

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia
Departamento de Física e Química - Instituto de Ciências
Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS
DE SISTEMAS POLIMÉRICOS ARBORESCENTES
PGLD-AAS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER**

Alexandra Rodrigues Pereira da Silva

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz

Itajubá, abril de 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia
Departamento de Física e Química - Instituto de Ciências

Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS
DE SISTEMAS POLIMÉRICOS ARBORESCENTES
PGLD-AAS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER**

**Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da
Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), como
requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências
dos Materiais para Engenharia.**

Área de concentração: Biomateriais.

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz

Itajubá, abril de 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
Programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia
Departamento de Física e Química - Instituto de Ciências

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES BIOQUÍMICAS
DE SISTEMAS POLIMÉRICOS ARBORESCENTES
PGLD-AAS PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER**

Alexandra Rodrigues Pereira da Silva

**Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da
Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI), como
requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências
dos Materiais para Engenharia.**

Aprovada por:

Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz – Orientador

Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira

Prof. Dr. Élcio Rogério Barrak

Itajubá, abril de 2008.

"Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha.
É porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra.
Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só,
porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós.
Essa é a mais bela responsabilidade da vida e
a prova de que as pessoas não se encontram por acaso."
(Charles Chaplin)

Agradecimentos

À Deus, cheio de bondade, que me deu saúde e força para vencer todos os meus obstáculos.

Ao professor Dr. Alvaro Antônio Alencar de Queiroz, exemplo de caráter, brilhantismo e dedicação, por sua orientação acadêmica, amizade, paciência e por dividir comigo essa jornada.

À minha família que sempre me deu carinho e amor incondicional: pai, mãe, Jú, Bruno e Ierko.

Ao meu namorado, Guilherme Grespan, pelo seu amor, paciência, amizade e apoio.

Aos professores do curso de mestrado em Materiais para Engenharia pelo desenvolvimento do meu conhecimento científico, em especial Dr. Demétrio Artur Werner Soares e Dr. Luiz Francisco Pontin, pela paciência.

Ao professor Dr. Julio San Román e à professora Dra. Maria Rosa Aguilar do Instituto de Ciências e Tecnologia de Polímeros do Consejo Superior de Investigación Científica – ICTP/CSIC, pelos ensaios de RMN de prótons, carbono e DSC.

Às professoras Dras. Olga Zazuco Higa e Maria Aparecida Pires Camillo do IPEN-Centro de Biotecnologia/USP, pelos ensaios de citotoxicidade e atividade antitumoral (MCF-7).

Aos funcionários da secretaria do ICE/UNIFEI, em especial às Roseli e Matilde.

Às funcionárias da PPG/UNIFEI, em especial à Maria Auta.

Ao Glauber, técnico responsável pelo Laboratório Didático de Química da UNIFEI.

Às queridas amigas da República Toca das Coyotes, pela amizade, brincadeiras e apoio nos momentos difíceis.

Aos meus queridos amigos, os que fiz em Itajubá e os de sempre.

Aos colegas do curso de mestrado em Materiais para Engenharia, em especial Janderson, Alessandra e Adelaine.

Ao colega Wagner, pela ajuda no Laboratório de Medidas Elétricas da UNIFEI.

À Fapemig pelo suporte financeiro.

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

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	v
Lista de tabelas.....	x
Lista de abreviaturas.....	xi
Resumo.....	xvi
Abstract.....	xvii

INTRODUÇÃO.....	1
------------------------	----------

CAPÍTULO 1 – BIOLOGIA MOLECULAR: ELUCIDANDO A UNIDADE

BIOLÓGICA.....	4
-----------------------	----------

1.0 – Introdução.....	4
1.1 – A proliferação celular normal.....	5
1.2 – Câncer: a proliferação celular patológica.....	11
1.3 – Bases moleculares da regulação da apoptose nas células tumorais.....	14
1.4 – Angiogênese: o gatilho proliferativo.....	17
1.5 – Referências bibliográficas.....	23

CAPÍTULO 2 – O CÂNCER DE MAMA: UM DILEMA TERAPÊUTICO NA

ATUALIDADE	26
-------------------------	-----------

2.0 – Introdução.....	26
2.1 – Epidemiologia do câncer de mama.....	26
2.2 – Anatomia da mama.....	28
2.3 – Aspectos gerais do câncer de mama.....	29
2.3.1 – Tipos de cânceres de mama.....	29

2.3.2 – Fatores de risco.....	30
2.3.3 – Sinais e sintomas.....	30
2.3.4 – Exames para detecção do câncer de mama.....	31
2.3.5 – Tratamentos para o câncer de mama.....	32
2.4 – Quimioterápicos: a necessidade de medicamentos mais eficazes.....	36
2.4.1 – Efeitos colaterais associados à quimioterapia.....	44
2.4.2 – O custo da quimioterapia.....	45
2.5 – Aspectos psicológicos relativos ao câncer de mama.....	46
2.6 – Referências bibliográficas.....	48

CAPÍTULO 3 – ÁCIDO ACETILSALICÍLICO: MUITO ALÉM DA

ANALGESIA.....51

3.0 – Introdução.....	51
3.1 – O ácido acetilsalicílico.....	51
3.2 – A história do AAS.....	52
3.3 – Mecanismos de ação do AAS.....	54
3.4 – Efeitos terapêuticos do AAS.....	57
3.5 – Efeitos colaterais da terapia com AAS.....	57
3.6 – O AAS e o câncer de mama.....	58
3.6.1 – COX-2: mecanismos relacionados ao câncer.....	58
3.6.2 – Expressão da COX-2 em tumores sólidos humanos e lesões pré-malignas.....	62
3.6.3 – COX-2 e o câncer de mama: uma evidência molecular.....	63
3.6.4 – O papel da COX-2 no câncer de mama.....	66
3.6.5 – Inibição da COX-2 no câncer de mama.....	67
3.7 – Referências bibliográficas.....	70

CAPÍTULO 4 – DENDRÍMEROS: UMA NOVA LUZ NO TRATAMENTO DO

CÂNCER.....72

4.0 – Introdução.....	72
4.1 – A síntese de dendrímeros.....	73
4.2 – Estrutura molecular e o mimetismo de proteínas.....	76
4.3 – Propriedades físico-químicas e bioquímicas dos dendrímeros.....	78
4.4 – Aplicações dos dendrímeros como sistemas carregadores de fármacos.....	82
4.5 – Referências bibliográficas.....	87
CAPÍTULO 5 – OBJETIVOS DA DISSERTAÇÃO.....	89
CAPÍTULO 6 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	90
6.1 – Síntese e caracterização do PGLD-AAS.....	90
6.1.1 – Síntese do poliglicerol com estrutura dendrítica.....	90
6.1.2 – Controle da reação de polimerização.....	90
6.1.3 – Imobilização do AAS.....	93
6.1.4 – Caracterização físico-química do PGLD-AAS.....	94
6.1.5 – Estudo da constante dielétrica (real e imaginária) do conjugado PGLD-AAS.....	96
6.2 – Caracterizações biológicas do PGLD-AAS.....	97
6.2.1 – Tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada.....	97
6.2.2 – Adsorção protéica.....	99
6.2.3 – Adesão plaquetária.....	99
6.2.4 – Formação de trombos.....	100
6.3 – Atividade antitumoral.....	101
6.3.1 – Teste de inibição do crescimento das células de tumor de mama MCF-7.....	101
6.3.2 – Análise da morfologia das células MCF-7 submetidas à ação do PGLD-AAS.....	101
6.3.3 – Ensaio de citotoxicidade contra células de mamíferos.....	101

6.4 – Referências bibliográficas.....	103
---------------------------------------	-----

CAPÍTULO 7 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....105

7.1 – Síntese e caracterização do PGLD.....	105
---	-----

7.2 – Imobilização do AAS.....	120
--------------------------------	-----

7.3 – A relação atividade biológica-constante dielétrica.....	122
---	-----

7.4 – Propriedades hemocompatíveis <i>in vitro</i> do PGLD-AAS.....	127
---	-----

7.4.1 – Adsorção protéica e absorção de água.....	129
---	-----

7.4.2 – Adesão plaquetária e formação de trombo.....	132
--	-----

7.4.3 – Os tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativada.....	136
---	-----

7.4.4 – Atividade antitumoral.....	139
------------------------------------	-----

7.4.5 – Análise da biocompatibilidade: Citotoxicidade.....	141
--	-----

7.5 – Referências bibliográficas.....	142
---------------------------------------	-----

CAPÍTULO 8 – CONCLUSÕES.....145

CAPÍTULO 9 – PERSPECTIVAS FUTURAS.....146

Lista de Figuras

Figura 1.1: Ilustração da síntese protéica para formação das células a partir do DNA.....	6
Figura 1.2: A duplicação do DNA.....	7
Figura 1.3: As fases da mitose.....	7
Figura 1.4: Fatores que podem causar dano ao DNA e alternativas para evitar esse dano.....	8
Figura 1.5: p53 e o ciclo celular.....	9
Figura 1.6: Transformação de proto-oncogenes em oncogenes.....	10
Figura 1.7: Influência do p53 no ciclo celular.....	11
Figura 1.8: Corpúsculos apoptóticos sendo fagocitados por uma célula branca do sangue.....	15
Figura 1.9: Influência da angiogênese no crescimento tumoral.....	18
Figura 1.10: Seção transversal de um tumor sólido, mostrando a diminuição da concentração de oxigênio em função da distância capilar.....	19
Figura 1.11: Representação esquemática da angiogênese.....	20
Figura 1.12: Progressão da angiogênese e crescimento tumoral.....	21
Figura 1.13: Metastatização do tumor através dos vasos sanguíneos.....	23
Figura 2.1: Tipos de cânceres mais incidentes estimados para o ano de 2008, em mulheres, no Brasil.....	27
Figura 2.2: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação.....	27
Figura 2.3: Representação lateral e frontal da mama humana.....	29
Figura 2.4: Ilustração de uma mamografia.....	31
Figura 2.5: Exame clínico da mama por mamografia (esquerda) e ressonância magnética nuclear (direita).....	32
Figura 2.6: Ilustração da Mastectomia Radical.....	33
Figura 2.7: Radioterapia.....	34
Figura 2.8: Estrutura química do Anastrozol.....	35
Figura 2.9: Estrutura química do Letrozol.....	35

Figura 2.10: Estrutura química do Letrozol.....	35
Figura 2.11: Estrutura química da Epirrubicina – Antraciclina.....	38
Figura 2.12: Estrutura química da Doxorubicina – Antraciclina.....	38
Figura 2.13: Estrutura química da Cisplatina.....	39
Figura 2.14: Estrutura química da Ciclofosfamida.....	39
Figura 2.15: Estrutura química da Fluorouracila.....	40
Figura 2.16: Estrutura química do metotrexato.....	40
Figura 2.17: Estrutura química da Capecitabina.....	41
Figura 2.18: Estrutura química do paclitaxel.....	41
Figura 2.19: Ciclo da divisão celular onde atuam os fármacos capazes de estabilizarem os microtúbulos.....	42
Figura 2.20: Estrutura química do Docetaxel.....	43
Figura 3.1: Hipócrates, o pai da medicina moderna.....	52
Figura 3.2: (1) Salicilina, (2) Ácido Salicílico e (3) Ácido Acetilsalicílico.....	53
Figura 3.3: Ilustração da síntese de Kolbe para produção do ácido acetilsalicílico.....	53
Figura 3.4: Reação química que leva à produção de AAS.....	54
Figura 3.5: Síntese de prostaglandina via ácido araquidônico.....	55
Figura 3.6: Esquema simplificado da ação do AAS sobre as isoformas da COX.....	56
Figura 3.7: Representação esquemática dos papéis da COX-2 na carcinogênese.....	59
Figura 3.8: Regulação transcricional da aromatase via COX-2.....	65
Figura 4.1: Uma estrutura dendrítica típica.....	72
Figura 4.2: Estruturas poliméricas.....	73
Figura 4.3: Figura esquemática do método divergente de crescimento de dendrímeros.....	74
Figura 4.4: Representação esquemática de uma síntese dendrímerica convergente.....	75
Figura 4.5: Os dois principais métodos de construção de macromoléculas dendríticas.....	75
Figura 4.6: Representação de dendrímeros do núcleo até a geração 7, mostrando aumento linear no diâmetro e o crescimento exponencial do número dos grupos de superfície.....	76

Figura 4.7: Escala dimensional comparando o dendrímero PAMAM ($G = 4-7$) com uma variedade de proteínas, bicamada lipídica e DNA.....	77
Figura 4.8: A arquitetura dendrítica nos sistemas biológicos.....	79
Figura 4.9: Medicamento encapsulado no interior de um dendrímero.....	80
Figura 4.10: Molécula biológica ligada à superfície do dendrímero.....	81
Figura 4.11: Ilustração idealizando a circulação de dendrímeros na circulação sanguínea. Estes se ligam aos receptores das células tumorais e liberam o fármaco no sítio alvo.....	82
Figura 4.12: Representação esquemática de Metrotexato (esquerda) e 5-fluorouracil (direita) encapsuladas dentro de dendrímeros geração 3 e 4 de PAMAM +PEG.....	85
Figura 4.13: Dendrímero de poliglicerol.....	85
Figura 6.1: (A)Trajetória do laser através da célula reacional. Os ângulos de refração e incidência são definidos por r e i , respectivamente. (B) Elucidação das relações geométricas na célula reacional.....	92
Figura 6.2: Equipamento de NMR Bruker 300 MHz (A) e Bruker 500 MHz (B) do ICTP/CSIC. Nota-se em (B) a introdução da amostra no equipamento de NMR.....	94
Figura 6.3: Equipamento para cromatografia de permeação em gel (GPC) Waters, modelo 510 utilizado neste trabalho. O equipamento pertence à Petroquímica União/ SP.....	96
Figura 6.4: Ilustração da caixa de teste aberta (A) e do aparelho utilizado para a medida da constante dielétrica (B).....	97
Figura 6.5: Placas de Elisa ilustrando o ensaio de citotoxicidade. A intensidade da cor é proporcional ao número de células viáveis.....	103
Figura 7.1: Porcentual de conversão da glicerina em poliglicerol e sua influência na massa molecular.....	105
Figura 7.2: Reação de policondensação do glicerol em hexaglicerol. Em seqüência a síntese divergente do dendrímero de poliglicerol a partir de um núcleo oligomérico de poliglicerol.....	106

Figura 7.3: Espectro FTIR da glicerina (GL) e do PGL sintetizado neste trabalho.....	107
Figura 7.4: Mecanismo de desprotonação do glicidol (A), propagação (B) e ciclização (C).....	108
Figura 7.5: Cinética de polimerização do PGL para obtenção do PGLD. Temperatura: 90°C.....	109
Figura 7.6: Curva de calibração (A) e análise por GPC do PGLD (B) obtido após 12 horas de processo.....	111
Figura 7.7: Estrutura esquemática do poliglicerol com estrutura dendrítica. L ₁₄ , L ₁₃ , D e T significam ligações lineares, estruturas dendríticas e grupos terminais, respectivamente.....	115
Figura 7.8: Espectro RMN de carbono (A) e de próton (B) do PGLD sintetizado neste trabalho.....	117
Figura 7.9: Determinação da temperatura de transição vítrea do PGLD sintetizado neste trabalho utilizando a técnica de calorimetria exploratória diferencial.....	119
Figura 7.10: Estrutura do PGLD-AAS sintetizado neste trabalho utilizando a rota sintética de esterificação com DCC/DMAP.....	120
Figura 7.11: Cromatografias: de camada delgada (A) e líquida de alta eficiência (B) do AAS e conjugado PGLD-AAS. HPLC: coluna (C(18), 150 mm x 4,6 mm x 5 micron). Fase móvel: solução methanol: água:ácido acético glacial (8,0: 5,5: 1,0). Detecção a 302 nm.....	121
Figura 7.12: Constante dielétrica real da solução de soro fisiológico e PGLD-AAS em diferentes concentrações a 10 kHz, 100 kHz e 1 MHz.....	124
Figura 7.13: Constante dielétrica imaginária da solução de soro fisiológico e PGLD-AAS em diferentes concentrações a 10 kHz, 100 kHz e 1 MHz.....	125
Figura 7.14: Constante dielétrica da solução de eritrócitos a 50%.....	126
Figura 7.15: Constante dielétrica da solução PGLD-AAS: Eritrócitos (1:1) em diferentes frequências.....	126
Figura 7.16: Esquema simplificado da cascata de coagulação sanguínea.....	128
Figura 7.17: Adsorção de Fibrinogênio e Albumina na superfície do PGLD-AAS.....	129

Figura 7.18: Evolução no espectro vibracional (FTIR/ATR) da superfície de PGLD-AAS durante o processo de sorção de água. Solução PBS, pH 7,4 a 37°C.....	131
Figura 7.19: Conteúdo de água nas superfícies de PS (○) e PGLD-AAS (●) a 37°C, PBS- pH=7,4.....	132
Figura 7.20: Porcentual de plaquetas ativadas aderidas sobre: PS (●) e PGLD-AAS (○).....	134
Figura 7.21: Micrografia da microscopia eletrônica de varredura (MEV) ilustrando a superfície de PS não revestida (A) e revestida com o dendrímero PGLD-AAS (B) após o contato com sangue humano por 180 s.....	135
Figura 7.22: Cinética da formação de trombos na superfície do PS (placas de Elisa) antes (●) e após o revestimento com o dendrímero PGLD-AAS (○).....	136
Figura 7.23: Ensaio da atividade anticoagulante do conjugado PGLD-AAS: TTPA (A) e TP (B).....	138
Figura 7.24: Influência da concentração de PGLD-AAS no ensaio de inibição de crescimento de células MCF-7. O percentual de crescimento foi determinado em ensaio MTS por 48 horas.....	140
Figura 7.25: Microscopia por contraste de fase do efeito do PGLD-AAS (A) na morfologia das células MCF-7 em cultura <i>in vitro</i> . Aumento 200X. Em (B) observa-se o controle.....	141
Figura 7.26: Gráfico da citotoxicidade de PGLD-AAS comparado com fenol e polietileno.....	142

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: A expressão de COX-2 foi determinada considerando o produto da intensidade da coloração e a porcentagem de células tumorais.....	67
Tabela 4.1: Dendrímeros como transportadores de vários quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer.....	84
Tabela 7.1- Análise do espectro de ^{13}C -NMR para o PGLD sintetizado neste trabalho. Solvente: $^{\text{d}}\text{DMSO}$, temperatura: 25°C	118

Lista de Abreviaturas

^{13}C -RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

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

^1H -RMN – Ressonância Magnética Nuclear de Próton

AA – Ácido Araquidônico

AAS – Ácido acetilsalicílico

ACD – Solução Citrato Dextrose

AINEs – Antiinflamatórios Não Esteróides

AP-1 – Proteína Ativadora-1

ATCC – Coleção de Cultura do Tipo Americana

Bcl-2 – Proteína ou Gene de Célula-B de Linfoma 2

Bcl-xL – Proteína Anti-apoptótica da Família Bcl-2

bFGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos b

BRCA1 – Gene do Câncer de Mama tipo 1

BRCA2 – Gene do Câncer de Mama tipo 2

BSA – Albumina do Soro Bovino

cAMP – Adenosina Monofosfato Cíclico

células NK – células *natural killer*

CHO – Cultura de Células de Ovário de Hamster Chinês

CIN – Neoplasia Intraepitelial Cervical

CMF – Ciclofosfamida/Metotrexato/5-Fluorouracil

COX-1 – Enzima ciclooxigenase-1

COX-2 – Enzima ciclooxigenase-2

CSTR – Reator Tipo Tanque Agitado

CYP19 – Gene Regulador da Aromatase

D – Estrutura Dendrítica

DCC – 1,3-diciclohexilcarbodiimida

DCIS – Carcinoma Ductal *in situ*

dDMSO – Dimetilsulfóxido Deuterado

DMAP – 4-dimetilaminopiridina

DMF – Dimetilformamida

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

EC50% – Dose Efetiva 50%

EPR – reforço da permeação e retenção

EUA – Estados Unidos da América

Fb – Fibrinogênio Humano

FDA – *Food and Drug Administration*

FEC – 5-Fluorouracil/Epírrubicina/Ciclofosfamida

FGF – Fator de Crescimento de Fibroblastos

FT – Fator Tecidual

FTIR – Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

G₁ – Fase Gap 1 do Ciclo Celular

G₂ – Fase Gap 2 do Ciclo Celular

G₀ – Geração 0

G₁ – Geração 1

G₂ – Geração 2

G₃ – Geração 3

G₄ – Geração 4

G₅ – Geração 5

G₆ – Geração 6

G₇ – Geração 7

GL – Glicerina ou Glicidol

GPC – Cromatografia de Permeação em Gel

GR – Grau de Ramificação

He-Ne – Hélio-Neônio

HFb – Fibrinogênio do Soro Humano

HIF-1 α – Fator Indutor de Hipóxia-1 α

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HSA – Albumina do Soro Humano

IAP – Proteína Inibidora da Apoptose

IC_{50%} – Índice de Citotoxicidade de 50%

ICTP/CSIC – Instituto de Ciências e Tecnologia de polímeros do “Consejo Superior de Investigación Científica”

Ig – Imunoglobulina

IGF – Fator de Crescimento Insulina
IL-1 – Interleucina-1
IL-1 β – Interleucina-1 β
IL-2 – Interleucina-2
IL-6 – Interleucina-6
IL-8 – Interleucina-8
INR – Relação Normalizada Internacional
IP – Índice de Polidispersão
ISI – Índice de Sensibilidade Internacional
IPEN – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares
M – Fase da Mitose do Ciclo Celular
MAPK – Proteína Quinase Ativada pela Mitogênese
MCF-7 – Linhagem Celular do Câncer de Mama
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MMPs – Matrizes de Metaloproteinases
MMP-2 – Matriz de Metaloproteinase-2
MMP-9 – Matriz de Metaloproteinase-9
mRNA – RNA mensageiro
MTS – Corante Supravital do Composto Tetrazólico
NF-kB – Fator Nuclear kB
p53 – Gene ou Proteína p53
PAMAM – Poli(amido amina)
PBS – Solução Tampão Fosfato
PDGF – Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
PDGFR – Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaqueta
PDMS – Polidimetilsiloxisano
PE – Polietileno
PEG – Poli(etileno glicol)
PEO – Poli(óxido de etileno)
PET – Politereftalato de Etileno
PGE2 – Prostaglandina E2
PGF2 α – Prostaglandina F2 α
PGG2 – Prostaglandina G2
PGI2 – Prostaglandina I2

PGL – Poliglicerol Oligomérico
PGLD – Poliglicerol Dendrítico
PGLD-AAS – Poliglicerol Dendrítico conjugado com o Ácido Acetilsalicílico
PGLD G5 – Poliglicerol Dendrítico de Geração 5
PGLD-Sk – Poliglicerol Dendrítico conjugado com Estreptoquinase
PGs – Prostaglandinas
pH – Potencial Hidrogeniônico
PIA – Proteínas Inibidoras da Apoptose
PK – Pré-caliceína
PMS – Agente Acoplador de Elétrons
PP – Polipropileno
PRP – Plasma Rico em Plaquetas
PS – Poliestireno
PVC – Policloreto de Vinila
QV – Qualidade de Vida
RM – Ressonância Magnética
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RNA – Ácido Ribonucléico
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
RPMI 1640 – Meio de Cultura de Tecido Animal Desidratado
S – Fase de Síntese do Ciclo Celular
SC-236 – Antiinflamatório Inibidor Seletivo da COX-2
SEM – Microscópio Eletrônico de Varredura
SFB – Soro Fetal Bovino
Sk – Estreptoquinase
T – Grupos Terminais
TFPI – Inibidor do Fator Tecidual
T_g – Temperatura de Transição Vítrea
TKRs – Receptor Tirosina Quinase
TLC – Cromatografia de Camada Delgada
TNF – Fator de Necrose Tumoral
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α
TP – Tempo de Protrombina
tRNA – RNA de Transferência

TTPA – Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada

TXA2 – Tromboxano A2

UNIFEI – Universidade Federal de Itajubá

USP – Universidade de São Paulo

UV – Raios Ultravioleta

UV/Vis – Ultra Violeta Visível

VEGF – Fator de Crescimento Vascular Endotelial

VEGFR – Receptor do Fator de Crescimento Vascular Endotelial

VHL – Tumor de Von Hippel-Lindau

Resumo

O principal objetivo deste trabalho é relatar a hemocompatibilidade e propriedades antitumorais do dendrímero de poliglicerol salicilado (PGLD-AAS). O dendrímero de poliglicerol (PGLD) foi preparado seguindo a metodologia sintética divergente. A natureza da estrutura do PGLD foi caracterizada pelas técnicas GPC e ^{13}C -NMR. O dendrímero de poliglicerol salicilado foi preparado pela esterificação do ácido acetilsalicílico com o PGLD. A adsorção protéica, adesão plaquetária, formação de trombo e propriedades anticoagulantes foram conduzidas por experiências *in vitro* para analisar a interação do sangue com o PGLD-AAS. A citotoxicidade do conjugado foi estudada contra células de mamíferos (CHO). O dendrímero sintetizado (PGLD) apresenta baixa dispersão em peso molecular ($M_w/M_n = 1,05$) e um grau de ramificação (G_R) de 0,82, caracterizando a estrutura dendrítica do polímero. Investigações sobre adsorções de proteínas albumina do soro humano e fibrinogênio mostraram que o PGLD-AAS adsorve mais albumina que fibrinogênio. As micrografias eletrônicas digitais do PGLD-AAS após contato com o sangue mostraram um comportamento hemocompatível do conjugado bioativo. As análises clínicas TTPA e TP indicam que o PGLD-AAS exibe boa atividade anticoagulante. A constante dielétrica de PGLD-AAS em solução fisiológica indica que este dendrímero bioativo não induz agregação de células sanguíneas. O conjugado PGLD-AAS exibe especificidade e bioatividade contra o câncer de mama humano derivado da linhagem celular MCF-7. A droga diminuiu a viabilidade celular em uma maneira dose dependente, exibindo uma IC_{50} de $88,6 \pm 5,3 \mu\text{M}$, com $50 \mu\text{M}$ PGLD-AAS. O PGLD-AAS induziu alterações morfológicas na membrana celular da linhagem MCF-7. A bioquímica e estudos *in vitro* indicam que PGLD-AAS parece ser um promissor agente antineoplásico.

Abstract

The main aim of this work is to report the hemocompatible and antitumoral properties of the salicylated polyglycerol dendrimer (PGLD-AAS). The polyglycerol dendrimer (PGLD) was prepared by following the divergent synthetic methodology. The nature of the PGLD structure was characterized by GPC and ^{13}C -NMR techniques. The salicylated PGLD dendrimers was prepared by esterification of acetylsalicylic acid with PGLD. Protein adsorption, platelet adhesion, thrombus formation and anticoagulant properties were conducted by *in vitro* experiments to examine the interaction of blood with PGLD-AAS. The cytotoxicity of the conjugate was studied against mammalian cells (CHO). The synthesized dendrimer (PGLD) presents low dispersion in molecular weight ($M_w/M_n = 1.05$) and a degree of branching (DB) of 0.82 characterizing the polymer dendritic structure. Investigation about adsorptions of human serum albumin and fibrinogen proteins showed that the PGLD-AAS adsorbed more albumin than fibrinogen. The scanning electron micrographs of the PGLD-AAS after contact with blood showed a hemocompatible behavior of the bioactive conjugate. TTPA and TP clinical analyses indicate that the PGLD-AAS exhibits good anticoagulant activities. The dielectric constant of PGLD-AAS in physiological solution indicates that this bioactive dendrimer does not induce aggregation of blood cells. The conjugate PGLD-AAS exhibit specificity and bioactivity against human breast cancer derived cell line MCF-7. The drug decreased cell viability in a dose dependent manner, exhibiting an IC_{50} of $88.6 \pm 5.3 \mu\text{M}$ with $50 \mu\text{M}$ PGLD-AAS. The PGLD-AAS induced morphological alterations on cell line MCF-7 membrane. The biochemical and *in vitro* studies indicate that PGLD-AAS appears to be a promising anticancer agent.

Introdução

O câncer parece ter assumido o papel da principal causa de morte da população nos países desenvolvidos e naqueles em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos cerca de uma pessoa em cinco morre de câncer contra a estatística de uma morte para cada 15 indivíduos nos países em desenvolvimento [1].

Embora tenha havido um espetacular avanço quanto aos esclarecimentos da biologia molecular do câncer, o sinal específico para a gênese desta patologia ainda permanece como um verdadeiro mistério para a mente humana. O conhecimento dos mecanismos de desenvolvimento do tumor levou ao desenvolvimento de quimioterápicos que deram ao paciente a possibilidade de conseguir um aumento significativo da qualidade de vida, mas não necessariamente cura, porque as células ativavam sistemas de resistência às drogas e o tumor geralmente progredia. Entretanto, os quimioterápicos são pouco específicos, afetam tecidos que têm rápida proliferação, havendo então significativos efeitos colaterais[2].

Os efeitos colaterais da quimioterapia estão associados com a formulação e a biodistribuição do medicamento, toxicidade a células normais e aquisição de resistência pelas células do câncer. Com o objetivo de fornecer a maior porção do medicamento ao local alvo e por um período de tempo prolongado, nanoestruturas que promovem a liberação controlada e vetorizada do medicamento foram projetadas no século passado [3].

Atualmente a terapia moderna do câncer se tornou um desafio multidisciplinar. O conhecimento dos mecanismos fisiológicos possibilitou o desenvolvimento e aperfeiçoamento de biomateriais, presentemente utilizados por milhares de pessoas e cujo objetivo principal no caso do câncer, é o de substituir ou restaurar as funções de tecidos danificados ou promover a liberação de agentes quimioterápicos com menor toxicidade para o paciente.

Há pouco mais de meio século o ser humano vem utilizando, de modo sistemático, macromoléculas sintéticas para a fabricação de biomateriais, elementos que visam substituir um tecido ou órgão biológico com a finalidade última de favorecer a vida. Uma grande parte dos biomateriais utilizados atualmente são compostos por polímeros, especialmente projetados para sua utilização em contato com o organismo biológico.

Entre as vantagens que os nanossistemas podem oferecer à medicina destacam-se: a proteção do fármaco no sistema terapêutico contra possíveis instabilidades no organismo biológico, manutenção dos níveis plasmáticos com concentração constante, o aumento da eficácia terapêutica, liberação progressiva e controlada da espécie bioativa pelo

condicionamento a estímulos do meio em que se encontram, diminuições expressivas da toxicidade pela redução de picos plasmáticos de concentração máxima, diminuição da instabilidade e decomposição de fármacos sensíveis, possibilidade de direcionamento a alvos específicos, possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas nos dispositivos, diminuição da dose terapêutica e do número de administrações e aumento da aceitação da terapia pelo paciente [5].

No século XX, as macromoléculas altamente ramificadas denominadas dendrímeros causaram uma verdadeira revolução nas áreas médica e farmacêutica devido às suas propriedades biomiméticas de proteínas globulares e seu elevado nível de organização estrutural. A elevada densidade de grupos funcionais na superfície dos dendrímeros torna estes compostos altamente interessantes para a imobilização de compostos bioativos para o tratamento do câncer. Até o presente, escassos estudos com eficácia comprovada foram realizados com o uso de dendrímeros para o tratamento ou diagnóstico do câncer [6-7].

Em nossa busca por dendrímeros com atividade fibrinolítica e antiagregante plaquetária no triênio 2006-2009, nosso grupo de pesquisa verificou que o dendrímero de poliglicerol contendo em sua estrutura o ácido acetilsalicílico (PGLD-AAS) recentemente sintetizado em nossos laboratórios parecia possuir uma significativa atividade contra células MCF-7 de carcinoma mamário humano [8].

O AAS é um antigo antiinflamatório não esteróide (AINES) que inibe a produção de prostaglandinas através da inibição da enzima cicloxigenase (COX), responsável pela biossíntese de icosanóides derivados da cascata do ácido araquidônico, fosfolípídeo de membrana celular, precursor das prostaglandinas. A enzima COX-2 é induzida por estímulos pró-inflamatórios como citocinas e fatores de crescimento, bem como se apresenta elevada em uma grande variedade de neoplasias. Em vários experimentos que avaliam a deleção do gene da COX-2 ou a inibição seletiva da proteína COX-2, observou-se uma redução expressiva no crescimento e desenvolvimento de tumores [9]. Recentemente, os pesquisadores obtiveram indícios da conexão entre inflamação e câncer, transformando completamente o entendimento do câncer e sua terapia.

Como propriedades biocompatíveis, pode-se dizer que os dendrímeros devem exibir baixa toxicidade e não ser imunogênicos para serem utilizados com segurança em aplicações clínicas. Até recentemente, a citotoxicidade dos dendrímeros foi estudada *in vitro* sendo poucos estudos *in vivo* publicados na literatura especializada, muito provavelmente devido à grande disputa por patentes pelos grandes conglomerados farmacêuticos internacionais dos países desenvolvidos. Entretanto, é sabido que o desenvolvimento de sistemas bioativos

baseados em polímeros arborescentes poderá contribuir significativamente para a terapia do câncer ou sua identificação em estágio precoce, dado a capacidade de tais sistemas de se ligar aos receptores celulares.

Nesta dissertação são discutidas as propriedades bioquímicas de sistemas poliméricos arborescentes PGLD-AAS para o tratamento do câncer, especificamente o carcinoma mamário humano.

Referências Bibliográficas

- [1] Pisani P. *Burden of cancer in developing countries*. In: Pearce N, Matos E, Vainio H, Boffetta P, Kogevinas M, editors. *Occupational cancer in developing countries*. Lyon: IARC; 1994. p.31-9. (IARC Scientific Publications n.129).
- [2] Perera F. P. Molecular epidemiology: insights into câncer susceptibility, risk assessment and prevention. *J Natl Cancer Inst*, v.8, p. 496-509, 1996.
- [3] Park J. H. *et al.* Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Prog Polym Sci*, 33(1): 113-137, 2008.
- [4] Gu F., Zhang L., Teply B.A., Mann N., Wang A., Radovic-Moreno A.F., Langer R., Farokhzad O.C. Precise engineering of targeted nanoparticles by using self-assembled biointegrated block copolymers. *PNAS*. 105(7): 2586-91, 2008.
- [5] Tao S.L., Desai T.A. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. *Adv. Drug Del. Rev.*, 55: 315-28, 2003.
- [6] Gillies E.R, Fréchet J.M.J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov. Today*, 10(1): 35-43, 2005.
- [7] Wolinsky J.B., Grinstaff M.W. Therapeutic and diagnostic applications of dendrimers for cancer treatment. *Adv. Drug Deliv.Rev.* 60(9, 10): 1037-1055, 2008.
- [8] De Queiroz A.A.A. *Dendrímeros biofuncionais hemocompatíveis*. Produtividade em Pesquisa - PQ - CA 10/2005.
- [9] Chun, K.S.; Surh, YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Bioch. Pharm.* 68: 1089–1100, 2004.

Capítulo 1 - Biologia molecular: elucidando a unidade biológica

1.0 Introdução

Apesar de todo o avanço alcançado na medicina clínica preventiva, o câncer é uma ameaça oculta de surgimento inesperado e pronunciado, segundo o imaginário popular, uma morte inexorável associada a um doloroso processo de sofrimento e deterioração física.

A evolução da medicina ao longo do último século promoveu uma importante alteração neste prognóstico desfavorável, permitindo que um grande percentual dos portadores de câncer tenham atualmente a oportunidade da cura como uma realidade significativamente viável.

A acentuada redução da mortalidade por câncer no presente século é consequência de vários fatores, destacando-se o desenvolvimento de políticas de saúde que visam à prevenção, avanço alcançado nos métodos de diagnóstico e métodos cirúrgicos e o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos.

O ser humano é composto por uma estrutura formada por cerca de 100 trilhões de células. Todas estas células, com exceção das hemácias, contêm o mesmo DNA, apresentando-se, no entanto com formato, estrutura e funções diferentes em consequência de sua variada expressão gênica.

Essa variedade celular inclui ao mesmo tempo um comportamento bastante diverso quanto ao ritmo de proliferação de cada tecido em decorrência principalmente de seu nível de diferenciação e função tecidual.

Assim sendo, observa-se em uma extremidade desta biodiversidade, células extremamente diferenciadas como os neurônios e as células musculares, os quais não realizam qualquer divisão ao longo de toda a vida do indivíduo, sendo impossível sua reposição no caso de perda do tecido biológico.

Por outro lado, as células epiteliais apresentam uma atividade proliferativa intensa devido à necessidade de reposição do grande número de células perdidas através do processo fisiológico de apoptose. Outras células apresentam ainda uma atividade proliferativa intermediária como as células hepáticas, que se dividem uma vez a cada ano.

Ao ritmo de atividade proliferativa damos o nome de ciclo celular e a replicação da molécula da vida, o DNA, representa um momento crítico na evolução celular do tecido biológico.

A compreensão adequada do mecanismo de ação de agentes quimioterápicos depende do conhecimento de algumas informações básicas a respeito da estrutura e funcionamento dos mecanismos celulares.

Diversos são os esforços para desenvolver um tratamento mais eficaz, quimioterápicos com menores efeitos colaterais, menor custo e ao mesmo tempo uma melhora na qualidade de vida do paciente. A compreensão dos mecanismos de carcinogênese são, dessa forma, essenciais para o desenvolvimento de tratamentos mais adequados, especialmente quando se trata da utilização de novos medicamentos.

1.1 A proliferação celular normal

O genoma humano é composto de 30 a 50 mil genes, que formam 23 pares de cromossomos [1, 2]. Os cromossomos são formados por DNA e uma complexa classe de proteínas cromossômicas conhecidas como histonas [2]. O DNA possui uma estrutura estável capaz de servir de molde para sua duplicação. A função enzimática necessária para duplicação, transcrição e reparo é exercida por proteínas [3].

Cada cromossomo carrega milhares de genes, por sua vez, cada gene consiste de pequenos estiramentos de DNA que especificam as instruções da confecção de uma proteína em particular. Cada gene possui uma região promotora que controla quando e em que tecido um gene é expresso. O pareamento original assegura a replicação precisa do DNA durante a divisão da célula [2]. A Figura 1.1 ilustra o mecanismo de formação da célula a partir do DNA.

A informação genética contida no DNA deve ser traduzida para a síntese protéica, cujos principais processos envolvidos são transcrição e translação. Na transcrição, o código genético precisa ser transcrito do DNA para uma hélice de RNA, gerando assim um mensageiro (mRNA). O mRNA recém formado inicia a translação em direção ao citoplasma. Nos ribossomos, o mRNA é lido em grupos de trincas de bases de nucleotídeos (códon). O aminoácido adicionado para o crescimento da cadeia do polipeptídeo é ditado por cada sequência de códon no mRNA determinado pelo código genético [1, 2].

Cada aminoácido é trazido para o ribossoma por outra molécula especializada conhecida como RNA de transferência (tRNA). Isto leva à produção de cadeias de

aminoácidos que formam proteínas específicas de acordo com o código indicado no mRNA [1, 2].

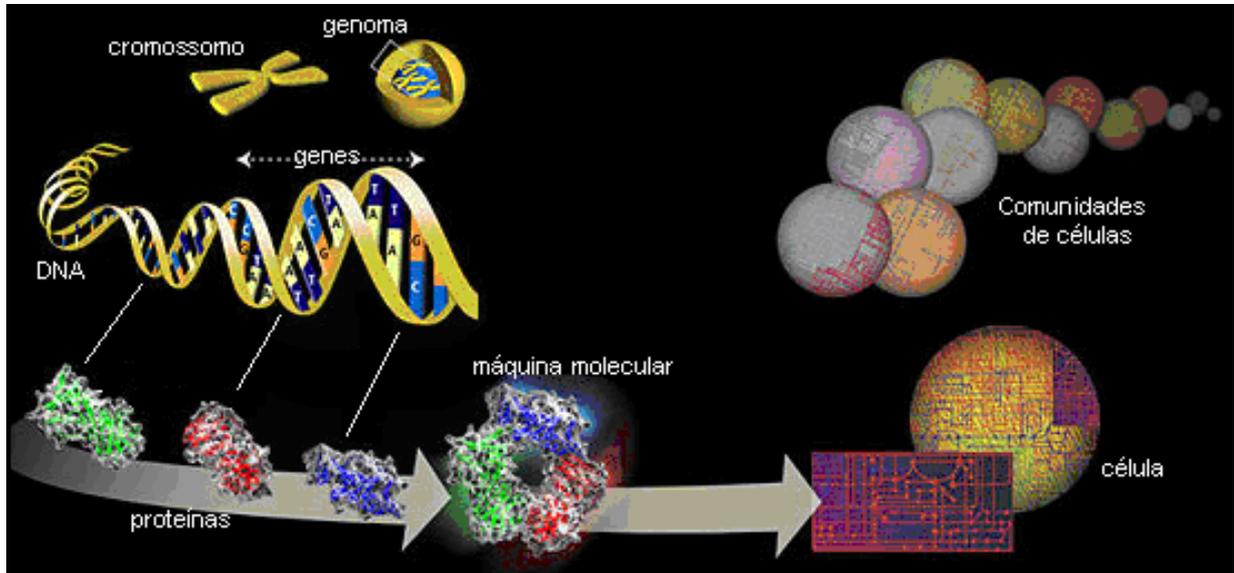


Figura 1.1: Ilustração da síntese proteica para formação das células a partir do DNA. Adaptada de [4].

A sequência de eventos que ocorre ao longo da vida de uma célula, desde seu nascimento até seu desaparecimento através da divisão, dando origem a duas células filhas idênticas como ocorre nas células somáticas do organismo, denomina-se ciclo celular.

O ciclo celular é um conjunto ordenado de eventos, cujo objetivo final é o crescimento celular e sua divisão em duas células-filhas. Apresenta quatro fases: a fase G_1 é onde ocorre aumento da célula e síntese de proteínas para preparação da replicação do DNA. A duplicação do DNA (Figura 1.2) ocorre na fase S (síntese). A fase G_2 compreende o período entre o final da fase S e a mitose, onde ocorre síntese proteica adicional estimulada pela atividade das ciclinas. Na fase M ou mitose propriamente dita, porções iguais de cromossomos e componentes celulares são divididos para as duas novas células filhas [1, 2]. Uma vez ocorrida a duplicação dos genes, a mitose ocorre automaticamente dentro de cerca de uma hora (Figura 1.3) [5].

Com o objetivo de evitar o acúmulo de defeitos genéticos durante a mitose, controles moleculares no núcleo determinam se a divisão celular deve proceder ou ser adiada. Estes controles moleculares incluem: os pontos de checagem e as ciclinas, que monitoram a atividade molecular entre cada estágio do ciclo celular, adiando a progressão se aberrações genéticas ocorrerem [1].

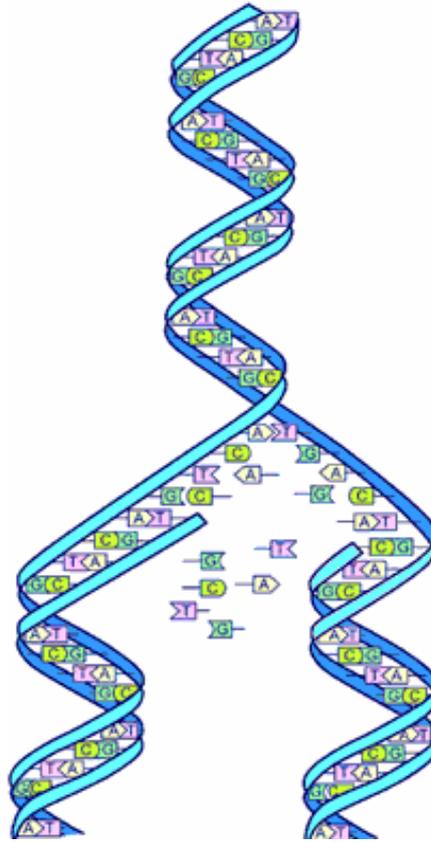


Figura 1.2: A duplicação do DNA [6]

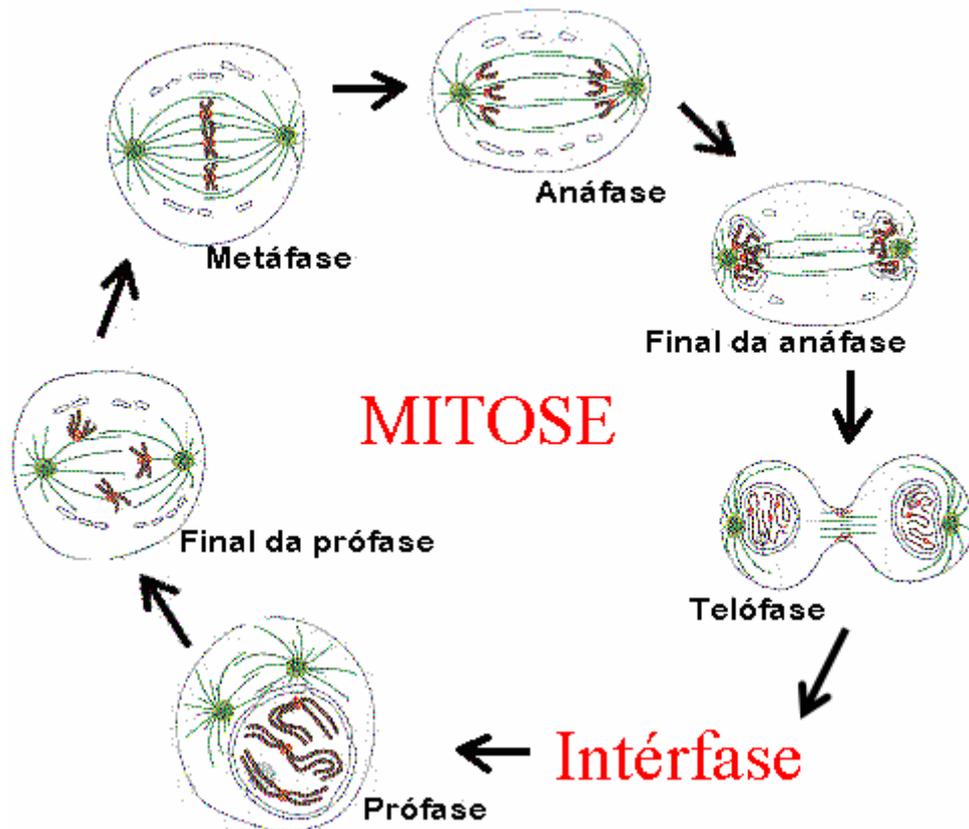


Figura 1.3: As fases da mitose [7].

O sistema de reparo (Figura 1.4) é constituído por enzimas especializadas em reverter as mutações do DNA, seja por correção direta ou por excisão do pedaço errado na hélice e reconstrução. Essas enzimas podem variar ligeiramente em sua eficiência de pessoa para pessoa, pois é uma carga genética. Pessoas com um reparo melhor têm menos chance de desenvolver câncer. Esse é, portanto, o fator genético na tendência maior ou menor para o câncer [6].

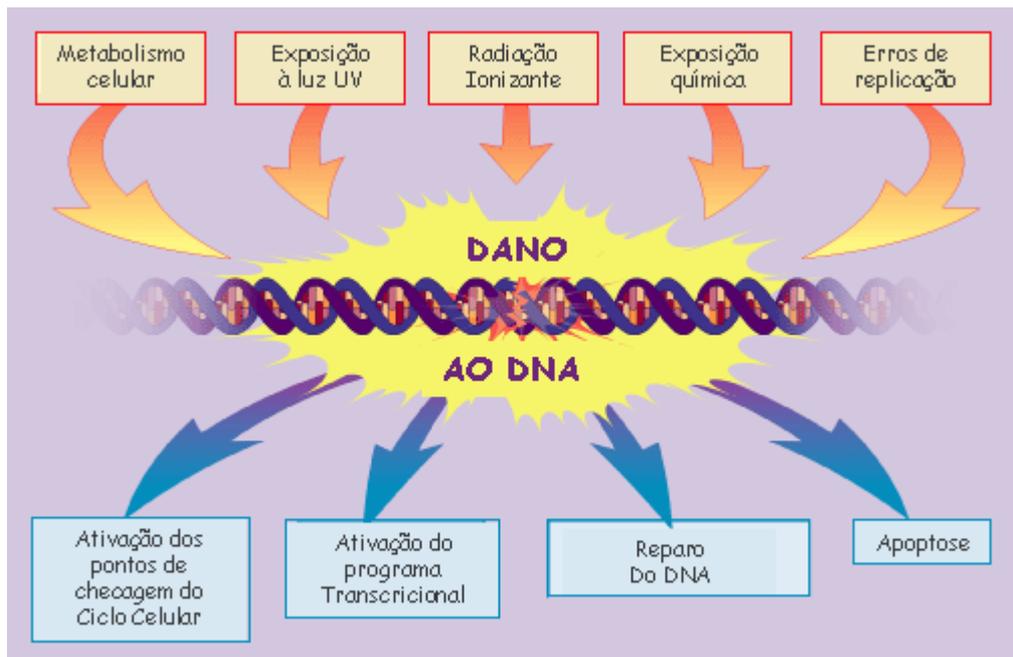


Figura 1.4: Fatores que podem causar dano ao DNA e alternativas para evitar esse dano. Adaptada de [8].

Existem dois importantes pontos de restrição no ciclo celular. O primeiro ocorre durante as fases G_1 e S, onde se inicia a replicação do cromossomo. Disfunções nesta via ocorrem na maioria dos carcinomas humanos. O produto do gene p53, a proteína p53, exerce um papel de guardião nesta fase (Figura 1.5), integrando uma variedade de mensagens intracelulares que permitem o reparo celular ou indução de apoptose. Este gene previne a reprodução de células com aberrações no DNA [1, 2].

O segundo ponto de controle ocorre entre as fases G_2 e M, antes das células iniciarem a divisão mitótica.

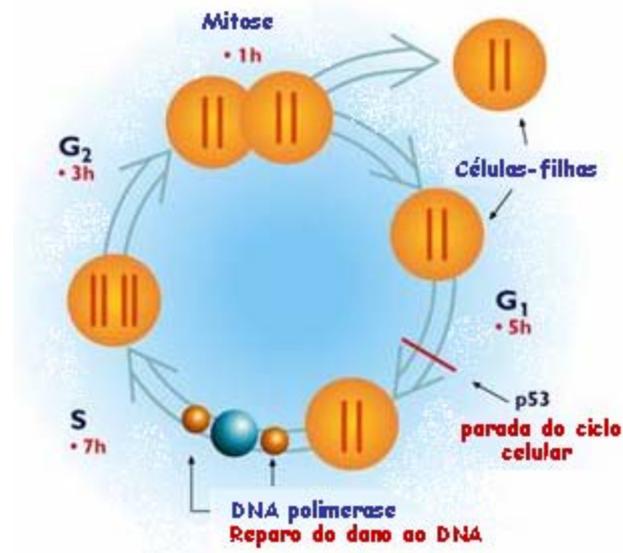


Figura 1.5: p53 e o ciclo celular. Adaptada de [9].

As ciclinas formam os mecanismos responsáveis pela progressão do ciclo celular e são reguladas por um processo complexo de síntese, modificação pós-translacional e degradação programada [2, 10].

A ciclina E tem um papel central na transdução da resposta mitogênica a diversos hormônios, fatores inflamatórios (citocinas) e fatores de crescimento. A hiperexpressão da ciclina E ocasiona a progressão através do ciclo celular. Células tumorais de câncer de mama estimuladas *in vitro* por estrógenos apresentam aumento da ciclina E [10].

Uma célula recentemente formada é ativada por estímulos e sinais externos à membrana celular para crescer e se diferenciar. Estes estímulos incluem fatores de crescimento, citocinas e receptores de antígenos. Os fatores de crescimento se ligam à membrana da célula ativando o processo de comunicação entre a superfície da célula e as estruturas e núcleo no interior da célula. A resposta final a este “sinal de transdução” pode ser proliferação celular, morte celular ou uma variedade de outras atividades [1].

As citocinas são proteínas com função mensageira entre as células, influenciam o crescimento e diferenciação de células brancas do sangue (leucócitos) e regulam respostas imune e inflamatória. Receptores de citocinas também usam sinais de transdução como uma ferramenta de comunicação para mediar a proliferação e diferenciação celular.

Os proto-oncogenes são genes promotores do crescimento celular encontrados em células normais. Eles codificam proteínas que respondem a sinais externos, levando à expressão do gene, síntese de DNA, alterações na membrana, contato célula-a-célula e

metabolismo celular. Quando o crescimento celular está completo, o proto-oncogene é “desligado”.

Os oncogenes são uma forma mutante de proto-oncogenes (Figura 1.6). Como a transdução de sinal é iniciada por um estímulo como um fator de crescimento, a proteína oncogênica irá promover a superprodução daquele fator de crescimento, levando a excessivos sinais de crescimento. Os oncogenes também afetam os pontos de checagem durante o ciclo celular, permitindo que células mutantes se dividam, levando a uma divisão celular descontrolada [1].

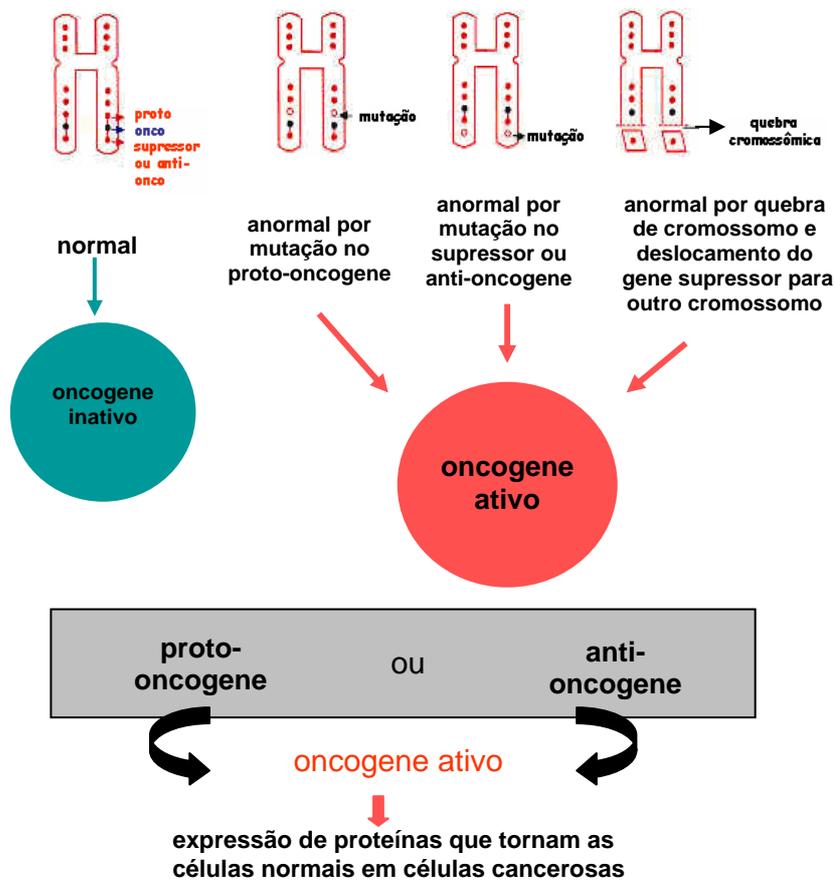


Figura 1.6: Transformação de proto-oncogenes em oncogenes. Adaptada de [11]

Os genes supressores de tumor inibem o desenvolvimento de células cancerosas. O mais conhecido gene supressor de tumor, p53, bloqueia a habilidade de ciclinas estimularem a divisão celular (Figura 1.7). Ele é capaz de detectar mutações irreparáveis e guiar a célula para apoptose. Quando o gene p53 está mutado, sua efetividade como gene supressor de tumor é diminuída e o câncer se desenvolve. Genes p53 mutados são encontrados em aproximadamente 50% dos cânceres e a disfunção da proteína p53 contribui para a tumorigênese e a agressividade do tumor [1, 12]. Outro gene supressor de tumor é BRCA1 (encontrado em câncer familiar de mama e ovário) [1].

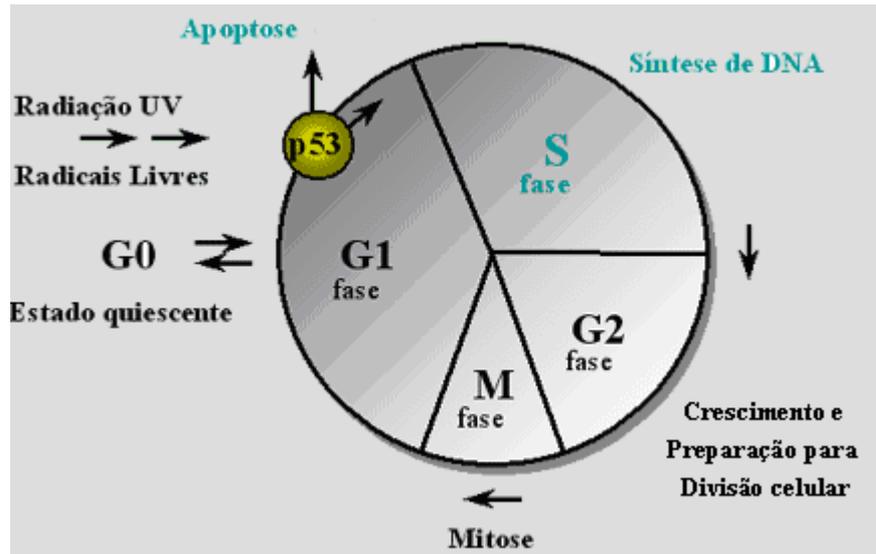


Figura 1.7: Influência do p53 no ciclo celular. Adaptada de [13].

Além dos proto-oncogenes e genes supressores de tumor, genes de reparo de DNA auxiliam no reparo do DNA danificado por agentes ambientais. Quando esses genes são defeituosos, eles permitem que células mutantes se dividam, resultando em células filhas defeituosas [1].

1.2 Câncer: a proliferação celular patológica

Os seres humanos são constituídos por um extenso conjunto de células que atuam como um organismo único, submetendo seu próprio metabolismo interno às necessidades do conjunto. Para que isto ocorra, existe um complexo sistema de comunicação entre as células mediado pela presença de moléculas, cuja interação com as células alvo irá modificar seu comportamento interno, conforme discutido anteriormente.

Apesar de todas as precauções do sistema biológico quanto aos danos ao DNA, uma célula recém-formada ainda conserva características mutantes significativas. A perda dos mecanismos responsáveis pelo controle ordenado da progressão das células através do ciclo celular e replicação fiel do DNA é um evento inicial e fundamental na progressão do câncer [3].

A causa da alteração do genoma é uma mutação de um ou mais genes; ou mutação de um grande segmento de um filamento de DNA contendo muitos genes. Em alguns casos, a adição ou perda de grandes segmentos cromossômicos também pode ser um fator decisivo para a mutação [6].

Os tumores surgem de células normais que sofreram algum dano no seu DNA sem sofrer apoptose. Este dano celular inicial apresenta como alvo genes celulares que regulam o

crescimento como proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes de reparo de DNA ou genes de apoptose. Uma vez ocorrido, fatores adicionais exercem papel na progressão do tumor e na sua diversidade genética [1].

Existem basicamente duas diferenças fundamentais entre as células normais e cancerosas: 1) as células cancerosas não respeitam os limites normais de crescimento celular; 2) as células cancerosas são muito menos aderentes entre si, portanto possuem tendência a migrar pelos tecidos, para atingir a corrente sanguínea e para atingir todas as partes do corpo, onde formam ninhos para os novos crescimentos tumorais. Ainda, o tecido canceroso compete com os tecidos normais pelos nutrientes. Visto que as células cancerosas continuam a proliferar indefinidamente, seu número fica multiplicado dia após dia, conseqüentemente exigirão toda a nutrição disponível, como resultado, os tecidos normais sofrem a morte nutritiva [6].

Em resumo, a base biológica do câncer é o dano ao genoma que resulta em aberrações na expressão dos genes. Variações inter-individuais na experiência do câncer são devido a diferenças na quantidade de dano e/ou na capacidade de reparo ao dano [14].

Denomina-se câncer um conjunto de doenças que apresentam como elementos comuns o surgimento de novos tecidos (ou neoplasias) em determinado órgão ou região, formados por células com duas principais características: elevada atividade proliferativa e capacidade de invasão e colonização de outros órgãos.

A maior parte dos tecidos biológicos apresenta-se em um estado de integridade volumétrica determinado pelo equilíbrio entre o número de células que morrem, em geral através de um processo programado de apoptose, e o surgimento de novas células decorrente da permanente atividade proliferativa.

O equilíbrio tecidual é mantido mediante a ação de mecanismos de controle interno e externo à célula, pode ser temporariamente alterado, observando-se momentos onde a atividade proliferativa pode ser alterada para cumprir ações necessárias à homeostase. Cumprida esta função, observa-se uma regressão deste desequilíbrio ao nível da normalidade.

Na ausência de um comportamento invasivo de suas células, a simples presença de um distúrbio de natureza proliferativa poderá levar ao surgimento de tumores descritos como benignos, os quais irão causar sintomas se forem muito volumosos ou secretarem substâncias biologicamente ativas, como os hormônios. Nestes casos, as células tendem a ser mais parecidas com aquelas que as originaram e as estruturas de adesão entre elas devem ser mais preservadas, mantendo a relativa formatação e integridade do tecido.

Os tumores possuem dois componentes básicos: 1) células neoplásicas que constituem o parênquima e 2) o estroma de suporte, constituído de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. O crescimento e a evolução do tumor dependem do seu tecido de suporte que fornecerá o suporte nutricional e o arcabouço para as células em proliferação.

As células tumorais caracterizam-se por apresentarem diversas alterações morfológicas e funcionais. Os núcleos são desproporcionalmente grandes e apresentam grande número de mitoses. A maioria dos tumores cresce rapidamente, porém a taxa de crescimento apresenta diferentes velocidades dependendo da suficiência do suprimento sanguíneo, hormônios, nível de diferenciação celular. O crescimento dos tumores é acompanhado de infiltração progressiva, invasão e destruição do tecido circundante. Não reconhecem limites anatômicos normais, assim podem se projetar através dos tecidos dificultando a ressecção cirúrgica.

Outra característica específica de tumores malignos é a metástase, um implante tumoral descontínuo em relação ao tumor primário. A oportunidade de disseminação surge com sua penetração pelos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais. Cerca de 30% dos pacientes recém-diagnosticados com tumores sólidos apresentam metástases, o que diminui acentuadamente a possibilidade de cura.

Os tumores resultam da ocorrência de vários fatores independentes em uma célula com efeitos cumulativos. Os fatores ambientais são encontrados no meio ambiente, no local de trabalho, nos alimentos e nas práticas pessoais. Os agentes carcinogênicos podem ser o carcinógeno químico (que causa mudanças locais na sequência de nucleotídeos), a radiação ionizante, como os raios X (que causam quebras cromossômicas e translocações), os vírus (que introduzem DNA estranho na célula), os raios ultravioleta (UV), drogas e o estilo de vida como sedentarismo, alcoolismo, tabagismo, obesidade e a influência dietética [7, 15].

Os carcinomas ocorrem, em sua maioria, nos anos mais tardios de vida, tornando a idade uma importante influência na possibilidade de desenvolver câncer. Os mais jovens e crianças não são poupados, porém ocupam uma parcela menor de casos.

Algumas condições clínicas também são importantes para o desenvolvimento do câncer, como proliferações regenerativas, hiperplásicas e displásicas.

Além de fatores como o ambiente e a idade, a predisposição hereditária é outro forte fator para o desenvolvimento de tumores. Dessa forma, genes de apoptose alterados também podem levar à malignidade, porque a morte celular programada é inibida, permitindo a proliferação de células malignas [1].

Considerando seu aspecto histológico, os tumores malignos podem ser classificados quanto à sua origem do ponto de vista embrionário. Assim sendo, tumores originários do endoderma ou ectoderma são denominados carcinomas, enquanto que aqueles derivados de células do mesoderma são descritos como sarcomas. Embora a maior parte dos tumores seja de natureza sólida, as leucemias representam um tipo especial de sarcoma formado por células individuais mantidas em suspensão no sangue.

1.3 Bases moleculares da regulação da apoptose nas células tumorais

Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. Em 1972, Kerr, Wyllie e Currie sugeriram o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular. A apoptose é um processo essencial de controle celular destinado a eliminar células indesejáveis do hospedeiro através da ativação de uma série coordenada e programada de eventos. A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, durante o desenvolvimento, como um mecanismo homeostático para manter as populações celulares nos tecidos, como um mecanismo de defesa (nas reações imunes), quando as células são lesadas por uma doença ou agentes nocivos, no envelhecimento, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos [1, 2, 15, 16].

A via de regulação da apoptose é inerente à própria célula e é fortemente ativada na presença de oncogenes celulares e virais. Todas as células do organismo parecem possuir a capacidade para apoptose, inclusive as de rápida proliferação – como os leucócitos – e as não proliferativas, como os neurônios [17].

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. As organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear. A seguir, a membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Os prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho e se rompem, originando estruturas que carregam o conteúdo celular. Estas porções celulares envoltas pela membrana celular são denominadas corpúsculos apoptóticos. Os corpúsculos apoptóticos são rapidamente fagocitados por células sadias adjacentes, sejam elas parenquimatosas ou macrófagos e removidos sem causar um

processo inflamatório (Figura 1.8). Outra característica muito marcante da morte por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA, a qual possui um padrão característico. Uma endonuclease é ativada e produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 180 a 200 pares de base [2, 15, 16].

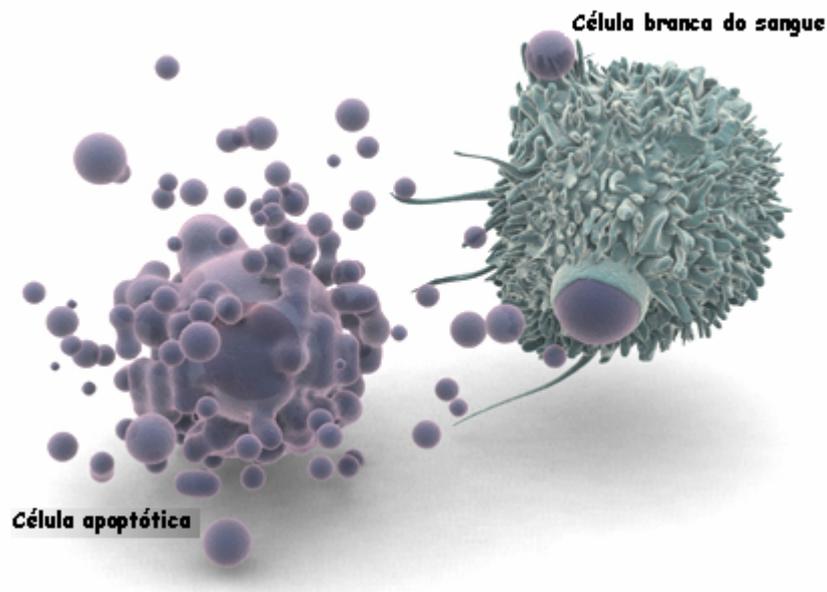


Figura 1.8: Corpúsculos apoptóticos sendo fagocitados por uma célula branca do sangue [18].

A homeostase de uma população de células depende do equilíbrio entre os processos de proliferação e morte celular [17]. A apoptose pode ser ativada por uma variedade de sinais que desencadeiam a morte, desde a ausência de fator do crescimento ou hormônio; uma interação ligante-receptor positiva e agentes lesivos específicos [15].

Dentre todos os novos conhecimentos proporcionados pelos estudos da biologia molecular, um dos mais importantes foi a compreensão de que as células animais dispõem de um mecanismo interno capaz de realizar uma auto destruição de forma fisiológica e programada para ocorrer em resposta a determinadas condições de origem interna ou externa.

Mesmo no indivíduo adulto, a morte celular programada permanece como um mecanismo permanente necessário para complementar a atividade proliferativa tecidual. Estima-se que cerca de 50 a 70 bilhões de células morram a cada dia em consequência da apoptose, equivalendo em um ano à produção e destruição de um volume celular correspondente ao peso total do indivíduo.

Além de ocorrer de forma programada como parte do equilíbrio proliferativo do corpo, o mecanismo da apoptose apresenta uma importante diferença em relação à morte celular “não-programada” resultante de uma lesão tecidual.

No caso da morte por necrose, as células sofrem um processo não controlado de aumento de volume seguido por ruptura da membrana celular. Como consequência, teremos a liberação dos elementos celulares no espaço extracelular, provocando uma resposta inflamatória local e suas consequências.

Na apoptose, o procedimento de desaparecimento da célula ocorre através de uma sequência de eventos intracelulares executado em sua maioria por uma família de enzimas denominadas como caspases, sendo estas assim chamadas por serem proteases compostas por cisteínas e que desempenham a função de destruir proteínas seccionando-as após resíduos de ácido aspártico (c = cisteína, asp = aspartato e ase = enzima).

Uma vez ativadas, as caspases irão desencadear uma cascata de ações enzimáticas com o objetivo de seccionar e destruir os elementos estruturais fundamentais da célula como o citoesqueleto, o envelope nuclear e o próprio DNA. Neste processo de morte “limpa”, a superfície celular sofre alterações que irão permitir sua fagocitose pelas células vizinhas e macrófagos, sem que estes sejam agredidos por seus resíduos.

Como uma ação fisiológica, a apoptose está subordinada a uma série de mecanismos reguladores os quais irão controlar sua ativação ou repressão de acordo com diversas circunstâncias. Embora a apoptose seja um elemento chave na prevenção e ocorrência de tumores, outros agentes de natureza ambiental, farmacológica, infecciosa, entre outros, poderão influir no desencadeamento de estímulos apoptóticos, sendo, no momento, objeto de estudos para a compreensão de diversas doenças.

Os fatores reguladores da apoptose envolvem a família dos Bcl-2, um grupo de proteínas transmembranas, receptores de morte celular (FNT) e proteínas inibidoras da apoptose (IAP).

As proteínas da família Bcl-2 têm por função controlar a ação das caspases, estimulando ou inibindo a ocorrência da apoptose. Estas proteínas podem apresentar ações conflitantes entre si como a proteína Bcl-2 propriamente dita, de função regulatória aparentemente antiapoptótica, e a proteína Bax, identificada com uma atividade pró-apoptótica. Embora em fase de estudos, existem fortes evidências de que a atividade apoptótica de uma célula está relacionada aos níveis de concentração e a atividade destas proteínas e de seus respectivos processos de sinalização intracelular.

A necessidade de responder a estímulos internos e externos para a execução de um processo de morte celular programada requer a existência de alguns receptores específicos para esta finalidade, os quais poderiam ser ativados através de presença de moléculas ligantes ou eventualmente a supressão de alguns agentes tróficos como os fatores de crescimento, por exemplo. Alguns destes receptores já foram identificados, apresentando características bioquímicas que os colocam integrando uma família descrita como fatores de necrose tumoral (FNT).

A descoberta da importante família das caspases levou à identificação de outras proteínas capazes de inibir sua ação apoptótica. Estas proteínas genericamente denominadas IAP, apresentam também uma relevante participação no equilíbrio da atividade proliferativa celular em condições normais e patológicas, como no caso da survivina, recentemente identificada como um potente agente antiapoptótico de valor prognóstico significativo na evolução de alguns tumores malignos.

1.4 Angiogênese: o gatilho proliferativo

Para que uma célula evolua de seu estado normal até assumir as características de uma célula neoplásica é necessária a ocorrência de uma série de mutações envolvendo a ativação de oncogenes e inativação de supressores de tumor, tornando-se insensível aos estímulos apoptóticos. Entretanto, aparentemente isto não é suficiente para que esta célula dê origem a um tumor com volume detectável e capaz de ameaçar a vida do indivíduo. Para que um determinado grupo de células consiga manter um crescimento sustentado é necessário que exista uma fonte de suprimento sanguíneo específico e constante.

No século passado, descobriu-se que os tumores apresentam uma vascularização bastante proeminente em relação aos tecidos normais. A vascularização exacerbada demonstrou ser uma condição essencial para que ocorra o desenvolvimento neoplásico. Este fato se deve ao desenvolvimento de microvasos a partir de células endoteliais pertencentes a capilares situados próximos às células neoplásicas.

A presença de um crescimento vascular aumentado em um tecido tumoral demonstra a existência de um forte estímulo para as células endoteliais, capaz de alterar seu estado proliferativo normal, bem como a natureza local deste estímulo, uma vez que tal proliferação irá ocorrer apenas no segmento adjacente ao surgimento de um diminuto clone de células neoplásicas. A este crescimento vascular localizado denomina-se angiogênese.

Assim, a angiogênese consiste no desenvolvimento de novos vasos sanguíneos em um tecido [21]. É fundamental em muitos processos fisiológicos incluindo desenvolvimento,

reprodução e reparo de feridas [22]. Ao contrário dos processos fisiológicos que são auto-limitados, altamente regulados e controlados no tempo, a angiogênese pode persistir durante meses ou anos e não raro termina espontaneamente em uma variedade de processos patológicos e várias desordens inflamatórias, incluindo doenças como câncer, retinopatia diabética e artrite reumatóide [21-23].

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 (Figura 1.9) [22, 25].

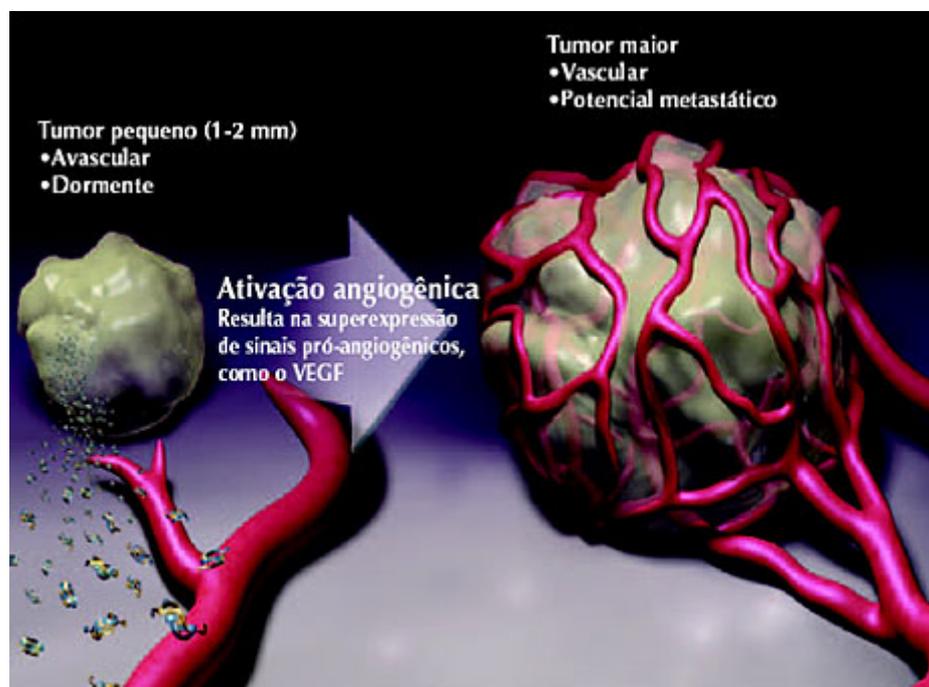


Figura 1.9: Influência da angiogênese no crescimento tumoral [26].

A angiogênese representa um processo fundamental para o desenvolvimento tumoral, pois, além de fornecer aporte nutricional às células neoplásicas proliferantes, também estabelece condições favoráveis à disseminação metastática [21, 24]. A hipóxia (Figura 1.10) é um importante sinalizador para o desencadeamento da liberação de citocinas angiogênicas, assim, influenciando na progressão tumoral e metástase [25].

O aparecimento de atividade angiogênica num tumor é um dos vários estágios de evolução das doenças malignas ou pré-malignas. A angiogênese aumentada, em comparação com tecidos normais, é vista em uma série de condições pré-neoplásicas, incluindo metaplasia, displasia e carcinoma *in situ* do pulmão, carcinoma ductal *in situ* de mama (DCIS) e neoplasia intraepitelial cervical (CIN). A indução da expressão de fatores de crescimento

angiogênicos foram implicados no processo de remodelagem da rede vascular pré-existente e em gerar uma densa rede de microvasos em volta de DCIS [21, 27].

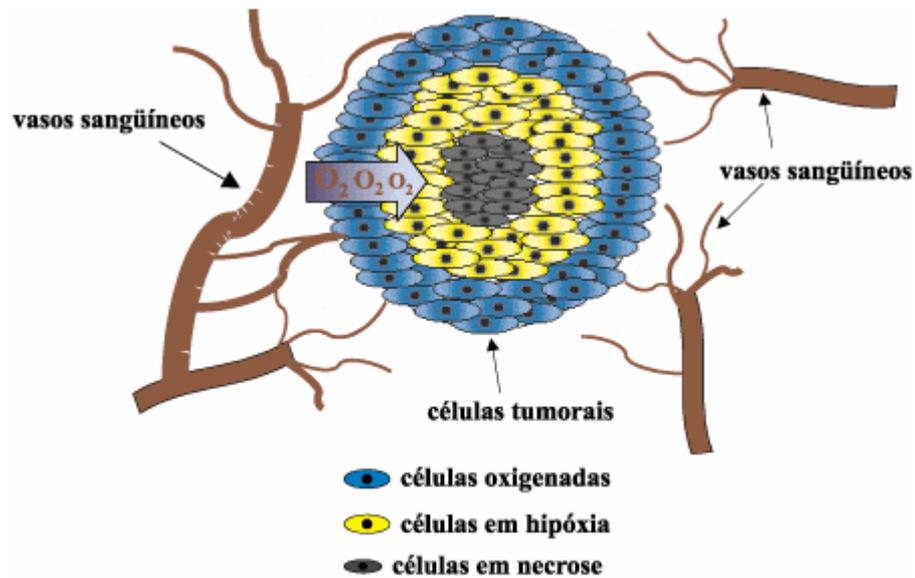


Figura 1.10: Seção transversal de um tumor sólido, mostrando a diminuição da concentração de oxigênio em função da distância capilar [25].

A angiogênese tumoral envolve a interação de células tumorais, células endoteliais, fagócitos 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 [23, 25, 28].

O processo de angiogênese envolve a série de etapas ilustradas na Figura 1.11 [28]. A célula endotelial é comum em todos os tumores sólidos, além de proliferar apenas em condições patológicas. Elas são recrutadas e proliferam pela ação de fatores angiogênicos liberados por células tumorais. A diferenciação do endotélio tumoral em uma rede vascular madura raramente se completa, assim os vasos sanguíneos tumorais exibem uma morfologia anormal: são altamente desorganizados, com paredes relativamente finas e têm diâmetro irregular com menos pericitos de suporte ou 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 pro-angiogênicos e citocinas inflamatórias [25].

O processo de progressão de uma célula normal para a malignidade envolve, dentre muitos mecanismos, a capacidade de estimular a angiogênese, através do aumento da secreção de fatores vaso-indutores e diminuição dos inibidores.

Na angiogênese tumoral, não há um equilíbrio entre seus fatores inibidores e promotores [29, 30]. Um dos fatores inibidores da angiogênese mais estudado é a

trombospondina, produzida por fibroblastos humanos sob controle do gene supressor tumoral p53 [21].

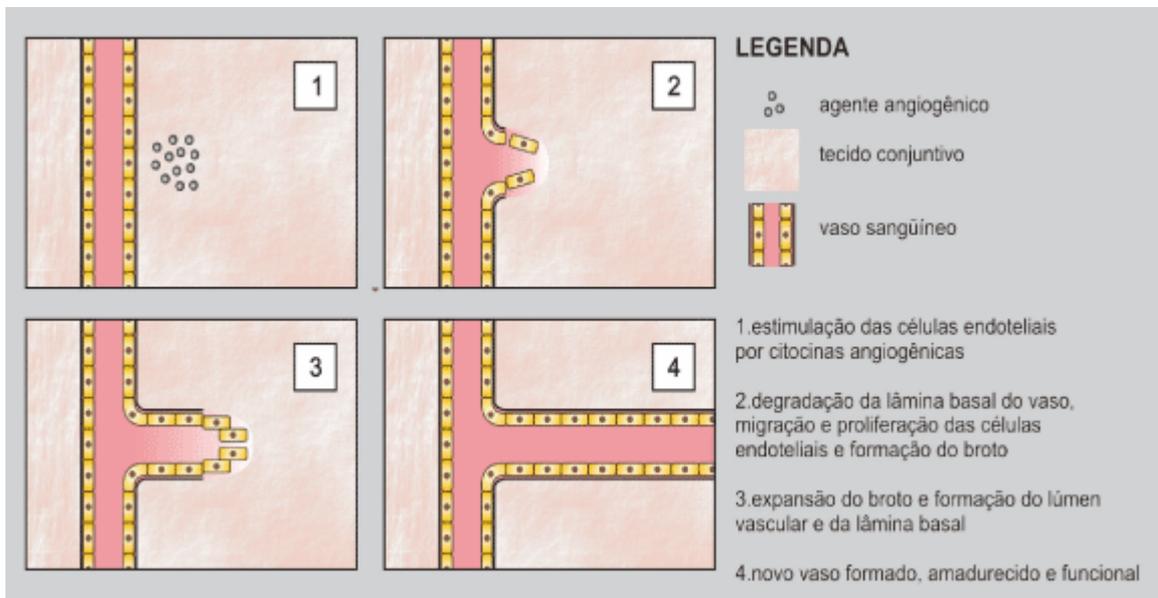


Figura 1.11: Representação esquemática da angiogênese [28]

Os fatores promotores positivos da angiogênese podem se dividir, esquematicamente, em dois grandes subgrupos: os fatores de crescimento e as citocinas. Dentre os fatores de crescimento, salientam-se o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), os membros da família do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e fator de crescimento celular endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), os quais são liberados pelas células tumorais e tidos como estimuladores da proliferação, invasão e atividade quimiotática endotelial em carcinomas. Dentre as citocinas, realce para a interleucina 6 (IL-6) e a interleucina 8 (IL-8) [21, 22, 24].

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é o mais potente indutor de angiogênese e há quatro receptores VEGF (VEGFR). Esses receptores são expressos por células endoteliais e não por células tumorais [24, 32]. O fator de crescimento vascular endotelial-A (VEGF-A) é a mais potente proteína pró-angiogênica já descrita. Ela induz proliferação, germinação e formação de tubos de células endoteliais. O fator de crescimento VEGF-A é expresso em praticamente todos os tumores sólidos estudados [22].

A angiogênese é mediada principalmente por VEGF em condições hipóxicas devido à progressão do tumor, além de baixo pH dentro do tumor, hipoglicemia, estresse e inflamação induzida pela proliferação do tumor [30]. Sinais mitogênicos, de sobrevivência celular e inflamatórios desempenham um papel essencial na síntese e secreção de fatores angiogênicos

por células tumorais [25, 30]. Esse processo ocorre via ativação de receptor tirosina quinase (TKRs), levando à fosforilação de importantes moléculas sinalizadoras e causando a expressão de VEGF nas células tumorais (Figura 1.12).

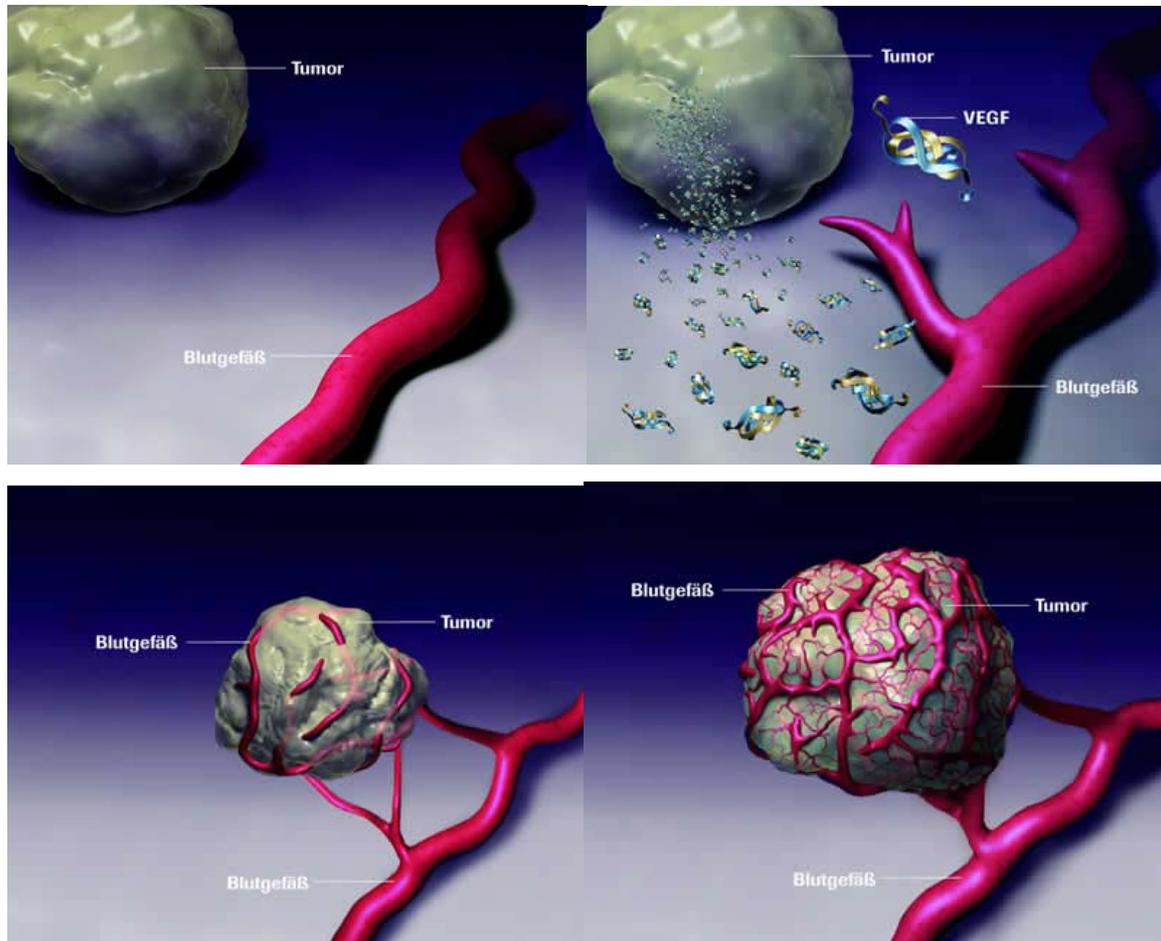


Figura 1.12: Progressão da angiogênese e crescimento tumoral [31].

O fenótipo do tumor angiogênico é caracterizado pela alta densidade de microvasos, elevados níveis de VEGF e está relacionado a um prognóstico pobre [30]. O fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e seu receptor (PDGFR) convertem sinais que dirigem crescimento celular, divisão e migração. Atividade aumentada de PDGF/PDGFR é requerida para angiogênese e pode ser oncogênica. O receptor ligante de PDGF é conhecido em ativar tirosina quinase intracelular, levando a autofosforilação do domínio citoplasmático do receptor assim como fosforilação de outros substratos intracelulares. PDGF foi identificado como um potente fator de crescimento para sarcomas. Além disso, os cânceres de mama são conhecidos por expressarem PDGF.

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF), especialmente o bFGF, são uns dos fatores angiogênicos melhores caracterizados e mais potentes. Recentemente, outro receptor

da família tirosina quinase, receptores TIE-1 e TIE-2, foram encontrados estarem criticamente envolvidos na angiogênese.

O produto do gene supressor de tumor Von Hippel-Lindau (VHL) exerce um papel crítico na ativação do fator alfa-1 indutor de hipóxia (HIF-1 α) que pode levar a um novo entendimento do mecanismo de neovascularização induzido por hipóxia.

Pouco se sabe sobre a relação entre a especificidade dos fatores angiogênicos e o tipo de tumor. Em cânceres humanos, a superexpressão de VEGF está ligada à superexpressão de COX-2 e, dessa forma, angiogênese tumoral e produção de prostaglandina (PG).

A inflamação é um dos mais importantes processos em mediar angiogênese. Nesse sentido, citocinas inflamatórias/angiogênicas secretadas pelos leucócitos, como neutrófilos, mastócitos e macrófagos, exercem papel crucial na neo-angiogênese e remodelação vascular. Sinais inflamatórios regulam a expressão e secreção de vários agentes angiogênicos. A COX-2 é uma das moléculas angiogênicas inflamatórias secretadas pelas células tumorais que influenciam o crescimento e desenvolvimento vascular do tumor e metástase. A atividade aumentada de COX-2 produz excessiva quantidade de prostaglandinas (PGs). As PGs contribuem para o crescimento do tumor por induzir a formação de novos vasos sanguíneos que fornecem viabilidade celular e crescimento do tumor. A indução de COX-2 foi relatada em numerosos tumores sólidos (cólon, próstata, pulmão, mama, pâncreas, pele, cabeça e pescoço), mas não em tecidos normais correspondentes. A COX-2 foi detectada em células tumorais, vascularização tumoral e capilares adjacentes pré-existentes. Enquanto os vasos normais expressam a enzima COX-1, as novas células angiogênicas endoteliais expressam a COX-2 [23, 25, 32].

A produção de VEGF e outros fatores angiogênicos põe em ação uma cascata de sinais intermediários, fatores de transcrição e regulação, e entre as prostaglandinas produzidas por ciclo-oxigenases (COX), a isoforma COX-2 [21].

A regulação de VEGF induzido por hipóxia pode ser mediada pela COX-2. Em condições hipóxicas, a superexpressão de COX-2 induz a expressão de VEGF pela modulação de HIF-1 α . Foi demonstrado que PGE₂ induz translocação de HIF-1 α para dentro do núcleo e induz VEGF. Assim PGs podem induzir angiogênese tumoral e mais especificamente são importantes reguladores de crescimento por estimularem proliferação celular em ratos e humanos (PGE₂ e PGE_{2a}) [23].

Vários estudos sugerem que a enzima COX-2 pode ser uma importante ligação regulatória entre a progressão do tumor e os fatores tumorigênicos sendo a inibição terapêutica da angiogênese para o controle e prevenção do câncer alvo de intensa pesquisa. A

inibição de COX-2 tem se tornado um campo de especial interesse na prevenção e regressão de tumores em desenvolvimento [23, 26, 32].

A vascularidade tumoral é um forte indicador de sua agressividade biológica, especialmente em câncer de mama, e está significativamente correlacionado com o grau clínico e histológico do carcinoma (Figura 1.13). O uso de inibidores de angiogênese é apropriado no início dos estágios da doença, especialmente em pacientes com prognóstico pobre, melhorando a sobrevivência e a qualidade de vida [23].

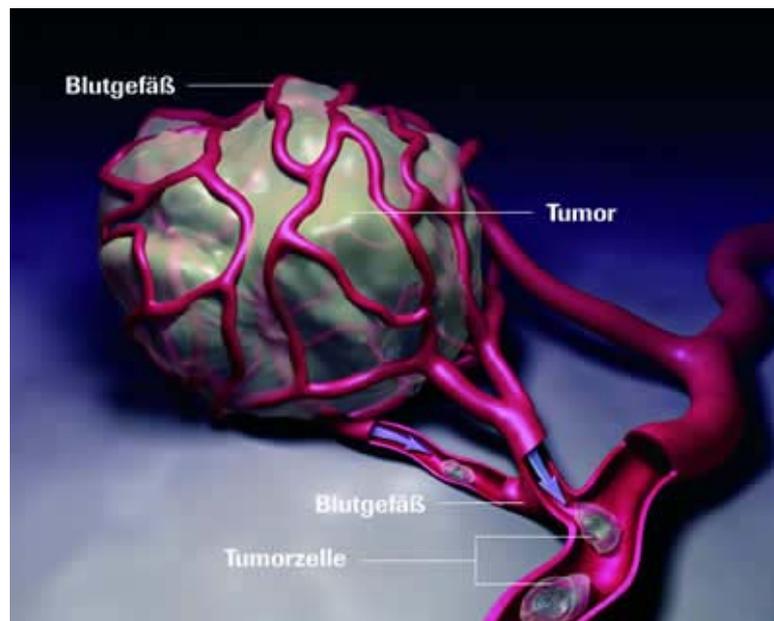


Figura 1.13: Metastatização do tumor através dos vasos sanguíneos [33].

1.5 Referências bibliográficas

- [1] Mautner, B.; HUANG, D. Molecular Biology and Immunology. *Seminars in Oncology Nursing*, v. 19, n. 3 , p. 154-161, 2003.
- [2] Rieger, P. T. The Biology of Cancer Genetics. *Seminars in Oncology Nursing*, v. 20, n. 3, p. 145-154, 2004.
- [3] Disponível em: <<http://www.geocities.com/CapeCanaveral/Lab/6969/biomol.htm>>. Acesso em 09 outubro 2007.
- [4] Disponível em: <http://143.107.180.237/cbme/var/news_site/storage/images/imagens/biologia__1/citologia__1/genoma/5652-1-por-BR/genoma.jpg>. Acesso em 09 outubro 2007.
- [5] Guyton, A. C. *Fisiologia Humana*. Sétima Edição, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1992.
- [6] Disponível em: <<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/08/Dna-split.png>>. Acesso em 09 outubro 2007.

- [7] Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Watson, J. D. *Biologia Molecular da Célula*. 3ª ed., Artmédicas, Porto Alegre, 1997.
- [8] Disponível em: <http://www.rndsystems.com/DAM_public/5174.gif>. Acesso 12 dezembro 2007.
- [9] Disponível em: <<http://www.icb.ufmg.br/prodabi/grupo1/ciclo.html>>. Acesso: 11 dezembro 2007.
- [10] Marques, R.; Buzaid, A. C. Ciclina E e Câncer de Mama. *Rev Assoc Med Bras*; v. 50, n. 3, p. 229-251, 2004.
- [11] Disponível em: <www.ciencianews.com.br/cienci2.jpg>. Acesso em 10 outubro 2007.
- [12] Almeida, J. R. C, *et al.* Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n.3, p. 305-316, 2007.
- [13] Disponível em: <http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=8&materia_id=255&materiaver=1>, acessado em 18/02/2008.
- [14] Mathers, J. C. The biological revolution – towards a mechanistic understanding of the impact of diet on cancer risk. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 551, n. 1-2, p. 43-49, 2004.
- [15] Cotran, R. S.; Kumar, V.; Collins, T. Robbins *Patologia Estrutural e Funcional*. 6ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2000.
- [16] Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*; v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
- [17] Louro, I. D.; *et al.* *Genética Molecular do Câncer*. 2ª ed., MSG Produções, São Paulo, 2002.
- [18] Disponível em: <<http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/apoptosismacrophage.jpg>>. Acesso em 20 fevereiro de 2008.
- [19] Krammer, P.H. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. V. 407, p. 789-795, 2000.
- [20] Chung, Y. M.; Bae, Y. S.; LEE, S. Y. Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during Sodium Salicylate-induced apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 34, n. 4, p. 434–442, 2003.
- [21] Disponível em: <<http://www.mni.pt/guia/index.php?file=guia-artigo&cod=56>>, acessado em 03/10/2007.
- [22] Otrrock, Z. K., Mahfouz, R. A. R.; Makarem, J. A.; Shamseddine, A. I. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 39, p. 212-220, 2007.

- [23] Rahman, M. A.; Toi, M. Anti-angiogenic therapy in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 57, p. 463–470, 2003.
- [24] Souza, G. F. M.; Freitas, R. A.; Miranda, J. L. Angiogênese em carcinoma de células escamosas de língua e lábio inferior. *Cienc Odontol Bras.* v. 10, n. 1, p. 12-18, 2007.
- [25] 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
- [26] Disponível em: <http://www.roche.com.br/TherapeuticAreas/Oncologia/anti_vegf/angiogenese_vegf/o_que_angiogenese/o_papel_da_angiogenese_no_cancer/default_PT.htm?freetextitem1page=3>, acessado em 19/02/2008.
- [27] O'Byrne, K.J.; *et al.* The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *European Journal of Câncer.* v. 36, p. 151-169, 2000.
- [28] Silva, T. H. A.; *et al.* Agentes antitumorais inibidores da angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\gamma\beta 3$. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* v.43, n.1, 2007
- [29] Bhat, T. A., Singh, R. P. Tumor angiogenesis – A potential target in cancer chemoprevention. *Food Chem. Toxicol.*, 2007. doi:10.1016/j.fct.2007.08.032.
- [30] Fayette, J.; Soria, J. C.; Armand, J. P. Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment. *European Journal of Cancer.* v. 41, p. 1109–1116, 2005.
- [31] Disponível em: <http://www.roche.com.br/TherapeuticAreas/Oncologia/anti_vegf/angiogenese_vegf/o_que_angiogenese/fatores_reguladores_da_angiogenese/default_PT.htm?freetextitem1page=2>, acessado em 19/02/2008.
- [32] Masferrer, J. F.; Koki, A.; Seibert, K. COX-2 Inhibitors: A New Class of Antiangiogenic Agents *Annals of the New York Academy of Sciences.* v. 889, p.84-86, 1999.
- [33] Disponível em: <www.roche.de/.../images/angiogenese.jpg> acessado em 19/02/2008.

Capítulo 2 - Câncer de mama: um dilema terapêutico na atualidade

2.0 Introdução

As neoplasias mais agressivas são aquelas que possuem elevada taxa de divisão celular, com mudanças profundas no metabolismo energético, para que elas possam atingir um estágio anormal de proliferação. O câncer de mama é provavelmente o mais temido pelas mulheres devido à sua alta frequência e principalmente pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e da própria imagem pessoal. Ele é relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente [1, 2]. No Brasil, o câncer de mama é o que mais causa mortes entre as mulheres, sendo que o número de novos casos esperados para o ano de 2008 é de 49.400 [2].

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda seja diagnosticada em estágios avançados. Na população mundial, a sobrevivência média após cinco anos é de 61%. Os homens também podem desenvolver câncer de mama, porém é raro, constituindo menos de 1% dos casos [2].

2.1 Epidemiologia do câncer de mama

Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, válidas também para o ano de 2009, apontam que ocorrerão 466.730 casos novos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino. São esperados 231.860 casos novos, para o sexo masculino, e 234.870 para o sexo feminino.

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama.

A estimativa para o câncer de mama revelou 49.400 novos casos para 2008. Esperam-se 51 novos casos de câncer de mama a cada 100 mil mulheres (Figura 2.1) [2].

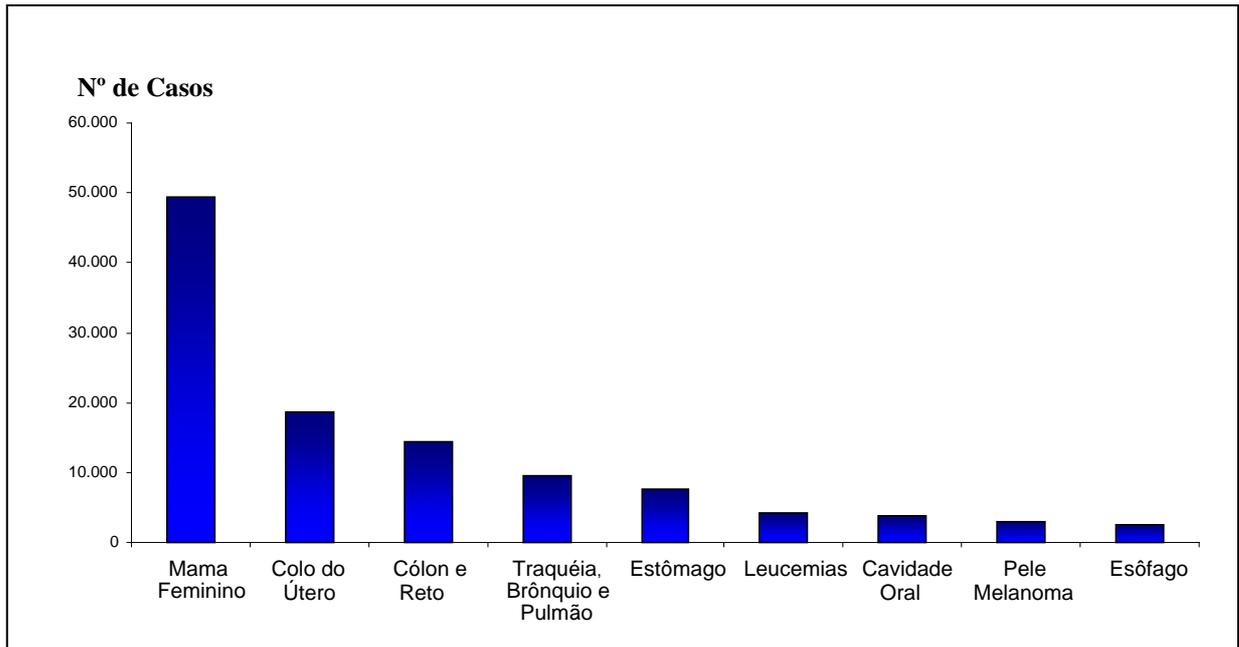


Figura 2.1: Tipos de cânceres mais incidentes estimados para o ano de 2008, em mulheres, no Brasil [2].

Na região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 68 casos novos por 100 mil (Figura 2.2).

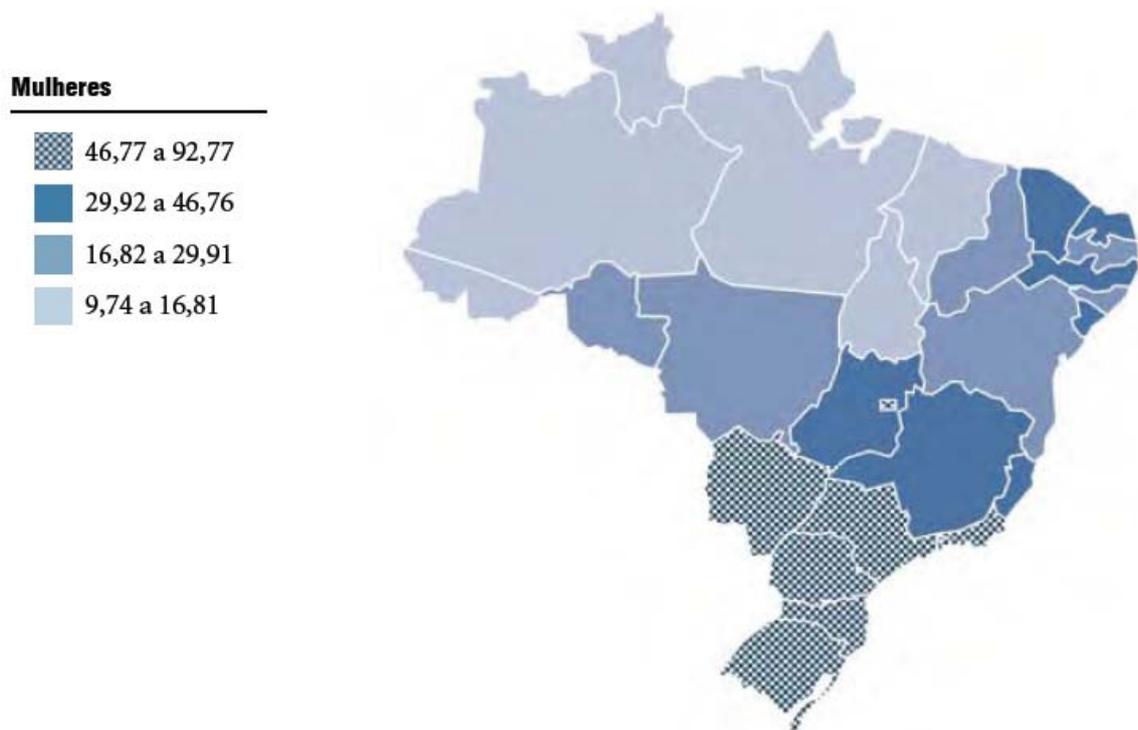


Figura 2.2: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2008, segundo a Unidade da Federação [2].

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (Inca), o câncer precisa ser encarado como um problema de saúde pública, pois se trata de uma doença evitável e prevenível. O crescimento da incidência do câncer está relacionado ao envelhecimento da população. O perfil do câncer no Brasil vem acompanhando o perfil observado em países desenvolvidos. As mudanças refletem o processo de urbanização e a ampliação do acesso à informação [2].

Infelizmente, o Brasil ainda está longe de ser um exemplo em políticas de controle da doença. O Brasil tem incidência parecida com a dos países desenvolvidos, mas política de controle semelhante à dos subdesenvolvidos. “Para se ter uma idéia da magnitude do problema, o número de casos de câncer no país a cada ano é maior do que o número de casos de Aids nos últimos 24 anos”, afirma Luiz Antônio Santini, diretor do Inca [3].

2.2 Anatomia da mama

A mama é composta dos tecidos glandular, ductal, adiposo e fibroso [4], além dos vasos sanguíneos e linfáticos [5]. Estruturalmente a mama é formada por duas porções distintas: parênquima e o estroma mamário. O parênquima é constituído pela porção secretora - glândulas, e um sistema canalicular que se inicia nos alvéolos mamários e termina nos mamilos - ductos. O estroma é constituído por tecido fibroso e adiposo, e é responsável pela consistência característica da mama [6, 7].

Como funções de cada tecido: as glândulas produzem o leite, os ductos ligam as glândulas aos mamilos, o tecido gorduroso circunda as glândulas e os ductos, e os vasos linfáticos conduzem a linfa para os linfonodos localizados nas axilas, acima das clavículas e no tórax [5].

As glândulas mamárias são formadas por 15 a 20 lobos mamários, são em número par, localizadas simetricamente de cada lado do tórax. São suportadas e mantidas na sua posição por um conjunto de ligamentos, os quais se estendem desde o músculo peitoral maior [4] até a pele que as recobre. São ricamente inervadas e vascularizadas, e são envolvidas por tecido adiposo e conjuntivo. A forma, tamanho e consistência variam com a idade, etnia, biótipo e grau de adiposidade [6]. O tecido glandular na mama humana está sob a influência de hormônios, tais como os estrógenos, progestinas e prolactina [8]. A Figura 2.3 ilustra a anatomia da mama humana.

Os ductos mamários formam uma estrutura arborizada, que direciona o leite das glândulas para o mamilo [7]. Cada mama tem na sua porção apical um mamilo com cerca de 6 a 13 mm de comprimento e diâmetro variável e, ao redor do mamilo, encontra-se uma área cutânea pigmentada com 2 a 4 cm de diâmetro denominada de aréola mamária [6].

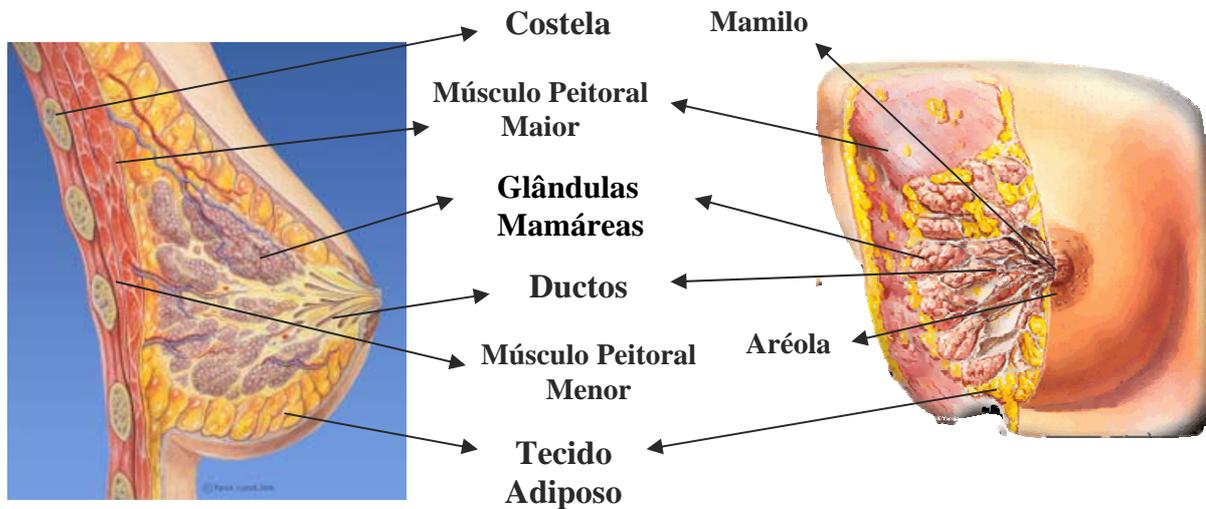


Figura 2.3: Representação lateral e frontal da mama humana [9].

Os homens também possuem glândulas mamárias e mamilos, mas não há produção de leite devido à falta do hormônio feminino estrogênio [8].

2.3 Aspectos gerais do câncer de mama

Segundo dados do Inca, o câncer da mama é a primeira causa de mortes em mulheres no Brasil. Na maioria das vezes, o diagnóstico é estabelecido em uma fase tardia da doença, isso se deve a uma política ineficaz de controle e rastreamento da doença, que tem na mamografia, aliada ao exame clínico das mamas e ao auto-exame, seus instrumentos fundamentais. Apesar do diagnóstico, na maioria das vezes, ainda ser feito em estágios mais avançados da doença, novos métodos para detecção precoce e novas possibilidades de tratamento vêm surgindo, resultando em um aumento da sobrevivência dessas mulheres. Essa melhora da expectativa de vida se contrapõe a uma alteração no estado de saúde global, uma vez que o câncer da mama e os tratamentos propostos causam um grande impacto na vida dessas mulheres [10].

2.3.1 Tipos de cânceres de mama

O carcinoma ductal, originário do epitélio dos ductos mamários, é responsável por cerca de 94% dos cânceres de mama; o carcinoma lobular aparece em aproximadamente 5,5% dos casos e menos de 1% devido a várias outras origens. Geralmente a porção mais superior e lateral da mama contém mais tecido glandular e por isso não se surpreende que mais de 50%

dos cânceres de mama originem-se nessa região. Se a doença se espalha do local de origem, é chamado de carcinoma ductal ou lobular invasivo ou infiltrativo. Se a doença não se espalhou ela é chamada de carcinoma (ductal ou lobular) *in situ*. Os tumores de mama crescem em velocidades diferentes, mas alguns oncologistas estimam que o tumor dobra de tamanho a cada 100 dias [7, 8].

2.3.2 Fatores de risco

De maneira geral, o câncer de mama é resultado da interação bastante complexa de uma gama enorme de fatores. Dentre os fatores de risco mais comuns associados ao câncer de mama encontram-se:

- i. Estilo de vida, que pode aumentar consideravelmente o risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer: terapia de reposição hormonal (hormônios para a menopausa) e/ou método anticoncepcional de elevadas dosagens por período prolongado, bebidas alcoólicas, dieta rica em gorduras e pobre em fibras e vitaminas, obesidade, e exposição a radiações ionizantes em idade inferior a 35 anos [2, 5, 11, 12].
- ii. Idade: o câncer de mama é raro antes dos 25 anos de idade [11] e relativamente raro antes dos 35, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. A média de idade das pacientes diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo de mama foi de 55,5 anos. Alguns estudos apontam para dois tipos de câncer de mama relacionados com a idade: o primeiro tipo ocorre na pré-menopausa e é caracterizado por ser mais agressivo e estrogênio receptor (ER) negativo; o segundo ocorre na pós-menopausa e está associado com características indolentes e principalmente por ser ER positivo [2, 13].
- iii. História ginecológica: menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, primeira gravidez tardia (após 30 anos) [2, 5].
- iv. História familiar: se um ou mais parentes de primeiro grau (mãe ou irmã) foram acometidas antes dos 50 anos de idade [2, 5].
- v. Outras Doenças da Mama: doença proliferativa benigna da mama [2, 5].

2.3.3 Sinais e sintomas

Os sintomas do câncer de mama palpável são o nódulo ou tumor no seio, acompanhado ou não de dor mamária. Podem surgir alterações da coloração superfície ou textura na pele que recobre a mama ou do mamilo, como abaulamentos ou retrações ou um aspecto semelhante a casca de uma laranja; saída de secreção através do mamilo e o aparecimento de nódulos palpáveis na axila [2, 8].

2.3.4 Exames para detecção do câncer de mama

Quando realizado por um médico ou enfermeira treinados, pode detectar tumor de até 1 centímetro, se este for superficial. A sensibilidade desse método varia de 57% a 83% em mulheres com idade entre 50 e 59 anos, e em torno de 71% nas que estão entre 40 e 49 anos [2].

A mamografia (Figura 2.4) é a radiografia da mama que permite a detecção precoce do câncer, por ser capaz de mostrar lesões em fase inicial, muito pequenas (de milímetros). É realizada em um aparelho de raios X apropriado, chamado mamógrafo. Nele, a mama é comprimida de forma a fornecer melhores imagens, e, portanto, melhor capacidade de diagnóstico. A sensibilidade varia de 46% a 88% e depende de fatores tais como: tamanho e localização da lesão, densidade do tecido mamário, qualidade dos recursos técnicos e habilidade de interpretação do radiologista [2].

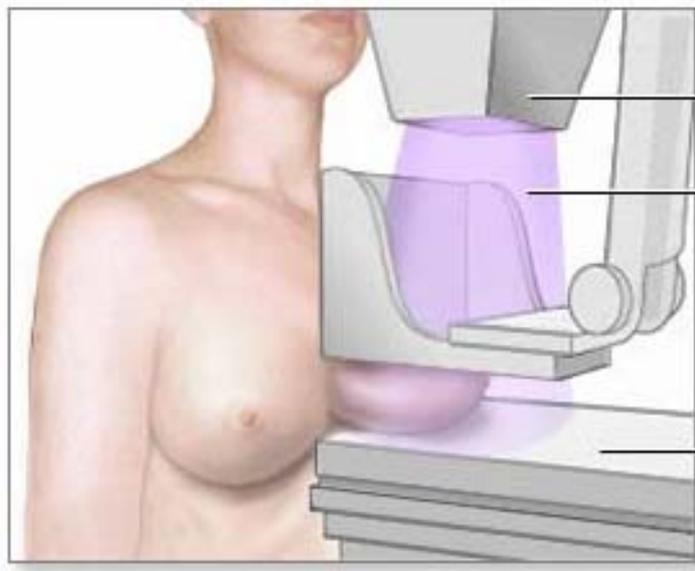


Figura 2.4: Ilustração de uma mamografia [14].

A ressonância magnética nuclear (RMN) é considerada mais confiável do que a mamografia no diagnóstico do câncer de mama. Estudos indicam que o exame de RMN é capaz de detectar tumores contralaterais não encontrados na mamografia em 3,2% das 401 mulheres estudadas. Entretanto, o custo da RMN é cerca de cinco vezes superior ao de uma mamografia [15]. A Figura 2.5 ilustra os resultados clínicos obtidos no exame por mamografia e ressonância magnética nuclear, respectivamente.

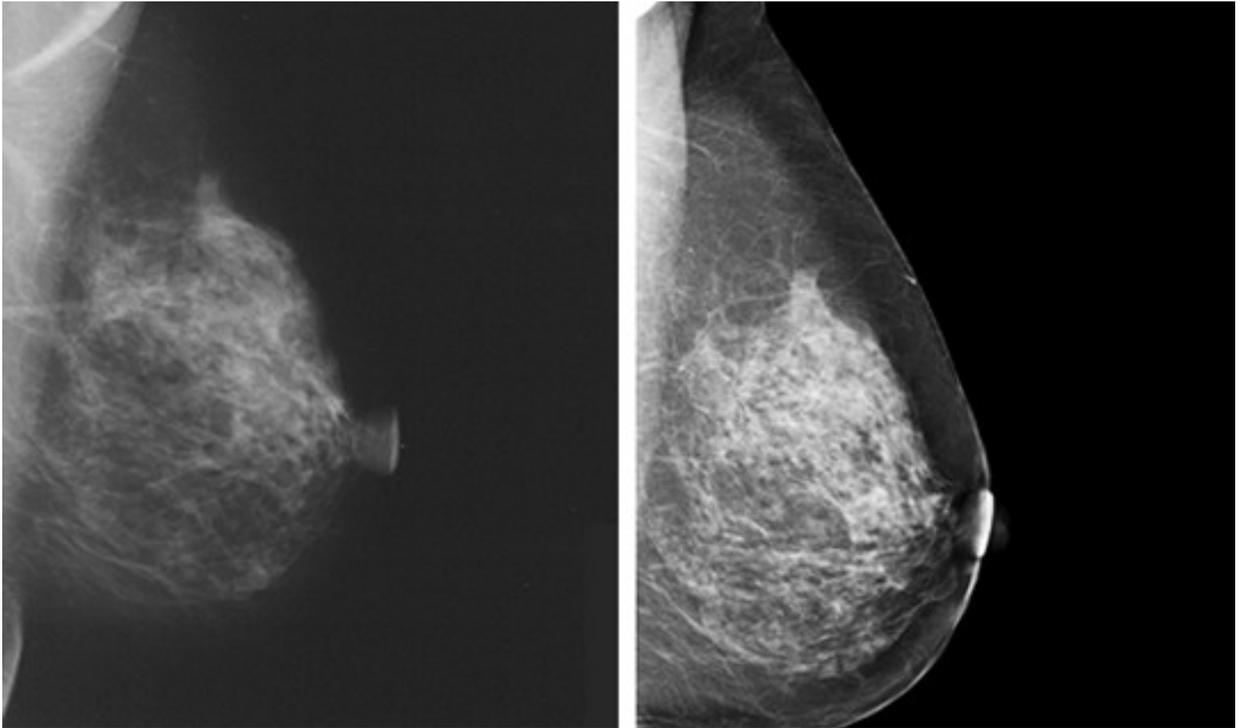


Figura 2.5: Exame clínico da mama por mamografia (esquerda) e ressonância magnética nuclear (direita) [15].

O exame das mamas realizado pela própria mulher mensalmente não substitui o exame físico realizado por profissional de saúde (médico ou enfermeiro). Portanto, não é considerado eficiente para o rastreamento de lesões, mas é importante para o auto-conhecimento de possíveis tumores pela paciente.

Geralmente o câncer de mama metastatiza para os linfonodos axilares, do pescoço ou para aqueles acima da clavícula (supraclaviculares). Os órgãos mais afetados por metástases são a pele, linfonodos distantes, ossos, pulmões, fígado e cérebro [2, 12].

2.3.5 Tratamentos para o câncer de mama

O tratamento para câncer de mama é sempre individual, avaliando a doença do paciente e sua situação pessoal. Mas existem alguns passos comuns no tratamento da doença.

Os tratamentos locais, que se encarregam do controle locoregional da doença, incluem a cirurgia e a radioterapia [11]. A cirurgia para o câncer de mama requer a excisão de qualquer tumor invasivo com margens negativas. O tumor deve ser excisado “em bloco”, com alguns centímetros de tecido normal. Os tipos de cirurgia para remoção do câncer de mama incluem a lumpectomia, mastectomia parcial e mastectomia radical.

Na lumpectomia é realizada a remoção do nódulo de tumor e uma margem de segurança próxima à lesão. A mastectomia parcial é o ato cirúrgico que envolve a remoção do

tumor, uma área de tecido normal e parte a camada acima do músculo onde o tumor estava. Pode ser feita uma dissecação dos linfonodos axilares. Na mastectomia total existe a remoção de toda a mama. Por outro lado, existe ainda a mastectomia radical modificada onde toda a mama, alguns linfonodos axilares e o tecido que recobre o músculo são removidos. A Figura 2.6 ilustra as técnicas cirúrgicas citadas que embora terríveis, salvam vidas.

Uma das complicações da cirurgia para a remoção do câncer de mama é o desenvolvimento de linfedema no membro superior após a dissecação de linfonodos axilares. Além de a paciente sentir-se mutilada pela cirurgia, o linfedema causa alterações físicas, funcionais e emocionais [11].

No Brasil, os estágios III e IV (os mais avançados da doença) chegam a corresponder a cerca de 60% dos diagnósticos iniciais. Neste caso, o número de mastectomias realizadas ainda é muito elevado [10].

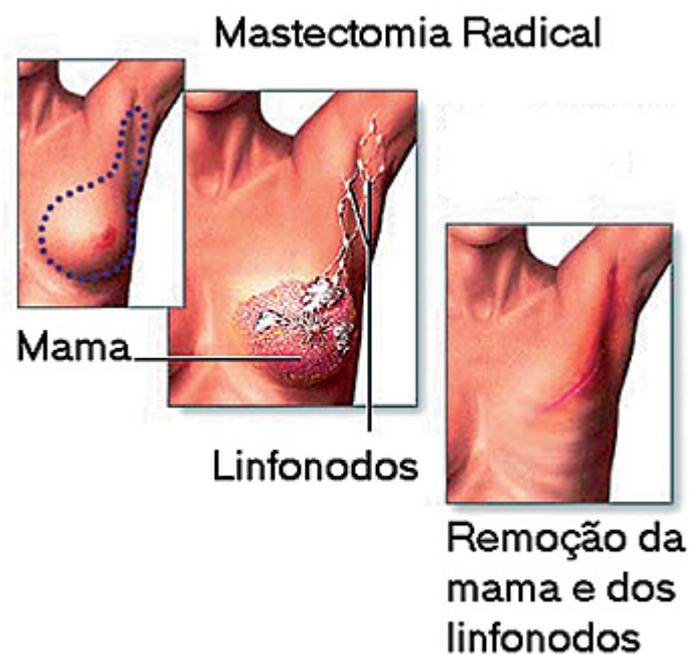


Figura 2.6: Ilustração da Mastectomia Radical [16].

A radioterapia é indicada de maneira regular por algumas semanas após a lumpectomia ou mastectomia com o objetivo de diminuir a recidiva ipsilateral (na mesma mama afetada) [2, 11]. Uma dose alta de radiação é usada e podem ocorrer efeitos colaterais, incluindo fadiga, inchaço e alterações de pele. Algumas vezes a radiação pode ser

administrada antes da cirurgia para que ela reduza o tamanho do tumor e facilite a intervenção cirúrgica (Figura 2.7) [2].



Figura 2.7: Radioterapia [17].

O tratamento sistêmico para o câncer de mama é realizado para diminuir a chance da recidiva à distância, ou seja, metástases. Ele é utilizado para atacar eventuais células microscópicas em pacientes recidivantes. O tratamento sistêmico, que pode melhorar a chance de cura por volta de 30%, é dividido em três componentes: hormonoterapia, quimioterapia e imunoterapia [11].

A terapia hormonal é eficaz somente em pacientes que possuem tumores que expressam os receptores hormonais de estrogênio e/ou progesterona. O benefício é a redução absoluta da mortalidade em mais de 10%. O medicamento mais utilizado é o tamoxifeno, que pode causar ondas de calor, tromboembolismo e tumores de endométrio [11, 18].

Mais recentemente os inibidores de aromatase foram desenvolvidos a exemplos do anastrozol, letrosol e examestano [19].

Anastrozol (Figura 2.8), nome comercial Arimidex®, é um medicamento indicado no tratamento do câncer de mama em mulheres na pós-menopausa por sua ação de inibição da aromatase. É utilizado na terapia adjuvante e no tratamento da metástase. Atua na diminuição da quantidade de estrogênio produzida pelo organismo.

Letrozol, nome comercial Femara®, é um inibidor não-esteroidal da aromatase introduzido para o tratamento adjuvante do câncer de mama receptor positivo. Letrozol bloqueia a produção de estrogênios, sua ação é específica, dessa forma não altera a produção de mineralocorticóides (Figura 2.9).

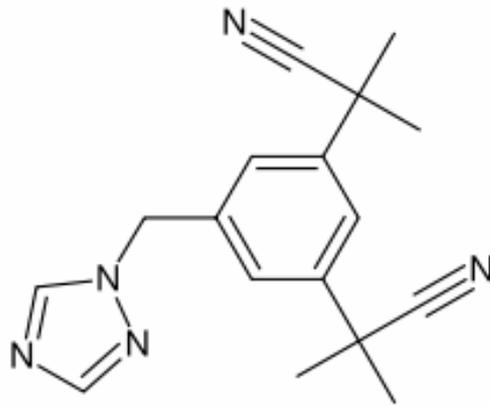


Figura 2.8: Estrutura química do Anastrozol [19].

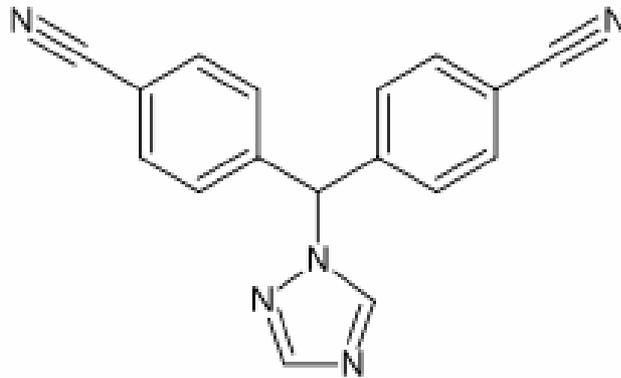


Figura 2.9: Estrutura química do Letrozol [19].

Exemestano (Figura 2.10) é um inibidor oral da aromatase, também conhecido como inativador exclusivo da aromatase, utilizado no tratamento adjuvante do câncer de mama com receptores de estrogênio positivos. Comercializado com o nome Aromasin®.

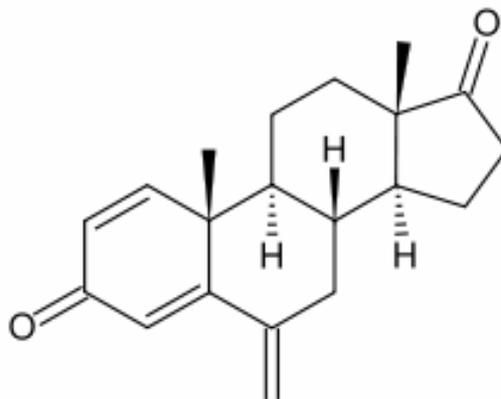


Figura 2.10: Estrutura química do Exemestano [19].

A imunoterapia demonstra benefício em pacientes com tumores de mama metastáticos que hiperexpressam a proteína Her2-neu. Cerca de 20% a 25% dos tumores de mama hiperexpressam essa proteína. Também pode reduzir a recidiva de pacientes tratadas por um ano após a cirurgia [11].

A quimioterapia é a terapia mais indicada para pacientes com alta chance de recidiva, seja pelo tamanho do tumor ou pelo número de linfonodos acometidos, e, principalmente, nas pacientes com receptores hormonais negativos [11]. A quimioterapia tem o objetivo de destruir as células tumorais que podem ter migrado do tumor inicial e estejam circulando pelo organismo [8].

Muitas das substâncias citotóxicas mais potentes atuam em fases específicas do ciclo celular, conseqüentemente, só exercem a sua atividade contra células que se encontram em processos de divisão. Os carcinomas de pulmão, cólon e mama, que apresentam divisão celular relativamente lenta, constituem mais de 90% de todos os tipos de câncer humano. Estes tipos de neoplasias, em geral, respondem pouco aos agentes quimioterápicos e o tratamento curativo é extremamente difícil. Apesar dos avanços na triagem, na cirurgia, na radioterapia, na terapia hormonal e na quimioterapia, a doença metastática permanece incurável e a sobrevida mediana após descoberta de metástases ainda é de apenas dois a três anos [20].

2.4 Quimioterápicos: a necessidade de medicamentos mais eficazes

Os agentes utilizados no tratamento do câncer afetam tanto as células normais como as neoplásicas, porém eles acarretam maior dano às células malignas do que às dos tecidos normais, devido às diferenças quantitativas entre os processos metabólicos dessas duas populações celulares. A maioria das drogas utilizadas na quimioterapia antineoplásica interfere de algum modo no mecanismo de reprodução celular, e a melhor compreensão do ciclo celular normal levou à definição dos mecanismos de ação da maioria das drogas utilizadas atualmente [1, 2].

A grande maioria das pacientes em fase de pré-menopausa abaixo dos 50 anos precisará receber quimioterapia após a extração de um tumor de mama. O tratamento usualmente será de 6 a 8 ciclos de quimioterapia, nos quais dois ou mais quimioterápicos serão combinados. Os ciclos são aplicados a cada 21-28 dias. O tratamento de quimioterapia dura em média 5-6 meses [21].

A quimioterapia aumenta a chance de cura das pacientes cujo câncer atingiu os gânglios linfáticos das axilas, ainda que para casos onde os gânglios não estejam afetados haja

também a indicação do uso da quimioterapia, levando-se em conta outros fatores de risco de recaída [21].

A quimioterapia pode ser administrada pré- (neo-adjuvante) ou pós-operatório (adjuvante), em doentes com câncer de mama em estágios I-III para melhorar a sobrevivência por erradicar micrometástases clinicamente indetectáveis. A quimioterapia é também utilizada para prolongar a vida útil e atenuar ou prevenir sintomas ou complicações e melhorar a qualidade de vida em pacientes com estágio IV de câncer de mama metastático. No entanto, a sobrevivência absoluta em geral é modesta e varia de 2% a 11%. Isto sugere que apenas um pequeno subconjunto dos pacientes realmente se beneficia de quimioterapia adjuvante [22, 23].

A terapia adjuvante com quimioterápico é administrada quando o primeiro tratamento, usualmente a cirurgia, foi capaz de erradicar todo o tumor visível. Apesar do paciente não apresentar evidência de metástases distantes, existe a hipótese dessas micrometástases [24].

Há um crescente interesse na possibilidade de se administrar a terapia adjuvante antes da terapêutica primária. Tal tratamento pode reduzir o tumor primário, tornando o tratamento mais simples e mais eficaz, e pode permitir a erradicação das micrometástases na primeira oportunidade, apresentando assim uma maior probabilidade de êxito [22, 25-27].

Os principais agentes quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer de mama estão divididos em classes de acordo com o mecanismo de ação: Antibióticos Antitumorais, Agentes Alquilantes, Agentes Antimetabólitos e Inibidores de Mitose.

As antraciclina são antibióticos citotóxicos, cujo mecanismo de ação é dado pela inibição da síntese de DNA e RNA por intercalar pares de base na hélice do DNA ou RNA, evitando assim a replicação e o crescimento rápido de células cancerígenas. Eles também criam radicais livres de oxigênio que danificam o DNA e as membranas celulares [19,28].

As antraciclina são e continuarão a ser uma parte efetiva e importante da terapia do câncer de mama, mas o risco de insuficiência cardíaca progressiva após o recebimento de doses acumuladas limita o seu uso e, portanto, a sua efetividade a longo-prazo. Além disso, um estudo evidenciou efeitos trombogênicos da epirrubicina, um exemplo de antraciclina com menores efeitos colaterais, cuja estrutura química está ilustrada na Figura 2.11 e comercializada com os nomes de Rubina® e Farmorrubicina®. Um outro exemplo de antraciclina utilizado também para o tratamento do câncer de mama é a doxorubicina, um estereoisômero da epirrubicina, que pode ser associada com cardiotoxicidade e neutropenia febril, cujo nome comercial é Doxorubicina® e Biorrub® (Figura 2.12) [27, 29-31].

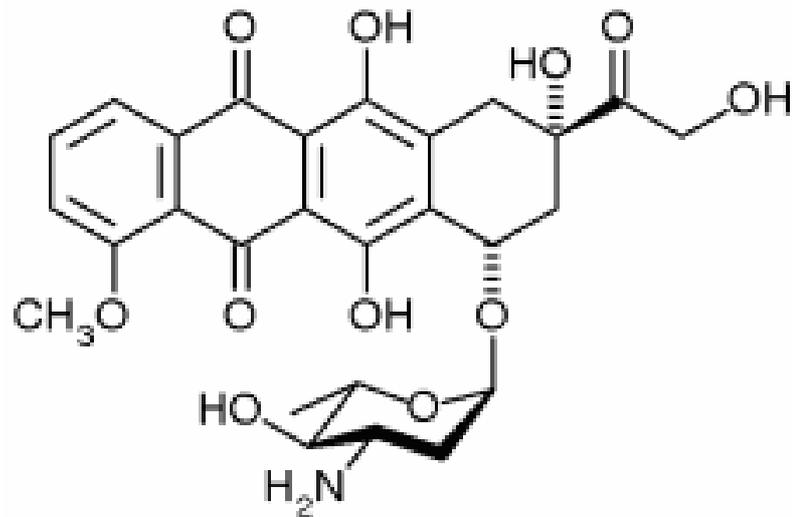


Figura 2.11: Estrutura química da Epirubicina – Antraciclina [19].

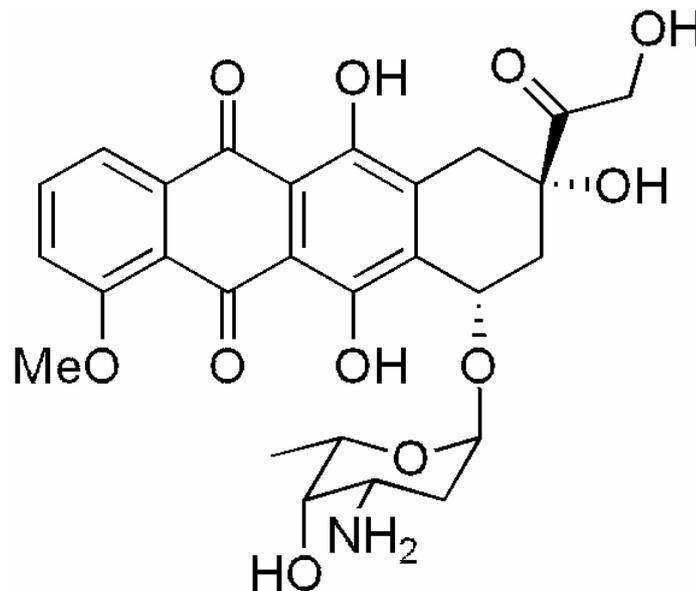


Figura 2.12: Estrutura química da Doxorubicina – Antraciclina [19].

A cisplatina (Figura 2.13) é um agente alquilante. Apresenta, como principais efeitos colaterais a nefrotoxicidade, neurotoxicidade, náusea e vômito, alopecia, distúrbio eletrolítico e ototoxicidade. Também há evidência de efeitos trombogênicos. A cisplatina é comercializada como Cisplatinum®, Cisplatyl®, Platiran®, entre outros [19, 27, 31].

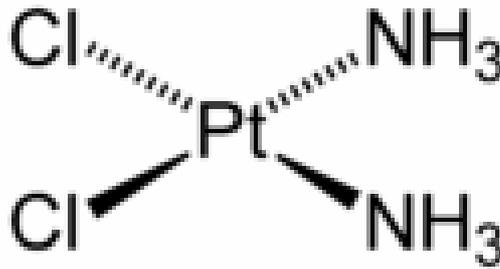


Figura 2.13: Estrutura química da Cisplatina [19].

Dentre os agentes alquilantes, a ciclofosfamida (Figura 2.14) induz a ligação cruzada e/ou a fragmentação das hélices de DNA, impede a divisão celular, é um agente não específico de fase do ciclo celular. Dependendo do estado de saúde da paciente, é contra indicada devido a possível hipersensibilidade e depressão grave da medula óssea. Este fármaco é comercializado com o nome de Cycran® ou Genuxal® [28, 31].

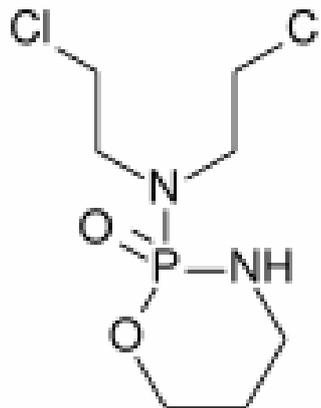


Figura 2.14: Estrutura química da Ciclofosfamida [19].

Dentre os agentes antimetabólicos, a fluorouracila (Figura 2.15) é um análogo das pirimidinas, e seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese de DNA. Este composto é incorporado diretamente nas cadeias de DNA e RNA, perturbando assim o ciclo celular. Como efeitos colaterais, pode apresentar hipersensibilidade, depressão da medula óssea e infecções potencialmente graves. O fluorouracil é o princípio ativo do Utoral®, um agente antimetabólico disponível no mercado [19, 28].

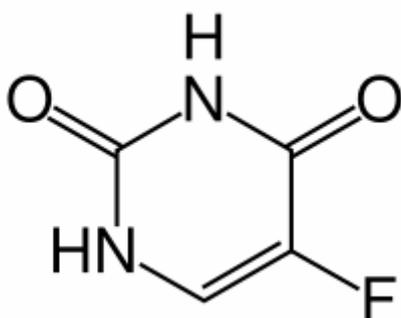


Figura 2.15: Estrutura química da Fluorouracila [19].

O metotrexato também é um agente antimetabólito indutor de quebras cromossômicas na inibição da reprodução celular. É antagonista do ácido fólico e sua estrutura química está ilustrada na Figura 2.16 [19].

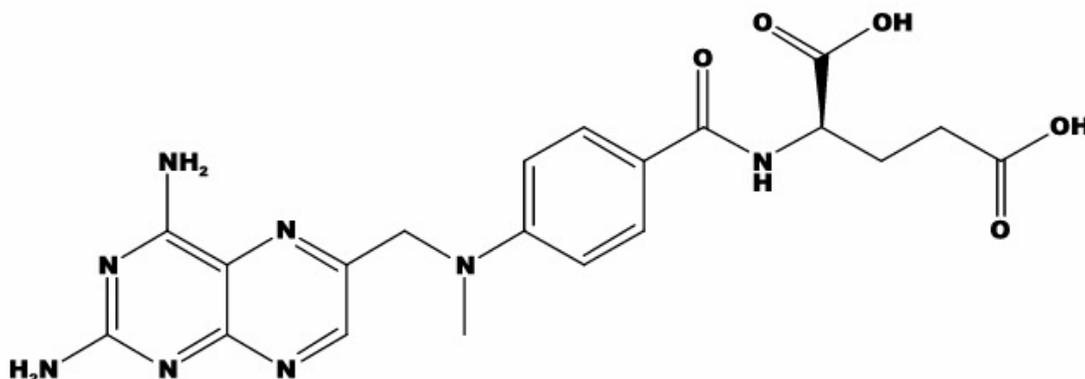


Figura 2.16: Estrutura química do Metotrexato [32]

A capecitabina (Figura 2.17), uma fluoropirimidina oral, tem demonstrado alta atividade e boa tolerabilidade como monoterapia ou em combinação com outros medicamentos sendo este composto classificado como agente antimetabólito [27].

A capecitabina é um pró-fármaco enzimaticamente convertido em 5-fluorouracil diretamente no tumor, onde inibe a síntese DNA e retarda o crescimento do tecido tumoral. A capecitabina é comercializada sob o nome Xeloda® (Roche). Apresenta vantagens em termos de segurança como a inexistência de cardiotoxicidade cumulativa, neutropenia e perda de cabelos. Os eventos adversos constatados mais comuns incluem diarreia, dores abdominais, náusea, estomatite e síndrome mão-pé (eritrodisestesia palmar-plantar) [19, 27, 29].

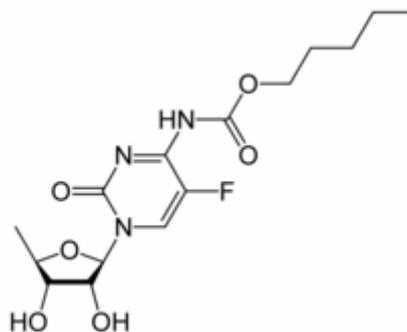


Figura 2.17: Estrutura química da Capecitabina [19].

O paclitaxel (Figura 2.18) é um inibidor de mitose, comercializado como Paclitaxel[®], Paxel[®], Tarvexol[®], Taxol[®] e está indicado no tratamento de carcinoma de mama, após falha da quimioterapia combinada para doença metastática ou recidiva. O mecanismo de ação do paclitaxel consiste na inibição da replicação celular e conduz à inibição de células na fase tardia G2 da mitose. Esse medicamento interfere nos microtúbulos celulares. O equilíbrio entre os microtúbulos é deslocado para a formação de polímeros de tubulina estáveis, e a mitose é perturbada (Figura 2.19).

Esse tipo de quimioterápico mostrou ser efetivo, incluindo completa remissão do tumor em pacientes com carcinoma metastático de mama previamente tratados (taxa de resposta entre 27 e 62%).

Os efeitos colaterais incluem mielossupressão, especialmente neutropenia, além de neurotoxicidade sensorial (com típica dormência, formigamento e dolorosa parestesia nas extremidades), diarreia e alopecia. Também pode aparecer mucosite e reações de hipersensibilidade fatais em alguns casos [33].

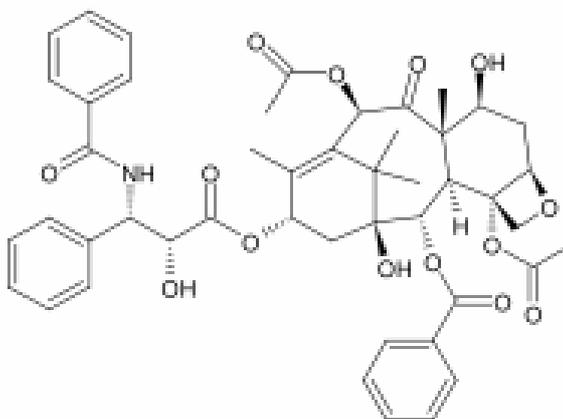


Figura 2.18: Estrutura química do Paclitaxel [19].

Um estudo com 25 pacientes com câncer de mama metastático que receberam infusão de Taxol[®] (paclitaxel) por 21 dias apresentou progressão da doença em apenas 2 pacientes (8%). Outro estudo com 28 pacientes com o mesmo tipo de câncer e a mesma medicação, porém em intervalo de administração diferente, apresentou uma taxa de 62% de resposta, incluindo uma resposta completa. Estudos indicam que pacientes resistentes a antraciclina apresentaram bons resultados com o paclitaxel [33].

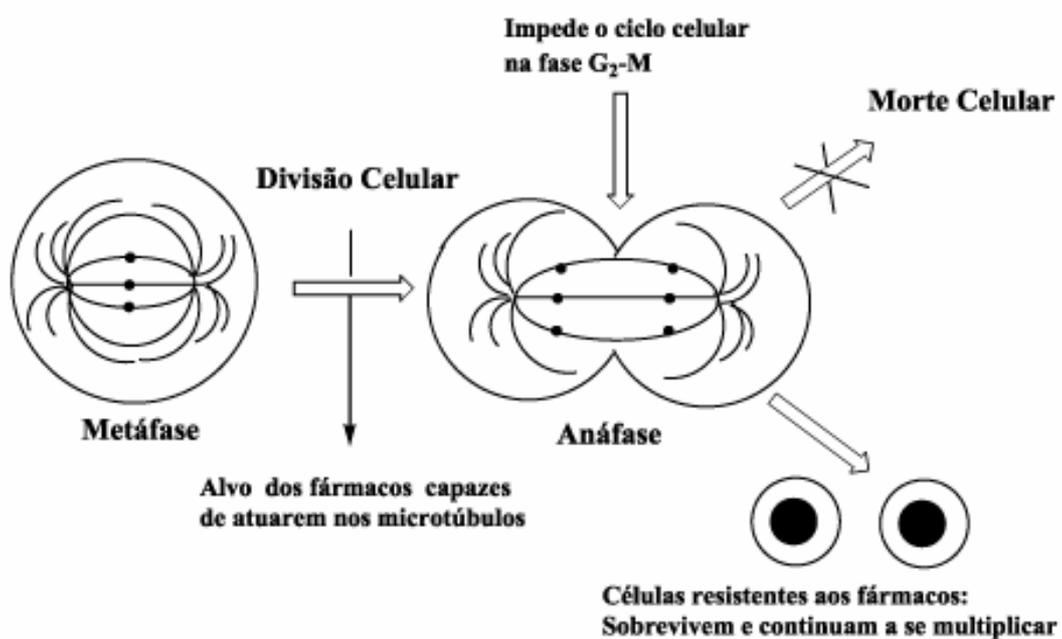


Figura 2.19: Ciclo da divisão celular onde atuam os fármacos capazes de estabilizarem os microtúbulos [34].

O docetaxel (Figura 2.20) é um análogo semi-sintético do paclitaxel, cuja atividade antitumoral deve-se, essencialmente, ao fato de constituir um agente antimetabólico, ou seja, tem capacidade para interromper o processo normal de associação e dissociação dos microtúbulos. O docetaxel liga-se à tubulina livre (subunidade β), promovendo a polimerização da tubulina em microtúbulos estáveis e inibindo a sua dissociação.

Dentre os efeitos colaterais mais conhecidos, pode-se citar diminuição do número de glóbulos vermelhos ou de glóbulos brancos do sangue, queda de cabelo, náuseas, vômitos, mucosites, diarreia e cansaço. O composto é comercializado sob o nome Taxotere[®] [19, 31].

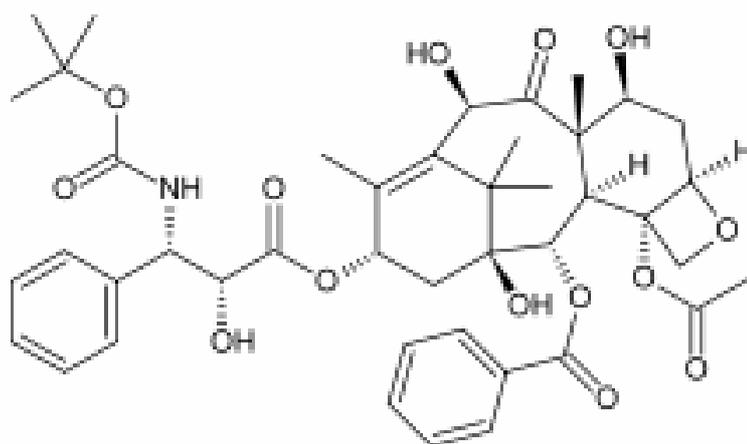


Figura 2.20: Estrutura química do Docetaxel [19].

Estudos sugerem que a combinação de quimioterapia incluindo uma antraciclina (por exemplo, doxorubicina ou epirubicina) pode ser preferível à tradicional combinação terapêutica padrão com ciclofosfamida, metotrexato e fluorouracilo [25].

A combinação de ciclofosfamida, metotrexato e 5-flourouracil utilizado para o tratamento do câncer de mama é aprovada por ser relativamente não-tóxica e, aproximadamente 40-50% dos pacientes respondem ao tratamento com uma duração média de até 18 meses [24].

O padrão adjuvante da quimioterapia em pacientes com câncer de mama em estágio inicial considerados de alto risco para o desenvolvimento da doença recorrente inclui combinações de ciclofosfamida, epirubicina (ou metotrexato) e 5-fluorouracilo [35]. Entretanto, outros pesquisadores afirmam que o esquema quimioterápico deve ser baseado em regimes contendo antraciclinas (Doxorrubicina ou Epirubicina) associadas à Taxanos ou ciclofosfamida e Fluorouracil [26].

Apesar da adição de docetaxel à terapia neo-adjuvante com antraciclina não melhorar a eficiência, a administração seqüencial de antraciclina seguida por docetaxel melhorou a taxa da resposta patológica quando comparada com administração somente de antraciclina [27].

Doses elevadas de quimioterapia foram amplamente aceitas na década de 1990, sendo atualmente abandonadas devido aos graves efeitos colaterais. No entanto, há indicações de que a elevada dose de quimioterapia com agentes alquilantes pode ser eficaz em um subgrupo de cânceres de mama. Uma proporção significativa de pacientes altamente selecionados atingiram sobrevida longa, apesar do diagnóstico da doença em estágio IV. Em 1998, o primeiro estudo sobre doses elevadas de quimioterapia adjuvante foi publicado e não conseguiu mostrar uma vantagem de sobrevivência com este tipo de procedimento [36].

Um estudo recente anunciou que a quimioterapia em altas doses, após a cirurgia, não prolonga a vida das pacientes. Neste caso, 6.200 pacientes foram analisados em um período de 15 anos. As doses muito altas de quimioterapia provaram ser extremamente tóxicas. Segundo o estudo, houve um decréscimo de 13% na taxa de reincidência em pacientes que receberam doses altas de quimioterapia, mas a queda na mortalidade foi de apenas 6%, o que não foi estatisticamente significativo [37].

2.4.1 Efeitos colaterais associados à quimioterapia

Embora o objetivo da quimioterapia seja prevenir ou atenuar os sintomas do câncer, paradoxalmente exerce considerável toxicidade ao paciente. Cada medicamento apresenta suas particularidades quanto aos efeitos colaterais mais expressivos. Os efeitos secundários são dependentes da dosagem, das combinações entre diferentes quimioterápicos e o aspecto mais importante, da intensidade e metabolismo individual de cada medicamento. Entretanto, alguns efeitos colaterais são comuns a vários quimioterápicos e serão descritos a seguir.

A aplicação de tais medicamentos sistêmicos frequentemente provoca graves efeitos adversos agudos, como por exemplo, supressão da medula óssea e mucosite no aparelho digestivo, ou os efeitos adversos que ocorrem mais tarde, por exemplo, neurotoxicidade e cardiomiopatia [35].

Em relação aos problemas cardíacos, podem ocorrer cardiomiopatias, acidente cardíaco congestivo, arritmias cardíacas. A toxicidade no coração é caracterizada por alterações no eletrocardiograma, alteração cardíaca congestiva, alteração ventricular, fibrilação atrial, bloqueio atrial ventricular e taquicardia supraventricular, podendo chegar a infarto agudo do miocárdio e morte.

Quanto à supressão da medula óssea, ocorre redução na contagem de granulócitos, queda da resistência do organismo a infecções e necessidade de antibioticoterapia e internações hospitalares nos casos mais graves, podendo chegar à morte por septicemia. Dentre as complicações hematológicas, pode ocorrer trombocitopenia, anemia, leucopenia, neutropenia e febre, o que pode requerer transfusões sanguíneas e hospitalização [30].

A maioria dos pacientes desenvolve complicação hematológica ou hepática durante o tratamento, que pode ser devido aos agentes citotóxicos usados na quimioterapia ou devido ao processo da doença que envolve órgãos vitais [24].

Em tecidos da mucosa oral, os efeitos citotóxicos e do estado imuno-reprimido podem predispor os doentes a mucosite oral e hemorragia, infecção oral e hipofunção da glândula salivar. O mecanismo celular por trás da hipofunção da glândula salivar induzida por

quimioterapia necessita ser esclarecido. Estas reações adversas são temporárias, as glândulas salivares retornam aos seus valores normais de secreção no prazo de um ano após o tratamento [35].

A quimioterapia resulta no empobrecimento da maturidade dos folículos ovarianos, ocorre oligomenorréia e queda do número de folículos primordiais (menopausa). Como conseqüências da menopausa, pode-se citar fluxos de calor, alterações de humor, aumento de peso e, em longo prazo, redução da densidade mineral do osso. Mulheres abaixo de 40 anos têm uma diminuição significativa na sua qualidade de vida [35, 38].

Pacientes que receberam seis ciclos de CMF (ciclofosfamida/metotrexato/5-fluorouracil) mostraram baixa contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, níveis elevados de substâncias produzidas pelo fígado, como fosfatase alcalina e lactato desidrogenase. No mesmo estudo, foi observado em pacientes de câncer de mama que receberam dose padrão de fluorouracil-epirubicin-ciclofosfamida exibiram uma baixa contagem de plaquetas em comparação com os doentes recém-diagnosticados, além de leucopenia e trombocitopenia. Também ficou constatado que a tolerabilidade e eficácia de quimioterápicos são reduzidas em idosos, em comparação com pacientes mais jovens [24].

Dentre os quimioterápicos, os agentes alquilantes são os mais citotóxicos para induzir amenorréia. O risco é um pouco menor com antraciclinas ou anti-metabólitos. Com a idade de 40 anos, o risco de menopausa com um regime de CMF é de aproximadamente 78%, enquanto que um risco de 38% pode ser observado para um regime FEC (5-fluorouracil/epirubicina/ciclofosfamida). A quimioterapia resultará na perda de uma parte significativa da reserva ovariana e isso explica o fato da menopausa ocorrer mais cedo do que o esperado para todas as mulheres [38].

Dentre os efeitos colaterais encontrados na associação entre epirubicina, cisplatina e capetabina, pode-se citar, como os mais graves, as náuseas e vômitos e os eventos trombogênicos. O estudo relatou episódios de náuseas anormalmente prolongadas e, dentre os 48 pacientes, 4 deles apresentaram trombose venosa, o que levou a dois óbitos [27].

2.4.2 O custo da quimioterapia

Como muitos medicamentos antitumorais novos estão sendo lançados no mercado, a análise econômica na hora de optar por um medicamento é levada em consideração quando o paciente toma uma decisão do tipo de tratamento a ser submetido. Há muitas terapias utilizadas nos estágios avançados da doença, onde o ganho na sobrevivência nem sempre é longo e os custos são cada vez mais elevados.

Também deve ser levado em consideração o tempo de tratamento, que pode variar de um paciente para o outro, e pode durar meses ou anos. Quando ocorre remissão do tumor, o paciente ainda passa por um período de preservação, utilizando medicamentos para prevenir uma recaída ou uma possível metástase. Porém, pode haver recorrência do tumor e o tratamento se reiniciar novamente. Pacientes terminais também precisam de cuidados que vão além dos medicamentos, pois exigem gastos hospitalares, com médicos e/ou enfermeiros domiciliares.

Além do custo dos próprios quimioterápicos, o custo do tratamento dos efeitos colaterais dos quimioterápicos, que podem incluir desde outros medicamentos até internações hospitalares, consultas especializadas e testes laboratoriais.

Não somente deve ser levado em consideração o custo do tratamento para o paciente, como também, o custo para a sociedade, pois o paciente que sofre quimioterapia normalmente não trabalha durante esse período. Os parentes mais próximos do paciente devem cuidar do doente durante todo o período, o que pode significar afastamento temporário do trabalho. Além disso, existem gastos indiretos em relação ao tratamento como o transporte, viagens, acomodações, alimentação especial, dentre outros [30, 39-41].

O Brasil gasta hoje, entre internação hospitalar, quimioterapia e radioterapia, em torno de R\$ 1,2 bilhão de reais por ano, além de gastos com a prevenção. O gasto com o câncer dobrou nos últimos 5 anos devido ao aumento do número de casos, porém sem grande melhorias nos resultados.

2.5 Aspectos psicológicos relativos ao câncer de mama

A mama é a metonímia do feminino e o seu acometimento expõe as pacientes a uma série de questões: o seu posicionamento como mulher, atraente e feminina, ou a mãe que amamenta. O *National Cancer Policy Board* dos Estados Unidos, no ano de 2004, cita algumas dessas questões, como o medo da recorrência, sintomas físicos dos efeitos colaterais, problemas relacionados ao sono, dor, alterações da imagem corporal, disfunção sexual, ansiedade relacionada ao tratamento, pensamentos intrusivos a respeito da doença, sentimentos de vulnerabilidade, incluída a questão da morte. Além disso, as pacientes enfrentam o sofrimento da mutilação, receio do surgimento do linfedema e, até mesmo, sentimentos de desvalorização social [28, 42].

Estudos compararam a relação entre qualidade de vida (QV) e pacientes que sofreram o tratamento conservador ou a mastectomia total. As pacientes que se submeteram ao tratamento conservador evidenciaram uma melhor QV. As pacientes que sofreram

mastectomia total se sentiam menos atraentes devido à sua aparência geral, à cicatriz, tinham limitações no trabalho, no lazer e em outras atividades do dia-a-dia. Mesmo em mulheres com mais de 70 anos de idade, houve a perda na QV, pois elas não se sentiam “inteiras” e propensas às suas atividades habituais [28].

As prioridades individuais variam com a idade e os diferentes momentos da vida, desde modo, estudos verificaram que mulheres mais velhas apresentam melhores resultados quanto à QV, porque essas valorizam menos a mama e a feminilidade. As mulheres casadas apresentaram melhor qualidade de vida global que as mulheres solteiras. As mulheres mais jovens têm maior dificuldade de adaptação após os tratamentos do câncer de mama [42].

Mulheres submetidas à terapia sistêmica, como quimioterapia, apresentam piores níveis de qualidade de vida global, saúde geral, função física e social, devido aos graves efeitos colaterais que essa terapia induz.

Em relação às classes sociais, mulheres com maior escolaridade apresentaram melhor função física, emocional, menos dor e sintomas na mama, em relação a mulheres com baixa escolaridade. Além disso, alterações psicológicas como depressão em pacientes de menores condições financeiras foram associadas com a preocupação econômica em relação à qualidade do tratamento recebido [11].

A chegada de novas terapias, equipamentos e medicamentos somados ao envelhecimento da população são apontados como fatores que terão grande impacto nos custos do tratamento do câncer nos próximos anos. Tanto para o setor público como para o segmento de saúde privada. Um estudo baseado em dados de usuários de um plano de saúde privado estimou que, entre 2008 e 2010, o tratamento do câncer em estágios avançados será quase oito vezes mais caro do que se esses mesmos pacientes tivessem detectado a doença na fase inicial. Para o mesmo período, as projeções indicam que os custos de tratamento serão sete vezes maiores do que as despesas com ações de prevenção [24].

Devido ao alto custo dos tratamentos hoje existentes e aos problemas decorrentes destes, como efeitos colaterais e mutilações, existe uma grande necessidade de busca por medicamentos menos dispendiosos, mais eficientes e com menores efeitos colaterais.

A quimioterapia sistêmica é um componente integral da estratégia do tratamento de mulheres com câncer de mama e conta com melhorias significativas na mortalidade por esta doença. As decisões sobre essa terapia estão cada vez mais complexas com o advento de novas estratégias terapêuticas, uma crescente produção literária sobre a biologia molecular e história natural do câncer de mama, bem como avanços nas técnicas terapêuticas e detecção precoce. Em última análise, o risco-benefício continuará a evoluir em resposta a estes avanços

médicos e em breve será capaz de se adequar recomendações de tratamento à biologia individual do câncer e às necessidades do indivíduo afetado.

Com o objetivo de equilibrar as vantagens e os efeitos colaterais da quimioterapia, um medicamento com mais de 100 anos de comprovada eficiência e eficaz para o tratamento de uma grande variedade de doenças está sendo alvo de estudos. O ácido acetilsalicílico (AAS) é um dos medicamentos contra a dor mais seguros do mundo e menos dispendioso. Um sucesso significativo foi conseguido na área da quimioprevenção com o uso da aspirina e de outras drogas antiinflamatórias não esteroidais (AINEs) para prevenir neoplasia coloretal. O uso desses medicamentos também foi associado a uma diminuição no risco do câncer de mama.

A melhor compreensão do mecanismo de ação do AAS em relação ao câncer e em seus vários estágios será discutida no capítulo seguinte.

2.6 Referências bibliográficas

- [1] Meira, D. D. Avaliação dos efeitos do clotrimazol em células MCF-7 de carcinoma mamário humano – Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Faculdade de Farmácia, 2005.
- [2] Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso 04 janeiro 2008.
- [3] Disponível em: <http://www.agencia.fapesp.br/boletim_dentro.php?id=8063>. Acesso 29 novembro 2007.
- [4] Disponível em: <<http://www.mentorcorp.com/global-pt/breast-reconstruction/mastectomy-anatomy.htm>>. Acesso 27 novembro 2007.
- [5] Disponível em: <http://www.ministeriosdamulher.org.br/projeto_um-toque-de-vida.html>. Acesso 27 novembro 2007.
- [6] Disponível em: <<http://www.esebb.pt/~franco/especialidade/Anatomofisiologia.pdf>>. Acesso 27 novembro 2007.
- [7] Disponível em: <<http://www.geocities.com/HotSprings/1613/mamograf.htm>>. Acesso 27 novembro 2007.
- [8] Disponível em: <<http://www.andre.sasse.com/mama.htm>>. Acesso 17 maio 2007.
- [9] Disponível em: <<http://www.wikipedia.org/wiki/breast>>. Acesso 05 julho 2007.
- [10] Makluf, A. S. D.; *et al.* Avaliação da qualidade de vida em mulheres com câncer da mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 52(1), p. 49-58, 2006.
- [11] Cantinelli, F. S.; *et al.* A oncopsiquiatria no câncer de mama – considerações a respeito de questões do feminino, *Revista de Psiquiatria Clínica*, Faculdade de Medicina-Universidade

de São Paulo. Disponível em: <<http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/vol33/n3/124.html>>, acessado em: 07/11/2007.

[12] Conde, D. M.; *et al.* Qualidade de vida de mulheres com câncer de mama. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v.28, n.3, 2006.

[13] Grudzinski, M. *et al.* Expressão da COX-2 e CD105 no câncer de mama e sobrevida livre de doença. *Rev Assoc Med Bras*, v. 52(4), p. 275-80, 2006.

[14] Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/images/ency/fullsize/1105.jpg>>. Acesso 05 julho 2007.

[15] Disponível em: <<http://www.farmacia.com.pt/index.php?name=News&file=article&sid=3945>>. Acesso 08 janeiro 2008.

[16] Disponível em: <http://www.unesp.br/prope/projtecn/Saude/Imagens/Saude14_1.jpg>. Acesso 21 fevereiro 2008.

[17] Disponível em: <<http://www.brasilecola.com/upload/e/radioterapia.jpg>>. Acesso 21 fevereiro 2008.

[18] Disponível em: <<http://www.unifesp.br/dgineco/tratamento.htm>>. Acesso 17 maio 2007.

[19] Disponível em: <www.wikipedia.org>. Acesso em 03 março 2008.

[20] Araújo, L. H. L., *et al.* Metástase Gástrica de Câncer de Mama: Relato de Caso e Revisão de Literatura. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 53, n. 3, p. 365-368, 2007.

[21] Disponível em: <http://www.gbecam.org.br/index.php?acao=especial&especial_id=1>. Acesso em 03 março 2008.

[22] Andre, F.; *et al.* DNA arrays as predictors of efficacy of adjuvant/neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients: Current data and issues on study design. *Biochimica et Biophysica Acta* 1766 (2006) 197–204

[23] Disponível em: <[http://www.hemonc.theclinics.com/article/S0889-8588\(07\)00016-0/abstract](http://www.hemonc.theclinics.com/article/S0889-8588(07)00016-0/abstract)>. Acesso em 03 março 2008.

[24] Mehreen, L.; Khanam, A. Evaluation of toxicities induced by chemotherapy in breast cancer patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy* v. 59, p. 524–527, 2005.

[25] Parmar, M. K. B. Adjuvant therapy. *Medicine*, v. 36, n.1, 2007.

[26] Disponível em: <http://www.projtodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/024.pdf>. Acesso em 03 março 2008.

[27] Villman, K.; *et al.* A phase II study of epirubicin, cisplatin and capecitabine as neoadjuvant chemotherapy in locally advanced or inflammatory breast cancer. *ESJO*, 43 (2007) 1153–1160.

- [28] Disponível em: <[http://www.hemonc.theclinics.com/article/S0889-8588\(07\)00024-X/abstract](http://www.hemonc.theclinics.com/article/S0889-8588(07)00024-X/abstract)>. Acesso em 03 março 2008.
- [29] Disponível em: <<http://www.prnewswire.com/cgi-bin/stories.pl?ACCT=PRNI2&STORY=/www/story/06-04-2006/0004374526&EDATE=>>>. Acesso em 03 março 2008.
- [30] Dranitsaris, G.; Tran, T. M. Economic analyses of toxicity secondary to anthracycline-based breast cancer chemotherapy. *EJC*, v. 31A, n. 13/14, p. 2174-2180, 1995.
- [31] Disponível em: <www.bulas.med.br>. Acesso em 03 março 2008.
- [32] Disponível em: <<http://www.webalice.it/alberto.frangini/Methotrexate.jpg>>. Acesso em 03 março 2008.
- [33] Guchelaar, H.-J.; et al. Clinical, Toxicological and Pharmaceutical Aspects of the Antineoplastic Drug Taxoh: A Review. *Clinical Oncology* (1994) 6:40-48
- [34] Disponível em: <<http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v27n2/19278f3.gif>>. Acesso em 03 março 2008.
- [35] Jensen, S. B.; et al. Adjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces temporary salivary gland hypofunction. *Oral Oncology*, v. 44, n. 2, p. 162-173, 2008.
- [36] Rodenhuis, S. High-dose chemotherapy in breast cancer: a critical review - Extended Abstracts, *Elsevier*, p. 24-25, 2006.
- [37] Disponível em: <<http://revistadasemana.abril.com.br/conteudo/mundo/conteudomundo263523.shtml>>. Acesso em 03 março 2008.
- [38] Jones, A. L. Fertility and pregnancy after breast cancer. *The Breast* (2006) 15(S2) S41–S46
- [39] Uyl-de Groot, C. A. Economic evaluation of cancer therapies: more and better studies will lead to better choices in cancer care. *EJC*, 42 (2006) 2862-2866.
- [40] Cetto, G. L.; Molino, A. Economic aspects of high-dose chemotherapy: a clinician's perspective review. *Oncology/Hematology*, 41 (2002) 251-267.
- [41] Disponível em: <http://www.agencia.fapesp.br/boletim_dentro.php?data%5Bid_materia_boletim%5D=8063>. Acesso em 03 março 2008.
- [42] Maluf, M. F. M., Mori, L. J.; Barros, A. C. S. D. O impacto psicológico do câncer de mama. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 51, n. 2, p. 149-154, 2005.
- [43] Disponível em: <http://www.inca.gov.br/releases/press_release_view.asp?ID=1600>. Acesso 29 novembro 2007.

Capítulo 3 – Ácido Acetilsalicílico: muito além da analgesia

3.0 Introdução

Com relação ao desenvolvimento de fármacos, o quadro atual é caracterizado pela existência de tratamentos de elevado custo e índice terapêutico relativamente reduzido. Há diversas classes farmacológicas disponíveis de agentes quimioterápicos para tratamento do câncer, mas nenhuma delas tem se mostrado capaz de erradicar as células cancerosas sem afetar os tecidos normais [1].

Enquanto a epidemiologia e a prevenção do câncer têm focado na identificação e na modificação dos fatores de estilo de vida que podem aumentar ou diminuir o risco de vários cânceres, recentemente a atenção tem sido centrada na quimioprevenção, o uso de agentes químicos para prevenir ou inibir o processo carcinogênico. Sucesso significativo foi conseguido nesta área com o uso da aspirina e de outras drogas antiinflamatórias não esteróides (AINEs) para prevenir a neoplasia coloretal. O uso desses medicamentos também tem sido associado a uma diminuição no risco do câncer de mama [2].

3.1 O ácido acetilsalicílico [3-5]

Os antiinflamatórios, analgésicos e antipiréticos formam um grupo heterogêneo de compostos que compartilham algumas ações terapêuticas e efeitos colaterais. O protótipo é o ácido acetilsalicílico. Esses compostos são frequentemente denominados de antiinflamatórios não-esteróides ou AINEs.

Apesar da introdução de muitos fármacos novos no mercado, o ácido acetilsalicílico (AAS) continua sendo o analgésico-antipirético e antiinflamatório mais amplamente prescrito, constituindo o padrão para a comparação e avaliação de outros medicamentos. É o ingrediente ativo em mais de 50 medicações sendo um dos medicamentos contra a dor mais seguros do mundo e menos dispendioso, com mais de 100 anos de comprovada eficiência e eficaz para o tratamento uma grande variedade de doenças. Nos EUA, são consumidas quantidades enormes desse medicamento e algumas estimativas calculam que a quantidade alcance 10.000 a 20.000 toneladas por ano.

Quando administrado por via oral, o AAS é rapidamente absorvido pelo estômago e parte superior do intestino delgado. O nível máximo é alcançado em cerca de 1 h, seguido de

declínio gradual. A meia-vida plasmática do AAS é de cerca de 15 minutos; a do salicilato é de 2-3 h em doses baixas e cerca de 12 h nas doses antiinflamatórias convencionais.

Após sua absorção, o AAS distribui-se pela maioria dos tecidos do corpo e líquidos transcélulares, por meio de processos passivos que dependem do pH. O AAS acetila a albumina humana *in vivo* por uma reação com o grupo ϵ -amino da lisina. Os hormônios, o DNA, a hemoglobina e outras proteínas também são acetiladas. O AAS sofre hidrólise a ácido salicílico no plasma, no fígado e nos eritrócitos.

A biotransformação do AAS ocorre principalmente no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias do fígado. Os três produtos principais são o ácido salicílico, o éter ou glicuronídeo fenólico e o éster ou acilglicuronídeo. Uma pequena fração é oxidada em ácido genticóico, entre outros.

O AAS é excretado na urina sob a forma de ácido salicílico livre (10%), ácido salicílico (75%), glicuronídeo fenólico salicílico (10%), acilglicuronídeo salicílico (5%) e ácido genticóico (<1%).

3.2 A história do AAS

A história do AAS teve início no século V a.C. com Hipócrates (Figura 3.1), o pai da medicina moderna, que prescrevia preparações com cascas e folhas do salgueiro para o tratamento de febres e para aliviar as dores do parto. Dioscórides, um dos mais notáveis médicos da Antiguidade, que viveu na Grécia no século I da era cristã, receitava emplastos feitos com cascas e folhas do salgueiro para o tratamento de dores reumáticas [6].

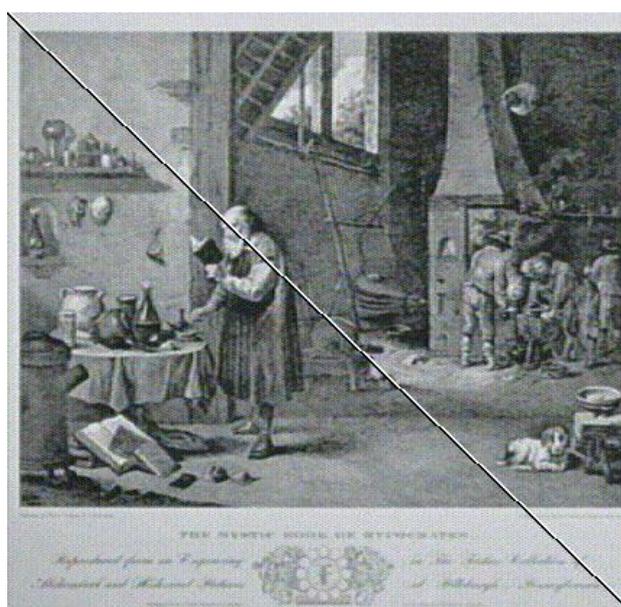


Figura 3.1: Hipócrates, o pai da medicina moderna [6].

Na Inglaterra, em 1757, o reverendo Edmund Stone provou o sabor amargo das cascas do salgueiro. Seis anos mais tarde, os resultados de suas observações clínicas mostraram as propriedades analgésicas e antipiréticas do extrato daquela planta [3, 7].

A salicilina (Figura 5.2), princípio ativo do salgueiro branco, foi isolada pela primeira vez em 1829 pelo farmacêutico francês Louis Hector Leroux [6]. A salicilina era um glicosídeo amargo com efeito antipirético que, quando submetida à hidrólise, produzia glicose e álcool salicílico. Este pode ser convertido em ácido salicílico por oxidação no organismo humano ou *in vitro* por manipulação química. As propriedades anti-reumáticas da salicilina assemelham-se muito às do ácido salicílico (Figura 3.2) [3, 6].

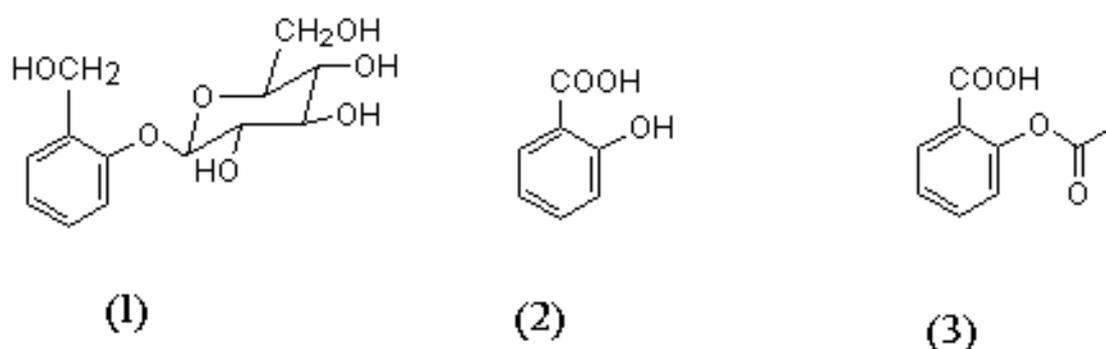


Figura 3.2: (1) Salicilina, (2) Ácido Salicílico e (3) Ácido Acetilsalicílico [6].

Em 1838, o químico italiano Raffaele Piria purificou a salicilina e obteve, por hidrólise e oxidação, o ácido livre [6]. Em 1859, o célebre químico alemão Hermann Kolbe e seus alunos sintetizaram o ácido salicílico (Figura 3.3) e seu sal sódico a partir do fenol, pela reação entre o fenóxido de sódio e o dióxido de carbono.

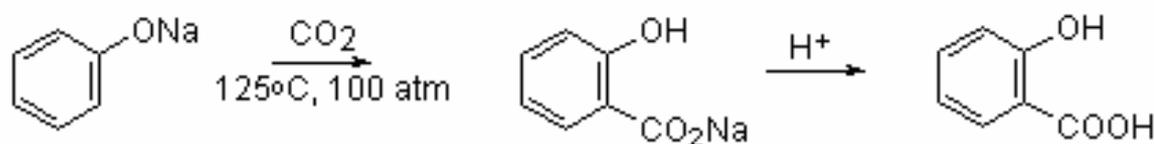


Figura 3.3: Ilustração da síntese de Kolbe para produção do ácido salicílico [6].

Em 1874, Friedrich von Heyden, um dos alunos de Kolbe, em Dresden, Alemanha, estabeleceu a primeira grande fábrica destinada à produção em larga escala de salicilatos sintéticos.

Em um dos laboratórios da Bayer, no ano de 1897, Felix Hoffman realizou a síntese do ácido acetilsalicílico. O novo medicamento era menos ácido que o ácido salicílico, mas

mantinha a propriedade analgésica desejada [6, 7]. O ácido acetilsalicílico foi obtido a partir da esterificação do ácido salicílico com anidrido acético em presença do ácido sulfúrico que atua como catalisador (Figura 3.4) [8].

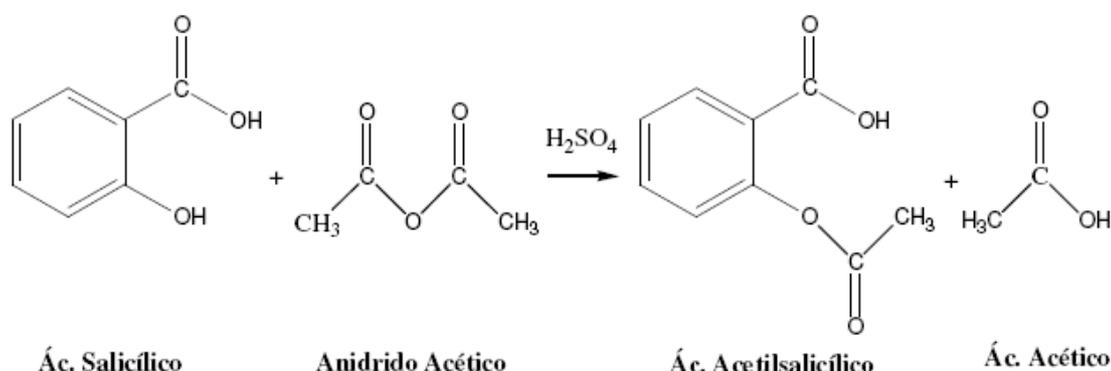


Figura 3.4: Reação química que leva à produção de AAS [8].

As propriedades terapêuticas do AAS levaram os laboratórios de pesquisa da Bayer a lançarem o AAS no mercado para competir com os salicilatos naturais, o que ocorreu a partir de 1897 sob o nome de Aspirina[®] [7]. Aspirina deriva de: A de acetil e spirina de "spiric acid", o outro nome em inglês pelo qual era também conhecido o ácido salicílico. "Spiric" por sua vez tem origem em *Spiraea*, gênero ao qual pertence à *Salix alba*, planta de onde foi isolada a salicilina. Desde então, a medicina passou a dispor da aspirina como uma das mais potentes armas de seu arsenal terapêutico [6].

Após mais de 100 anos de sua descoberta, o AAS continua sendo alvo de inúmeras pesquisas sobre sua aplicação terapêutica como analgésico e antiinflamatório, atuando no controle da febre, na artrite reumatóide e na inibição da agregação plaquetária [7], além de diversos estudos sobre a quimioprevenção do câncer coloretal e de diversos outros cânceres.

3.3 Mecanismos de ação do AAS

O processo inflamatório envolve uma série de eventos que podem ser desencadeados por numerosos estímulos tais como agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno-anticorpo e lesão térmica ou por agentes físicos. Cada tipo de estímulo provoca um padrão de resposta.

Várias citocinas diferentes desempenham um papel essencial na coordenação do processo inflamatório, especialmente a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (FNT). A IL-1 e o TNF são derivados de células mononucleares e macrófagos e induzem a expressão de genes que promovem a síntese de proteínas para os eventos inflamatórios. A IL-

1 e o FNT provocam muitas respostas pró-inflamatórias, como indução de febre, sono e anorexia, indução das enzimas ciclooxigenase e lipooxigenase, ativação das células B, células T, e células destruidoras naturais e produção de outras citocinas. Também aumentam a expressão de muitos tipos de genes, provavelmente em parte pela ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B e AP-1. As células B são linfócitos com função de defesa imunológica contra vírus, bactérias e fungos, principalmente através da produção e liberação de citocinas. As células T, que também são linfócitos, apresentam funções de apresentação de antígenos e produção de anticorpos [3].

O ácido araquidônico, um ácido graxo poliinsaturado de 20 de carbonos, cuja fórmula química é $C_{20}H_{32}O_2$, é o precursor para a síntese das prostaglandinas. A fosfolipase A2 catalisa a hidrólise de fosfolípidios para produzir o ácido araquidônico livre (Figura 3.5) [4].

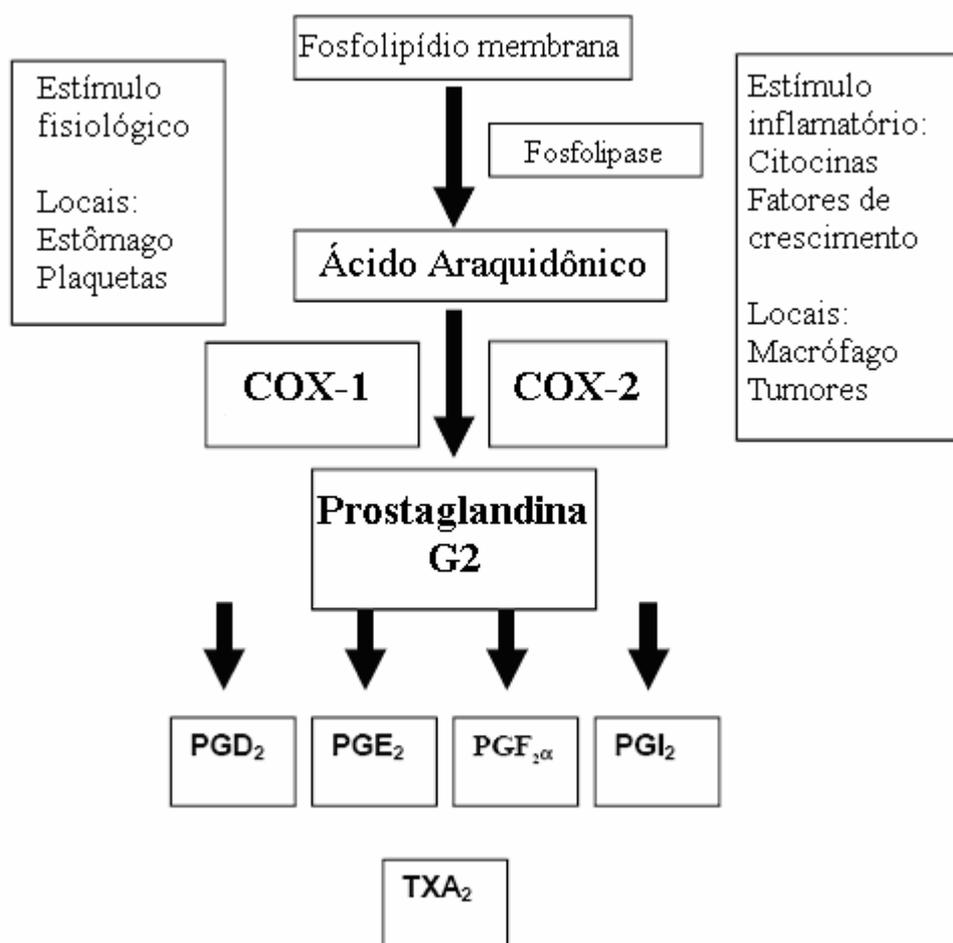


Figura 3.5: Síntese de prostaglandina via ácido araquidônico. Adaptado de [4].

A primeira enzima envolvida na via da síntese das prostaglandinas é a prostaglandina endoperóxido-sintetase ou ciclooxigenase. Essa enzima converte o ácido araquidônico nos intermediários instáveis PGG_2 e PGH_2 . Existem duas formas de ciclooxigenase, denominadas

ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2). A COX-1 é uma isoforma constitutiva encontrada na maioria das células e tecidos normais, sendo constitutivamente expressa no estômago; enquanto que a COX-2 é induzida em condições de inflamação por citocinas e mediadores da inflamação. Entretanto, a COX-2 também é constitutivamente expressa em determinadas áreas do rim e do cérebro [9-12].

O AAS inibe a enzima ciclooxigenase (Figura 3.6), e, desta forma, a síntese de prostaglandinas. O AAS modifica de modo covalente a COX-1 e a COX-2, resultando numa inibição irreversível da atividade destas enzimas. A duração dos efeitos do AAS está relacionada com a taxa de renovação das ciclooxigenases nos diferentes tecidos-alvo.

Na estrutura da COX-1, o AAS acetila a serina 530, impedindo a ligação do ácido araquidônico ao local ativo da enzima e a capacidade da enzima de sintetizar prostaglandinas. Na COX-2, o AAS acetila uma serina homóloga na posição 516. Embora a modificação covalente da COX-2 pelo AAS também bloqueie a atividade de ciclooxigenase dessa isoforma, uma propriedade interessante da COX-2, não compartilhada pela COX-1, é que sua forma acetilada passa a sintetizar o ácido 15 (*R*)-hidroxieicosatetraenóico (15(*R*)-HETE). É interessante assinalar que esse produto induzido pelo AAS pode sofrer metabolismo transcelular pela enzima 5-lipooxigenase, produzindo 15-epilipoxina A₄, que exerce potentes ações antiinflamatórias e pode potencializar a ação antiinflamatória do AAS.

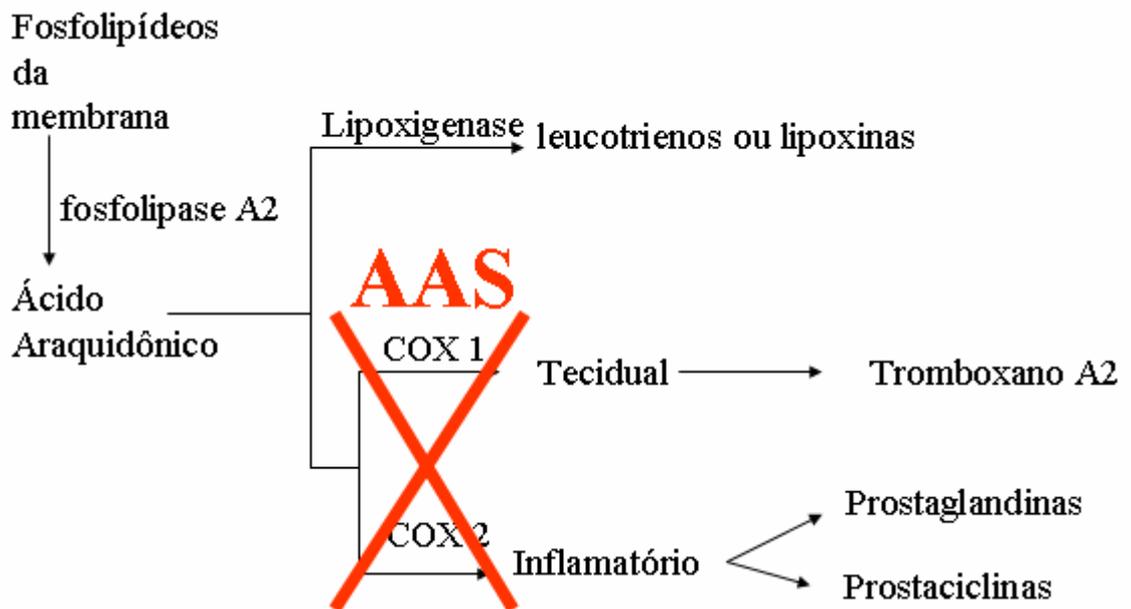


Figura 3.6: Esquema simplificado da ação do AAS sobre as isoformas da COX.

3.4 Efeitos terapêuticos do AAS [2-4]

O AAS é antipirético, analgésico e antiinflamatório. Em geral, o AAS proporciona apenas alívio sintomático da dor e da inflamação associadas à doença e não interrompem a progressão da lesão patológica do tecido. O efeito analgésico decorre da inibição da síntese de prostaglandinas E_2 (PGE_2). A febre resulta de uma maior formação de citocinas ($IL-1\beta$, $IL-6$, $TNF-\alpha$), que aumentam a síntese de PGE_2 , que por sua vez, estimula o hipotálamo a elevar a temperatura corporal. O AAS suprime essa resposta ao inibir a síntese de PGE_2 .

O AAS se acumula nos locais de inflamação, o que representa uma propriedade farmacocinética interessante para fármacos usados como antiinflamatórios.

Uma nova e importante área de aplicação dos AINEs consiste na prevenção do câncer de colo. Os estudos epidemiológicos realizados sugeriram que o uso frequente de AAS está associado a uma notável redução de 50% na incidência do câncer de colo. É interessante assinalar que essa redução foi observada com a ingestão de apenas 4-6 comprimidos de 325 mg/semana. Evidências sugerem que o efeito dos AINEs sobre o câncer de colo é mediado pela inibição da COX-2, que sofre notável superexpressão nesse tipo de tumor.

Existe um número de estudos ao longo dos últimos 30 anos associando o uso de AINEs e uma incidência reduzida de câncer, incluindo o câncer de mama. Estudos de caso-controle encontraram um risco reduzido de pelo menos 20% a 40% no risco de desenvolver o câncer de mama associado com a utilização de qualquer AINEs três vezes ou mais por semana durante, pelo menos, um ano.

3.5 Efeitos colaterais da terapia com AAS [3]

O efeito colateral mais comum consiste numa tendência a induzir ulceração gástrica ou intestinal. A lesão e o sangramento estão relacionados com a inibição da biossíntese de prostaglandinas gástricas, especialmente PGI_2 e PGE_2 , que atuam como citoprotetores da mucosa gástrica.

Outros efeitos colaterais desses fármacos que resultam no bloqueio da síntese de prostaglandinas e do tromboxano A_2 incluem distúrbios da função plaquetária. As plaquetas perdem a capacidade de agregação e formação de trombos. Entretanto, os efeitos sobre a atividade das ciclooxygenases exigem a produção de novas plaquetas, pois estas células são incapazes de regenerar suas funções. Esse efeito colateral tem sido explorado no tratamento profilático dos distúrbios tromboembólicos.

3.6 O AAS e o câncer de mama

A tendência atual na terapêutica do câncer baseia-se em um projeto de marcador molecular derivado de estudos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*. Os estudos *in vitro* demonstraram o possível papel dos inibidores de COX como um agente único para prevenir a ocorrência de tumores. Em contrapartida, vários estudos epidemiológicos concebidos para outros fins mostraram indícios que inibidores da COX ou AINEs, como a aspirina, podem ter uma influência benéfica na diminuição do desenvolvimento e crescimento de tumores malignos [13].

Uma das mais promissoras abordagens para reduzir o risco de câncer é a quimioprevenção. Quimioprevenção é a tentativa de usar compostos não-tóxicos naturais e sintéticos ou suas misturas para intervir nos estágios precoces da carcinogênese, antes de características invasivas se manifestarem. A inflamação crônica é considerada promotora do desenvolvimento do tumor por vários mecanismos. Dessa forma, os AINEs demonstraram inibir a transformação maligna em vários modelos animais e culturas celulares [9].

O carcinoma de mama afeta cerca de uma em cada 12 mulheres, e é a principal causa de morte em mulheres entre as idades de 40 e 50 anos. Estudos de câncer de mama indicaram uma ligação entre a patogênese da doença e a expressão das ciclooxigenases, particularmente a COX-2 no tecido maligno [10].

3.6.1 COX-2: mecanismos relacionados ao câncer

Como já discutido anteriormente, as isoformas da enzima COX fazem parte do complexo de enzimas prostaglandina sintetase, que desempenham um papel fundamental na conversão do ácido araquidônico em prostaglandina G₂ (PGG₂).

O gene da COX-1 é expresso a um nível constante durante todo o ciclo celular, e por quase todos os tecidos, embora não em todas as células de um tecido. Em contrapartida, o gene da COX-2 é um gene de início imediato. A enzima COX-2 é induzida rapidamente em resposta a vários estímulos inflamatórios e mitogênicos. Os fatores de crescimento (VEGF, PDGF), citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, FNT), endotoxina bacteriana, promotores tumorais e a radiação UVB são todos estimuladores da expressão da COX-2. A COX-2 é indetectável na maioria dos tecidos normais, exceto para o sistema nervoso central, rins, vesículas seminais e traquéia. A COX-2 é expressa por células que medeiam a inflamação, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos. A enzima foi reconhecida como a principal isoforma responsável pela síntese de prostanóides envolvidos em processos patológicos, particularmente aqueles relacionados com os estados inflamatórios agudos e crônicos.

Também pode resultar da ativação da via MAPK (proteína quinase ativada pela mitogênese) [10, 11, 13].

A COX-2 está relacionada com a formação de substâncias cancerígenas, promoção do crescimento tumoral, inibição da apoptose, desenvolvimento da angiogênese e de processos metastáticos (Figura 3.7) [13].

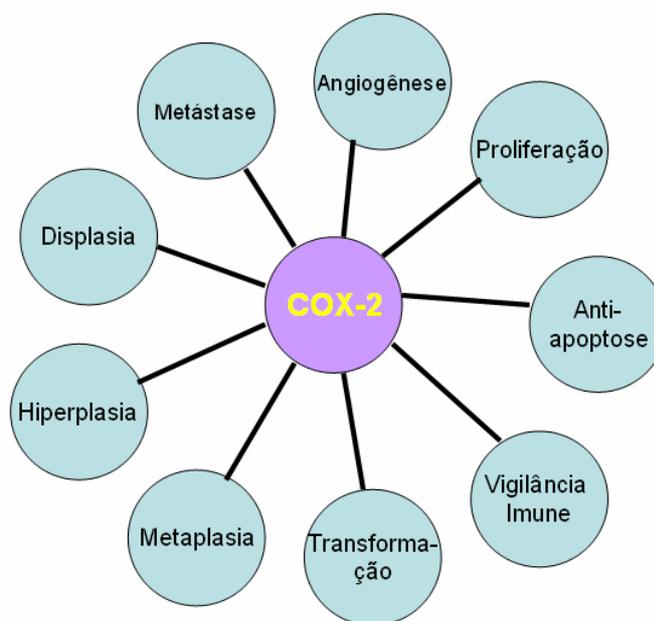


Figura 3.7: Representação esquemática dos papéis da COX-2 na carcinogênese. Adaptado de [9].

A atividade peroxidase da COX pode converter agentes pré-cancerígenos em agentes cancerígenos e, assim, iniciar a formação do tumor. Quantidades substanciais de xenobióticos (compostos orgânicos naturais não-humanos) podem ser co-oxidados em mutagênicos pela atividade peroxidase da COX. Esta reação pode ser relevante a regiões de órgãos que são expostas a agentes cancerígenos do tabaco, como pulmão, cavidade oral e bexiga. Do mesmo modo, estrógenos demonstram transformação e atividade genotóxica.

Além disso, o próprio metabolismo do ácido araquidônico produz agentes mutagênicos. Alguns subprodutos da oxidação do ácido araquidônico, como malondialdeído são altamente reativos quimicamente e formam adutos com o DNA.

Liu *et al.*, em 2001, foram os primeiros a descrever a tumorigênese induzida pela superexpressão da COX-2. No estudo, observaram hiperplasia e carcinoma nas células epiteliais da glândula mamária associadas a uma forte expressão da COX-2 com níveis aumentados de PGE2. Este estudo é o único que tem estabelecido um papel claro para a COX-2 na iniciação do tumor [14].

O papel na promoção do tumor pela COX-2 é mais fortemente apoiado por estudos prévios em modelos de tumor coloretal. Oshima *et al.* (1996) descreveram uma redução do número e tamanho de pólipos no cólon de ratos através da inibição da COX-2 [15].

Estudos demonstraram que a concentração de PGE2 foi aumentada em células com superexpressão à COX-2, e é considerada como o mais importante efector da COX-2. Sabe-se que, inativando alguns receptores da PGE2, reproduz-se os efeitos da inativação da COX-2. A PGE2 pode promover carcinogênese, invasão e metástases, assim como angiogênese tumoral. A exposição a PGE2 aumenta a taxa de formação de colônia pelas células do câncer de cólon, mas apenas em linhagens celulares que expressam a COX-2 [13].

A diminuição da taxa de apoptose tem sido largamente observada em lesões pré-malignas e malignas. Assim, diversos estudos experimentais demonstraram uma correlação positiva entre a expressão da COX-2 e inibição da apoptose.

Células epiteliais intestinais de ratos projetadas para superexpressar COX-2 mostraram aumento na quantidade da proteína antiapoptótica Bcl-2 e foram resistentes a apoptose estimulada [13]. No entanto, tratamento com os AINEs foram capazes de inverter esta resistência à apoptose. Células com alterações no fenótipo, como superexpressão da COX-2, podem aumentar o potencial tumorigênico das células epiteliais intestinais, criando resistência à apoptose.

Estudos afirmam que os quimiopreventivos inibidores da COX-2 aumentam a susceptibilidade de células cancerosas para apoptose. Este estudo foi o primeiro a revelar o envolvimento direto de salicilatos na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de morte celular. Indicando um novo mecanismo para AINEs com consequente produção de ROS em células cancerosas gastrointestinais, que resultaram no desencadeamento da apoptose.

A superexpressão de Bcl-2 ou Bcl-xL suprime a produção de ROS, em consequência, protege as células da morte induzida. Estudos ainda afirmaram que células de câncer de cólon que expressavam diferentes níveis de COX-2 também produziram ROS e sofreram apoptose em resposta a um AINE [11].

É fato conhecido na literatura que as espécies reativas de oxigênio (ROS) podem ser produzidas por células inflamatórias. Estudos nas duas últimas décadas têm demonstrado que ROS são capazes de causar danos oxidativos ao DNA e sinalização celular desregulada, que pode vir a conduzir a carcinogênese. Assim sendo, a aspirina pode proteger contra a carcinogênese através da inibição de ROS [16].

O crescimento dos tumores sólidos e a formação de metástases dependem da geração de novos vasos sanguíneos. As células tumorais produzem dezenas de fatores que garantem o crescimento dos vasos sanguíneos. Recentes evidências sugerem um papel da COX no processo de angiogênese. Usando um modelo de angiogênese de córnea, celecoxib (AINEs) provocou uma redução do número e comprimento dos capilares em desenvolvimento [13].

Em um estudo recente, níveis de PG e densidade microvascular foram medidos para determinar o papel da expressão de COX-2 em 42 pacientes com adenocarcinoma gástrico primário [13]. Os tumores que superexpressavam COX-2 mostraram significativamente elevados níveis de PGE2 nos tecidos cancerígenos e uma maior densidade microvascular. Estes dados indicam que COX-2 e PGs derivadas de COX-2 podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento do câncer através do mecanismo de estímulo da célula tumoral ao crescimento e neovascularização. Também existe evidência que COX-2 está envolvida na produção de fatores pró-angiogênicos, como VEGF, bFGF, PDGF e endotelina [10].

Uma questão importante na progressão dos tumores é a capacidade das células em invadir tecidos localmente e difundir a locais distantes do tumor de origem. A degradação da matriz extracelular e a mobilidade celular são essenciais neste processo. Matrizes de metaloproteinases (MMPs) são enzimas de degradação da matriz extracelular. Sua expressão está associada à invasão das células tumorais na membrana basal e estroma, penetração dos vasos sanguíneos e metástase. Foi demonstrado que a COX-2 induz a expressão de MMP nas células cancerosas do cólon humano e, por isso, promove metástase. Além disso, a inibição da COX-2 em tumor da próstata humana resultou em uma diminuição da secreção MMP-2 e MMP-9 [13].

Existe uma relação entre as alterações das propriedades da aderência das células cancerosas e superexpressão de COX-2. A COX-2 aumenta a aderência das células tumorais à matriz extracelular pela diminuição da expressão de E-Caderina que assegura a aderência célula-célula. Consistente com estes achados *in vitro*, inibidores seletivos da COX-2 têm sido utilizados para inibir a metástase em animais [13].

O crescimento tumoral está associado à supressão imune. Macrófagos são ativados e produzem PGE2 que, por sua vez, inibem a produção de citocinas reguladoras, a proliferação de linfócitos B e T e diminuem a atividade citotóxica de células *natural killer* (células NK) [13].

Assim, estes resultados identificam a superexpressão da COX-2 como um evento precoce na carcinogênese. Um aumento nas citocinas relacionadas com a inflamação induz a expressão de COX-2 que pode estimular a produção de prostaglandinas.

Considerando a ligação entre apoptose, angiogênese, invasão, metástase e COX-2 e prostaglandinas, uma ligação de causa e efeito entre inflamação crônica e carcinogênese pode ser sugerida. Quanto mais avançado o tumor se torna no que diz respeito ao estágio e grau, maior será o nível da produção de COX-2 [10].

No que diz respeito aos eventos que estimulam a superexpressão de COX-2, o ambiente químico estabelecido pela malignidade compreende um ótimo meio para a transcrição do gene. Este ambiente contém oncogenes desregulados, citocinas, fatores de crescimento, hormônios, todos os quais causam indução da expressão de COX-2. A perda da função de genes supressores tumorais também pode ser uma explicação para a superexpressão de COX-2. Estudos demonstraram que a linhagem celular de fibroblastos de ratos produzidos para expressar p53 exibem uma grande redução na atividade do promotor de COX-2 comparadas às células com perda constitutiva da expressão de p53 [10].

3.6.2 Expressão da COX-2 em tumores sólidos humanos e lesões pré-malignas

As primeiras pistas que os AINEs poderiam reduzir o risco de câncer vieram de observações clínicas e grandes pesquisas de base populacional, em doentes de câncer coloretal que tomaram aspirina ou outros AINEs durante um longo período de tempo para outros fins. Mais tarde, grandes estudos observacionais e prospectivos demonstraram uma redução do risco de câncer coloretal em 40-50% em pacientes com longo tempo de ingestão de AINEs (10-15 anos) [9, 13].

Vários estudos de caso-controle mostraram um efeito protetor do uso de AINEs contra cânceres epiteliais extra-colônicos, como esofágico, gástrico e câncer de mama. Um estudo caso-controle com base para medir a taxa de câncer de mama invasivo em relação ao uso de AINEs mostrou uma significativa redução do risco de apresentar um tumor grande ou metástases após exposição a AINEs 2-5 e 6-10 anos anteriores ao diagnóstico [13].

A expressão de COX-2 tem sido observada em células cancerosas, mas também em macrófagos ou outras células não-cancerosas na área do tumor. De fato, a inflamação é considerada um possível iniciador de câncer, mas não é requerida para promover o seu crescimento [13].

A expressão de COX-2 em cânceres sólidos humanos não está confinada ao componente epitelial do tumor. A neovasculatura associada aos tumores também demonstram

coloração de COX-2 por métodos imunohistoquímicos. Os efeitos de inibidores específicos da COX-2 foram testados em modelos de angiogênese em animais e demonstrou causar inibição da resposta angiogênica em angiogênese FGF induzida em ratos. Além dos efeitos angiogênicos, a expressão de COX-2 demonstrou efeitos sobre a apoptose [4].

3.6.3 COX-2 e o câncer de mama: uma evidência molecular

As consequências da superexpressão de COX-2 incluem aumento da produção de prostaglandinas (PGs) e fator angiogênico e uma transcrição contínua do gene COX-2. As prostaglandinas exercem um papel importante em uma variedade de processos fisiológicos por agirem em hormônios locais. Elas possuem meia-vida curta, frequentemente alguns minutos, e podem alterar a atividade das células que as produziram ou das células adjacentes.

Há uma clara evidência de ligação entre altos níveis de prostaglandinas e câncer. Essas moléculas estimulam a proliferação celular, e em particular, induzem a mitogênese de células epiteliais mamárias [10].

Muitos tumores humanos produzem mais PGs que os tecidos normais, de onde são provenientes. Acredita-se que as PGs são importantes na patogênese do câncer devido aos seus efeitos sobre a proliferação celular, angiogênese, vigilância imune e apoptose. A hipótese que PGs contribuem para carcinogênese está apoiada por conclusões epidemiológicas e experimentais onde inibidores de COX, incluindo os AINEs, protegem contra uma variedade de tumores. O dado mais específico que apoia uma conexão de causa-efeito entre COX-2 e tumorigênese vem de estudos genéticos. Ratos transgênicos, frutos da engenharia genética, superexpressam o gene para COX-2 humanos em glândulas mamárias desenvolvendo hiperplasia focal de glândula mamária, displasia e tumores metastáticos. Estes achados são consistentes com a idéia de que a elevada expressão da COX-2, sob certas condições, pode facilitar a formação do tumor [9].

A produção de prostaglandinas é maior em lesões associadas com a presença de células neoplásicas em tumores linfáticos, vasos sanguíneos e nodos axilares. Níveis de prostaglandinas parecem ser grandes em locais de metástases nodais comparados com áreas de tumor primário, e são elevadas em tumores de grau moderado-alto. Notavelmente, tumores com receptores negativos para esteróides podem produzir mais prostaglandinas que lesões que expressam receptores de esteróides. Também pode haver uma relação entre idade, início da menopausa e produção de prostaglandina pela mama.

As prostaglandinas são susceptíveis em aumentar a síntese local de estrogênio na mama [10]. O gene aromatase (CYP19) é responsável pela síntese de estrogênio, dentre eles o

estradiol, que é o mais potente estrogênio endógeno [10, 17]. Os níveis mais elevados da enzima aromatase estão presentes nos ovários de mulheres na pré-menopausa, na placenta de mulheres grávidas e nos tecidos adiposos periféricos dos homens e das mulheres na pós-menopausa. A atividade da aromatase também foi demonstrada no tecido mamário *in vitro*. Além disso, a expressão da aromatase é maior na mama ou nas proximidades dos sítios tumorais.

A regulação da aromatase em vários tecidos é complexa e várias regiões promotoras de tecidos específicos foram identificadas no gene CYP19. O promotor PII é encontrado no ovário e nos tecidos do câncer de mama. O promotor PI.4 é o responsável por glicocorticóides e citocinas como a IL-1 β , IL-6 e TNF- α [16]. A expressão do gene do promotor PII conduz a um aumento de três a quatro vezes na expressão da aromatase. A prostaglandina E2 (PGE2) causa comutação do promotor de PI.4 para PII em células do estroma adiposo, é capaz de aumentar a atividade da aromatase, e é o mais potente fator estimulante da expressão da aromatase via promotor PII [10].

Os promotores específicos detectados nos tecidos malignos estão sob o controle do AMP cíclico (AMPc). Assim, o conceito do promotor interrompido entre tecidos mamários normais e malignos foi desenvolvido (Figura 3.8) [4].

A PGE2, sintetizada por muitos carcinomas, é um conhecido estimulante do AMPc em células do câncer de mama. Um estudo de 23 tumores mamários humanos constatou uma correlação positiva significativa entre COX-2 e a aromatase. Além da PGE2, as citocinas, como a IL-6 ou o TNF também podem regular a atividade da aromatase [4].

As prostaglandinas PGE2 aumentam os níveis intracelulares de AMPc e estimulam a biossíntese de estrogênio. Este mecanismo bioquímico pode explicar observações epidemiológicas dos efeitos benéficos dos AINEs sobre o câncer de mama. Estudos realizados em 20 espécimes de câncer de mama humanos e em 5 amostras de tecido mamário normal como controle sugerem uma relação entre expressão do gene CYP19 e expressão dos genes das COX [17].

Estudos têm demonstrado que os AINEs e os inibidores seletivos de COX-1 e COX-2 produzem diminuições dose-dependentes na atividade da aromatase em tecidos do câncer de mama e o efeito dos inibidores da COX na expressão da aromatase ocorre através da supressão dos promotores específicos do tecido PI.3, PI.4 e PII [17].

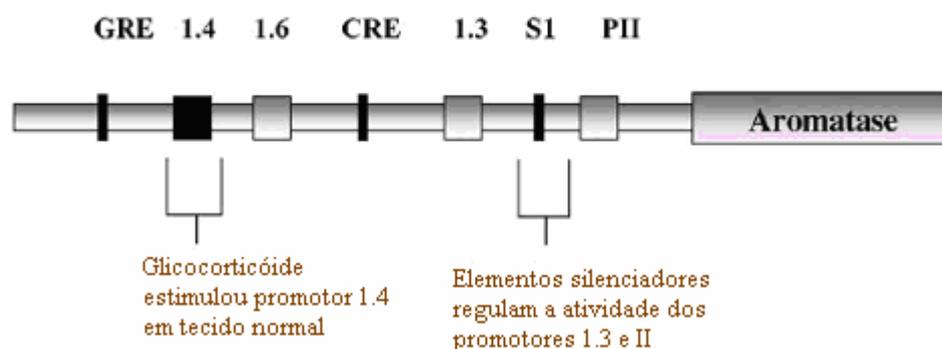
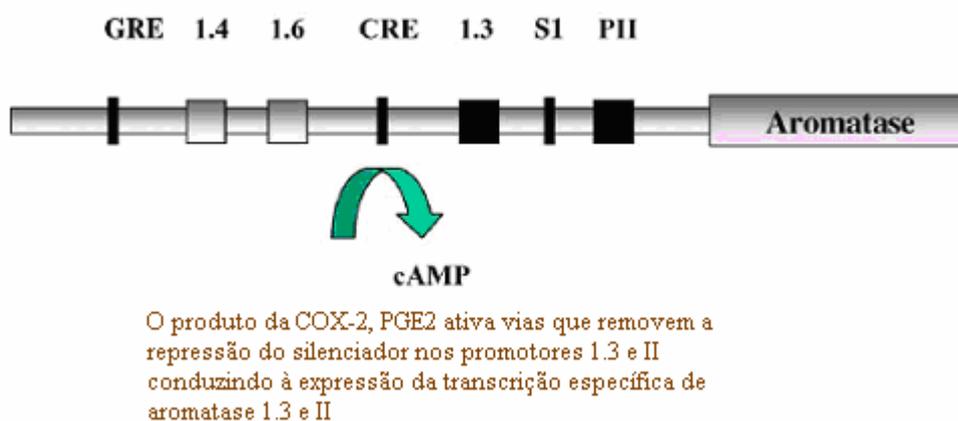
Tecido normal*Tecido canceroso*

Figura 3.8: Regulação transcricional da aromatase via COX-2 [4].

Entretanto, outros estudos mostraram que os efeitos supressivos tumorais dos AINEs não estão relacionados a uma redução nos níveis de prostaglandinas, mas devem-se à elevação dos níveis de ácido araquidônico (AA). Um aumento dramático nos níveis de AA estimula a produção de ceramida, conhecido como um mediador da apoptose [18].

O p53, um dos principais genes supressores tumorais envolvidos no controle da progressão do ciclo celular, integridade do DNA e sobrevivência da célula, parece também estar envolvido na regulação da expressão da COX-2. Um tipo-selvagem, mas não uma forma mutante de p53 reprimiu a transcrição do gene da COX-2. Tumores gástricos humanos com mutação do p53 exibiram um nível mais elevado de expressão da COX-2 quando comparados com tumores sem mutação do p53.

Investigações ao longo dos últimos anos mostrou que NF-κB (fator nuclear κB) é um fator de transcrição indutível responsável por regular a expressão de genes envolvidos na sobrevivência da célula, adesão celular, inflamação, diferenciação e crescimento. Na maioria

das células latentes, NF- κ B está retido no citoplasma por ligação a uma das proteínas inibitórias I κ B. O NF- κ B é ativado em resposta a uma ampla variedade de estímulos que promovem a dissociação do inibidor I κ B. Evidências indicam que NF- κ B desempenha um papel central na resposta inflamatória em geral, bem como nas respostas imunes. A região promotora da COX-2 contém dois sítios de ligação NF- κ B. Assim, a NF- κ B demonstrou ser regulador positivo da expressão da COX-2 em macrófagos murinos [9].

A via sinalizadora NF- κ B também foi identificada como um alvo para os efeitos antitumorais da aspirina e AINEs relacionados. Neste caso, aspirina induz ativação do NF- κ B, que é necessário para a sua atividade antitumoral [11]. Entretanto, um outro estudo afirmou que a aspirina inibiu a ativação da NF- κ B e as subsequentes respostas inflamatórias [16].

3.6.4 O papel da COX-2 no câncer de mama

Estudos encontraram evidencia imunohistoquímica da expressão de COX-2 em 56% de um grupo de tumores de mama, que incluíam carcinoma ductal *in situ* (DCIS), carcinoma ductal invasivo e carcinoma lobular invasivo (n=30). É mais provável DCIS expressar COX-2 que o carcinoma invasivo, e características pobremente diferenciadas foram associados com baixa expressão da COX-2. Oitenta por cento das lesões DCIS expressam fortemente COX-2, independentemente do grau da lesão. Este estudo foi o primeiro a revelar a expressão de COX-2 em DCIS, sugerindo que a indução da COX-2 poderia representar um evento precoce na evolução de uma lesão invasiva. Apoiando isto, a expressão de COX-2 estava claramente presente em lesões pré-cancerígenas [10].

Parrett *et al.* (1997), encontraram a expressão de COX-2 em 100% dos cânceres de mama estudados (n=13), com nenhuma expressão de COX-2 detectável em tecidos normais de mama [19]. Singh-Ranger e Mokbel (2002) ainda observaram uma associação significativa entre COX-2 e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) mRNA [10].

A técnica de imunohistoquímica foi utilizada para analisar a expressão da proteína de COX-2 em 1567 cânceres de mama invasivos. Uma elevada expressão foi observada em 37,4% dos tumores, e foi significativamente associada a uma desfavorável sobrevida livre de doença, tumores de grandes dimensões, alto grau histológico, status negativo de receptor de hormônio, uma elevada taxa de proliferação e alta expressão de p53 [20].

Em um estudo citado por Davies (2003) demonstrou-se que das 21 espécies de tumores mamários humanos, todas elas apresentaram expressão detectável e heterogênea do gene da COX-2. Estudos anteriores demonstraram uma relação entre níveis de prostaglandina tecidual em tumores mamários humanos, baixa sobrevivência pós-operatória e

desenvolvimento de metástases. Estudos clínicos associaram altas concentrações de PGE2 com elevado potencial metastático e uma falta de receptores estrogênicos e progesterona [4].

Entretanto, alguns estudos relataram uma fraca expressão de COX-2 em câncer de mama. No maior estudo realizado, a expressão de COX-2 foi observada em apenas 8 de 46 amostras estudadas. A hipótese era que a produção de prostaglandina poderia ser devido à superexpressão de COX-1 nas células do câncer de mama. Por outro lado, o desenvolvimento de angiogênese e metástase dos linfonodos demonstraram ser mais frequentes em tumores que expressavam a COX-2 e PGE2 [11].

A Tabela 3.1 resume os níveis da COX-2 na expressão do câncer de mama invasivo, DCIS e epitélio normal da mama. A alta frequência de expressão de COX-2 foi observada em células epiteliais de adenocarcinomas mamários e em áreas adjacentes aos DCIS. Além disso, a maior frequência de COX-2 em DCIS versus câncer de mama invasivo sugere que a regulação da COX-2 é um acontecimento relativamente precoce na carcinogênese mamária. Os autores concluíram que a expressão continuada de COX-2 poderá se tornar menos importante após a ocorrência de um tumor invasivo [10].

Tabela 3.1: A expressão de COX-2 foi determinada considerando o produto da intensidade da coloração e a porcentagem de células tumorais [10].

Nível da expressão citoplásmica de COX-2 por imunohistoquímica em tecidos de mama humanos		
Câncer invasivo	Carcinoma ductal <i>in situ</i>	Epitélio normal
Negativas (57%)	negativas (37%)	negativas (19%)
Positivo (43%)	positivas (63%)	positivas (81%)

Grudzinski *et al.*(2006) [21] avaliaram a expressão da COX-2 em 72 pacientes com carcinoma ductal invasivo de mama, dentre elas, cinquenta e uma pacientes tiveram expressão positiva para a COX-2 (71%). Do total de 15 pacientes com recidiva local, 13 apresentaram a expressão da COX-2 no tumor. Concluíram então que a expressão positiva da COX-2 em linfonodos axilares com ou sem metástase parece ser um fator prognóstico independente para sobrevida livre de doença.

3.6.5 Inibição da COX-2 no câncer de mama

Uma grande quantidade de dados já existe atualmente apoiando a capacidade de inibidores da COX para prevenir o desenvolvimento de tumores de mama em modelos

animais. A maioria tem mostrado que a inibição de COX-1 e 2 e a inibição seletiva da COX-2 podem reduzir a incidência e multiplicidade do tumor. O tratamento do câncer de mama estabelecido com inibidores da COX-2 demonstrou ser bem sucedido no modelo de ratos. Ratos com tumores palpáveis posteriormente alimentados com uma dieta contendo os inibidores seletivos da COX-2 (Celecoxib) apresentaram uma redução no volume tumoral.

Os inibidores da COX poderiam ser usados em mulheres com um alto risco para desenvolver o câncer de mama. Isso pode incluir mulheres com uma forte história de doença familiar, aquelas com um alto risco devido à exposição a agentes conhecidos promotores de câncer, como por exemplo, a terapia de reposição hormonal, e pacientes com um risco muito elevado (carregadores dos genes BRCA1 e BRCA2).

Outro papel potencial para inibidores de COX seria no tratamento de pacientes com lesões pré-malignas, precocemente malignas ou mesmo tratadas cirurgicamente. Neste caso, estudos experimentais já sugeriram que certos subtipos de tumores podem ser mais ou menos propensos a expressão de COX-2. Isto poderá significar que os pacientes cujos tumores mostram muita expressividade de COX-2 se beneficiariam de AINEs [10].

Modelos *in vitro* com a combinação de AINEs e quimioterápicos convencionais têm mostrado efeitos sinérgicos sobre o crescimento e desenvolvimento tumoral. Combinações de um inibidor da COX com agentes quimioterápicos como a cisplatina e ciclofosfamida resultaram em atraso no crescimento do tumor e uma diminuição do número de metástases pulmonares [13].

As combinações de AINEs com radioterapia também revelaram um efeito sinérgico no crescimento e desenvolvimento do tumor *in vitro*. Estudos têm utilizado modelos animais com sarcoma e receberam irradiação com ou sem SC-236, um inibidor seletivo da COX-2. A droga inibiu o crescimento tumoral e reforçou o efeito de radioterapia, sem afetar a resposta do tecido normal à radiação. Inibidores seletivos da COX-2 potencializam o efeito da radiação em tumores que expressam COX-2, mas não sobre tumores sem COX-2 [13].

Kima, *et al.* (2003) trataram células de câncer de colo de útero com várias concentrações de aspirina durante 48 horas e encontraram sinais apoptóticos após o uso desse medicamento. Também sugeriram que a aspirina poderia eliminar a capacidade das células cancerígenas em formarem colônia por citotoxicidade. Propuseram então que a aspirina é um co-fator para aumentar a eficiência da radioterapia. Sugeriram ainda que a terapia combinada de aspirina e radiação pode contribuir para a diminuição da incidência de câncer do colo do útero [22].

Resultados encorajadores também foram observados utilizando combinações dos inibidores da COX-2 e terapia hormonal, ou COX-2 como terapia única. Em cânceres de mama sensíveis a hormônios, Chow *et al.* (2003) [23] compararam terapia anti-aromatase (exemestano) e inibidores da COX-2 com exemestano isoladamente ou com Letrozol em uma configuração neoadjuvante em pacientes com câncer de mama pós-menopausa. Os resultados da análise preliminar são animadores, pois todas as pacientes apresentaram resposta clínica e houve diminuição na área tumor, mas uma conclusão definitiva só poderá ser estabelecida após a conclusão do estudo.

O interesse em COX-2 como um alvo molecular terapêutico foi, em parte, devido à eficácia dos AINEs na prevenção do câncer. Esta idéia foi baseada na consideração de que enzimas COX são alvos de AINEs. Recentes experimentos contestaram esta teoria e levou ao desenvolvimento de um novo conceito: COX independência. Diferentes metabólitos de sulindac podem induzir apoptose independentemente da sua capacidade de inibir COX-2 [13].

A ligação entre a COX-2 e os sistemas de enzima aromatase no câncer sugere que a inibição da COX-2 e da aromatase pode ser mais útil do que cada uma isolada. Isso pode ter implicações para o tratamento de pacientes com regimes estabelecidos de quimioterapia, e poderia proporcionar uma razão para a terapia adjuvante com AINEs [10].

Parece atraente minimizar a perda dos efeitos de proteção da isoenzima COX-1 usando inibidores seletivos da COX-2 em malignidades. Estudos experimentais demonstraram, no entanto, que a atividade desregulada da COX-1 também está presente nos tumores de mama. Isto leva a considerar se apenas a inibição da COX-2 no estado maligno estabelecido seria eficaz, ou ainda, se esta estratégia incentivaria a consequente superatividade do sistema enzimático COX-1. Em modelos animais, a inibição específica de COX-2 e a inibição generalizada da COX parecem ser eficazes na prevenção da incidência e multiplicidade do tumor [10].

Os papéis distintos das isoenzimas COX exigem um detalhado exame das possíveis consequências biológicas do longo-prazo na supressão da COX nos pacientes. Efeitos sugeridos em estudos realizados em animais incluem infertilidade, teratogenicidade e malformações congênitas cardiovasculares. Se estes efeitos podem ocorrer em seres humanos certamente merece maior investigação [10].

Davies, em 2003, concluiu que os inibidores da COX-2 podem ter um papel na quimioprevenção, baseado em parte em seus efeitos anti-angiogênicos e pró-apoptóticos e em parte sobre a inibição da síntese de estrogênios [4].

Desde que a imprópria e anormal superexpressão da COX-2 está implicada na patogênese de diversos tipos de cânceres humanos, esta enzima indutível pode ser um biomarcador substituto útil para a avaliação de quimiopreventivos incluindo AINEs. A inibição farmacológica da COX-2 reduz a formação de tumores no intestino, esôfago, mama, pulmão e na bexiga de animais, o que apóia a idéia de que inibidores da COX-2 podem ser úteis para prevenir o câncer.

3.7 Referências bibliográficas

- [1] Silva, T. H. A.; Butera, A. p.; Leal, D. H. S.; Alves, R. J. Agentes antitumorais inibidores da angiogênese - Modelos farmacofóricos para inibidores da integrina $\alpha\gamma\beta 3$. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* v.43, n.1, 2007.
- [2] Terry, M. B.; *et al.* Association of Frequency and Duration of Aspirin Use and Hormone Receptor Status With Breast Cancer Risk. *JAMA*, v. 291, n. 20, 2004.
- [3] Gilman, A. G.; Hardman, J. G.; Limbird, L. E. Goodman & Gilman *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10^a ed., McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 2003.
- [4] Davies, G.L.S. Cyclooxygenase-2 and chemoprevention of breast câncer. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 86, p. 495–499, 2003.
- [5] Disponível em: <<http://www.aspirin.org/>>, acessado em 15/02/2008.
- [6] Disponível em: <<http://www.s bq.org.br/PN-NET/causo5.htm>>, acessado em 20/05/2007.
- [7] Agosta, W. C. Medicines and Drugs from Plants. *J. Chem. Ed.* n. 74, p. 857-860, 1997.
- [8] Disponível em: <[www.dqb.fc.ul.pt/cadeiras/qgb/Microsoft%20Word%20-%20QGB aspirina .pdf](http://www.dqb.fc.ul.pt/cadeiras/qgb/Microsoft%20Word%20-%20QGB%20aspirina.pdf)>, acessado em 20/05/2007.
- [9] Chun, KS.; Surh, YJ. Signal transduction pathways regulating cyclooxygenase-2 expression: potential molecular targets for chemoprevention. *Biochemical Pharmacology*. v. 68, p. 1089–1100, 2004.
- [10] Singh-Ranger, G.; Mokbel, K. The role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in breast cancer, and implications of COX-2 inhibition. *EJSO*; v. 28, p. 729-737, 2002.
- [11] Chung, Y. M.; Bae, Y. S.; LEE, S. Y. Molecular ordering of ROS production, mitochondrial changes, and caspase activation during Sodium Salicylate-induced apoptosis. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 34, n. 4, p. 434–442, 2003.
- [12] Giovannucci, E. The prevention of colorectal cancer by aspirin use. *Biomed & Pharmacother*, v. 53, p. 303-308, 1999.

- [13] Méric, J-B.; *et al.* Cyclooxygenase-2 as a target for anticancer drug development. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. v. 59, p. 51–64, 2006.
- [14] Liu CH, Chang SH, Narko K, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem*. v. 276, p.18563–9, 2001.
- [15] Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, et al. Suppression of intestinal polyposis in APC delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2). *Cell*; v. 87, p. 803–9, 1996.
- [16] Hsu, C. S.; Li, Y. Aspirin potently inhibits oxidative DNA strand breaks: implications for cancer chemoprevention. *Bioch. and Bioph. Res. Comm.* V. 293, p. 705–709, 2002.
- [17] Brueggemeier, R. W.; *et al.* Aromatase and COX in breast cancer: Enzyme inhibitors and beyond. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, v. 106, p. 16–23, 2007.
- [18] Chan, T.A.; *et al.* Mechanisms underlying nonsteroidal anti-inflammatory drugmediated apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 95, p. 681–686, 1998.
- [19] Parret, M.L.; *et al.* Cyclooxygenase-2 gene expression in human breast cancer. *Int J Oncol*;; v. 10, p. 503-8, 1997.
- [20] Ristimaki, A.; *et al.* Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*, v. 62, p. 632-5, 2002.
- [21] Grudzinski, M. *et al.* Expressão da COX-2 e CD105 no câncer de mama e sobrevida livre de doença. *Rev Assoc Med Bras*, v. 52(4), p. 275-80, 2006.
- [22] Kima, K. Y.; Seola, J. Y.; Jeonb, G.; Nama, M. J. The combined treatment of aspirin and radiation induces apoptosis by the regulation of bcl-2 and caspase-3 in human cervical cancer cell, *Cancer Letters*, v. 189, p. 157–166, 2003.
- [23] Chow LW, Wong JL, Toi ML. Celecoxib anti-aromatase neoadjuvant trial for locally advanced breast cancer: preliminary report. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 86, p.443–7, 2003.

Capítulo 4 - Dendrímeros: uma nova luz no tratamento do câncer

4.0 Introdução

O desenvolvimento de nanoestruturas moleculares com tamanho e forma de partículas bem definidos é de grande interesse em certas aplicações biomédicas, tais como sistemas para transporte de fármacos, agentes de contraste ou transfecção de genes. Os materiais utilizados como carregadores de fármacos deverão possuir escala nanométrica e tamanho uniforme para aumentar sua capacidade de atravessar membranas celulares [1].

O termo dendrímero deriva do grego “dendron” e “mero”, que quer dizer respectivamente árvore e parte ou fração. Topologicamente descreve uma arquitetura de uma nova classe de moléculas que são fundamentalmente formadas por um núcleo que é uma molécula à qual se ligam “ramos”. Estas moléculas altamente ramificadas, também são altamente simétricas. Em gerações muito altas, a partir da 4^a geração, elas tendem a apresentar uma estrutura globular devido às interações entre as cadeias, como é ilustrado na Figura 4.1 [2].



Figura 4.1: Uma estrutura dendrítica típica [2].

A nanomedicina, um ramo da nanotecnologia, se refere à intervenção médica em escala molecular altamente específica para o tratamento de doenças ou reparo de tecidos danificados. Nos últimos anos, a nanomedicina baseada em polímeros tem recebido atenção crescente devido à suas habilidades de melhorar a eficiência da terapêutica do câncer [3].

A terapia do câncer se tornou um desafio multidisciplinar, requerendo a colaboração entre médicos, biólogos, químicos, físicos, cientistas de materiais e engenheiros biomédicos. A quimioterapia é a maior abordagem terapêutica para o tratamento do câncer. Em geral, a aplicação clínica de quimioterápicos envolve altos riscos para o paciente, porque os medicamentos não são específicos para as células cancerígenas. A maioria dos pacientes sofre

os efeitos colaterais, tais como a diminuição na qualidade de vida e os tratamentos repetitivos. A ineficiência e os efeitos colaterais da quimioterapia são associados com a formulação e a biodistribuição do medicamento, toxicidade a células normais e aquisição de resistência pelas células de câncer. Com o objetivo de fornecer a maior porção do medicamento ao local alvo e por um período de tempo prolongado, os medicamentos devem apresentar liberação controlada e vetorizada. Estas propriedades podem ser obtidas com o desenvolvimento de formulações em escala nanométrica [3].

4.1 Síntese de dendrímeros

As três classes tradicionais de arquitetura macromolecular dos polímeros, linear, com ligações cruzadas e ramificada, são amplamente reconhecidas por gerar vários produtos polidispersos de diferentes pesos moleculares. Em contrapartida, a síntese de dendrímeros oferece a oportunidade para gerar uma estrutura monodispersa com arquitetura macromolecular controlada semelhante àquelas observadas nos sistemas biológicos. As estruturas poliméricas estão ilustradas na Figura 4.2 [2].

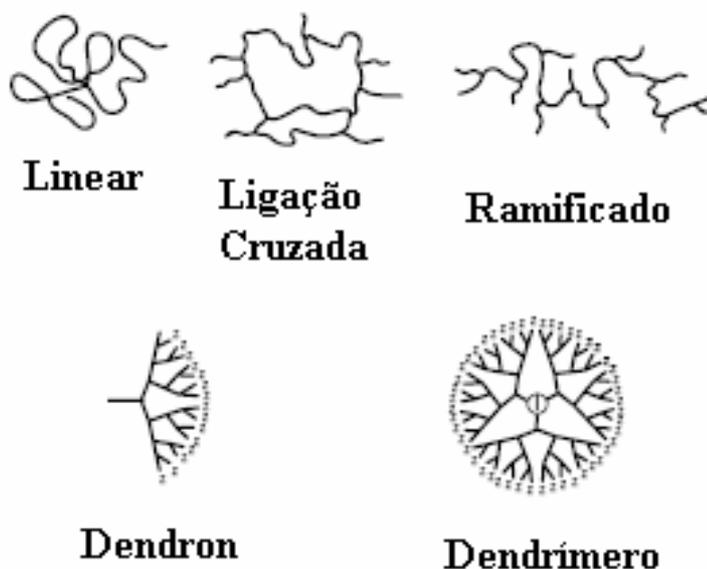


Figura 4.2: Estruturas poliméricas [4].

No ano de 1978, as primeiras estratégias sintéticas para produzir macromoléculas dendríticas monodispersas com estrutura controlada foram iniciadas pelo grupo de Vögtle. Os dendrímeros podem ser sintetizados a partir do método divergente ou processo de crescimento convergente. A síntese divergente é o método no qual o crescimento do dendrímero ocorre a

partir de um núcleo. Este método envolve o crescimento radial da molécula em módulos, ramo-por-ramo de acordo com certas regras e princípios dendríticos (Figura 4.3) [1-8].

Este método é caracterizado por reações que ocorrem por um aumento do número de sítios, como se o dendrímero estivesse sendo construído de dentro para fora. As camadas externas passam a constituir a estrutura interna do dendrímero. Uma característica deste método é que há um rápido aumento do número de grupos terminais reativos. Entretanto, quanto mais a molécula cresce, maiores imperfeições e falhas ocorrem. Isto se deve ao fato de que reações incompletas dos grupos terminais podem ser observadas [1, 4, 5].

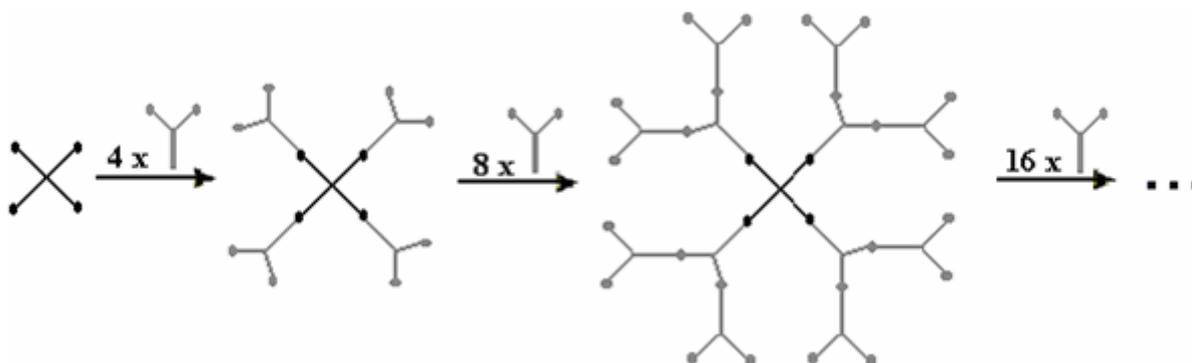


Figura 4.3: Figura esquemática do método divergente de crescimento de dendrímeros [5].

Embora seja comumente utilizado para a obtenção de grandes quantidades de dendrímeros, o método de síntese divergente apresenta como principais inconvenientes as reações incompletas dos grupos terminais que introduzem defeitos na macromolécula. Para impedir a formação de defeitos, normalmente utilizam-se grandes quantidades de precursores, o que dificulta a purificação do produto final [4-6].

A síntese divergente é atualmente a rota preferida pelos produtores mundiais por ser um método mais rápido, incluindo Dendrimax (Ann Arbor, MI, E.U.A.), DSM Fine Chemicals (Geleen, Holanda) e grupo Perstorp (Perstorp, Suécia) [4].

O segundo método para a síntese de dendrímeros segue um processo de crescimento convergente. Essa síntese começa pelo que se tornará a periferia do dendrímero, ou seja, fazendo-se os ramos e só depois juntando-se o núcleo para produzir o dendrímero. O princípio básico do método convergente envolve a construção de pequenos fragmentos denominados dendrons que sofrem policondensação e constituem o núcleo central e que, conseqüentemente, evoluem para a formação final do dendrímero. A estratégia da síntese convergente limita a construção de gerações de dendrímeros mais baixas. A Figura 4.4 ilustra o procedimento geral dessa técnica [1-8].

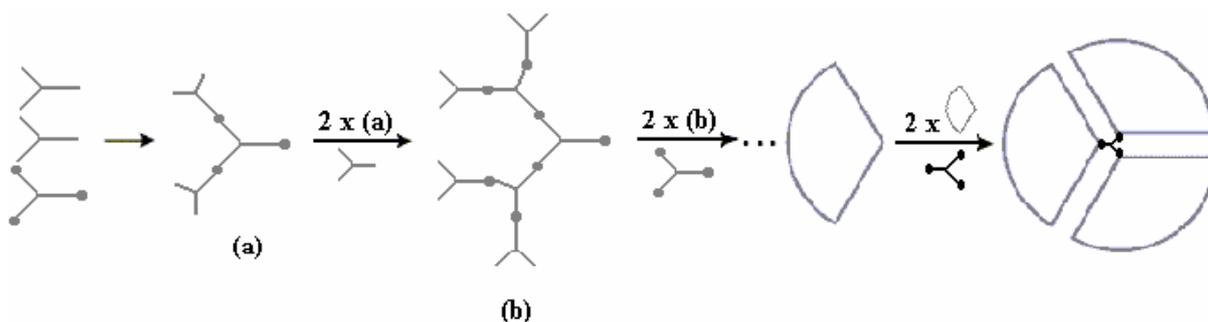


Figura 4.4: Representação esquemática de uma síntese dendrímica convergente [6].

A Figura 4.5 faz um paralelo comparativo entre os dois principais métodos de construção de macromoléculas dendríticas.

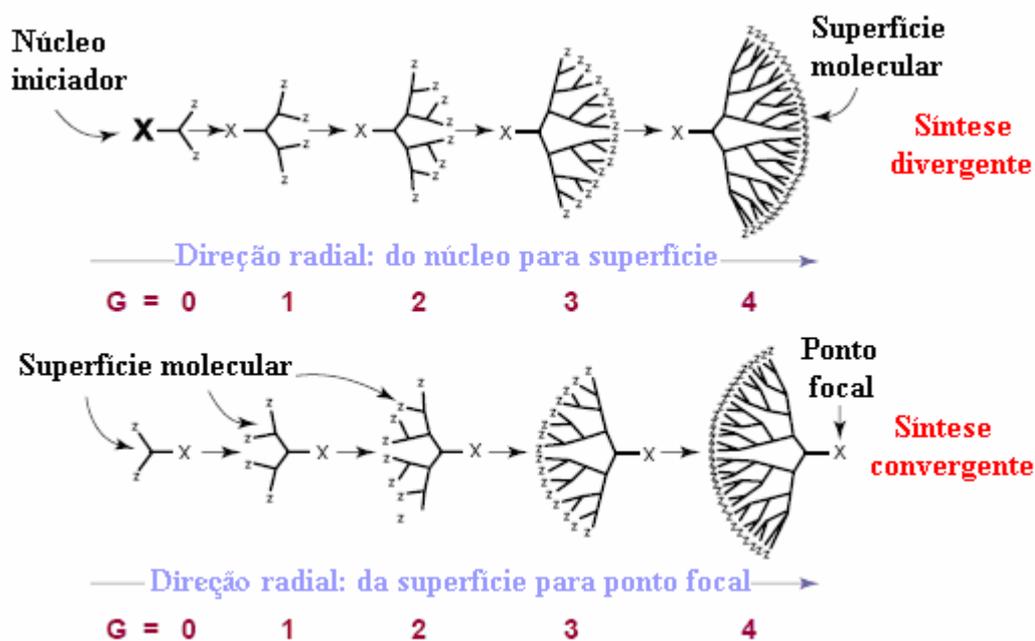


Figura 4.5: Os dois principais métodos de construção de macromoléculas dendríticas. Adaptada de [4].

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 (Figura 4.6). Os recentes sucessos em simplificar e otimizar a síntese de dendrímeros fornecem uma grande variedade de estruturas e ao mesmo tempo reduzem os custos da sua produção [1, 4].

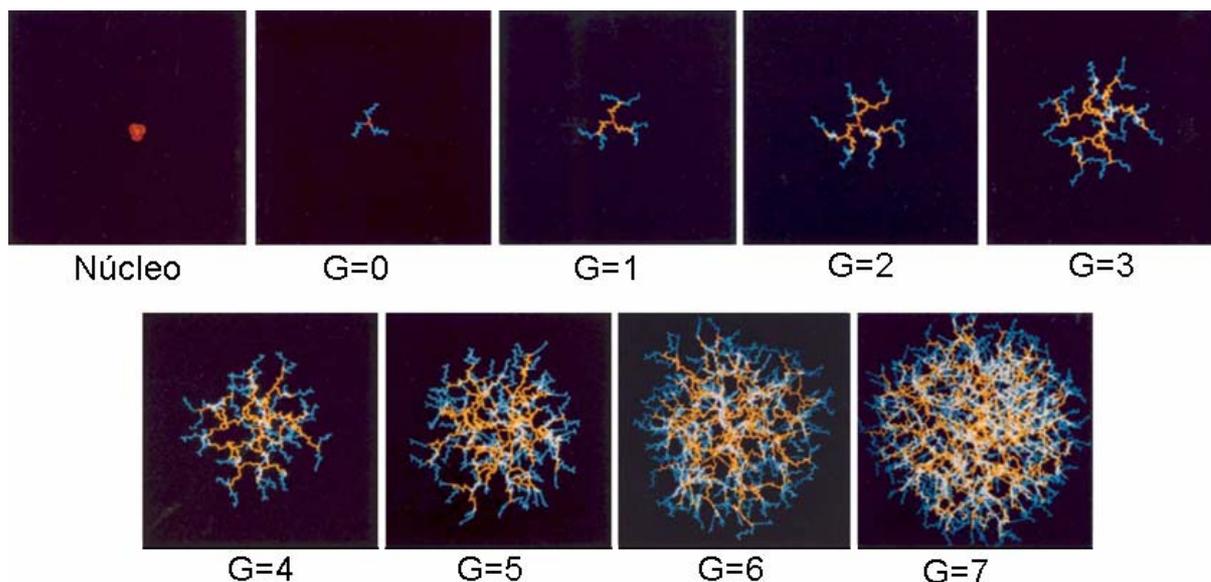


Figura 4.6: Representação de dendrímeros do núcleo até a geração 7, mostrando aumento linear no diâmetro e o crescimento exponencial do número dos grupos de superfície. Adaptada de [1].

4.2 Estrutura molecular e o mimetismo de proteínas

Todos os organismos vivos são dependentes de uma variedade de agentes químicos, físicos e biológicos que levam à síntese de uma grande variedade de nanobioestruturas precisas. Estas estruturas únicas como DNA e as proteínas são responsáveis pelo controle e desempenho de todas as funções vitais no organismo humano [6].

As proteínas são nanoestruturas tridimensionais com papéis estruturais e funcionais bem definidos. Como estratégia-chave das proteínas, pode-se citar que a síntese protéica e do DNA é uma sequência de monômeros covalentemente direcionada, tamanho/forma/superfície química são orientados pela auto-montagem, e a sequência induzida e ligações-cruzadas dentro das proteínas produzem os formatos tridimensionais. O tamanho é determinado pelo comprimento linear sequenciado (grau de polimerização) da cadeia polipeptídica. O adequado sequenciamento de todos os vinte tipos de cadeias laterais encontrados no repertório natural de aminoácidos define a estrutura secundária e terciária das proteínas. A forma, o desenho, a disposição da funcionalidade química e a flexibilidade são determinados pela sequência dos aminoácidos, que, por sua vez, conduzem ao processo de dobramento. A posição do aminoácido cisteína na cadeia do polipeptídeo principal determina a estrutura quaternária dominante, ou seja, a forma tridimensional, em proteínas de cadeia única e cadeia múltipla [6, 9].

O mimetismo e comparação de dendrímeros globulares com as proteínas foram feitos no início dos anos noventa. O requintado controle de tamanho, forma e superfície química dos dendrímeros, tem permitido a sua utilização como substitutos de proteínas em uma variedade

de aplicações. Tais usos incluem diagnóstico, entrega de gene, calibradores de massa molecular, apresentação de antígenos, mimese de enzimas e de proteínas globulares. Dessa forma, os dendrímeros são frequentemente referidos como “proteínas artificiais” [1, 4, 6].

A dimensão aproximada de tamanho e forma e a comparação de quase-equivalência da superfície dos dendrímeros às nanobioestruturas sugerem uma grande estratégia no biomimetismo como uma maneira de criar novos materiais com funções biológicas [4, 6]. Como exemplo, pode-se citar o dendrímero poli(amido amina) PAMAM, que corresponde ao tamanho e contornos de proteínas muito importantes: a insulina ($\approx 30 \text{ \AA}$), o citocromo C ($\approx 40 \text{ \AA}$) e a hemoglobina ($\approx 55 \text{ \AA}$) que são aproximadamente do mesmo tamanho e forma das gerações 3, 4 e 5 do dendrímero de PAMAM, respectivamente (Figura 4.7). As gerações 5 e 6 têm diâmetros aproximadamente equivalentes à bicamada lipídica das membranas das células biológicas. Estas propriedades fundamentais levaram à comercialização do dendrímero de PAMAM como substituto da proteína globular para imunodiagnósticos e aplicações de expressão do gene *in vitro* [4].

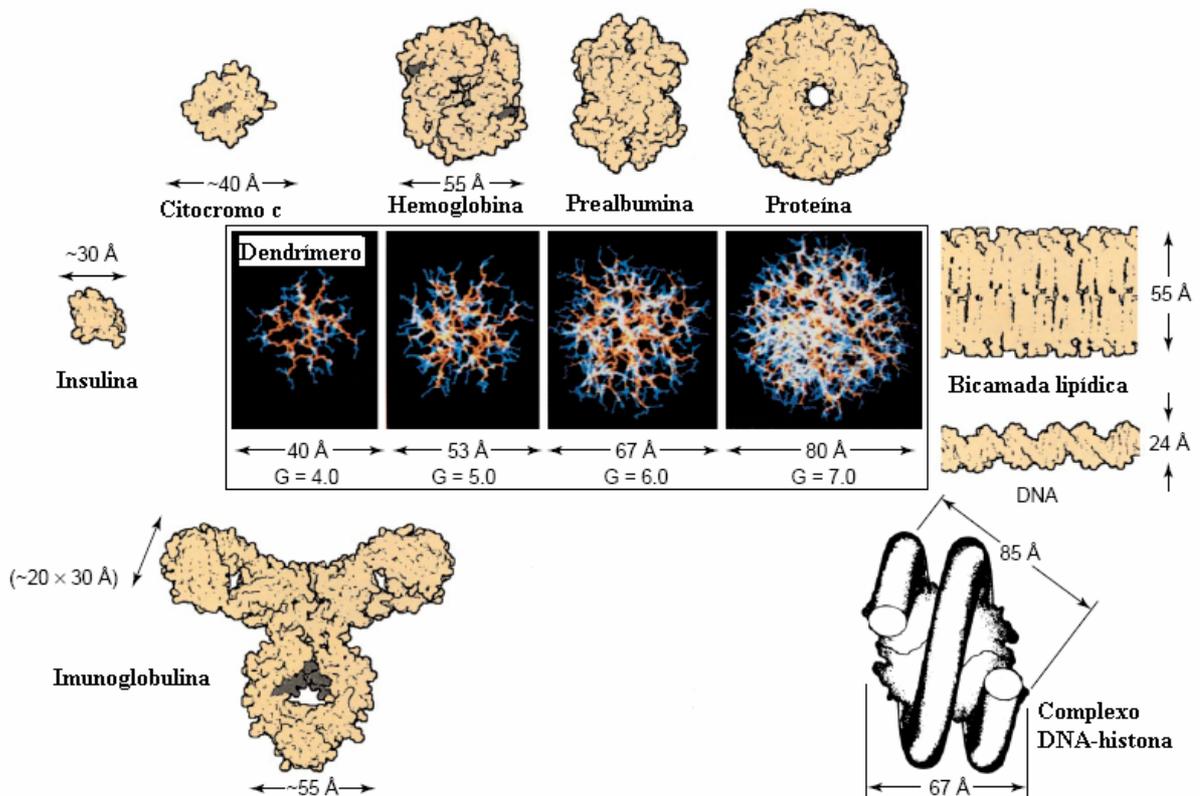


Figura 4.7: Escala dimensional comparando o dendrímero PAMAM (G = 4-7) com uma variedade de proteínas, bicamada lipídica e DNA. Adaptada de [4].

Apesar de haver muitas similaridades entre dendrímeros e proteínas globulares, é importante observar as diferenças significativas entre eles. Enquanto as proteínas globulares são estruturas terciárias que resultam de dobras da estrutura linear seqüencial complexa, elas são extremamente frágeis e suscetíveis a condições de desnaturação, como alta temperatura, luz e pH. Além disso, o dobramento das proteínas geralmente produz pacotes interiores densos e superfícies que possuem domínios altamente heterogêneos de funcionalidade, hidrofobicidade e hidrofiliçidade. Em contraste, dendrímeros são conhecidos por serem estruturas tridimensionais ligadas covalentemente e por possuírem um núcleo interno que pode atuar como reservatório nanoescalar e uma superfície exterior funcional homogênea e topologicamente definida (nanoarcabouço) [1, 6].

4.3 Propriedades físico-químicas e bioquímicas dos dendrímeros

Os dendrímeros podem ser visualizados como três domínios arquitetônicos críticos: (1) a superfície funcional, que contem um grande número de sítios potencialmente passivos/reativos (nanoarcabouço); (2) a casca interior, camada ramificada definida por dendrons, em volta do núcleo; e (3) o núcleo ao qual os dendrons estão presos. Os dois últimos domínios representam nanoambientes bem definidos que estão protegidos do exterior pela superfície do dendrímero, no caso de gerações maiores.

A alta densidade da superfície externa funcional torna a superfície do dendrímero apropriada como nanoarcabouço, onde a proximidade dos grupos funcionais é importante, ou para o propósito de receptor mediado por marcadores. Por outro lado, o interior é apropriado para atuar no encapsulamento de moléculas bioativas [1].

A arquitetura dendrítica é, sem dúvida, uma das mais difundidas topologias observadas universalmente em todos os sistemas biológicos. Esses padrões são encontrados em praticamente todas as escalas dimensionais de comprimento. Eles aparecem em diversos protótipos incluindo aqueles que podem ser medidos em metros, nas topologias circulatórias da anatomia humana que são encontrados em milímetros e centímetros, ou nos neurônios cerebrais em micrômetro (Figura 4.8) [1, 4].

Assim como as células biológicas possuem componentes do citoesqueleto (por exemplo, α - e β -tubulinas e microtúbulos), que definem simultaneamente a forma da célula e facilita o tráfico dentro do citoplasma, tal mimetismo existe dentro do interior de um dendrímero. É reconhecido que o interior dos dendrímeros pode ser facilmente concebido e reconfigurado para definir uma vasta gama de cavidades espaciais, como domínios hidrofóbicos e hidrofílicos, ligantes ou sítios de complexação ácido-base.

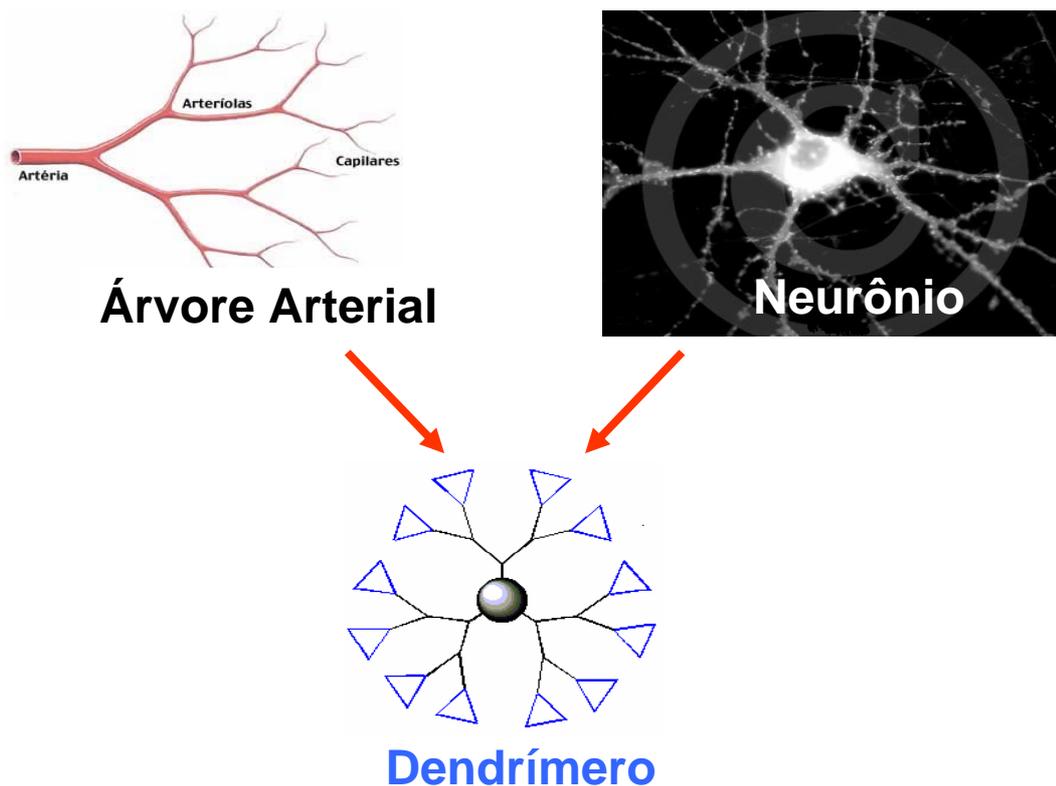


Figura 4.8: A arquitetura dendrítica nos sistemas biológicos [10 e 11].

As características estruturais covalentes dos dendrímeros oferecem uma variedade de tamanhos e formas definidos e permitem extensas modificações na superfície do dendrímero para controlar efetivamente a entrada e saída de moléculas hospedeiras.

De uma perspectiva termodinâmica, o encapsulamento, ou seja, a molécula livre ou complexada no dendrímero, pode ser distinguido por barreiras de energia finita relacionadas com a facilidade de entrada e saída nas cavidades do dendrímero. Se a molécula do fármaco é incompatível com a dimensão do dendrímero, ou apresenta caráter hidrofílico ou hidrofóbico diferente do dendrímero, pode não se formar o complexo ou o fármaco pode ser apenas parcialmente encarcerado dentro do dendrímero. Por outro lado, o componente hidrofóbico de um fármaco pode se isolar da interface exterior do complexo dendrítico para permitir um contato mínimo com domínios polar e aquoso.

Notavelmente, as propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas, assim como outras propriedades supramoleculares, como ligações não-covalentes e reação ácido-base, influenciam fortemente no encapsulamento.

O encapsulamento químico ou físico (Figura 4.9) está baseado na interação iônica ou qualquer outra forma de associação entre os dois compostos (por exemplo, ligação covalente,

ligação de hidrogênio, adsorção, absorção, ligação metálica e de van der Waals). Este encapsulamento pode ser reversível ou irreversível [7].

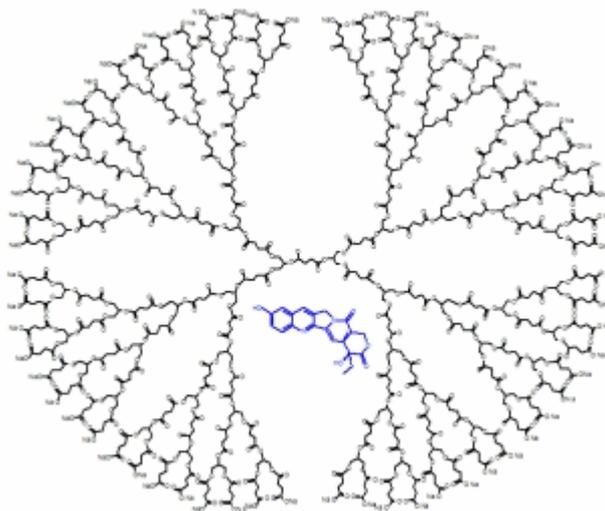


Figura 4.9: Medicamento encapsulado no interior de um dendrímero [12].

A análise de um dendrímero ramificado simétrico evidencia que há outros importantes parâmetros que podem controlar o espaço interior e a interação entre fármaco e carregador. Estes parâmetros incluem componentes como: ângulos de ramificação, ângulos de rotação e o comprimento da unidade repetitiva. De igual importância são as propriedades espaciais, físico-químicas e de afinidade química do núcleo [4].

A superfície dos dendrímeros proporciona uma excelente plataforma para a fixação de ligantes específicos de células, modificadores de solubilidade e moléculas que reduzem a interação com macromoléculas do sistema de defesa do organismo (Figura 4.10). A capacidade para anexar uma ou todas essas moléculas de uma forma definida e controlada sobre uma superfície dendrítica diferencia claramente os dendrímeros de outros carregadores, como micelas, lipossomas, gotículas de emulsão e engenharia de partículas [1].

Como propriedades bioquímicas, pode-se dizer que os dendrímeros devem exibir baixa toxicidade e não ser imunogênicos para serem amplamente utilizados em aplicações biomédicas. Até hoje, a citotoxicidade dos dendrímeros foi estudada *in vitro*, todavia poucos estudos *in vivo* foram publicados. Além disso, a citotoxicidade parece ser dependente da geração, quanto maior a geração, mais tóxico é o dendrímero [1].

A biocompatibilidade dos dendrímeros não é determinada unicamente pelos grupos de superfície. Dendrímeros que contêm um núcleo aromático poliéter e grupos de superfície aniônico carboxilado demonstraram ser hemolíticos em uma solução de células sanguíneas de

rato após 24 horas. Isso sugere que o interior aromático do dendrímero pode causar hemólise através do contato com membranas hidrofóbicas [1].

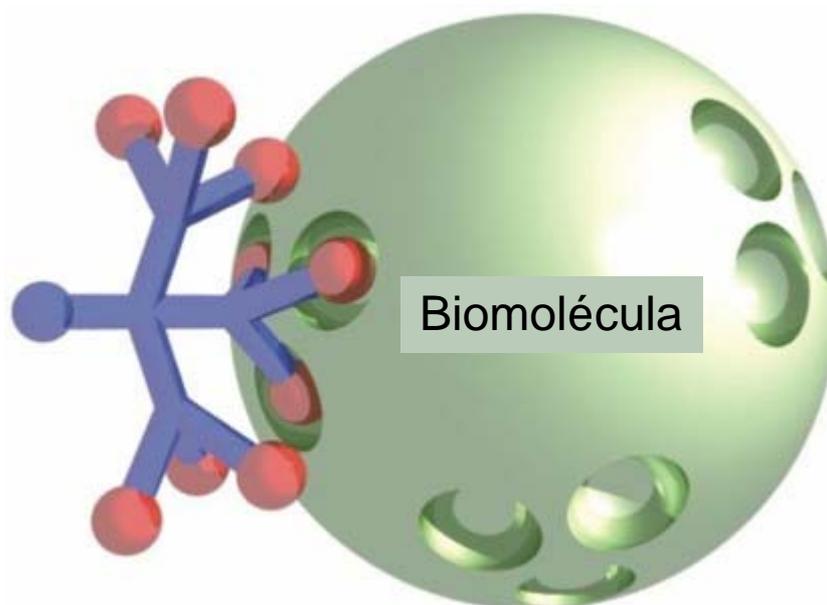


Figura 4.10: Molécula biológica ligada à superfície do dendrímero. Adaptado de [13].

Superfícies hidrofílicas reduzem a energia interfacial em um ambiente aquoso, assim previnem indesejável agregação, pois minimizam o reconhecimento por proteínas e células do corpo, permitindo a circulação no sangue por um longo período de tempo e aumentando assim a possibilidade de alcançar o local alvo [3].

Os dendrímeros são projetados para serem altamente biocompatíveis e hidrossolúveis. Além disso, alguns dendrímeros são desenvolvidos para serem biodegradáveis [8].

Os dendrímeros PAMAM apresentam caráter não imunogênico e baixa toxicidade em mamíferos, sobretudo quando sua superfície contém grupos funcionais do tipo aniônico ou neutro, tais como funcionalidades carboxílicas ou hidroxílicas. Além disso, em estudos comparativos entre dendrímeros PAMAM aniônicos (terminação carboxila) e catiônicos (terminação amina), os dendrímeros aniônicos mostraram menor citotoxicidade à células de mamíferos [1, 4, 7].

O alto nível de controle sobre a arquitetura dos dendrímeros, tamanho, forma, comprimento dos ramos e densidade, e a funcionalidade de superfície, fazem desses compostos carregadores ideais em aplicações biomédicas como o transporte de fármacos em locais específicos do sistema biológico [1, 4, 7].

Além disso, a notável similaridade das escalas de tamanho dos dendrímeros, controle preciso da estrutura e propriedades físico químicas comparadas com proteínas globulares, anticorpos e enzimas sugerem papéis promissores para estes materiais [4].

4.4 Aplicações dos dendrímeros como sistemas carregadores de fármacos

Os medicamentos para o tratamento do câncer que envolvem transporte de fármacos utilizam polímeros que devem apresentar, dentre outras características, biocompatibilidade e/ou biodegradabilidade e devem ser aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*). O fármaco ou é disperso dentro da nanopartícula polimérica ou conjugado com a estrutura do polímero. No primeiro caso, o fármaco encapsulado é liberado por difusão e no segundo caso, uma erosão de superfície ou degradação da matriz do polímero exerce um papel na liberação do medicamento e várias técnicas podem ser utilizadas para ajustar a taxa de liberação. Recentemente, polímeros funcionais são produzidos para a finalidade de liberação controlada de fármacos, como enxerto de polímero, blocos de copolímeros, polímeros dendronizados e dendrímeros (Figura 4.11) [3, 7].

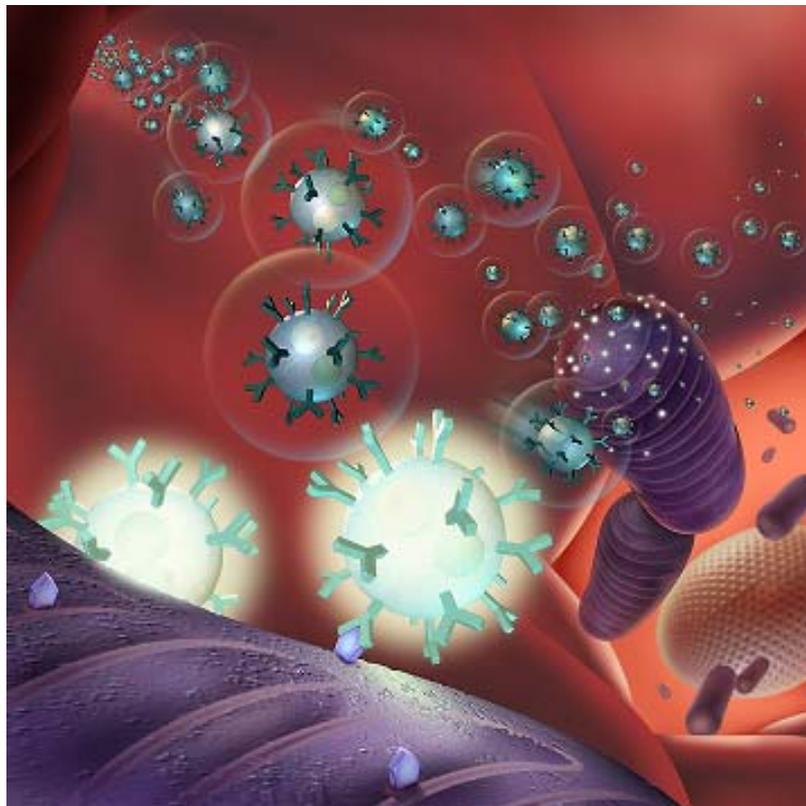


Figura 4.11: Ilustração idealizando a circulação de dendrímeros na circulação sanguínea. Estes se ligam aos receptores das células tumorais e liberam o fármaco no sítio alvo [14].

A utilização de polímeros como transportadores de fármacos, especialmente os que possuem baixa solubilidade em água e pH fisiológico, são tóxicos para o tecido normal, ou não podem ser administradas em dose suficiente, ganhou o interesse nos últimos anos [7].

Além de melhorar as propriedades do fármaco como solubilidade e tempo de circulação no plasma, carregadores poliméricos também podem facilitar o transporte passivo de drogas para tumores sólidos. Este transporte é possível devido ao aumento da permeabilidade vascular do tumor às macromoléculas e limitado devido à drenagem linfática. Combinados, esses fatores levam ao acúmulo seletivo de macromoléculas no tecido tumoral - um fenômeno denominado efeito de "reforço da permeação e retenção" (EPR).

A comparação das características de dendrímeros com as dos polímeros lineares mostra que a arquitetura dendrítica pode oferecer algumas vantagens para aplicações no transporte de fármacos. A funcionalidade controlada dos dendrímeros pode ser usada para juntar várias moléculas bioativas, grupos alvo e solubilizar grupos à periferia do dendrímero de uma forma bem definida. Além disso, a baixa polidispersividade de dendrímeros fornece comportamento farmacocinético em contraste com alguns polímeros lineares que contém frações com peso molecular muito diferentes dentro de uma determinada amostra. Além disso, a forma globular dos dendrímeros, em oposição à estrutura aleatória linear de polímeros, apresenta efeitos interessantes relacionados com a arquitetura macromolecular humana. Assim, as propriedades únicas de dendrímeros, quando comparados com polímeros lineares, tornam esses materiais interessantes candidatos para o desenvolvimento de sistemas de transporte de medicamentos antineoplásicos [8].

Os dendrímeros têm sido utilizados como carregadores de uma variedade de pequenas moléculas farmacêuticas (Tabela 4.1). Os agentes bioativos podem ser encapsulados no interior dos dendrímeros ou ser quimicamente anexados ou quimicamente absorvidos sobre a superfície do dendrímero, através de ligações covalentes ou complexação de transferência da carga, com a opção de personalizar as propriedades do transportador às necessidades específicas do material ativo e suas aplicações terapêuticas. Além disso, a alta densidade de superfície permite a fixação de grupos para terapia de alvo, bem como grupos que modificam o comportamento da solução ou toxicidade de dendrímeros [1, 15].

Tabela 4.1: Dendrímeros como transportadores de vários quimioterápicos utilizados no tratamento do câncer.

Quimioterápico	Dendrímero	Referência
Cisplatina	PAMAM	Tomalia e Svenson [1]
Doxorrubicina	PEO tipo estrela G2	Tomalia e Svenson [1]
Adriamicina	PEG + PAMAM G3	Tomalia e Svenson [1]
Tetotrexato	PEG + PAMAM G4	
5-Fluorouracil	PAMAM G4	Tomalia e Svenson [1]
Cisplatina	PAMAM	Malik, <i>et al</i> [7]
Cisplatina	PEO	Gillies e Fréchet [8]
Doxorrubicina		

Recentes progressos foram feitos na aplicação de dendrímeros biocompatíveis no tratamento do câncer, incluindo a sua utilização como sistemas de transporte de medicamentos de antineoplásicos potentes como a cisplatina e doxorrubicina [8].

Derivados dendríticos de baixo peso molecular baseados em proteínas com propriedades terapêuticas demonstrou melhorar as suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas [8].

O conjugado dendrímero-antineoplásico pode ser preparado por dissolução do dendrímero em um solvente adequado, como a água. Em seguida, o agente antineoplásico é conjugado com o dendrímero [7]. Como exemplo desse tipo de conjugado, o quimioterápico cisplatina foi encapsulado dentro do dendrímero PAMAM, formando, assim, um conjugado que exibe liberação lenta, acúmulo maior nos tumores sólidos e menor toxicidade comparada com a cisplatina livre [1].

Outro medicamento para o tratamento do câncer, doxorrubicina, foi covalentemente ligado ao carregador poli(óxido de etileno) tipo estrela (PEG) apresentando uma redução na citotoxicidade em 80-98%. Em outro estudo, cadeias de poli(etileno glicol) monometil éter foram fixadas a gerações 3 e 4 do dendrímero PAMAM terminado com PEG₂₀₀₀. O comportamento de encapsulamento desses compostos com os quimioterápicos adriamicina e metotrexato foram estudados (Figura 4.9). O dendrímero de geração 4 apresentou maior eficiência de encapsulamento. A liberação dos medicamentos foi lenta em solução iônica e rápida em solução isotônica [1].

O dendrímero PAMAM G4 apresentou adequado encapsulamento do quimioterápico 5-fluorouracil (Figura 4.12), reduzida taxa de liberação e baixa toxicidade hemolítica [1].

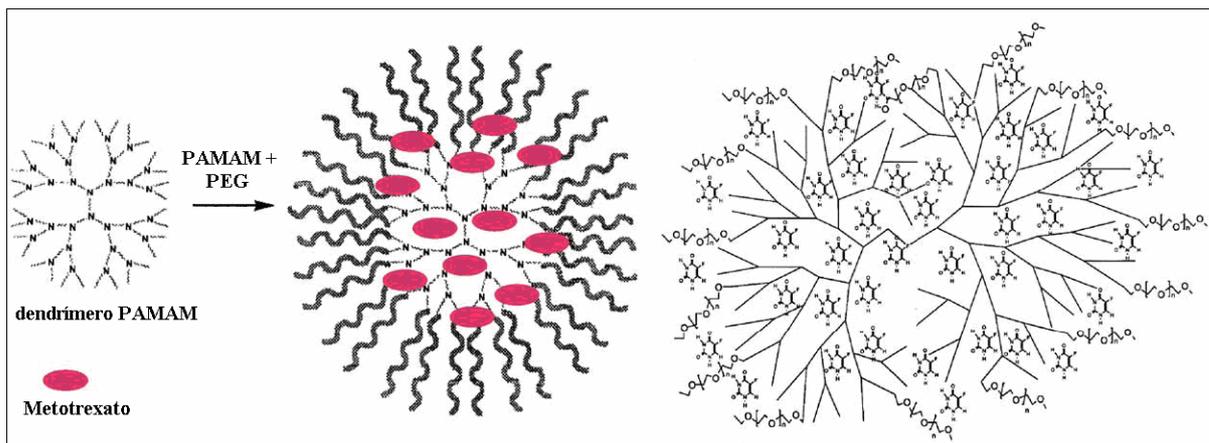


Figura 4.12: Representação esquemática de Metotrexato (esquerda) e 5-fluorouracil (direita) encapsuladas dentro de dendrímeros geração 3 e 4 de PAMAM +PEG. Adaptado de [1].

O dendrímero de poliglicerol (PGLD), ilustrado na Figura 4.13, é um polímero solúvel em água que contém grupos hidroxilas e ligações éter. A baixa citotoxicidade e a aprovação do poliglicerol (PLG) pela FDA, como emulsificante nas indústrias farmacêutica e alimentícia, fizeram dele um polímero promissor para o uso no campo biomédico. O PGLD apresenta baixa temperatura de transição vítrea (T_g) e alta densidade de grupos hidroxila locais, características que o tornam interessante. Estes grupos hidroxila funcionais podem ser modificados em um segundo passo sintético e utilizados como sítios para imobilização de compostos bioativos. O PGLD é preparado seguindo a metodologia de síntese divergente devido ao grau de controle fornecido por essa técnica [15, 16].

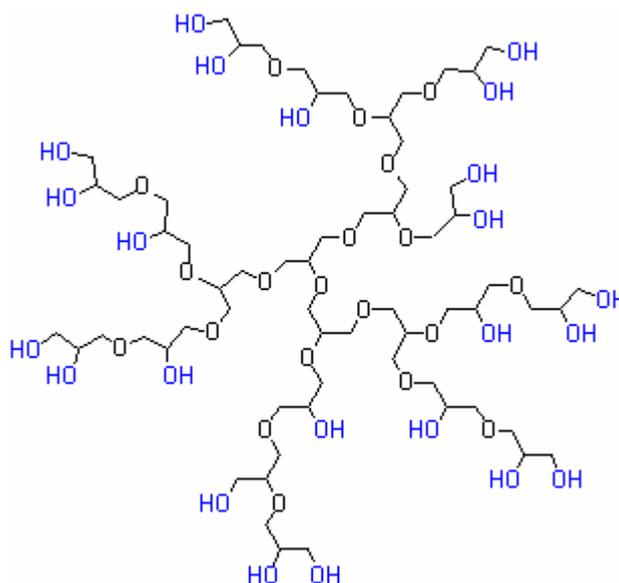


Figura 4.13: Dendrímero de poliglicerol.

Um método interessante de se obter dendrímeros tromborresistentes é a modificação das superfícies dendríticas através de um revestimento com biomoléculas com propriedades trombolíticas. O grupo de biomateriais da Unifei tem estudado as propriedades bioquímicas do bioconjugado obtido através da combinação entre a estreptoquinase (Sk) e o dendrímero PGLD G5 quanto à obtenção de superfícies fibrinolíticas. A compatibilidade sanguínea do bioconjugado PGLD-Sk foi avaliada por ensaios *in vitro* tais como a adesão plaquetária e a formação do trombo. Os resultados indicaram que o revestimento de PGLD-Sk apresentou caráter antitrombogênico [15].

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. Através desta arquitetura núcleo-casca, o transporte seletivo e a liberação das moléculas encapsuladas são possíveis tanto no meio hidrofílico quanto no meio hidrofóbico. Além disso, essas nanocápsulas dendríticas podem ser empregadas como moldes para a preparação de nanopartículas de metais de transição. Desde que o complexo dendrímero-prata seja preparado em uma base cujo molde seja o dendrímero, observou-se que existe um sinergismo na atividade antimicrobiana após testes *in vitro* de várias bactérias. Se o dendrímero não penetrar através da membrana, essas nanocápsulas podem ser úteis para tratamento antibacteriano de queimaduras [5].

Os dendrímeros têm se tornado um importante campo interdisciplinar na atual ciência dos polímeros. 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.

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 [5, 7].

É fato conhecido da literatura que o ácido acetilsalicílico (AAS) apresenta alguns efeitos colaterais com sérias limitações, especialmente para pacientes que necessitam de tratamentos por longo período de tempo. Através da inibição da enzima ciclooxygenase, o AAS inibe processos inflamatórios e alguns processos relacionados à carcinogênese. Porém, devido ao seu caráter não seletivo, também inibe processos fisiológicos importantes como citoproteção da mucosa gástrica e algumas funções da coagulação sanguínea.

A necessidade de uma elevada dosagem do AAS para o tratamento do 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.

Entretanto, devido às propriedades dos dendrímeros, como entrega controlada e vetorizada do medicamento ao local alvo e por um período de tempo prolongado, tornam o conjugado PGLD-AAS um sistema promissor para o tratamento do câncer.

4.5 Referências bibliográficas

- [1] Svenson, S.; Tomalia, D. A. Dendrimers in biomedical applications—reflections on the field. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 57, p. 2106–2129, 2005.
- [2] Disponível em: <<http://www.dq.fct.unl.pt/cadeiras/docinf/main/Trabalhos2003%20PDF/Artur%20Bento%20Dendr%EDmeros.pdf>>. Acesso em: 14 maio 2007.
- [3] Park, J. H. *et al.* Polymeric nanomedicine for cancer therapy. *Prog Polym Sci*, v. 33, n. 1, p. 113-137, 2008.
- [4] Esfand, R.; Tomalia, D. A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *DDT*, v. 6, n. 8, 2001.
- [5] Giarola, V. M. Ressonância de Plásmom de Superfície aplicada ao desenvolvimento de sistemas arborescentes hemocompatíveis. *Dissertação de Mestrado*. Universidade federal de Itajubá. 2007.
- [6] Tomalia, D. A.; *et el.* Structure control within poly(amidoamine) dendrimers: size, shape and regio-chemical mimicry of globular proteins. *Tetrahedron*, v. 59, p. 3799–3813, 2003.
- [7] Malik, N.; Duncan, R.; Tomalia, D. A.; Esfand, R. Dendritic-antineoplastic drug delivery system. *US Patent Issued* US200364050, 2006.
- [8] Gillies, E. R.; Fréchet, J. M. J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discovery Today*, v.10, n. 1, p. 35-43, 2005.
- [9] Tomalia, D. A. Introduction to “Dendrimers and Dendritic Polymers”. *Prog. Polym. Sci.* v. 30, p. 217–219, 2005.
- [10] Disponível em: <http://br.geocities.com/bermudesbio/materias/sistema_circulatorio/sistema_circulatorio1.jpg>. Acesso em 10 março 2008.
- [11] Disponível em: <<http://memoriasdeadriano.blogspot.com/2007/11/neurnio.html>>. Acesso em 10 março 2008.
- [12] Disponível em: <<http://www.york.ac.uk/depts/chem/staff/dks4.jpg>> Acesso em: 25 fevereiro 2008.

[13] Disponível em: <<http://people.bu.edu/mgrin/projectimages/delivery.jpg>>. Acesso em 10 março 2008.

[14] Disponível em: <<http://www.lifesciences.umich.edu/research/featured/050122/images/nanodrug3.jpg>>. Acesso em 10 março 2008.

[15] 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.

[16] Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=172.854>>. Acesso em: 28 fevereiro 2008.

Capítulo 5 – Objetivos da Dissertação

Há quase meio século, o ser humano vem utilizando macromoléculas sintéticas para a fabricação de biomateriais como, por exemplo, os polímeros que são projetados para serem utilizados em contato com o organismo biológico.

De origem petroquímica, os polímeros sintéticos afetaram não somente as engenharias, mas, principalmente, a medicina, a biotecnologia e a área farmacêutica. Esses novos materiais poliméricos, que interagem favoravelmente com o organismo biológico tornando possível a substituição de órgãos lesados irreversivelmente, promovem a qualidade de vida do paciente.

No final do século XX, surgiram as macromoléculas altamente ramificadas denominadas dendrímeros. Tais sistemas macromoleculares causaram uma verdadeira revolução nas áreas médica e farmacêutica, uma vez que mimetizam proteínas e agem como receptores artificiais de anticorpos, entre várias outras propriedades características desses materiais projetados.

Os dendrímeros são considerados atualmente como um dos blocos fundamentais da química nanoscópica. Tais compostos isomoleculares possuem um elevado nível de organização estrutural e marcam o início de uma nova era na ciência macromolecular: a era da química nanoscópica. A elevada densidade de grupos funcionais na superfície dos dendrímeros torna estes compostos bem interessantes para o projeto de carregadores de fármacos. Neste sentido, a aplicação de dendrímeros do tipo poligliceróis densamente ramificados com propriedades biocompatíveis, parece ser uma alternativa promissora para a obtenção de carregadores de quimioterápicos para o tratamento do câncer.

A pesquisa desenvolvida neste trabalho é multidisciplinar e envolve a biofísica de nanointerfaces. O objetivo geral é o desenvolvimento de interfaces multi-biofuncionais apoiadas por compostos com grupos farmacofóricos com propriedades anticoagulantes, de repressão da adesão e ativação plaquetária e atividade antitumoral.

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- (a) Sintetizar e caracterizar por técnicas físico-químicas o conjugado PGLD-AAS.
- (b) Estudar as propriedades de biocompatibilidade do conjugado PGLD-AAS, a saber: adsorção protéica, adesão e ativação plaquetária, formação de trombos, atividade anticoagulante e citotoxicidade.
- (c) Investigar as propriedades antitumorais do conjugado PGLD-AAS frente a células tumorais da linhagem MCF-7.

Capítulo 6 - Materiais e Métodos

6.1 Síntese e caracterização do PGLD-AAS

6.1.1 Síntese do poliglicerol com estrutura dendrítica

Neste trabalho é descrita a obtenção do poliglicerol com estrutura dendrítica (PGLD) [1-3] a partir da polimerização por abertura do anel do 2,3-epoxi-1-propanol (glicidol) utilizando-se a síntese divergente e um núcleo oligomérico de poliglicerol. A escolha do glicidol se deve à sua elevada reatividade em condições brandas de polimerização (baixa temperatura e pressão) e a propriedade de gerar poliéteres com elevada densidade de hidroxilas na superfície da macromolécula.

Inicialmente, um núcleo de poliglicerol (PGL) oligomérico foi preparado a partir da reação de eterificação da glicerina a 230°C utilizando-se Na₂CO₃ (0.34% m/m) em atmosfera de nitrogênio e 50 mmHg de pressão. A água reacional foi destilada em um equipamento Dean-Stark.

O PGL obtido foi purificado destilando-se a glicerina não reagida sob pressão reduzida (o ponto de ebulição da glicerina a 10 mmHg é de 160,8°C).

Após transferência do PGL para um reator tipo tanque agitado (CSTR) em aço inox 316 NL provido de um agitador tipo âncora (400 rpm), o sistema foi mantido sob vácuo a 100°C por 24 horas para remoção da umidade residual (<0,01% m/m, avaliada por Karl Fischer). O sistema reacional foi alimentado lentamente (vazão 0,1 mL.min⁻¹) com glicidol (50 mL) parcialmente desprotonado com metilato de potássio (3,7 M, Fluka). A temperatura do sistema reacional foi mantida em 90°C durante 12 horas de processo. Após conversão total, o poliglicerol dendrítico (PGLD) foi dissolvido em metanol e neutralizado após filtração em coluna trocadora de íons tipo catiônica. Depois foi purificado por diálise em membranas de acetato de celulose para remoção do poliglicerol não reagido. O PGLD obtido foi seco em seguida sob vácuo por 15 h a 80°C (10 mmHg).

6.1.2 Controle da reação de polimerização

A reação de polimerização foi acompanhada através de medidas do índice de refração do sistema reacional utilizando-se um laser de HeNe ($\lambda = 632,8$ nm, potência 10 mW). O

princípio básico do método baseia-se na variação do índice de refração do sistema reacional com o avanço da reação de polimerização.

Quando a luz laser incide no sistema reacional onde se processa a reação de síntese do dendrímero, a relação entre a fração de luz refletida e a transmitida é dada pela lei de Snell [4]:

$$\eta = \frac{\text{sen } i}{\text{sen } r} \quad (6.1)$$

sendo η , i , r , o índice de refração do meio e os ângulos de incidência e refração, respectivamente.

O experimento para monitoração do índice de refração em função do tempo é esquematizado na Figura 6.1. À medida que ocorre a formação do dendrímero o índice de refração do meio reacional varia proporcionalmente à posição (Y) da luz laser no anteparo.

O índice de refração (η) do sistema reacional é relacionado ao ângulo de refração (r) por:

$$r = \text{sen}^{-1} \left(\frac{4 - \eta^2}{3\eta^2} \right)^{1/2} \quad (6.2)$$

Do triângulo DCE na Figura 6.1, pode ser demonstrado que:

$$\frac{\theta}{2} + (180^\circ - r) + (i - r) = 180^\circ \quad (6.3)$$

ou:

$$\theta = 4r - 2i$$

Da Figura 6.1, observa-se que:

$$\theta = \frac{Y}{X} \quad (6.4)$$

Uma vez que X não varia significativamente durante o experimento, tem-se que Y é proporcional a $\tan \theta$. Portanto, o deslocamento no feixe de laser a ser medido durante o experimento é dado por:

$$Y \propto \tan \theta \left[4 \text{sen}^{-1} \left(\frac{4 - \eta^2}{3\eta^2} \right)^{1/2} - 2i \right] \quad (6.5)$$

A expressão (6.5) demonstra que a deflexão na luz laser será proporcional ao índice de refração do meio.

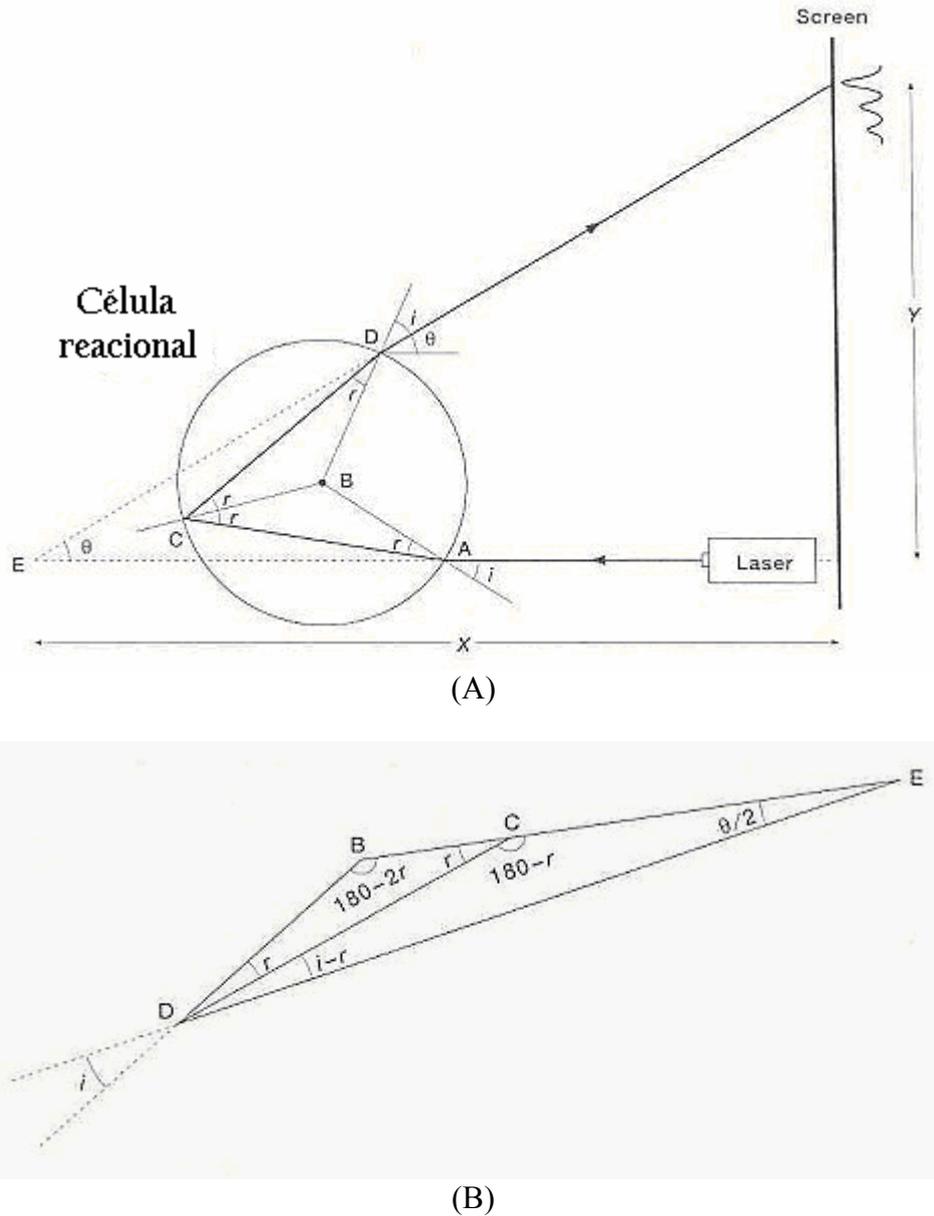


Figura 6.1: (A)Trajetória do laser através da célula reacional. Os ângulos de refração e incidência são definidos por r e i, respectivamente. (B) Elucidação das relações geométricas na célula reacional.

A reação para a obtenção do dendrímero de poliglicerol pode ser considerada um sistema ternário formado por glicidol (X_1), glicerina (X_2) e o poliglicerol (X_3). Portanto, o índice de refração (η) do sistema é dado por:

$$\eta = X_1\eta_1 + X_2\eta_2 + X_3\eta_3 \quad (6.6)$$

sendo que X_1 , X_2 e X_3 representam as frações molares do glicidol, glicerina e dendrímero, respectivamente.

Considerando que a reação de formação do dendrímero é do tipo $A \rightarrow B$, o índice de refração (η) de um dado sistema reacional pode ser escrito como:

$$\eta = \eta_A[A] + \eta_B[B] \quad (6.7)$$

sendo $\eta_A[A]$ e $\eta_B[B]$ as contribuições das espécies A e B participantes do sistema reacional. Portanto, a contribuição de A para o índice de refração do sistema reacional diminui, enquanto que a contribuição de B para η do sistema aumenta em função do tempo.

Considerando a reação de polimerização do glicidol como sendo de primeira ordem (ou pseudo-primeira ordem), reescreve-se a equação (6.7) como [5-7]:

$$\eta = \eta_{A, [A]_{t=0}} e^{-kt} + (1 - e^{-kt}) \eta_{B, [A]_{t=0}} \quad (6.8)$$

sendo $\eta_{A, [A]_{t=0}}$ definido como o índice de refração (η) no tempo t e $\eta_{B, [A]_{t=0}}$ representa η em $t = \infty$.

Assumindo conversão total na reação de polimerização, a equação (6.8) pode ser reescrita como:

$$\eta = \eta_{t=0} e^{-kt} + \eta_{t=\infty}(1 - e^{-kt}) \quad (6.9)$$

ou

$$(\eta - \eta_{t=\infty}) = (\eta_{t=0} - \eta_{t=\infty}) \cdot e^{-kt} \quad (6.10)$$

O percentual de conversão para a obtenção do dendrímero pode ser escrito como:

$$\% \text{Conversão} = \left(1 - \frac{[M]}{[M]_0} \right) \cdot 100 \quad (6.11)$$

sendo $[M]$ e $[M]_0$ a concentração de glicidol no tempo t e $t = 0$, respectivamente.

Portanto, combinando as equações (6.10) e (6.11), o percentual de conversão do monômero a polímero pode ser calculado através da expressão:

$$\% \text{Conversão} = \left(1 - \frac{\eta - \eta_{t=\infty}}{\eta_{t=0} - \eta_{t=\infty}} \right) \cdot 100 \quad (6.12)$$

A equação (6.12) permite o controle da reação de obtenção do dendrímero em tempo real, bastando para tanto, a medida da deflexão do feixe de laser em função do tempo.

6.1.3 Imobilização do AAS

O dendrímero de poliglicerol conjugado com o ácido acetilsalicílico (PGLD-AAS) foi preparado pela esterificação de ácido acetilsalicílico com PGLD utilizando 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) como agente desidratante e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como acilação catalítica. As reações de formação de éster procederam através de intermediários de o-aciluréia ou anidrido na presença de DMAP. O PGLD (1,0 g, 0,06 mM) e o ácido acetilsalicílico (Sigma, 2,0 g, 11,1 mM) foram dissolvidos em dimetilformamida (DMF) anidro. DCC (Sigma-Aldrich, 1,5 g, 7,28 mM) e DMAP (Aldrich, 0,24 g, 2,0 mM)

foram adicionados e o sistema reacional foi agitado continuamente durante 8 h à temperatura ambiente (25°C). A mistura da reação foi filtrada para remover a diciclohexiluréia formada durante a reação e dialisada em seguida em DMF durante 48 h para remover o AAS livre. O excesso de solvente foi removido sob vácuo à temperatura ambiente para obter o conjugado PGLD-AAS. O conjugado seco PGLD-AAS foi recristalizado de éter dietílico para retirar qualquer AAS não reagido. O dendrímero salicilado foi caracterizado por espectroscopia ^1H -RMN e ^{13}C -RMN.

6.1.4 Caracterização físico-química do PGLD-AAS

A estrutura do PGLD-AAS obtido foi caracterizada utilizando-se técnicas espectroscópicas (FTIR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e cromatografia de permeação em gel (GPC) no Instituto de Ciências e Tecnologia de Polímeros do Consejo Superior de Investigación Científica – ICTP/CSIC.

A ressonância magnética nuclear de próton (^1H -RMN) e carbono (^{13}C -RMN) foi efetuada em um espectrômetro Bruker 300 e 500 MHz (Figura 6.2) utilizando-se como solvente a água deuterada (D_2O).

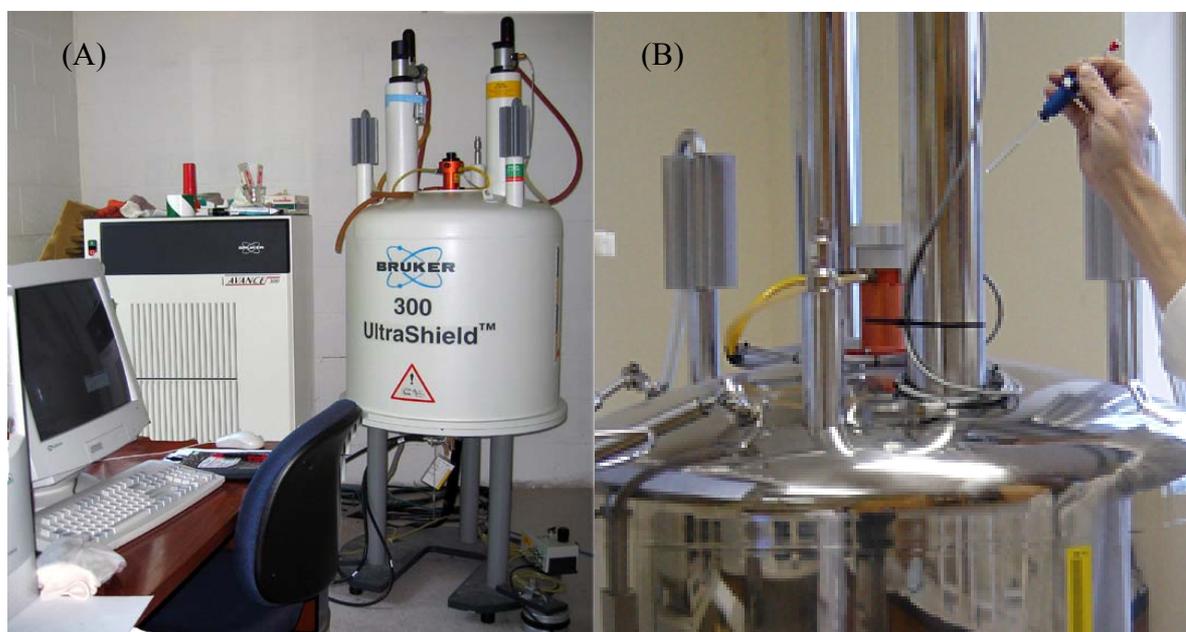


Figura 6.2: Equipamento de RMN Bruker 300 MHz (A) e Bruker 500 MHz (B) do ICTP/CSIC. Nota-se em (B) a introdução da amostra no equipamento de NMR.

A temperatura de transição vítrea (T_g) do PGLD foi determinada utilizando-se a calorimetria exploratória diferencial em um equipamento Perkin-Elmer DSC 7 em atmosfera de nitrogênio (40 mmHg) e velocidade de aquecimento de $5 \text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$. O intervalo de

temperaturas explorado foi de -110°C a 80°C . A amostra foi aquecida de -110°C até 80°C e em seguida resfriada rapidamente até -110°C . Atingido o equilíbrio térmico, a amostra foi submetida a novo aquecimento nas mesmas condições e novamente resfriada até -110°C . Uma última corrida foi então efetuada, até a temperatura de 80°C , e registrada.

A massa molecular e a polidispersividade do PGLD foram determinados por cromatografia de permeação em gel (GPC). Na análise por GPC, dimetilformamida com 0,2% LiBr (m/m) foi utilizado como eluente (fluxo $1,0\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, pressão 550psi). Os poli(etileno glicóis) (PEG) de massas moleculares 194, 960, 4.250, 18.600, 64.700 e 450.000g/mol foram utilizados para construção da curva de calibração. O sistema analítico consistiu de um cromatógrafo HPLC 510 da Waters equipado com detector 2414 (índice de refração) (Figura 6.3). Foram utilizadas colunas PLgel acoplada em série ($10.000\text{ \AA} + 1000\text{ \AA} + 100\text{ \AA}$, tamanho de partícula de $5\text{ }\mu\text{m}$). O volume de injeção da amostra foi de $20\text{ }\mu\text{L}$. A aquisição e tratamento dos dados cromatográficos foram efetuados com software SW da Waters Breeze 3.3.

A função de calibração foi calculada como sendo de 3^a ordem e a aplicação do método dos quadrados mínimos log (Massa Molecular) vs tempo de retenção forneceu um coeficiente de correlação igual a 0,9990.

As massas moleculares numérico (M_n) e ponderal (M_w) foram calculados por [8]:

$$M_n = \frac{\sum h_i}{\sum \frac{h_i}{s(Mp/s)_i^t}} \quad M_w = \frac{E \sum h_i s(Mp/s)_i^t}{\sum h_i} \quad (6.13)$$

sendo M_n e M_w as massas moleculares numérica média e ponderal média, respectivamente. O termo $(Mp/s)_i$ representa a massa molecular do polímero padrão utilizado para a construção da curva de calibração. A altura do pico no cromatograma do polímero fracionado e o volume de eluição são representados por h_i e i , respectivamente. Os termos s e t são constantes. O índice de polidispersão (IP) é definido como:

$$IP = \frac{M_w}{M_n} \quad (6.14)$$

O índice de hidroxila (N_{OH}) do PGLD foi determinado após acetilação do polímero (0,5-0,6 g) com 10 mL de uma solução de anidrido acético/piridina (1:9). Após refluxo por 30 minutos, a solução resultante foi titulada com NaOH 1,0 M utilizando-se fenolftaleína como indicador.

O N_{OH} foi calculado de acordo com [9]:

$$N_{OH} = \frac{(V_2 - V_1) \times 56,11}{m} \text{ mgKOH.g}^{-1} \quad (6.15)$$

sendo V_1 o volume de NaOH utilizado na titulação de um branco, V_2 o volume de NaOH utilizado na titulação da amostra e m a massa de PGLD empregada.



Figura 6.3: Equipamento para cromatografia de permeação em gel (GPC) Waters, modelo 510 utilizado neste trabalho. O equipamento pertence à Petroquímica União/SP.

6.1.5 Estudo da constante dielétrica (real e imaginária) do conjugado PGLD-AAS

Para um material ser reconhecido como próprio do organismo e não ser rapidamente eliminado ou causar alterações na resposta imunológica, este deve apresentar propriedades de hemocompatibilidade adequadas. Portanto é imprescindível que o material sintético não apresente diferenças significativas em relação à constante dielétrica (CD) do sangue.

Os ensaios da CD do PGLD-AAS foram realizados no Laboratório de Medidas Elétricas da UNIFEI. Foram utilizadas soluções do dendrímero diluídas em solução fisiológica (NaCl 0,9%) a 2, 4, 10, 20, 30 e 50% em massa, respectivamente.

Feita a calibração inicial do aparelho Precision LCR Meter (modelo HP4284A da marca Agilent Technologies), as soluções foram adicionadas na ordem crescente de suas concentrações, dentro de uma célula de ensaio do tipo Liquid Test Fixture modelo 16452A, da marca Agilent Technologies para a medida da CD (Figura 6.4). Preenchido o volume da célula (4,8 mL), fez-se a aquisição das medidas com frequências de 10 kHz, 100 kHz e 1 MHz para cada concentração. A aquisição dos dados foi efetuada pelo software Lab View.

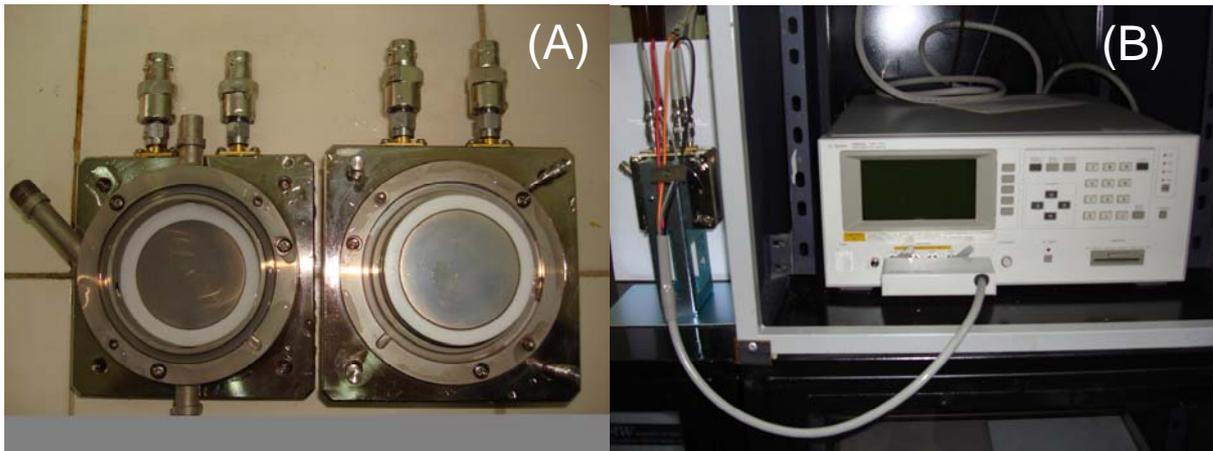


Figura 6.4: Ilustração da caixa de teste aberta (A) e do aparelho utilizado para a medida da constante dielétrica (B).

6.2 Caracterizações biológicas do PGLD-AAS

Os experimentos de caracterizações biológicas foram realizados no Laboratório de Biomateriais da UNIFEI.

6.2.1 Tempo de protrombina e tempo de tromboplastina parcial ativada [10]

O experimento foi realizado em um analisador de coagulação microprocessado da marca Drake (modelo Quick-Timer, fabricado em 1998, pela indústria nacional Drake Eletrônica e Comércio Ltda., aprovado pelo Inmetro) com o objetivo de avaliar o tempo de protrombina (TP) e tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPA). O aparelho possui um sistema detector fotométrico com agitador magnético, sensor de cubeta óptico reflexivo e um bloco termostatzado confeccionado em alumínio com controle eletrônico da temperatura (37°C) para incubação das amostras. O aparelho utiliza o plasma sanguíneo e reagentes comerciais para a determinação fotométrica do TP e TTPA. Para a determinação do TTPA foram utilizados reagentes adquiridos da empresa Wiener Laboratórios S.A.I.C. (indústria Argentina, lote 861230603): Cefalina com ácido elágico como ativador particulado e solução de cloreto de cálcio estável a 0,025 mol/L. Os valores de referência foram 30-43 s. Para valores anormais, consideram-se tempos maiores ou menores de 6 segundos dos valores de referência.

Para a realização do TP, foram utilizados os reagentes TP CLOT, fabricado por BIOS Diagnóstica Indústria e Comércio Ltda. (indústria nacional, lote C8002) e o Índice de Sensibilidade Internacional (ISI) 1,40. A composição do reagente de acordo com o fabricante

é extrato de cérebro de coelho, cloreto de cálcio, tampão e conservante. O valor do INR (Relação Normalizada Internacional) é dado pela expressão:

$$\text{INR} = \left[\frac{\text{TP do paciente}}{\text{TP do "pool" de plasmas normais "do dia"}} \right]^{\text{ISI}} \quad (6.16)$$

Os valores de referência do TP são 10-14s, a atividade de protrombina em % é de 70-100% e o INR entre 0,9 e 1,2.

Tanto para a realização do TTPA quanto do TP, foi necessário coletar sangue humano de paciente saudável com utilização de scalp número 23 e posteriormente depositar o sangue em tubo de ensaio estéril à vácuo, com anticoagulante citrato de sódio 0,38% (0,130 mol/L), na proporção de nove partes de sangue para uma de anticoagulante.

O tubo de ensaio contendo 4,5 mL de sangue humano e 0,5 mL do anticoagulante foi centrifugado a 3.500 rpm por 5 minutos. Após esse período, observam-se duas fases: na parte superior o plasma sanguíneo e na parte inferior, os elementos figurados do sangue. A cubeta estéril onde é depositado o plasma juntamente com os reagentes para a realização dos exames contém o volume máximo de 350 µL.

No teste de TTPA controle, utilizou-se 100 µL de plasma, 100 µL de reagente Cefalina com ácido elágico e 100 µL de solução de cloreto de cálcio a 0,025 mol/L. O volume máximo da solução utilizada foi de 350 µL.

No ensaio de TTPA com o dendrímero de PGLD-AAS, pipetou-se 100 µL de plasma e transferiu-se para uma cubeta previamente limpa e esterilizada, que já continha em seu interior um agitador magnético. Incubou-se o plasma, acrescentando 100 µL do reagente de cefalina com ácido elágico e 50 µL da solução de PGLD-AAS a 50% em massa, em solução fisiológica, a 37°C no próprio aparelho por 3 min. A cubeta foi colocada no analisador e adicionou-se 100 µL do cloreto de cálcio para realização da análise propriamente dita. O ensaio foi realizado em triplicata.

No teste de TP controle, a cubeta com volume máximo de 350 µL foi preenchida com 100 µL de plasma e 200 µL de reagente próprio. No ensaio de TP com o PGLD-AAS, foi pipetado 100 µL de plasma na cubeta previamente limpa e esterilizada, que já continha em seu interior o agitador magnético. O plasma e 50 µL da solução de PGLD-AAS a 50% (m/m) em solução fisiológica foram incubados a 37°C no próprio aparelho por 3 min. Em seguida, a cubeta foi colocada no analisador de fotometria onde foi então acrescentado 200 µL do reagente de cefalina com ácido elágico. O ensaio foi realizado em triplicata.

6.2.2 Adsorção protéica

As proteínas albumina de soro humano (HSA) e fibrinogênio humano (Fb) foram marcadas com ^{125}I segundo o método de Hunter-Greenwood modificado por Biscayart [10, 11]. Empregou-se 0,5-0,7 mCi (18,5-25,9 MBq) de radioisótopo, 1 mg de proteína em 30 μL de tampão fosfato (PBS) 0,05 M, pH 7,4. A reação procedeu-se à temperatura ambiente por 5 minutos adicionando-se em seguida 5 μg de metabissulfito de sódio em 5 μL do mesmo tampão PBS 0,05M. A purificação da proteína marcada foi feita por filtração em gel Sephadex G-100 para o HSA e G-250 para o fibrinogênio. Para um cálculo preciso dos coeficientes de distribuição dos picos radioativos (K_D). O coeficiente de distribuição permitiu a comprovação da pureza e identidade do marcado.

O estudo da adsorção de proteínas ocorreu após o contato dos poços das placas de Elisa previamente revestidos com o dendrímero PGLD-AAS com as proteínas marcadas radioisotopicamente. As superfícies sintéticas foram incubadas com as proteínas marcadas ($2,0 \cdot 10^5$ cpm.mL $^{-1}$) em solução PBS pH 7,4 equilibradas termicamente a 37°C. Após incubação por um período de 2 horas, a adsorção protéica foi avaliada após lavagem das superfícies sintéticas com PBS pH 7,4 a 37°C. A radioatividade das superfícies de poliestireno (PS) e PGLD-AAS foram avaliadas em um contador gama (Beckman) para a determinação da concentração das proteínas adsorvidas em função do tempo.

6.2.3 Adesão plaquetária

O ensaio de adesão plaquetária foi efetuado após contato da superfície de poliestireno (poços de placa Elisa) revestido com PGLD-AAS com plaquetas marcadas com ^{51}Cr [12]. No ensaio com plaquetas marcadas com ^{51}Cr , sangue humano foi coletado em solução de citrato de sódio (3,8%) e o plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado após centrifugação a 700xg por 5 minutos. Após adição de prostaglandina sódica (PGI_2 , 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e nova centrifugação do PRP a 900xg por 10 minutos as plaquetas foram resuspensas em solução de ACD pH 6,0 (6,85 mM citrato de sódio, 130 mM NaCl, 4 mM KCL e 5,5 mM de glicose). As plaquetas foram peletizadas novamente e em seguida resuspensas em solução de Hapes-Tyrode (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 0,42 mM NaH_2PO_4 , 12 mM NaHCO_3 , 5,5 mM glicose, 2% BSA e 5 mM ácido 4,2-hidroxietil-1-piperazina etanosulfônico). A concentração de plaquetas foi ajustada para cerca de $2 \cdot 10^9$ células.mL $^{-1}$ e em seguida foram marcadas com ^{51}Cr pela adição

de $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ ($\mu\text{Ci.mL}^{-1}$) e incubadas por 40 minutos a 20°C . As plaquetas marcadas com ^{51}Cr foram lavadas duas vezes com o tampão de Hepes-Tyrode, centrifugadas e resuspensas novamente no tampão. Após ajuste para uma concentração de 2.10^8 células. mL^{-1} , as plaquetas foram utilizadas no ensaio de adesão plaquetária.

Para o ensaio de adesão plaquetária, os poços da placa de Elisa foram revestidos com PGLD-AAS e em seguida imersos em tampão de Hepes-Tyrode por 1 hora a 37°C . Após remoção do tampão, a solução contendo as plaquetas marcadas com ^{51}Cr foram adicionadas através de uma bomba peristáltica e mantidas em condições de fluxo por até 4 horas. Os tubos foram em seguida lavados com a solução tampão de Hepes-Tyrode contendo solução de MgCl_2 1 mM. A radioatividade dos tubos foi medida em um contador gama. Os resultados foram expressos como a média de 5 experimentos.

Para observação do processo de adesão e agregação plaquetária nas superfícies das amostras de PS e PGLD-AAS, após contato com o PRP, estas foram desidratadas em etanol, secas em atmosfera de CO_2 (ponto crítico) e após revestimento com ouro foram observadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV Phillips XL 30).

6.2.4 Formação de trombos

A formação de trombos nas superfícies dos tubos de PS e PGLD-AAS foi estudada utilizando-se a metodologia inicialmente proposta por Imai e Nose [13]. Sangue humano recém coletado foi colocado em solução de ACD (citrato-dextrose) para impedir a hemólise dos glóbulos vermelhos. Após hidratação da superfície da placa de Elisa em solução PBS pH 7,4 a 37°C estas foram colocadas em contato com o sangue previamente preparado com a solução de ACD e em seguida a reação de coagulação foi iniciada pela adição de 20 μL de CaCl_2 a 3,8%. Após um determinado intervalo de tempo a reação de formação de trombos foi interrompida pela adição de água destilada. As superfícies testadas foram mantidas por 5 minutos em solução de glutaraldeído a 25% para a fixação dos trombos. Os tubos poliméricos foram em seguida secos sob vácuo a 25°C até peso constante.

A quantidade de trombos na superfície foi avaliada gravimetricamente pela equação:

$$\%Trombos = \frac{W_t}{W_g} \times 100 \quad (6.17)$$

sendo W_g a massa dos trombos formados no vidro após 60 minutos (referência de coagulação total) e W_t representa a massa dos trombos formados nos tubos poliméricos após um certo tempo de reação.

6.3 Atividade antitumoral

Os ensaios de verificação da atividade antitumoral e de citotoxicidade foram realizados no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), no Centro de Biotecnologia da Universidade de São Paulo (USP).

6.3.1 Teste de inibição do crescimento das células de tumor de mama MCF-7

Para este ensaio foram utilizadas linhagem celular do câncer de mama MCF-7 (ATCC número HTB-22TM) que foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de antibióticos (penicilina 100 UI e estreptomicina 10 µg/mL) mais fungizona (0,25 µg/mL) e 1% de L-glutamina mantido em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Para o ensaio foi utilizada uma placa de Elisa com 96 poços e foram distribuídas 6000 células por poço. O composto PGLD-AAS, assim como o controle PGLD, foi diluído no intervalo de dose 10 a 0,02% (v/v) com o fator de diluição 1:2 no próprio meio de cultura RPMI 1640 sem os suplementos. Foram esterilizados por filtração em 0,45 µM

Como controle positivo foi utilizado fenol 0,3% e como controle negativo, polietileno molecular de alta densidade; ambos no intervalo de 100 a 6,25% com o fator de diluição 1:2. Todas as diluições foram analisadas em quadruplicata. A viabilidade celular foi medida após 72 horas de incubação, com a adição de 20 µL de MTS 0,2% + PMS 0,9% (20:1). A leitura foi realizada duas horas depois em leitor de microplacas em 490 nm.

Os resultados foram expressos relacionando inibição do crescimento celular com concentração (v/v) do composto. Para o ajuste foi utilizado o modelo sigmoidal dose-resposta (declive variável) e determinado o EC50% (dose efetiva de 50%).

6.3.2 Análise da morfologia das células MCF-7 submetidas à ação do PGLD-AAS

Neste ensaio foi utilizada uma placa de cultura de 12 poços contendo 20.000 células por poço e adicionado a concentração da EC50% de PGLD-AAS e dos controles PGLD e meio de cultura. Foram feitas fotos da cultura celular em diferentes intervalos de tempo utilizando o microscópio invertido da marca Nikon e aumento de 200 vezes.

6.3.3 Ensaio de citotoxicidade contra células de mamíferos [14-16]

A norma ISO 10993 formula as regras e sugere alguns testes para avaliar os efeitos biológicos adversos de materiais (metais, cerâmicas, polímeros ou compósitos) utilizados em dispositivos médicos. Segundo a parte 1 da referida norma, o teste de citotoxicidade *in vitro* deve ser um dos ensaios iniciais para avaliar a biocompatibilidade de qualquer biomaterial.

Após a verificação da ausência de toxicidade, o estudo da biocompatibilidade do biomaterial pode prosseguir com a realização de outros ensaios *in vitro* (genotoxicidade, hemocompatibilidade, etc.) e *in vivo* em animais de laboratório (sensibilidade, implante, etc.). Algumas vantagens do teste de citotoxicidade incluem a rapidez, a sensibilidade (capacidade de distinguir entre materiais tóxicos e não tóxicos) e o baixo custo.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* se baseiam no contato do biomaterial ou do seu extrato com uma cultura celular de mamíferos. As alterações celulares são verificadas por diferentes mecanismos tais como a incorporação de um corante vital ou a inibição da formação de colônias celulares. A viabilidade celular é o parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade do material. As membranas celulares podem ser danificadas por muitas substâncias, resultando na diminuição da captura de um corante vital. Assim, a quantificação das células vivas, danificadas ou mortas pode ser efetuada pela intensidade de cor da cultura celular em um espectrofotômetro.

No presente trabalho o teste de citotoxicidade foi baseado na avaliação quantitativa de células viáveis depois de expostas ao extrato do PGLD-AAS utilizado como revestimento de placas Elisa, e pela incubação com um corante supravital chamado MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfopenil-2H-tetrazolio) e um reagente de acoplamento eletrônico PMS (metassulfato de fenazina). O MTS é bioreduzido por células a um produto formazan que é solúvel no meio de cultura do tecido. A análise colorimétrica do corante incorporado é, então, realizada. A quantidade de MTS (marcador da viabilidade celular) absorvida pela população de células é diretamente proporcional ao número de células viáveis na cultura. A toxicidade induzida pela amostra sob teste é medida em uma faixa de concentrações de extrato do biomaterial e a concentração que produz uma redução em 50% da absorção de MTS é tomada como o parâmetro de toxicidade.

O extrato do PGLD-AAS foi preparado de acordo com a ISO 10993-5, que preconiza uma razão entre a área da superfície e o volume do veículo de extração no intervalo de 0,5 a 6,0 cm²/mL. Amostras de 4 cm² foram esterilizadas por autoclavagem a 120°C por 20 min e então 4 mL de RPMI 1640 foram adicionados e incubados a 37°C por 48 h. O extrato obtido foi empregado no teste de citotoxicidade com uma cultura de células de ovário de hamster chinês (CHO K1).

As células CHO foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). Uma microplaca de cultura celular com 96 poços foi preparada com diluições crescentes (100, 50, 25, 12,5, e 6,25%) do extrato do biomaterial (50 µL/poço, 4 poços/cada diluição). Em seguida, 50 µL da suspensão

celular (3000 células) foram dispensadas nos poços. Colunas de controle de quatro poços foram preparadas com o meio sem células (branco) e meio mais células (controle negativo). A microplaca foi incubada sob atmosfera úmida de 5% de CO₂. Após 72 h, 20 µL de uma mistura (20:1) de 0,2% de MTS e 0,09% de PMS em PBS (solução tamponada de fosfato) foi adicionada aos poços e deixada por 2 h. A incorporação do corante foi medida pela leitura de absorvância a 490 nm em leitor de microplacas contra a coluna do branco (Figura 6.6). O índice de citotoxicidade (IC_{50%}) foi estimado por interpolação, como a concentração do extrato que resulta em 50% de inibição da absorção de MTS, após a construção de um gráfico com a média de porcentagem de células vivas contra a concentração do extrato (%). Paralelamente ao ensaio, uma solução de fenol 0,3% e o polímero PE foram usados, respectivamente, como controles positivo e negativo (Figura 6.5).

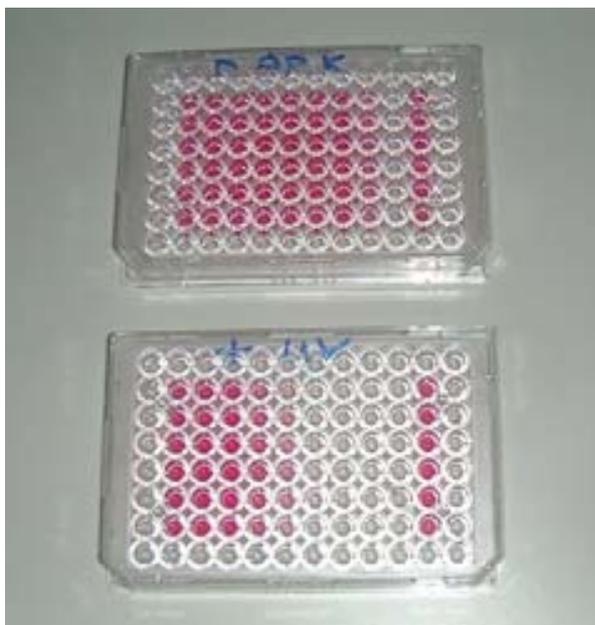


Figura 6.5: Placas de Elisa ilustrando o ensaio de citotoxicidade. A intensidade da cor é proporcional ao número de células viáveis.

6.4 Referências bibliográficas

- [1] 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.
- [2] Newkome, G.R.; Moorefield, C.N.; Vogtle, F. *Dendrimers and dendrons: concepts, synthesis, applications*. New York, Wiley-VCH, 2001.

- [3] Tomalia, D.A. Dendrimer molecules. *Sci.Am*, v. 272, p. 62-66, 1995.
- [4] Keller, F.J.; Gettys, W.E.; Skove, M.J. *Physics* New York, McGraw Hill, p. 412, 1993.
- [5] Li, Q.; Wang, D.; Elisseeff, J.H. Heterogeneous-phase reaction of glycidyl methacrylate and chondroitin sulfate: mechanism of ring-opening-transesterification competition. *Macromolecules*, v. 36, p. 2556-2562, 2003.
- [6] Noll, E.D. *Phys.Teach.* v. 11, p. 307, 1973.
- [7] Spenser, B.; Zare, R.N. *J.Chem.Ed.* v. 65, n. 835, p. 304-307, 1988.
- [8] *The United States Pharmacopeia*. Rockville (USA), USP Convention, NF XXI edition, p. 1200-1201, 1985.
- [9] Solomon, D.H. *The chemistry of organic film formers*. New York, John Wiley, p. 90-93, 1967.
- [10] Disponível em: <<http://www.clot.com.br/>>. Acesso em 21 maio 2007.
- [11] Bartolini P. Efeitos da radiodação sobre as atividades biológica, imunológica, de ligação a receptores e propriedades físico-químicas do hormônio de crescimento humano. *Tese de doutorado*. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-IPEN/USP, 1984.
- [12] Moroi, M., Okuma, M., Jung, S. M. Platelet adhesion to collagen-coated wells: analysis of this complex process and a comparison with the adhesion to matrigel-coated wells. *Bioch.Biophys.Acta*.1137: 1-9, 1992.
- [13] Imai, Y.; Nose, Y. A new method for evaluation of antithrombogenicity of materials. *J.Biomed.Mater.Res.* v. 6, p. 166-72, 1972.
- [14] Borefreund, E.; Puerner, J.A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). *J.Tissue Culture Meth.* v. 9, p. 7-9, 1984.
- [15] Barltrop, J. 5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2(4,5-dimethylthiazol)-3-(4 sulpho- phenyl) tetrazolium, inner salt (MTS) and related analogs of 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reducing to purple water-soluble formazans as cell-viability indicators. *Bioorg. & Med.Chem.Lett.* v. 1, n. 611, 1991.
- [16] ISO 10993-5:1992(E) Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods.

Capítulo 7 - Resultados e Discussão

7.1 Síntese e caracterização do PGLD

É bem conhecido na literatura que polióis tendem a sofrer eterificação na presença de catalisadores como NaOH, Na₂CO₃, CaO e elevadas temperaturas originando poliéteres. O processo de eterificação em meio alcalino não é seletivo exigindo, portanto, um longo tempo reacional e atmosfera inerte para inibir-se a formação de acroleína.

A Figura 7.1 mostra o percentual de conversão da glicerina em poliglicerol oligomérico em função do tempo. Percebe-se uma massa molecular limite de 450 g.mol⁻¹, equivalente ao hexaglicerol que foi obtida após 23 horas de reação. O rendimento do processo foi de 70,8%.

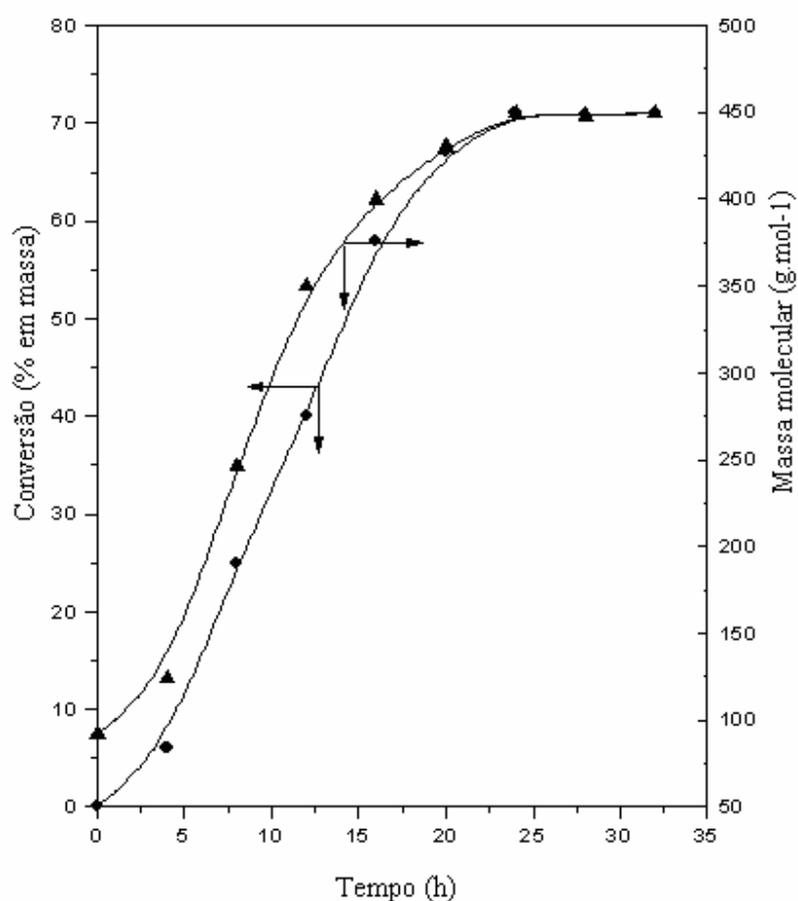


Figura 7.1: Porcentual de conversão da glicerina em poliglicerol e sua influência na massa molecular.

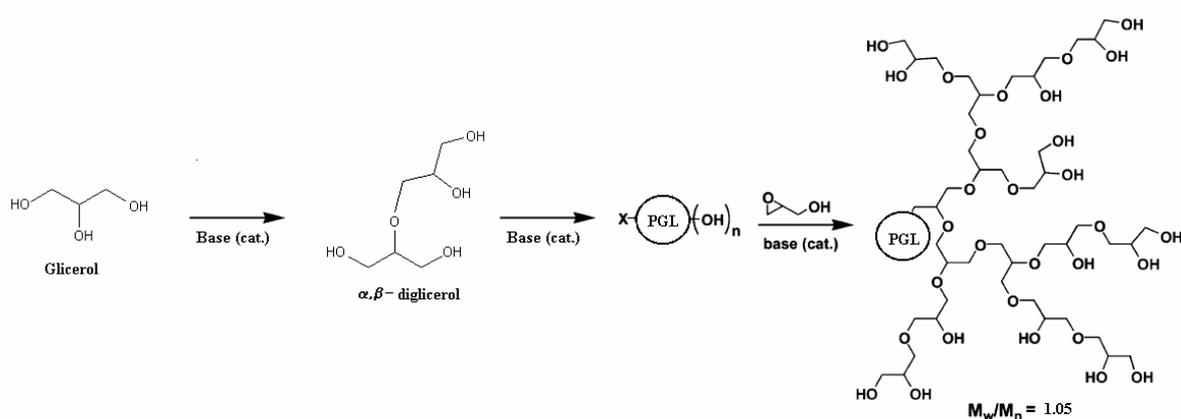


Figura 7.2: Reação de policondensação do glicerol em hexáglicerol. Em seqüência a síntese divergente do dendrímero de poliglicerol a partir de um núcleo oligomérico de poliglicerol.

Após reação de policondensação, o poliglicerol (PGL) foi caracterizado por espectroscopia vibracional. A Figura 7.3 apresenta o espectro no infravermelho (FTIR) do PGL sintetizado. Observa-se uma significativa alteração na região de $1500-1000\text{ cm}^{-1}$ do espectro vibracional como consequência da reação de eterificação da glicerina.

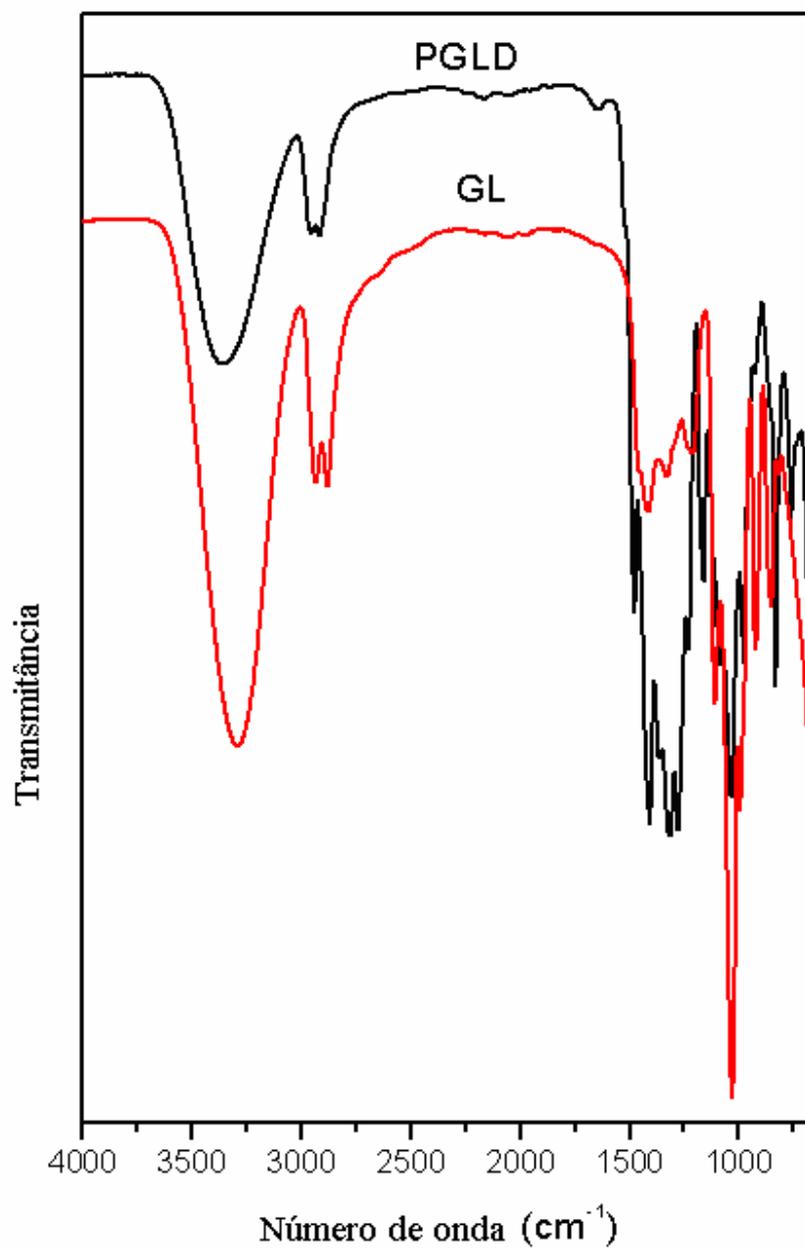


Figura 7.3: Espectro FTIR da glicerina (GL) e do PGL sintetizado neste trabalho.

A segunda etapa do processo reacional envolve a obtenção de um alcoóxido como iniciador do processo. Neste caso, um alcoóxido é obtido pela reação de metalação do glicidol de acordo com a reação demonstrada na Figura 7.4:

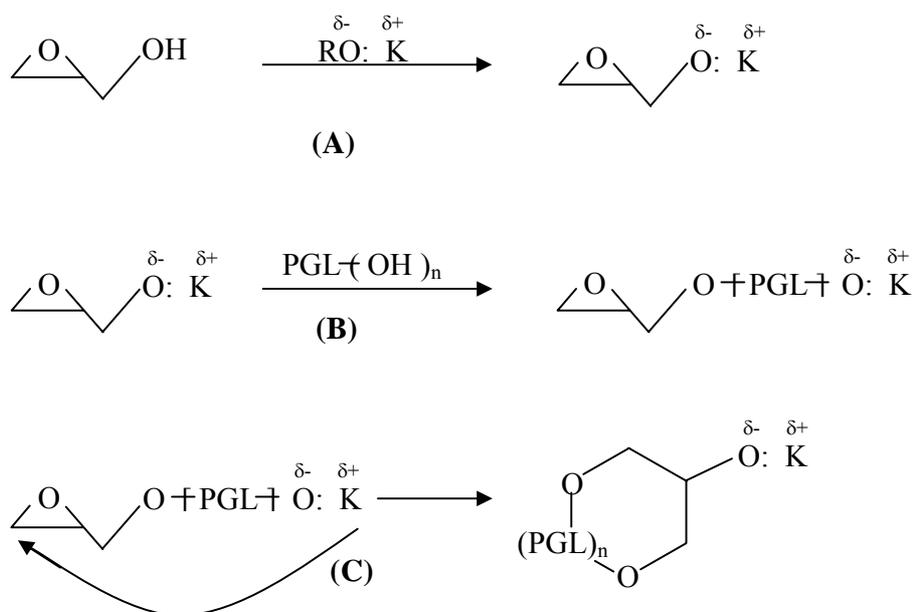


Figura 7.4: Mecanismo de desprotonação do glicidol (A), propagação (B) e ciclização (C).

A reação de abertura do anel leva à formação de um alcoóxido como sítio ativo que propaga-se anionicamente. A reação de ciclização é indesejável uma vez que tende a formar compostos de baixo peso molecular além de levar à obtenção de materiais altamente polidispersos no peso molecular. A reação de ciclização do precursor oligomérico pode ser inibida adotando como variáveis de controle a parcial desprotonação (~10%), baixa concentração e a lenta adição do glicidol durante o processo de polimerização.

A Figura 7.5 ilustra o percentual de conversão em função do tempo para a reação de obtenção do poliglicerol com estrutura dendrítica (PGLD). A análise dos resultados obtidos indica que a polimerização segue uma cinética de primeira ordem clássica. O rendimento do processo para obtenção do PGLD foi de 95%.

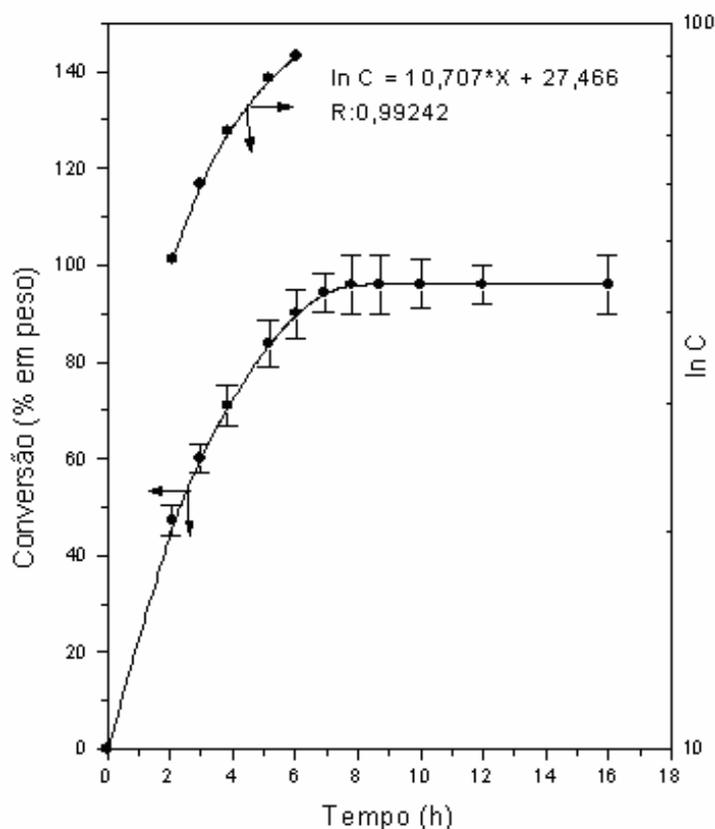


Figura 7.5: Cinética de polimerização do PGL para obtenção do PGLD. Temperatura: 90°C.

A massa molecular médio e a polidispersão de dendrímeros são dois parâmetros de maior importância para a determinação e explicação do comportamento físico destes sistemas macromoleculares.

Dendrímeros de massa molecular muito baixa geralmente não apresentam as propriedades mecânicas desejáveis para a área médica, enquanto que os de massa molecular muito elevada são muito pouco solúveis e geralmente não é possível utilizá-los no revestimento de superfícies sintéticas.

A cromatografia de permeação em gel (GPC), uma técnica que tem sido destacada como fundamental para a ciência macromolecular, é uma técnica de separação introduzida por Moore em 1964 para a determinação da distribuição de massas moleculares de um polímero [1].

A técnica GPC utiliza colunas empacotadas com géis de poliestireno ou polietileno glicóis reticulados de diferentes porosidades constituindo a fase estacionária. O polímero dissolvido em um solvente conveniente é separado de acordo com seu volume hidrodinâmico, ou seja, moléculas pequenas tendem a permanecer na fase estacionária, enquanto que moléculas grandes

são excluídas preferencialmente da fase estacionária. Os detectores utilizados podem ser do tipo refratométricos, UV ou IR, dependendo da natureza do polímero.

A eficiência do processo de separação é função do volume de retenção (ou eluição) (V_R) e da massa molar do material. O volume de retenção por sua vez é função do volume intersticial V_o e o volume do poro acessível no gel, ou seja:

$$V_R = V_o + K_D V_i \quad (7.1)$$

sendo V_i o volume interno total do poro e K_D é o coeficiente de partição entre V_i e a porção acessível para um dado soluto.

Quando $K_D = 0$ (moléculas grandes) $V_R = V_o$, ocorrendo uma eluição rápida da coluna. Para moléculas pequenas que penetram no volume do poro, $K_D = 1$ e a eluição da coluna é mais lenta. A técnica da cromatografia de permeação em gel (GPC) está limitada a moléculas onde $V_R \leq V_o$ ou, $V_R \geq V_o + V_i$.

Uma vez que a massa molecular de um polímero determinado por GPC não representa o seu valor absoluto, ou seja, é um valor obtido com base em uma curva de calibração de polímeros de conhecidas massas moleculares, podemos escrever:

$$\log[\eta]_s M_s = \log[\eta]_u M_u \quad (7.2)$$

sendo $[\eta]$ e M a viscosidade intrínseca e a massa molar do polímero, respectivamente. Os índices s e u representam o padrão e a amostra em análise, respectivamente.

Desde que os volumes hidrodinâmicos da amostra e do padrão não são necessariamente iguais, tem-se que $[\eta]_s = K_s M_s^{v_s}$ e $[\eta]_u = K_u M_u^{v_u}$. A massa molar da amostra u pode ser determinada a partir de [2]:

$$\log M_u = \frac{1}{1 + v_u} \cdot \log \left[\frac{K_s}{K_u} \right] + \frac{1 + v_s}{1 + v_u} \log M_s \quad (7.3)$$

Frequentemente as curvas de calibração são construídas a partir de poliestireno (PS) ou poli(etileno glicol) (PEG) sendo conhecidos o peso molecular absoluto do polímero. O peso molecular absoluto de um polímero pode ser determinado a partir de técnicas como o espalhamento de luz e a osmometria.

A Figura 7.6 mostra a análise por GPC de um poliglicerol com estrutura dendrítica (PGLD) obtido após 12 horas de processo a 90°C. O dendrímero exibiu uma distribuição de peso molecular bimodal e um baixo índice de dispersão no peso molecular ($M_n/M_w = 1,05$).

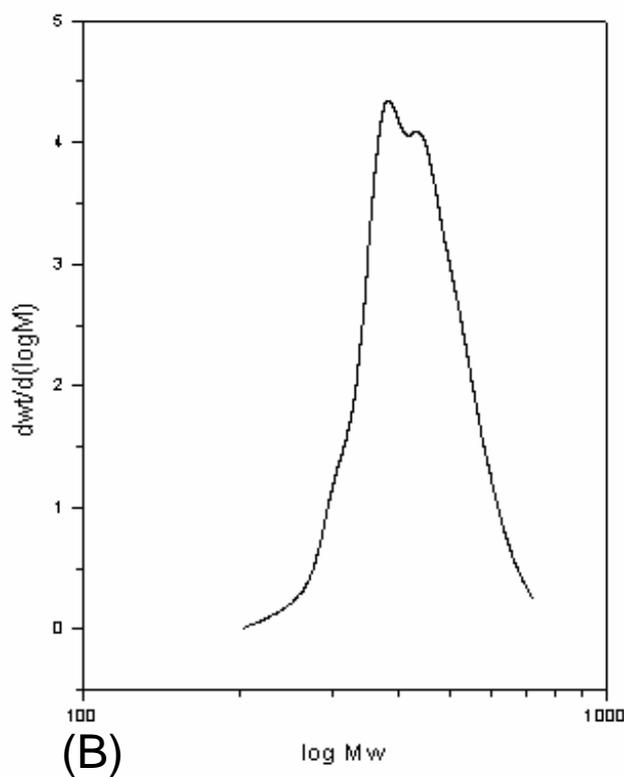
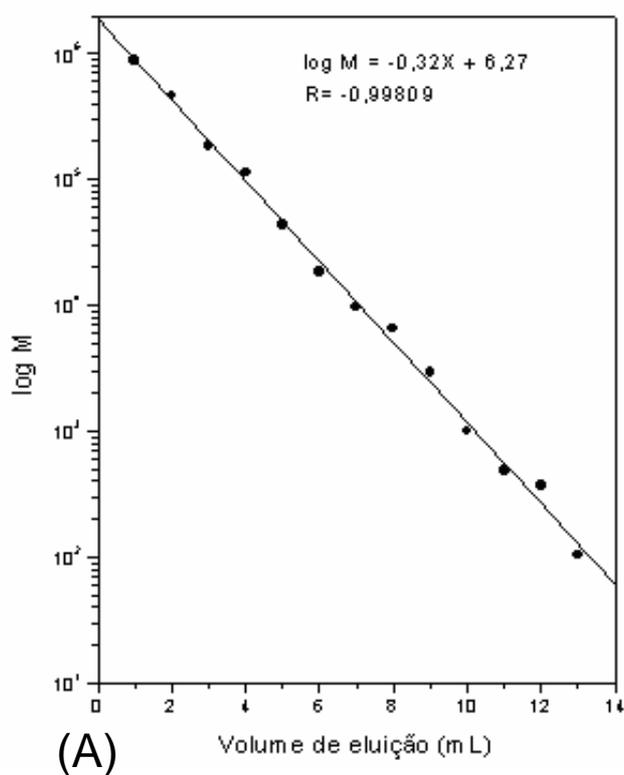


Figura 7.6: Curva de calibração (A) e análise por GPC do PGLD (B) obtido após 12 horas de processo.

O controle da massa molecular, bem como a polidispersividade de dendrímeros utilizando como iniciadores alcoóxidos polifuncionais, geralmente é problemático devido a uma forte tendência em se formar agregados devido à associação de grupos terminais, mesmo quando se utilizam solventes polares. Consequentemente, o controle da massa molecular é significativamente limitado e uma distribuição multimodal no peso molecular da macromolécula é observada.

Considerando um baixo grau de desprotonação, a velocidade de polimerização do glicidol poderia ser descrita por [3]:

$$\frac{d[Gl]}{dt} = k[RO^-][ROH][Gl] \quad (7.4)$$

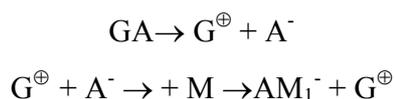
sendo $[RO^-]$, $[ROH]$ e $[Gl]$ as concentrações do alcoóxido, poliglicerol e glicidol, respectivamente.

Portanto, a equação (7.4) mostra que a velocidade de polimerização é controlada pelas concentrações do glicidol, alcoóxido e grupos hidroxila. Estudos da literatura demonstram que um controle da razão concentração do epóxido/concentração de um polioliol não permite um controle preciso do peso molecular bem como do índice de polidispersão do polímero.

A obtenção de um poliglicerol de estrutura dendrítica monodisperso neste trabalho vem demonstrar que a parcial desprotonação de um poliglicerol utilizado como iniciador parece ser uma rota sintética mais adequada para a síntese de poligliceróis dendríticos. Neste caso, um provável equilíbrio dinâmico entre alcoóxidos e grupos hidroxilas parece garantir a iniciação simultânea de todos os grupos alcoóxidos presentes no sistema reacional.

Teoricamente seria de se esperar que a distribuição de massas moleculares em uma polimerização aniônica seguisse uma distribuição de Poisson gerando, portanto, sistemas monodispersos.

Considerando que a concentração inicial do iniciador é dada por $[GA]$, a etapa de iniciação pode ser escrita como [4]:



sendo que o crescimento da cadeia do polímero pode iniciar nos centros $[AM_1^{-}] = [GA]$.

A velocidade de propagação pode ser escrita como uma equação integrada de velocidade de primeira ordem com relação à concentração do monômero:

$$-\int \frac{d[M]}{dt} = v_p = \int k_p [AM^-][M] = \int k_p [GA][M] \Rightarrow [M] = [M]_0 \exp(-k_p [GA]t) \quad (7.5)$$

sendo $[M]_0$ a concentração inicial do monômero a $t=0$.

$$\bar{v} = \left(\frac{[M]_0 - [M]}{[GA]} \right) \quad (7.6)$$

sendo v o comprimento cinético da cadeia.

Substituindo (7.5) em (7.6), obtém-se:

$$\bar{v} = \frac{[M]_0}{[GA]} \{1 - \exp(-k_p [GA]t)\} \quad (7.7)$$

A velocidade da reação de polimerização após a adição de mais glicidol ao centro reativo da cadeia, assumindo a presença da espécie G^\oplus , pode ser escrita como:



Logo pode-se escrever:

$$-\frac{d[AM_1^-]}{dt} = k_p [AM_1^-][M] = k_p [AM_1^-][M]_0 \exp(-k_p [GA]t) \quad (7.8)$$

Após integração, considerando $[AM_1^-]=[GA]$ em $t=0$, tem-se a expressão:

$$[AM_1^-] = [GA] \exp\left\{ \frac{-[M]_0}{[GA]} [1 - \exp(k_p [GA]t)] \right\} \quad (7.9)$$

Introduzindo a equação (7.7), obtém-se a expressão simplificada:

$$[AM_1^-] = [GA] \exp(-\bar{v}) \quad (7.10)$$

Generalizando a análise para a adição de $n-1$ unidades monoméricas do sítio ativo $\{AM^-\}$, obtém-se:

$$[AM_n^-] = [GA] \bar{v}^{n-1} \frac{\exp(-\bar{v})}{(n-1)!} \quad (7.11)$$

A razão entre o número de cadeias com grau de polimerização n (N_n) e o número total de cadeias (N) pode ser escrita como:

$$\frac{N_n}{N} = \frac{[AM_n^-]}{[GA]} = \frac{\bar{v}^{n-1} \exp(-\bar{v})}{(n-1)!} \quad (7.12)$$

A expressão (7.12) representa a distribuição de Poisson. A estreita distribuição de massas moleculares observada na análise por cromatografia de permeação em gel é justificada, portanto pela polimerização aniônica do glicidol.

Por sua vez, o índice de polidispersão na massa molecular é dado por:

$$\frac{M_w}{M_n} = 1 + \frac{\bar{v}}{(\bar{v} + 1)^2} \quad (7.13)$$

Substituindo o valor M_w/M_n obtido pela análise GPC, obtém-se um valor de $v \approx 20$.

O comprimento cinético de cadeia, v , é uma medida do número médio de unidades monoméricas reagindo com um sítio ativo durante seu tempo de meia-vida e pode ser relacionado com a velocidade de reação de propagação por:

$$\bar{v} = \frac{k_p^2 [M]^2}{2k_t v_p} \quad (7.14)$$

sendo que k_p , k_t e v_p representam as constantes cinéticas de propagação, terminação e a velocidade de propagação, respectivamente.

A equação (7.14) mostra que v é inversamente proporcional à concentração de radicais, ou seja, o comprimento das ramificações pode ser controlado alterando-se a concentração do iniciador.

No processo de polimerização do glicidol para obtenção do poliglicerol dendrítico, as unidades epoxídicas que vão incorporando-se às cadeias poliméricas em crescimento podem apresentar ligações éter, grupos hidroxilas terminais na periferia do dendrímico e carbono assimétrico ou pseudoassimétrico, uma vez que em geral não possuem atividade ótica em função da natureza macromolecular dos substituintes.

A massa molecular de um dendrímico pode ser relacionada ao número de gerações através da expressão [5]:

$$M = M_c + n_c \left[M_m \left(\frac{n_m^G - 1}{n_m} \right) + M_t n_m^G \right] \quad (7.15)$$

sendo M_c a massa molar do núcleo, M_m a massa molar do monômero ramificado, M_t a massa molar do grupo terminal e n_c a funcionalidade do núcleo, n_m a funcionalidade da ramificação e G o número de gerações.

Substituindo os dados obtidos para o PGLD obtido neste trabalho, a saber: $M \approx 20.000 \text{ g.mol}^{-1}$, $M_c \approx 550 \text{ g.mol}^{-1}$, $M_m \approx 59 \text{ g.mol}^{-1}$, $M_t \approx 16 \text{ g.mol}^{-1}$, $n_c = 12$, $n_m = 2$, obtém-se um número de gerações (G) para o PGLD aproximadamente igual a 5.

A utilização do poliglicerol (PGL) como núcleo de crescimento no processo de síntese divergente gera a estrutura dendrítica com uma elevada densidade de grupos hidroxila na periferia da macromolécula como ilustrado na Figura 7.7.

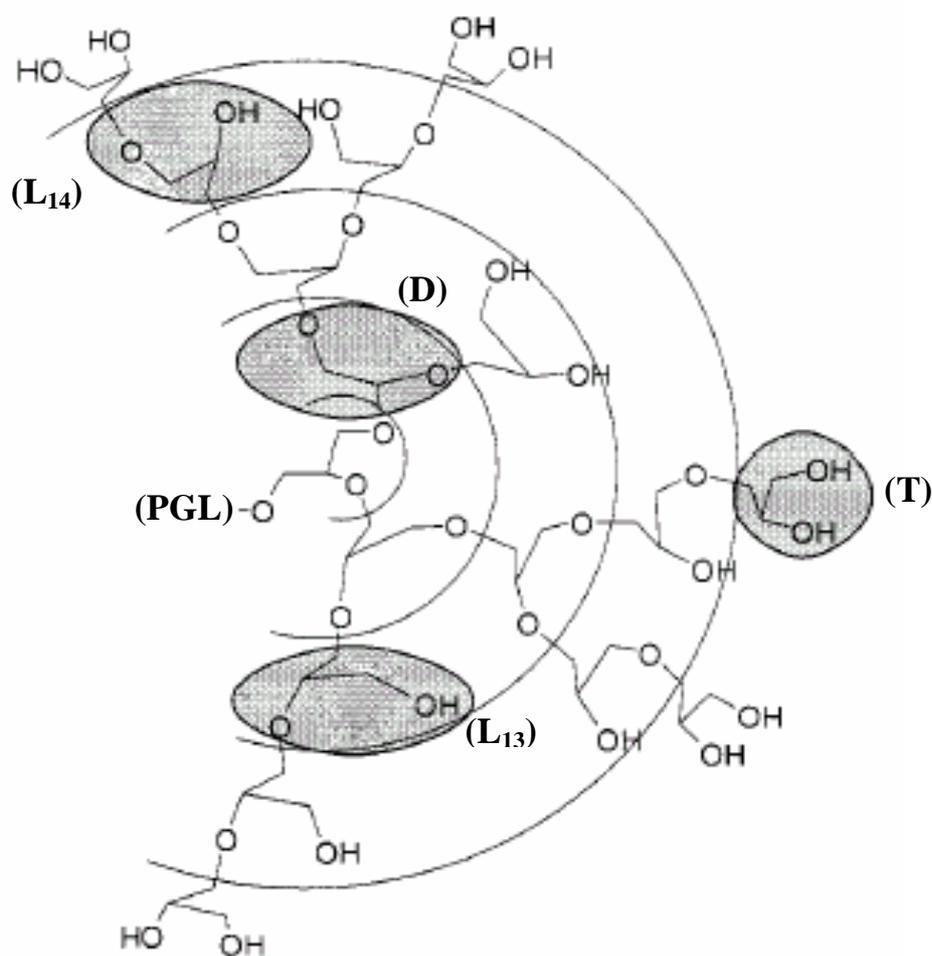


Figura 7.7: Estrutura esquemática do poliglicerol com estrutura dendrítica. L₁₄, L₁₃, D e T significam ligações lineares, estruturas dendríticas e grupos terminais, respectivamente.

A ressonância magnética nuclear representa uma importante ferramenta para a caracterização de estruturas dendríticas uma vez que a análise detalhada do espectro fornece informações acerca do grau de polimerização bem como da extensão da ramificação.

A Figura 7.8 (A) ilustra o espectro de ^{13}C -RMN para o poliglicerol de estrutura dendrítica sintetizado neste trabalho. Quatro unidades estruturais podem ser distinguidas na estrutura dendrítica a saber: (a) se a propagação ocorreu através de hidroxilas secundárias uma unidade linear do tipo 1,3 é formada (L_{13}); (b) se hidroxilas primárias sofrem propagação, uma correspondente unidade linear 1,4 (L_{14}) é formada; (c) se ambas as hidroxilas reagem com o monômero, uma unidade dendrítica (D) é formada e a cadeia polimérica é ligada a hidroxilas secundárias e; (d) se o monômero sofre alguma desativação por troca de próton, uma unidade terminal (T) com duas hidroxilas é formada.

A Tabela 7.1 indica as atribuições efetuadas ao espectro ^{13}C -NMR do dendrímero obtido neste trabalho. Os dados obtidos podem ser utilizados na determinação do grau de ramificação (G_R) da macromolécula. O grau de ramificação é uma medida que indica a tendência das ramificações criadas durante a etapa de propagação em gerar estruturas dendríticas. Para estruturas lineares o grau de ramificação (G_R) é igual a zero ($G_R=0$), para uma reação de policondensação ao acaso $G_R=0,5$ e finalmente para a formação de uma estrutura dendrítica, $G_R=1$.

O grau de ramificação pode ser calculado a partir das intensidades dos picos no espectro de ^{13}C -NMR através da equação:

$$G_R = \frac{2D}{2D + L_{13} + L_{14}} \quad (7.16)$$

sendo G_R o grau de ramificação e D, L_{13} e L_{14} representam as contribuições das frações dendríticas e lineares presentes no polímero, respectivamente.

O valor obtido neste trabalho, $G_R = 0,80$ indica que a lenta adição do alcoóxido promoveu a formação da estrutura dendrítica.

O espectro ^1H -NMR do PGLD (Figura 7.8 (B)) é menos informativo que o espectro de carbono, mas pode-se notar claramente a incorporação do glicidol. Os sinais dos grupos metil e metileno a 0,9 e 1,4 ppm respectivamente são devidos ao glicidol. Os quatro prótons metilênicos e um próton relativo ao grupo metino do PGLD aparecem como uma larga ressonância entre 3,3 e 3,9 ppm. Os prótons relativos ao grupo OH geram um sinal a 4,8 ppm.

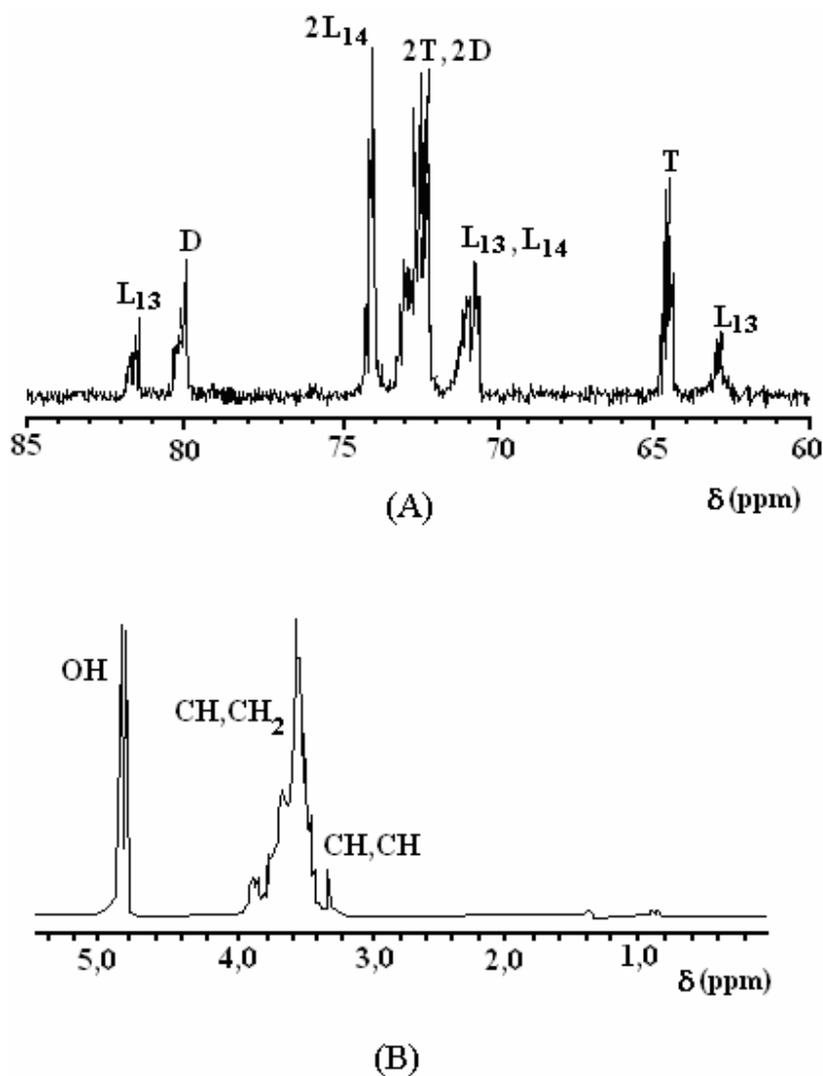


Figura 7.8: Espectro RMN de carbono (A) e de próton (B) do PGLD sintetizado neste trabalho.

Uma macromolécula apresenta uma estrutura microscópica não linear onde, dependendo da temperatura, diferentes estruturas podem coexistir em equilíbrio sendo que, no estado líquido ou fundido, as cadeias macromoleculares são caracterizadas pelo alto grau de liberdade.

Tabela 7.1- Análise do espectro de ^{13}C -NMR para o PGLD sintetizado neste trabalho.Solvente: $^d\text{DMSO}$, temperatura: 25 °C.

Região da Molécula	Grupo funcional	Deslocamento (ppm)	Integral relativa
L ₁₃	CH ₂ OH	62,9	0,85
	CH ₂	71,2	
	CH	81,6	
D	CH	80,2	6,31
	CH ₂	73,0	
	CH ₂	72,4	
L ₁₄	CH ₂	74,0	2,12
	CHOH	70,9	
T	CH ₂ OH	64,5	4,31
	CHOH	71,3	
	CH ₂	72,4	

Quando a massa viscosa e quente de um polímero fundido é deixada resfriar sem a interferência de forças externas, pode haver a formação de estruturas com certo grau de ordenação tridimensional, denominados cristalitos. Tais estruturas permanecem imersas em uma matriz amorfa que confere ao polímero um determinado grau de cristalinidade. Na ausência de forças externas, os cristalitos tendem a se formar ao acaso, não havendo uma direção preferencial ao longo da qual os cristalitos se dispõem.

Um polímero pode existir em três estados físicos: vítreo, altamente elástico e fluido viscoso. É importante ressaltar que a passagem de um estado físico a outro não ocorre em uma temperatura definida, mas em um certo intervalo de temperaturas onde existe uma variação gradual nas propriedades termodinâmicas do material. Neste caso, os valores médios da temperatura na região de transição são denominados de temperatura de transição [6].

A transição do estado vítreo para o estado altamente elástico é denominada de temperatura de transição vítrea (T_g) e comumente se associa a este estado a estrutura de um líquido congelado. A temperatura de T_g é comumente associada a uma transição de fase de segunda ordem, uma vez que os potenciais termodinâmicos são contínuos, mas a primeira e segunda derivada são caracterizadas por exibirem uma variação brusca com a temperatura, ou seja:

$$\frac{\partial^2 G}{\partial P^2} = \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T; \frac{\partial^2 G}{\partial P \partial T} = \left(\frac{\partial V}{\partial T} \right)_P; \frac{\partial^2 G}{\partial T^2} = \frac{c_p}{T} \quad (7.17)$$

A temperatura de transição vítrea pode ser medida experimentalmente pela calorimetria exploratória diferencial (DSC), uma técnica que tem sido amplamente utilizada na obtenção de informações relativas ao estado sólido das substâncias macromoleculares [7]. Neste caso, na transição de fase correspondente à temperatura vítrea (T_g), a técnica DSC exibirá uma resposta endotérmica correspondente a uma variação na capacidade calorífica do material.

Embora exista uma certa controvérsia com relação ao equilíbrio de fases em um sistema macromolecular, existe um consenso no meio científico de que a T_g de um material polimérico está diretamente relacionada às interações intermoleculares de longo ou curto alcance bem como interações intramoleculares na cadeia da macromolécula [8].

A natureza da estrutura dendrítica, com relação à existência de grupos funcionais polares ou apolares na periferia da macromolécula, exerce uma influência significativa nas propriedades macroscópicas do polímero, destacando-se a temperatura de transição vítrea e seu comportamento reológico.

A Figura 7.9 mostra a curva DSC para o poliglicerol com estrutura dendrítica sintetizado neste trabalho. A baixa temperatura de transição vítrea observada ($T_g = -27^\circ\text{C}$) indica que o PGLD sintetizado é adequado para o transporte de fármacos devido à sua elevada flexibilidade à temperatura ambiente.

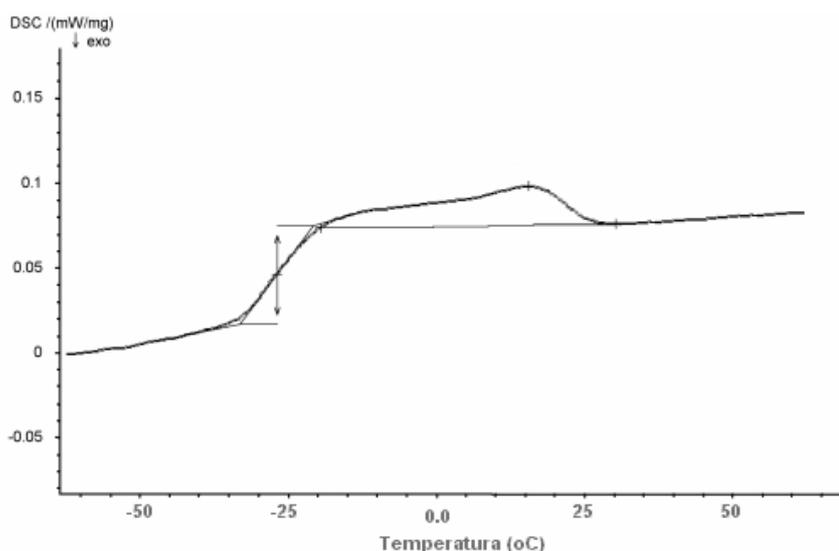


Figura 7.9: Determinação da temperatura de transição vítrea do PGLD sintetizado neste trabalho utilizando a técnica de calorimetria exploratória diferencial.

7.2 Imobilização do AAS

A tecnologia dos fármacos imobilizados em nanopartículas representa uma das fronteiras da ciência do mundo contemporâneo e envolve diferentes aspectos multidisciplinares que pode contribuir significativamente para o aumento da qualidade de vida e ao mesmo tempo preservar a saúde humana.

Nanosistemas contendo fármacos imobilizados oferecem inúmeras vantagens para a quimioterapia quando comparados a outros sistemas de dosagem convencional destacando-se a diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação e o direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas.

Neste trabalho, foi efetuada a síntese do conjugado bioativo PGLD-AAS (Figura 7.10). O ensaio da pureza do bioconjugado foi analisado por cromatografia de camada delgada (TLC) em placas de sílica gel (0.25 mm espessura, 60-mesh; Merck). As placas foram colocadas em uma cuba contendo uma solução clorofórmio/metanol/água (65:25:4, v/v) como fase móvel. Em seguida as placas TLC foram expostas ao vapor de iodo para formação de um complexo de cor amarelada que permitiu a identificação da pureza do conjugado PGLD-AAS obtido.

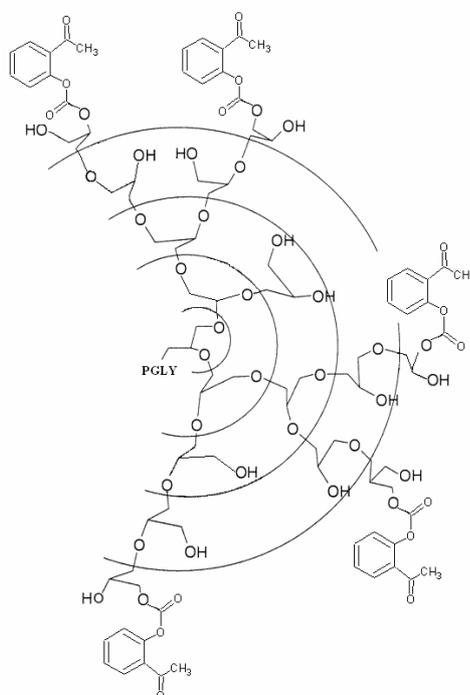


Figura 7.10: Estrutura do PGLD-AAS sintetizado neste trabalho utilizando a rota sintética de esterificação com DCC/DMAP.

A cromatografia em camada fina (ou delgada) é uma técnica barata, simples e muito importante para a separação rápida e análise quantitativa de pequenas quantidades de material. Ela é usada para determinar a pureza do composto, identificar componentes em uma mistura comparando-os com padrões; acompanhar o curso de uma reação pelo aparecimento dos produtos e desaparecimento dos reagentes e ainda para isolar componentes puros de uma mistura.

Na cromatografia de camada delgada, a fase líquida ascende por uma camada fina do adsorvente estendida sobre placas de sílica utilizadas como suporte neste trabalho. A Figura 7.11 (A) ilustra a cromatografia de camada delgada para os compostos AAS e PGLD-AAS e a Figura 7.11 (B) a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

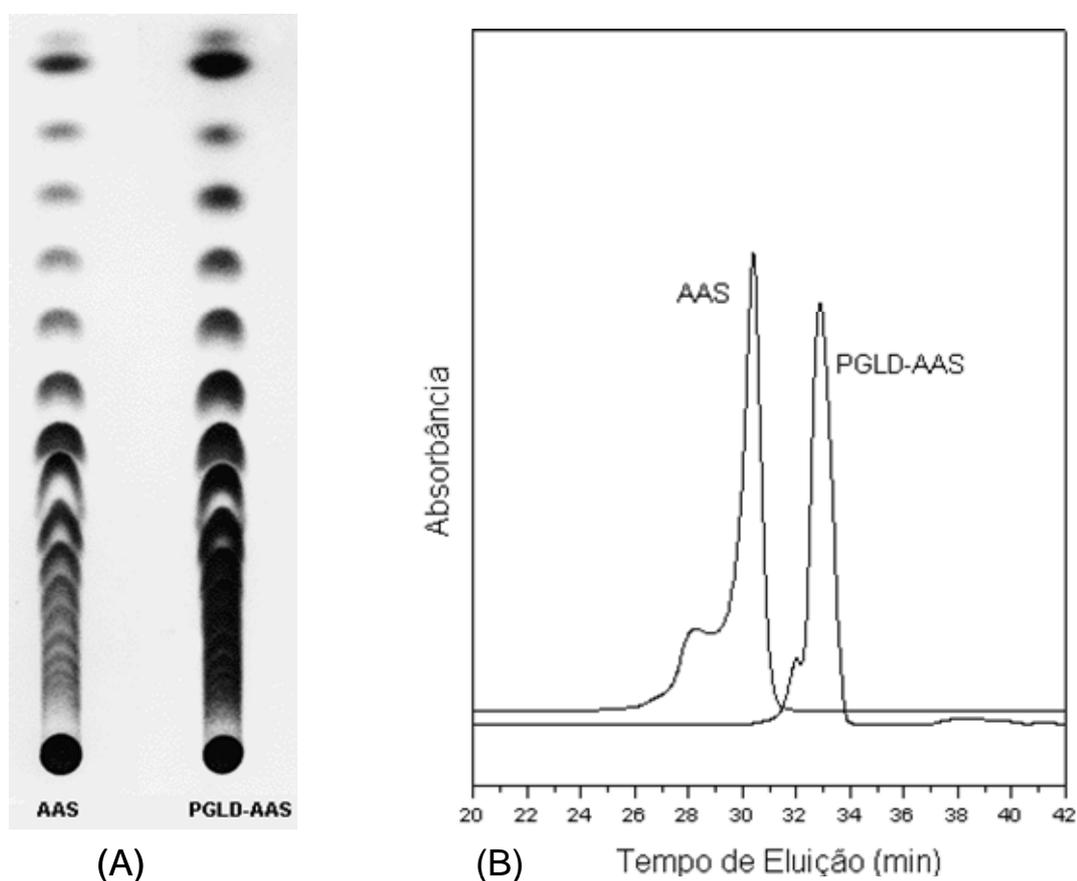


Figura 7.11: Cromatografias: de camada delgada (A) e líquida de alta eficiência (B) do AAS e conjugado PGLD-AAS. HPLC: coluna (C(18), 150 mm x 4.6 mm x 5 micron). Fase móvel: solução metanol:água:ácido acético glacial (8.0: 5.5: 1.0). Detecção a 302 nm.

Um parâmetro frequentemente usado em cromatografia é o "índice de retenção" de um composto (R_f). Na cromatografia de camada fina, o R_f é função do tipo de suporte (fase fixa) empregado e do eluente. Ele é definido como a razão entre a distância percorrida pela mancha do componente e a distância percorrida pelo eluente. Portanto:

$$R_f = d_c / d_s \quad (7.18)$$

sendo d_c a distância percorrida pelo componentes da mistura e d_s a distância percorrida pelo eluente.

Neste trabalho, os valores de R_f para o AAS e PGLD-AAS foram 0,6 e 0,72 respectivamente.

Assumindo que o AAS está distribuído estatisticamente no PGLD, a conjugação do AAS com o dendrímero aumenta significativamente a hidrofobicidade deste último em função da presença do anel aromático, conforme pode ser observado através das cromatografias TLC e HPLC. A partir da análise por HPLC calcula-se que a quantidade do antiinflamatório não esteroideal incorporado à estrutura dendrítica foi de $200 \pm 20 \text{ mg.g}^{-1}$ de PGLD.

7.3 A relação atividade biológica-constante dielétrica [9-11]

O valor das constantes dielétricas de diferentes tecidos depende da constituição dos mesmos, da frequência e, no caso das moléculas polares, também da temperatura. No caso da água, que é uma molécula polar, a constante dielétrica relativa é 81 para baixas frequências e cai com o aumento da frequência devido à inércia rotacional dos dipolos elétricos com o campo externo.

É fato conhecido da literatura que a constante dielétrica relativa do sangue é dependente da frequência. Para frequências de 10 kHz a 100 MHz, a constante dielétrica é afetada pela polarização das membranas, acima de 100 MHz, as membranas perdem a sua influência, e se comportam como um curto circuito; acima de 10 GHz a constante dielétrica reflete o conteúdo de água no sangue.

O sangue é composto essencialmente por moléculas polares. Neste caso, as mudanças ocorridas na permissividade quando o fluido vital é submetido à um campo elétrico são atribuídas principalmente ao relaxamento das moléculas de água presentes no sangue. Uma abordagem simples sugere que o efeito da variação da quantidade de qualquer componente deverá afetar a

permissividade do sangue através da mudança em relação ao volume de água livre que está presente.

Os principais componentes do sangue que determinam seu comportamento dielétrico são os glóbulos vermelhos, as proteínas plasmáticas e a água. Os glóbulos vermelhos são discos bicôncavos com diâmetro médio de 7,8 μm , largura de 1,84 μm e a espessura da membrana é de 75 Å. Aproximadamente 30% do volume dos glóbulos vermelhos é ocupado por hemoglobina, enquanto o resto é essencialmente água. Em um adulto saudável, existem cerca de 5×10^9 glóbulos vermelhos em 1 mL de sangue, o que é consideravelmente maior do que a concentração dos outros tipos de células do sangue.

A concentração total de proteínas do plasma é de aproximadamente 7 g por 100 mL, das quais, cerca de 4-5 g é albumina. O resto do plasma é composto por água, que totaliza mais de 90% em volume do sangue.

Quando uma amostra de sangue é colocada em um campo elétrico, respostas complexas podem ser esperadas. A membrana das células vermelhas tem uma alta capacitância, que dá origem a uma alta permissividade em baixas frequências. Para os dois principais constituintes não-aquosos do sangue, albumina e hemoglobina, as dispersões na permissividade elétrica ocorrem na faixa de 1-10MHz.

Nas frequências acima de 10 MHz, duas outras questões devem ser consideradas. As proteínas albumina e hemoglobina possuem cadeias laterais passíveis de sofrerem rotação sob a ação do campo elétrico. Outra consideração a ser feita é a água, que é fortemente vinculada às macromoléculas. Salienta-se que as moléculas de água que solvata as proteínas e outras macromoléculas presentes no sangue podem ser incapazes de sofrer rotação em altas frequências relativamente às moléculas de água livres. Esta observação sugere que a água ligada forma uma camada bimolecular abrangendo ambas as superfícies da membrana. Cálculos demonstram que uma célula vermelha se liga a cerca de 6×10^9 moléculas de água. Como existem 5×10^9 eritrócitos por mL de sangue, a quantidade de água adjacente ligada às membranas celulares é inferior a 10^{-3} g/mL do sangue total, que é novamente insignificante.

No sangue de indivíduos normais, o efeito repulsivo das cargas positivas e negativas na superfície externa da membrana dos eritrócitos (potencial zeta) sobrepuja a força de atração entre os eritrócitos (força de van der Waals) e mantém as células suspensas com pequena agregação. Um aumento na concentração de proteínas plasmáticas, como fibrinogênio e mucoproteínas,

resulta em grande aumento na constante dielétrica do plasma, superando o potencial zeta. Consequentemente, os eritrócitos se agregam formando empilhamentos que se sedimentam em uma velocidade acelerada.

A constante dielétrica ou, mais corretamente, a parte real da constante dielétrica (ϵ') e a constante dielétrica imaginária (ϵ'') foram medidas neste trabalho em função da concentração de PGLD-AAS em solução fisiológica em três faixas distintas de frequências: 10 e 100 kHz e 1 MHz (Figuras 7.12 e 7.13).

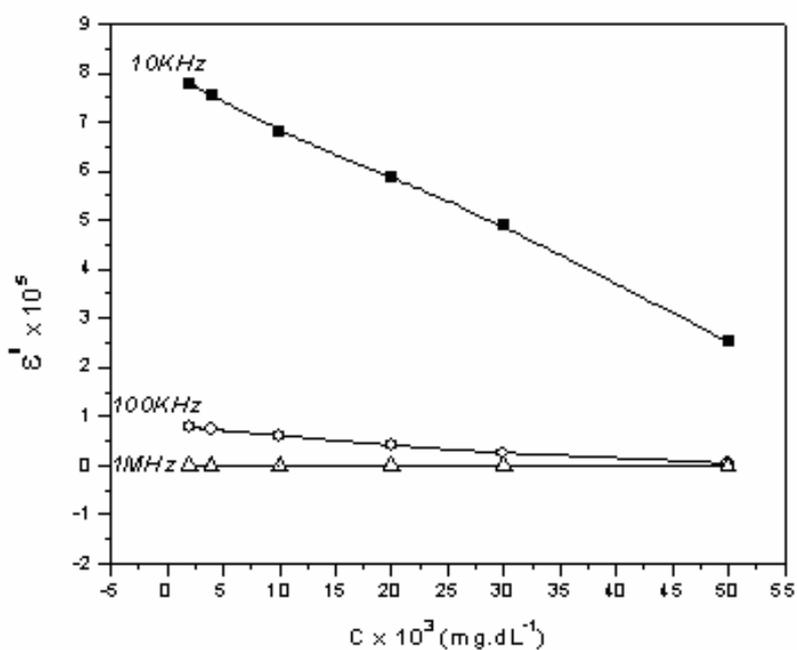


Figura 7.12: Constante dielétrica real da solução de soro fisiológico e PGLD-AAS em diferentes concentrações a 10 kHz, 100 kHz e 1 MHz.

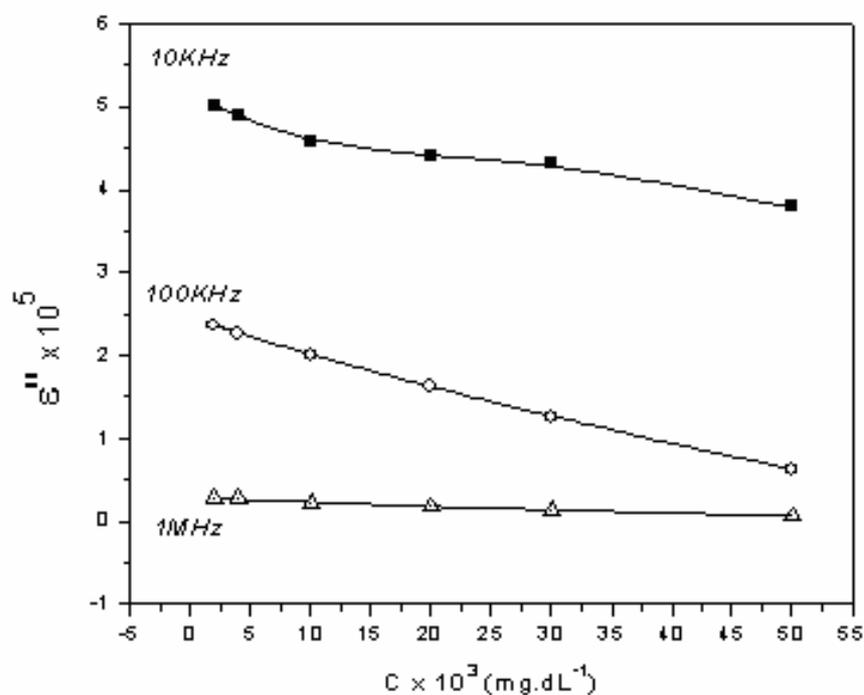


Figura 7.13: Constante dielétrica imaginária da solução de soro fisiológico e PGLD-AAS em diferentes concentrações a 10 kHz, 100 kHz e 1 MHz.

Foi observada uma linearidade das medidas de ϵ' e de ϵ'' em boa concordância com a literatura consultada, sugerindo que o aumento da concentração está relacionado à uma redução nos graus de liberdade das moléculas de água em solução fisiológica. A diminuição em ϵ' e ϵ'' ocorre em uma escala semelhante quando comparada à constante dielétrica do sangue em diferentes concentrações.

Para um material ser reconhecido como próprio do organismo e não ser rapidamente eliminado ou causar alterações na resposta imunológica, este deve apresentar, dentre outras propriedades, características semelhante às das células humanas. Para exercer a função de carregador de fármaco, é imprescindível que o material exiba as propriedades de hemocompatibilidade adequadas. Portanto é imprescindível que o material sintético em contato com o fluido fisiológico vital não apresente diferenças significativas em relação à constante dielétrica do sangue.

Dentre as células sanguíneas, os eritrócitos são as que se encontram em maiores concentrações, portanto são as células que mais influenciam na medida da constante dielétrica sanguínea. As figuras 7.14 e 7.15 comparam as constantes dielétricas de uma solução de 50% de

eritrócitos com uma solução contendo PGLD-AAS:Eritrócitos (1:1). A adição do PGLD-AAS à solução de eritrócitos não alterou significativamente a curva da constante dielétrica, sugerindo que não houve agregação das células sanguíneas induzida pelo conjugado bioativo PGLD-AAS.

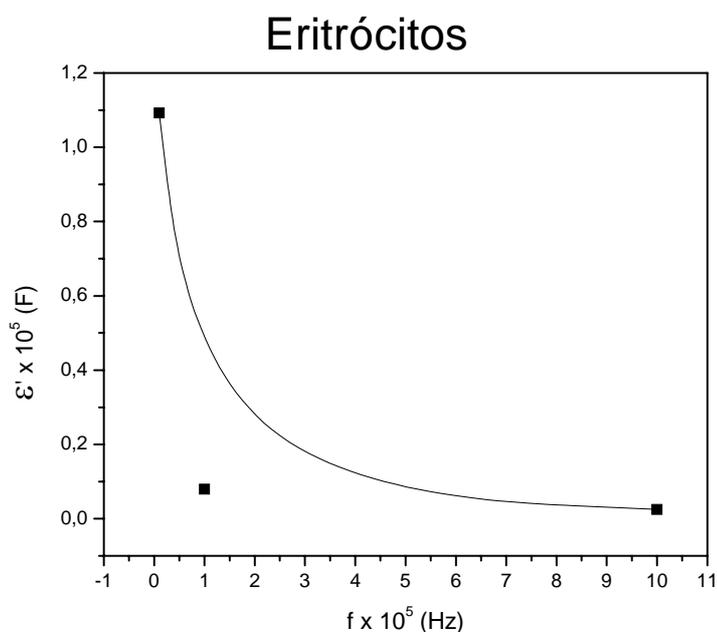


Figura 7.14: Constante dielétrica da solução de eritrócitos a 50%.

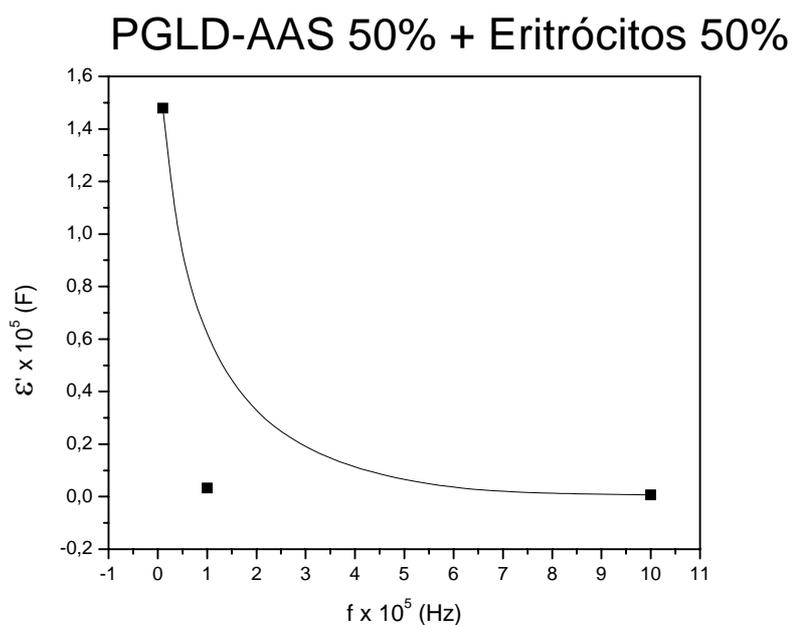


Figura 7.15: Constante dielétrica da solução PGLD-AAS: Eritrócitos (1:1) em diferentes frequências.

7.4 Propriedades hemocompatíveis *in vitro* do PGLD-AAS

Dentre todos os critérios exigidos para um material sintético ser considerado biocompatível, a compatibilidade com o sangue parece ser a mais complexa, pois limita grandemente a aplicação de macromoléculas sintéticas como carregadores de fármacos diretamente na corrente sanguínea. De um modo geral um polímero é considerado hemocompatível ou antitrombogênico se não houver ativação da cascata de coagulação intrínseca do sangue bem como ausência de plaquetas e leucócitos ativados aderidos em sua superfície.

A cascata da coagulação sanguínea é o principal fator bioquímico que limita a aplicação de polímeros bioativos diretamente na circulação sanguínea. A coagulação sanguínea pode ocorrer através de duas vias básicas: intrínseca e extrínseca e ambas as vias confluem para uma via final comum.

A via extrínseca é iniciada com a liberação de tromboplastina tecidual após uma lesão do tecido biológico. Nesta via a formação do ativador extrínseco se dá quando o fator III (lipoproteína) é liberado pelos tecidos que estão em torno do vaso sanguíneo, de modo que a função protéica deste fator ativa o fator VII na presença de cálcio e o fator X ativa o fator V que vai agir com a fração lipídica do fator III.

A via intrínseca é iniciada pela exposição do sangue a uma superfície negativamente carregada. A formação do ativador intrínseco se dá quando o fator XII é ativado no momento em que entra em contato com as bordas da lesão vascular. Uma vez ativado, o fator XII dá origem a uma reação em cascata que consiste na ativação do fator XI na presença do cálcio.

Na via intrínseca, a calicreína deflagra a ativação dos fatores XII, XI e IX, em cascata, ou seja, um fator ativa o seguinte, numa seqüência ordenada. O fator IX, em presença de cálcio e o fator VIII (anti-hemofílico) ativam o fator X, iniciando a via final comum. O fator V (ativado pelo fator X) reagirá com os fosfolipídeos liberados pelas plaquetas, originando desta forma o ativador intrínseco.

Na via comum, a protrombina é ativada pelo fator X ativado, formando-se trombina. A trombina não somente converte o fibrinogênio em fibrina, mas também ativa o fator XIII, responsável pela polimerização da fibrina.

A fibrina polimerizada é insolúvel, e forma um retículo que aprisiona células do sangue, formando um coágulo ou trombo, cujo objetivo original seria o fechamento de uma descontinuidade na parede do vaso. Quando o sistema é ativado dentro do vaso (ou na superfície

de um material sintético implantado), o coágulo formado pode obstruir o vaso sanguíneo ou ser levado pelo fluxo sangüíneo comprometendo seriamente a saúde do paciente.

O coágulo formado é reabsorvido simultaneamente com a cicatrização da parede do vaso sanguíneo cerca de 24 a 48 horas após o início da coagulação em um mecanismo conhecido como fibrinólise. Neste caso, a substância responsável pela reabsorção do coágulo é a fibrinolizina, substância esta ativada pelo fator XIII. Para uma melhor compreensão, a cascata de coagulação do sangue é representada esquematicamente na Figura 7.16.

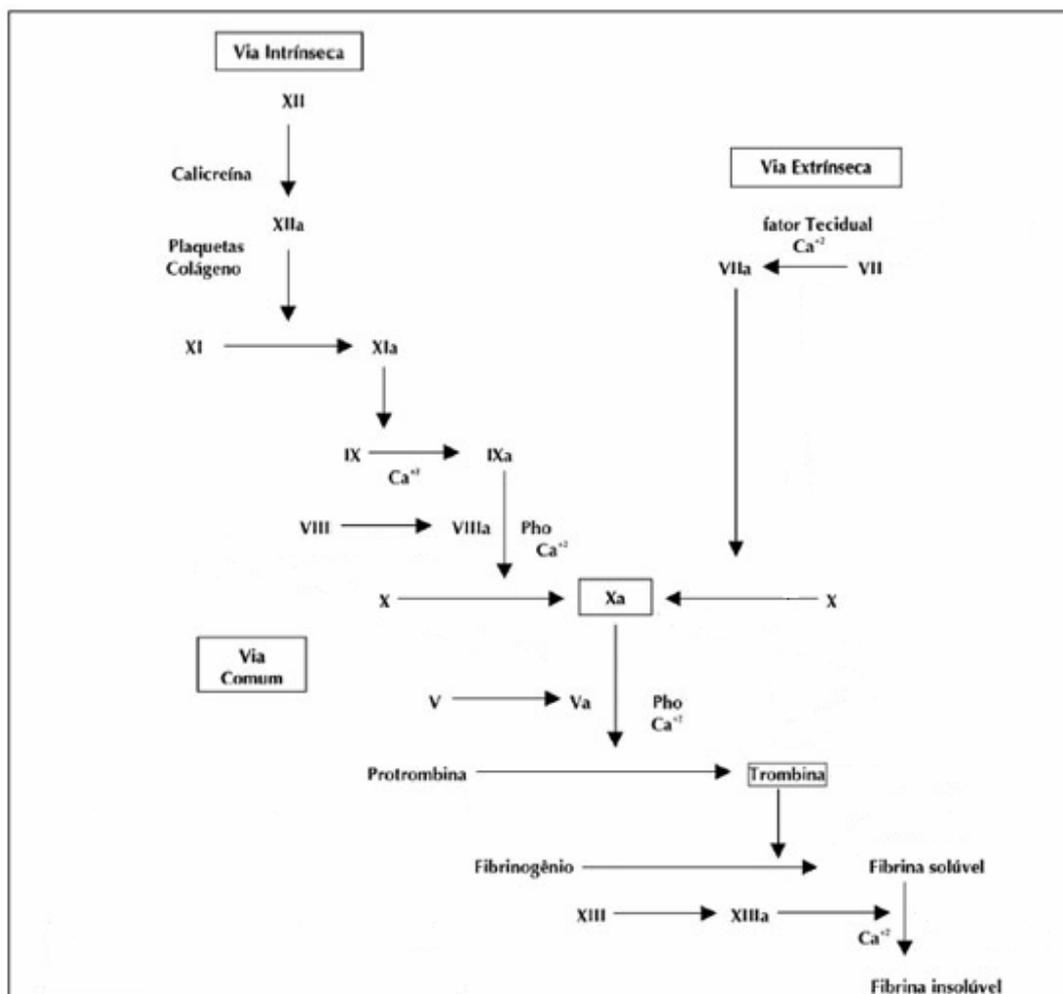


Figura 7.16: Esquema simplificado da cascata de coagulação sanguínea [12].

A fim de se minimizar a experimentação animal, a hemocompatibilidade de uma superfície sintética deve ser avaliada inicialmente através de ensaios *in vitro*. Tais ensaios envolvem a adsorção protéica, adesão e ativação de plaquetas e a formação de trombos. Com o

intuito de minimizar a utilização do dendrímero e também de reagentes foi utilizado neste ensaio poços de placa Elisa. Neste caso, a placa de Elisa é constituída de poliestireno (PS).

7.4.1 Adsorção protéica e absorção de água

O primeiro evento resultante da interação entre uma superfície sintética e o sangue é a adsorção protéica, que pode influenciar os demais eventos como adesão plaquetária e a formação de trombos.

A adsorção de fibrinogênio tem grande importância no fenômeno da hemocompatibilidade dos materiais poliméricos uma vez que por ser um dos fatores da coagulação, facilita a adesão de plaquetas, participando de reações de troca com outras proteínas, importantes no mecanismo de coagulação sanguínea [13].

Diversos estudos tem relacionado a absorção preferencial de albumina ao caráter não trombogênico das superfícies sintéticas orgânicas (Figura 7.17).

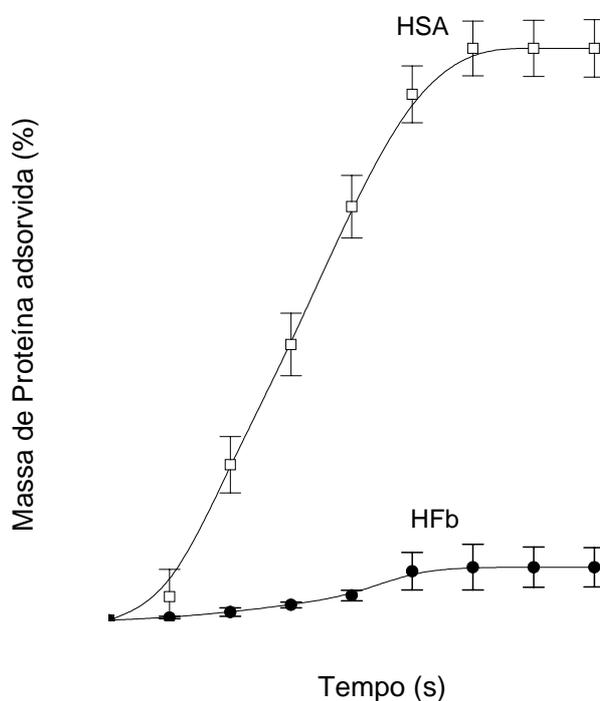


Figura 7.17: Adsorção de Fibrinogênio e Albumina na superfície do PGLD-AAS.

No caso das superfícies que exibem um caráter essencialmente hemocompatível, é fato comprovado experimentalmente que tais superfícies apresentam uma elevada hidrofiliicidade [14].

Neste trabalho o processo de absorção de água pelas superfícies não revestidas (PS) e revestidas com o dendrímero PGLD-AAS foi avaliado através da espectroscopia no infravermelho (FTIR) [15, 16]. Neste caso, considerando a banda de absorção da água, a seguinte expressão pode ser utilizada:

$$\frac{A_t}{A_\infty} = 1 - \frac{8\gamma}{\pi[1 - \exp(2L\gamma)]} \sum_{n=0}^{\infty} \left[\frac{\exp\left(\frac{-D(2n+1)^2\pi^2 t}{4L^2}\right) \left[\frac{(2n+1)\pi}{2L} \exp(-\gamma 2L) + (-1)^n (2\gamma) \right]}{(2n+1) \left(4\gamma^2 + \left(\frac{(2n+1)\pi}{2L} \right)^2 \right)} \right] \quad (7.19)$$

sendo A_t , A_∞ e L a absorvância correspondente à massa de água adsorvida no tempo t , absorvância correspondente à massa no equilíbrio e a espessura do filme do dendrímero depositado, respectivamente.

O termo γ representa o decaimento no campo evanescente e D o coeficiente de difusão da água na superfície polimérica. Para γ pode-se escrever:

$$\gamma = \frac{2n_2\pi \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2}}{\lambda} \quad (7.20)$$

sendo n_1 , n_2 , θ e λ os índices de refração do polímero e do cristal de ATR, ângulo de incidência do IR no cristal (45°) e o comprimento de onda da luz absorvida.

Como pode ser observado na figura 7.18, a região de 3200 cm^{-1} , característica da banda de absorção do grupo OH sofre um aumento de intensidade significativa relativamente ao tempo de exposição da superfície sintética à água.

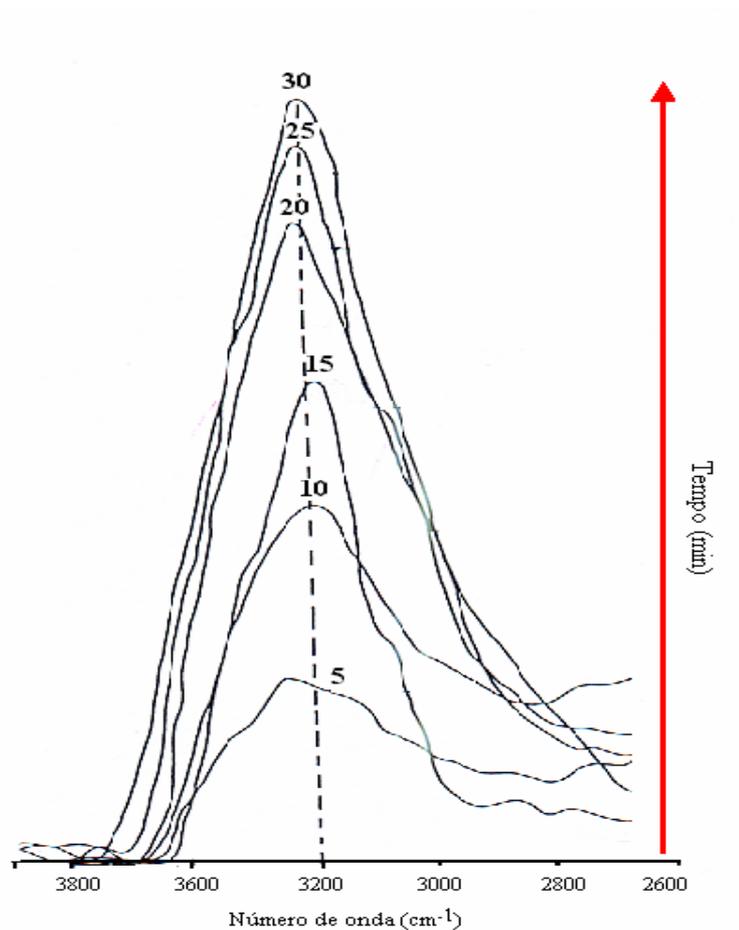


Figura 7.18: Evolução no espectro vibracional (FTIR/ATR) da superfície de PGLD-AAS durante o processo de sorção de água. Solução PBS, pH 7,4 a 37 °C.

A Figura 7.19 mostra o conteúdo de água nas superfícies sintéticas revestidas com o bioconjugado PGLD-AAS. Como pode ser observado, o revestimento dendrítico levou a um incremento significativo no conteúdo de água do polímero revestido, indicando sua natureza hidrofílica.

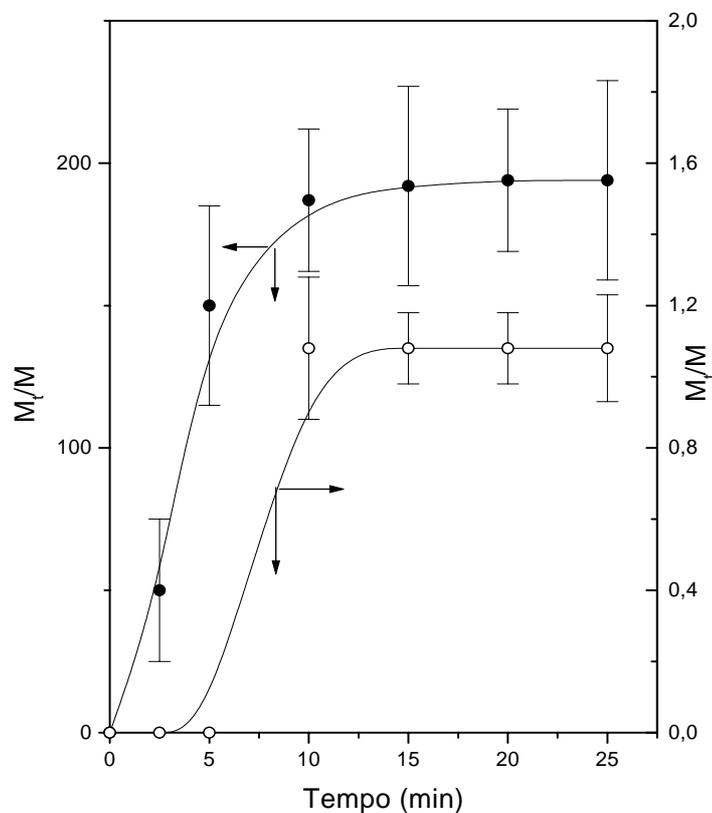


Figura 7.19: Conteúdo de água nas superfícies de PS (○) e PGLD-AAS (●) a 37 °C, PBS- pH=7,4.

7.4.2 Adesão plaquetária e formação de trombo

O primeiro evento decorrente da exposição de uma superfície sintética ao sangue é a adsorção de proteínas séricas seguido da adesão plaquetária na forma de monocamadas ou agregados. Estudos indicam que o processo de adesão de plaquetas envolve a interação física ou química dos receptores de membrana desta célula com a superfície do polímero sintético [17].

A interação entre a superfície sintética e o sangue envolve uma fenomenologia ainda não totalmente esclarecida pela literatura. Entretanto, sabe-se que, após exposição ao sangue, uma série de eventos predominantemente de adsorção dos elementos presentes no fluido vital iniciam-se na interface macromolécula-tecido biológico. Desta maneira as propriedades físico-químicas da macromolécula, tais como presença de microdomínios hidrofílico/hidrofóbico, topologia e

presença de cristalitos são fatores que podem influenciar nas interações entre a superfície sintética e o sangue [18].

De uma maneira geral, a série de fatores que determinam a formação de uma interface por deposição plaquetária sobre a superfície de um biomaterial é influenciada pela termodinâmica do sistema que através de variações entálpicas e entrópicas dirigem o potencial termodinâmico de Gibbs para o processo de adesão e agregação da célula sanguínea na superfície sintética [19].

Entretanto, deve-se recordar que o caráter não temporal da termodinâmica impede o estabelecimento de uma avaliação mais criteriosa da dinâmica da interação célula sanguínea/superfície sintética. A adesão de plaquetas na superfície sintética é mediada pelo fator VII da coagulação sanguínea, podendo ser liberados alguns constituintes do agregado plaquetário dentro do plasma. Estas transformações estão sob o controle das prostaglandinas, íons Ca^{+2} , AMP e ADP. As proteínas específicas e fosfolípidos da membrana plaquetária são de importância primordial para a aceleração e controle do processo de coagulação. Por sua vez, as plaquetas aderidas sobre a superfície sintética podem ser ativadas levando ao início de um conjunto de reações que conduzem à formação de trombos.

Embora mais de três décadas tenham se passado na tentativa de se estabelecer um mecanismo preciso da interação entre a plaqueta sanguínea e a superfície dos polímeros sintéticos, semelhantemente à física contemporânea, falta uma teoria unificada que seja capaz de prever tanto os processos de adesão quanto os de ativação plaquetária independente da estrutura da macromolécula sintética em estudo.

A Figura 7.20 ilustra a adesão de plaquetas nas superfícies do PS e PGLD-AAS. Observa-se que a superfície de PS revestida com o conjugado PGLD-AAS adere significativamente menos plaquetas que a superfície sintética não revestida.

A Figura 7.21 mostra as micrografias MEV para as superfícies de PS e PGLD-AAS após exposição ao sangue humano. As superfícies de PS revestidas com PGLD-AAS apresentaram poucas plaquetas aderidas, em comparação ao PS não revestido, evidenciando uma tendência bastante significativa das superfícies revestidas a um comportamento hemocompatível.

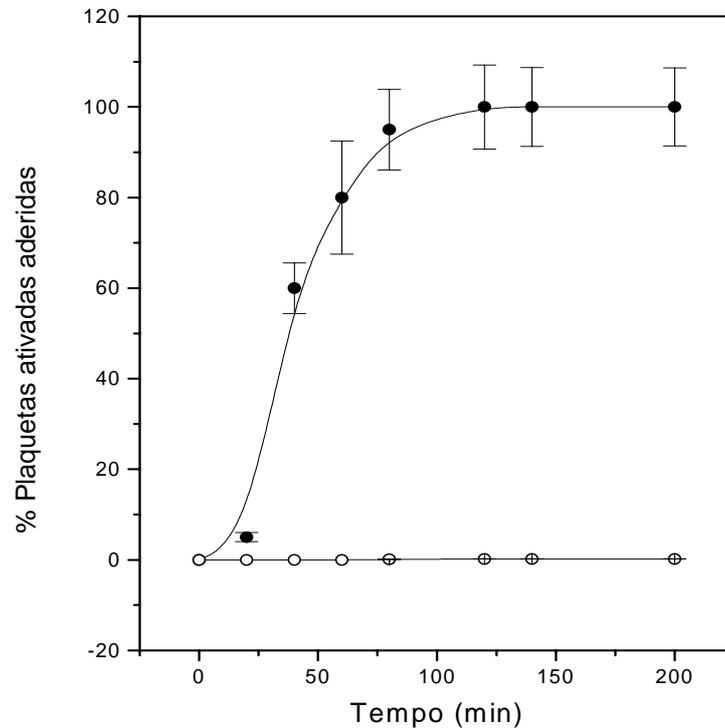


Figura 7.20: Porcentual de plaquetas ativadas aderidas sobre: PS (●) e PGLD-AAS (○).

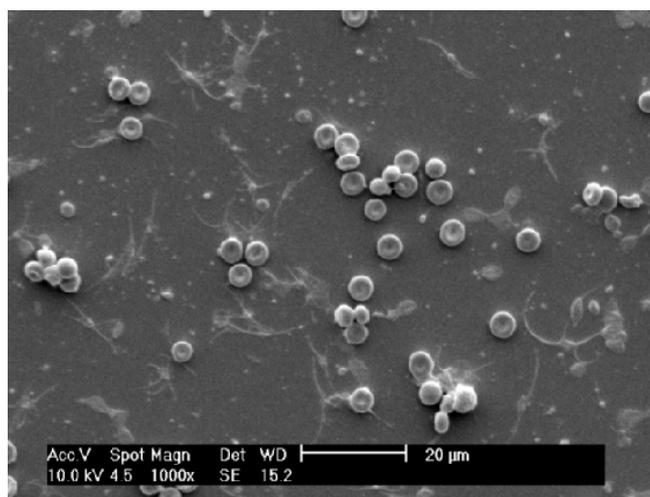
Dentre os vários modelos desenvolvidos nos últimos 30 anos para a explicação das propriedades biocompatíveis de uma superfície sintética, o modelo de Bayer que ressalta a importância de superfícies sintéticas com baixa energia livre de superfície (γ_c) parece ser o mais adequado do ponto de vista termodinâmico [16]. De acordo com o modelo em questão, superfícies sintéticas com baixa energia livre de superfície após contato com o sangue poderão exibir propriedades hemocompatíveis. Deste modo, revestimentos de baixa energia livre de superfície poderiam inibir os processos de adesão e ativação das plaquetas sanguíneas.

Uma propriedade da microestrutura do revestimento que está intrinsecamente ligada a γ_c é a temperatura de transição vítrea do revestimento [20-25]:

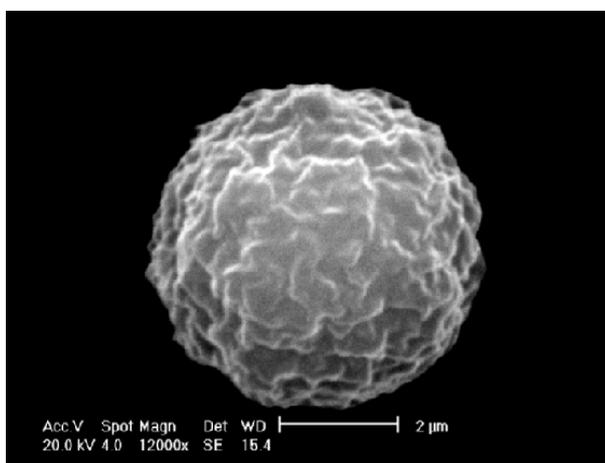
$$\gamma_c^{0,86} = (0,03RT_g - 1,5) (n\phi^2 \cdot V_m^{-0,71}) \tag{7.21}$$

sendo n o grau de liberdade do sistema, V_m o volume molar e ϕ o parâmetro de interação.

Embora possua algumas limitações, a expressão (7.20) foi utilizada para o cálculo da tensão crítica de superfície do revestimento de PGLD-AAS. O valor de γ_c obtido para o revestimento de PGLD-AAS foi de $19,2 \text{ dinas.cm}^{-1}$. Como já mencionado anteriormente, a baixa energia livre de superfície característica do revestimento poderia favorecer a propriedade de hemocompatibilidade e conseqüentemente a interação da superfície sintética com as plaquetas do sangue.



(A)



(B)

Figura 7.21: Micrografia da microscopia eletrônica de varredura (MEV) ilustrando a superfície de PS não revestida (A) e revestida com o dendrímero PGLD-AAS (B) após o contato com sangue humano por 180 s.

A figura 7.22 mostra as curvas representando a cinética da formação de trombos nas superfícies do PS revestida com o PGLD-AAS e não revestida (PS). Observa-se que a superfície revestida é significativamente menos trombogênica que o polímero não revestido com o PGLD-AAS.

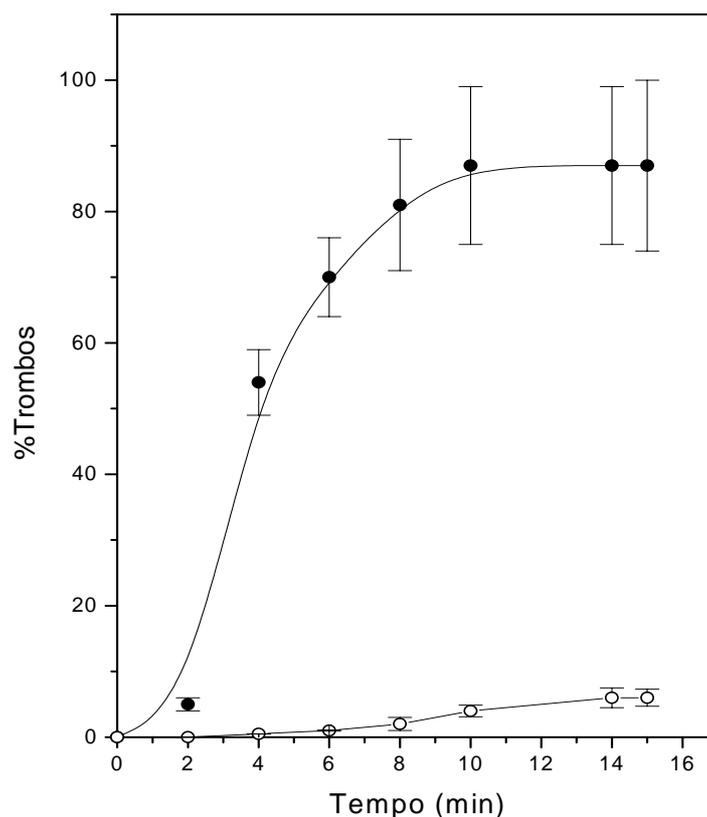


Figura 7.22: Cinética da formação de trombos na superfície do PS (placas de Elisa) antes (●) e após o revestimento com o dendrímero PGLD-AAS (○).

7.4.3 Os tempos de protrombina e de tromboplastina parcial ativada

É fato conhecido da literatura que o ácido acetilsalicílico possui atividades antitrombóticas e antiagregantes plaquetária sendo amplamente utilizado na prevenção dos eventos combinados de acidente vascular cerebral, infarto agudo do miocárdio e mortalidade cardiovascular. Portanto, sua conjugação com o dendrímero pode alterar de modo significativo a hemodinâmica do organismo humano e propiciar um efeito sinérgico entre a propriedade

antitrombótica resultantes de alterações na cascata de coagulação e a desejada atividade antitumoral.

As anormalidades na via extrínseca e comum da cascata de coagulação podem prolongar o TP (fatores VII, V, X, protrombina ou fibrinogênio). O teste pode estar prolongado nas deficiências de um ou mais dos fatores acima, bem como na presença de um inibidor de algum desses fatores. Dos cinco fatores que alteram o TP, três são dependentes de vitamina K (protrombina, fator VII e fator X) e tornam-se diminuídos com o uso dos anticoagulantes cumarínicos, motivo pelo qual o TP é o exame mais amplamente usado para a monitorização do processo de anticoagulação.

O TTPA avalia as vias intrínseca e comum da cascata da coagulação (pré-caliceína, cininogênio de alto peso molecular, fatores XII, XI, IX, VIII, X, V, protrombina e fibrinogênio). O TTPA é relativamente mais sensível a deficiências dos fatores VIII e IX do que a deficiências dos fatores XI e XII ou fatores da via comum. O TTPA é usado para detecção de deficiências ou inibidores dos fatores da coagulação da via intrínseca ou comum, além de se prestar para monitorização da anticoagulação.

A Figura 7.23 mostra a atividade anticoagulante do PGLD-AAS. Constatou-se que o conjugado bioativo PGLD-AAS apresenta significativa atividade anticoagulante. Entretanto, o mecanismo exato da atividade anticoagulante ainda está sendo investigado pelo grupo de pesquisa de biomateriais da Unifei.

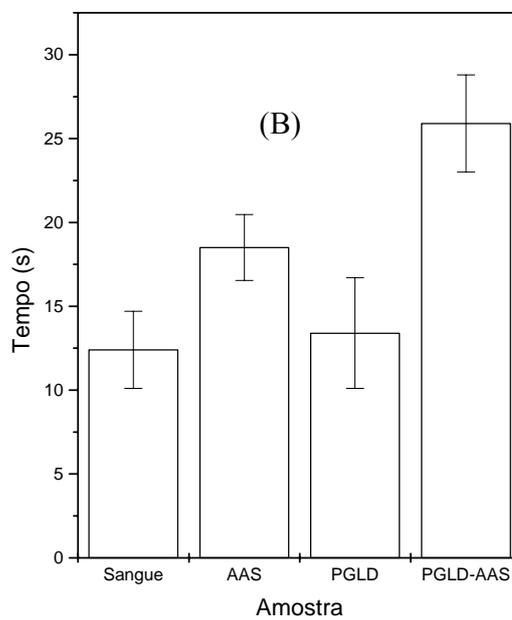
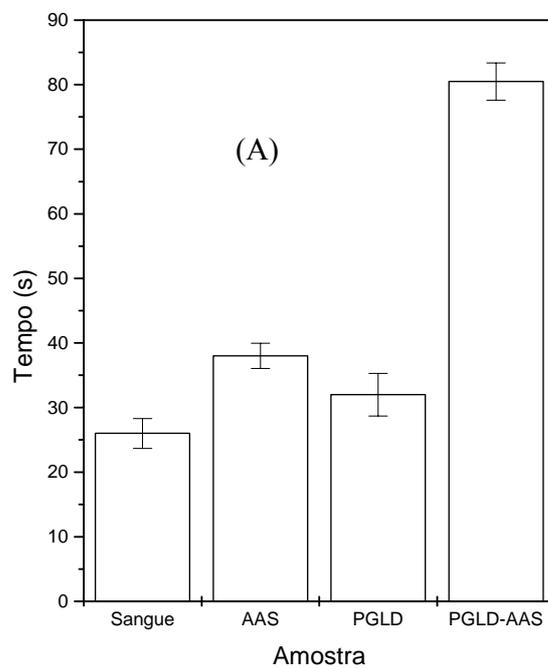


Figura 7.23: Ensaio da atividade anticoagulante do conjugado PGLD-AAS: TTPA (A) e TP (B).

7.4.4 Atividade antitumoral

Como já citado anteriormente, no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde dos últimos 5 anos (Data SUS), as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte em indivíduos com mais de 40 anos e a terceira causa de morte em todas as faixas etárias. As neoplasias malignas são responsáveis por aproximadamente 16% dos óbitos em nosso país, o que significa aproximadamente 110.000 mil mortes por ano. Ao considerarmos que estes números são subestimados, podemos destacar o impacto das neoplasias na saúde pública brasileira e mundial. Dentre as neoplasias malignas, o câncer de mama é uma das enfermidades mais frequentes, tanto em incidência como em mortalidade.

Estudos da literatura têm demonstrado a atividade antitumoral e citolítica do ácido acetilsalicílico. Entretanto os efeitos colaterais associados a este antiinflamatório não-esteróide têm incentivado a busca de derivados do AAS que possam ser utilizados no tratamento do câncer de modo seguro. A elevada funcionalidade e biocompatibilidade do dendrímero PGLD parece trazer uma luz a esta busca.

Os ensaios de determinação da viabilidade celular foram realizados para se verificar as alterações na sobrevivência das células MCF-7 quando tratadas ou não com o conjugado PGLD-AAS, estabelecendo assim o tempo e concentrações ideais de incubação com o dendrímero bioativo. Observou-se que as células tratadas com o PGLD-AAS exibiram uma diminuição da viabilidade celular de maneira dependente da dose de incubação. Notou-se que o aumento da concentração do PGLD-AAS induziu uma diminuição da viabilidade das células MCF-7, como pode ser observado na Figura 7.24, confirmando que a resposta ao dendrímero bioativo é dependente da dose utilizada. A Figura 7.25 demonstra que o extrato PGLD-AAS possui atividade antiproliferativa com IC_{50} calculada de $0,75 \mu\text{g.mL}^{-1}$, concentração dependente e efeito citostático sobre a linhagem celular MCF-7.

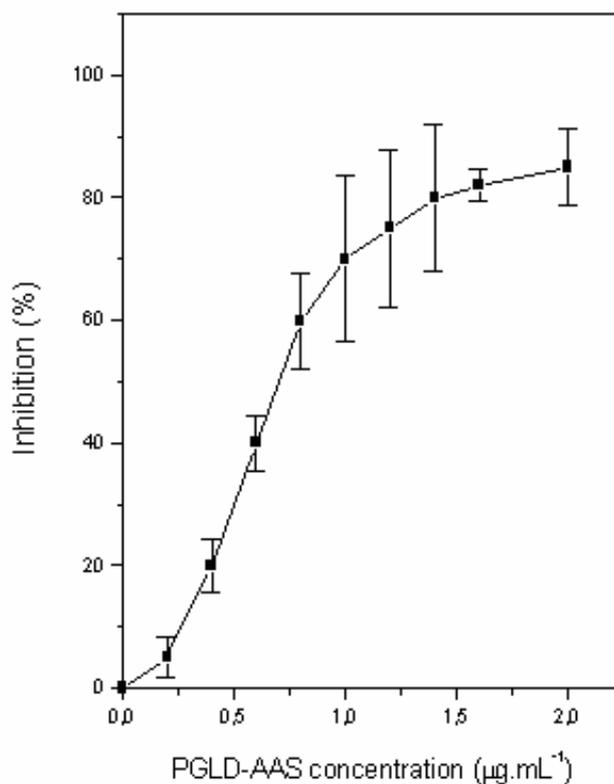


Figura 7.24: Influência da concentração de PGLD-AAS no ensaio de inibição de crescimento de células MCF-7. O percentual de crescimento foi determinado em ensaio MTS por 72 horas.

Uma vez confirmada que a resposta das células MCF-7 ao PGLD-AAS era dependente da concentração do bioconjugado, resolveu-se investigar as alterações morfológicas decorrentes do uso do dendrímero bioativo. Após tratamento com PGLD-AAS observaram-se alterações morfológicas significativas das células MCF-7 provavelmente associadas à morte celular por apoptose (Figura 7.25).

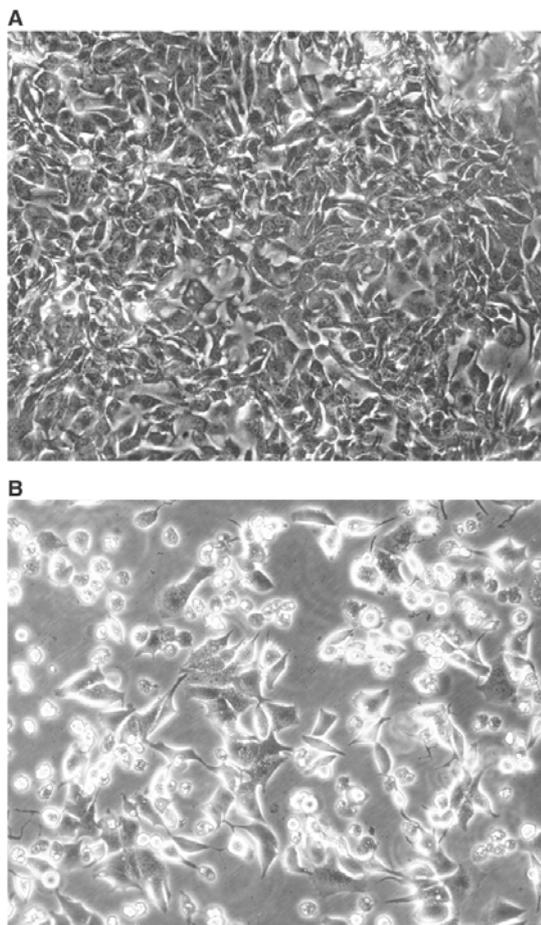


Figura 7.25: Microscopia por contraste de fase: em (A) observa-se o controle e em (B) observa-se o efeito do PGLD-AAS na morfologia das células MCF-7 em cultura *in vitro*. Aumento 200X.

7.4.5 Análise da biocompatibilidade: citotoxicidade

A citotoxicidade do PGLD-AAS sobre células de mamíferos (CHO) é ilustrada na Figura 7.24. Observou-se que a o PGLD-AAS não possui ação citotóxica sobre a linhagem de células não tumorais (CHO), o que é desejável para sua futura utilização como agente quimioterápico.

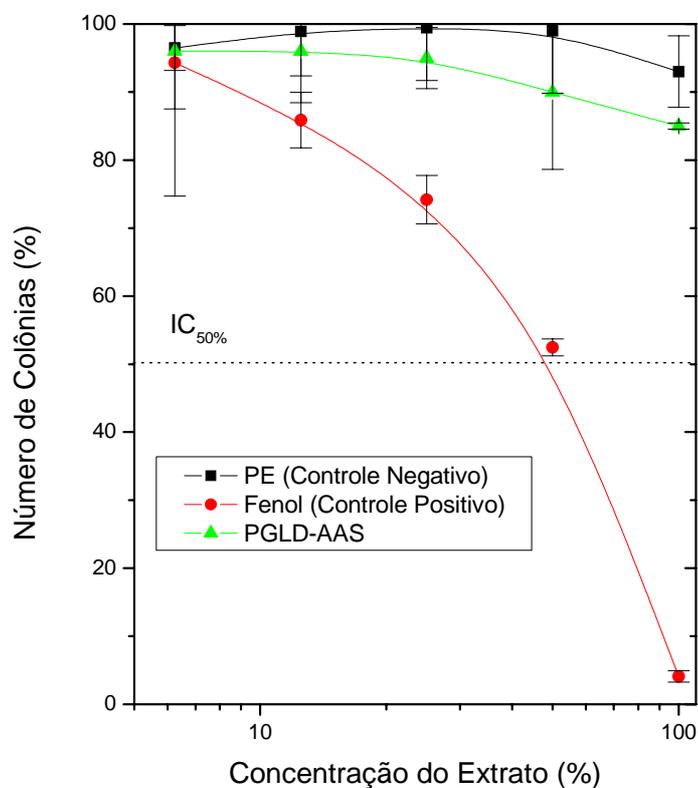


Figura 7.26: Gráfico da citotoxicidade de PGLD-AAS comparada com fenol e polietileno.

7.5 Referências bibliográficas

- [1] Moore, J.C. *J.Polym.Sci.A*, v. 2, p. 835, 1964.
- [2] Cowie, J.M.G. *Polymers: chemistry & physics of modern materials*. New York, Chapman & Hall, p. 210-213, 1991.
- [3] Knischka, R.; *et al.* Functional poly(ethylene oxide) multiarm star polymers: core-first synthesis using hyperbranched polyglycerol initiators. *Macromolecules*, v. 33, p. 315-320, 2000.
- [4] Sandler, S.R.; *et al.* *Polymer synthesis and characterization*. New York, Academic Press, p.143, 1998.
- [5] Tomalia, D.A.; Naylor, A.M.; Goddard, W.A. Starburst dendrimers: molecular level control of size, shape, surface chemistry, topology and flexibility from atoms to macroscopic matter. *Angew.Chem.Int.Ed.* v. 29, p. 138-175, 1990.
- [6] Tager, A. *Physical chemistry of polymers*. Moscow, Mir Publishers, p.130-134, 1972.

- [7] McNaughton, J.L.; Mortimer, C.T. *Calorimetria diferencial de barrido*. New York, Perkin Elmer, 1975.
- [8] Ibar, J.P. Do we need a new theory in polymer physics? *J.M.S. Rev.Macromol.Chem.Phys.* C v. 37, n. 3, p. 389-458, 1997.
- [9] Disponível em: <<http://www.prorad.com.br/pro/rni.pdf>>. Acesso: 19 fevereiro 2008.
- [10] Grant, E. H.; Sheppard, R. J. Relationship between the Electrical Permittivity of Whole Blood and the Haemoglobin Content. *Phys. Med. Biol.*, v. 19, n. 2, p. 153-160, 1974.
- [11] Gilman, A. G.; Hardman, J. G.; Limbird, L. E. Goodman & Gilman *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 10ª ed., McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 2003.
- [12] Okano, T.; *et al.* Characterization of the microstructure of poly(propylene oxide)-segmented polyamide and its suppression of platelet adhesion. *Polym.J.* 16(2): 119-28, 1984.
- [13] Disponível em: <<http://www.rbc.org.br/imagens/12-03-03-figura1.jpg>>. Acesso em 5 julho 2007.
- [14] Vroman, L.; *et al.* Reactions of formed elements of blood with plasma proteins at interfaces. *Annals N.Y.Academ.Sci.* v. 283, p. 65-75, 1977.
- [15] Rifonov, A., *et al.* Na investigation of liquid penetration through solid phase by attenuated total reflection spectroscopy (ATR). *Phys.Stat.Soli.* v. 27, p. 135-140, 1975.
- [16] Queiroz, A.A.A.; Abraham G.A.; San Román J.; Peniche C. Antimicrobial properties of polyglycerol-chitosan dendrimers. *Anais do Third International Congress on Biomaterials-Biomat'03*. La Habana, Cuba, March 25th–28th, p. 10, 2003.
- [17] Forbes, C.D.; Prentice, C.R.M. Thrombus formation and artificial surfaces. *BritishMed.Bull.* v. 34, n. 2, p. 201-207, 1978.
- [18] Ratner, B.D. Biomedical applications of synthetic polymers. In: Allen G.; Bevington J. (Editors). *Comprehensive polymer science*. New York (EUA), Pergamon Press, v. 7, p. 201-247, 1989.
- [19] Queiroz, A. A. A. Thermodynamic analysis of the surface of biomaterials. *J. Molec. Structure (Theochem)*, v. 394, p. 271-279, 1997.
- [20] Bayer, R.E. The role of surface energy in thrombogenesis. *Bull.N.Y.Academ.Med.* v. 48, n. 2, p. 257-72, 1972.

- [21] Hayes, R.A., The relationship between glass temperature, molar cohesion and polymer structure. *J.Appl.Polym.Sci.* v. 5, n. 15, p. 318-321, 1961.
- [22] Lee, L.H. Relationship between surface wettability and glass temperature of high polymers. *J.Appl.Polym.Sci.* v. 12, p. 719-30, 1968.
- [23] Bayer, R.E. Key events in blood interactions at nonphysiologic interfaces- A personal primer. *Artif.Organs.* v. 2, n. 4, 1978.
- [24] Josefowicz, M.; Josefowicz, J. Antitrombogenic polymers. *Pure & Appl.Chem.* v. 56, n. 10, p. 1335-1344, 1984.
- [25] Beugeling, T. The interaction of polymer surfaces with blood. *J.Polym.Sci.:Polym.Symp.* v. 66, p. 419-428, 1979.

Capítulo 8 – Conclusões

O estudo das propriedades do conjugado dendrímero de poliglicerol com o ácido acetil salicílico (PGLD-AAS) foi realizado através de ensaios físicos, químicos e biológicos relacionados. Cada ensaio foi essencial tanto na caracterização do material quanto na análise da hemocompatibilidade do mesmo.

Através da análise por GPC foram realizadas medidas a fim de se observar o grau de pureza do dendrímero de poliglicerol sintetizado. Os resultados do baixo índice de polidispersão obtido (1,05) e o pico próximo da característica monomodal indicam um elevado grau de pureza do dendrímero PGLD. Através desta técnica, também foi possível determinar o comprimento cinético da cadeia polimérica sendo igual à aproximadamente 20 e que o PGLD sintetizado neste trabalho é de geração 5 (G5).

Os resultados da espectroscopia ^{13}C -RMN e ^1H -RMN comprovaram a estrutura dendrítica do polímero de poliglicerol bem como a existência dos grupos hidroxilas terminais que interagem diretamente com as proteínas do plasma sanguíneo. Através da técnica ^{13}C -RMN obteve-se o grau de ramificação da macromolécula. O resultado obtido ($G_R = 0,80$) indica a formação da estrutura dendrítica do PGLD sintetizado.

O resultado da técnica de DSC indica uma temperatura de transição vítrea de aproximadamente -27°C , apropriada para que o dendrímero obtido não sofra nenhuma transição de fase no fluído e temperaturas corpóreas.

Os ensaios de constante dielétrica do sangue sugerem que o conjugado PGLD-AAS não sofre agregação e seu comportamento quanto a fenômenos de polarização elétrica no fluído fisiológico é muito parecido com as células sanguíneas.

Os ensaios de biocompatibilidade indicam que o conjugado PGLD-AAS possui as 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.

O conjugado PGLD-AAS exibiu atividade específica para a linhagem MCF-7, sendo observado apoptose celular resultante desta interação.

Capítulo 9 – Perspectivas Futuras

A aplicação do conjugado PGLD-AAS representa uma vertente interessante quanto ao desenvolvimento de biomateriais bioativos quanto à sua atividade antitumoral. Neste sentido, a química nanoscópica tem demonstrado ser uma ferramenta poderosa no desenvolvimento de compostos bioativos em escala nanométrica.

Aliado à bioquímica e engenharia de materiais, o PGLD-AAS de baixa toxicidade para o tecido biológico e ao mesmo tempo com atividade antitumoral contra células de MCF-7 são oferecidos à medicina oncológica. Entretanto, o elevado custo da técnica de obtenção do conjugado PGLD-AAS exclui neste momento a população de baixa renda em nosso país e se constitui num desafio que deve ser vencido.

Espera-se que esta dissertação forneça as ferramentas iniciais para o desenvolvimento de sistemas simples e extremamente versáteis quanto ao seu tipo de aplicação na área da oncologia. O escopo do presente trabalho e, obviamente, também o binômio tempo/instrumentação nos privou de respostas a um conjunto de perguntas que surgiram após as respectivas análises dos resultados obtidos e 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 Investigar a estrutura do PGLD por técnicas do tipo Maldi-Tof e RMN-3D, buscando uma melhor caracterização deste dendrímero do ponto de vista topológico.
- 3 Estudar o efeito de solvatação do conjugado PGLD-AAS por técnicas de RMN.
- 4 Estudar a hemocompatibilidade do sistema PGLD-AAS quanto ao mecanismo de transporte de proteínas globulares e não globulares para uma melhor compreensão da interação entre o sistema sintético e o fluido fisiológico.
- 5 Analisar o mecanismo de interação entre plaquetas do sangue e o grupo farmacofórico do AAS imobilizado na superfície dendrítica.
- 6 Aprofundar o estudo da interação com as células da linhagem MCF-7 observando o mecanismo de apoptose induzido pelo PGLD-AAS do ponto de vista da biologia molecular.

- 7 Investigar a atividade antitumoral do PGLD-AAS em outras linhagens de células tumorais.

Cada sugestão futura proposta acima tem como objetivo responder a perguntas altamente específicas e, cujas respostas contribuirão significativamente para o domínio da tecnologia de síntese de dendrímeros transportadores de quimioterápicos. Acreditamos que as perguntas merecem respostas não somente para a satisfação intelectual, mas procurando também contribuir para que nossas universidades depositem seu olhar sobre aqueles que são nossa mais forte e pura motivação de existência científica, os menos favorecidos de nossa sociedade.