from initiation to recurrence, progression, and survival. *J Clin Oncol*. v. 23: 5746- 5756.
- [27] Visser, K.E.; Eichten, A.; Coussens, L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature*, v. 6, p. 24-37, 2006.
- [28] Coussens, L.M, Werb Z. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Nature*, v. 420, p. 860-867, 2002
- [29] Lu, H.; Ouyang, W.; Huang, C. Inflammation a key event in cancer development. *Molecular Cancer Research*, v.4, n.4, p.221-233, 2006.
- [30] de Visser, K.; Korets, L. V.; Coussens, L. M. new carcinogenesis by chronic inflammation is B lymphocyte dependent. *Cancer Cell* v. 7, p.411–423, 2005.

- [31] Lin, W-W; Karin, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, v.117, n.5, p.1175-1183, 2007.
- [32] Bernardi, A. *Efeitos dos Anti-inflamatorios não Esteiroidaissobre a proliferação celular e atividade das ecto nucleotidases em linhagens de Gliomas*.2006. Dissertação de Mestrado em Bioquímica.Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Orientador Dra Ana Maria Oliveira Battastini.
- [33] Wang, W. ; Dubois, R. N. Cyclooxygenase 2 derived prostaglandin E2 regulates the angiogenic switch. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United State of America*, v.101, n. 2, p. 415-416, 2004.
- [34] Millanta, F.; *et al.* COX-2 expression in canine and feline invasive mammary carcinomas: correlation with clinicopathological features and prognostic molecular markers. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 98, n. 1, p. 115-120, 2006.
- [35] Bezerra de Moura, S. A.; Catão,, M. A.; Gerby, M.; Beltrão, R. V.; Oliveira de Sales, M. A.; Costa, L. J. Marcadores biológicos no câncer de boca. *Internatinal Journal of Dentistry*, v.1, n.2, p.58-62, 2006 .
- [36] Folkman, J. *et al.* Tumor Angiogenesis: Therapeutic implications. *N Engl J Med* v.285, p.1182-1186
- [37] Otrock, Z. K.; Mahfouz, R. A. R.; Makarem, J. A.; Shamseddine, A. I. Understanding thebiology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 39, p. 212-220, 2007.
- [38] Oliveira, R. B.; Alves, R. J. Agentes antineoplásicos biorredutíveis: uma nova alternativa para o tratamento de tumores sólidos. *Quím. Nova*. v.25, n.6a, 2002
- [39] Ferrara, N.; Gerber, H.; Le-Couter, J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine* v. 9, n6. p. 669-676, 1972.
- [40] Normanno, N. *et al.* The MEK/MAPK pathway is involved in the resistance of breast cancer cells to the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib. *J Cell Physiol* v.207, p. 420-427, 2006.
- [41] Alexandra Rodrigues Pereira da Silva. Estudo das Propriedades Bioquímicas do Sistema Arborescente PGLD-AAS para o tratamento do Câncer.. 2008. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá,

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. *Orientador*: Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.
- [42] Queiroga, F. L.; *et al.* Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Research*, v. 25, n. 6, p.4269-4275, 2005.
- [43] Lee, C.; Macgregor, P.F.”Drug Resistance and microarrays, how far are we from personalized cancer treatment”, *Mod. Drug Discovery*, v 7 p.45-49, 2004
- [44] Disponível em: < <http://revistaepoca.globo.com/Revista/Epoca/0,,EMI50282-15223,00-OS+DESAFIOS+DO+CANCER.html> > Acessado em 28/09/2010.
- [45] Allavena, P.; *et al.* Pathways connecting inflammation and cancer. *Current Opinion in Genetics & Development*.18, p 3-10, 2008.
- [46] Grudzinski, M.; *et al.* Expressão da cox-2 e CD105 no câncer de mama e sobrevida livre de doença. *Expressão da COX-2 e CD105 no câncer de mama e sobrevida livre de doença*. Vet. Ass. Med. Bras., v. 52, n.4, p.275-280, 2006
- [47] Millen, E. C.; *et al.* Correlação entre COX-2 e ciclina D-1 após administração de tamoxifeno neoadjuvante em curto prazo no tratamento de carcinoma de mama . *Rev Bras Mastol*. v. 19, n.2, p.47-52, 2009.
- [48] Hilário, M. O. E.; *et al.* Antiinflamatórios não-hormonais. *Jornal de Pediatria - V*. 82, n.5(Supl), 2006.
- [49] Harris, R.E; Beebe-Donk, J.; Alshafie, A. Reduction in the risk of human breast cancer by selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *BMC Cancer*. v.6, n.27, 2006.
- [50] DeNardo, D. G.; Coussens, L. M. Inflammation and breast cancerBalancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Research*, n. 9, p.212, 2006.
- [51] Brabender, J.; Park, J.; Metzger, R.; Schneider, P.M.; Lord, R.V.; Holscher, A.H.; Danenberg, K. D.; Danenberg, P.V. Prognostic significance of cyclooxygenase 2 mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Ann Surg*. v. 235, n.3, p.440-443, 2006.
- [52] _____. Fisiopatologia do câncer. In:_____. Ações de enfermagem no controle do câncer. uma proposta de integração ensino-serviço. 3. ed. rev. ampl.. Rio de Janeiro: INCA. p 48-77, 2008.
- [53] Disponível em: <http://www.wpclipart.com/medical/medical_problems/cancer/Metastasis__how_cancer__spreads.png.html> Acessado em 14/12/2010

- [54] Lee, C.; Macgregor, P.F.” Drug Resistance and microarrays, how far are we from personalized cancer treatment”, *Mod. Drug Discovery*, v 7 p.45-49, 2004.
- [55] Lemmel, E.M.; Bolten, W.; Burgos-Vargas, R.; *et al.* Efficacy and safety of meloxicam in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.* v. 24, n.2, p. 282-290, 1997.
- [56] Júnior, J. O. L.; Serrano, S. C.; Teodoro, A. L. Dana, B. A. Os antiinflamatórios não hormonais. *Prática hospitalar*, v.51, p. 173-178, 2007.
- [57] Emery, P. Clinical implications of selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Scand J Rheumatol.* v.102, n. 1, p.23-28, 1996.
- [58] Disponível em: <http://www.merial.com.br/veterinarios/caes_gatos/webvet/2007/setembro/images/acao_cox1_cox2.gif> Acessado em 14/10/2010
- [59] Andrew, T. C.; *et al.* Aspirin and the Risk of Colorectal Cancer in Relation to the Expression of COX-2. *N Engl J Med.* v. 356, p.2131-2142, 2007.
- [60] Chan, A. T.; En adición a la prevención del cáncer colorrectal, la aspirina® también puede influenciar en los tumores ya establecidos. *JAMA.* v.302, p.649-58, 2009.
- [61] Sala-Vila, A; Miles, E.A.; Calder, P.C. Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. *Clinical and Experimental Allergy*, v.38, p.1432-1450, 2008.
- [62] Grivicich, I.; Regner, A.; Rocha, A. B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia.* v.53, n. 3 335-343
- [63] Maldonado, V. B. Efeitos Microscópicos do ácido acetil salicílico e do acetaminofen na movimentação dentária induzida e nas reabsorções radiculares associadas. 2009. Dissertação (Mestrado em Odontopediatria)- faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Orientador: Alberto Consolaro.
- [64] Moore, J. T. Química para Leigos. Rio de Janeiro: Starlin Alta Con. Com. Ltda, 2008.
- [65] Disponível em : <<http://cqufam.wordpress.com/>> Acessado em 14/10/2010
- [66] Chan, A. T.; En adición a la prevención del cáncer colorrectal, la aspirina® también puede influenciar en los tumores ya establecidos. *JAMA.* v. 302, p.649-658, 2009;

- [67] Booth, N.H. *Farmacologia e Terapêutica Veterinária*. Editora Guanabara.6.ed. Rio de Janeiro, 1992. 998p.
- [68] Disponível em: <<http://www.quimicalizando.com/curiosidades/a-historia-da-aspirina>> Acessado em 14/10/2010
- [69] LECOMTE, M. Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase- (cyclooxygenase-2) by aspirin. **J Biol Chem**, 269(suppl.1): 13.207-215, 1994.
- [70] Pereira, M., Oliveira, R., “Anti-inflamatórios não esteróides. Revisão farmacológica”, *Gazeta Médica*, p.85-96, 2009.
- [71] Qiu, L. Y.; Bae, Y. H. Polymer architecture and drug delivery. • A review of polymeric structures for drug delivery. *Pharm. Re.*, v. 23, p.1, 2006.
- [72] Ganta, S.; Devalapally, H.; Shahiwala, A.; Amiji, M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery . *J. Control. Release*, v. 126, p.187-204, 2008.
- [73] Allen, T. M.; Cullis, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*. v. 303, p.1818-1822, 2004.
- [74] Formatriz, T. P.; *et al.* Microemulsões e fases líquidos cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 14, n. 3, p. 301-313, 2005.
- [75] Disponível em: <http://biomedme.com/general/novel-biodegradable-nanoparticles-for-drug-delivery_5276.html> Acessado em 13/02/2011.
- [76] Patri, A.K. Targeted drug delivery with dendrimers: Comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex B. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 57, p. 2203– 2214, 2005.
- [77] Montanari, M.L.C.; *et al.* Sistemas transportadores de drogas. *Quím. Nova*, v.21, n.4, 1998.
- [78] Fisher, M.; Vögtle, F. Synthesis and Applications of Supramolecular. *Templated Mesoporous Materials*, *Angew. Chem.*, v. 38, p. 56-77, 1999.
- [79] Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; e Goddard III, W. A.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* v. 29, p. 138, 1990.
- [80] Klajnert, B.; Bryszewska, N. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochimica Polonica*, v.48, n.1, p. 199-208, 2001.
- [81] Matthews, O. A.; Shipway A. N.; Stoddart, J.F. Dendrimers – branching out from curiosities into new technologies *Prog. Polym. Sci.*, v.23, p.156, 1998.

- [82] Jansen, J. F. G. A.; de Brabander-van den Berg, E. M. M. e Meijer, E. W.; Encapsulation of guest molecules into a dendritic box. *Science*. v.266, p.1226-1229, 1994.
- [83] Jansen, F. F. G. A., Meijer, E. W. Drug Delivery systems. *Am. Chem. Soc.* v. 117, p. 4417, 1995..
- [84] Esfand, R.; Tomalia, D. A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Research Focus Reviews*. v. 6, n. 8, p. 427-436, 2001.
- [85] Aulenta, F.; Hayes, W.; Rannard, S. Dendrimers: a new class of nanoscopic containers and delivery devices. *European Polymer Journal*. v. 39, p.1741-1771, 2003.
- [86] Patel, R.P.; *et al.* "Dendrimers: A new innovation in drug delivery", *Pharma Bio World*, p. 42-52, 2007.
- [87] Gillies, E.R.; Fréchet J.M.J, "Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery" *Drug Discovery Today*, v.10, p.35-43, 2005.
- [88] Florence, A. T. Dendrimers: a versatile targeting platform. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 57, p. 2104– 2105, 2005.
- [89] Jesse, B.; Grinstaff, M. W. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 60, p.1037-1055, 2008.
- [90] Lee, C.C.; Gillies, E.R.; Fox, M.E.; Guillaudeu, S.J.; Fréchet, J.M.; Dy, E.E.; Szoka, F.C. A Single Dose of Doxorubicin-Functionalized Bow-tie Dendrimer Cures Mice Bearing C-26 Colon Carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* , v. 103, 16649–16654, 2006.
- [91] Hamilton, S.K.; Harth, E. Molecular Dendritic Transporter Nanoparticle Vectors Provide Efficient Intracellular Delivery of Peptides. *ACS Nano* v. 3, p. 402–410, 2009.
- [92] Hamilton, S.K.; Ikizler, M.R.; Wallen, C.; Wright, P.F.; Harth, E. Effective Delivery of IgGantibodies Into Infected Cells via Dendritic Molecular Transporter Conjugate IgGMTw. *Mol. BioSyst.* v. 4, 1209–1211, 2008.
- [93] Colin V. Bonduelle ¹ and Elizabeth R. Gillies Dendritic Guanidines as Efficient Analogues of Cell Penetrating Peptides *Pharmaceuticals* v.3, p. 636-666, 2010

- [94] Markatou, E.; et al. Molecular interactions between dimethoxycurcumin and Pamam dendrimer carriers. *International Journal of Pharmaceutics*. v. 339, p. 231-236, 2007.
- [95] Indha, N. K. *et al.* Supramolecular Aggregates of Water Soluble Dendritic Polyglycerol Architectures for the Solubilization of Hydrophobic Compounds. *Macromol. Rapid Commun.*, v. 31, p.1516–1520, 2010.
- [96] Lee, C.C.; Szoka, F. C.; et al. A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice bearing C-26 colon carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. 103, n.45, p.16649-16654, 2006.
- [97] Fernandes, E. G. R.; *et al.* Propriedades antitrombogênicas do bioconjugado dendrímeros estreptoquinase-poliglicerol. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, v. 17, p. 105-111, 2006.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais e equipamentos utilizados.

O estudo da bioatividade e citotoxicidade do PGLD-AAS contra as células tumorais de pulmão (ATCC), mama (ATCC) e óssea (ATCC) foi realizado no Centro de Biotecnologia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) sob a supervisão da Dra. Maria Aparecida Pires Camillo.

Os seguintes materiais e equipamentos foram gentilmente cedidos pelo IPEN para a realização desse trabalho:

- ◆ Meio F12K, GIBCO-BRL (Gaithersburg, EUA)
- ◆ Meio EMEM, GIBCO-BRL (Gaithersburg, EUA)
- ◆ Ampicilina GIBCO-BRL (Gaithersburg, EUA)
- ◆ Fungisona, GIBCO-BRL (Gaithersburg, EUA)
- ◆ Soro fetal bovino (SFB), GIBCO-BRL (Gaithersburg, EUA)
- ◆ Tripsina, GIBCO-BRL (Gaithersburg, EUA)
- ◆ L-Glutamina – LabSynth, (Brasil);
- ◆ Dimetilsulfóxido (DMSO), MERK (São Paulo, SP, Brasil)
- ◆ Trypan blue 0,4% (corante vital) - GIBCO-BRL, (Gaithersburg, EUA)
- ◆ MTS, PROMEGA CORPORATION (Madison, EUA)
- ◆ PMS, SIGMA (St. Louis, EUA)
- ◆ Pipetas de 2, 5, 10 e 25 mL, CORNING COSTAR CORR (EUA)
- ◆ Placa 96 well 3595 e 6 well, CORNING COSTAR CORR (EUA)

- ◆ Estufa de cultura de células. Reveal habitat, GS Laboratory Equipment, (Asheville, EUA)
- ◆ Fluxo laminar horizontal, classe II, modelo BBF - 4SS, Biological Safety Cabinet - Germfree Lab. Inc, (Miami, EUA)
- ◆ Material plástico estéril para cultura celular - CORNING COSAR CORP (Cambridge, EUA)
- ◆ Banho-maria, QUIMIS Ap. Científicos Ltda., (São Paulo, SP, Brasil)
- ◆ Centrífuga de bancada, modelo LS 3 plus , CELM (São Paulo, SP, Brasil)
- ◆ Sistema de Filtração de 500 mL, 0,22µm, CORNING COSTAR CORR (EUA)
- ◆ Purificador de água Milli-Q-plus - MILLIPORE, (Bedford, EUA)
- ◆ Microscópio invertido, modelo eclipse TS 100, Nikon; (Japão)
- ◆ Microscópio de Epifluorescência Axioskop 40 Zeiss; (EUA)
- ◆ Leitor de E.L.I.S.A Spectra Max 190 Molecular Devices (EUA)
- ◆ Camera Fotografica Canon Power Shot A640 (EUA)
- ◆ Corantes de fluorescência: Laranja de Acridina e Brometo de Etídio

4.2. Síntese do PGLD-AAS.

A síntese e caracterização do PGLD-AAS foi efetuado de acordo com trabalhos anteriores do grupo de Polímeros Bioativos e Biomiméticos da UNIFEI. O PGLD foi sintetizado a partir da síntese de Williamsom modificada pela utilização de um catalisador de transferência de fase. Após purificação por diálise, uma reação de esterificação entre AAS e PGLD foi promovida com 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente desidratante e 4-dimetilaminopiridina (DMA) para a acilação catalítica. Ambos, PGLD e PGLD-AAS foram caracterizados por técnicas espectroscópicas (^1H -NMR, ^{13}C -NMR e FT-IR). A Figura 3.1 ilustra a estrutura do PGLD-AAS utilizado nesse trabalho [1-2-3-4].

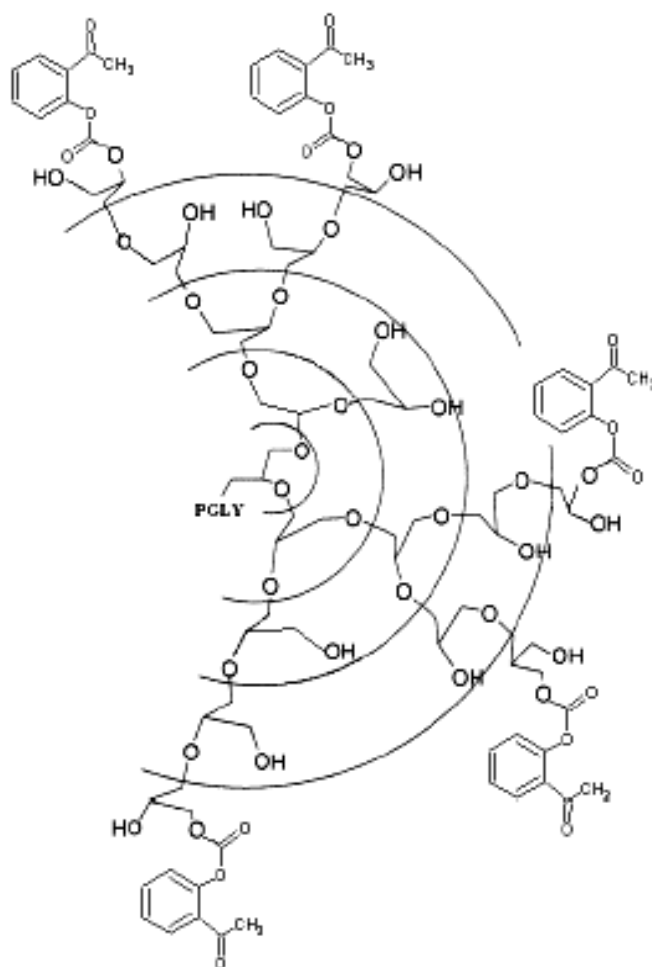


Figura 4.1: Ilustração da estrutura do PGLD-AAS utilizado nesse trabalho [1-4]. L₄

4.3. Linhagens celulares utilizadas.

As linhagens celulares utilizadas nessa dissertação foram adquiridas por importação da American Type Culture Collection (ATCC-EUA) e European Collection of Cell Cultures (ECACC). As características das linhagens celulares utilizadas são descritas a seguir.

4.3.1. Célula pulmonar humana de 14 semanas de gestação (MRC-5) de origem fibroblástica.

A cultura da célula MRC-5 foi efetuada em meio de cultura do tipo Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) com adição de soro fetal bovino em concentração final de 10% e 1% de antibiótico (ampicilina) e antifúngico (fungisona), a uma atmosfera úmida de 95% de ar e 5% CO₂. A temperatura do meio de cultivo foi mantida em 37 °C. O inóculo inicial foi de $5,0 \cdot 10^4$ células.mL⁻¹, que foram subcultivadas a cada dois dias e mantidas em fase log de crescimento celular até atingirem a sub-confluência na placa de cultura de onde foram descoladas pela ação da solução de tripsina (0,05%) /EDTA(0,02%) em solução tampão fosfato pH 7,4. A Figura 4.2 ilustra a microscopia ótica da célula MRC-5 [5].

ATCC Number: **CCL-171**
Designation: **MRC-5**

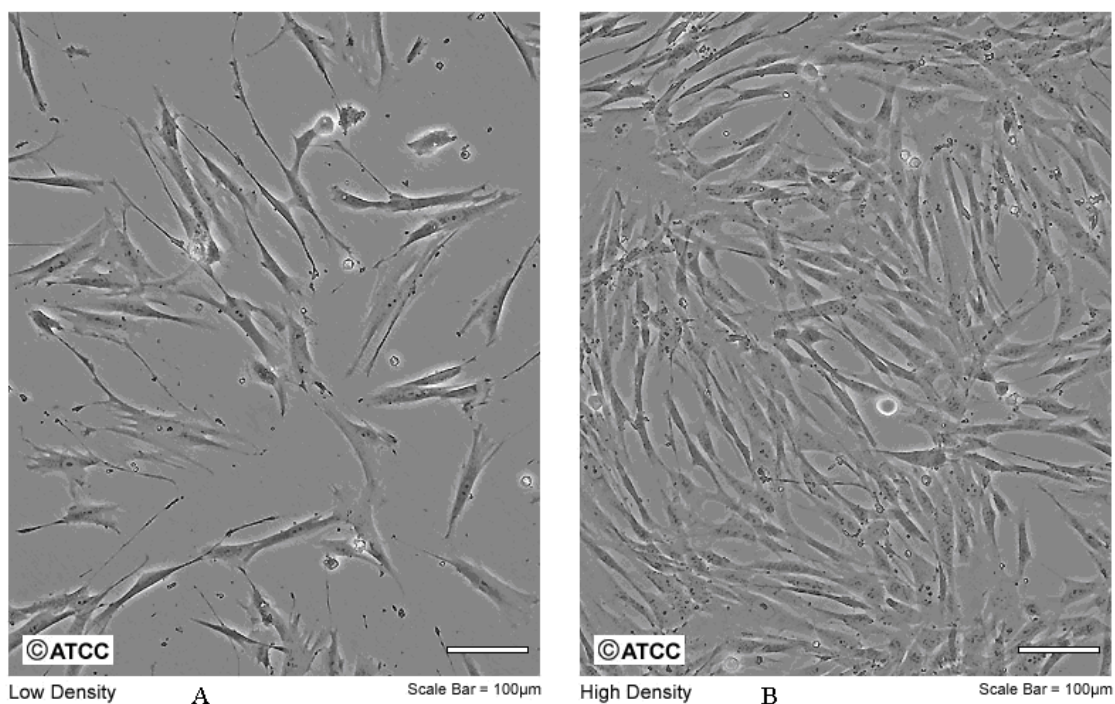


Figura 4.2: Micrografia Cultura da linhagem MRC-5, com baixa densidade (A) e alta densidade (B) [6].

4.3.2. Célula pulmonar tumoral (carcinoma) A-549

O meio apropriado para a cultura de células A-549 de origem epitelial é o meio F-12, com adição de soro fetal bovino em concentração final de 10% e 1% de antibiótico (ampicilina) e antifúngico (fungisona), a uma atmosfera úmida de 95% de ar e 5% CO₂. A temperatura do meio de cultivo foi mantida em 37 °C. O inoculo inicial foi de $5,0 \cdot 10^{-4}$ células.mL⁻¹, que foram subcultivadas a cada dois dias e mantidas em fase log de crescimento celular até atingirem a sub-confluência na placa de cultura, de onde foram descoladas pela ação da solução de tripsina (0,05%) /EDTA(0,02%) em solução tampão fosfato pH 7,4. A Figura 4.3 ilustra a microscopia ótica de células de carcinoma A-549 [6].

ATCC Number: **CCL-185**
Designation: **A-549**

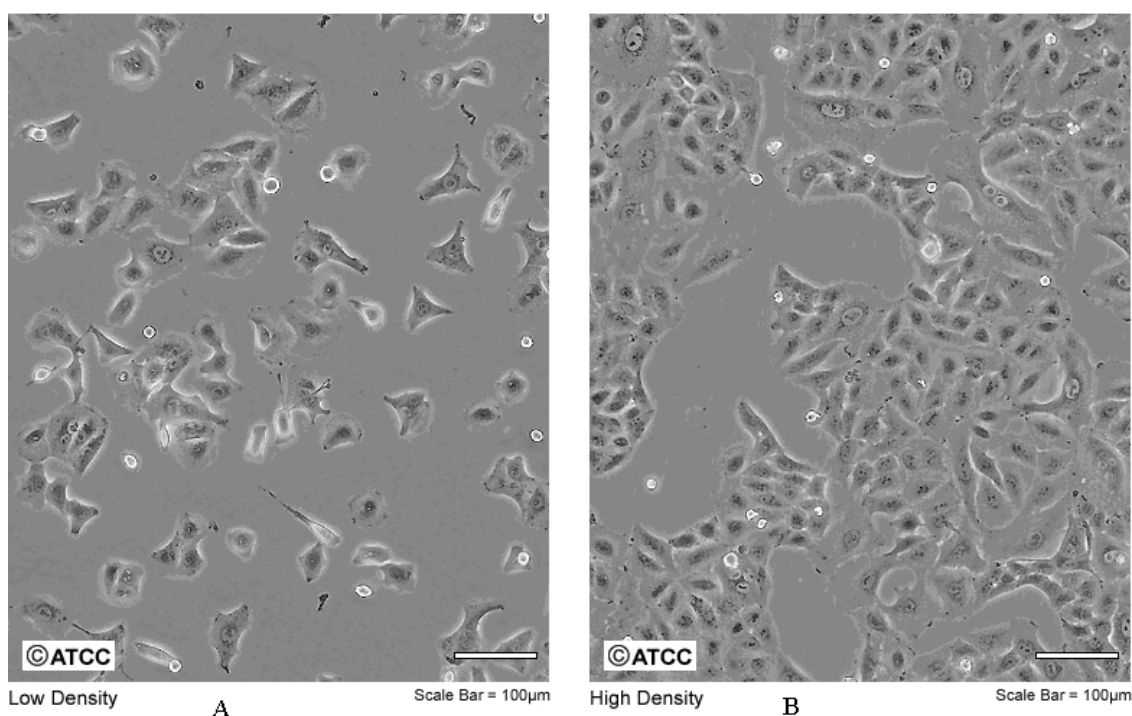


Figura 4.3: Micrografia da cultura da linhagem celular ATCC A-549, com baixa densidade (A) e alta densidade (B) [7].

4.3.3. Célula óssea tumoral MG-63 (ECACC)

A experimentação com células ósseas tumorais de osteossarcoma, MG-63 (ECACC-Alemanha) de origem fibroblástica foi efetuado em meio de cultura Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) com adição de soro fetal bovino em concentração final de 10% e 1 % de antibiótico (Ampicilina) e antifúngico (Fungisona), em atmosfera úmida de 95% de ar e 5% CO₂. O inóculo inicial foi de $5,0 \cdot 10^4$ células.mL⁻¹, que foram subcultivadas a cada dois dias e mantidas em fase log de crescimento celular até atingirem a sub-confluência na placa de cultura de onde foram descoladas pela ação da solução de tripsina (0,05%) /EDTA(0,02%) em solução tampão fosfato pH 7,4. A Figura 4.6 mostra a micrografia ótica das células da linhagem MG-63 [8].

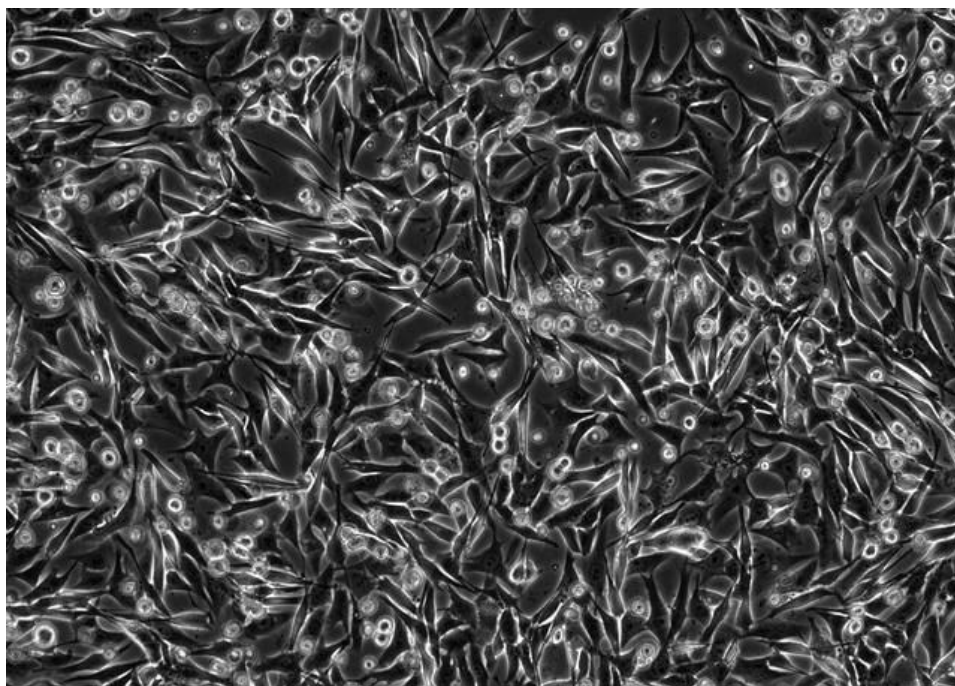


Figura 4.4: Micrografia da cultura da linhagem celular de célula óssea tumoral MG-63 de origem fibroblástica com alta densidade [9].

4.3.5. Célula de ovário de Hamster Chinês (CHO)

Nesse trabalho, a experimentação com células CHO (ATCC) de origem fibroblástica foi efetuado em meio de cultura F12 K, $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de bicarbonato de sódio e $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ glicose suplementado com 200 nM metotrexato, $0,002 \text{ mg.mL}^{-1}$ de insulina e 10% soro fetal bovino. A cultura celular foi feita em atmosfera de 95% ar e 5% de CO_2 . A temperatura da cultura celular foi mantida em 37°C . A Figura 3.7 mostra a micrografia ótica das células da linhagem CHO [10].

ATCC Number: **CRL-12445**
Designation: **CHO DP-12#1934 cl18.42**

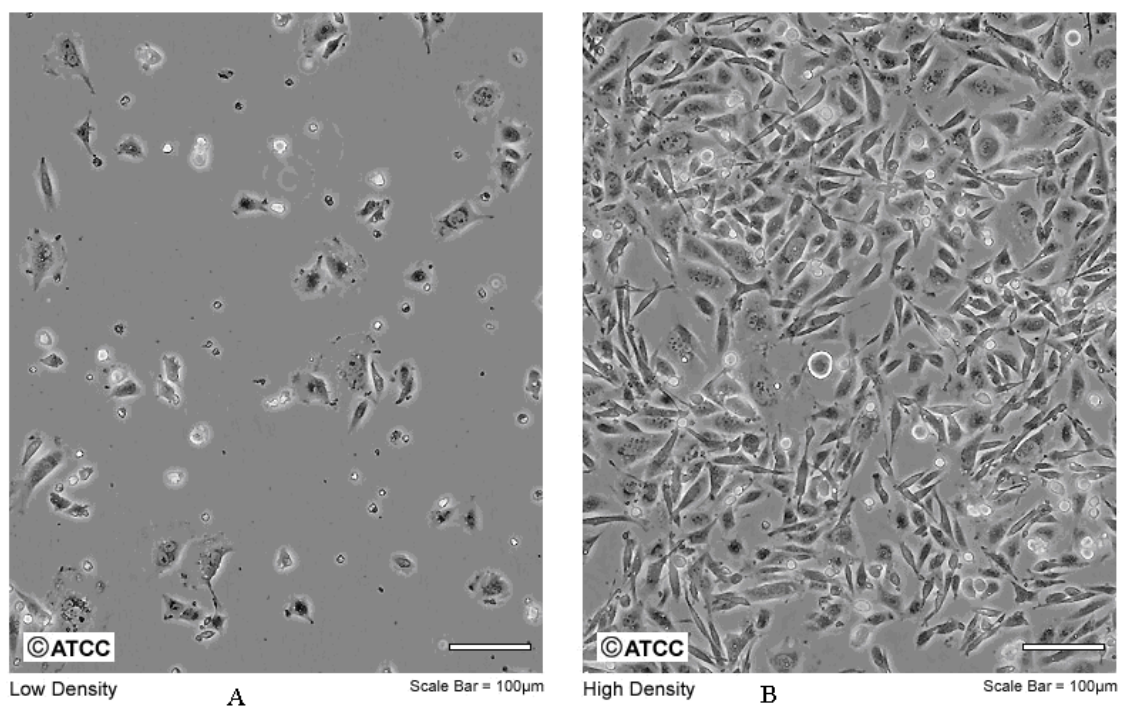


Figura 4.5: Micrografia da cultura da linhagem celular de células CHO de origem fibroblástica, com baixa densidade (A) e alta densidade (B) [11].

4.4. Metodologias utilizadas

4.4.1. Determinação da viabilidade celular

Muitos métodos *in vitro*, para pesquisa de citotoxicidade em biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em submeter o material direta ou indiretamente ao contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares como a lise das células (morte celular), inibição de crescimento celular e outros efeitos ocasionados pelo biomaterial e/ou seus extratos [12-13].

O material comprovadamente citotóxico é representado por aquele que libera um elemento ou composto químico em quantidade suficiente para causar a morte celular. A morte celular é causada pela inibição de vias metabólicas. O número de células afetadas indica a dose e potência da substância analisada capazes de matar as células. O conceito de dose liberada do composto tóxico é considerado equivalente à dose absorvida pelas células.

O estudo da viabilidade celular após incubação do meio de cultura das linhagens celulares com PGLD-AAS foi realizado segundo a norma ISO 10.993-5 utilizando-se controle negativo e positivo. O controle negativo deve ser um material que não produz resposta citotóxica, sendo utilizado nesse trabalho o próprio meio de cultura celular. Como controle positivo utilizou-se o fenol, um material que ocasiona em resposta citotóxica reprodutível.

O parâmetro mais utilizado para avaliação da toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais. No presente trabalho a viabilidade celular após a exposição das linhagens celulares descritas ao PGLD-AAS, pode ser mensurada pela incubação com corante vital MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazolio) e reagente acoplador de elétrons, PMS. (metassulfato de fenazina) na razão 20:1, e incubado por 2 horas. Após o último período de incubação, a placa foi levada a uma leitora ELISA (espectrofotômetro para placas de 96 poços) com filtro de 490 nm para leitura das densidades ópticas [13].

A indução da toxicidade pela amostra avaliada é medida em uma faixa de concentrações específica do biomaterial e a concentração que produz uma redução em 50% da absorção de MTS foi considerada como o parâmetro de toxicidade. O índice de

Citotoxicidade (IC50% - concentração de extrato que inibe a formação de 50% das colônias em relação ao controle) foi estimado, ajustando modelos matemáticos às curvas construídas a partir da porcentagem de colônias formadas em relação ao controle, versus a concentração do extrato expressa em porcentagem [13].

4.4.2. Preparo das linhagens celulares para cultura

Para o descongelamento das células foi reservado, dentro da capela de fluxo laminar e 5 mL do meio de cultura apropriado para cada linhagem celular em um tubo para centrífuga de 15 mL. O vial de cultura celular foi retirado do armazenamento em nitrogênio líquido, abrindo imediatamente $\frac{1}{4}$ da rosca da tampa. Depois de fechados os vials são levados para o fluxo laminar.

Foi adicionado 1 mL do meio de cultura no vial para homogeneização. Este conteúdo foi colocado no tubo para centrífuga já preparado. Depois de centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm. O meio de cultura foi aspirado e substituído por um novo meio, para cultivo no frasco apropriado, que é levado para uma estufa para manutenção da cultura celular a 37° C em uma atmosfera com 5% de CO₂. A Figura 3.8 ilustra o procedimento para descongelamento celular.

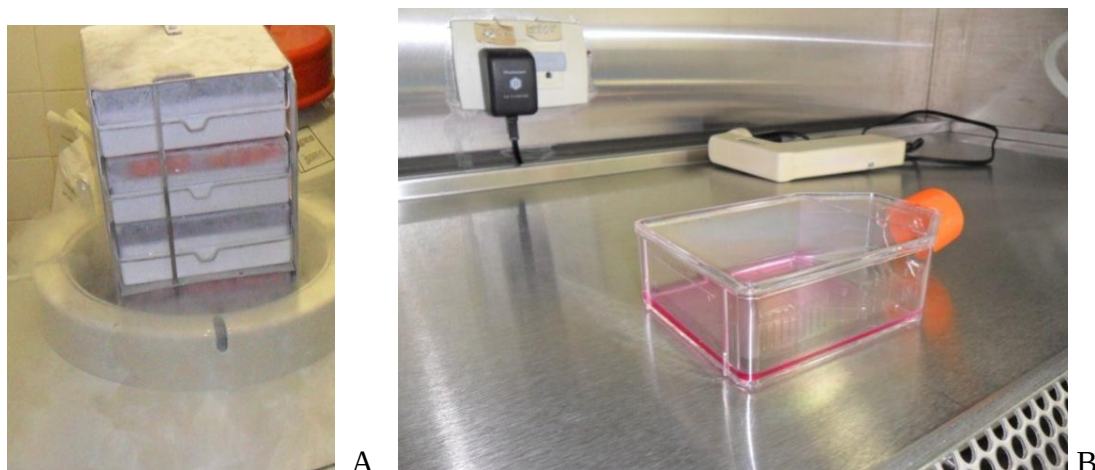


Figura 4.6: Vials com linhagem celular retirados do nitrogênio líquido (A) e frasco contendo linhagem celular cultivada (B).

O passo seguinte ao descongelamento celular envolveu a tripsinização, necessária para a manutenção e suspensão das células para os ensaios, uma vez que elas

se aderem às placas. Para tanto, as células em confluência, mantidas em frascos de cultura celular, foram lavadas com solução fisiológica e a seguir, foi adicionado 0,05 % de tripsina. Após 5 minutos de incubação com tripsina, foi adicionado o mesmo volume de meio de cultura com soro fetal bovino e esta solução foi transferida para tubos de centrífuga de 15 mL e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Após troca de meio, as células foram homogeneizadas e a quantidade adequada de células foi semeada em novo frasco de cultura celular.

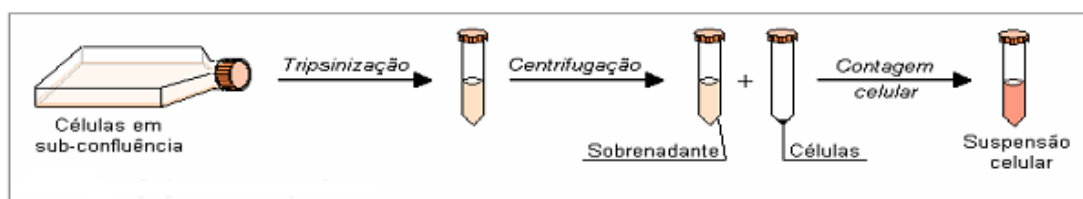


Figura 4.7: Esquema da cultura celular, etapa de preparo das células que serão utilizadas no teste de viabilidade celular [14].

Para a obtenção de uma suspensão celular com $1,2 \times 10^5$ células por mL de meio de cultura, quantidade adequada para o ensaio, as células foram contadas em câmara de Neubauer. Este método consiste em colocar uma lamínula sobre a área demarcada na câmara de contagem. Depois de homogeneizada a suspensão celular é transferida para um tubo de ensaio onde foi adicionado corante azul de tripano 0,2% (Trypan Blue), obtendo assim uma suspensão celular diluída. Uma alíquota de 10 μ L foi pipetada na borda da lamínula, preenchendo cuidadosamente a câmara de contagem.

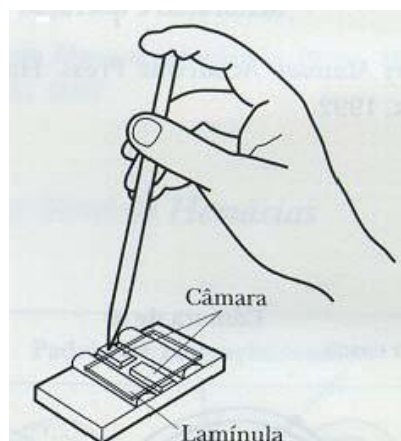


Figura 4.8: Ilustração Câmara de Neubauer demonstrando a pipetagem da suspensão celular.

Com auxílio de microscópio invertido foi feita contagem das células nas 4 áreas de um lado da câmara de contagem (Fig. 4.9), o valor obtido foi dividido por 4 para obter a média. Para obter o número de células/mL, este valor foi multiplicado por 10.000, pois: $1\text{mL} = 1\text{ cc} = 1.000\text{ mm}^3$. Uma vez que na câmara de Neubauer obtemos o número de células por $0,1\text{ mm}^3$, então devemos multiplicar por 10; portanto 10.000.

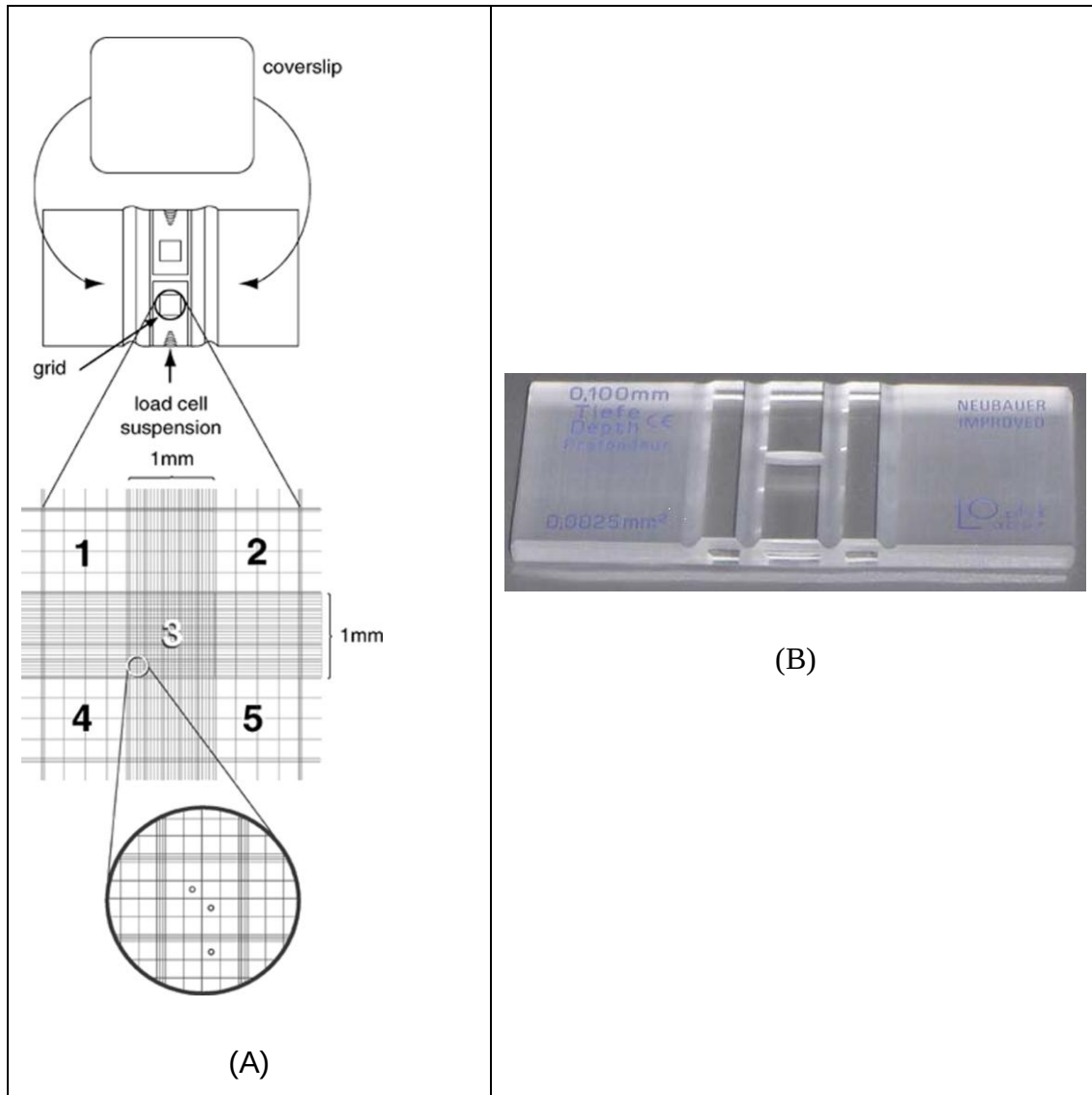


Figura 4.9: Ilustração da divisão em quadrantes de uma Câmara de Neubauer (A) Câmara de Neubauer (quadriculado de $0,0025\text{mm}^2$ e profundidade de $0,100\text{mm}$) (B).

4.4.3. Preparação do meio de cultura para o ensaio de bioatividade do PGLD-AAS

O meio F12 para a linhagem A-549 foi preparado com 20% de soro fetal bovino e 2% de antibiótico e antifúngico e pipetado 50µL na placa de 96 poços.

De maneira semelhante para as linhagens MG-63 e MRC-5, foi preparado o meio EMEM com 20% de soro fetal bovino, acrescentando ainda 2 % de antibiótico e antifúngico e 2% de piruvato e 50µL do meio de cultura foi pipetado na placa de 96 poços.

Como controle positivo foi utilizada solução de Fenol 3% diluída em meio de cultura sem soro a 50%, essas diluições foram feitas consecutivamente até obtermos 10 diluições distintas. Para o controle negativo foi empregado o próprio meio de cultura, pipetando-se 50µL, e adicionando a este 50µL da suspensão celular.

A solução de ácido acetilsalicílico, preparado em uma solução de 10 mg.mL⁻¹ foi diluída em meio de cultura sem soro a 50%, essas diluições foram feitas consecutivamente até se obterem 10 diluições distintas.

4.4.4. Preparo das soluções do PGLD e PGLD-AAS para os ensaios in vitro.

Para o ensaio de citotoxicidade 1,5 mL de PGLD foi diluída em 1,5 mL de meio de cultura. Esta solução de 50% de extrato de PGLD foi homogeneizada e diluída em 50% do meio de cultura consecutivamente, gerando dez amostras com concentrações diferentes. Foi preparada também uma solução a 20% do conjugado PGLD-AAS que foi diluída em 50% consecutivamente, gerando dez amostras com concentrações diferentes. A Figura 4.10 e a tabela 1 ilustram o processo de diluição das amostras em seus respectivos vials.



Figura 4.10: Amostras de AAS, PGLD e PGLD-AAS para os ensaios de citotoxicidade.

Tabela 1: Preparo das diluições do controle positivo e das amostras de PGLD, PGLD-AAS e AAS em solução tampão PBS, pH 7.4.

	Concentração Inicial.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
FENOL 3 %	1,5	0,75	0,375	0,1875	0,09375	0,046875	0,023438	0,011719	0,005859	0,00293	0,001465	0,000732	0,000366
PGLD- (% m/m)	50	25	12,5	6,25	3,125	1,5625	0,78125	0,390625	0,195313	0,097656	0,048828	0,024414	0,012207
PGLD-AAS (% m/m)	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125	0,039063	0,019531	0,009766	0,004883
AAS	10mg/mL	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125	0,039063	0,019531	0,009766	0,004883	0,002441

Após filtração em Millipore 45 μ m as amostras iniciais foram pipetadas em triplicata (50 μ L/poço) em placa de cultura com 96 poços e mantidas na estufa até a preparação das suspensões celulares.

As células foram removidas da garrafa de cultura com tripsina a 0,05%, centrifugadas, ressuspensas e contadas em câmara de Neubauer. Foram preparadas

suspensões celulares em seu meio de cultura, com soro fetal bovino, distribuídas (50 µL) sobre as placas de cultura contendo as amostras. O volume total de cada poço foi de 100 µL.

Na microplaca uma coluna controle de três poços foi preparada com meio sem células (branco) e meio em vez de amostra mais as células (controle negativo). As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida sob 5 % de CO₂ por 72 horas.

Após este período, 20 µL de uma mistura (20:1) de 0,2 % de MTS e 0,09 % PMS em PBS foram adicionadas a todos os poços, retornando as microplacas para a estufa. Procedeu-se em seguida à leitura em espectrofotômetro a 490 nm.

4.4.5 Microscopia ótica por coloração diferencial fluorescente.

As linhagens de células foram testadas (100µl/poço) em placas de 96 poços. Passadas 24 horas em estufa a 37°C (5% de CO₂ e 100% umidade relativa), as células foram tratadas com 100µl/poço de diferentes diluições dos extratos, para verificação da viabilidade celular. Após o tratamento com AAS livre, extrato PGLD e extrato PGLD AAS. As células foram incubadas por mais 1, 4 ou 24 horas. Após o período de incubação, 25µL do sobrenadante foi adicionado em cada poço para manter um volume adequado para o ensaio.

A técnica para microscopia de fluorescência consistiu em adicionar dois corantes fluorescentes: alaranjado de acridina (Sigma, 100µg/mL) e brometo de etídio (Sigma 100µg/mL), na proporção de 1:1 para cada 25µL de meio contendo as células (SPECTOR, 1998) em uma lâmina histológica com a cultura celular aderida coberta com uma lamínula. Estas foram lavadas com 50µL PBS (pH 7,4) e metanol foi acrescentado. Depois de fixadas as lâminas, foram levadas ao microscópio de epifluorescência (Axioskop 40, Zeiss) com filtro adequado. Esse microscópio de fluorescência contém uma fonte de luz que excita substâncias fluorescentes, essas absorvem energia e emitem luz na faixa do espectro visível [15].

Também foram feitas micrografias apenas com alaranjado de acridina, o que permite a visualização das células para avaliação da permeabilidade aos extratos e das características do estágio celular de desenvolvimento em que se encontram [16].

Referências Bibliográficas:

- [1] De Queiroz, A.A.A.; Abraham, G. ; Roman, J. S. . Immobilization of a nonsL teiroidal anti-inflammatory drug onto commercial segmented polyurethane surface to improve haemocompatibility properties. *Biomaterials, Inglaterra*, v. 23, p. 1625-1638, 2002.
- [2] De Queiroz, A.A.A; Vargas, R,R; Higa, O.Z; Ribeiro R.R, Vitolo, M. Lactam-amide graft copolymers as novel support for enzyme immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 84, n. 4, p. 767-777, 2002.
- [3] Alexandra Rodrigues Pereira da Silva. Estudo das Propriedades Bioquímicas do Sistema Arborescente PGLD-AAS para o tratamento do Câncer.. 2008. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. *Orientador: Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.*
- [4] Janderson Freitas Leite. Propriedades Hemocompatíveis do Dendrímero Bioativo de Poliglicerol Conjugado com Estreptoquinase. 2008. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Uiversidade Federal de Itajubá. *Orientador: Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.*
- [5]Disponível em: <[www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-171&Template=cellBiology](http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-171&Template=cellBiology)>. Acessado em 25/07/2010
- [6]Disponível em: <[https://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB22&Template=cellBiology](https://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB22&Template=cellBiology)> Acessado em 25/07/2010.
- [7] Disponível em: <[http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ Product Details/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL185&Template=cellBiology](http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL185&Template=cellBiology)>. Acessado em 25/07/2010.
- [8] Disponível em: <<http://www.atcc.org/Attachments/1753.jpg>>. Acessado em 25/07/2010.

- [9] Disponível em: <[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4= 86051601|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC&lang=en_US](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?N4=86051601|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC&lang=en_US)>. Acessado em 25/07/2010.
- [10] Disponível em: <<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-61&Template=cellBiology>>. Acessado em 25/07/2010.
- [11] Disponível em: <<http://www.atcc.org/Attachments/1768.jpg>>. Acessado em 25/07/2010.
- [12] Cory, A.H. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Comm.*, v. 3, 207-212, 1991.
- [13] Rogero, S. O. et al. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. *Materials Research*, v. 6, No. 3, 317-320, 2003.
- [14] Lorenzetti, S.G. Obtenção dos Sistemas Bioconjugados Crotoxina/PEBD-g-PHEMA E Crotoxina/PCL. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações.)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade da São Paulo. *Orientadora*: Dra Olga Zazuco Higa.
- [15] Guedes e Silva, C.C. Estudo da Biocompatibilidade do Nitreto de Silício. Dissertação (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Materiais.)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade da São Paulo. *Orientador*: Dr. José Carlos Bressiani.
- [16] Solomon, D.H. The chemistry of organic film formers. *New York, John Wiley*, p. 90-93, 1967.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Síntese e caracterização físico-química

O processo de síntese e caracterização do PGLD e PGLD-AAS foi realizado de acordo com os trabalhos anteriores do grupo de biomateriais da UNIFEI [1-4]. O dendrímero de poliglicerol (PGLD) é um polímero solúvel em água que contém grupos hidroxilas e ligações éter sendo caracterizado, portanto, como poliéter. A baixa citotoxicidade e a aprovação dos poligliceróis (PGL's) pelo FDA (EUA) [5-7] para utilização como agente emulsificante na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia tem proporcionado a publicação de várias patentes sobre a aplicação de PGL's [8-12].

Considerando sua massa e topologia, o PGLD pode ser considerado idealmente como uma nanopartícula isotrópica devido essencialmente à sua natureza globular. As nanopartículas poliméricas são colóides macromoleculares cujo tamanho varia de 1-10 nm. O termo nanopartícula é um nome coletivo para nanoesferas e nanocápsulas. Nanoesferas têm uma estrutura matricial. Nesse caso, os fármacos podem ser absorvidos na superfície da esfera ou encapsulados dentro da partícula (Figura 5.1). Nanocápsulas são sistemas vesiculares em que o princípio bioativo está confinado em uma cavidade consistindo em um núcleo interno oleoso circundado por uma membrana polimérica. Neste caso, as substâncias bioativas são normalmente dissolvidas no núcleo interno, mas também pode ser adsorvido à superfície da nanocápsula [13].

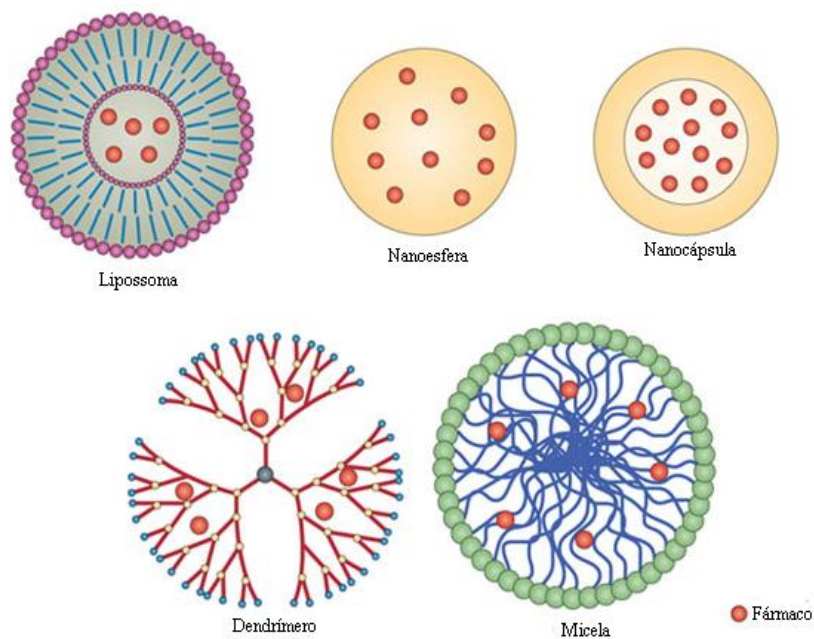


Figura 5.1: - Nanopartículas isotrópicas que atuam como sistemas transportadores de fármacos. Adaptado de [14].

Embora exista uma grande quantidade na literatura de trabalhos publicados sobre nanomateriais isotrópicos (nanoesferas, micelas, nanocápsulas e lipossomas) recentemente foi demonstrado na literatura que nanomateriais anisotrópicos também podem ser obtidos (Figura 5.2). A aplicação de nanocápsulas anisotrópicas constitui um tema de grande interesse para a comunidade científica no que concerne ao estudo da interação nanomaterial-célula biológica.

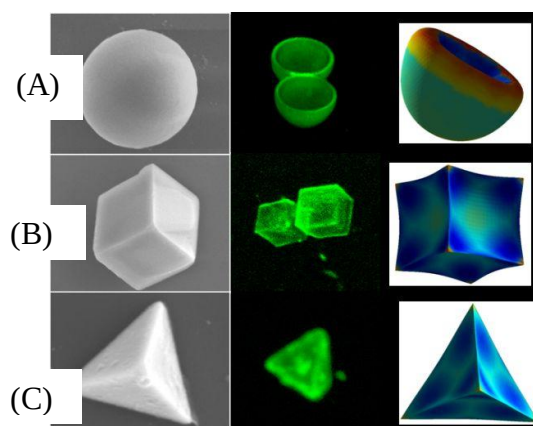


Figura 5.2: Nanocápsulas isotrópica (A) e anisotrópicas (B,C). Espera-se que num futuro muito próximo as nanocápsulas anisotrópicas poderão ser utilizadas como sistemas transportadores de fármacos. Adaptado de [15].

O dendrímero bioativo PGLD-AAS é uma nanopartícula globular, idealmente isotrópica, e que se constitui do ponto de vista da química farmacêutica como um pró-fármaco. A modificação molecular do AAS mediante sua ligação ao PGLD via ligação éster constitui-se num método promissor de obtenção de um sistema transportador com propriedades biofarmacêuticas melhoradas, tais como aumento no tempo de permanência no organismo e propriedades de solubilidade consideravelmente melhoradas, possibilitando a administração de doses menores, diminuição da toxicidade e elaboração de formas farmacêuticas adequadas para o tratamento de pacientes que já apresentam rins e fígado debilitados pela enfermidade ou pela idade.

Nesse trabalho, a rota de obtenção do dendrímero PGLD foi efetuada a partir da síntese de Williamsom modificada pela utilização de um catalisador de transferência de fase. Por exemplo, para a síntese de famílias de PGLD de geração zero a três ($G = 0-3$), um processo iterativo de seis etapas onde a alilação de um núcleo de poliglicerol seguido da dihidroxilação catalítica com óxido de N-metilmorfolina da ligação alílica foi adotado. A reação de alilação sob condições de transferência de fase permitiu a formação quantitativa do dendrímero com bons rendimentos, próximo a 80%, reduzindo assim, o número de defeitos na cadeia macromolecular (Figura 5.3). O produto final, PGLD, foi purificado em coluna cromatográfica de sílica gel.

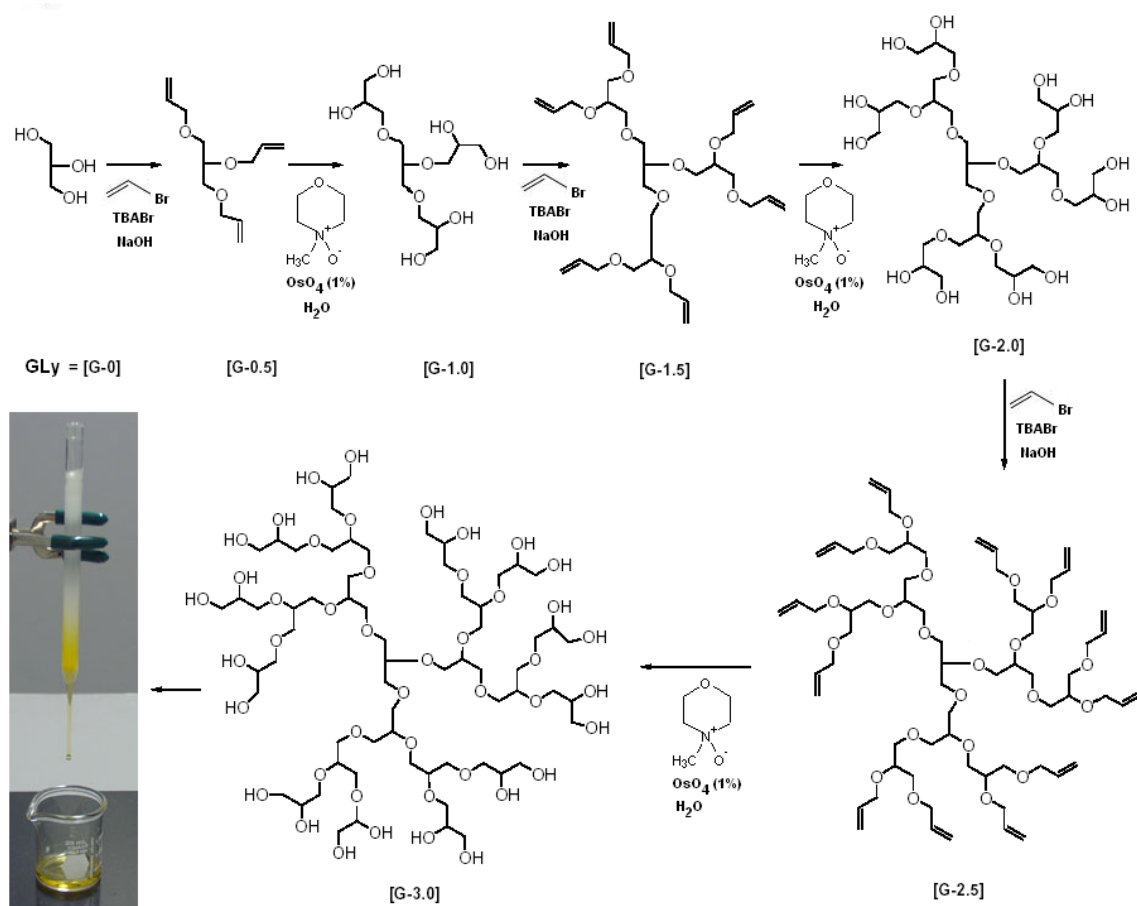


Figura 5.3: Ilustração do processo de síntese do PGLD utilizando a rota sintética de Williamson e rota sintética adaptada de [16]. Gly = glicerol, TBABr = Brometo de tetrabutil amônio.

Após purificação cromatográfica, os dendrímeros de PGLD foram caracterizados por espectroscopias de RMN de prótons (¹H), carbono (¹³C).

Neste trabalho avaliou-se o comportamento bioativo de um dendrímero de PGLD salicilado de geração 3 (G3). Assim, um dendrímero de peso molecular igual a 1.7 kDa e um número médio de 26 hidroxilas por molécula foi obtido via síntese divergente. Inicialmente, a purificação cromatográfica do PGLD (G3) forneceu um rendimento de 88%, tendo o produto obtido as seguintes características: ¹H-NMR (Figura 5.4-A): (300 MHz, D₂O). Deslocamentos (δ, ppm): 4,8 (OH); 4.04 (OCH₂-CH-CH₂); 3,95-3,40 (CH₂-O-CH₂). ¹³C-NMR (Figura 5.4-B): (75 MHz, D₂O): Deslocamentos (δ, ppm): 62,9 (CH₂-OH, unidade terminal); 82,0-81,5; 80,6-79,8; 74,7-73,9; 73,8-72,2; 71,8-70,7; 64,7; 63,1 (CH₂-O-CH₂, poliéter).

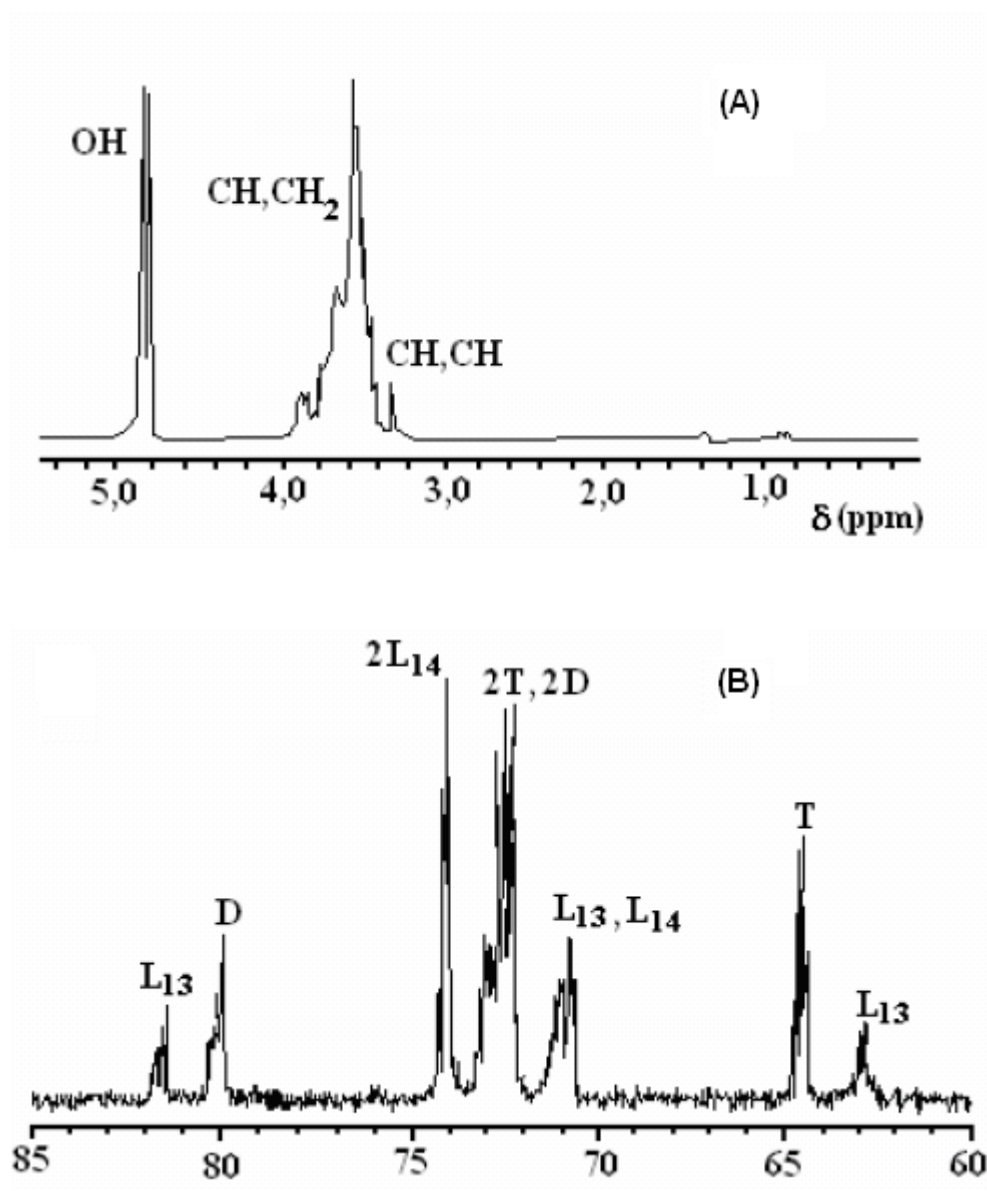


Figura 5.4: Espectros de ^1H -RMN (A) e ^{13}C -RMN (B). Solvente utilizado: D_2O à temperatura ambiente (25 °C).

A análise da isomolecularidade do PGLD foi avaliada utilizando-se a técnica de dessorção a laser assistida por matriz com tempo de voo (Maldi-Tof). Utilizou-se um espectrômetro Bruker Maldi-MS com analisador de tempo de voo e detector tipo microcanal de placas (MCP). A fonte de energia foi um laser de nitrogênio de comprimento de onda de 337 nm e pulso de 3 ns. A matriz utilizada foi o ácido indolacrílico em solução saturada de acetona. A Figura 5.5 ilustra o espectro Maldi-Tof

do PGLD (G3). A massa real determinada foi igual a 1,72 kDa (Na^+). Esse valor foi consistente com o peso molecular teórico (1,68 kDa) reportado pela literatura [16].

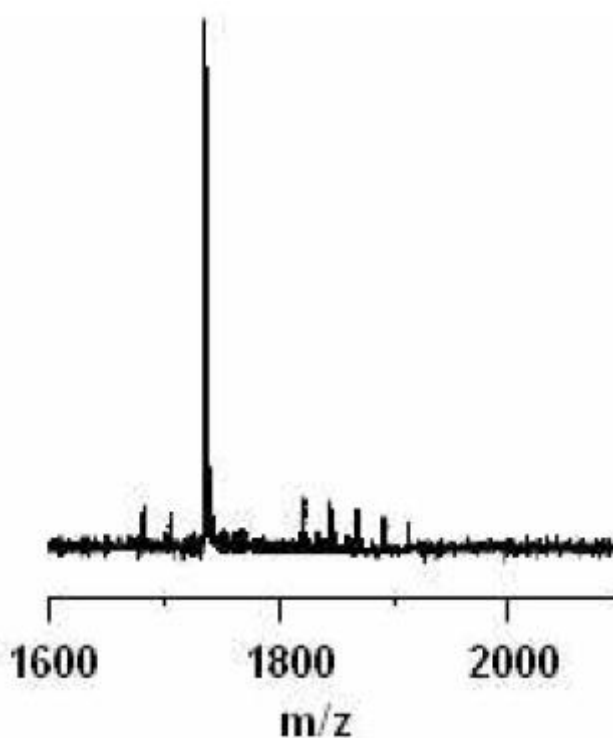


Figura 5.5: Espectro Maldi-Tof do PGLD (G3).

A pureza do PGLD (G=3) sintetizado foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os parâmetros frequentemente observados em CLAE são o "tempo de retenção" R_t (específico de cada pico, permite identificar a molécula) e a área (que esta relacionada à concentração de cada pico). A pureza do conjugado PGLD-AAS foi avaliada por CLAE sendo os perfis cromatográficos obtidos apresentados nas Figuras 5.6 e 5.7.

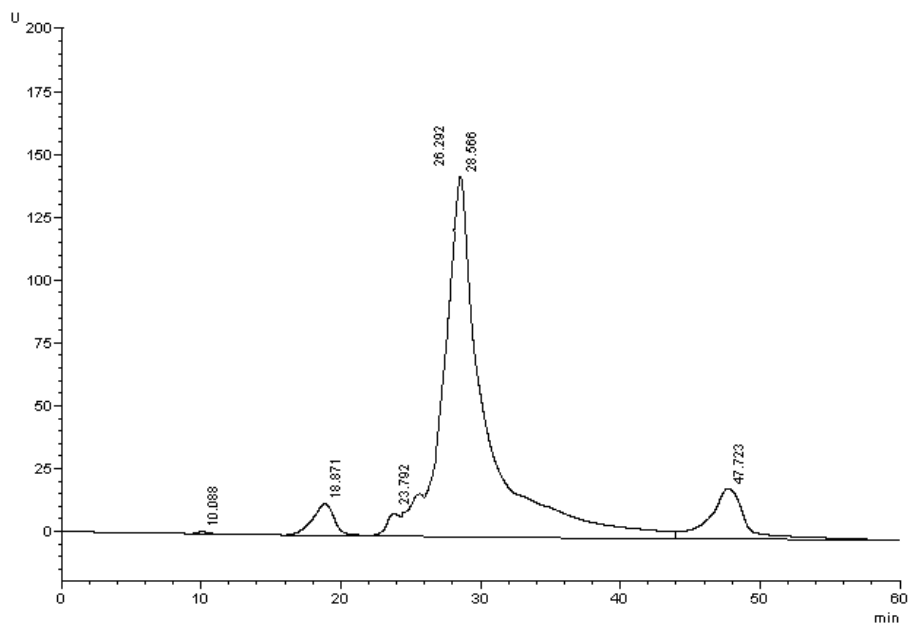


Figura 5.6: Perfil cromatográfico CLAE do PGLD (G3).

Como controles também foram analisados o dendrímero não conjugado (PGLD) e o ácido acetilsalicílico livre (AAS). Foram obtidos os tempos de retenção de 26,2 min. para o PGLD e 24,2 min. para o AAS livre. O tempo de retenção obtido para o conjugado PGLD-AAS foi de 28,6 min. Os valores do tempo de retenção neste sistema de análise (filtração em gel) refletem o tamanho molecular do composto que está sendo analisado, portanto, o conjugado foi o de filtração mais lenta por ser a molécula maior. Considerando o valor da área do pico foi possível estimar a quantidade de AAS incorporado à estrutura dendrítica em $200 \pm 20 \text{ mg.g}^{-1}$ de PGLD.

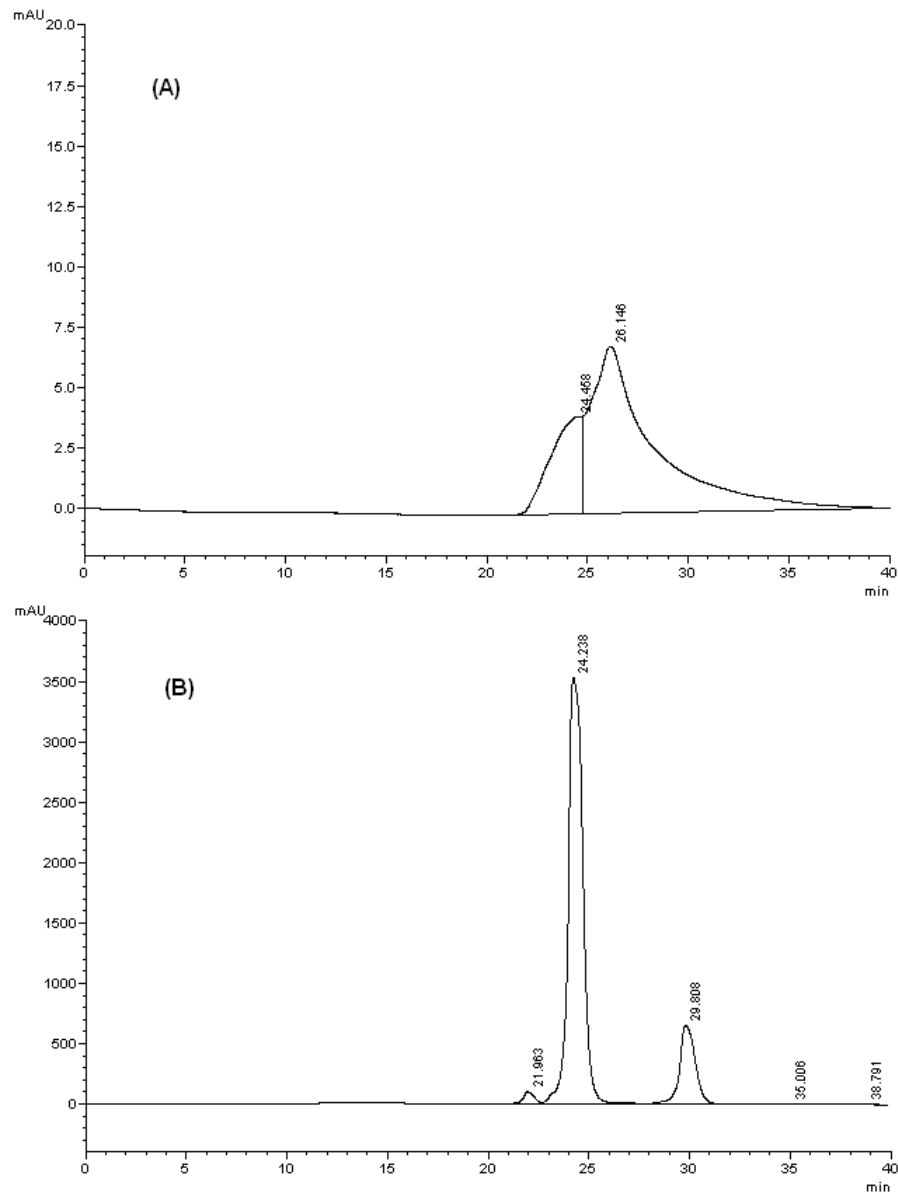


Figura 5.7: Comparação dos perfis de eluição por CLAE do AAS (A) e do conjugado PGLD-AAS (B).

5.2. Estudo *in vitro* em linhagens tumorais da citotoxicidade do PGLD-AAS

Neste trabalho, o potencial de citotoxicidade do PGLD-AAS contra o câncer foi avaliado por técnicas *in vitro* em linhagens tumorais. O efeito citotóxico do dendrímero salicilado foi avaliado por parâmetros que incluem a morte e proliferação celular. O efeito do PGLD-AAS no crescimento de linhagens celulares tumorais pode fornecer

importantes informações a respeito do processo de crescimento e morte celular que poderão ser utilizados estrategicamente no desenvolvimento de uma nova forma terapêutica de quimioterápicos para uso em humanos. Ao mesmo tempo, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* minimiza a experimentação em animais, em boa concordância com o princípio dos 3R's (Replace, Reduction, Refinement) [17].

O princípio dos 3 R's envolve três palavras de profundo significado na experimentação animal: *replace*, *refinement* e *reduction*. Nesse caso, *replace*, que se traduz pela substituição absoluta por técnicas que não usem animais ou, substituição por animais menos evoluídos. O segundo princípio, denominado *reduction*, significa a redução do número de animais usados ou o desenvolvimento de estratégias que resulte num menor número de animais utilizados na experimentação, obtendo a mesma quantidade de informação ou maximizando a informação obtida por animal. Finalmente o *refinement* que quer dizer refinamento, ou seja, a diminuição da incidência ou severidade de procedimentos aplicados. Como pode ser observado, o princípio dos 3R's define na verdade uma nova ciência ética, daí o neologismo Bioética, que combina humildade, responsabilidade e uma competência interdisciplinar, intercultural e que sobretudo, potencializa o senso de humanidade no planejamento experimental.

Considerando o procedimento *in vitro* realizado nesse trabalho com linhagens tumorais, o procedimento traz algumas vantagens relativamente à experimentação animal tais como o controle físico-químico do pH, temperatura, pressão osmótica, pressão parcial de CO₂ e O₂ além das condições fisiológicas que podem ser mantidas relativamente constantes. Ao mesmo tempo, no processo de replicação celular as características da linhagem se perpetuam devido à homogeneidade das amostras.

O ensaio de citotoxicidade utilizando linhagens celulares pode ser considerado como um primeiro parâmetro indicativo da atividade antitumoral do PGLD-AAS. Nesse caso, a velocidade de crescimento e multiplicação celular pode ser medida indiretamente, utilizando os corantes supravitais MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazolio), sendo a intensidade da cor desenvolvida diretamente proporcional ao número de células presentes no meio [17-18].

A viabilidade celular é o parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade de um biomaterial e pode ser avaliada através do teste de citotoxicidade *in vitro* utilizando-se células de mamíferos. Nesse trabalho, a avaliação da atividade citotóxica do PGLD-AAS foi realizado em cultura de células de ovário de hamster chinês CHO-k1. A curva

dose resposta da amostra, determinada após 48 horas de exposição, foi construída para permitir a obtenção dos valores de IC_{50} , índice de citotoxicidade que causa a morte celular de 50 %. A viabilidade celular foi revelada após o contato das células previamente incubadas com o PGLD-AAS com o corante supravital do composto tetrazólico (5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5- dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil) tetrazólio (MTS) a 0,2 % e metassulfato de fenazida (PMS) a 0,09% (20:1).

No ensaio, o MTS é bioreduzido através da enzima mitocondrial succinato desidrogenase pelas células viáveis ao produto formazan que é solúvel no meio de cultura. A quantidade de MTS metabolizada pela população de células é diretamente proporcional ao número de células viáveis. O mecanismo do ensaio MTS é apresentado na Figura 5.8.

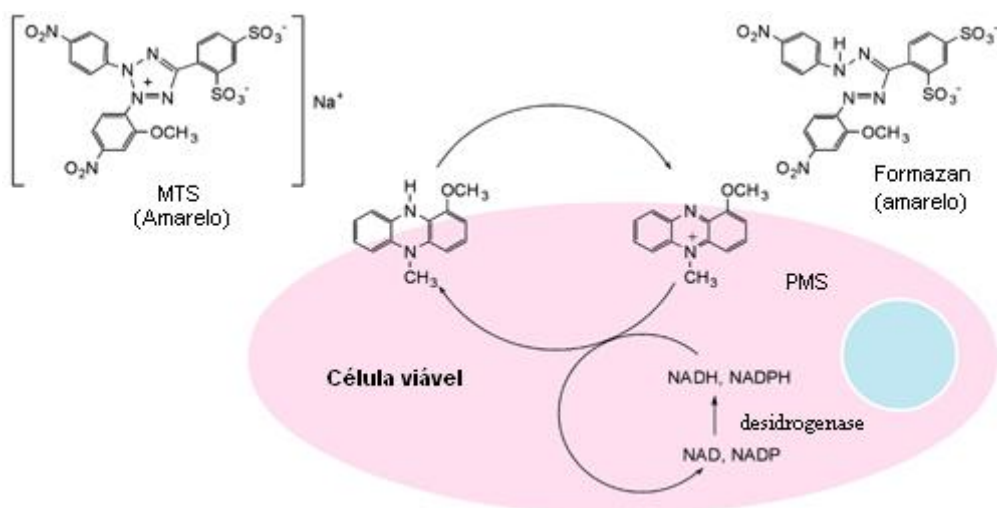


Figura 5.8: Mecanismo do ensaio de viabilidade celular utilizando-se o MTS.

O número de células vivas após a incubação com PGLD-AAS pode ser determinada colorimetricamente. Nesse caso, a coloração marrom indica que a amostra incubada com as células causou citotoxicidade, ou seja, morte celular, enquanto que a coloração amarela indica ausência de citotoxicidade, uma vez que existem células vivas no meio.

A Figura 5.9 mostra o ensaio de citotoxicidade do PGLD-AAS contra as células CHO. Observa-se que o PGLD-AAS apresenta boas características de biocompatibilidade com células de mamíferos, o que pode contribuir para a preservação das células saudáveis quando da sua aplicação como agente quimioterápico no tratamento de câncer. Essa observação abre caminho para uma abordagem contemporânea no

tratamento do câncer: o desenvolvimento dos chamados fármacos inteligentes, que atacam o tumor sem afetar células saudáveis. É bem conhecido que tais fármacos são direcionados a uma determinada mutação e, em vez de inibir indiscriminadamente as células que estão proliferando, inibem somente as células cancerosas [20-22].

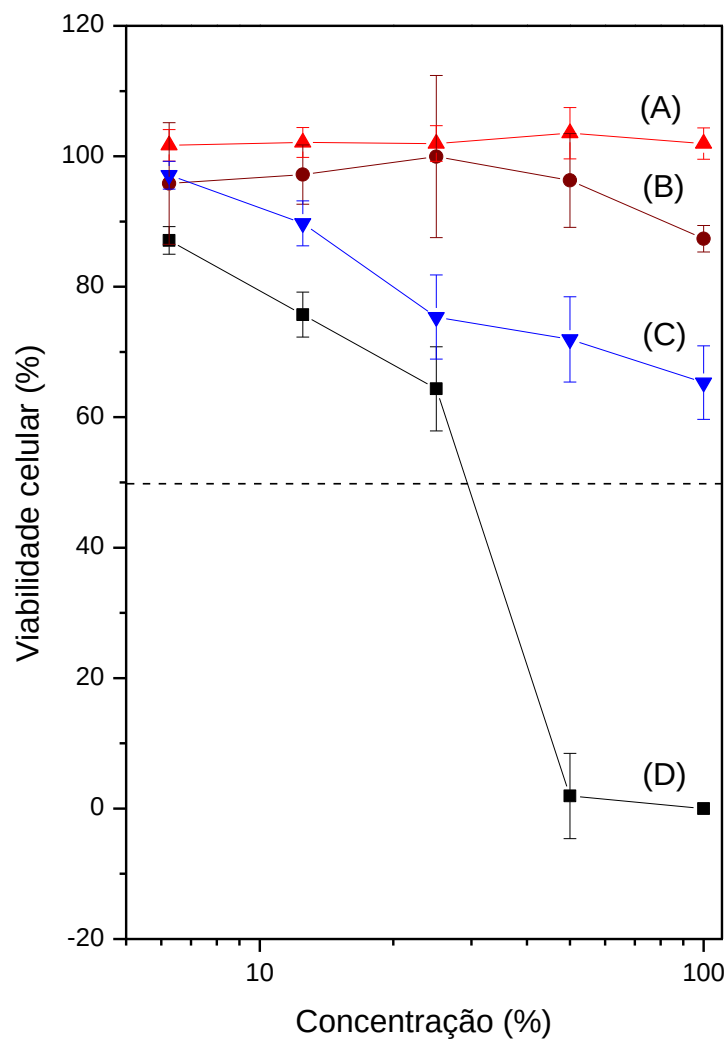


Figura 5.9: Ensaios de viabilidade celular para o PGLD-AAS (B) e PGLD (C). Os controles positivos e negativos são (D) e (A), respectivamente.

A Figura 5.10 apresenta as curvas de viabilidade celular do composto PGLD-AAS nas linhagens estudadas MG-63, A-549 e MRC-5. A viabilidade celular comparativa foi dada em IC_{50} , que define a menor concentração do dendrímero salicilado capaz de inibir a reprodução de 50% das células tumorais.

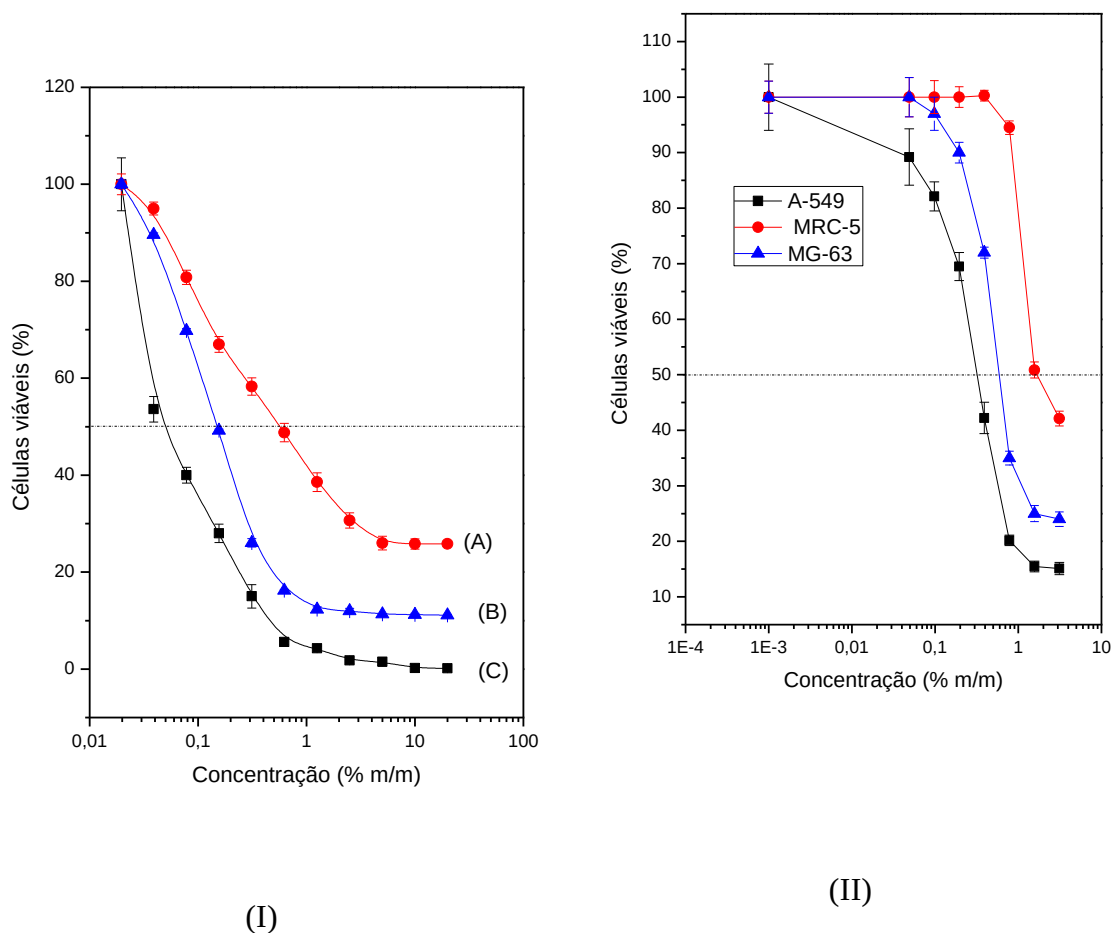


Figura 5.10: Efeito da concentração do PGLD-AAS (I) e ácido acetilsalicílico (II) na viabilidade celular das linhagens MRC-5 (A), MG-63 (B) e A-549 (C). Tempo de incubação: 24 h.

Os valores de IC_{50} do efeito do PGLD-AAS nas linhagens MG-63, A-549 e MRC-5 são 0,043% (m/m), 0,16% (m/m) e 0,57% (m/m), respectivamente. Comparando o valor de IC_{50} do PGLD-AAS observa-se que este tem valores 14 vezes maior (A-549), 3,9 vezes maior (MG-63) e 2,3 vezes maior (MRC-5) relativamente ao IC_{50} do AAS, mostrando uma boa atividade do PGLD-AAS nas linhagens estudadas.

5.3. Análise morfológica: Coloração diferencial por Laranja de Acridina/Brometo de Etídeo

A morfologia das células tratadas com PGLD-AAS, PGLD e AAS livre foram investigadas utilizando coloração Laranja de Acridina (LA)/Brometo de Etídeo (BE), para microscopia fluorescente. As membranas citoplasmáticas e nucleares são permeáveis ao LA e, ao entrar em contato com esta substância as células são observadas na cor verde. Células mortas são coradas em laranja pelo BE, que só penetra em células com alteração de permeabilidade celular. Assim sendo, as membranas das células viáveis e apoptóticas precoces, que permanecem íntegras, permitem a passagem, somente do LA e se coram em verde. Por sua vez, as células necróticas e apoptóticas tardias, que apresentam perda da integridade da membrana, permitem a passagem do BE, sendo observadas na cor vermelha [20-21].

A apoptose é um tipo de morte celular programada que é verificada em diversas situações fisiológicas bem como em patologias relacionadas com o câncer, doenças neurodegenerativas, infecções e intoxicação, além de patologias cardiovasculares e renais. O processo de apoptose se caracteriza por uma série de alterações morfológicas, pela participação das caspases, liberação de citocromo c mitocondrial e fragmentação nuclear [22-24].

A Figura 5.11 (A, B) mostra microscopia de fluorescência de células viáveis da linhagem A-549 na amostra controle. Observa-se a presença de células normais, coradas em verde. Na Figura 5.11 (C, D) observa-se a linhagem A-549 após adição do PGLD na concentração de 0,1% m/m. Observa-se um resultado semelhante ao da amostra controle, (Figura 5.11: A, B), com a presença células viáveis coradas na cor verde. Não se observaram indícios de apoptose por ação do PGLD.

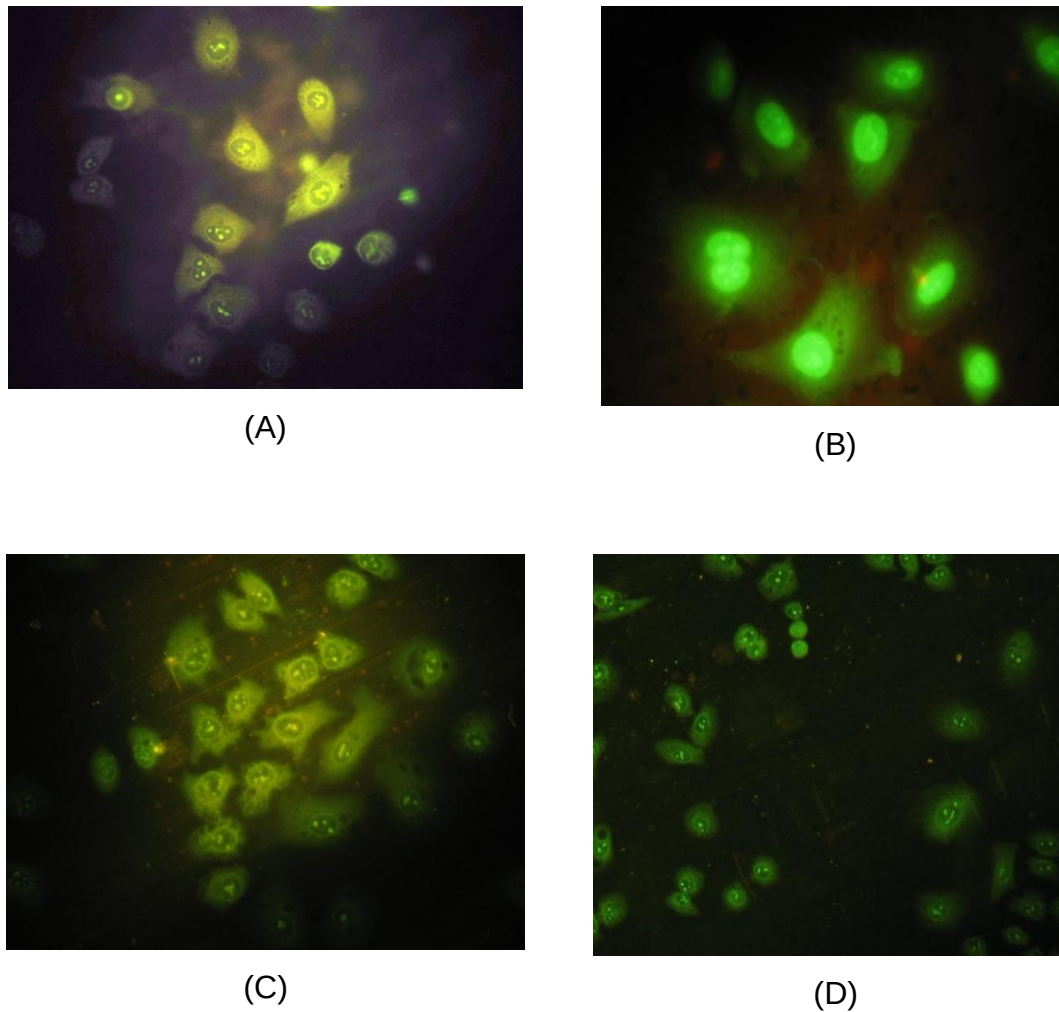


Figura 5.11: Micrografias do controle da linhagem A-549, corada com laranja de acridina e brometo de etídio (A, B). Em (C) e (D) observa-se a linhagem A-549 após incubação com PGLD (0,1 % m/m). Corante utilizado: laranja de acridina e brometo de etídio. Filtro 9, 100x (D) e 200x (A,B,C).

A Figura 5.12 ilustra os efeitos do AAS e PGLD-AAS na linhagem tumoral A-549. As células viáveis estão coradas em verde e as células apoptóticas em laranja. Observa-se que o PGLD-AAS leva a um aumento significativo no número de células apoptóticas, quando comparado ao PGLD (Fig. 5.11) e AAS livre (Fig. 5.12: A-B).

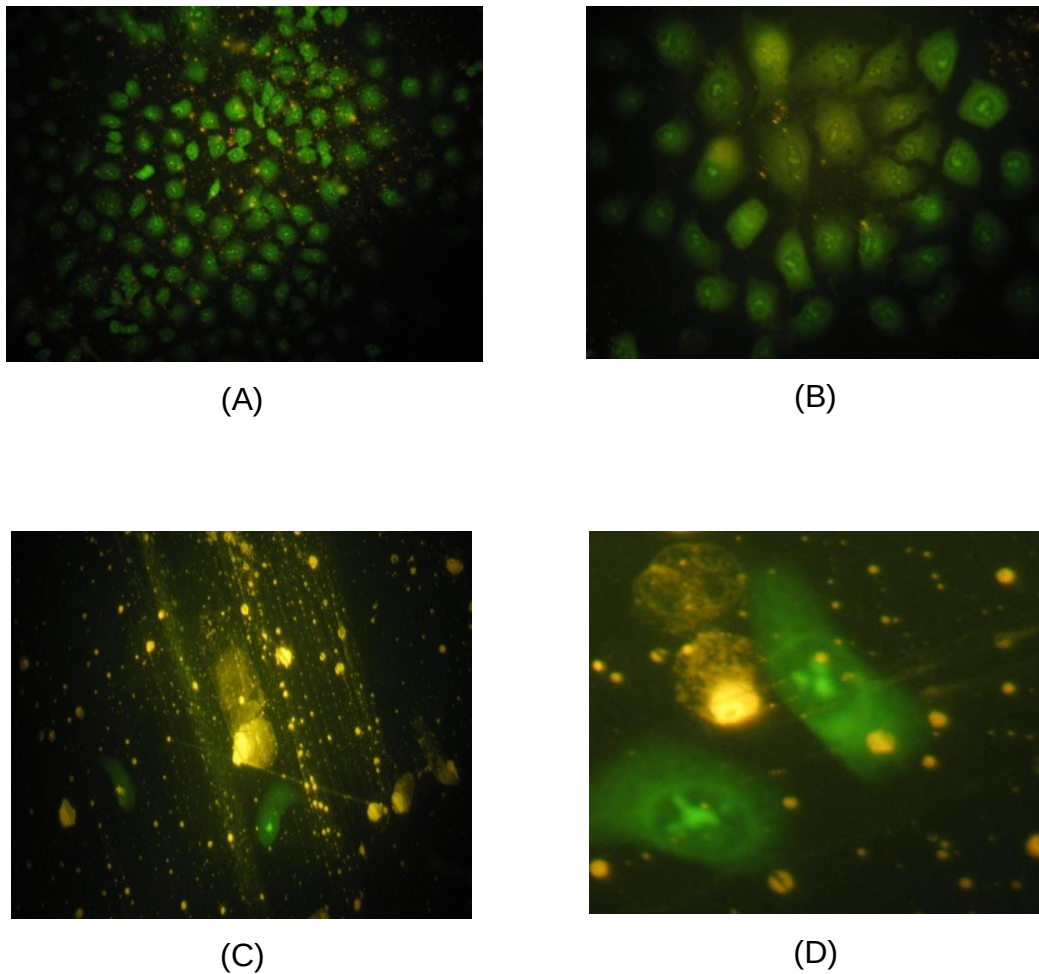


Figura 5.12: Linhagem celular A-549 na presença de AAS livre (A, B) e PGLD-AAS (C, D). A lâmina foi corada com laranja de acridina e brometo de etídio. Filtro 9, 100x (A), 200 x (B e C) e 400x (D). Concentração de AAS e PGLD-AAS: 01% (m/m).

A Figura 5.13 mostra a microscopia de fluorescência de células viáveis da linhagem MG-63 na amostra controle. Observa-se a presença de células normais, coradas em verde. Na Figura 5.13 (C, D) observa-se a linhagem de células MG-63 após adição do PGLD na concentração de 0,1% m/m. Observa-se um resultado semelhante ao grupo de controle (Figura 5.13 - A, B), com a presença células viáveis coradas na cor verde. Não se observaram indícios de apoptose significativos por ação do PGLD.

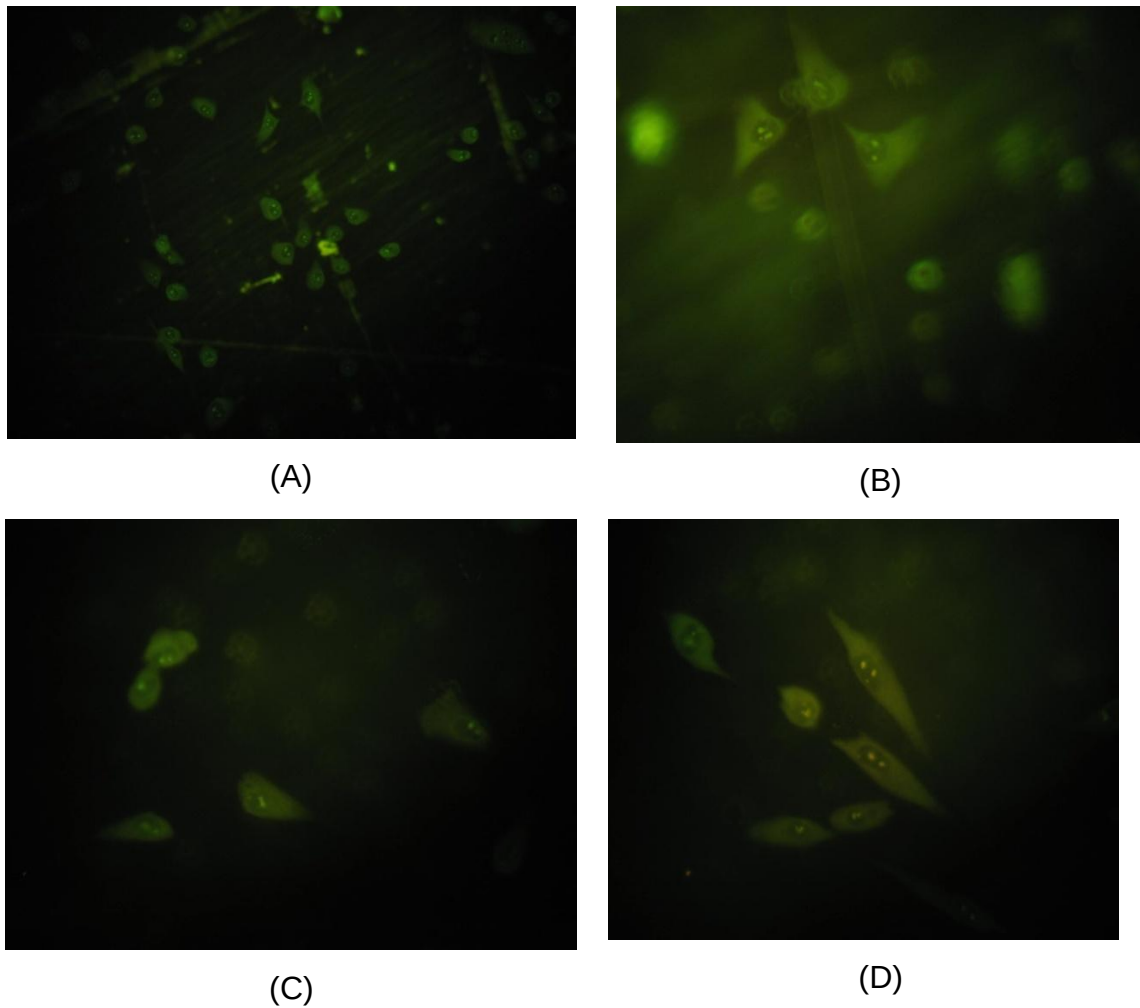


Figura 5.13: Micrografias da linhagem MG63 (controle), corada com laranja de acridina e brometo de etídio (A, B). Em (C) e (D) observa-se a linhagem MG-63 após incubação com PGLD. Corante utilizado: laranja de acridina e brometo de etídio. Filtro 9, 100x (A) e 200x (B, C, D).

A Figura 5.14 ilustra os efeitos do AAS e PGLD-AAS na linhagem tumoral MG-63. As células viáveis estão coradas em verde e as células apoptóticas em laranja. Observa-se que o PGLD-AAS leva a um aumento significativo no número de células apoptóticas, quando comparado ao PGLD (Fig. 5.13) e AAS livre (Fig. 5.14: A-B).

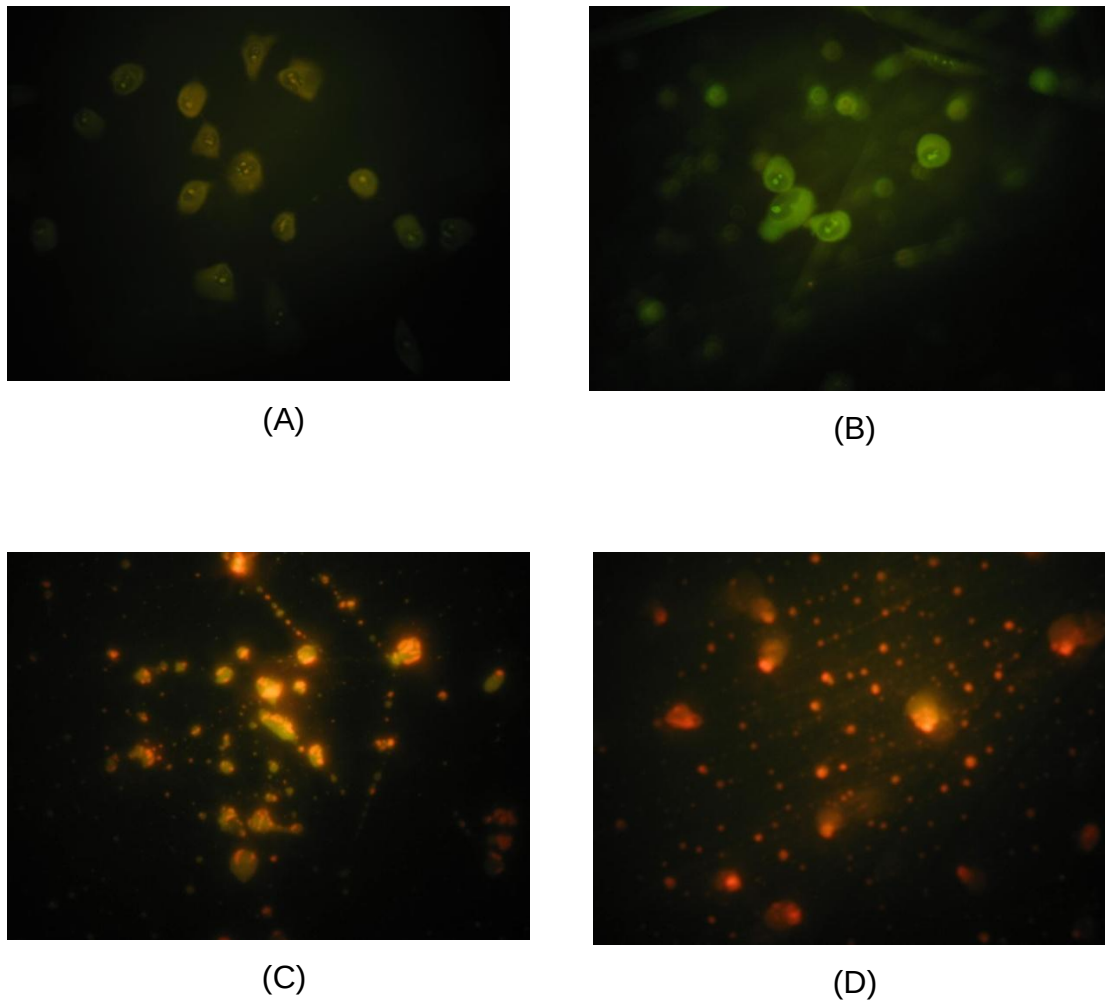


Figura 5.14: Linhagem celular MG-63 na presença de AAS livre (A,B) e PGLD-AAS (C,D). As lâminas foram coradas com laranja de acridina e brometo de Etídio. Filtro 9, 200x. Concentração de PGLD e AAS: 0,1% (m/m).

A Figura 5.15 mostra a microscopia de fluorescência de células viáveis da linhagem MRC-5 do grupo controle. Observa-se a presença de células normais, coradas em verde. Na Figura 5.15 (C, D) observa-se a linhagem de células MRC-5 após adição do PGLD na concentração de 0,1 % (m/m). Observa-se um resultado semelhante ao grupo de controle (Figura 5.15-A, B), com a presença células viáveis coradas na cor verde. Não se observaram indícios de apoptose significativos por ação do PGLD.

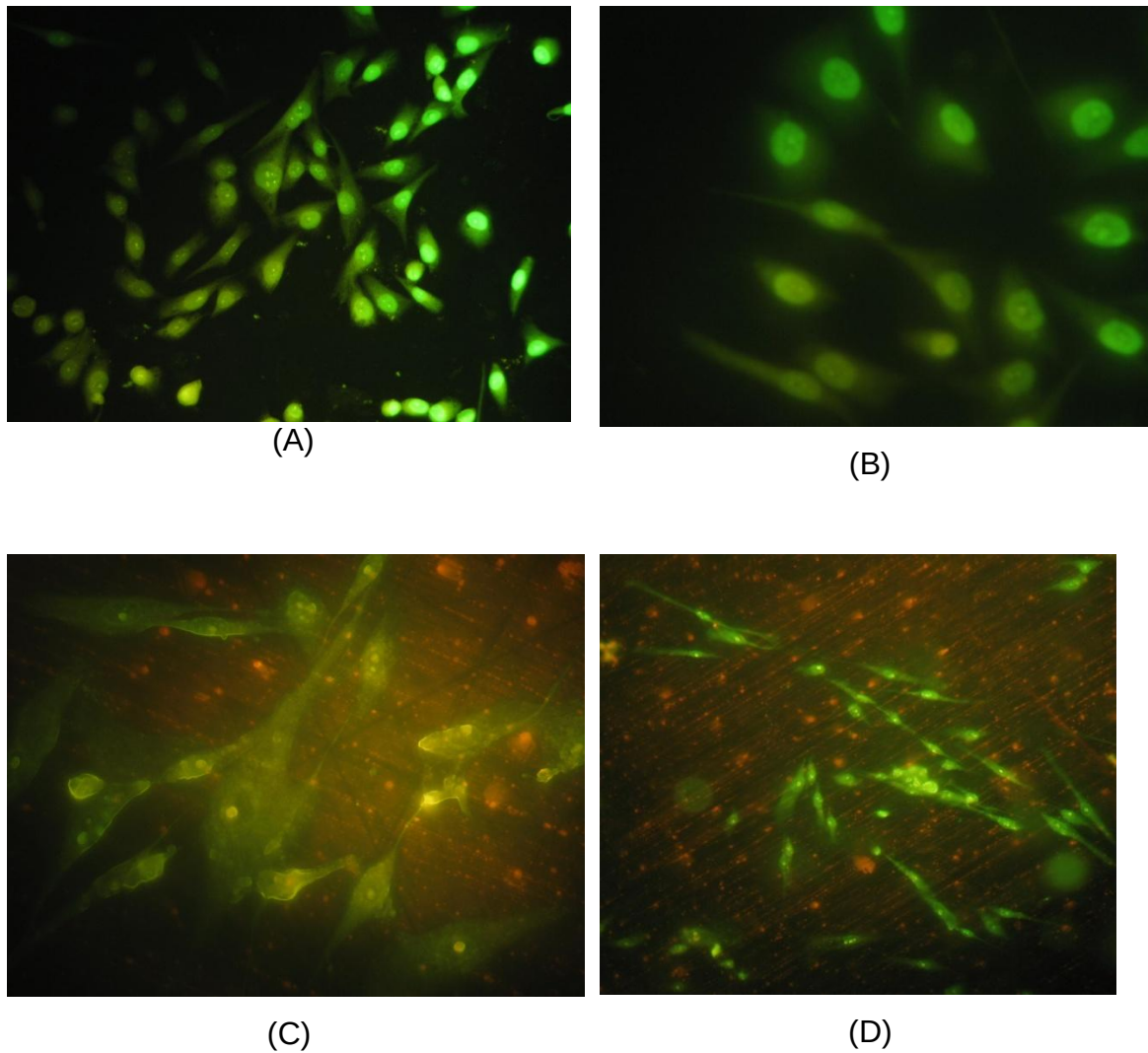


Figura 5.15: Micrografias da linhagem MRC-5 (controle) (A, B) e após incubação com PGLD (0,1% (m/m) (C, D). Corante utilizado: laranja de acridina e brometo de etídio, Filtro 9, 100x (A, D) e 200x (B, C).

A Figura 5.16 ilustra os efeitos do AAS e PGLD-AAS na linhagem celular MRC-5. As células viáveis estão coradas em verde e as células apoptóticas em laranja. Observa-se que o PGLD-AAS leva a um aumento significativo no número de células apoptóticas, quando comparado ao PGLD (Fig. 5.15) e AAS livre (Fig. 5.16: A).

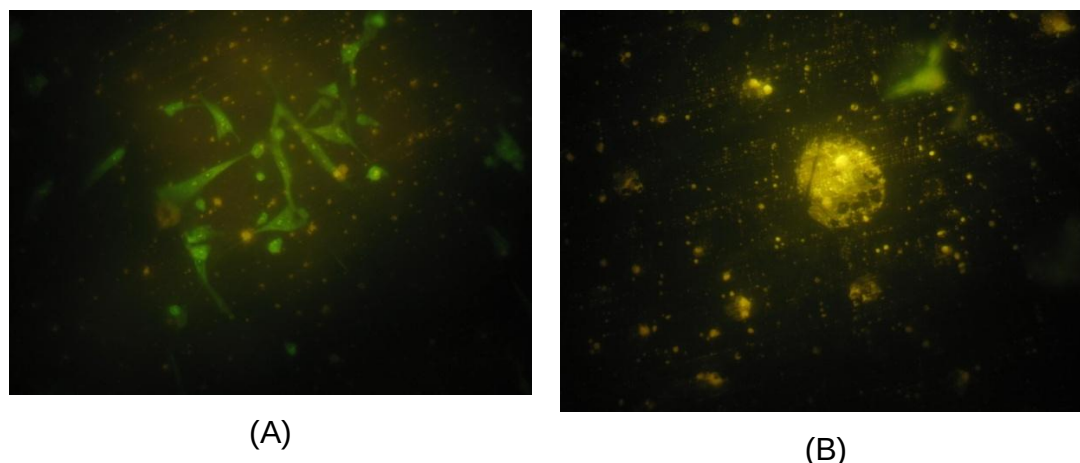


Figura 5.16: Linhagem celular MRC-5 após incubação com AAS livre (0,1% m/m) (A) e, PGLD-AAS (0,1% m/m) (B). As lâminas foram coradas com laranja de acridina e brometo de etídio. Filtro 9. 100x (A) e 400x (B).

As informações morfológicas observadas diretamente por coloração diferencial com LA/BE tais como a redução do volume celular, aparecimento de corpos apoptóticos, formação de vacúolos intracelulares e condensação de cromatina (Figuras 5.11 até 5.16) sugerem que o PGLD-AAS induz a morte celular por apoptose em todas as linhagens celulares estudadas. Embora a via de indução deste processo apoptótico ainda não esteja completamente compreendida, sabe-se que a mitocôndria desempenha um papel importante no processo de deflagração da apoptose em certas condições fisiológicas, o que pode disparar o surgimento de tumores.

O padrão bioquímico e morfológico associado com a programação normal de morte celular inclui vários eventos. Os mais significativos são a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação cromatínica, despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação internucleossomal do DNA e alterações na assimetria de fosfolipídeos de membrana plasmática [25-26]. Quando a morte celular apresenta todas as características morfológicas e bioquímicas de apoptose, mas foi induzida por um determinado composto ou por um estímulo físico, não constitui um processo programado e sim uma resposta celular às mudanças ambientais [27-28]. A Figura 5.17 ilustra os estágios envolvidos no processo de apoptose.

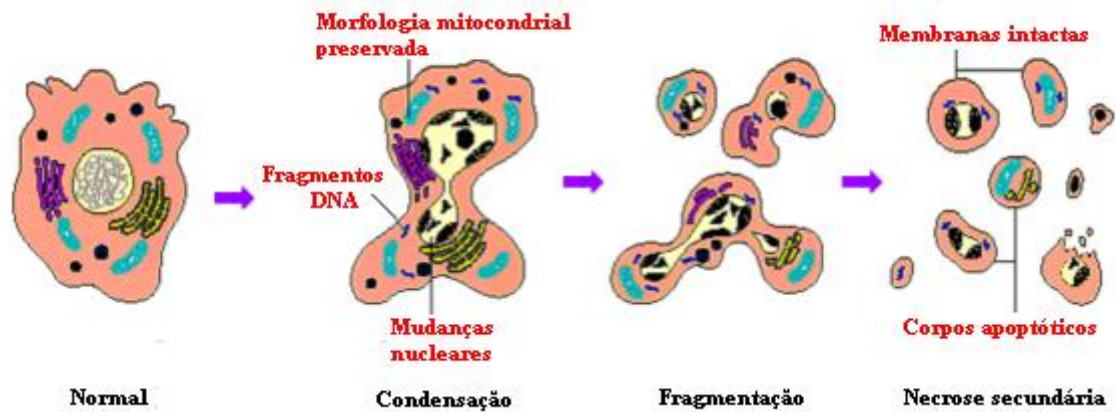


Figura 5.17: Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por apoptose. O processo apoptótico envolve alteração de permeabilidade de membranas, condensação cromatínica, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos sem desintegração de organelas.

Por outro lado, a morte celular por necrose é uma resposta celular severa, caracterizada morfológicamente por inchaço citoplasmático e mitocondrial, ruptura da membrana plasmática e liberação do conteúdo extracelular. Conseqüentemente, ocorre a geração de uma resposta inflamatória, que pode causar lesão e até mesmo a morte de células vizinhas sendo afetadas e lesadas um grande número de células ao mesmo tempo. Devido ao desencadeamento do processo inflamatório no processo de necrose há alterações irreversíveis no tecido e/ou órgão afetado [29]. A Figura 5.18 ilustra os estágios envolvidos no processo de necrose celular.

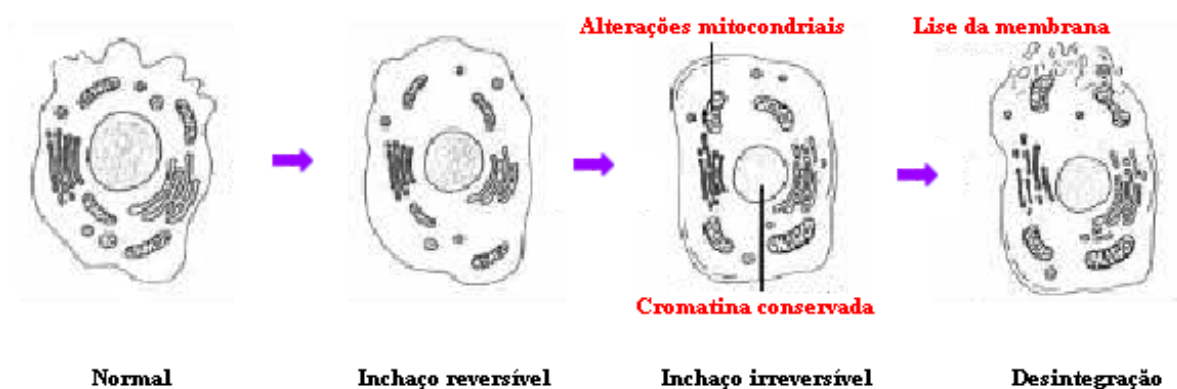


Figura 5.18: Distinção das diferentes alterações morfológicas nos processos de morte celular por necrose.

A necrose é caracterizada pela perda de integridade de membrana plasmática, floculação da cromatina, inchaço seguido de lise celular com extravasamento do conteúdo intracelular e desintegração de organelas.

A Figura 5.19 ilustra a freqüência das células estudadas MG-63, MRC-5 e A-549 em processo de degeneração bem como sua via de degeneração. A partir da microscopia de fluorescência a porcentagem de células em apoptose e necrose foi realizada conforme a equação 5.1, a seguir:

$$F_{CA}(\%) = \frac{N_{CA}}{N_{CC}} \times 100$$

$$F_{CN} = \frac{N_{CN}}{N_{CC}} \times 100$$

Equação 5.1: Porcentagem de células em apoptose e necrose.

sendo F_{CA} , F_{CN} , N_{CA} , N_{CN} e N_{CC} a freqüência de células em apoptose, freqüência de células em necrose, número total de células em apoptose, número total de células em necrose e número total de células contadas, respectivamente.

A via de degeneração mais freqüente nos grupos celulares tratado com PGLD-AAS foi a apoptose. Ao mesmo tempo, pode ser observado que a ordem de sensibilidade das linhagens celulares (SLC) ao PGLD-AAS é dado por:

$$SLC_{MRC-5} < SLC_{MG-63} < SLC_{A-549}$$

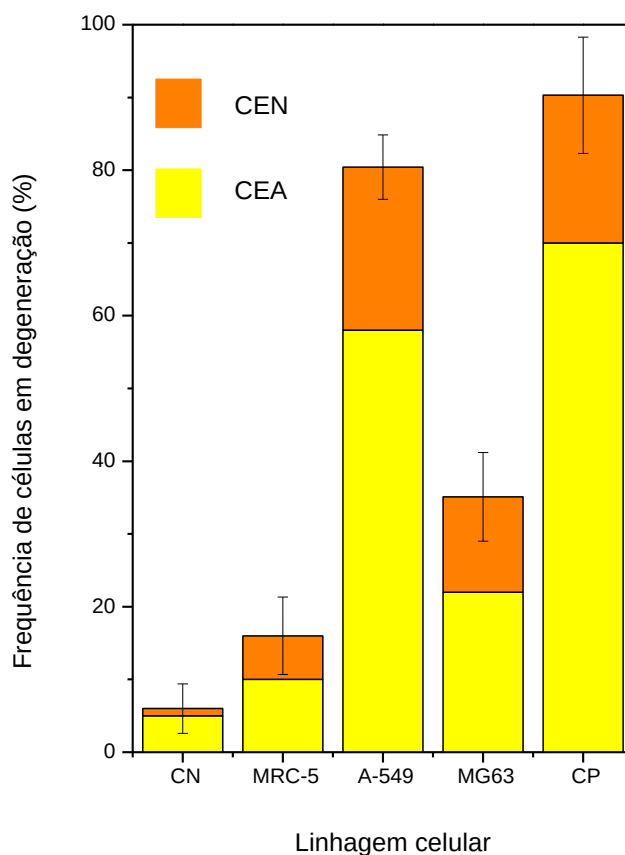


Figura 5.19: Efeitos do tratamento com PGLD-AAS (24 h) sobre a frequência de células MG63, MRC-5 e A-549 nas vias de degeneração necrose e apoptose. CEA e CEN são células em apoptose e em necrose, respectivamente. Concentração PGLD: 0,1 % (m/m). CN= controle negativo e CP = controle positivo.

O PGLD ao se associar ao AAS parece facilitar, através de sua arquitetura dendrítica, um transporte seletivo para a atuação do AAS, possível tanto no meio hidrofílico quanto no meio hidrofóbico exercendo a função de carreador desse composto para a célula e levando a uma maior eficácia de sua ação. Ao comparar o tratamento de PGLD-AAS para linhagem normal de origem fibroblástica MRC-5 e linhagem tumoral óssea com a mesma origem fibroblástica (osteossarcoma) os resultados obtidos não sugerem diferenças significantes no que se refere à indução de apoptose (Figura 5.20).

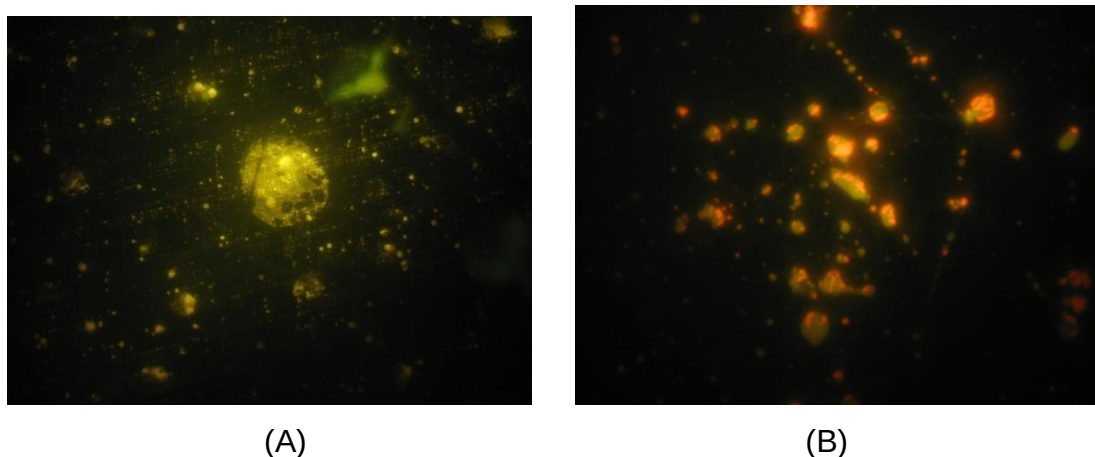


Figura 5.20: Comparativo entre as linhagens MRC-5 fibroblástica normal (A) e MG-63 fibroblastica tumoral (B) que receberam tratamento com PGLD-AAS (0,1% m/m). Ambas as linhagens apresentaram apoptose.

A Figura 5.21 mostra os resultados de microscopia fluorescente entre as células de linhagens MRC-5 e A-549. Os resultados referentes à bioatividade do PGLD-AAS entre as células de linhagem normal fibroblástica (MRC-5) e as células tumorais de origem epitelial (carcinoma), ambas de pulmão, mostrou que as duas linhagens apresentaram sensibilidade ao bioconjugado.

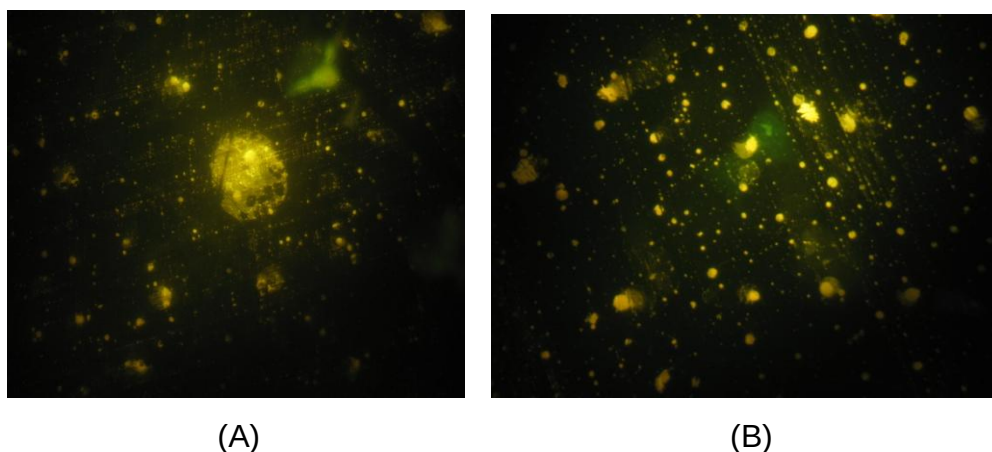


Figura 5.21 Comparativo entre as linhagens MRC-5 fibroblastica normal (A) e A-549 tumoral epitelial (B) que receberam tratamento com PGLD AAS (0,1% m/m).

As membranas celulares têm espessura de 7 a 9 nm. em média e são constituídas por uma camada lipídica bimolecular, contendo em ambos os lados, moléculas de proteínas que penetram e às vezes transpõem esta camada. Os ácidos graxos presentes na camada lipídica não possuem uma estrutura cristalina rígida, ao contrário, em temperatura fisiológica eles têm características quase fluidas. Assim, o caráter fluido das membranas e, portanto, sua permeabilidade, é determinada, principalmente, pela estrutura e proporção relativa de ácidos graxos insaturados presentes na região. Este modelo denominado de “mosaico fluido” foi proposto por Singer e Nicolson, em 1972, e continua sendo o mais aceito até hoje (Figura 5.22) [30].

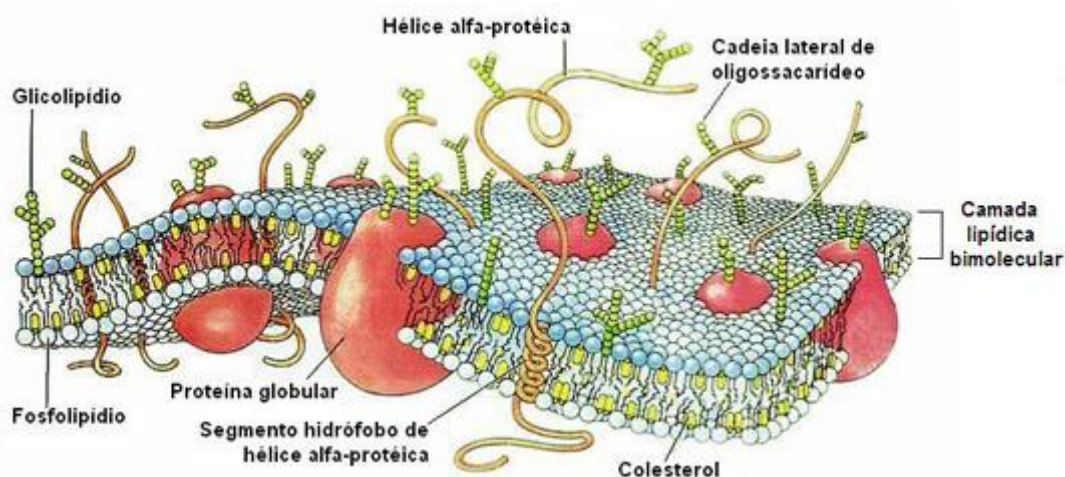


Figura 5.22: Estrutura da membrana plasmática segundo o modelo de mosaico fluido.

Devido à constituição lipoprotéica das membranas biológicas, as substâncias químicas lipossolúveis, ou seja, apolares, terão capacidade de transpô-las facilmente, pelo processo de difusão passiva. Já as substâncias hidrossolúveis não atravessam essas membranas, a não ser que tenham pequeno tamanho molecular e possam ser filtradas, através dos poros aquosos. O mecanismo utilizado pelo AAS para internalização através da membrana é eficiente apenas em meio ácido.

As características tanto hidrofílicas quanto hidrofóbica do PGLD permitem que ele exerça a função de carreador e facilite a travessia do AAS para o interior da célula,

através da membrana plasmática, melhorando sua eficiência. A Figura 5.24 evidencia a internalização do PGLD-AAS nas linhagens tumorais A-549 e MRC-5.

O PGLD-AAS pode ser internalizado nas células pelos processos de fusão direta com a membrana celular ou por endocitose [31]. Essas vias não são exclusivas e podem ocorrer a várias extensões dependendo do tipo, confluência e idade das células, bem como do tamanho e carga dos lipoplexos. A maioria dos estudos realizados indica que a internalização é feita majoritariamente por endocitose [32]. A endocitose pode ocorrer através de vários mecanismos englobados normalmente em duas categorias: fagocitose e pinocitose. Esta última compreende macropinocitose, e as vias caveolae, da clatrina e endocitose independente das vias da clatrina e da caveilina (Figura 5.23) [33].

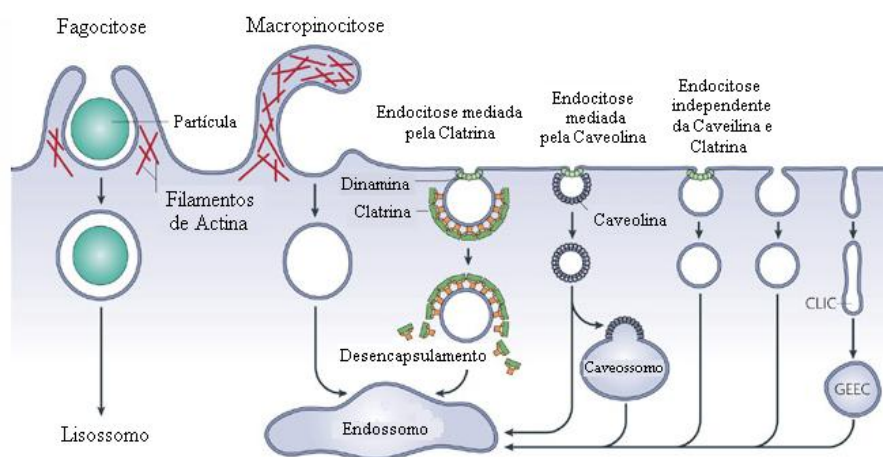


Figura 5.23: Representação esquemática das diferentes vias de endocitose. Adaptado de [34]. CLICS = Transportadores independente das vias da clatrina e dinamina, GEEC = Proteína glicosil fosfatidilinositol ancorada nos compartimentos endossômicos.

Na ausência de ligantes, o tamanho das partículas define a via de internalização e o conseqüente processo intracelular. Partículas menores que 200 nm são internalizadas pela via endocítica mediada por clatrina, alcançando rapidamente o compartimento lisossomal. As partículas entre 200 nm e 1 μ m são preferencialmente internalizadas pela via caveolina.

O dendrímero bioativo PGLD-AAS possui um diâmetro em torno de 3,6 nm [35] e, poderá, portanto ser internalizado pela via endocítica mediada pela clatrina. No entanto, a linhagem MG-63 não apresentou internalização. É fato conhecido na literatura que a composição da membrana celular varia com os vários tipos de células

[36], o que poderia facilitar ou não a ligação do PGLD-AAS à sua superfície ou sua internalização. Esses resultados não foram os esperados tendo em conta que as células tumorais se dividem mais rapidamente, e caracteristicamente possuem um número mais elevado de receptores para a transferrina nas suas membranas [37-38].

Nas células A-549 e MRC-5 a associação da transferrina ao PGLD-AAS poderia levar a um aumento significativo da atividade, possivelmente devido a uma maior capacidade de internalização do dendrímero bioativo, dada à capacidade do PGLD-AAS de promover o processo de endocitose. No caso das células MG-63 os receptores de transferrina poderiam estar de algum modo alterado, não promovendo assim a internalização do composto bioativo PGLD-AAS. Entretanto o mecanismo exato de interação entre as células tumorais estudadas nesse trabalho e o PGLD-AAS permanece desconhecido e poderá ser focado em um trabalho futuro.

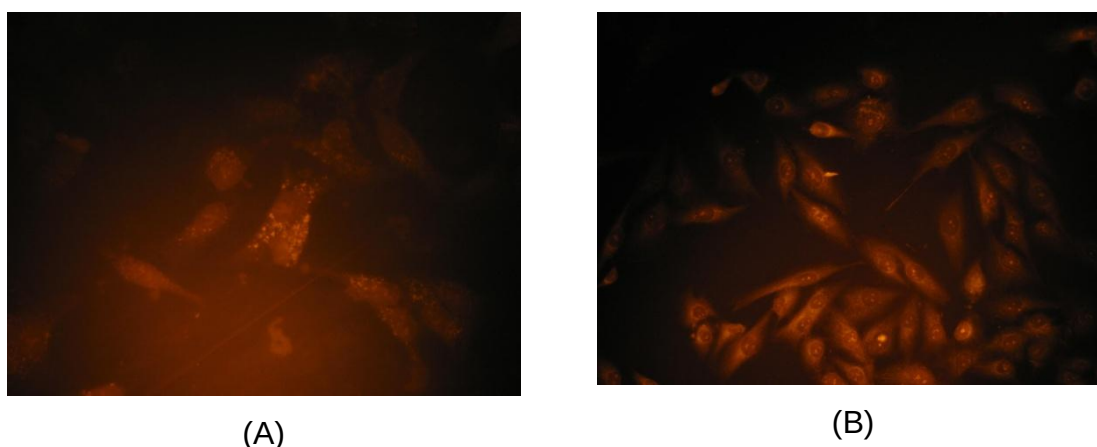


Figura 5.24: Microscopia de fluorescência das linhagens celulares A-549 (A) e MRC-5 (B) após exposição ao PGLD-AAS (0,1% m/m).

Referências Bibliográficas:

- [1] Fernandes E.G.R.; De Queiroz A.A.A. A bioconjugated polyglycerol dendrimer with glucose sensing properties. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, v. 20, p. 473-479, 2009.
- [2] De Queiroz A.A.A.; Fernandes, E. G. R.; Abraham, G. A.; Roman, J. S. Antithrombogenic properties of bioconjugate streptokinase-polyglycerol dendrimers. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, v. 17, p. 105-111, 2006.
- [3] Alexandra Rodrigues Pereira da Silva. Estudo das Propriedades Bioquímicas do Sistema Arborescente PGLD-AAS para o tratamento do Câncer. 2008. Dissertação (Mestrado em Materiais para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. *Orientador*: Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.
- [4] Giarola, V. M. Ressonância de plásmons de superfície aplicada ao desenvolvimento de sistemas arborescentes hemocompatíveis. 2007. Dissertação (Mestrado em Materiais Para Engenharia) - Universidade Federal de Itajubá, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior. *Orientador*: Alvaro Antonio Alencar de Queiroz.
- [5] Code of Federal Regulations. 1977. No. 21, Parts 100-199 Food and Drugs. Published US Government Printing Office, Washington, D.C.
- [6] List, G. R.; Mounts, T.L. Partially hydrogenated-winterized soybean oil. Capturado de <<http://ddr.nal.usda.gov/bitstream/10113/26378/1/IND82010061.pdf>> em 10 de fevereiro de 2011.
- [7] Hasenhuettl, G. L.; Hartel, R. W. Food emulsifiers and their applications. New York (EUA), Springer, 2008.
- [8] Battermann, W.; Dilla, W.; Dillenburg H.; Battermann, W. Use of polyglycerol for processing foodstuff. Patent 5.904.944 (EUA) (Solvay), 1999.
- [9] Leinweber, D.; Grundner, H.; Wasmund, E.; Scherl F. X. Alkoxylated polyglycerols and their use as demulsifiers. Patent 7.026.363 B2 (EUA), Clariant DE, 2006.

- [10] Fahy, G.; Wowk, B; Prevention of ice nucleation by polyglycerol. Patent 616.858 B2 (EUA), 2003.
- [11] Fahy, G.M.; Wu, J. Polyglycerol And Lactose Compositions For The Protection Of Living Systems From States Of Reduced Metabolism - Patent 6949335 (EUA), 21st Century Medicine Inc., 2005.
- [12] Gruning, B.; Hameyer, P.; Metzelaars, J.; Weitemeyer, C. Polyglycerol Partial Esters Of Fatty Acids And Polyfunctional Carboxylic Acids, Their Preparation And Use. Patent 6242499 B1 (EUA), Goldschmidt AG, 2001.
- [13] Allemann, E.; Gurny, R; Doelker, E. Drug-loaded nanoparticles - preparation methods and drug targeting issues. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 39, p. 173-191, 1993.
- [14] Orive, G.; Anitua, E.; Pedraz, J.L.; Emerich, D.F. Biomaterials for promoting brain protection, repair and regeneration. *Nature Reviews Neuroscience*, v.10, p.682-692, 2009.
- [15] Shchepelina, O.; Kozlovskaya, V.; Kharlampieva, H.; Mao, W.; Alexeev, A.; Tsukruk, V.V. Anisotropic Micro- and Nano-Capsules. *Macromol. Rapid Commun.* v.3, n.23, p. 2041-2046, 2010.
- [16] Haag, R.; Sunder, A.; Stumbe, J.F. An approach to glycerol dendrimers and pseudo-dendritic polyglycerols. *J. Am. Chem. Soc.*, V.122, p. 2954-2955, 2000.
- [17] Russell, W.M.S.; Burch, R.L. The Principles of Humane Experimental Technique. Methuen, London, 1959. Reprinted by UFAW, 1992: 8 Hamilton Close, South Mimms, Potters Bar, Herts EN6 3QD England. ISBN 0 900767 78 2 .
- [18] Houghton, P.; Fang, R.; Techatanawart, I.; Steventon, G.; Hylands, P.J.; Lee, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. *Methods* v. 42, p. 377-387, 2007.
- [19] Keepers, Y. P.; Pizao, P. E.; Peters, G. J.; Van Ark-Otte, J.; Winograd, B.; Pinedo, H. M. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays

- for in vitro chemosensitivity testing. *European Journal of Cancer*, n. 27, p. 1717, 1991
- [20] Cotter, T. G.; et al. Techniques in apoptosis - a user's guide. *Portland Press*. v.20, p. 8-9. 1996.
- [21] Miriam Fussae Suzuki, Avaliação dos efeitos genotóxicos e citotóxicos do Sm-EDTMP em linfócitos periféricos de pacientes com metástase óssea. 2003. Dissertação Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear-Aplicações. Ipen/USP. Orientador: Dra. Kayo Okazaki
- [22] Golstein, P.; Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *TRENDS in Biochem. Sci*, V.32, N.1, p. 37-43, 2006.
- [23] Kroemer, G.; Dallaporta, B.; Resche-Rigon, M. The mitochondrial death/life regular in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol*, n.60, p.619-642, 1998.
- [24] Lemasters, J.J.; Nieminen, A.L.; Qian, T.; Trost, L.C.; Elmore, S.P.; Nishimura, Y.; Crowe, R.A.; Cascio, W.E.; Bradham, C.A.; Brenner, D.A.; Herman, B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim.Biophys. Acta*, n.1366, p. 177-96, 1998.
- [25] Kerr, J.F.R. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, n. 182, p. 471-474, 2002.
- [26] Mcconkey, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicology Letters*, n. 99, p. 157-168, 1998.
- [27] Kerr, J.F.R.; Wyllie, A.H.; Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, n. 26, p. 239-257, 1972.
- [28] Kerr, J.F.R. Neglected opportunities in apoptosis research. *Trends Cell Biol.*, n. 5, p.55-57, 1995.
- [29] Curtin, J. F.; et al. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods.*, n. 265, p. 49-72, 2002.
- [30] Singer, S. J.; Nicolson, G.L. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science*, Vol. 175, n.4023, p. 720-731, 1972.

- [31] Zabner, J. Cationic lipids used in gene transfer. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.27, n.1, 17-28, 1997.
- [32] Duzgunes, N.; Nir, S. Mechanisms and kinetics of liposome-cell interactions. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v.40, n.1-2, p. 3-18, 1999.
- [33] Conner, S.D., Schmid, S.L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, Vol. 422, p. 37-44, 2003.
- [34] Parton, R. G.; Simons, K. The multiple faces of caveolae. *Nature Rev.Mol.Cell Biol.* V.8, p. 185–194, 2007.
- [35] Ooya, T.; Lee, J.; Park, K. Hydrotropic dendrimers of generations 4 and 5: synthesis, characterization, and hydrotropic solubilization of paclitaxel. *Bioconjugate Chem.* v.15, p. 1221-1229, 2004.
- [36] Callaghan, R.; van Gorkom, L.C.M.; Epand, R.M. A comparison of membrane properties and composition between cell lines selected and transfected for multi-drug resistance. *Br. J. Cancer*, v.66, p.781-786, 1992.
- [37] Qian, Z.M.; Li, H.G.; Sun, H.; Ho, K. Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway. *Pharmacol Rev*, v.54, p.561–587, 2002.
- [38] Tros de Ilarduya, C.; Arangoa, M.A; Moreno-Aliaga, M.J; Duzgunes, N. Enhanced gene delivery in vitro and in vivo by improved transferrin-lipoplexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, v.1561, n.2, p.209-221.

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A relação entre inflamação e câncer pode ser simplificada da seguinte maneira: a inflamação aguda combate, enquanto que a inflamação crônica promove o desenvolvimento do câncer. A inflamação crônica pode promover um significativo acúmulo de mutações genéticas nas células (causadas por carcinógenos ou reativos do oxigênio) possivelmente inibindo a apoptose, direcionando-as à proliferação e dando a essas células pré-neoplásicas e neoplásicas vantagens no crescimento. Assim como a inflamação aguda pode levar ao desaparecimento de lesões pré-neoplásicas e o estímulo inflamatório persistente (inflamação crônica) está comumente associado com o aumento no desenvolvimento do câncer [1].

Desta forma, como descrito neste trabalho, numerosos estudos experimentais, epidemiológicos e clínicos sugerem que os anti-inflamatórios não esteróides (AINEs) como o ácido acetilsalicílico são promissores medicamentos antineoplásicos e podem estar associados a redução do risco de desenvolvimento de muitos tipos de cânceres como pulmão [2], mama [3] e outros. Embora o mecanismo responsável pela atividade antitumoral de AINEs ainda seja desconhecido, esta atividade é comumente atribuída à inibição da enzima ciclooxigenase em especial na sua isoforma COX-2, que é encontrada com abundância em muitos tumores [4].

No entanto, os efeitos antineoplásicos de AINEs podem também estar relacionados a ativação da apoptose, inibição da angiogênese, ou inibição direta do crescimento da célula cancerosa, bloqueando a transdução de sinal. Além disso, tanto inibidores seletivos de COX-2 quanto os não seletivos, têm demonstrado importantes efeitos antiproliferativos, principalmente induzindo a parada do ciclo celular ou apoptose G1, em diferentes linhagens de células tumorais, independentemente da expressão da COX2 [5].

Outro importante fator relacionado a atividade antiproliferativa dos AINEs é a lipofilicidade, uma vez que os compostos lipofílicos possuem um maior grau de permeabilidade na membrana plasmática, o que representa um importante requisito para a sua atividade biológica. Pró-fármacos lipofílicos derivados de AINEs, tais como ésteres alifáticos e aromáticos e as amidas, além de derivados amida covalentemente ligadas moléculas anti-oxidantes tem demonstrado tanto atividade

antioxidante quanto antiproliferativa. Em estudo realizado por Marjanovic (2007) com amidas derivadas dos AINEs Fenoprofeno e Ketoprofen demonstraram aumento significativo do potencial antineoplásico destes compostos em linhagens celulares MCF-7 quando comparados ao AINE original, provavelmente por causa do aumento da lipofilicidade. Além disso estes compostos induziram a parada do ciclo na fase G1, assim como a apoptose [5].

Estes dados sugerem que os AINEs podem mediar seus efeitos inibitórios na proliferação celular, pelo menos em parte, através de mecanismos independentes da COX- 2.

No caso de células epiteliais dos alvéolos pulmonares, que tem a função de interagir com substâncias ou células tanto no espaço alveolar quanto no interstício pulmonar, um papel importante na resposta imune é exercido por elas. Isso se deve a sua capacidade de gerar mediadores biologicamente ativos em resposta a estímulos [6].

Este grupo de células responde aos leucócitos que foram recrutados do sangue periférico para o interstício pulmonar levando a produção novos mediadores por vias transcelulares. Esses mediadores modulam alterações pulmonares fisiopatológicos, tais como a hiperplasia, a fibrose e a neoplasia [6].

Um desses mediadores são os eicosanóides, como abordado anteriormente, os eicosanóides são produtos de oxigenação dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. O ácido araquidônico é o mais abundante e importante dos precursores dos eicosanóides. Para que ocorra a síntese dos eicosanóides, o araquidonato deve ser inicialmente liberado ou mobilizado de fosfolipídeos da membrana por uma ou mais lipases do tipo fosfolipase A2 (PLA2) [7]. Após mobilização, o ácido araquidônico é oxigenado por quatro vias distintas: as vias da ciclooxigenase (COX), da lipoxigenase (LO), da epoxigenase P450 e do isoprostano.

As Lipoxigenases (LO) são as responsáveis pela síntese das Lipoxinas (LX). As Lipoxinas (LXS) são eicosanóides, derivados de ácidos graxos poliinsaturados, assim como prostaglandinas e leucotrienos, que carregam uma estrutura conjugada tetraenal. Em seres humanos as lipoxinas são sintetizadas por diferentes vias, três LOs diferentes introduzem o oxigênio nas posições 5, 12, e 15 do ácido araquidônico. Pela via da 5-LO nos neutrófilos, o leucotrieno A4 (LTA₄) é formado e é rapidamente convertido pelas plaquetas em lipoxina A4 (LXA₄) pela via da 12-LO. Um segundo modo de formação da lipoxina (LX) acontece através da oxigenação do ácido araquidônico pela 15-

lipoxigenase (15-LO), seguido pela formação do composto 5(6) epoxitetraeno, intermediados nos leucócitos para obter lipoxina A4 e lipoxina B4 [8].

A lipoxina pode ser sintetizada ainda por uma terceira via, através da acetilação da ciclooxigenase-2 (COX-2) pela aspirina. envolve a formação de um intermediário chave do ácido araquidônico (AA), denominado ácido 15-R-15-hidroxi-eicosatetraenoicos (15R-HETE), pe de prostaglandina-ASA acetilada endoperoxídeo sintase-2 (PGHS-2, da ciclooxigenase). Esses “aspirin-triggered-LXs” (ATLs) são mais potentes e eficazes que a LXA₄ e LXB₄, em alguns efeitos como, por exemplo, inibindo a migração e a adesão de neutrófilos e proliferação celular [9-10].

Em células endoteliais tratadas com citocinas, o 15R-HETE é liberado e transformado em leucócitos ativados pela 5-LO e subseqüentes reações para produzir uma nova série de Lipoxinas (aspirin-triggered-LXs). Há crescentes evidências de que o AAS tem um papel protetor contra o câncer humano [11].

Dado que o AAS não afeta diretamente as enzimas Lipoxigenases, os eicosanóides gerados pela biossíntese transcelular na presença de ácido acetilsalicílico, podem estar envolvidos na ação terapêutica quimiopreventiva desse composto. Em estudo envolvendo linhagens celulares A-549, Claria *et al.* (1996), demonstrou que a formação de aspirin-triggered-LXs envolve tanto PGHS-2 acetilada pelo AAS quanto pela via do citocromo P450. Sendo assim estes compostos podem ser gerados em tecidos com atividade da P450 sem a necessidade de ser provocada pelo AAS, levantando a possibilidade das aspirin-triggered-LXs poderem ser geradas novamente, reforçando a sua via de formação pela presença de ácido acetilsalicílico. Explicando o efeito protetor do AAS contra o câncer humano [12].

Já em tecidos ósseos, estudos in vitro demonstraram efeitos negativos dos AINEs sobre fatores de crescimento que estimulam a osteogênese, principalmente proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs). Arikawa *et al.* (2004) relataram redução dos níveis de BMP-2 em culturas de células-tronco mesenquimais após a adição de NS-398, um inibidor seletivo da COX-2, através de um mecanismo que está relacionado à inibição de prostaglandina E2 (PGE2) [13].

Estudando BMP-2 como um possível fator que promove a regeneração do tecido periodontal, ou seja, promove a proliferação de células do periodonto, Takigushi *et al.* (1999), propôs o tratamento simultâneo dessas células do ligamento periodontal com BMP-2 e interleucina-1 (IL-1). Este tratamento causou um aumento na atividade da

fosfatase alcalina (ALP) e da produção de PGE₂, e promoveu a diferenciação dos osteoblastos. A adição do AINE indometacina na cultura reprimia esta ação [14]. Extrapolando estes resultados para o caso de neoplasias, o AINE age no sentido de inibir os eventos que promovem a proliferação celular.

A superfamília do fator de crescimento transformador (TGF- β) consiste em citocinas multifuncionais que regulam o crescimento e a diferenciação celular, remodelamento de tecido, resposta imune e angiogênese. Em mamíferos, existem três isoformas principais, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3 que na maioria dos tipos celulares, possuem as mesmas atividades biológicas. Essa citocina age principalmente em tecidos epiteliais [15].

Nas fases de iniciação e promoção da carcinogênese o TGF- β parece exercer efeito supressor de tumor, através do controle da progressão do ciclo celular e indução de apoptose, levantando a possibilidade de que a indução local de TGF- β poderia ser uma ferramenta terapêutica útil contra o desenvolvimento tumoral. Antiestrogenos, como tamoxifeno, demonstraram indução da secreção de TGF- β em linhagens celulares tumorais, sugerindo que alguns dos efeitos in vivo desta classe de drogas pode ser mediada pela indução de inibidores do crescimento endógeno [16].

Em contraste com esse efeito supressor, na fase de progressão da carcinogênese TGF- β também tem sido implicado como fator promotor de tumor, já que ele atua no remodelamento da matriz extracelular, angiogênese e supressão imune [16].

Referências Bibliográficas:

- [1] Philip, M.; ROWLEY, D. A.; Schreiber, H. Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin. Cancer Biol.*, v. 14, p. 433-439, 2004.
- [2] Brabender, J.; *et al.* Prognostic significance of cyclooxygenase 2 mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Ann Surg.* v.235, n.3 p.440-443, 2002.
- [3] Grudzinski, M.; *et al.* Expressão da cox-2 e CD105 no câncer de mama e sobrevida livre de doença. *Rev Med Bras*, v. 52, n. 4, p. 275-280, 2006.
- [4] Husain, S.S.; Szabo, I.L.; Tarnawski, A.S. NSAID inhibition of GI cancer growth: clinical implications and molecular mechanism of action. *Am J Gastroenterol.* v. 97, p.542–553, 2002.
- [5] Marjanovic, M. Fenoprofen and Ketoprofen Amides as Potential Antitumor Agents *Chem Biol Drug.* v. 69, p. 222–226, 2007.
- [6] Elias, J.A.; *et al.* Epithelial interleukin- 11. Regulation by cytokines, respiratory syncytial virus, and retinoic acid. *J. Biol. Chem.*, v.269, p. 22261-22268, 1994.
- [7] Nathoo, N.; <http://jcp.bmjjournals.com/content/57/1/6.abstract> - *aff-1 et a.l.* The eicosanoid cascade: possible role in gliomas and meningiomas. *J Clin Pathol.*, v. 57, p. 6-13, 2004.
- [8] Serhan, C.N. Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. *Biochim. Biophys. Acta.* v. 1212, p. 1-25, 1994.
- [9] Samuelsson, B.; *et al.* Leukotrienes and lipoxins: Structures, biosynthesis, and biological effects. *Science.* v.237, p. 1171-1176, 1987.
- [10] Claria, J.; Serhan, C.N. Aspirin triggers previously undescribed bioactive eicosanoids by human endothelial cell-leukocyte interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 92, p. 9475-9479, 1995.
- [11] Giovannucci, E.; *et al.* Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N. Engl. J. Med.* v. 333, p.609-614, 1995.
- [12] Arikawa, T.; Omura, K.; Morita, I. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol.* v. 200, p.400-406, 2004.
- [13] Takiguchi, T.; *et al.* Effect of prostaglandin E2 on recombinant human bone morphogenetic protein-2-stimulated osteoblastic differentiation in human periodontal ligament cells. *J Periodont Res* v.34, p.431-436, 1999.
- [14] Roberts, A. B.; *et al.* Transforming growth factor beta: biochemistry and roles

in embryogenesis, tissue repair and remodelling and carcinogenesis. *Recent Prog. Horm. Res.* v.44, p.157-197, 1990.

- [15] Colletta, L. M.; *et al.* The Growth Inhibition of Human Breast Cancer Cells by a Novel Synthetic Progestin Involves the Induction of Transforming Growth Factor Beta *J. Clin. Invest.* v.87, p. 277-283, 1991.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES

Neste trabalho foi investigada a atividade do PGLD-AAS na viabilidade de linhagens celulares MG-63, A-549 e MRC-5. Dentro dessa temática pode-se concluir com base nos resultados obtidos que:

- 1) As espectroscopias de ressonância magnética nuclear de prótons e carbono indicaram a estrutura arborescente do composto PGLD-AAS. Ao mesmo tempo, a análise por Maldi-Tof indicaram a isomolecularidade da estrutura dendrítica obtida.
- 2) A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) demonstrou a pureza do PGLD-AAS sintetizado permitindo também a caracterização da quantidade de fármaco (AAS) incorporado na estrutura dendrítica.
- 3) Nesse trabalho foram avaliadas as propriedades antitumorais de uma nanoplataforma transportadora de ácido acetilsalicílico, com propriedades físico-químicas compatíveis com a estrutura arborescente de um dendrímero. O dendrímero bioconjugado com AAS mostrou ser biocompatível e biofuncional, sendo portanto um promissor sistema para o desenvolvimento de formulações para o tratamento de câncer.
- 4) O dendrímero PGLD-AAS apresentou não citotoxicidade em ensaio *in vitro* em células de mamíferos (CHO-k1), demonstrando a possibilidade de desenvolver-se quimioterápicos vetorizáveis para o tratamento do câncer.
- 5) No ensaio para biofuncionalidade, o conjugado PGLD-AAS comprovou sua atividade antiproliferativa em três linhagens de células tumorais: osteosarcoma humano (MG63), linhagem celular normal pulmonar humana de origem fibroblástica (MRC-5) e carcinoma de pulmão humano (A-549).

- 6) No ensaio com as células de linhagens tumorais, o PGLD diminuiu a viabilidade celular de uma maneira dose dependente sendo esse efeito registrado por micrografia da cultura celular.
- 7) A técnica de coloração diferencial com LA/BE foi possível identificar na cultura células em apoptose e células necróticas após exposição ao PGLD-AAS, comprovando a atividade do composto na viabilidade das células tumorais.
- 8) A apoptose foi a principal via de degeneração celular induzida pelo PGLD-AAS observado nesse trabalho.
- 9) Observou-se ao microscópio de fluorescência a internalização do PGLD-AAS nas linhagens celulares MRC-5 e A-549.
- 10) A não internalização do PGLD-AAS na linhagem MG-63 pode estar associado à alteração nos receptores de membrana celular.

CAPÍTULO 8

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os recentes avanços na biologia molecular possibilitaram uma melhor compreensão a respeito dos mecanismos da carcinogênese. Neste sentido os agentes antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) , após a observação de que estas suprimem o processo inflamatório pela inibição da enzima ciclooxigenase, impedindo a síntese de prostaglandinas se tornaram atrativos na terapia antineoplásica.

O desenvolvimento de transportadores nanométricos que permitem vetorizar a biodistribuição deste fármaco se torna então uma luz para otimizar a utilização de AINEs no tratamento contra o câncer. Estudos farmacológicos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o dendrímero de poliglicerol salicilado (PGLD-AAS) possui uma significativa atividade contra células de câncer de mama (MCF-7).

Neste contexto, tendo em vista a necessidade de entendimento da dinâmica interação entre a inflamação e o desenvolvimento tumoral. Os resultados deste trabalho fornecerão as ferramentas necessárias para a realização de um tratamento de câncer mais seletivo uma vez que propiciará a síntese de novos fármacos vetorizados especificamente contra os oncogenes que conduzem o crescimento do tumor. As análises dos resultados obtidos trouxeram novas indagações que apresentamos aqui como as perspectivas ou sugestões para trabalhos futuros:

- 1- Aperfeiçoar a técnica de síntese do conjugado PGLD-AAS buscando rotas alternativas que levem à obtenção de dendrímeros verdadeiros minimizando assim, a formação de produtos altamente ramificados.
- 2- Analisar diferentes formas de contato entre as linhagens de células tumorais e o extrato de PGLD-AAS.
- 3- Elucidar os mecanismo da bioatividade do PGLD-AAS em linhagens de células tumorais.
- 4- Avançar no estudo da biocompatibilidade do extrato de PGLD-AAS

- 5- Desenvolver novos bioconjugados entre PGLD e outros tipos de AINEs.

Cada sugestão futura proposta acima tem como objetivo responder a perguntas cujas respostas contribuirão significativamente para o domínio da tecnologia de síntese de dendrímeros transportadores de quimioterápicos.

