

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MATERIAIS PARA ENGENHARIA

**DENDRÍMERO DE POLIGLICEROL CARREGADO COM COMPLEXO DE
BORO-CURCUMINA COMBINANDO ANTI-ANGIOGÊNESE E BNCT COM
POTENCIAL PARA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO DO CÂNCER.**

ALEXANDRO DA SILVA NUNES

Itajubá-MG

Agosto de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

MATERIAIS PARA ENGENHARIA

ALEXANDRO DA SILVA NUNES

**DENDRÍMERO DE POLIGLICEROL CARREGADO COM COMPLEXO DE
BORO-CURCUMINA COMBINANDO ANTI-ANGIOGÊNESE E BNCT COM
POTENCIAL PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER.**

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia, Instituto de Física e Química (IFQ), da Universidade Federal de Itajubá, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Doutor em Ciências em Materiais para Engenharia.

Área de concentração: Não Metais

Orientador: ALVARO ANTÔNIO ALENCAR DE QUEIROZ

Itajubá-MG

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

MATERIAIS PARA ENGENHARIA

ALEXANDRO DA SILVA NUNES

**DENDRÍMERO DE POLIGLICEROL CARREGADO COM COMPLEXO DE
BORO-CURCUMINA COMBINANDO ANTI-ANGIOGÊNESE E BNCT COM
POTENCIAL PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER.**

Banca Examinadora:

Prof. ALVARO ANTÔNIO ALENCAR DE QUEIROZ (Orientador)

Prof. ADHIMAR FLÁVIO OLIVEIRA

Profª. KARINA ARRUDA ALMEIDA

Profª. MARIA FERNANDA XAVIER PINTO MEDEIROS

Prof. NIRTON CRISTI SILVA VIEIRA

Itajubá-MG

2019

Dedico

a Isabella, Davi Lucca e Emanuella

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela vida.

Agradeço ao Prof. Alvaro A.A. Queiroz por me oferecer este tópico interessante e pela possibilidade de trabalhar em seu grupo de pesquisa. Agradeço o apoio acadêmico, científico e pessoal. Agradeço a ele também pelo apoio para superar momentos difíceis das circunstâncias da vida.

Agradeço a Profa. Maria Elena pela convivência agradável, pelo apoio contínuo e por seus incentivos.

Agradeço aos meus colegas do laboratório pela convivência que se transformou em amizade.

Agradeço pela realização dos testes biológicos a prof. Dra Olga Zazuco Higa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo (IPEN/USP), a prof. Dra Andrea Cecília Dorión Rodas da Universidade Federal do ABC (UFABC) e ao prof. Dr Décio dos Santos Pinto Jr da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP).

O autor também agradece a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à FAPEMIG (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) para apoio financeiro e bolsas de estudo.

Finalmente agradeço a minha família por todo apoio.

Sumário

Capítulo 1 - Motivação para o Desenvolvimento da Tese	1
1.1. Dendrímeros de Poliglicérol Transportadores do Complexo Boro-curcumina para o Tratamento do Câncer de Cabeça e Pescoço	3
Capítulo 2 - Técnicas Clínicas Convencionais para o Tratamento de Gliomas	7
2.1. Glioma	7
2.2. Diagnóstico Clínico de Gliomas	9
2.3. Ressonância Magnética (RM)	9
2.4. Monitoramento <i>in vivo</i> por Imagem de Ressonância Magnética de Gliomas	11
2.5. Agentes de Contraste em Ressonância Magnética de Imagem (RMI)	12
2.6. Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (PET)	14
2.7. Terapia Clínica de Gliomas	15
2.8. Terapia Anti-Angiogênese	18
2.9. Radioterapia no Tratamento Clínico de Tumores	24
Capítulo 3 - Sobre a Utilização da Terapia de Captura de Nêutrons pelo Boro (BNCT) no Tratamento de Gliomas	27
3.1. Conceitos Básicos da BNCT	27
3.2. Sistemas Moleculares Transportadores de Boro para BNCT	28
3.2.1. Concepção de Ringsdorf do Transporte Molecular de Fármacos	28
3.2.2. Agentes transportadores de ^{10}B	30
3.2.3. Agentes de Terceira Geração para a BNCT	32
3.2.4. Dendrímeros com Agentes Transportadores de Boro	33
3.3. Dosimetria da BNCT	38
3.4. O Projeto de Reatores de Nêutrons Térmicos para a BNCT	40
3.5. Fontes de Nêutrons para BNCT	41
3.6. Reatores de Fissão para BNCT	41
3.7. Fontes de Nêutrons Baseados em Aceleradores de Partículas (ABNS)	43
3.8. Utilização de Aceleradores de Partículas	43
3.9. Análise Crítica da BNCT	44
3.10. Resultados dos Ensaio Clínicos nos EUA, Europa e Japão	46

Capítulo 4 – Objetivos	48
4.1. Objetivos Gerais	48
4.2. Objetivos Específicos	48
Capítulo 5 - Materiais e Métodos	49
5.1. Síntese e Caracterização do PGLD	49
5.2. Síntese do Conjugado PGLDBC	49
5.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN- H^1 e RMN- C^{13})	50
5.4. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	52
5.5. Análise Termogravimetria (TGA)	52
5.6. Caracterização <i>in silico</i> de Ancoragem Molecular	52
5.6.1. Configuração do Cluster	52
5.6.2. Preparação das Estruturas Moleculares de ASH e do PGLD	53
5.6.3. Ancoragem Molecular	54
5.7. Potencial eletrostático	55
5.8. Ensaios Biológicos	56
5.8.1. Linhagem Celular, Reagentes e Condições de Cultura	56
5.8.2. Determinação de IC_{50} Utilizando o Ensaio MTS	58
5.8.3. Análise das Células Apoptóticas pelo Método Tunel	58
Capítulo 6 - Resultados e Discussão	59
6.1. Caracterização do PGLD e PGLDBC com RMN H^1 , RMN ^{13}C e FTIR.	59
6.2. Estabilidade Térmica do PGLD, PGLDBC e da Curcumina	76
6.3 Resultado de Ancoragem Molecular	79
6.4. Interação PGLD-ASH	82
6.5. Local de Ligação	83
6.6. Modo de Interação	84
6.7. Curva de Viabilidade Celular e Determinação do IC_{50}	85
6.8. Análise de Apoptose Celular pelo Método de Tunel	89
Capítulo 7 – Conclusão	94
Capítulo 8 - Perspectivas	95
Referências	96

Índice de Figuras

- Figura 1** - Estrutura molecular (A) e o potencial eletrostático (B) do PGLD G4, a cor azul indica deficiência de elétrons e a cor vermelha excesso de elétrons. 4
- Figura 2** - Tumores cerebrais de glioblastoma multiforme (GBM) [15]. 7
- Figura 3** - Distribuição de diferentes tipos de tumores do SNC [6]. 7
- Figura 4** - Espectros de substância branca normal. Mio-inositol, glutamina + glutamato e lipídeos + macromoléculas são vistos no espectro. NAA = N-acetil-aspartato, Cr = Creatina, Cho = colina, min = mio-inositol, Glux = glutamina + glutamato, ppm = partes por milhão [19]. 9
- Figura 5** - Imagem de RM de colina registrada, em um paciente com um astrocitoma grau II, mostra uma área vermelha adjacente ao volume principal do tumor, indicando que isto pode representar, uma área de maior malignidade [19]. 9
- Figura 6** - Estrutura molecular e potencial eletrostático dos marcadores de PET, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons. 11
- Figura 7** - Em (a) após a injeção de contraste gadolínio (Gd); Na imagem (B) mostrando um grande sinal anormal com um núcleo intenso; (C) oferece uma visão na medida do edema (seta vermelha). A imagem (D) mostra células tumorais ativas na periferia do tumor (seta branca); (E) mostra a área de difusão anormal de moléculas de água; (F) corresponde ao tecido cerebral saudável (seta branca) e ao tecido tumoral (setas vermelhas) [19]. 12
- Figura 8** - (A) imagem metabólica infiltrante de uma paciente com astrocitoma anaplásico. (B) ^{18}F FET-PET de um segundo paciente com glioma, tratado com terapia anti-angiogênese (C). ^{18}F -FLT comparada a ressonância magnética de imagem, para um terceiro paciente GBM. (D) ^{18}F -FMISO a varredura em um quarto paciente com um GBM no lobo temporal esquerdo [25]. 13
- Figura 9** - Estrutura molecular e potencial eletrostático da Temozolamida, a cor 14

vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons.

Figura 10 - Estrutura molecular e potencial eletrostático da 1,3-bis-(2-cloroetil)-1-nitrosuréia (BCNU), a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons. 15

Figura 11 - Estrutura molecular e potencial eletrostático da (a) vincristina e (b) lignanas, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons 16

Figura 12 - Estrutura cristalográfica do Bevacizumab obtida no Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) [32]. 17

Figura 13 - Estrutura molecular e potencial eletrostático da curcumina, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons. 18

Figura 14 - Rizomas frescos, secos e moídos de *Curcuma longa* [47]. 18

Figura 15 - Estrutura cristalográfica PDB 1SVC do NF-KB obtida no Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) [79]. 20

Figura 16 - Mecanismo geral da função do fator de transcrição NF-kappaB [80]. 21

Figura 17- Estrutura molecular e potencial eletrostático da piperina, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons. 23

Figura 18 - Os núcleos de He^4 e Li^7 , percorrem distâncias de 8,8 e 4,8 μm respectivamente, com taxa de transferência linear de energia (LET) de 196 e 162 $\text{KeV}/\mu\text{m}$, a um diâmetro de $<10\mu\text{m}$, e a radiação gama de 478 KeV é proveniente da desexcitação do núcleo de ^7Li (94 %) e dos 6 % restantes de energia cinética sem radiação gama [87]. 26

Figura 19 - O modelo de Ringsdorf para o sistema de administração de fármaco à base de polímeros sintéticos [111]. 28

Figura 20 - Nanotransportador dendrítico unimolecular para encapsulamento supramolecular de composto biologicamente ativo [112]. 28

Figura 21 - Estrutura molecular e potencial eletrostático do BPA, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons. 29

Figura 22 - Estruturas de polímeros: (a) polímero linear, (b) polímero hiper-ramificado e (c) dendrímero [146]. 32

Figura 23 - Síntese divergente via adição e desproteção de uma unidade de 33

monômero (superior) e síntese convergente de dendrímeros (inferior) [146].

Figura 24 - Polímero dendrítico: (a) dendrímero de poliglicerol perfeito [G3] e (b) poliglicerol hiperramificado (PGh) [146].

Figura 25 – (A) Estrutura molecular do dendrímero de poliglicerol boronado (PGLDB), (B) e o seu potencial eletrostático, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons [165].

Figura 26 - Estrutura do dendrímero PAMAM boronado e com anticorpo monoclonal biodirecionador [166].

Figura 27 - Reator da síntese do conjugado do dendrímero de poliglicerol com o complexo de boro e curcumina (PGLDBC).

Figura 28 - Estruturas moleculares da síntese do conjugado PGLDBC a partir do PGLD, do ácido bórico e da curcumina.

Figura 29 - Aparelhos de ressonância magnética nuclear de carbono treze e hidrogênio (RMN ^{13}C e ^1H) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo/São Carlos [240].

Figura 30 - Esquema do poliglicerol com estrutura L, D e T que significam lineares, estruturas dendríticas e terminais, respectivamente [146].

Figura 31 - Estrutura da ASH extraída do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) [248].

Figura 32 - Estruturas do PGLD (A) G3 e (B) G4 calculadas de acordo com o método AM1 (Austin Model) semi-empírico de química quântica computacional [250].

Figura 33 - Potencial eletrostático do PGLD (A) G3 e (B) G4, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons.

Figura 34 - Espcetros de RMN ^{13}C (a) indicando os picos correspondentes aos grupos L₁₃, L₁₄, D e T; RMN ^{13}C DEPT especificando os picos referentes a CH e CH₂ (b) e RMN ^1H apresentando os deslocamentos químicos para OH, CH, CH₂, CH₂OH e TMP (c)

Figura 35 – RMN ^1H (500 MHz, DMSO d_6). Deslocamentos (δ , ppm): 4,6 (OH); 3,6 (OCH₂-CHCH₂); 3,5-3,2 (CH₂-O-CH₂)

Figura 36 – Espectro de HSQC da curcumina em DMSO d_6

Figura 37 - Espectro de RMN ^{13}C , DMSO d_6 com valores de integração

correspondentes a estruturas L₁₃, L₁₄, D e T

Figura 38 - A determinação dos tipos de estruturas formadas como L₁₃, L₁₄, D e T são de acordo com as reações entre grupos específicos e apresentam diferentes deslocamentos químicos 66

Figura 39 - Espectro de RMN ¹H em DMSO-d₆ 500 MHz do conjugado PGLDBC demonstrando o deslocamento do pico do H-1 de 6.01 ppm para 6.5 ppm caracterizando a formação do complexo entre o boro e a curcumina 67

Figura 40 - Espectro de RMN ¹H em DMSO-d₆ 500 MHz do conjugado PGLDBC com o desaparecimento do pico do correspondente a OH fenólica da curcumina em 9.5 ppm, indicando a formação da ligação destas com as hidroxilas do PGLD 69

Figura 41 - Espectro de RMN ¹³C em DMSO-d₆ 175 MHz do conjugado PGLDBC com os deslocamentos químicos característicos do PGLD e da curcumina de acordo com o relatados na literatura indicando a formação do conjugado 70

Figura 42 - Espectro de RMN ¹³C em DMSO-d₆ 175 MHz do conjugado PGLDBC com os deslocamentos químicos característicos do PGLD em concordância com o relatado na literatura indicando a formação do conjugado 71

Figura 43 - O espectro de FTIR do conjugado PGLDBC demonstra que o complexo apresenta uma diminuição na intensidade da banda de carbonila (C = O), acompanhada de uma variação de aproximadamente 50 cm⁻¹ para os valores de número de onda correspondentes ao espectro da curcumina relatado na literatura 74

Figura 44 - Espectro de FTIR da curcumina 74

Figura 45 - Espectro de FTIR do PGLD 75

Figura 46 - Análise termogravimétrica do conjugado PGLDBC 76

Figura 47 - Análise Termogravimétrica da curcumina 77

Figura 48 - Análise Termogravimétrica do PGLD G4 78

Figura 49 - Histogramas de aglomerados de energia de 100 conformações geradas pela ancoragem de ASH no local IIA (A) e I (B). As conformações geradas pelo AutoDock foram agrupadas em RMSD = 2 Å e, em seguida, plotadas pela conformação de menor energia de cada cluster. (*) indica o mais abundante com o menor cluster de energia prevendo interação ASH-PGLD. 80

Figura 50 - Principais conformações de encaixe para o G3 nos sites IIA. 81

Figura 51 - Interações entre G3 com o resíduo de aminoácido Trp (A) e G3 (B) 82
com os resíduos Trp e Tyr.

Figura 52 - Modo de ligação do complexo PGLD-ASH, de acordo com os resíduos 83
de aminoácidos Gly189, Ala291, Tyr138, Tyr161 e Tyr191 que fazem parte do
sítio que faz interações hidrofóbicas com o PGLD.

Figura 53 - Sensibilidade das linhagens celulares estudadas ao PGLDB. A 85
concentração de células utilizadas no ensaio foi $1,0 \cdot 10^4$ por poço em 100 μ L do
meio de cultura em poços de placas Elisa de 96 poços. A viabilidade celular foi
medida depois de 24 horas de incubação após a aplicação do PGLDB. Cada ponto
corresponde à média de três ensaios. Os desvios padrões são inferiores a 1,0% e por
isso não estão destacados nos pontos.

Figura 54 - Sensibilidade das linhagens celulares estudadas à curcumina. A 86
concentração de células utilizadas no ensaio foi $1,0 \cdot 10^4$ por poço em 100 μ L do
meio de cultura em poços de placas Elisa de 96 poços. A viabilidade celular foi
medida depois de 24 horas de incubação após a aplicação da curcumina. Cada
ponto corresponde à média de três ensaios. Os desvios padrões são inferiores a
1,0% e por isso não estão destacados nos pontos.

Figura 55 - Sensibilidade das linhagens celulares ao PGLDBC. A concentração de 86
células utilizadas no ensaio foi $1,0 \cdot 10^4$ por poço em 100 μ L do meio de cultura em
poços de placas Elisa de 96 poços. A viabilidade celular foi medida depois de 24
horas de incubação após a aplicação do PGLDBC. Cada ponto corresponde à média
de três ensaios. Os desvios padrões são inferiores a 1,0% e por isso não estão
destacados nos pontos.

Figura 56 - Controle positivo (DMSO) e controle negativo para as linhagens 87
celulares estudadas nesse trabalho. O controle negativo correspondeu às linhagens
celulares CHO, HK, SCC25 e SCC9 em seu próprio meio de cultura após 24 horas.
A concentração de células utilizadas no ensaio foi $1,0 \cdot 10^4$ por poço em 100 μ L do
meio de cultura em poços de placas Elisa de 96 poços. A viabilidade celular foi
medida depois de 24 horas de incubação após a aplicação do DMSO. Cada ponto
corresponde à média de três ensaios. Os desvios padrões são inferiores a 1,0% e por
isso não estão destacados nos pontos.

Figura 57 - A estrutura molecular do DAPI ligado no DNA obtido no RCSDB do 88

pdb 1D30 [280].

Figura 58 - A estrutura molecular do DAPI ligado no DNA obtido no RCSDB do 89
pdb 1D30 [280].

Figura 59 - A estrutura molecular do BRCT obtido no RCSDB do pdb 2COE 89
[285].

Figura 60 - Fotografia representativa dos ensaios pelo método de Tunel para 90
apoptose dos grupos controles SCC9 (A), SCC25 (B) e após exposição ao
PGLDBC: SCC9(C) e SCC25(D).

Figura 61 - Contagem de células em apoptose nas linhagens celulares SCC9 e 91
SCC25 após administração do PGLDBC. A quantidade de PGLDBC adicionada às
culturas celulares são equivalentes à IC_{50} .

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Análise do espectro de RMN ^{13}C para o PGLD sintetizado neste trabalho. Solvente: DMSO, temperatura: 25 °C	66
Tabela 2 - Deslocamentos químicos (ppm) para Hidrogênio (^1H) e Carbono (^{13}C), número de hidrogênios, multiplicidade (d: dubleto; s: singlete) e constante de acoplamento (J) em Hz do conjugado PGLDBC	73

Lista de Abreviações

ASH – ALBUMINA DE SORO HUMANO

BNCT – TERAPIA DE CAPTURA DE NÊUTRONS

CLAE – CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

DEPT - INTENSIFICAÇÃO SEM DISTORÇÃO POR TRANSFERÊNCIA DE POLARIZAÇÃO

DMSO – DIMETILSULFÓXIDO

DSC – CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL

DTGA – DERIVADA DA TG

EM – ESPECTRO DE MASSAS

FCB - REATOR NUCLEAR DO MIT

FTIR – ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADAS DE FOURIER

G0 – DENDRÍMERO DE GERAÇÃO ZERO

G1 – DENDRÍMERO DE PRIMEIRA GERAÇÃO

G2 – DENDRÍMERO DE SEGUNDA GERAÇÃO

G3 – DENDRÍMERO DE TERCEIRA GERAÇÃO

G4 – DENDRÍMERO DE QUARTA GERAÇÃO

GPC - CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL

HSQC – COERÊNCIA QUÂNTICA HETERO NUCLEAR ÚNICA

IEA-R1 - REATOR NUCLEAR DO IPEN

INCA – INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER

PDB – BANCO DE DADOS DE PROTEÍNAS

PEG – POLI (ETILENOGLICOL)

PG - POLIGLICEROL

PGLh - POLIGLICEROL HIPERRAMIFICADO

PGL-10 – NÚCLEO OLIGOMÉRICO DE DECAGLICEROL

PGLD – DENDRÍMERO DE POLIGLICEROL

PGLDBC – CONJUGADO DO DENDRÍMERO DE POLIGLICEROL LIGADO AO COMPLEXO DE BORO-CURCUMINA

TG – ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

T_g – TEMPERATURA DE TRANSIÇÃO VÍTREA

TGA – CURVA GERADA PELA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA

RMN-H¹ - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO

RMN-C¹³ - RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE CARBONO

RMSD – DESVIO PADRÃO MÉDIO

DENDRÍMERO DE POLIGLICEROL CARREGADO COM COMPLEXO DE BORO-CURCUMINA COMBINANDO ANTI-ANGIOGÊNESE E BNCT COM POTENCIAL PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER

Resumo

Nos últimos anos a utilização de nanopartículas terapêuticas na medicina oncológica, tornou-se importante para a distribuição específica de quimioterápicos, permitindo a obtenção de formulações próprias. Nesta Tese as nanopartículas foram preparadas para aplicação na terapia de captura de nêutrons (BNCT) e na terapia anti-angiogênese. O dendrímero de poliglicerol (PGLD) foi utilizado como nanoplataforma neste trabalho, devido às suas inúmeras vantagens, tais como baixa toxicidade e facilidade de funcionalização. O objetivo desta Tese foi à síntese e caracterização de nanopartículas, baseadas no PGLD para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço. O PGLD foi conjugado com o complexo de boro-curcumina (PGLDBC). Em seguida foi caracterizado por RMN (^1H , ^{13}C), FTIR e análise termogravimétrica (TGA). As nanopartículas obtidas foram incubadas em condições *in vitro* com células tumorais das linhagens SCC25 e SCC9 e suas propriedades anticancerígenas foram avaliadas através da técnica de TUNEL apresentando CL_{50} de 15,44 mg/mL e 4,74 mg/mL. Confirmando o potencial do PGLDBC para o tratamento de câncer de cabeça e pescoço.

Palavras chaves: Dendrímero de Poliglicerol, curcumina, BNCT, Anti-angiogênese, Glioma.

DENDRIMER OF POLYGLYCEROL LOADED WITH COMPLEX BORO-CURCUMIN COMBINING ANTI-ANGIOGENESIS AND BNCT WITH POTENTIAL FOR THE TREATMENT OF CANCER

Abstract

In recent years, the use of therapeutic nanoparticles in cancer medicine has become important in order to obtain the specific distribution of chemotherapeutic agents, allowing the formulation of their own formulations. In this thesis the nanoparticles were prepared for application in boron neutron capture therapy (BNCT) and anti-angiogenesis therapy. Polyglycerol dendrimer (PGLD) was used as a nanopatform in this work because of its numerous advantages such as low toxicity and ease of functionalization. In this thesis the synthesis and characterization of nanoparticles based on PGLD for the treatment of head and neck cancer were performed. The polyglycerol dendrimer was conjugated to the boro-curcumin complex (PGLDBC). Then it was characterized by NMR (^1H , ^{13}C), FTIR and thermogravimetric analysis (TGA). The nanoparticles obtained were incubated under *in vitro* conditions with tumor cells of the SCC25 and SCC9 lines and their anticancer properties were evaluated by the TUNEL technique with LC50 of 15,44 mg/mL and 4,74 mg/mL. Confirming the potential of PGLDBC for the treatment of head and neck cancer.

Keywords: Polyglycerol dendrimer, Curcumin, BNCT, Anti-angiogenesis, Glioma.

Prefácio

Esta tese emprega o dendrímero de poliglicerol (PGLD) como transportador de um complexo de boro-curcumina para utilização na terapia de captura de nêutrons e na terapia anti-angiogênese de câncer.

No Capítulo 1 foi apresentado a motivação para esta tese que é a aplicação do conjugado do dendrímero de poliglicerol com um complexo de boro e curcumina com potencial para o tratamento de câncer por terapias de captura de nêutron e antiangiogênica.

No capítulo 2 foi realizado uma introdução sobre a classificação dos diferentes tipos de gliomas assim como os índices de incidência relatados na literatura no Brasil, o diagnóstico e as terapias convencionais.

No Capítulo 3 foi apresentado o “Estado da Arte” quanto aos transportadores de boro empregados em BNCT, culminando no potencial dendrímero de poliglicerol empregado como transportador de um complexo de boro. Um estudo a respeito da química supramolecular dos dendrímeros também foi apresentada abordando as interações moleculares entre as macromoléculas dendríticas e os sistemas biológicos. Além dos conceitos fundamentais sobre a terapia de captura de nêutrons por boro mostrando ainda as características do reator nuclear FCB do MIT e do reator nuclear IEA-R1 do IPEN. As vantagens e desvantagens do emprego de aceleradores de partículas em BNCT. Foi realizado uma análise crítica dos ensaios clínicos da BNCT, onde foram enfatizados pontos importantes que precisam ser melhorados, como a eficiência dos transportadores de boro, a dosimetria para microdistribuição de boro nas células em tempo real, assim como a padronização da técnica como um todo de forma que os resultados obtidos possam ser comparados. Além da questão da reprodutibilidade de todo o processo desenvolvido em diferentes centros de pesquisa.

No Capítulo 4 foram apresentados os objetivo geral e específicos.

Uma descrição detalhada da metodologia experimental, tais como síntese do PGLD e a conjugação com o complexo de boro-curcumina. Assim como as

caracterizações físico-químicas e os ensaios biológicos foram apresentados no Capítulo 5.

O Capítulo 6 apresenta os resultados obtidos e sua discussão.

No Capítulo 7 são apresentadas as conclusões desta tese que foram elaboradas com base nos resultados encontrados

E por fim as perspectivas foram apresentadas no capítulo 8.

Capítulo 1 - Motivação para o Desenvolvimento da Tese

O glioblastoma é a forma mais comum de tumor cerebral e o mais agressivo. Esse tipo de câncer sem tratamento apresenta uma sobrevida média de aproximadamente três meses. O método atual de tratamento envolve a ressecção cirúrgica seguida por radioterapia concomitante e quimioterapia com o agente alquilante de DNA a temozolomida (TMZ). O custo apenas do medicamento é de R\$ 80.000 mil reais para uma dose diária de 150 a 200 mg/m², por 5 dias a cada 28 dias [1]. Considerando a ineficácia terapêutica deste quimioterápico e a impossibilidade da remoção completa do tumor por cirurgia, a recorrência é inevitável e este tratamento se torna economicamente inviável [2].

Os dados do *World Cancer Report* de 2014 da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS) são conclusivos quando afirmam que o câncer é um problema de saúde pública e que 80% de 20 milhões de casos de câncer previsto até 2025 ocorrerão em países em desenvolvimento.

No Brasil segundo o Ministério da Saúde houve um déficit de repasse de R\$ 90 milhões não corrigidos pela inflação acumulada nos últimos cinco anos e de aproximadamente R\$ 350 milhões em 20 anos no setor de radioterapia do SUS. Isto reflete diretamente nos resultados de incidência de câncer no país, uma vez que um trabalho de prognóstico eficiente poderia diminuir drasticamente estas estatísticas [3]. Dados coletados no setor de radioterapia do SUS demonstraram que o modelo vigente não leva em consideração variáveis importantes. Por exemplo, a discrepância entre a incidência de câncer e o número de procedimentos aprovados, o que pode ser justificado pela não inclusão de novas tecnologias como a radioterapia guiada por imagem, que possibilitaria diagnosticar e curar o câncer precocemente [3].

Portanto, é importante considerar os custos monetários com a adoção de novas tecnologias que poderão ser vantajosas em relação aos custos dos atuais tratamentos que se tornarão cada vez mais obsoletos e ineficientes à longo prazo.

1.1. Dendrímero de Poliglicerol Carregado com Complexo de Boro-curcumina Combinando Anti-Angiogênese e BNCT no Tratamento do Câncer de Cabeça e Pescoço

Uma vez que o tratamento desse tipo de tumor não apresenta bons resultados através de cirurgia, quimioterápicos e radioter picas convencionais   necessária   exploração de novas alternativas. As propostas desta Tese como novas possibilidades de terapias são a captura de nêutrons pelo boro (BNCT) e a anti-angiogênese. Portanto, para contornar essas as limitações apresentadas pelas terapias convencionais, foi conjugado um complexo de boro-curcumina a um nanotransportador dendrítico de poliglicerol (PGLDBC). Este dendrímero de poliglicerol é apresentado nesta Tese como um transportador de um complexo de boro-curcumina com propriedades antitumorais. Dada a natureza altamente angiogênica do glioblastoma, a proposta foi combinar a BNCT com este potente agente anti-angiog nico a curcumina.

Há relatos na literatura de que o PGLD consegue atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e ainda apresentar uma captação celular de dezesseis vezes maior em comparação com o fármaco livre, além proporcionar um aumento na retenção do fármaco dentro da célula. Considerando que estas são as principais def ci ncias dos atuais fármacos em aplicação clínica na BNCT este conjugado se apresenta como promissor [4,5]. A curcumina é um importante inibidor da angiogênese, porém, sua propriedade é limitada devido a baixa absorção. Portanto a eficiência terapêutica da curcumina levou a esta conjug  o com o PGLD e a elucidação do seu mecanismo de a  o, que é explicado pela desativação do fator de transcrição (NF B) que é o responsável pela ligação entre a enzima RNA-polimerase e o DNA realizando a transcrição e subsequentemente a tradução g nica. A ativação do NF B ocorre por via não patológica no desenvolvimento neural e na atividade sin ptica e também por via patológica como resposta do sistema imune [6,7]. Como muitos produtos naturais, um dos principais benefícios da curcumina são estas propriedades biológicas contra células tumorais. O fato da curcumina não possuir solubilidade aquosa, limita seu emprego como fármaco. Portanto esse potencial fármaco não foi até agora utilizado. Para isto

essa abordagem para entregar esse produto natural hidrofóbico sem alterar sua estrutura foi utilizado o transportador polimérico de poliglicerol (PGLD). Este polímero dendrítico (PGLD) foi explorado para o encapsulamento deste fármaco. Possibilitando seu emprego na liberação controlada deste anticancerígeno. O PGLD é uma macromolécula globular, altamente ramificada, possuindo um núcleo bem definido, uma região interior e um grande número de grupos terminais. As características físicas do PGLD, incluindo sua monodispersividade, solubilidade em água, capacidade de encapsulamento e um grande número de grupos periféricos funcionalizáveis tornam essa macromolécula candidata ideal como transportador deste fármaco para liberação controlada [4,5].

Nesta Tese foi avaliado como nanotransportador o PGLD que tem como matéria prima um composto de metabólitos naturais o glicerol, o que explicaria a sua biocompatibilidade. Foram também descritas as características de encapsulação do PGLD, assim como a aplicação dessa macromolécula como um nanotransportador de fármacos. Assim expandimos as propriedades da curcumina com a aplicação do PGLD em sua liberação nos tecidos tumorais, que embora sendo um fármaco anticancerígeno, havia limitado sua atividade terapêutica por ser pouco solúvel em água. O PGLD tem atrativos para a terapia do câncer porque: (a) a composição química, a estrutura física e o peso molecular podem ser controlados com precisão; (b) a estrutura dendrítica permite uma funcionalização específica e diversificada para um determinado alvo; (c) as propriedades semelhantes a de um recipiente permitem o aprisionamento e distribuição de agentes anticancerígenos fracamente solúveis em água; (d) o potencial de aumentar a captação de fármacos em células tumorais [4,5]. As macromoléculas dendríticas possuem estrutura em escala nanométrica, homogênea e monodispersa, constituídas de ramificações análogas às de uma árvore (**Figura 1**) [8].

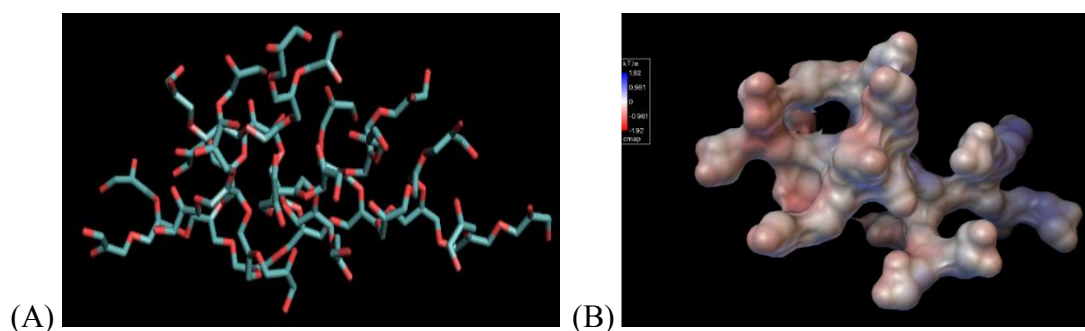


Figura 1 - Estrutura molecular (A) e o potencial eletrostático (B) do PGLD G4, a cor azul indica deficiência de elétrons e a cor vermelha excesso de elétrons.

Devido a sua estrutura altamente ramificada os sistemas baseados em dendrímeros são potencialmente úteis para muitas aplicações, neste caso na administração de fármaco. Além de o PGLD ser biocompatível, portanto, não imunogênico e não trombótico, ou seja, não interage com plaquetas e nem com fatores de coagulação. A aplicação do PGLD como transportador macromolecular dos agentes de BNCT e anti-angiogênese reduz efeitos colaterais, uma vez que apresenta baixa toxicidade além de aperfeiçoar o transporte e entrega destes agentes terapêuticos. Além de sua produção ter viabilidade econômica, uma vez que pode ser obtido de fonte renovável [9].

Os benefícios da terapia anti-angiogênica combinada com BNCT para o tratamento do câncer é promissora. Uma vez que a combinação da curcumina com BNCT pode potencialmente resultar em um efeito antitumoral sinérgico.

A BNCT é uma radioterapia não convencional que foi proposta para tratar gliomas malignos. Há relato na literatura de que a BNCT já é aplicada em países em desenvolvimento como a Argentina [10]. Esta terapia baseia-se em uma abordagem binária: na primeira etapa é injetado no paciente por via intravenosa um agente transportador de ^{10}B . Na segunda etapa o crânio do paciente é exposto a nêutrons térmicos ou epitérmicos dependendo da aplicação. Uma porção dos nêutrons é capturada pelos átomos de ^{10}B , induzindo uma reação nuclear localizada dentro da célula tumoral [11].

Atualmente a principal demanda para a BNCT, é o desenvolvimento de um transportador de ^{10}B com uma significativa especificidade por células tumorais, que

possibilite a aplicação de uma dose radio tóxica às células tumorais evitando assim danos em tecido saudável. Portanto nesta Tese foi sintetizado um conjugado bifuncional de dendrímero de poliglicerol com um complexo de boro-curcumina (PGLDBC), com propriedade anti-angiogênica e para utilização na BNCT. Considerando a eficiência deste nanotransportador tanto em atravessar a BHE e ainda de carregar uma grande quantidade de átomos de ^{10}B para dentro das células tumorais, isto faz com que esta seja uma alternativa muito promissora. A bifuncionalidade do PGLDBC potencializará o tratamento de câncer devido ao sinergismo entre a BNCT e a propriedade anti-angiogênica da curcumina.

É um grande desafio para a medicina desenvolver novos fármacos com potencial terapêutico máximo com efeitos colaterais mínimos e estas são características do PGLDBC. Os dendrímeros como transportadores de fármacos devem superar muitas barreiras antes de entregar os fármacos às células tumorais. Considerando isto uma investigação *in silico* foi realizada para elucidar as propriedades físicas e químicas dos dendrímeros e explorar seu comportamento ao interagir com biomoléculas, como a proteína albumina de soro humano (ASH). As simulações computacionais de ancoragem molecular como complemento das técnicas experimentais comprovaram que podem facilitar o progresso na compreensão do processo de interação do PGLD com biomoléculas. As estruturas dos dendrímeros foram investigadas por simulações computacionais neste trabalho e demonstraram que as interações hidrofóbicas, as ligações de hidrogênio e as atrações eletrostáticas desempenham papéis importantes na interação entre o PGLD e a ASH. Foi observado que o principal sítio de interação do dendrímero com a ASH é o sítio IIA que é o local onde interage a maioria dos fármacos comerciais [12].

Outras simulações estão em andamento como a ancoragem molecular entre o fibrinogênio e PGLD, que possibilitará confirmar com dados experimentais relatados na literatura que este dendrímero é biocompatível, ou seja, não trombótico [2].

Capítulo 2 - Técnicas Clínicas Convencionais para o Tratamento de Gliomas

2.1. Gliomas

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) [13], os tumores cerebrais primários têm sido tradicionalmente classificados, pelas suas características morfológicas em função da possível origem celular no tecido neoplásico. Gliomas são tumores que se originam das células glia (necessárias para manutenção, nutrição e proteção dos neurônios) [14]. Os gliomas são tumores cerebrais que resultam de uma proliferação descontrolada de células gliais. Ao contrário dos neurônios células gliais do cérebro humano tem a capacidade de se dividir e se multiplicar e o descontrolo nesses processos originam a este tipo de tumor.

O exame histopatológico dos gliomas é comumente utilizado para definir o seu grau e caracterizar sua agressividade [14]:

- tumores grau I tem um potencial proliferativo baixo, sem área infiltrativa e pode ser totalmente ressecado por cirurgia.
- tumores de grau II são infiltrativos e pobres em atividade mitótica, mas se repetem e tendem a progredir para maiores graus de malignidade.
- tumores grau III apresentam elevada atividade mitótica, polimorfismo nuclear, capacidade infiltrativa e anaplasia.
- tumores grau IV (glioblastoma), além de todas estas características supracitadas apresentam externalização microvascular e necrose.

Gliomas de baixo grau (I e II) são considerados tumores benignos, enquanto que os gliomas de alto grau (III e IV) são malignos (**Figura 2**) [14].

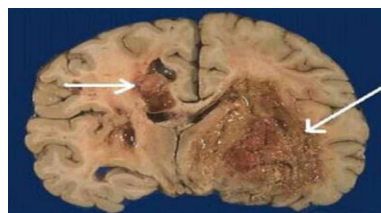


Figura 2 - Tumores cerebrais de glioblastoma multiforme (GBM) [15].

No Brasil, segundo os dados do INCA, a incidência de tumores do Sistema Nervoso Central (SNC), foi de 6,96/100000 habitantes anos (**Figura 3**). A medida de sobrevida é geralmente menor do que um ano desde o diagnóstico e a maioria dos pacientes (95%), evoluirão a óbito em dois anos [6]. Nos EUA estes gliomas têm uma incidência de cerca de 3-4/100000 habitantes anos. Apesar do tratamento multimodalidade, abordando cirurgias e a radioterapia concomitante, bem como o quimioterápico Temozolamida (TMZ) a sobrevivência ano é 5% [6].

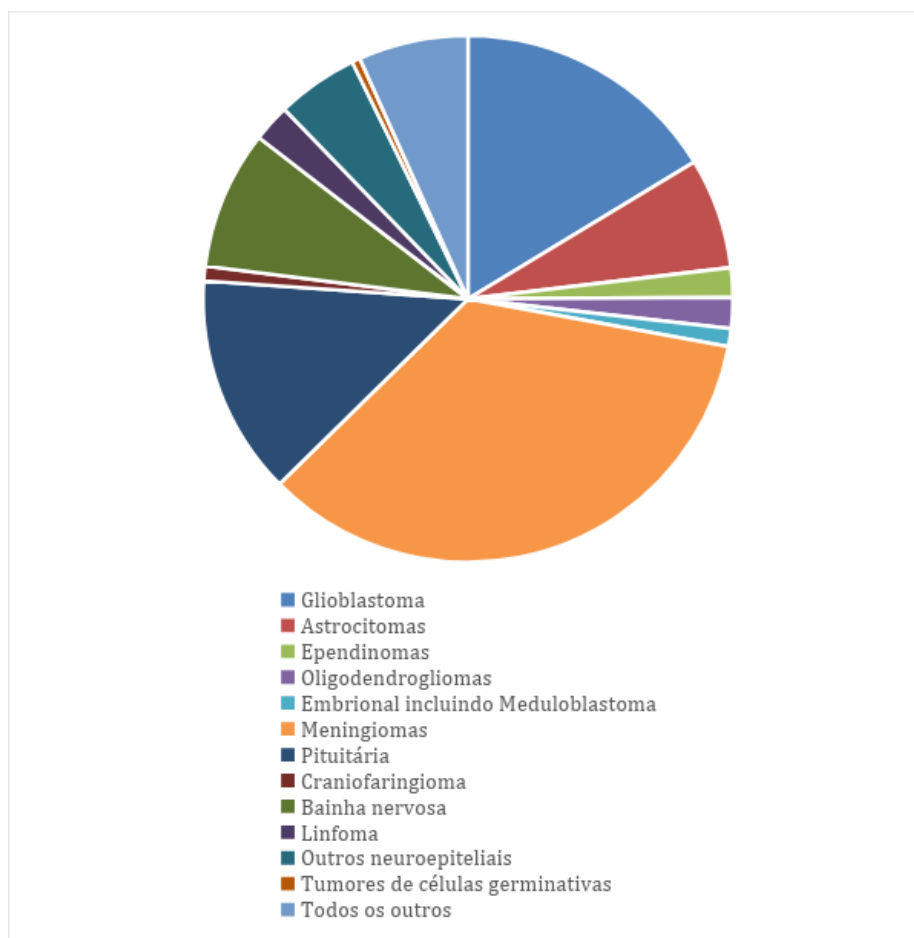


Figura 3 - Distribuição de diferentes tipos de tumores do SNC [6].

2.2. Diagnóstico Clínico de Gliomas

A análise clínica de gliomas em seu estágio inicial é de fundamental importância considerando o tempo de sobrevivência do paciente que é de apenas um ano após as terapias convencionais com quimioterápicos e radioterapia. O diagnóstico clínico de gliomas pode ser feito através das técnicas de ressonância magnética nuclear, tomografia de emissão de pósitrons e tomografia computadorizada que serão abordadas em seguida.

2.3. Ressonância Magnética (RM)

A RM permite a caracterização bioquímica de tecido *in vivo*. Esta mede a concentração de uma multiplicidade de moléculas, através da detecção da frequência de ressonância, das ondas eletromagnéticas de certos núcleos atômicos (sendo o próton o mais amplamente medido *in vivo*, mas também ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F entre outros), quando aplicado um campo magnético (B_0) específico. No entanto cada um dos núcleos em uma molécula tem uma frequência de ressonância ligeiramente diferente, devido à blindagem, a partir da sua nuvem eletrônica circundante, na estrutura ou no seu ambiente químico que altera o B_0 . Esta pequena alteração na frequência de ressonância, é chamado deslocamento químico e permite a detecção de moléculas específicas, que podem ser observados como picos em posições diferentes [15-17].

O deslocamento químico é medido em partes por milhão (ppm) em relação a um padrão, pois ele pode ser expandido com a força do B_0 , independente do campo magnético em que ocorre a aquisição e é o mesmo em todos os aparelhos de RM [18]. Os picos são observados, em uma representação gráfica, da frequência relativa no eixo x, e a intensidade no eixo y (espectro) e a área sob cada pico é proporcional à concentração de prótons (**Figura 4**) [19].

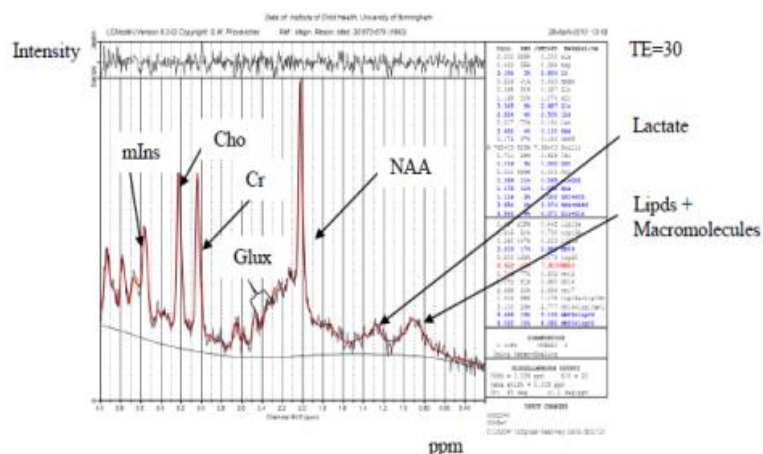


Figura 4 - Espectros de substância branca normal. Mio-inositol, glutamina + glutamato e lipídeos + macromoléculas são vistos no espectro. NAA = N-acetil-aspartato, Cr = Creatina, Cho = colina, min = mio-inositol, Glux = glutamina + glutamato, ppm = partes por milhão [19].

A variação na intensidade dos sinais de lipídeos, glutamato, glutamina e de outros metabólitos no espectro de RM indicariam a presença de tumores cerebral devido atividade metabólica descontrolada das células tumorais (**Figura 5**) [19].

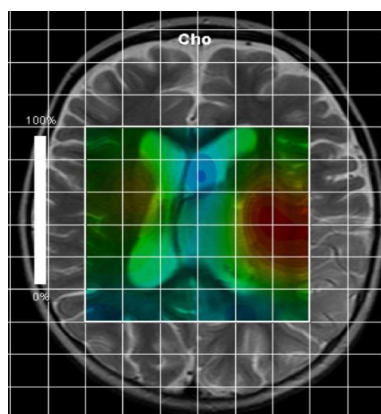


Figura 5 - Imagem de RM de colina registrada, em um paciente com um astrocitoma grau II, mostra uma área vermelha adjacente ao volume principal do tumor, indicando que isto pode representar uma área de maior malignidade [19].

2.4. Monitoramento *in vivo* por Imagem de Ressonância Magnética de Gliomas

A ressonância magnética de imagem (RMI) é uma ferramenta eficiente nos diagnósticos de tumores cerebrais em termos de detecção e avaliação de expansão do tumor. Além de fornecer mais informações sobre caracterização intrínseca de tecidos especificamente em Glioblastoma Multiforme (GBM) com a presença de necrose. É utilizado para a detecção e localização de tumores, para o planejamento de neurocirurgia e radioterapia e para avaliar a eficácia do tratamento. É muitas vezes a modalidade aplicada, devido à variedade de contrastes disponíveis e a sua capacidade de fornecer informações morfológicas, fisiológicas e metabólicas sobre o tumor [19].

A tomografia por emissão de pósitrons (PET- *Positron Emission Tomography*) é uma modalidade de imagem nuclear, que caracteriza moléculas endógenas, por exemplo, oxigênio e glicose, através de radionuclídeos emissores de pósitrons, de acordo com a sua distribuição e acúmulo no organismo. Esta técnica está sendo cada vez mais utilizada na análise da proliferação e atividade metabólica de células tumorais possibilitando a avaliação e o acompanhamento da resposta ao tratamento [20]. Complementando assim as imagens das estruturas dos órgãos, dos tecidos e a localização de tumores realizados por RMI.

Outras modalidades menos frequentemente utilizadas, incluem a tomografia computadorizada (TC), uma modalidade de imagens 3D, com base na atenuação dos raios-x em tecidos. Pode ser utilizado para abordar o contexto anatômico complementar a uma análise de PET, mas também para detectar tumores ou avaliar os parâmetros fisiológicos em análises de perfusão [21].

A emissão de fóton único de tomografia computadorizada (SPECT - *Single Photon Emission Computed Tomography*) é outra técnica de imagem nuclear com radio marcadores, que são mais viáveis economicamente do que os utilizados para o PET e podem ser utilizados para avaliar a proliferação celular [22,23].

2.5. Agentes de Contraste em Ressonância Magnética de Imagem (RMI)

Informações anatômicas de ressonância magnética são obtidas empregando agentes de contraste. Estes são utilizados para localizar tumores e edema tumoral, possivelmente associado a hemorragias ou necrose. Estas informações fisiológicas proporcionam o acesso a parâmetros relacionados ao tumor e a angiogênese e têm potencial prognóstico e pode ser utilizado para avaliar a resposta da terapia. Alguns destes marcadores são: ^{11}C -MET, ^{18}F -FET, ^{18}F -DOPA (**Figura 6**) [24-27].

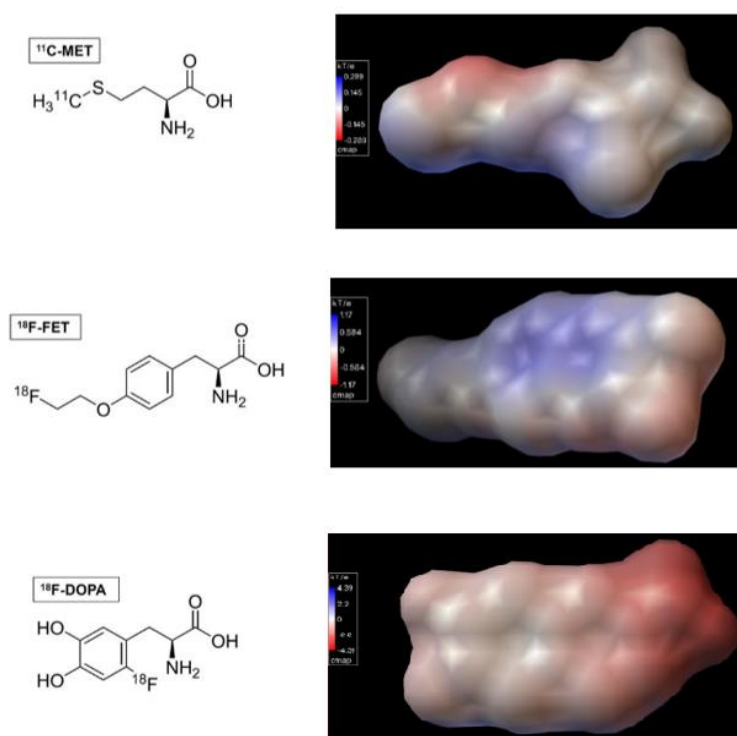


Figura 6 - Estrutura molecular e potencial eletrostático dos marcadores de PET, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons.

Alguns agentes de contraste possuem o elemento químico gadolínio em sua estrutura molecular que é paramagnético, ou seja, possui elétrons desemparelhados que possibilitam aumentar o tempo de relaxamento do próton (após este ser excitado por uma radiofrequência específica) e assim a sensibilidade diagnóstica. Uma vez que esse tempo de relaxamento do próton pode variar de vários segundos em fluidos corporais como líquido cefalorraquidiano para o tecido adiposo e estas diferenças de tempos de relaxamento é que originam o contraste da imagem. Este mecanismo de relaxamento do próton será abordado no Capítulo 5.

Na **Figura 7** as imagens de RMI de paciente com diagnóstico de GBM mostram em (a) um núcleo do tumor (seta vermelha), cercado por um círculo (seta branca), causado pelo sistema vascular do tumor e em (e) uma difusão anormal de água que pode ser causada por uma combinação de fatores como necrose e edema.

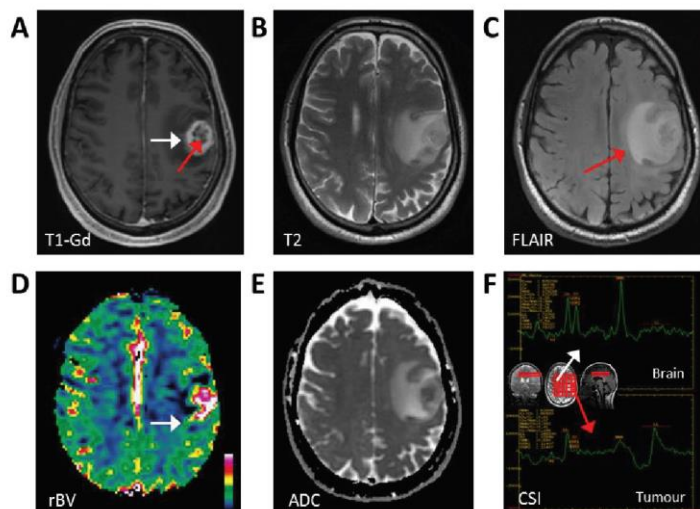


Figura 7 - Em (a) após a injeção de contraste gadolínio (Gd); Na imagem (B) mostrando um grande sinal anormal com um núcleo intenso; (C) oferece uma visão na medida do edema (seta vermelha). A imagem (D) mostra células tumorais ativas na periferia do tumor (seta branca); (E) mostra a área de difusão anormal de moléculas de água; (F) corresponde ao tecido cerebral saudável (seta branca) e ao tecido tumoral (setas vermelhas) [19].

2.6. Tomografia Computadorizada por Emissão de Pósitrons (PET)

Os marcadores de PET com base no metabolismo de aminoácidos ou ácidos nucleicos são utilizados para avaliar a proliferação e atividade metabólica e de prever e avaliar a resposta ao tratamento. Também avaliam os mecanismos moleculares associados com a morte celular, alterações no micro-ambiente ou de entrega de fármacos [24-27].

A **Figura 8** mostra as imagens moleculares dos tumores cerebrais com PET em (A) mostra a absorção de ^{18}F -FDG mais elevada no tumor do que na massa cinzenta circundante e também a absorção de ^{11}C -MET maior no tumor se estendendo para além da área de elevada absorção de FDG; em (B) mostra elevada absorção de marcador apesar da ausência de realce de contraste; em (C) mostra altos valores de absorção, indicativos de proliferação de células de tumor, que se infiltram (seta vermelha); em (D) mostra a acumulação do marcador em regiões hipóxicas do tumor (seta branca) [25].

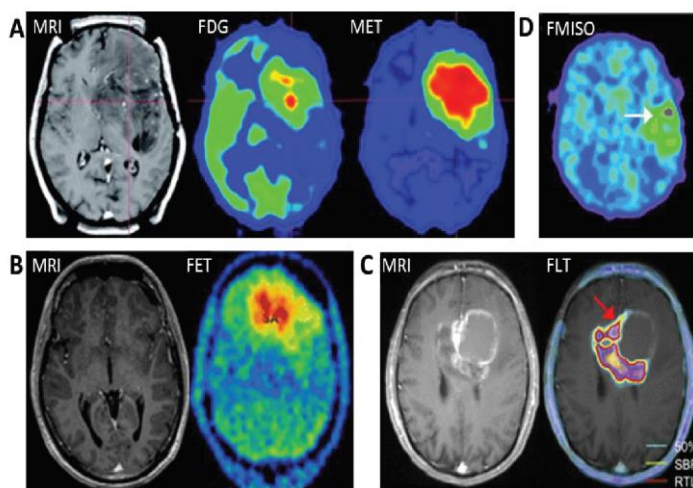


Figura 8 - (A) imagem metabólica infiltrante de uma paciente com astrocitoma anaplásico. (B) ^{18}F FET-PET de um segundo paciente com glioma, tratado com terapia anti-angiogênese (C). ^{18}F -FLT comparada à ressonância magnética de imagem, para

um terceiro paciente GBM. (D) ^{18}F -FMISO a varredura em um quarto paciente com um GBM no lobo temporal esquerdo [25].

2.7. Terapia Clínica de Gliomas

O GBM esta entre os tipos de câncer mais agressivo, uma vez que apresenta difícil diagnóstico e tratamento, gerando incapacidade e morte. Possui uma característica agravante de natureza infiltrativa, tornando a ressecção completa impossível. Os melhores resultados no controle destes tumores são obtidos combinando radioterapia pós-operatória e quimioterapia adjuvante. Mesmo com a ressecção, ocorre frequentemente recorrência e com a radioterapia e a quimioterapia há possibilidade de uma sobrevida de um ano [28].

O principal problema no tratamento deste tipo de tumor é seu rápido crescimento, pois mesmo que a ressecção remova 99,99% do tecido neoplásico, o restante que pode está infiltrado até sete cm de profundidade além da periferia da lesão, é capaz de se multiplicar e voltar ao tamanho inicial do tumor em até 30 dias. Considerando que 0,01% representam milhões de células e que uma única célula tumoral é suficiente para a recidiva da lesão. Em 2009 empregou-se o quimioterápico Temozolamida (TMZ) (**Figura 9**), que apresentou um aumento na sobrevida do paciente, uma vez que inibia a progressão do tumor, mas apesar de ser um fármaco novo, com poucos efeitos colaterais, sua eficácia é limitada [1].

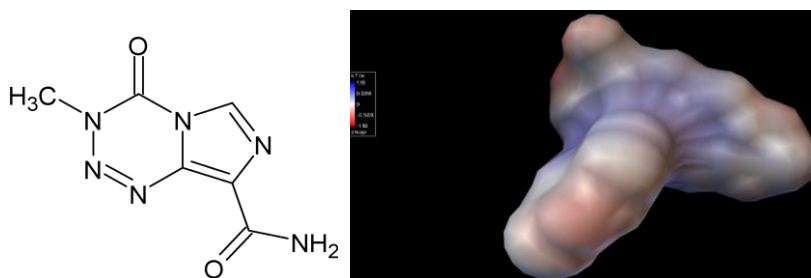


Figura 9 - Estrutura molecular e potencial eletrostático da Temozolamida, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons.

No Brasil o custo envolvido no tratamento de GBM com o medicamento Temozolamida em uma dose diária de 150 a 200 mg/m², por cinco dias a cada 28 dias é aproximadamente R\$ 80.000 mil reais [1]. Um bom indicador de sua eficiência é o monitoramento da enzima de reparação do DNA, o-metilguanina-DNA-metiltransferase (MGMT). Sendo assim seu baixo nível no tecido tumoral pode ser associado a uma maior sobrevida do paciente.

Este quimioterápico alquilante é capaz de substituir em outra molécula, um átomo de H, por um radical alquil, que se liga ao DNA, de modo a impedir a separação dos dois filamentos do DNA, na dupla hélice espiralar (fenômeno indispensável para replicação) [1]. Este consegue afetar as células em todas as fases do ciclo celular e raramente produz efeito clínico ótimo sem a combinação com outros agentes específicos, como a nitrosuréia (que são moléculas pequenas lipossolúveis, que atravessam a BHE, um exemplo, é o BCNU 1,3-bis-(2-cloroetil)-1-nitrosuréia (**Figura 10**). Estes foram os primeiros agentes quimioterápicos do SNC [1].

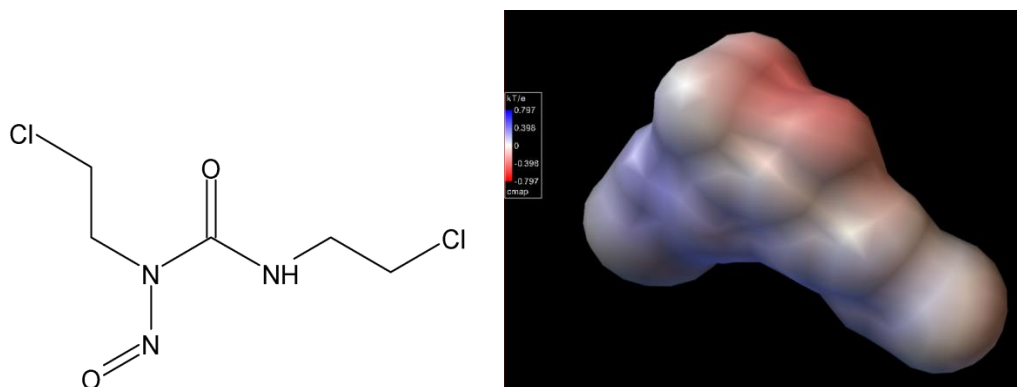


Figura 10 - Estrutura molecular e potencial eletrostático da 1,3-bis-(2-cloroetil)-1-nitrosuréia (BCNU), a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons.

Um protocolo aprovado para aplicação de 200 mg/m² de BNCU, a cada oito semanas por seis ciclos, considerando 100 mg a R\$ 274,71 chega a R\$ 40.000, ressaltando que está sendo levados em conta, apenas os medicamentos [1].

Vários outros quimioterápicos estão sendo empregados sem muito sucesso, são eles: os alcaloides vincristina, lignanas e seus derivados podofilotoxina, etoposido e teniposido que são inibidores mitóticos (**Figura 11**). Estes paralisam a mitose na metáfase, devido sua atividade sobre a proteína tubulina, constituinte dos microtúbulos do fuso espiralar, através do qual migram os cromossomos, assim durante a metáfase não migram e é interrompida a divisão celular. Estes são mais eficientes, quando combinados, com outros agentes específicos da fase S (síntese do DNA), uma vez que possuem atividade sobre a sincronização das células [1].

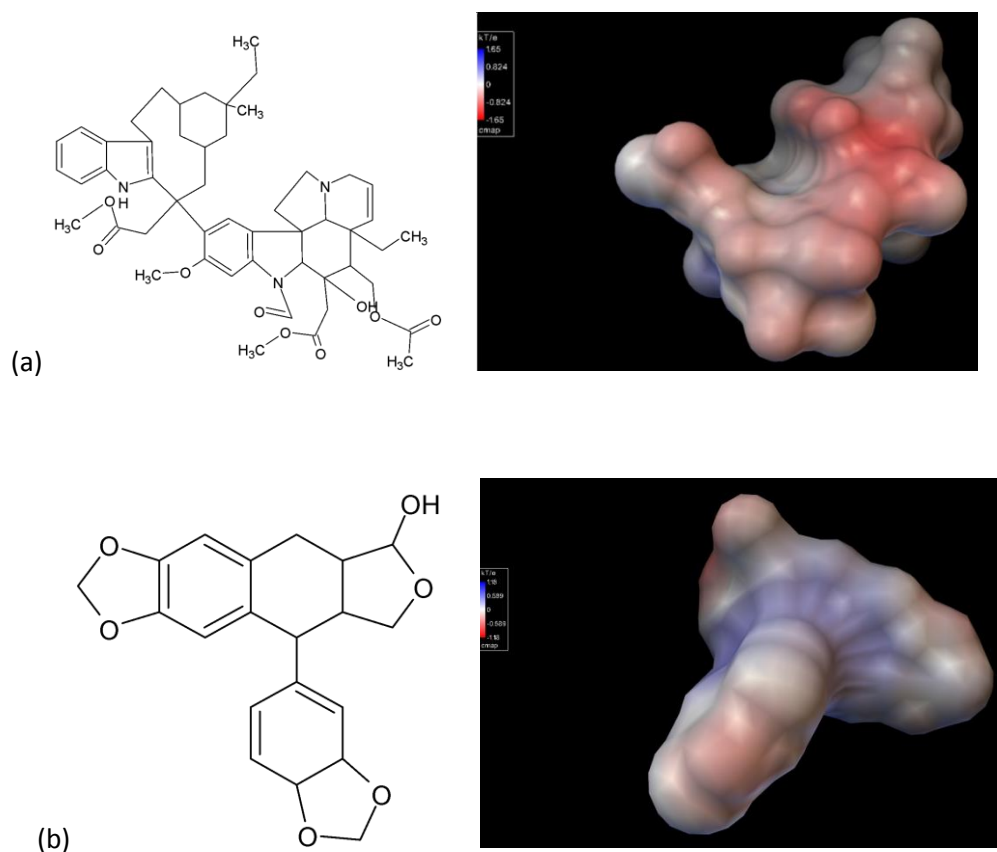


Figura 11 - Estrutura molecular e potencial eletrostático da (a) vincristina e (b) lignanas, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons.

2.8. Terapia Anti-Angiogênese

Entre as novas terapias mais promissoras, estão aquelas que visam à proliferação anormal de células endoteliais (angiogênese). Tais inibidores são indicados para o tratamento de gliomas. O mecanismo de ação de fármacos com propriedade anti-angiogênese é interromper a formação de vasos sanguíneos tumorais, levando privação de nutrientes e de oxigênio. A via *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) que é o principal motor da angiogênese tem sido o principal alvo de vários inibidores em desenvolvimento clínico. Por exemplo, a aprovação em 2009 pela *Food and Drug Administration* (FDA) de Bevacizumab (**Figura 12**), um anticorpo monoclonal contra VEGF para o tratamento de gliomas. Uma aprovação acelerada foi concedida, após estudos clínicos de fase II, que apresentaram sobrevida de seis meses sem progressão em comparação com os dados apresentados até aquela data [29-32].

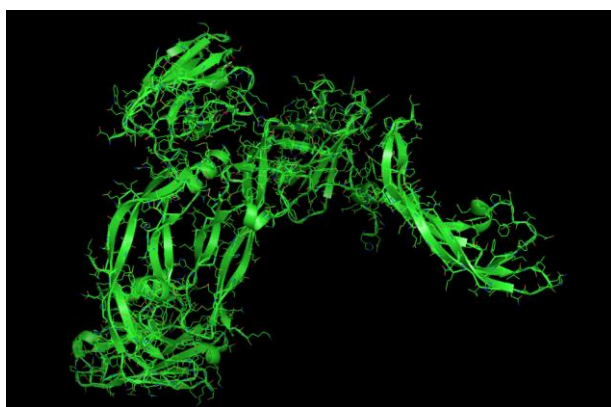


Figura 12 - Estrutura cristalográfica do Bevacizumab obtida no Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) [32].

Recentemente um produto natural denominado curcumina tem chamado à atenção da comunidade científica. Descobriu-se que a curcumina é um poderoso agente antiproliferativo de células tumorais. A primeira publicação sobre o uso de curcumina como medicamento foi publicado em 1937. Estudos nos últimos 60 anos demonstram uma série de efeitos positivos da curcumina. Seus efeitos foram comprovados como

antitumoral, pró-apoptótica, antiproliferativa, antioxidante, anti-inflamatório, antibacteriano, antiparasitário, antimicótico e antivírus (**Figura 13**) [33-46].

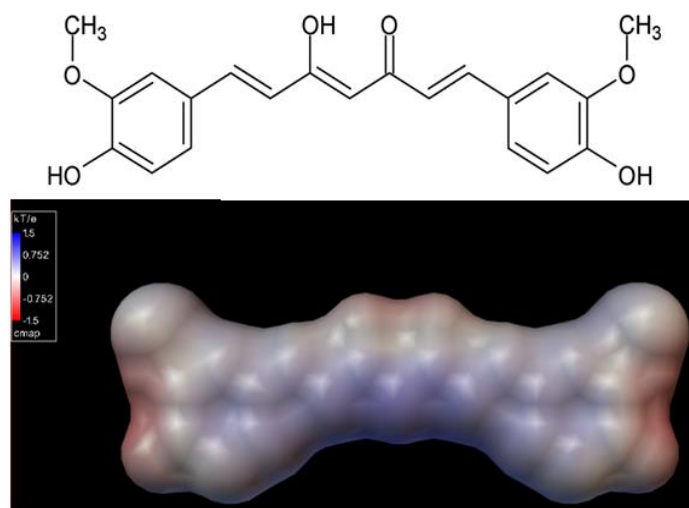


Figura 13 - Estrutura molecular e potencial eletrostático da curcumina, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons.

A curcumina é obtida pela moagem dos rizomas secos da *Curcuma Longa* da família *Zingiberaceae*. A Curcuma se desenvolve bem em zona tropical especialmente na Índia. Cresce cerca de 100 centímetros de altura e é uma planta perene. Tem folhas ovais oblongas, rizomas oblongos e flores brancas (**Figura 14**). Os curcuminóides (uma mistura de substâncias incluindo curcumina, mas não se limitando a ela) também estão presentes em outros gêneros de açafrão (*Curcuma mangga*, *Curcuma aromática*, etc.), mas o principal produto do açafrão é a curcumina [47].



Figura 14 - Rizomas frescos, secos e moídos de *Curcuma longa* [47].

A curcumina tem sido utilizada por muitos séculos na medicina tradicional chinesa e indiana. O primeiro artigo científico publicado, que mencionou o açafrão, foi em 1748. Esta substância foi isolada pela primeira vez de forma impura em 1815. O material amarelo que obtiveram das raízes da *Curcuma*, mais tarde foi analisado e caracterizado como óleo turmérico. Em 1842 foi obtido a curcumina pura e em 1910 foi determinada a estrutura química da curcumina (1E, 6E) 1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil) hepta-1,6-dieno-3,5-diona. Em 1913 o mesmo grupo de cientistas relatou como sintetizar este composto [47].

O interesse pela curcumina aumenta ano após ano, não apenas na pesquisa de fármacos, mas também em muitos outros como nas indústrias de alimentos e cosméticos. A vantagem é que é facilmente acessível e de baixo custo. É mais comum na indústria alimentos como aromatizante conservante ou agente corante (por exemplo, mostarda, margarina e bebidas). A curcumina é um componente amarelo empregado em especiarias como curry e também pode ser acrescentado ao chá. Também há relatos de ser utilizada em cosméticos. Não foram relatados na literatura efeitos colaterais ou tóxicos [47].

A curcumina é classificada como polifenol hidrofóbico natural com coeficiente de partição octanol/água log P 3,29. Os polifenóis são substâncias que ocorrem no chá verde ou preto, café, vinho tinto, chocolate, azeite, soja, cereais e em diferentes frutas ou vegetais. A curcumina é obtida a partir de rizomas da *Curcuma longa* não totalmente pura, mas como uma mistura de polifenóis. Estes polifenóis (curcuminóides) atribuem à cor amarela a curcumina [47].

Em nível molecular a curcumina é uma molécula pleiotrópica que diretamente ou indiretamente afeta as funções de diferentes moléculas e vias de sinalização. A curcumina influencia, por exemplo, o NF-kappaB que regula a expressão de genes envolvidos na tumorigênese. Além disso, a curcumina atua sobre enzimas que controlam processos inflamatórios. Por exemplo, ciclooxigenase-2 (COX-2), síntese induzível de óxido nítrico (iNOS) ou citocinas agente inflamatório: fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Outro alvo molecular da curcumina é a proteína quinase, por exemplo, proteína quinase C ou proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK). A curcumina também pode interromper o ciclo celular na fase G0/G1 ou na fase G2/M

aumentando a expressão de inibidores de cinase dependentes de ciclina (p21) ou diminuindo expressão de ciclina B1 [47].

Porém neste trabalho o mais significativo é o efeito da curcumina na inibição da via de sinalização do fator de transcrição NF-kappaB. O NFkB regula uma série de genes importantes para o sistema imunológico, sobrevivência celular, apoptose, proliferação celular e diferenciação celular. A alteração destas vias são as causas de várias doenças inflamatórias ou de tumores [48-78].

O NF-kappaB é um heterodímero que é inativo no citosol de todos os tipos de células e forma um complexo com uma proteína com uma função inibitória chamada inibidor-KappaB (IκB). O IκB mascara a sequência de etapas da localização nuclear do NF-kappaB. O NF-kappaB é composto de cinco subunidades (Rel, RelA ou p65, RelB, p50 e p52). O NF-kappaB pode ser ativado através de várias vias de sinalização como resultado de vários estímulos (infecções microbianas, estresse, agentes cancerígenos, radiações, oxidantes) que nos receptores (receptor de citocina, receptor tipo Toll) são reconhecidos. Se o IκB for fosforilado por IκB quinases (IKKs), acaba resultando em ubiquitinação do IκB e sua subsequente degradação no proteassoma. A degradação do IκB resulta em ativação do fator de transcrição NF-kappaB. O NF-kappaB ativado (subunidade p65, p50) é translocado para o núcleo onde se liga aos genes alvo e induz a expressão de até 200 genes diferentes. Então um novo IκB é sintetizado no núcleo, que novamente se liga ao NF-kappaB, interrompendo a ligação no DNA movendo todo o complexo de volta ao citoplasma (**Figura 15**) [48-78].

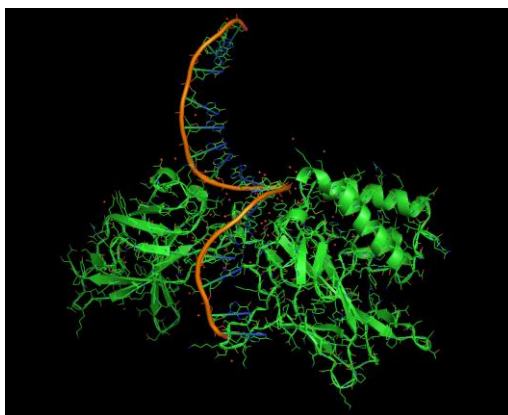


Figura 15 - Estrutura cristalográfica PDB 1SVC do NF-KB obtida no Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) [79].

Um exemplo dos genes que expressam a ativação de NF-kappaB é c-myc ou o gene *mdr1* responsável pelo aumento da expressão da glicoproteína-P (P-gp). A curcumina evita a ativação NF-kappaB evitando a degradação de IκB e desse modo inibindo a translocação do p65 para o núcleo (**Figura 16**) [48-78].

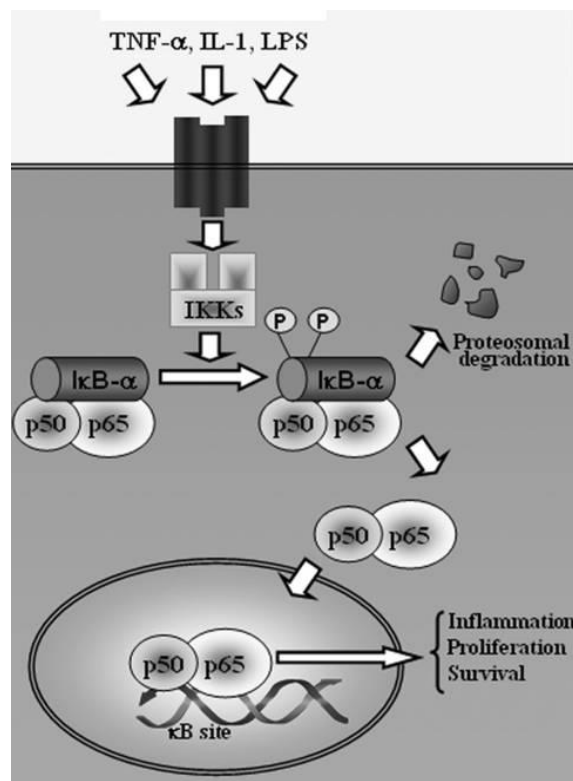


Figura 16 - Mecanismo geral da função do fator de transcrição NF-kappaB [80].

O sinal é ativado pelo receptor por IKKs que fosforila IκB (neste caso IκBα). A subsequente ubiquitinação e degradação de IκB ocorrem pela proteassoma. A subunidade do NF-kappaB liberada é translocada para o núcleo onde se liga ao DNA em um local específico o sítio KB e ocorre a expressão dos genes alvo. Enquanto isso o IκB é resintetizado e se liga no NF-kappaB, interrompe sua ligação no DNA e transfere todo o complexo de volta ao citoplasma [48-78].

A influência da curcumina nos fatores de crescimento, angiogênese e apoptose também são significativos. Fatores de crescimento e receptores de crescimento

desempenham um papel importante na proliferação celular. A desregulamentação desses fatores causa um crescimento e desenvolvimento de células anormais [48-78].

A angiogênese é um processo fisiológico onde os novos capilares sanguíneos se formam a partir dos capilares existentes. Este passo é fundamental para o crescimento de tumores e metástases. A curcumina atua sobre fatores de crescimento inibindo a angiogênese [48-78].

A apoptose é um processo fisiológico que quando ocorre o dano celular leva a morte programada. Quando as células diminuem seu volume, perdem contato com células vizinhas, há uma degradação do citoesqueleto e condensação nuclear e subsequente fragmentação da cromatina. A célula se desmonta e cria corpos apoptóticos de vários tamanhos. As células apoptóticas são então absorvidas por outras células (por exemplo, macrófagos). Esse processo é importante para manutenção da homeostase celular. A alteração da apoptose pode resultar em tumores, auto-imunes ou degenerativos. Estudos relatados na literatura mostraram que a curcumina afeta a expressão de 104 genes de um total de 214 genes que controlam a apoptose [48-78].

Uma característica negativa da curcumina é a sua fraca absorção através do epitélio intestinal e no sangue e também pelo metabolismo rápido no corpo. A curcumina é, portanto relativamente de baixa biodisponibilidade. O motivo do metabolismo rápido da curcumina pode ser provavelmente por sua natureza hidrofóbica, pela pobre absorção através do epitélio intestinal, no sangue e no fígado. Estudos demonstraram que na administração de 2 g de curcumina em pó não foram detectáveis em soro sanguíneo ou apenas em concentrações muito pequenas [48-78].

A curcumina é metabolizada no trato gastrointestinal por conjugações e reduções, que resultam na formação de metabólitos como dihidrocurcumina, tetrahidrocurcumina e hexahidrocurcumina. As Tetrahidrocurcuminas são antioxidantes e antiinflamatórios mais estáveis do que a curcumina. Foi relatado na literatura que hexahidrocurcumina reduz a expressão da enzima COX-2 [48-78]. Uma melhor biodisponibilidade da curcumina é obtida adicionando compostos que se ligam a curcumina e que permitem sua melhor absorção. Um exemplo de tais moléculas pode ser a piperina, que é um alcaloide encontrado em pimenta preta e pimenta longa (**Figura 17**) [81].

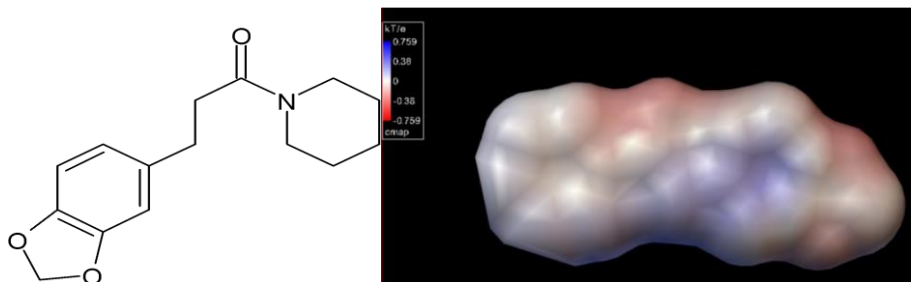


Figura 17- Estrutura molecular e potencial eletrostático da piperina, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons.

2.9. A Radioterapia no Tratamento Clínico de Tumores

A radioterapia envolve o planejamento a simulação e a irradiação. Em cada um destes processos, são definidos alguns parâmetros específicos para cada paciente a ser tratado. Para que a dose no alvo seja adequada, permitindo uma redução sistemática da dose no tecido normal e em órgãos de risco (adjacentes ao tumor), é fundamental que se tenha acesso à anatomia detalhada do paciente, e que seja feito o cálculo para uma dose precisa. Os avanços em imagiologia têm permitido a identificação de tumores além de possibilitar o diagnóstico através das imagens obtidas que são a base para o planejamento do tratamento radioterápico. Na sequência a simulação é realizada por um aparelho simulador, que reproduz as condições a serem aplicados no tratamento, baseando-se nos dados obtidos no planejamento [82].

O objetivo da simulação é definir as configurações, entre o paciente e o aparelho de radioterapia, e assegurar a deposição correta de energia no tecido, para atingir a dose de radiação ionizante prescrita. Finalmente o tumor é tratado na radioterapia através de um feixe de alta energia de raios gama ou raios X ou mesmo por outros tipos de radiação estabelecidos durante o planejamento [82].

A radioterapia usa partículas ou ondas que se movem em alta frequência para atingir o DNA das células do corpo e mudar a maneira como elas são capazes de se replicar. Se o DNA necessário para mitose e replicação for danificado, as células são incapazes de se replicar como de costume e o crescimento de um tumor cancerígeno é

inibido [91]. Este tipo de terapia parte do princípio de que as células cancerosas geralmente se replicam mais rapidamente do que as células normais do corpo. Como o DNA só pode ser danificado quando as células estão realizando o processo de replicação a maioria das células normais que demoram mais para se replicar são menos afetadas que as células cancerígenas [82].

Existem dois tipos principais de radioterapia: radiação de fótons e radiação de partículas. A radiação de fótons é a forma mais comum de radiação utilizada no tratamento do câncer e envolve um feixe de fótons de alta energia. A radiação é produzida a partir de uma fonte radioativa, como cobalto ou cério, ou com o uso de uma máquina aceleradora linear. O feixe de fótons é então direcionado para a localização do tumor no corpo, passa pelas células cancerígenas e sai do outro lado do corpo. A alta energia dos fótons que passam pelo corpo permite que eles quebrem as ligações do DNA inibindo sua replicação [82].

Na radiação de partículas os feixes de elétrons, prótons e partículas de nêutrons também podem ser utilizados para irradiar áreas do corpo e danificar o processo de replicação de células cancerígenas. Os feixes de elétrons produzidos por um acelerador linear podem efetivamente tratar tumores próximos à superfície do corpo, já que seu baixo nível de energia não lhes permite penetrar profundamente no corpo. Acredita-se que os feixes de prótons emitem sua energia para o tecido no final de seu caminho, sem causar grandes danos aos tecidos pelos quais viajaram anteriormente. Isso é menos comumente utilizado na prática, já que precisa de mais pesquisas para determinar o melhor método de uso e requer equipamento médico altamente especializado [82].

As técnicas anteriormente citadas são não convencionais e estão restritas principalmente aos países em desenvolvimento. Uma nova técnica aparece na década de 50 com resultados promissores para o tratamento de gliomas. Esta nova técnica é denominada Terapia de Captura de Nêutrons pelo Boro (BNCT), surgiu na década de 50 com resultados promissores para o tratamento de gliomas e será abordada no próximo capítulo dessa Tese [82].

Capítulo 3 - Sobre a Utilização da Terapia de Captura de Nêutrons pelo Boro (BNCT) no Tratamento de Gliomas

3.1. Conceitos Básicos da BNCT

Em 1932 foi descoberta a partícula de nêutron que possui aproximadamente 2000 vezes a massa do elétron, e em 1936 foi proposta a terapia de captura de nêutrons pelo boro (BNCT) [83,84].

Esta terapia é realizada com aplicação intravenosa de um composto de boro-10 não tóxico, não radioativo e com abundância isotópica de 20%. Em seguida é irradiado um feixe de nêutrons externo, colimado e filtrado em espectro epitérmico próximo a 2 KeV, sobre este boro concentrados nas células tumorais. Este feixe penetra o tecido e é termalizado aproximadamente 0,0253 eV preservando assim tecidos saudáveis. Então estes nêutrons térmicos ($<0,1\text{eV}$) ao atingirem os átomos de boro, induzem reações nucleares produzindo partículas alfa (^4He) de 1,47 MeV e átomo de lítio ^7Li de 0,84 MeV, esta energia cinética 2,31 MeV (94%) é transferida por reações inelásticas gerando ionização e excitação dentro da célula cancerígena [85-87].

Para que esta técnica seja bem sucedida, uma quantidade suficiente de boro deve ser entregue seletivamente, a todas as células de tumor e nêutrons térmicos suficientes, devem ser absorvidos para causar dano letal. Os efeitos destrutivos destas partículas de alta energia se limitam a células contendo boro em teoria BNCT fornece uma forma seletiva de destruir as células malignas (**Figura 18**) [85-87].

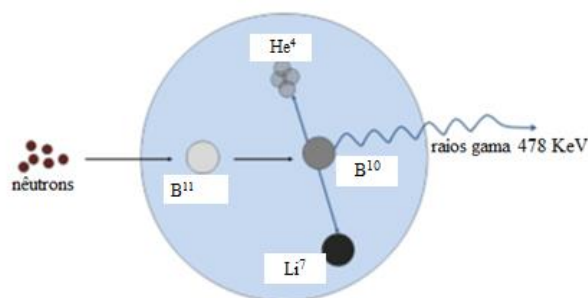


Figura 18 - Os núcleos de He^4 e Li^7 percorrem distâncias de 8,8 e 4,8 μm respectivamente, com taxa de transferência linear de energia (LET) de 196 e 162 $\text{KeV}/\mu\text{m}$, a um diâmetro de $<10\mu\text{m}$, e a radiação gama de 478 KeV é proveniente da desexcitação do núcleo de ^7Li (94 %) e dos 6 % restantes de energia cinética sem radiação gama [87].

O interesse clínico na BNCT tem focado principalmente no tratamento de gliomas [88-90] e mais recentemente em pacientes com tumores recorrentes na região da cabeça e pescoço [91-96], em que a terapia convencional não tenha apresentado bons resultados [97,98].

3.2. Sistemas Moleculares Transportadores de Boro para BNCT

3.2.1. Concepção de Ringsdorf do Transporte Molecular de Fármacos

A eficácia terapêutica de um fármaco é muitas vezes diminuída pela sua incapacidade de obter acesso ao local de ação com uma dose apropriada. Isto é muitas vezes devido à fraca solubilidade do fármaco em meio fisiológico. Portanto os medicamentos são entregues em grandes volumes de soluções aquosas ou etanólicas, às vezes mesmo em conjunto com surfactantes ou derivados químicos para fornecer soluções solúveis para os fármacos. O método pelo qual um medicamento é administrado pode ter um efeito significativo na sua eficácia [99].

Alguns fármacos têm um ótimo intervalo de concentração dentro do qual um benefício máximo é obtido e concentrações acima desta faixa podem ser tóxicas ou se estiverem abaixo não podem ser terapêuticas. O progresso muito lento no tratamento eficiente de doenças graves aumentou a necessidade de uma abordagem multidisciplinar para oferecer eficiência terapêutica aos tecidos alvo. A fim de minimizar a degradação e perda de fármaco, evitar efeitos colaterais nocivos, aumento da biodisponibilidade do fármaco e a percentagem do fármaco acumulado na zona requerida, vários sistemas de administração de medicamentos estão atualmente em desenvolvimento. Entre estes potenciais transportadores de fármacos estão os polímeros solúveis, micropartículas feitas de polímeros naturais ou sintéticos insolúveis ou biodegradáveis, lipoproteínas, lipossomas e micelas [100].

De acordo com Kabanov num sistema ideal de administração de fármaco com automontagem deve-se formar espontaneamente a partir de moléculas de fármacos, componentes de transporte, assim como porções de biodirecionadores. Seu tamanho deve ser de cerca de 10 nm, a fim de permitir que estes penetrem vários tecidos e até mesmo células e devem ser estável tempo suficiente in vivo para liberar o fármaco quando em contato com os tecidos e com as células-alvo. Considerando que os tamanhos das partículas individuais de macromoléculas transportadoras de fármacos (anticorpos e albumina) são inferiores a 5 nm. Além disso, os componentes do transportador devem ser removíveis do corpo após a função terapêutica e eles não devem provocar quaisquer reações biológicas [101].

Um fármaco pode ser solubilizado por encapsulação física (encapsulamento não covalente) ou por carregamento de moléculas hidrofóbicas que são conjugados com a estrutura polimérica (ligação covalente). No caso de conjugados de medicamentos, deve haver uma clivagem da ligação covalente entre o fármaco e polímero (hidrólise, ligações cliváveis enzimaticamente, etc.) na região do tumor devido acidez característica. No geral o modelo Ringsdorf para sistemas de entrega de fármacos foi baseado em polímeros sintéticos. O conjugado de polímero pode conter unidades especiais, tais como grupos de segmentação (anticorpos ou açúcares) e/ou grupos que aumentam a solubilidade (**Figura 19**) [102-110].

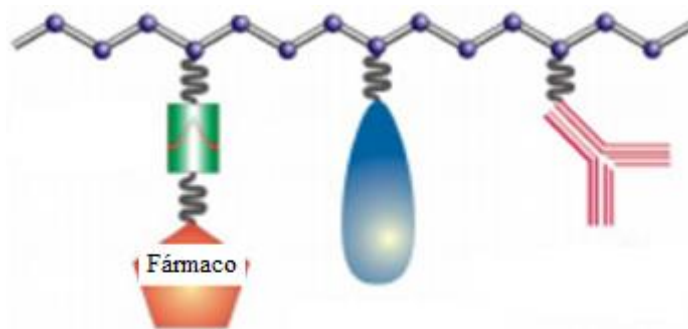


Figura 19 - O modelo de Ringsdorf para o sistema de administração de fármaco à base de polímeros sintéticos [111].

Os fármacos podem ser seletivamente liberados em meio ácido (tal como o tecido do tumor), quando os ligantes instáveis (que liga o reservatório ao núcleo) são clivados (**Figura 20**).

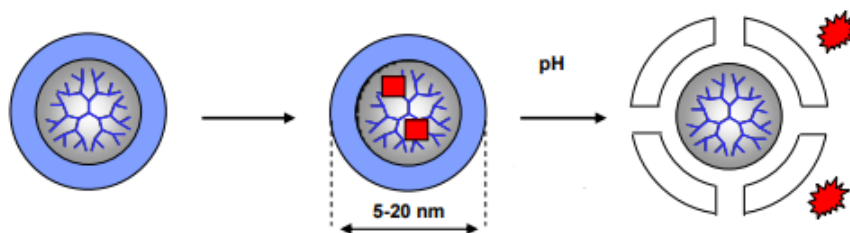


Figura 20 - Nanotransportador dendrítico unimolecular para encapsulamento supramolecular de composto biologicamente ativo [112].

Os estudos desenvolvidos até o momento sobre a compatibilidade bioquímica e das propriedades biológicas dos compostos de boro, resultaram no emprego clínico de borocaptato de sódio (BSH) e borofenilalanina (BPA) apesar da pouca eficiência apresentada [113,114]. Portanto esta tese apresenta uma nanopartícula transportadora de boro mais eficiente.

3.2.2. Agentes Transportadores de ^{10}B

Os ensaios clínicos de BNCT iniciados nos anos 50 e 60 utilizaram ácido bórico e alguns de seus derivados como agentes de entrega, mas estes compostos químicos simples não eram seletivos, além de apresentarem baixa retenção no tumor e não

atingirem relações adequadas de concentrações entre tumor/cérebro e tumor/sangue [115,116]. Na década de 1960 dois outros compostos de boro emergiram a partir de investigações de centenas de produtos químicos de baixo peso molecular contendo boro, um [(L)-4-di-hidroxi-borofenilalanina] chamado BPA, que foi baseado em ácidos arilborônicos [117] e outro que se baseou num ânion borano poliédrico, mercaptoundecahidrododecaborato de sódio chamado BSH [118]. Estes compostos de segunda geração apresentaram baixa toxicidade, persistindo por mais tempo em tumores, em comparação com moléculas relacionadas e relações de concentrações de boro entre tumor/cérebro e tumor/sangue > 1 . O BSH e a BPA foram complexados com frutose para melhorar a sua solubilidade em água e têm sido utilizados clinicamente no Japão, nos Estados Unidos, Europa e Argentina. Embora estes fármacos não sejam ideais, a sua segurança após administração IV já está estabelecida [113,114].

Ao longo dos últimos 20 anos várias outras classes de compostos contendo boro foram concebidos e sintetizados para satisfazer os seguintes requisitos: baixa toxicidade e proporção de boro entre tecido tumoral e saudável > 1 assim como para tecido tumoral e sangue; atingir cerca de 20 μg de boro por grama de tumor; eliminação rápida do sangue e do tecido normal, além de persistência no tumor durante BNCT. Neste trabalho serão resumidas as principais classes de compostos e serão discutido os requisitos gerais bioquímicos para um agente de entrega de boro eficaz (**Figura 21**) [113,114].

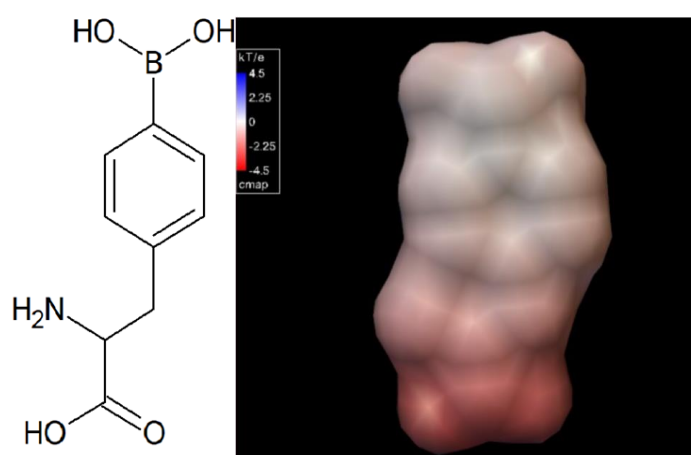


Figura 21 - Estrutura molecular e potencial eletrostático do BPA, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons.

3.2.3. Agentes de Terceira Geração para a BNCT

Os assim chamados compostos de terceira geração consistem principalmente de grupos ou aglomerados de boro estáveis, ligados através de ligações hidroliticamente estáveis a uma porção de direcionamento ao tumor, tais como biomoléculas de baixo peso molecular ou anticorpos monoclonais (mAb) e receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) de gliomas.

Normalmente as biomoléculas de baixo peso molecular têm apresentado propriedades de direcionamento seletivo e muitos estão em vários estágios de desenvolvimento para utilização em quimioterapia. O núcleo da célula tumoral e o DNA são alvos especialmente atrativos, porque a quantidade de boro necessário para produzir um efeito letal pode ser substancialmente reduzida se for localizada dentro ou próximo do núcleo [119]. Outros alvos subcelulares potenciais são mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi.

A solubilidade em água é um fator importante para um agente de boro ao passo que a hidrofobicidade é necessária para que possa atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e assim difundir dentro do cérebro e no tumor. Portanto compostos anfifílicos possuindo um equilíbrio adequado entre a hidrofiliabilidade e hidrofobicidade têm sido de interesse primordial, porque eles devem fornecer as concentrações de boro mais favoráveis entre tumor e tecido normal no cérebro, aumentando assim a especificidade do tumor.

No entanto para as moléculas de baixo peso molecular que têm como alvo os sistemas de transporte biológicos específicos e/ou são incorporadas num transportador de entrega de caráter anfifílico. O peso molecular do agente de entrega contendo boro também é um fator importante, uma vez que determina a taxa de difusão tanto no cérebro quanto no tumor.

Neste sentido a barreira hematoencefálica (BHE) pode ser vista como uma membrana reguladora, que seleciona a passagem de moléculas essenciais para o homeostase do SNC, enquanto inibe o que se acredita ser mais "nocivo" [120]. Os dendrímeros, as lipossomas e [121,122] as nanopartículas poliméricas [123,124] são adequados para esta aplicação mencionada, uma vez que possuem estruturas similares as destas moléculas essenciais. Surpreendentemente as suas aplicações para o SNC

ainda são muito escassas. No entanto alguns exemplos podem ser retirados da literatura sobre possíveis aplicações destes sistemas de entrega de fármaco no SNC [125,126]. Há relato na literatura do desenvolvimento de um transportador de boro para a BNTC, apresentando resultados significativos, com um dendrímero PAMAM [127]. Outro estudo in vitro descreveu um conjunto de dendrímeros baseado em poliéster denotado como PGLSA, que demonstraram que estes dendrímeros poderiam ser internalizados pelas células de glioblastoma (linha celular SF-268) [128].

As pesquisas recentes para melhorar a seletividade dos compostos transportadores de boro pelo tecido alvo tem envolvido a incorporação do ^{10}B em peptídeos, proteínas, anticorpos, nucleosídeos, açúcares, porfirinas, lipossomas e nanopartículas. Os nucleosídeos e nucleotídeos de baixo peso molecular contendo boro foram preparados para aplicação contra hiperproliferação de células malignas. O primeiro nucleosídeo contendo boro foi 5-(di-hidroxiboril)-2-desoxiuridina (DBDU) contendo apenas um átomo de boro [129]. A inserção de um grupo carborano contendo 10 átomos de boro poderia ser mais interessante uma vez que tais nucleosídeos teriam um aumento de 10 vezes de boro percentual. No entanto uma limitação destes é a sua lipofílicidade significativa que pode influenciar na reatividade enzimática [130].

Muitos hidratos de carbono: glicose, manose, ribose, frutose, galactose, maltose e lactose contendo boro foram sintetizados, a ideia era utilizar a absorção mediada por transportadores de açúcares com o aumento do metabolismo celular. Mas não existe evidência que qualquer dos compostos utilizados em sistemas de transporte tenha atingido algum diferencial na captação de tumores [131].

3.2.4. Dendrímeros como Agentes Transportadores de Boro

Hermann Staudinger é considerado o "pai" da química dos polímeros. Em 1920 publica no periódico "Berichten der Deutschen Gesellschaft Chemischen" seu artigo "Polimerização", que foi a base para os polímeros modernos. Em 1953 recebeu o Prémio Nobel por este trabalho pioneiro [132].

A "Hipótese Macromolecular" apresentada por Staudinger afirma que certos tipos de moléculas possuem cadeias muito longas. Um polímero é definido como uma macromolécula composta por muitos segmentos conectados. O processo para conectar

esses segmentos para formar um polímero é chamado polimerização. Dependendo da estrutura do monômero e do método de polimerização as cadeias de polímeros possuem estruturas diferentes que são lineares, ramificadas e dendríticas (**Figura 22**) [133-136].

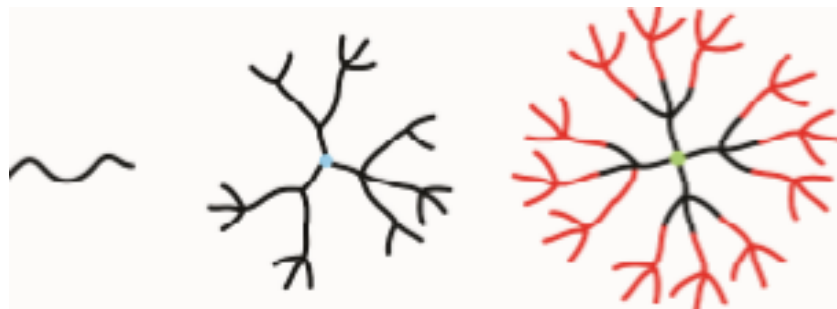


Figura 22 - Estruturas de polímeros: (a) polímero linear, (b) polímero hiper-ramificado e (c) dendrímero [146].

O dendrímero é um tipo especial de polímeros ramificados. Os polímeros hiperramificados, por outro lado não estão perfeitamente ramificados, mas compartilham propriedades semelhantes aos dendrímeros devido ao alto grau de ramificação [137-146].

Os dendrímeros e os polímeros hiperramificados foram especialmente estudados nas últimas duas décadas devido às suas estruturas bem definidas que podem ser utilizadas para uma variedade de aplicações, por exemplo, em medicina e farmácia como polímeros terapêuticos ou em química orgânica como suporte para síntese e catálise [147-155].

Os dendrímeros são macromoléculas monodispersas quase perfeitas com uma estrutura tridimensional regular e altamente ramificada. Eles consistem de três principais componentes estruturais: núcleo, ramificações e grupos terminais. Existem duas maneiras diferentes de sintetizar dendrímeros, a síntese convergente (extremidade $\rightarrow$ núcleo) e a síntese divergente (núcleo $\rightarrow$ extremidade) (**Figura 23**).

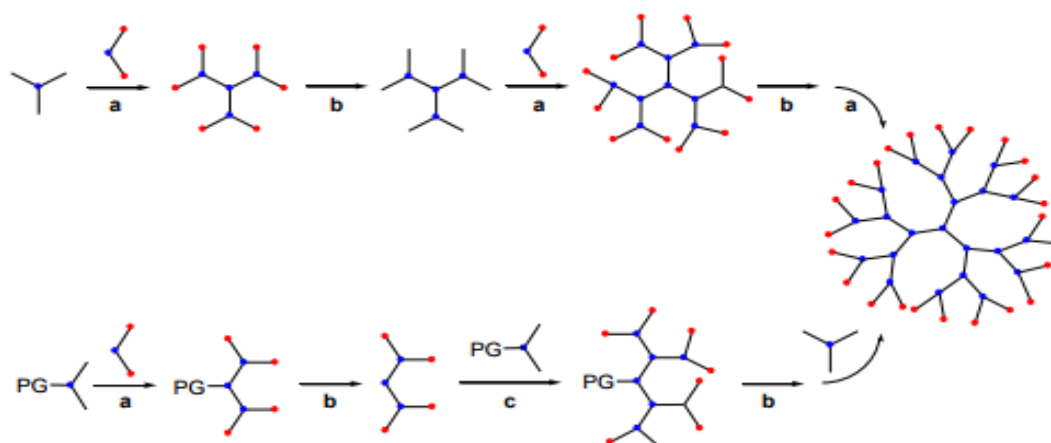


Figura 23 - Síntese divergente via adição e desproteção de uma unidade de monômero (superior) e síntese convergente de dendrímeros (inferior) [146].

A primeira síntese divergente de uma estrutura dendrítica com base em unidades de propilamina foi relatada por Vogtle em 1978. Newkome e Tomalia sintetizaram um dendrímero de maior geração o PAMAM (Poliamidoamina) em 1985 e introduziram o termo "dendrímero".

O método convergente foi relatado por Hawker e Fréchet entre 1989 e 1990 para dendrímeros polialila e polifenileno. No método convergente o dendrímero é sintetizado da extremidade para o núcleo. Os primeiros dendrons individuais são sintetizados, que são então ligados a um núcleo multifuncional. O crescimento começa com o núcleo iniciador e o processo continua repetindo o acoplamento de monômeros multifuncionais. A reação de uma funcionalidade periférica com o grupo reativo complementar de um monômero multifuncional introduz um novo ponto de ramificação em cada lado do acoplamento. Como resultado o número de funcionalidades periféricas aumenta em dois fatores ou mais dependendo do número de grupos funcionais do monômero. Depois de dirigir a primeira reação de acoplamento até a conclusão, essas funcionalidades periféricas latentes podem ser ativadas para permitir uma nova camada de grupos funcionais que é capaz de acoplar a monômeros adicionais. A repetição das etapas de acoplamento e ativação leva a um aumento exponencial do número de grupos reativos na periferia e cria novas gerações de dendrímeros. Para dendrímeros de maiores gerações sintetizados através da rota divergente os defeitos aumentam proporcionalmente. Este problema pode ser evitado na abordagem convergente [155]. A perfeição da estrutura hiperramificada em relação ao respectivo dendrímero perfeito

pode ser medida pelo grau de ramificação (GR). O GR de polímeros lineares é zero, enquanto no dendrímero perfeito é um. O GR pode ser calculado com base na intensidade da espectroscopia de RMN da fração de unidades lineares, dendríticas e terminais. Fréchet e Hawker compararam a soma das unidades dendríticas e da unidade terminal com a soma de todas as unidades de repetição na estrutura em que D, T e L representam o número de unidades dendríticas, terminais e lineares por molécula. Entretanto Frey e colegas de trabalho não incluíram a unidades de repetição terminal simplificaram a equação [155-192].

$$DB_{Frey} = \frac{2D}{2D + L} \quad (1)$$

A polimerização de monômeros de AB₂ como descrito por Flory teoricamente conduz a estruturas hiperramificadas devido ao grande excesso da funcionalidade de B e à maior reatividade do grupo A. O grau de ramificação é menor (GR = 0,5 - 0,7) do que em dendrímeros perfeitos (GR=1) porque a polimerização estatística resulta em estruturas ramificadas aleatoriamente. No entanto devido às suas propriedades físico-químicas semelhantes os dendrímeros e os polímeros hiperramificados são referidos como polímeros dendríticos (**Figura 24**) [155-192].

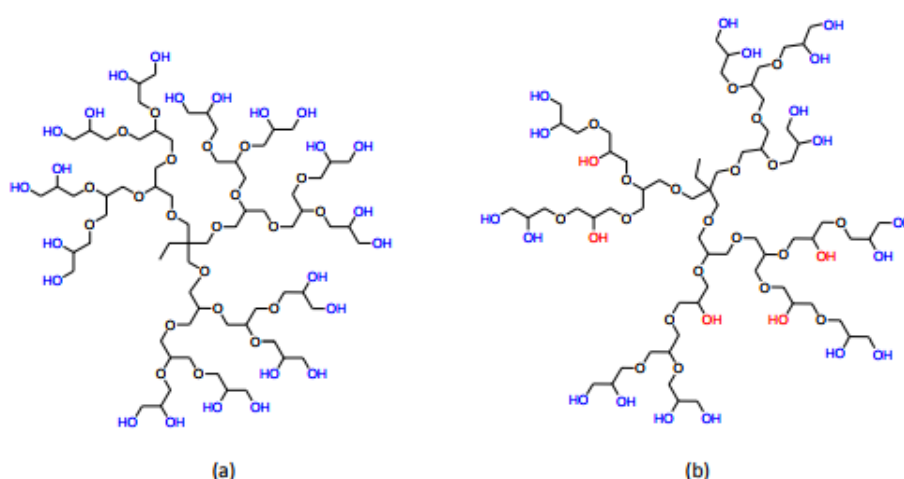


Figura 24 - Polímero dendrítico: (a) dendrímero de poliglicerol perfeito [G3] e (b) poliglicerol hiperramificado (PGh) [146].

A estrutura globular dos dendrímeros e o emaranhamento das cadeias causam baixa viscosidade na solução. Além da boa solubilidade em vários solventes e da grande quantidade de grupos terminais funcionais a sua estrutura definida torna os dendrímeros interessantes para muitas aplicações. Em numerosas publicações essas estruturas foram aplicadas em áreas medicinais [155].

Um estudo recente avaliou o emprego deste dendrímero de poliglicerol (PGLD) utilizado para obter uma macromolécula boronada para terapia de captura de nêutrons de boro (BNCT). A radiografia de captura de nêutrons de boro (BNCR) apresentou maior concentração de ^{10}B em função da geração de dendrímeros. A citotoxicidade *in vitro* para células tumorais foi avaliada e indicou menor citotoxicidade as células normais, sugerindo que a macromolécula é um material biocompatível e pode ser um biomaterial promissor para uso em tratamento de células neoplásicas por BNCT [165] (**Figura 25**).

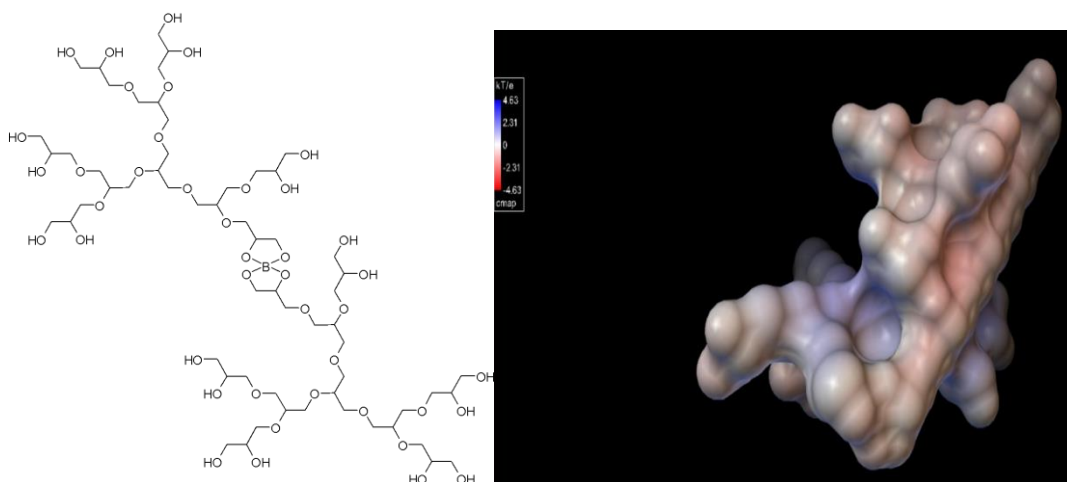


Figura 25 – (A) Estrutura molecular do dendrímero de poliglicerol boronado (PGLDB), (B) e o seu potencial eletrostático, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons [165].

Em outro trabalho relatado na literatura o dendrímero PAMAM de quinta geração conjugado (Ctx-G5-B1100) com boronofenilalanina (BPA) e borocaptato de sódio (BSH), dois fármacos atualmente utilizados para BNCT, além de um anticorpo monoclonal biodirecionador, para o tratamento do glioma [166]. O dendrímero boronado foi aplicado por convecção (Convection enhanced delivery - CED), um

método de aplicação com pressão que facilita o transporte de fármacos através da barreira hematoencefálica. O resultado foi de aproximadamente 50% a mais de retenção de boro nos gliomas em comparação com a acumulação resultante do método CED aplicado com os fármacos livres (**Figura 26**).

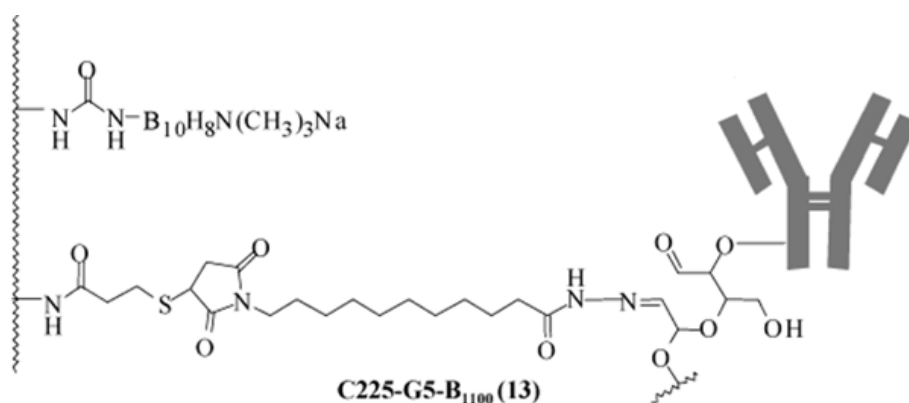


Figura 26 - Estrutura do dendrímero PAMAM boronado e com anticorpo monoclonal biodirecionador [166].

3.3. Dosimetria da BNCT

As questões complexas de dosimetria computacional e planejamento de tratamento com BNCT têm contado com uma técnica matemática com base em amostragem aleatória de simulação estocástica (Monte Carlo), para ajuste da geometria complexa do cérebro. A quantificação de boro é uma questão fundamental para BNCT no planejamento do tratamento e estas concentrações podem ser medidas, em pequenos aglomerados de células ou em células tumorais individuais, através da técnica supracitada [193].

Estudos clínicos em BNCT até agora têm sido executados normalmente com grupos individuais de pacientes, em centros de pesquisas específicos. Estes ensaios consistem principalmente de fase I/II, para estabelecer a tolerância da dose sobre o tecido normal e para demonstrar alguma possível eficácia terapêutica [194].

Cada centro de pesquisa tem por necessidade que desenvolver sua própria metodologia para medir, calcular e prescrever, as doses para estes ensaios, através do seu próprio programa de investigação. Isso limita a sua aplicabilidade para o local onde eles foram obtidos [194].

Após mais de 50 anos a BNCT continua a ser na sua maior parte, uma modalidade experimental, não havendo métodos padronizados que determinem para o paciente uma prescrição específica. Esta falta de uniformidade torna difícil a comparação dos resultados clínicos, a partir de diferentes centros de pesquisa, pois não há compatibilidade de dados clínicos, de segurança e de eficácia, que seriam fundamentais no caso de a BNCT ter uma aplicação clínica mais efetiva [194].

A dosimetria de feixes de nêutrons epitermais é complicada, pela presença de fótons e de uma dose de nêutrons rápidos, cada um possuindo eficácia biológica diferente e que devem ser quantificados separadamente. Alguns métodos de dosimetria têm sido desenvolvidos para determinar os componentes principais da dose absorvida, pois assim como boro outras reações de captura de nêutrons, de baixo consumo de energia ocorrem com o hidrogênio e o nitrogênio do tecido normal [194].

O planejamento do tratamento para NCT difere do planejamento da radioterapia convencional, em alguns aspectos é significativamente mais complexo, exigindo um software especializado. Os sistemas de planejamento de tratamento de NCT dependem exclusivamente de simulações de Monte Carlo, para cálculos de dose por causa da natureza complexa dominada pela dispersão de nêutrons. O método de Monte Carlo simula o transporte de nêutrons e fótons através da geometria do paciente para calcular os coeficientes de dose [195].

Um novo tipo de reator produziu um feixe de nêutrons epitérmico baseado em um conversor de fissão subcrítica denominado FCB, está alojado na sala experimental do MITR (MIT Research Reactor) e opera em paralelo com outras aplicações. O reator é arrefecido por convecção forçada de água deuterada. A potência do conversor é de 120 kW, a potência do reator é de 6 MW. Um filtro moderador é aplicado para adequar o espectro de energia de nêutrons, para a faixa de energia epitermal desejada. Um colimador define a abertura do feixe, para proporcionar aberturas circulares, que variam de 8 a 16 cm de diâmetro. O fluxo de nêutrons epitermais é de $6,2 \times 10^9$ N/cm²s. A medida das doses absorvidas é constante para todos os campos e são bem abaixo de $2,8 \times 10^{-12}$ Gy cm². Assim as distribuições de doses obtidas com o FCB, aproximam-se do ideal para a BNCT [195,196].

Os cálculos de planejamento de tratamento utilizam modelos computacionais do alvo, construído a partir de imagens TC ou RM. Enquanto que a densidade de elétrons é

a principal consideração para o transporte de fótons em tecidos o transporte de nêutrons é regido pelas interações nucleares. As concentrações de hidrogênio, nitrogênio e boro representam a maior influência sobre a dosimetria. Os planos de tratamento de BNCT são tipicamente apresentados como um total de doses ponderadas para o tumor e tecido normal e cada um é calculado separadamente [197].

De um modo geral as concentrações de boro tumoral em tecidos, utilizadas para os cálculos da dose no planejamento do tratamento, por exemplo, BPA-frutose (BPA-F), a concentração sanguínea de boro para o tumor, cérebro e tecido são 3,5, 1,0, e 1,5. No entanto nos casos em que BPA-F PET [198] estão disponíveis estes dados são muitas vezes incorporados no plano de tratamento e utilizados para estimar a distribuição espacial de boro em cálculos da dose [199]. Variações encontradas estão entre 7,6 e 13,2 Gy, para uma dose comum de 10 Gy tal como definido em Harvard-MIT através de ensaios clínicos. Essas variações em várias instalações não podem ser totalmente explicadas pelas incertezas experimentais ou erros de medição. Estas variações excluem possíveis diferenças relacionadas com fatores biológicos. Pelo contrário estes resultados destacam definições de fonte de feixe ou inexata avaliação comparativa dos sistemas de planejamento de tratamento que só se tornam viáveis quando comparados entre os centros de pesquisa [200,201].

A infraestrutura e as despesas associadas com a execução de ensaios, até agora tem sido significativo, mas mesmo assim mais testes com pacientes, ainda são necessários para demonstrar a eficácia, especialmente em pacientes com gliomas de alto grau. Como um pré-requisito a comunidade de pesquisa em NCT, precisa reconhecer a importância de quantificar e estabelecer uma uniformidade entre os centros de pesquisa.

3.4. O Projeto de Reatores de Nêutrons Térmicos para a BNCT

Em uma análise crítica do estado atual de reatores de fissão para BNCT, nota-se uma transição, que tem sido realizada desde 1994, a partir dos feixes de baixa energia térmica aplicada nos estudos clínicos anteriores, com um grande consumo de energia, para os atuais projetos de reatores de baixa potência e que possuem um feixe neutrônico

com maior capacidade de penetração e que atualmente estão sendo aplicados rotineiramente.

3.5. Fontes de Nêutrons para BNCT

Estudos clínicos sobre BNCT iniciaram no Brookhaven National Laboratory (BNL) e no Institute of Massachusetts Technology (MIT), em colaboração com o Massachusetts General Hospital (MGH) cerca de 60 anos atrás [202].

Os ensaios clínicos iniciais, liderados por uma equipe clínica do MIT/Harvard, para o tratamento de gliomas de alto grau, foram realizados com feixes de nêutrons térmicos produzidos em reatores de fissão. A penetração de 3-4 cm no tecido de nêutrons térmicos por irradiação com crânio aberto com auxílio de um dispositivo, inserido a cavidade cirúrgica, para aumentar a penetração de nêutrons e evitar dosagem excessiva no o couro cabeludo infelizmente falhou [202].

Após um intervalo de quase 25 anos os ensaios clínicos foram reiniciados no MIT e BNL, no início da década de 1990, utilizando pela primeira vez nêutrons de energia mais altas, na faixa de energias epitermais ($0,4 \text{ eV} \leq E \leq 10 \text{ keV}$). Esses nêutrons de energia mais elevada atende a necessidade de BNCT intraoperatório, durante o tratamento profundo de células tumorais. Os nêutrons epitermais, por exemplo, podem atingir tumores numa profundidade de oito cm. Os nêutrons epitermais são geralmente utilizados em irradiações de BNCT, embora algumas irradiações intra-operatórias com nêutrons térmicos sejam executadas [202].

Um exemplo desta aplicação está nas instalações de reatores no Japão, que são capazes de produzir várias combinações, de espectros de nêutrons térmicos e epitermais o que pode ser vantajoso para aplicação em tumores de cabeça e pescoço, onde a penetração profunda de feixe de nêutrons pode não ser necessária [203].

3.6. Reatores de Fissão para NCT

Duas abordagens foram utilizadas para a concepção de instalações de irradiação de nêutrons epitermais em reatores de fissão. Uso direto dos nêutrons do núcleo como fonte tem sido a abordagem predominante para modificação ou conversão de reatores existentes para NCT. Instalações têm sido construídas para uso clínico na América, Europa e Ásia e vários outros estão em construção [204].

Uma nova instalação interessante que faz uso de nêutrons do núcleo em um reator de baixa potência foi recentemente construída na China e está localizado em um subúrbio de Pequim [205]. Este é o primeiro reator concebido especificamente para NCT e é baseado em um projeto de custo baixo e seguro especialmente adequado para áreas povoadas em centros urbanos dentro de hospitais.

Outra abordagem para uso de reatores de fissão é baseada na utilização de um conversor de fissão, que converte uma reação de nêutrons térmicos, para nêutrons de maiores energia. Os nêutrons são em seguida moderados e filtrados, para produzir feixes de nêutrons epitermais. Esta abordagem pode ser especialmente útil, para modificar reatores polivalentes existentes.

O Fission Converter Bean (FCB) construído no Research MIT Reactor (MITR) atende todos os requisitos, de uma instalação de irradiação de nêutrons, necessário para a rotina clínica de alto rendimento em NCT. Características e capacidades do MIT FCB incluem alta intensidade, 10-15 minutos de tolerância para entrega da dose no campo de irradiação a aplicação prescrita correta do feixe de nêutrons, a medição da contaminação a partir de componentes específicos e feixe de fácil posicionamento em qualquer parte do corpo. Os índices terapêuticos são alcançados em profundidades de até 10 cm utilizando o atual fármaco disponível o BPA [206].

A menos que BNCT torna-se mais amplamente aceito, como uma modalidade de tratamento específico de câncer, a necessidade de desenvolver reatores nucleares adicionais, permanece limitada e parecem improváveis estas novas construções.

No Brasil a instalação para estudo em BNCT do IPEN, está localizada no canal de irradiação número 3 do reator de pesquisa IEA-R1 [207]. O IEA-R1 é um reator de pesquisa tipo piscina, moderado e refrigerado com água empregando elementos de

berílio e de grafite como refletores. O reator foi projetado para operar a uma potência máxima de cinco MW.

Em 1957 e ocorreu a criticalidade deste reator após a fase inicial de testes e passou então a operar na potência de dois MW. A partir de 1993 passou a operar na potência de 3,5 MW de permitindo irradiar materiais com fluxos de nêutrons térmicos, nêutrons epitérmicos e rápidos da ordem de $10^8 \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. O reator dispõe de nove tubos de irradiação horizontais ("Beam Holes") que fornecem feixes de nêutrons, utilizados em experimentos de pesquisas em terapia de câncer por captura de nêutrons em boro (BNCT), porém podem ser realizadas alterações de seus componentes de acordo com as necessidades experimentais [208].

3.7. Fontes de Nêutrons Baseados em Aceleradores de Partículas (ABNS)

Até a data presente todas as irradiações clínicas em BNCT utilizaram reatores como fontes de nêutrons. No entanto aceleradores de partículas estão em desenvolvimento e eventualmente podem fornecer outra opção de reatores de fissão. Aceleradores de partículas estão em desenvolvimento para utilização em NCT, com algumas vantagens como facilidade na obtenção de licenciamento, além de serem mais compactos e apresentam menor custo em comparação a reatores nucleares [209].

Geralmente eles produzem feixes de nêutrons de baixa intensidade, em comparação com fontes de reatores e este tem sido um problema para a implementação. Um aumento em intensidade será necessário para que aceleradores sejam competitivos com reatores para aplicação clínica em BNCT. Um ABNS recentemente foi aprovado e construído para uso clínico no Japão [210].

3.8. Utilização de Aceleradores de Partículas

O desenvolvimento de aceleradores de partículas de baixa energia (ABNSs) para BNCT é um grande avanço, uma vez que, apresentam a vantagem de serem anexados, a um complexo hospitalar, como de fato ocorre no Hospital Universitário Birmingham no Reino Unido. Em comparação com os feixes de reatores nucleares, foi constatada uma

superioridade quanto à qualidade além da fabricação padronizada eliminando assim as caracterizações complexas de feixes de nêutrons que inviabilizam atualmente a comparação de ensaios clínicos [210].

3.9. Análise Crítica da BNCT

Há várias questões críticas que devem ser abordadas caso a BNCT passe a ser uma modalidade efetiva, para o tratamento de tumores de cabeça e pescoço. Em primeiro lugar, existe uma necessidade de agentes de boro mais seletivos e eficazes. Para que possam entregar as quantidades necessárias de boro ao tumor (~ 20 ug/g). Além disso, a sua entrega deve ser otimizada para melhorar a absorção no tumor, assim como a microdistribuição celular [211]. Vários estudos têm mostrado que existe uma considerável variação na absorção de BSH e BPA em pacientes com tumores de cabeça e pescoço [212,213].

Atualmente a dose de entrega de fármacos ainda têm que ser otimizada, pois com base em dados experimentais a melhoria na dosagem e entrega poderia ter um impacto significativo no aumento da captação tumoral e microdistribuição [214-217]. A BNCT tem a capacidade de distribuir seletivamente uma dose elevada de radiação para o tumor, com uma dose muito menor para os tecidos circundantes normais.

A dosimetria para a BNCT baseia-se na microdistribuição de ^{10}B , que é indeterminada em tempo real, portanto são necessários métodos para fornecer estimativas quantitativas do teor de boro em tempo real [218]. Um exemplo com estudos de imagiologia marcadores BPA F^{18} , possibilitam determinar se um paciente poderia ser um candidato adequado para BNCT, utilizando BPA como o agente de entrega [219], uma vez que verifica a sua efetiva microdistribuição. Na ausência de dados de captação de boro no tumor em tempo real, a dosimetria para a BNCT deixa de ser eficiente. Este problema fica evidente a partir da discordância de doses estimadas de radiação aplicadas em tumores e a resposta terapêutica que deveriam ter sido mais eficientes se as estimativas da dose estivessem corretas [220].

A BNCT tem o potencial para atingir mais eficazmente o tumor, em comparação com o tratamento convencional. Embora exista uma discrepância na teoria de BNCT, que está baseada em um conceito muito sofisticado de seletividade celular e molecular,

na aplicação da radiação de alta energia (LET), que é a quantidade de energia que a partícula perde ao atravessar a célula. A implementação de protocolos clínicos são baseados em abordagens muito ineficientes de dosimetria para prescrição de administração de fármacos e irradiação ao paciente. Isso em parte é devido ao fato de que BNCT não ter sido desenvolvida em ambientes com uma equipe clínica multidisciplinar.

O foco no desenvolvimento da BNCT ficou voltado principalmente para os reatores nucleares. Estes ambientes estão localizados em locais com distâncias consideráveis de instalações hospitalares, o que tornou difícil atrair pacientes e equipes médicas especializadas, que deveriam estar envolvidos com BNCT. Portanto há uma necessidade urgente para desenvolvimento de reatores hospitalares compactos, como o que está em construção em Pequim na China, que poderiam ser facilmente instalados em centros urbanos que possibilitaria o tratamento de pacientes com tumores cabeça e pescoço. Embora possa até agora ter apresentado apenas resultados paliativos, que poderiam ser clinicamente significativos, como evidenciado pela experiência de vários grupos que tratam pacientes com glioma [221]. Além disso, ficam evidentes os resultados clínicos obtidos no tratamento de pacientes tanto com gliomas de alto grau como primário ou recorrente. Especificamente o aumento da dose de BPA, administrado por um longo período de tempo, ou combinado a BNCT com fótons, como tem sido realizado no Japão, têm apresentado o melhor resultado em dados de sobrevivência obtidos até à data presente, utilizando BNCT para tratar doentes com gliomas [222-225].

Há uma necessidade de ensaios clínicos randomizados. Isto é especialmente importante, porque quase todos os grandes avanços na terapia do câncer vieram destes estudos, embora não tenham sido realizados estudos randomizados de BNCT. Erros em ensaios clínicos não randomizados para o tratamento de tumores de cabeça e pescoço aconteceram e estão devidamente documentados [226]. Fica evidente que os resultados clínicos com BNCT mesmo sem a determinação clara da sua eficácia, não poderiam ser alcançados sem os ensaios clínicos [227].

3.10. Resultados dos Ensaios Clínicos nos EUA, Europa e Japão.

A instituição de pesquisa Brookhaven National Laboratory, utilizando como fonte de nêutrons epitermais o Brookhaven Medical Research Reactor. Realizou no período de 1994-1999 o tratamento de 53 pacientes com GBM empregando BPA 250–330 mg/kg por 2h. Estes pacientes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 12.8 meses [228].

As instituições de pesquisa Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School e Cambridge utilizando como fonte de nêutrons epitermais o MIT Research Reactor, realizou no período de 1996-1999 o tratamento de 20 pacientes com GBM empregando BPA 250–350 mg/kg por 1.5h. Estes pacientes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 11.1 meses [229].

A instituição de pesquisa Universitätsklinikum Essen utilizando como fonte de nêutrons epitermais o High Flux Reactor JRC Petten, realizou no período de 1997-2002 o tratamento de 26 pacientes com GBM empregando BSH 100 mg/kg por 1.7h. Estes pacientes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 10.4 a 13.2 meses [230].

A instituição de pesquisa Helsinki University Central Hospital utilizando como fonte de nêutrons epitermais, o FIR-1 realizou no período de 1999-2001, o tratamento de 30 pacientes com GBM, empregando BPA 290–500 mg/kg por 2h e estes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 11.0 a 21.9 meses. No período de 2001-2008 foi realizado o tratamento de 20 pacientes com GBM recorrente empregando BPA 290–450 mg/kg por 2h. Estes pacientes apresentaram tempo médio de sobrevivência de sete meses [231].

A instituição de pesquisa Nykoping Hospital utilizando como fonte de nêutrons epitermais o R2-0 Reactor realizou no período de 2001-2003 o tratamento de 29 pacientes com GBM, empregando BPA 900 mg/kg por 6 h e estes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 17.7 meses. No período de 2001-2005 foi realizado o tratamento de 12 pacientes com GBM recorrente, empregando BPA 900 mg/kg por 6h. Estes pacientes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 8.7 meses [232].

A instituição de pesquisa University of Tsukuba utilizando como fonte de nêutrons epitermais e termiais combinados, o JRR-4, realizando no período de 1999-2002, o tratamento de cinco pacientes com GBM empregando BPA 100 mg/kg por 1-

1.5h, e estes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 23.2 meses [233]. No período de 1998-2007, realizou o tratamento de sete pacientes com GBM recorrente empregando BSH 5 g/kg por 1h, com BNCT intra-operatório. Estes pacientes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 23.3 meses. Neste mesmo período realizou o tratamento de oito pacientes com GBM empregando BSH 5 g por 1 h e BPA 250 mg/kg por 1h (BNCT + XRT) e estes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 27.1 meses [234].

A instituição de pesquisa University of Tokushima utilizando como fonte de nêutrons epitermais e termiais combinados empregando o reator JRR-4 e o KURR Kyoto University Research Reactor realizando no período de 1998-2000 o tratamento de seis pacientes com GBM aplicando BSH 64.9-178.6 mg/kg intra-operatório BNCT. Estes pacientes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 15.5 meses. No período de 2001-2004, realizou o tratamento de 11 pacientes com GBM empregando BSH 64.9-178.6 mg/Kg com BNCT intra-operatório. Estes pacientes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 19.5 meses. No período de 2005-2008 realizou o tratamento de seis pacientes com GBM empregando BSH 100 mg/kg e BPA 250 mg/kg (BNCT + XRT) e estes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 26.2 meses [235,236].

A instituição de pesquisa Osaka Medical College utilizando como fonte de nêutrons epitermais e termiais combinados, empregando o reator JKURR, realizou no período de 2002-2003 o tratamento de 10 pacientes com GBM empregando BSH 5 g e BPA 250 mg/kg por 1 h. Estes pacientes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 14.5 meses. No período de 2003-2006 realizou o tratamento de 11 pacientes com GBM empregando BSH 5 g e BPA 700 mg/kg por 6h (BNCT + XRT). Estes pacientes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 23.5 meses. No período de 2002-2007 realizou o tratamento de 19 pacientes com GBM recorrente, empregando BSH 100 mg/kg e BPA 250 mg/kg por 1h. Estes pacientes apresentaram tempo médio de sobrevivência de 10.8 meses [237-239].

Capítulo 4 - Objetivos

4.1. Objetivos Gerais

O objetivo geral da presente Tese é a síntese e caracterização do dendrímero de poliglicerol conjugado com um complexo de boro e curcumina (PGLDBC) com foco no tratamento de gliomas através da BNCT e da terapia anti-angiogênese.

4.2. Objetivos Específicos

Para a concretização dessa Tese os seguintes objetivos específicos deste trabalho são apontados:

- a. Enriquecimento do PGLD com ^{10}B ;
- b. Complexação do PGLD boronado com curcumina;
- c. Caracterização do PGLDBC como sistema transportador do complexo de B e curcumina, utilizando as técnicas de ressonância magnética nuclear de prótons e carbono (RMN ^1H , RMN ^{13}C), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA);
- d. Investigar as propriedades antitumorais do conjugado PGLDBC em relação às células tumorais das linhagens SCC9 e SCC25, através da técnica de TUNEL.
- e. Caracterização *in silico* de Ancoragem Molecular do complexo proteína-ligante (ASH-PGLD).

Capítulo 5 - Materiais e Métodos

5.1. Síntese e Caracterização do PGLD

O processo de síntese e caracterização do PGLD foi realizado em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do professor Alvaro Antônio Alencar de Queiroz.

5.2. Síntese do Conjugado de PGLDBC

O conjugado de dendrímero de poliglicerol com o complexo de boro-curcumina foi sintetizado em um reator de vidro encamisado, com agitador magnético e um dispositivo termopar. No reator foram adicionados 10,04 g ácido bórico (Merck), 10 mL de água destilada e 55,80g de dendrímero de poliglicerol. Esta solução foi aquecida até a temperatura 90°C com agitação e sob refluxo utilizando Dean-Stark por um período de 6 h. A reação foi considerada completa com a ausência total de água no meio reacional. Em seguida foi adicionado uma solução de 3,55 g curcumina (Sigma-Aldrich) e 20 mL de etanol p.a. (Sigma-Aldrich). O meio reacional foi aquecido novamente a 90°C com agitação e sob refluxo utilizando Dean-Stark separando o álcool do meio reacional por outras 6 horas. Após 6 horas formou-se uma solução de coloração vermelha característica do complexo de boro-curcumina (**Figuras 27 e 28**).



Figura 27 - Reator da síntese do conjugado do dendrímero de poliglicerol com o complexo de boro e curcumina (PGLDBC).

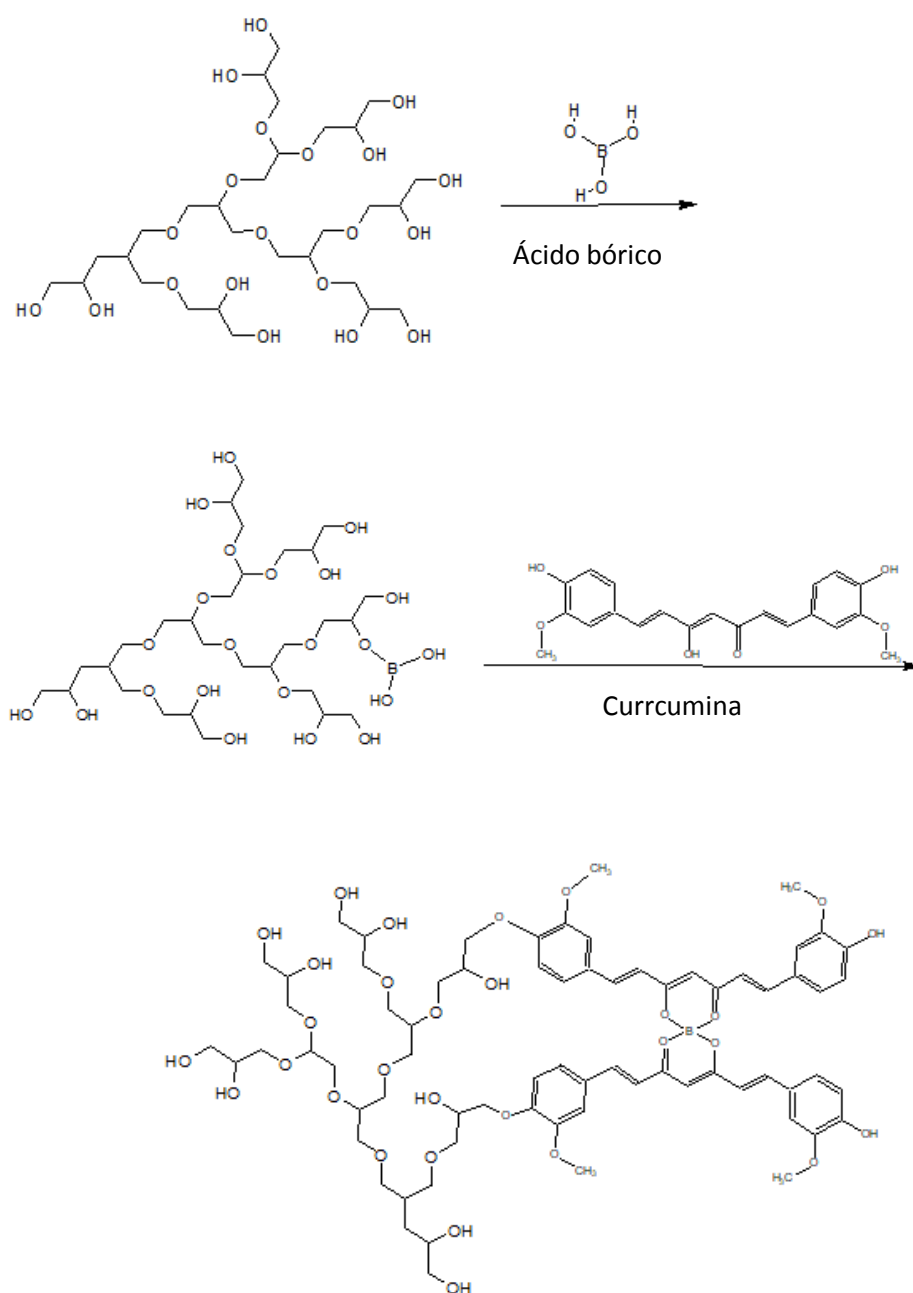


Figura 28 - Estruturas moleculares da síntese do conjugado PGLDBC a partir do PGLD, do ácido bórico e da curcumina.

5.3. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C)

A ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H) e carbono treze (RMN ^{13}C) foi efetuada em espectrômetros Agilent 400 e 500 MHz do Instituto de Química da Universidade de São Paulo/São Carlos, utilizando-se como solvente DMSO deuterado (**Figura 29**) [241-244].



Figura 29 - Aparelhos de ressonância magnética nuclear de carbono treze e hidrogênio (RMN ^{13}C e ^1H) do Instituto de Química da Universidade de São Paulo/São Carlos [240].

A caracterização da estrutura dendrítica é realizada da seguinte forma: (a) se a propagação ocorreu através de hidroxilas secundárias uma unidade linear do tipo 1,3 (L_{13}) é formada; (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; (d) se o monômero sofre alguma desativação por troca de próton, uma unidade terminal (T) com duas hidroxilas é formada (**Figura 30**) [181].

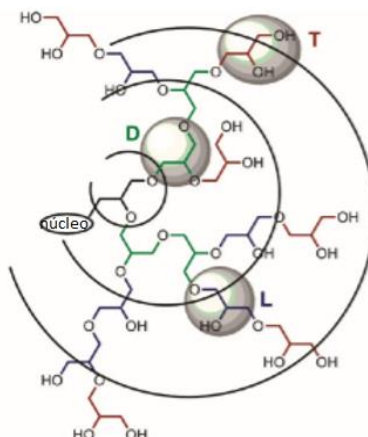


Figura 30 - Esquema do políglicerol com estrutura L, D e T que significam lineares, estruturas dendríticas e terminais, respectivamente [146].

5.4. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia vibracional no infravermelho (FTIR) foi realizada no aparelho Shimadzu IR Tracer 100 adicionando a amostra sobre o cristal de seleneto de zinco do acessório de reflectância total atenuada (ATR). Neste dispositivo a radiação está em um meio opticamente mais denso e em cada ponto de reflexão a radiação é atenuada [245-246].

5.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

Foi realizada em aparelho da marca Shimadzu modelo TGA-50 empregando o seguinte método: taxa de aquecimento 10 ° C/min; faixa de aquecimento 25 ° C a 800 ° C; atmosfera de ar; cadinho de alumina; massa ~ 5mg [247].

5.6. Caracterização *in silico* de Ancoragem Molecular

5.6.1. Configuração do Cluster

As simulações foram realizadas em um cluster computacional Beowulf composto por dois computadores com o i7-4770 da Intel. O sistema operacional escolhido foi o Ubuntu 16.04 LTS usando o OpenMP como protocolo multithreading. As simulações realizadas levaram 10 horas de tempo computacional.

5.6.2. Preparação das Estruturas Moleculares de ASH e do PGLD

A estrutura tridimensional da ASH (PDB ID: 1AO6) apresentada na **Figura 31** foi obtida do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB), o principal banco de dados de estruturas cristalográficas de proteínas [248].

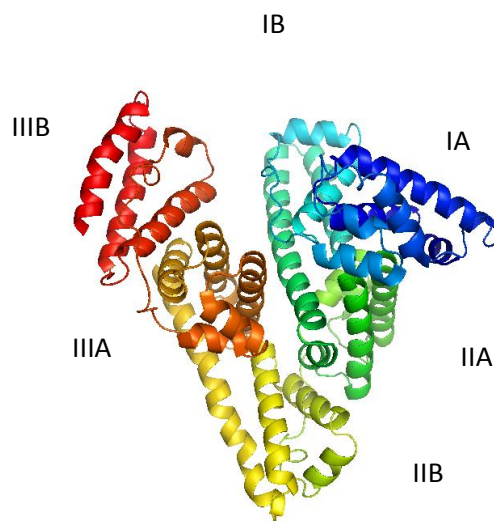


Figura 31 - Estrutura da ASH extraída do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) [248].

A estrutura tridimensional do PGLD apresentado na **Figura 32** foi realizada utilizando o programa Hyper Chem 7.1 [249] com geometria de energia mínima

obtida com os descritores físico-químicos de caráter estérico e eletrônico calculados pelos métodos semi-empíricos de química quântica computacional AM1 [250].

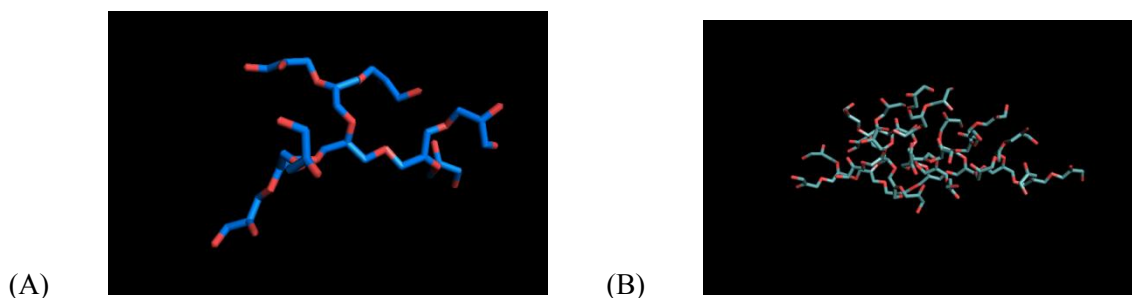


Figura 32 - Estruturas do PGLD (A) G3 e (B) G4 calculadas de acordo com o método AM1 (Austin Model) semi-empírico de química quântica computacional [250].

5.6.3. Ancoragem Molecular

Todas as conformações foram avaliadas no software Autodock Vina [251] com o auxílio do AutoDock Tools [252]. Foram avaliados os valores de *Root Mean Square Deviation* (RMSD), que é o desvio padrão médio dos átomos de uma estrutura em relação à outra estrutura modelo. Quanto maior este valor, maior é a diferença estrutural entre as proteínas ou estruturas que estão sendo comparadas. Foram obtidas as quatro melhores conformações dos complexos de ASH-PGLD.

No Autodock Vina o algoritmo desenvolve-se a partir de um somatório de todos os pares de átomos que podem movimentar-se em relação aos outros e a energia livre de ligação é calculada a partir de interações intermoleculares e intramoleculares onde as conformações mais estáveis são apresentadas com base nas constantes de afinidade (K_a) em Kcal/mol. A função de ponto do AutoDock Vina é baseada no método X-CSCORE para as interações intermoleculares, considerando as ligações de van der Waals, as ligações de hidrogênio, o efeito da deformação conformacional, o efeito hidrofóbico e a constante de regressão que expressa a diminuição de entropia translacional e rotacional [253].

Para as interações intramoleculares implementadas pelo AutoDock Vina, os átomos são classificados pelos seguintes tipos: doadores de ligação de H, aceptadores de ligação de H, doadores e aceptadores de ligação de H ou átomos polares; e pelos seus respectivos raios de van der Waals, excluindo alguns tipos de átomos não tão comuns em moléculas orgânicas. Para aperfeiçoar a seleção dos resultados são também empregados o método Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno e algoritmos estocásticos. A interação é então calculada em energia livre de ligação com um desvio de aproximadamente de 2 kcal/mol [254]:

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_{vdW} \Sigma_{ij} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\ & + \Delta G_{hbond} \Sigma_{ij} E \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} + E_{hbond} \right) \\ & + \Delta G_{elec} \Sigma_{ij} + \Delta G_{tor} N_{tor} + \Delta G_{sol} S_i V_j e^{(-r_{ij}^2/2e^2)} \end{aligned} \quad (2)$$

Na Equação 2 G_{vdw} , G_{hbond} , G_{elec} , G_{tor} , e G_{sol} representam ligações de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças torcionais e dessolvatação, respectivamente. A variável r_{ij} corresponde à distância entre cada átomo do complexo. Os parâmetros de Lennard-Jonnes para os potenciais entre dois átomos são representados por A_{ij} , B_{ij} , C_{ij} e D_{ij} . No terceiro termo temos volume (V) de átomos ao redor do complexo, dados por um peso S . O termo N_{tor} é referente a variação da entropia de acordo com as mudanças conformacionais das moléculas receptora e ligante. O termo de Lennard Jonnes r^{-12} possibilita calcular o potencial nas interações entre o ligante e o receptor.

5.7. Potencial Eletrostático

O potencial eletrostático é calculado como uma interação de Coulomb entre os átomos.

$$E_{coul}(r) = \sum_{i=NA} \sum_{j=NB} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}} \quad (3)$$

Onde NA representa os núcleos dos átomos carregados positivamente e NB os elétrons carregados negativamente e i e j os tipos de átomos. Dessa forma é realizado um balanço entre as interações de atração e repulsão.

O AutoDock requer um mapa de grade de potencial eletrostático. As cargas atômicas parciais devem ser atribuídas à molécula. A grade eletrostática é gerada pelo AutoGrid que resolve a equação linear de Poisson-Boltzmann. O AutoGrid calcula as interações de coulomb entre a molécula e uma sonda de carga e + 1.60219x10⁻¹⁹ C [252,253].

O mapa de potencial eletrostático possibilita estimar que tipos de interações estas moléculas poderão realizar. Por exemplo, possibilitará prever onde o complexo de boro-curcumina se ligará no PGLD. Considerando que as superfícies de alta densidade eletrônica de cor vermelha são suscetíveis a reações com eletrófilos, caracterizados por baixa densidade eletrônica e alta afinidade por elétrons (**Figura 33**).

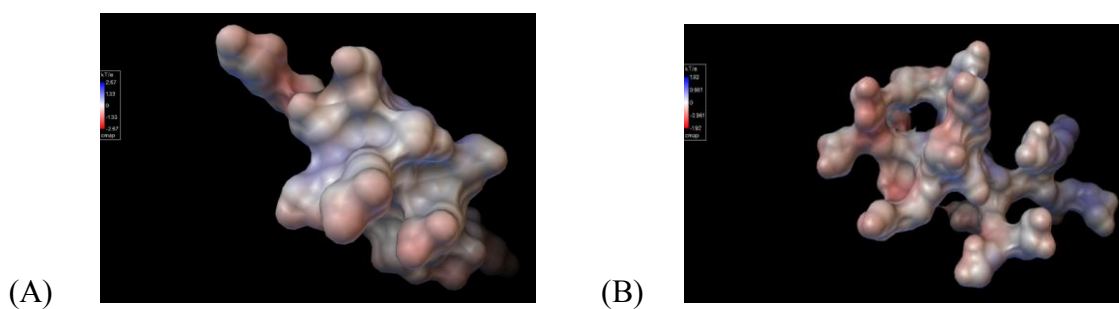


Figura 33 - Potencial eletrostático do PGLD (A) G3 e (B) G4, a cor vermelha indica excesso de elétrons e a cor azul deficiência de elétrons.

5.8. Ensaios Biológicos

Os ensaios biológicos foram realizados nos laboratórios da Dra Olga Zazuco Higa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo (IPEN/USP) com colaboração com a Dra Andrea Cecília Dorión Rodas da Universidade Federal do ABC (UFABC). Descreve-se a seguir os procedimentos adotados para os ensaios biológicos com o composto PGLDBC.

5.8.1. Linhagem Celular, Reagentes e Condições de Cultura.

Foram utilizadas duas linhagens celulares humanas de carcinoma epidermóide de língua (SCC9) (CRL-1629) e queratinócitos (HK). As linhagens celulares foram generosamente doadas pelo Doutor Décio dos Santos Pinto Jr. da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP), originalmente disponíveis via ATCC (do inglês *American Type Culture Collection*).

A linhagem celular SCC9 foi cultivada com meio de cultura constituído por: Dulbecco's modified Eagle medium (meio de Eagle modificado por Dulbecco—DMEM) (Sigma, cat. D6429) e meio de Ham F12 (Gibco, cat. 11765) (na proporção de 1:1), contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco cat. 12.657-029), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), anfotericina B (2,5

µg/mL) e glutamina (4 mM) (Gibco BRL: 21.051-040), em garrafas próprias para cultivo celular, e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37 °C.

As células foram incubadas por 24 e 48 horas com solução de PGLDBC na concentração de 0,3 mg/mL, que corresponde à IC₅₀ (concentração inibitória média) a qual foi determinada pelo ensaio utilizando o corante MTS 3-(4,5-dimetiltiazol-2-y)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazolio), descrito abaixo. A citotoxicidade da solução fisiológica, onde o PGLDBC foi diluída e previamente testado e não apresentou nenhum efeito sobre as células. O ensaio de citotoxicidade foi realizado utilizando a células de ovário de Hamster Chinês de origem fibroblástica (CHO). As células CHO de origem fibroblástica e adquiridas no banco de células ATCC foram cultivadas em meio de cultura F12 K, 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e 4,5 g/L de glicose suplementado com 200 nM metotrexato, 0,002 mg/mL de insulina e 10% soro fetal bovino em garrafas próprias para cultivo celular e mantidas em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37 °C.

Os queratinócitos orais foram obtidos a partir de culturas primárias de fragmentos de mucosa bucal, provenientes de pacientes doadores voluntários, submetidos a cirurgias, como: remoção de terceiros molares aumenta de coroa clínica e ulectomia, ocorridos no ambulatório da Faculdade de Odontologia da USP. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, sob a licença nº 087 / CEP-IPEN / SP. Os queratinócitos foram cultivados em um meio de cultura composto de Dulbecco's Eagle Modified Medium (DMEM, Gibco, New York, NY, USA), F-12 Nutrient Mixture (HAM, Gibco, New York, NY, USA) (2:1), suplementado com 10% de soro bovino Fetal Clone III (Hyclone, Logan, Utah, USA), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL), gentamicina (50 µg/mL), anfotericina B (2,5 µg/mL), glutamina (4 mM), adenina (0,18 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), insulina (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), hidrocortisona (0,4 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), toxina colérica (0,1 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), triiodotironina (20 pM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e fator de crescimento epidermal (EGF) (10 ng/mL) (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). As células foram semeadas sobre uma camada de sustentação (6.10^3 células/cm²), denominada *de feeder-layer*, a qual é

composta por uma linhagem de fibroblastos murinos do tipo 3T3-Swiss albino (ATCC/catálogo número CCL-92), irradiados (60 Gy) e mantidos em incubadora a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Estes fibroblastos foram irradiados antes da sua utilização como camada alimentadora numa fonte de células gama a 60 Gy. Quando os queratinócitos atingiram o estágio de subconfluência, foram utilizados para o experimento. Nesse caso, as células foram semeadas em uma concentração de 20.000 por poço (96 poços por placa, cada um com 0,31 cm²) em alta densidade, ou seja, sem camada de alimentação.

5.8.2. Determinação de IC₅₀ Utilizando o Ensaio MTS

Ambas as linhagens celulares foram incubadas em poços de 0,32 cm² de área (2x10⁴ células por poço), em placas de 96 poços. Os experimentos utilizaram diferentes concentrações de PGLDBC. Após 24, 48 e 72 horas de incubação com o fármaco, a viabilidade celular foi avaliada, utilizando um kit de ensaio MTS e o reagente acoplador de elétrons, PMS (metassulfato de fenazina) na razão 20:1. O período de incubação foi de 2 horas. Após incubação, a placa foi levada a uma leitora ELISA (espectrofotômetro para placas de 96 poços) com filtro de 490 nm para leitura das densidades ópticas. A indução da toxicidade em uma faixa de concentrações específica do PGLDBC e a concentração que produz uma redução em 50% da absorção de MTS foi considerada como o parâmetro de toxicidade. O índice de citotoxicidade (IC₅₀) correspondente à concentração de extrato do PGLDBC que inibe a formação de 50% das colônias em relação ao controle foi estimado, ajustando modelos matemáticos às curvas construídas a partir da porcentagem de colônias formadas em relação ao controle, versus a concentração do extrato expressa em porcentagem. Como controle positivo utilizou-se o fenol e como controle negativo o polietileno de alta densidade, materiais que ocasionam em resposta citotóxica reprodutível.

5.8.3. Análise das Células Apoptóticas pelo Método Tunel

Nas mesmas condições dos experimentos anteriores, as células apoptóticas foram analisadas utilizando o kit Dead End Fluorometric Tunel System (Promega). Para a montagem das lamínulas com as células, foi utilizado o sistema de montagem Vecta Shield com DAPI (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA, EUA). O DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) é um marcador fluorescente sintético, muito utilizado para marcar células vivas e DNA em experimentos de microscopia de fluorescência. As lamínulas foram visualizadas e analisadas qualitativamente em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss). Este sistema detecta o DNA fragmentado das células apoptóticas, cuja visualização ao microscópio se dá pela coloração verde fluorescente. Por meio da utilização do DAPI, contido na solução de Vectahield, a coloração dos núcleos de todas as células (apoptóticas e viáveis) se dá pelo azul fluorescente.

Capítulo 6 - Resultados e Discussão

6.1. Caracterização do PGLD e PGLDBC com RMN ^1H , RMN ^{13}C e FTIR.

O sinal observado no espectro de RMN é produzido pela absorção de radiação eletromagnética por um determinado núcleo de uma frequência específica. Na presença de um campo magnético externo um núcleo pode absorver radiação eletromagnética de frequência apropriada e sofrer uma transição entre os dois estados de energia. Se o número de núcleos no estado de energia mais baixo é igual ao número de núcleos no estado mais elevado, a taxa de absorção se aproxima da taxa de relaxamento, esse processo é chamado de saturação. Os elétrons em uma molécula circulam em torno do núcleo e produzem um campo magnético que se opõem ao campo magnético externo aplicado, esse fenômeno é chamado de deslocamento químico que é referido como parte por milhão (ppm) e é representado pelo símbolo delta (δ). Por definição o deslocamento químico de um núcleo é a diferença entre a frequência de ressonância do núcleo e um padrão, o tetrametilsilano $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ (TMS). Os espectrômetros de RMN com transformada de Fourier utilizam um pulso de radiofrequência (RF) para fazer com que os núcleos com um determinado campo magnético possam ser orientados para um nível de maior energia. Assim os núcleos irão emitir radiação em suas respectivas frequências de ressonância e criar um padrão de interferência de emissão de RF em função do tempo definida como um decaimento por indução livre (FID). Na prática quando uma amostra é colocada na sonda do espectrômetro de RMN, um pulso de radiofrequência (RF) é transmitido por uma bobina que envolve o suporte de amostras. A absorção ocorre quando a frequência do campo magnético aplicado entra em ressonância com uma radiação de frequência necessária para a transição entre dois níveis de energia, que em seguida é detectada através de um receptor de RF com transformada de Fourier, resultando em um espectro de RMN que aparece na tela do computador.

O espectro de RMN ^1H do PGLD observado na literatura é menos informativo do 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 TMP. 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 (**Figuras 34**) [181]. O espectro RMN ^{13}C além de contribuir para elucidar a estrutura molecular do PGLD ele determina se houve a formação da estrutura dendrítica do PGLD.

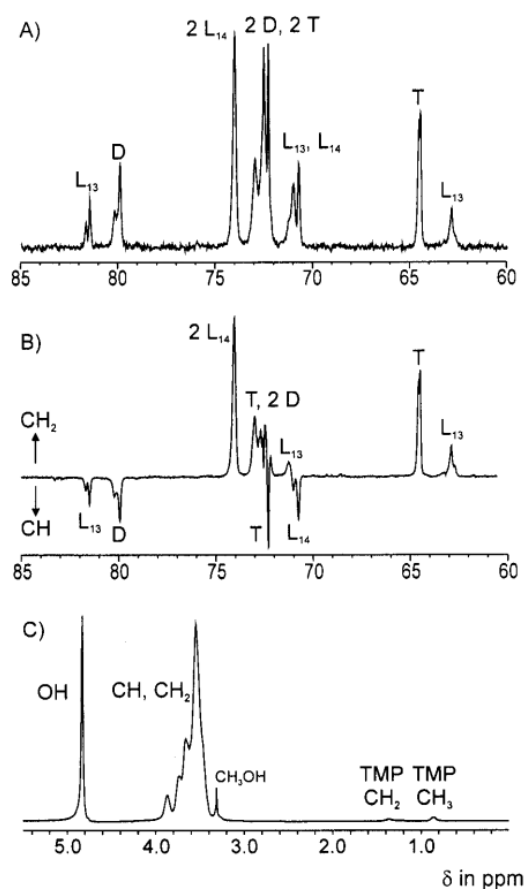


Figura 34 - Espectros de RMN ^{13}C do PGLD (a) indicando os picos correspondentes aos grupos L₁₃, L₁₄, D e T; RMN ^{13}C DEPT especificando os picos referentes à CH e CH₂ (b) e RMN ^1H apresentando os deslocamentos químicos para OH, CH, CH₂, CH₃OH e TMP (c) [181].

Em seguida o conjugado de PGLDBC foi caracterizado pela aquisição do espectro de RMN ^1H (a 500 MHz em DMSO- d_6). Um espectro de RMN ^1H é de grande importância para determinar a estrutura de uma molécula em relação aos núcleos de hidrogênios da molécula. No espectro de RMN ^1H do PGLDBC mostrado na **Figura 35**

o pico a 2,5 ppm é devido ao solvente DMSO. Em aproximadamente 4 ppm o pico de metila (OCH_3) é encontrado. Os picos de 6 ppm a 10 ppm são da parte aromática da molécula exceto 6,78 e 7,57 referente à $\text{CH}=\text{CH}$. Comparando estes deslocamentos químicos com aqueles obtido para a curcumina na literatura **Figura 36** [47] 3,86 (s; 6H; OCH_3), 6,06 (s; 1H; CH), 6,85 e 7,318 (2d; $J = 10$ Hz; 4H; Ar), 6,78 e 7,57 (2d; $J = 15$ Hz; 4H; $\text{CH} = \text{CH}$), 7,35 (s; 2H; Ar) e 9,7 ppm (s; 2H; OH), observamos uma boa semelhança entre os dois espectros.

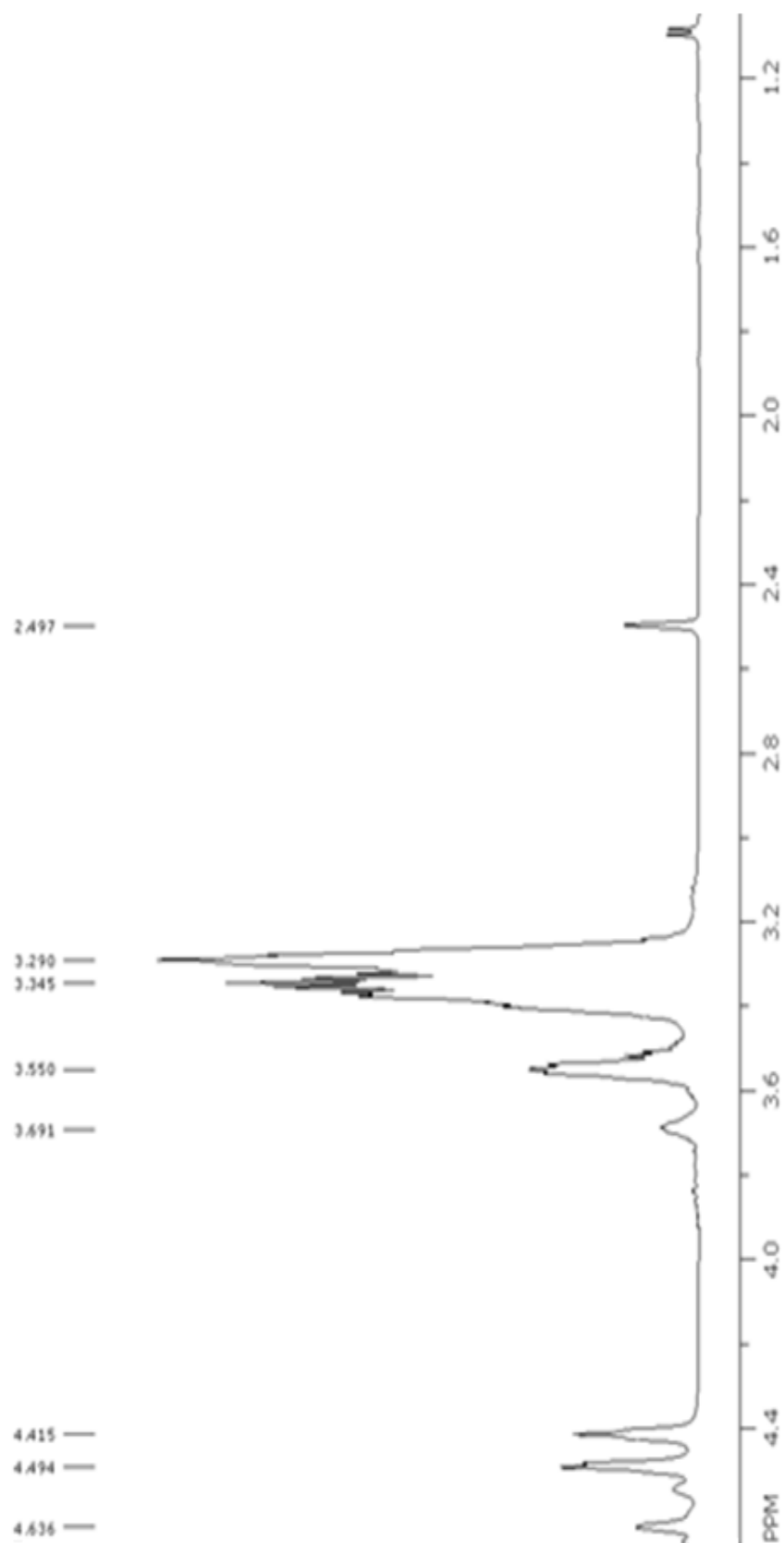


Figura 35 – RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) do PGLDBC. Deslocamentos (δ , ppm): 4,6 (OH); 3,6 ($\text{OCH}_2\text{-CHCH}_2$); 3,5-3,2 ($\text{CH}_2\text{-O-CH}_2$).

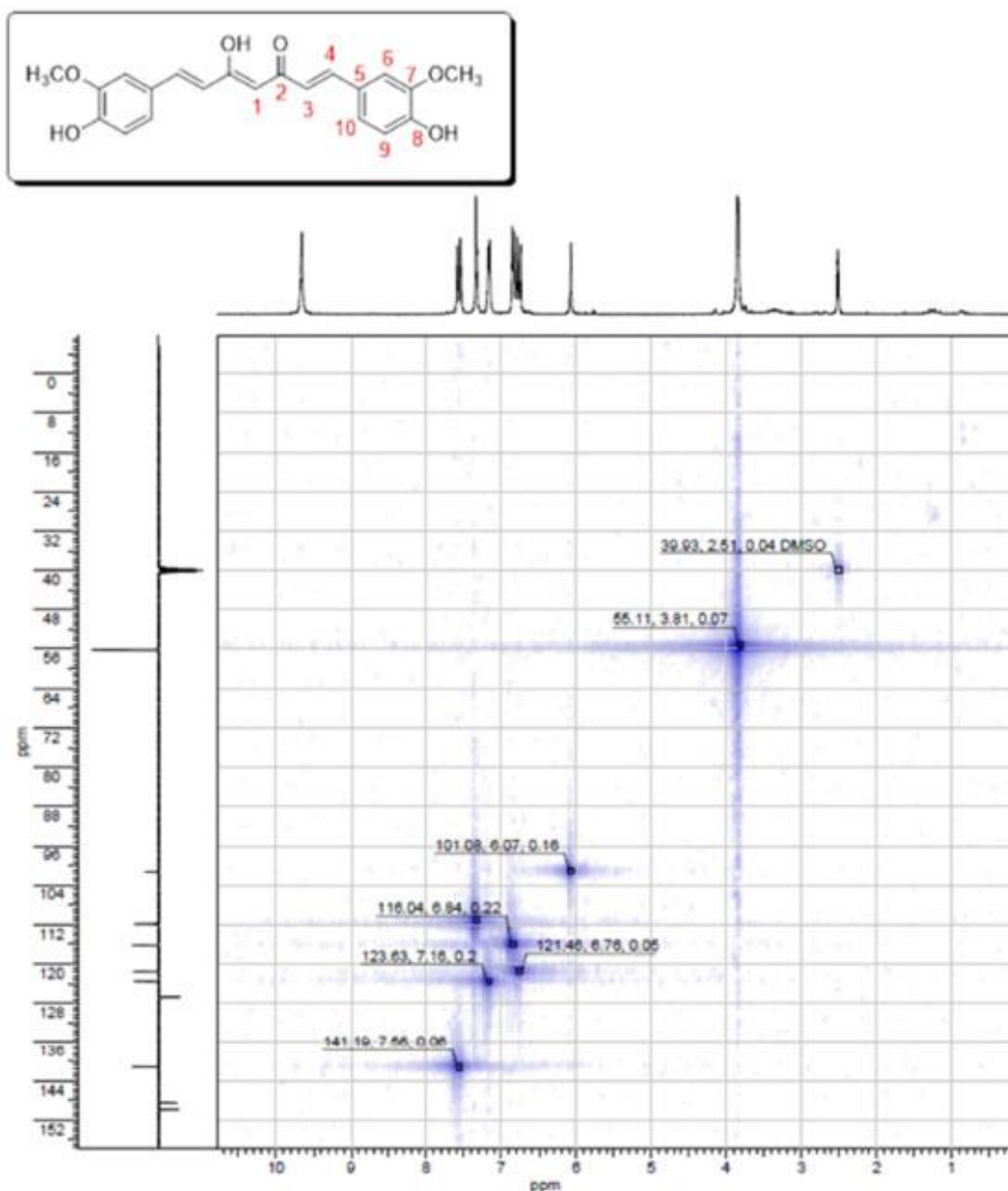


Figura 36 - Espectro de HSQC da curcumina em DMSO- d_6 [47].

Através do espectro de RMN ^{13}C do PGLD em DMSO- d_6 **Figura 37** é realizado a integração dos picos correspondentes aos grupos metino (D, $\text{L}_{1,3}$) e metilênicos ($\text{L}_{1,4}$) de acordo com a metodologia relatada na literatura para determinação do grau de ramificação do PGLD. Sendo o grupo $\text{L}_{1,4}$ mais abundante na estrutura do dendrímero, como pode ser observado nos valores de abundâncias relativas da **Tabela 1** [181].

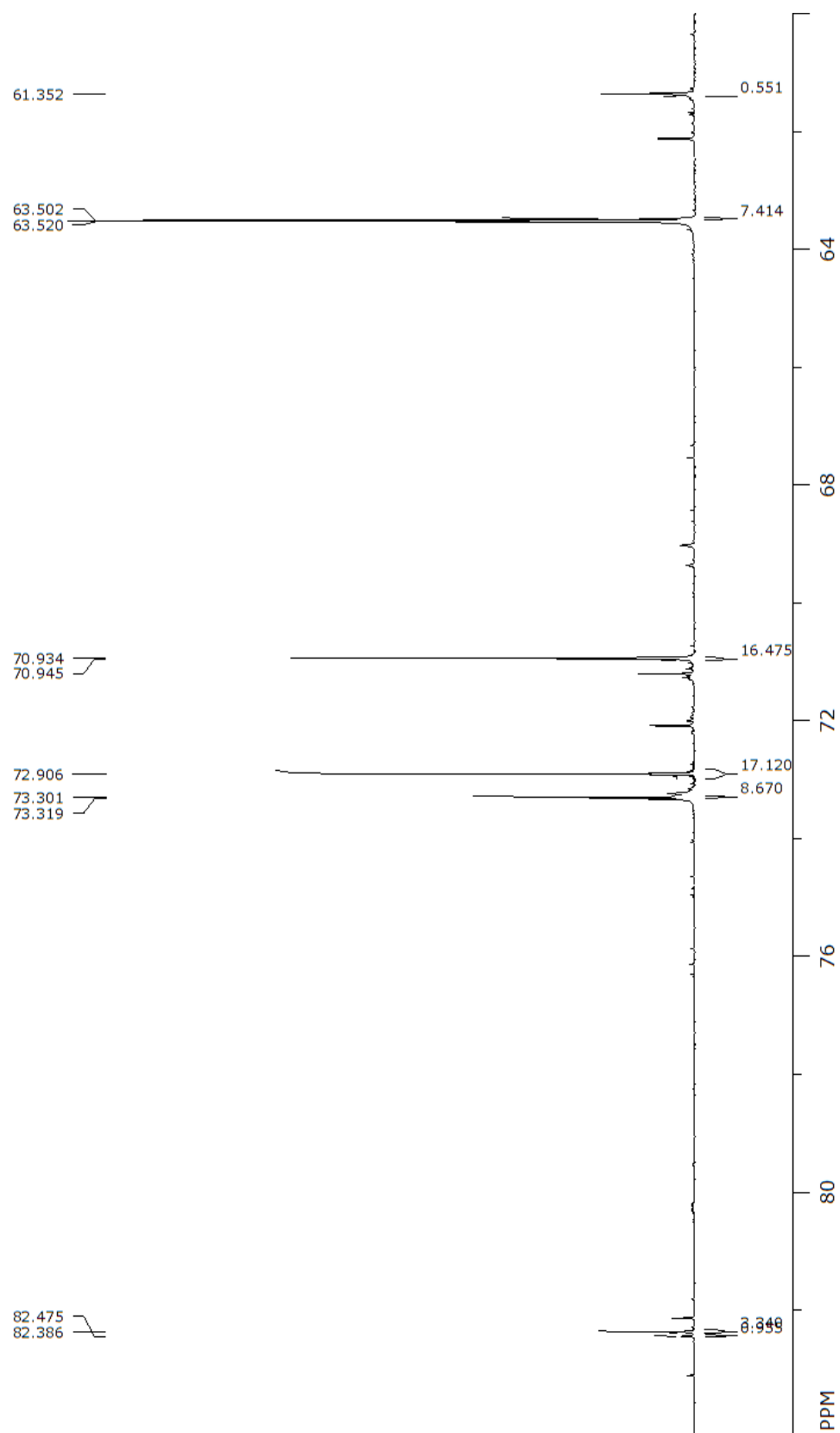


Figura 37 - Espectro de RMN ^{13}C do PGLD em DMSO-d_6 com valores de integração correspondentes a estruturas L₁₃, L₁₄, D e T.

Tabela 1 - Análise dos dados de integração do espectro de RMN ^{13}C do PGLD G4.

Região	Unidade Estrutural	Deslocamento Químico (ppm)	Integral Relativa (%)	Abundância Relativa (%)
$^{\text{L}}13$	CH	82.475	0.999	7.7
D	CH	82.386	3.340	25.7
$^{2\text{L}}1,4$	CH ₂	73.319	8.670	66.7

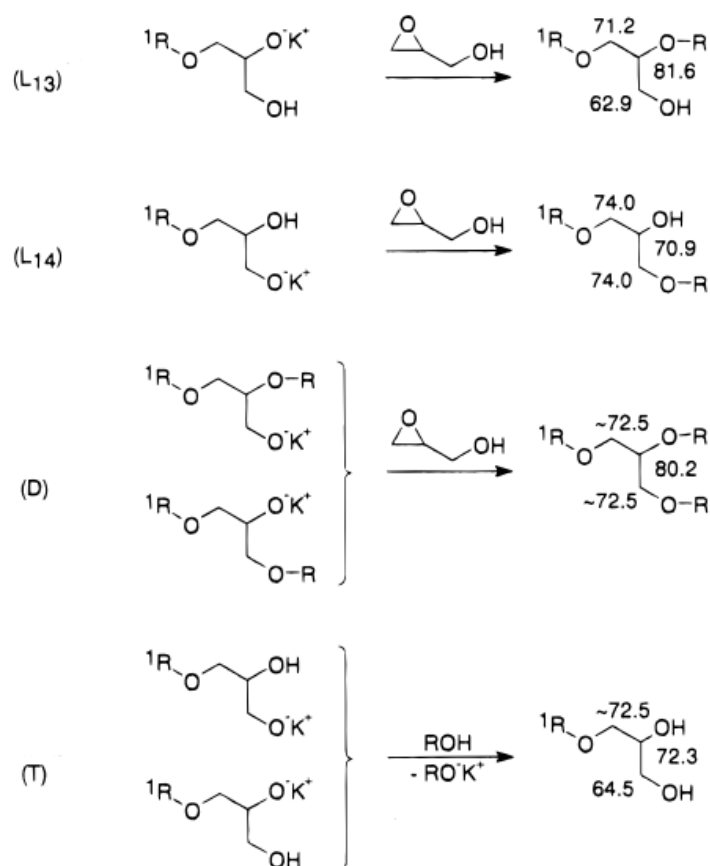


Figura 38 - A determinação dos tipos de estruturas formadas como L₁₃, L₁₄, D e T estão de acordo com as reações entre grupos específicos e apresentam diferentes deslocamentos químicos [181].

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 (GR) é igual à zero (GR=0), para uma reação de policondensação ao acaso GR=0,5 e finalmente para a formação de uma estrutura dendrítica, GR=1. O grau de ramificação pode ser calculado a partir das intensidades dos picos no espectro de RMN ¹³C através da equação:

$$GR = \frac{2D}{2D + L_{13} + L_{14}} \quad (4)$$

Sendo GR o grau de ramificação e D, L₁₃ e L₁₄ que representam as contribuições das frações dendríticas e lineares presentes no polímero, respectivamente. Os valores obtidos para GR próximos a 1 indicam que a lenta adição do alcóxido promoveu a formação da estrutura dendrítica. O valor determinado para este trabalho foi 0,6 indicando que o material apresenta características de isomolecularidade, embora pareça haver defeitos distribuídos na cadeia molecular do dendrímero.

Os espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C do conjugado PGLDBC (**Figura 39 e Figura 41, 42**) foram comparados com o espectro de curcumina da literatura mostrado na **Figura 36** e apresentaram uma correlação adequada. Conforme mostrado na **Figura 39** a interação do boro com os grupos ceto-enólicos das estruturas moleculares da curcuminas, influenciou os prótons circundantes. Uma mudança de pico ficou evidente no espectro do conjugado de PGLDBC, o deslocamento químico do próton central (H-1) que foi encontrado no espectro de RMN ¹H em 6 ppm relatado na literatura e no espectro obtido de RMN ¹H do conjugado PGLDBC este próton central (H-1) apresentou um deslocamento para 6,5 ppm (**Figura 39**). A comparação entre o espectro obtido e o espectro encontrado na literatura apresentado na **Figura 36** demonstraram que o complexo entre a curcumina e o boro foi formado, assim como o conjugado PGLDBC. Outra observação importante realizada foi a formação da ligação entre a hidroxila do poliglicerol e a hidroxila fenólica do complexo boro-curcumina formando o conjugado como pode ser observado no espectro de RMN ¹H devido à ausência do pico em 9.5 ppm que corresponderia a esta hidroxila do grupo fenol da curcumina (**Figura 40**).

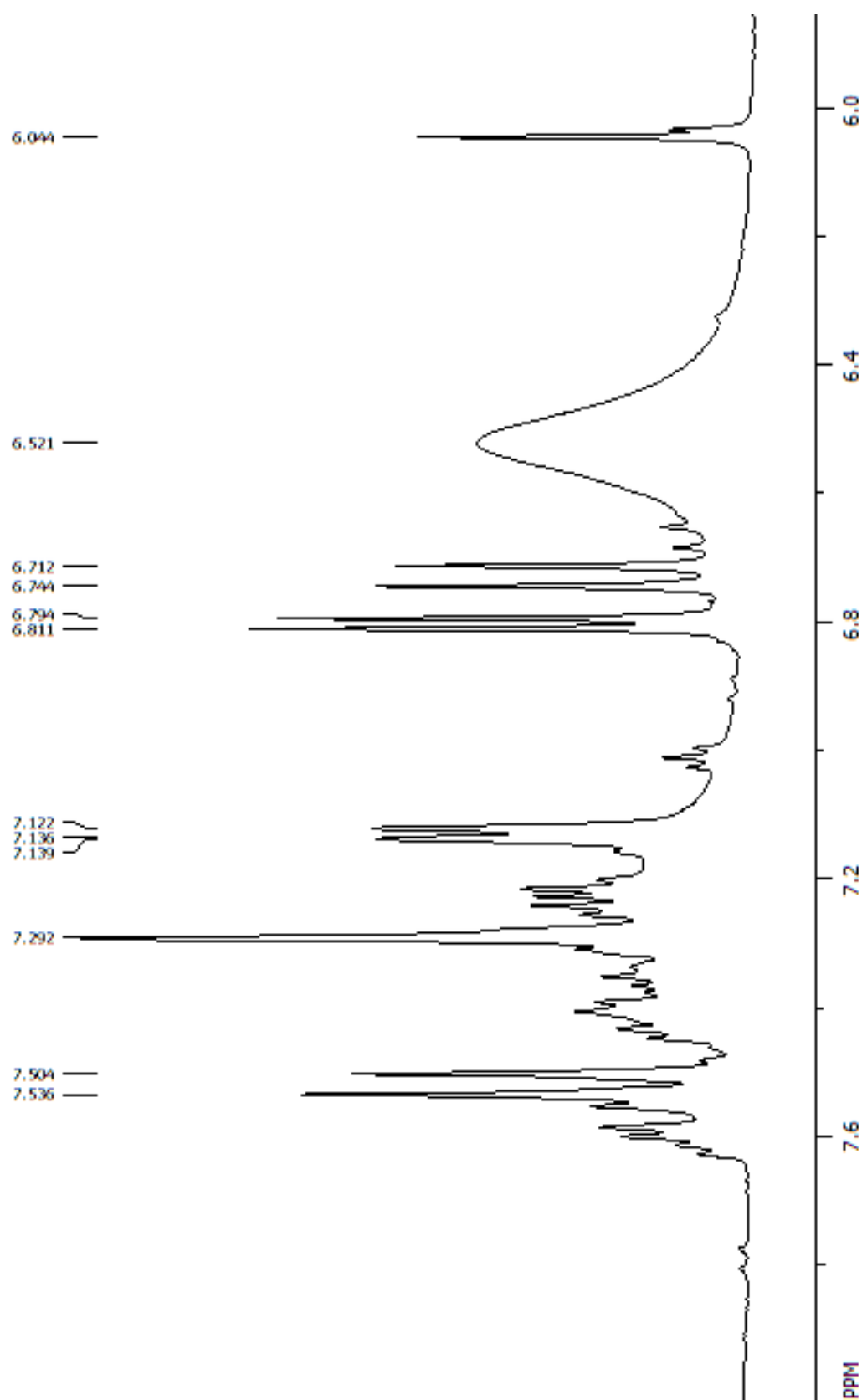


Figura 39 - Espectro de RMN ^1H em DMSO-d_6 500 MHz do conjugado PGLDBC demonstrando o deslocamento do pico do H-1 de 6.01 ppm para 6.5 ppm caracterizando a formação do complexo entre o boro e a curcuminina.

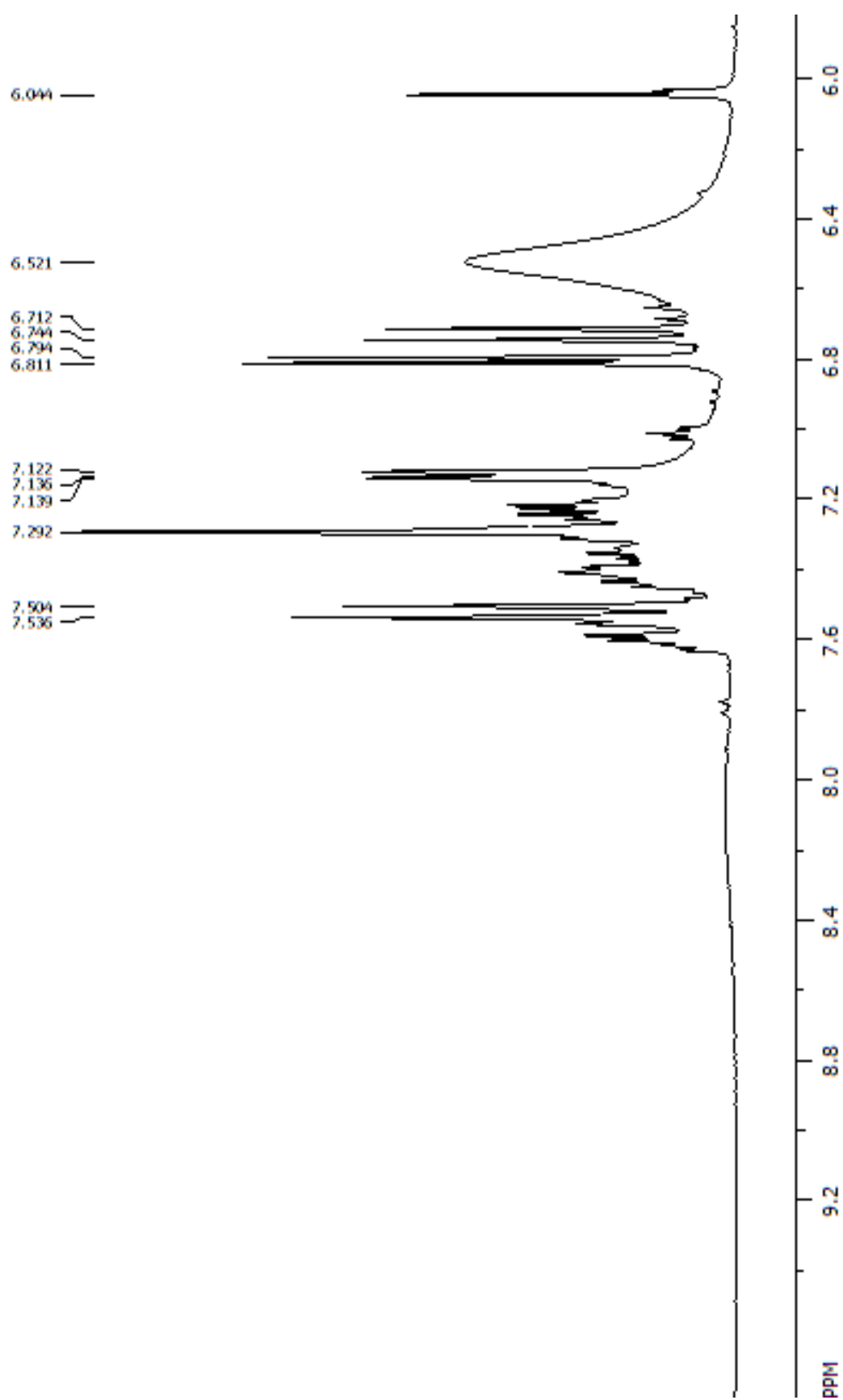


Figura 40 - Espectro de RMN ^1H em DMSO-d_6 500 MHz do conjugado PGLDBC com o desaparecimento do pico do correspondente a OH fenólica da curcumina em 9.5 ppm, indicando a formação da ligação destas com as hidroxilas do PGLD.

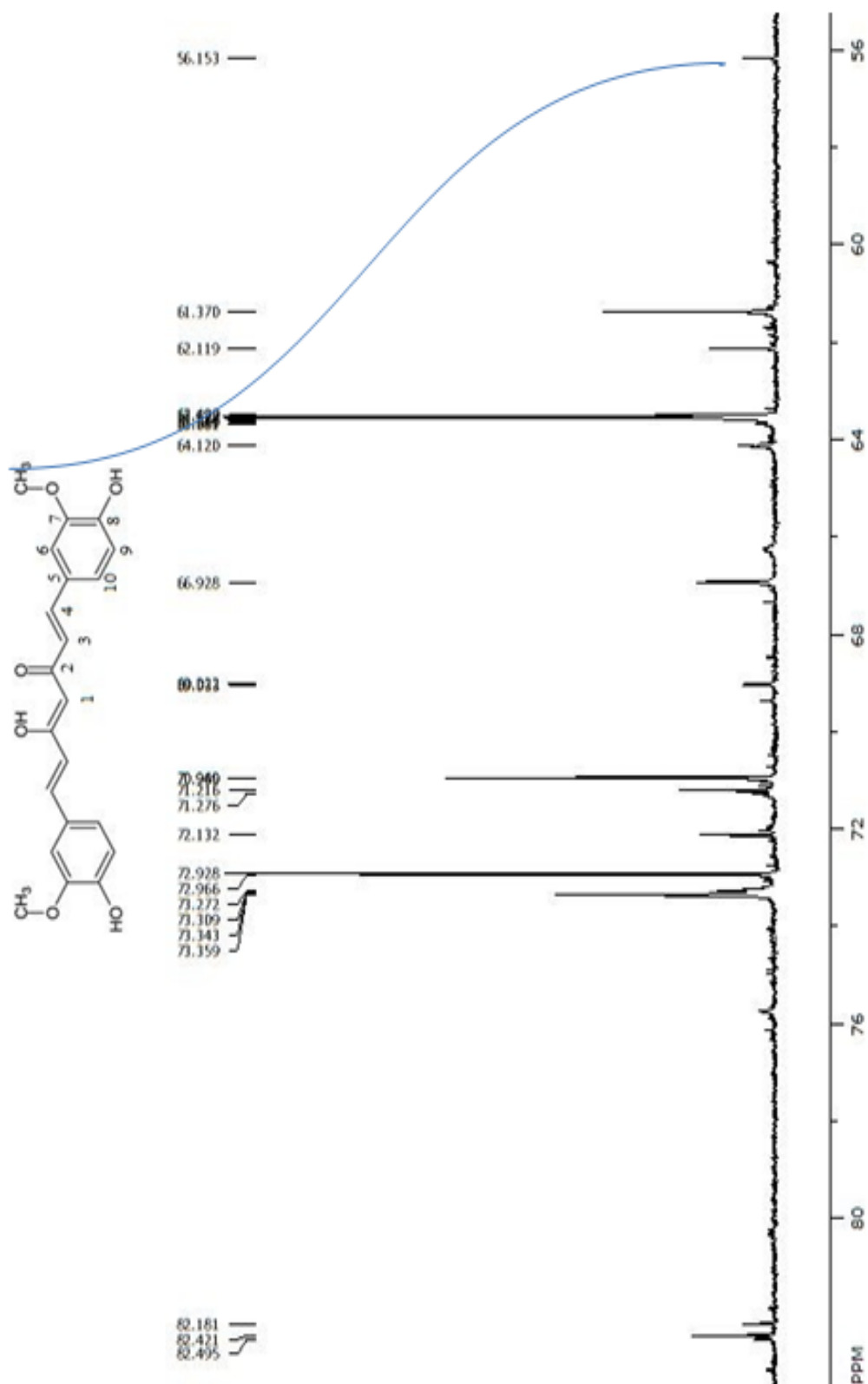


Figura 42 – Espectro de RMN ^{13}C em DMSO-d_6 125MHz do conjugado PGLDBC com os deslocamentos químicos característicos do PGLD em concordância com o relatado na literatura indicando a formação do conjugado .

Tabela 2 - Deslocamentos químicos (ppm) para Hidrogênio (^1H) e Carbono (^{13}C), número de hidrogênios, multiplicidade (d: duplete; s: singlete) e constante de acoplamento (J) em Hz do conjugado PGLDBC.

Posição	PGLDBC		Curcumina	
	C^{13}	H^1	C^{13}	H^1
1	101.189	6.5 ($^1\text{H};\text{s}$)	101.159	6.06 ($^1\text{H};\text{s}$)
2	183.664	-	183.762	-
3	123.623	6.8 ($2\text{H};\text{d}; 8,5\text{ Hz}$)	123.536	6.78 ($2\text{H};\text{d}; 15\text{Hz}; \text{dupla}$)
4	141.161	7.5($2\text{H};\text{d}; 16\text{ Hz}$)	141.079	7.57($2\text{H};\text{d}; 15\text{ Hz}; \text{dupla}$)
5	126.779	-	126.852	-
6	111.768	7.3 ($2\text{H};\text{s}$)	111.657	7.35 ($2\text{H};\text{s}$)
7	148.452	-	148.400	-
8	149.503	-	149.781	-
9	116.160	6.85 ($2\text{H};\text{d}; 8.5\text{Hz}$)	116.216	6.85 ($2\text{H};\text{d}; 10\text{Hz}; \text{ar}$)
10	121.594	7.18 ($2\text{H};\text{d}; 16\text{ Hz}$)	121.603	7.318 ($2\text{H};\text{d}; 10\text{ Hz}; \text{ar}$)
Ar-OCH ₃	56.153	Sobreposto pelos prótons do PGLD	56.128	3.86 ($6\text{H};\text{s}$)

O conjugado PGLDBC foi também caracterizado pela aquisição de um espectro de FTIR como demonstrado na **Figura 43**. Os picos característicos observados no FTIR do conjugado são uma banda de absorção a 3300 cm^{-1} de estiramento de hidroxila (Ar-OH) e do poliol sobrepostas, uma banda em 2900 cm^{-1} que representa estiramento C-H, a banda de 1625 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento simétrico do anel aromático C=C, outra banda a 1450 cm^{-1} de carbonila acompanhada por um ombro pequeno a 1440 cm^{-1} que foi atribuída ao tautomerismo de ceto-enol, as bandas a 1265 cm^{-1} correspondentes ao modo vibracional de estiramento C-O dos grupos álcool e a banda em 1060 cm^{-1} foram atribuída ao grupo éter C-O-C correspondente ao espectro do PGLD relatado na literatura [244,].

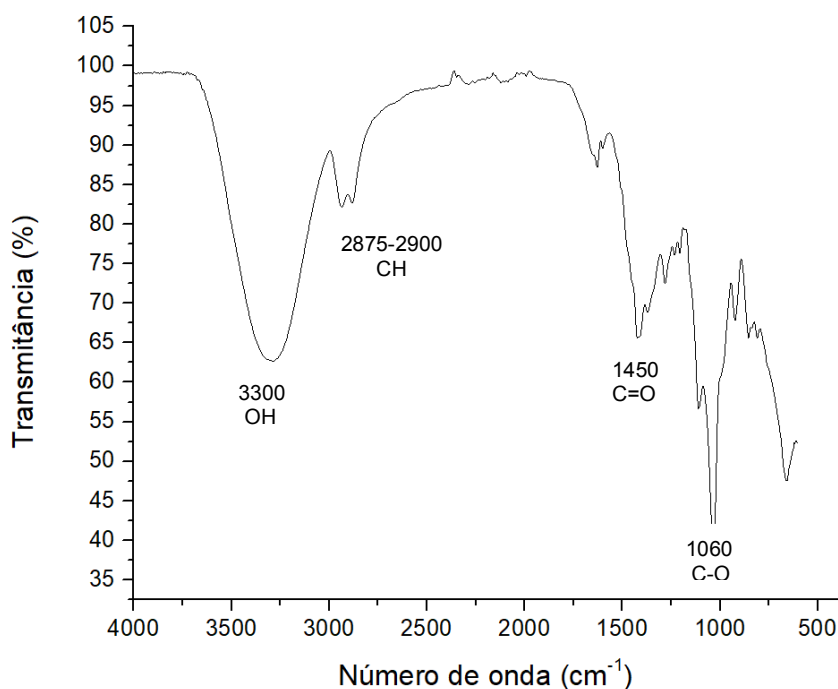


Figura 43 - O espectro de FTIR do conjugado PGLBC demonstra que o complexo apresenta uma diminuição na intensidade da banda de carbonila (C = O), acompanhada de uma variação de aproximadamente 50 cm^{-1} para os valores de número de onda correspondentes ao espectro da curcumina relatado na literatura [287].

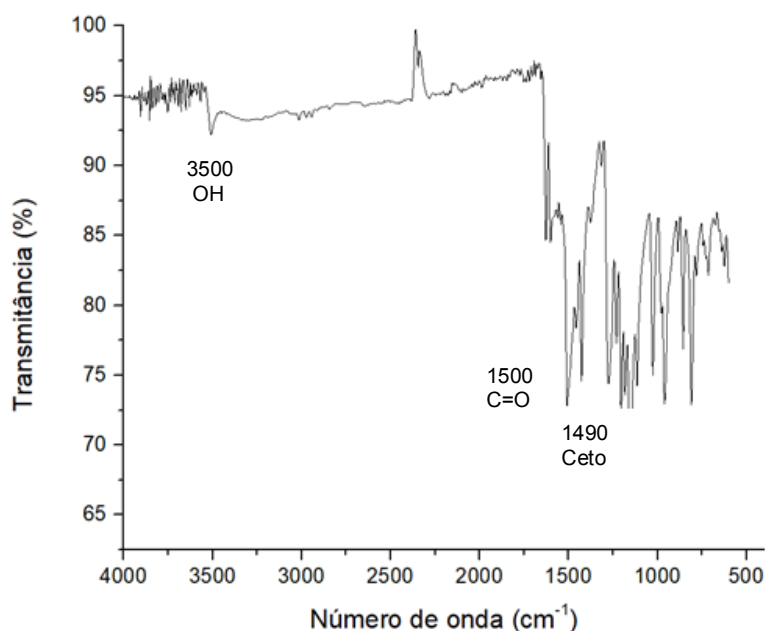


Figura 44 - Espectro de FTIR da curcumina

Os picos característicos observados no FTIR de curcumina pura são uma banda de absorção a 3500 cm^{-1} de estiramento de hidroxila fenólica (Ar-OH), uma banda em 2900 cm^{-1} que representa estiramento (C-H), uma banda a 1620 cm^{-1} de estiramento do anel aromático, uma banda a 1500 cm^{-1} atribuída à vibração da ligação de carbonila (C=O) acompanhada por um ombro pequeno a 1490 cm^{-1} que foi atribuída ao tautomerismo de ceto-enol da curcumina. As bandas a 1400 cm^{-1} e 1260 cm^{-1} correspondentes ao modo vibracional de estiramento (C-O) dos grupos álcool e fenol. As bandas a 985 cm^{-1} , 875 cm^{-1} e 815 cm^{-1} foram atribuídas às vibrações de deformação angular da ligação (RCH = CHR) de grupo alceno [287].

Na **Figura 45** é apresentado a caracterização do PGLD com FTIR que atribuiu à banda larga em 3300 cm^{-1} as hidroxilas (OH), as bandas em 2900 cm^{-1} e 2875 cm^{-1} aos estiramentos simétricos e assimétricos de (CH); em 1640 cm^{-1} , 1590 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} ao grupo (CH₂); em 1400 cm^{-1} a deformação angular no plano de (C-OH); em 1320 cm^{-1} e 1220 cm^{-1} ao grupo (CH₂); e em 1108 cm^{-1} aos grupos (C-O-C) e (C-O); em 1030 cm^{-1} ao grupo (C-O); e em 920 cm^{-1} ao grupo (C-OH) [244].

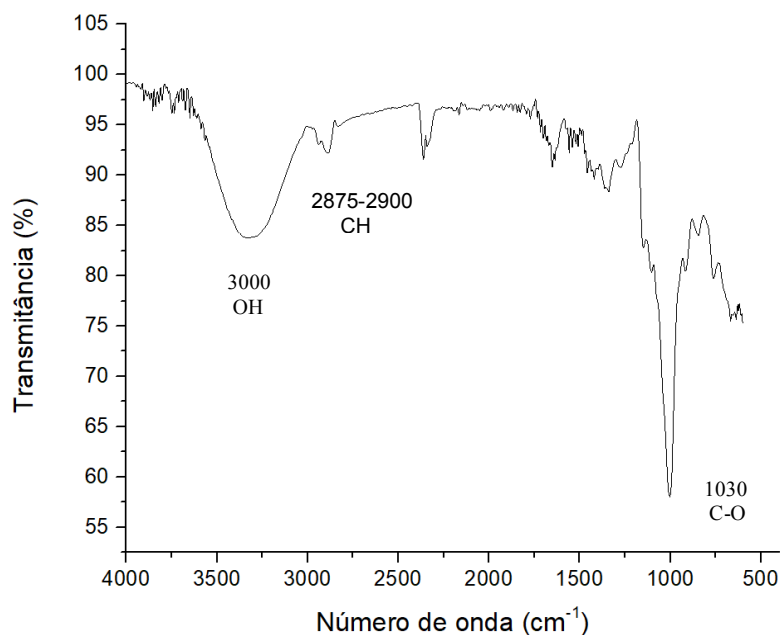


Figura 45 - Espectro de FTIR do PGLD.

6.2 Estabilidade Térmica do PGLD, PGLDBC e da Curcumina.

No processo de síntese do PGLDBC o PGLD foi submetido a temperaturas elevadas para conjugação do complexo de boro-curcumina em sua estrutura, portanto, foi necessário realizar previamente o estudo do seu processo de degradação térmica **Figura 46**.

Na **Figura 46** observamos que o PGLD apresenta três etapas de degradação térmica. A primeira etapa ocorre no intervalo de temperaturas de 100°C a 215°C com perda de massa de aproximadamente 20%. Esta etapa de degradação parece estar associada principalmente à perda de água estrutural processo que continua na segunda etapa, com perda de massa de 20% atribuídos à condensação das hidroxilas primárias do PGLD. A terceira etapa de decomposição térmica ocorre no intervalo de temperatura de 280°C a 380°C com perda de massa de aproximadamente 50% e parece está associado à pirólise do PGLD com formação de moléculas de baixa massa molecular a exemplo de CH_3CHO , HCOOCH_3 e HCOOC_2H_5 . Finalmente observa-se uma massa residual de

cerca de 10% até 600°C, provavelmente resultante da formação de um composto mais estável termicamente que degrada ao atingir 800°C [244].

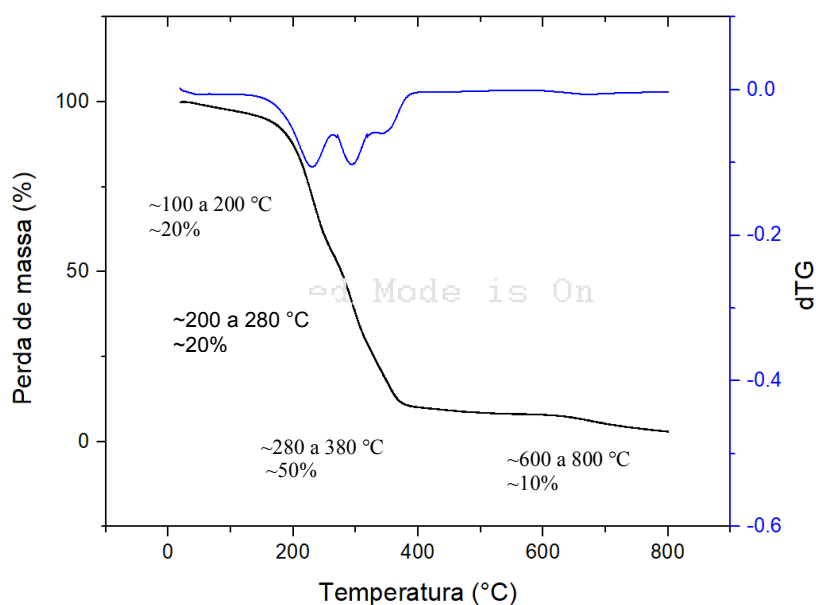


Figura 46 - Análise Termogravimétrica do PGLD G4.

O estudo de análise termogravimétrica de degradação térmica do PGLDBC também foi realizado, uma vez que, será submetido a um feixe de nêutrons para aplicação da terapia de captura de nêutrons em outros trabalhos futuramente.

A análise termogravimétrica do conjugado PGLDBC mostra a perda de massa em torno de 25%, o que é atribuído ao teor de umidade, uma perda de massa em torno de 40%, esta maior perda de peso é devida à condensação das hidroxilas primárias do dendrímero de poliglicerol, além da degradação dos grupos substituintes da curcumina e 25% de perda de massa é atribuído à formação de moléculas de baixa massa molecular devido à pirólise do dendrímero e devido à decomposição de dois anéis de benzeno da curcumina. Enfim observa-se uma massa residual de cerca de 10% até 800°C, provavelmente resultante da formação de um composto mais estável termicamente que não degrada totalmente ao atingir 1000°C (**Figura 47**).

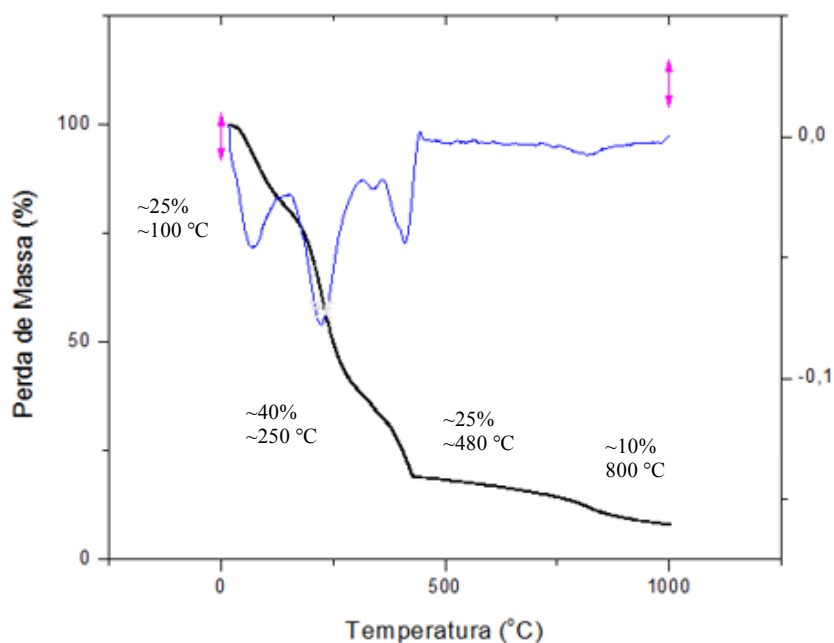


Figura 47 – Análise termogravimétrica do conjugado PGLDBC.

O estudo de estabilidade térmica da curcumina também foi realizado, uma vez que, no processo de complexação da curcumina com boro estas forma submetidos a temperaturas elevadas.

A **Figura 48** mostra as curvas TG/dTG da curcumina em uma velocidade de aquecimento de 10°C/min. Como pode ser visto a perda de massa inicia a cerca de 90°C e termina em cerca de 730°C. A perda de massa observada na curva TG é 100% o que indica que a curcumina foi completamente decomposta. A decomposição térmica da curcumina abaixo de 800°C ocorre em duas etapas mais significativas. Existe um ponto de inflexão em cerca de 350°C na curva dTG, que pode ser considerado como o ponto final da etapa I. Portanto a etapa I cuja perda de massa é 35% inicia em cerca de 90°C e termina em cerca de 350°C caracterizada por um pico dTG a cerca de 350°C. A etapa II cuja perda de massa é 65% inicia em cerca de 350°C e termina em cerca de 555°C o que envolve um pico dTG a cerca de 730°C. As análises TG/dTG sugerem que: (a) a etapa I é devido à decomposição de grupos substituintes da curcumina; (b) a etapa II é devido à decomposição dos dois anéis aromáticos da curcumina [288].

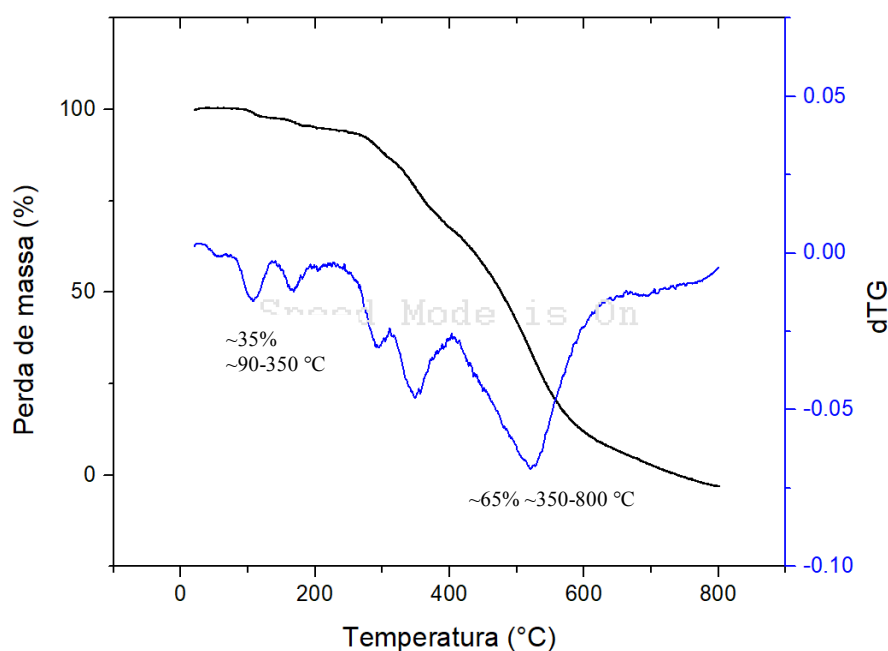


Figura 48 - Análise Termogravimétrica da curcumina

6.3. Resultado da Ancoragem Molecular

Os dendrímeros de poliglicerol (PGLD) foram amplamente estudados para sua aplicação na medicina [255-259]. Em aplicações clínicas a propriedade de hemocompatibilidade do PGLD é muito desejada, uma vez que facilita a distribuição do fármaco na circulação sanguínea [260-263]. Além da biocompatibilidade com tecidos vivos com uma citotoxicidade extremamente baixa [264-267]. O PGLD mostrou uma boa capacidade de transporte para várias moléculas bioativas, indicando a sua potencial aplicação na entrega de fármacos como um transportador com liberação controlada [268-272].

Apesar de suas extensas aplicações potenciais em medicina, a maioria dos estudos experimentais sobre PGLD carecem de informação estrutural e conformacional a nível molecular. A compreensão das características estruturais e dinâmicas do PGLD e de suas interações com os receptores biológicos a nível molecular seria muito útil para aperfeiçoar suas propriedades biológicas e farmacêuticas. Portanto estudos de simulações computacionais sobre as interações de

PGLD com a albumina de soro humano (ASH) que é a proteína de plasma sanguíneo mais abundante foram realizados [271]. Uma alta afinidade de ligação da ASH tem sido demonstrado para transportar uma ampla gama de ligantes endógenos e exógenos, incluindo uma significativa variedade de fármacos. Uma vez que estes fármacos com diferentes especificidades podem se ligar a mais de um sítio de ligação da ASH [272]. Considerando estas simulações computacionais associadas aos dados teóricos e experimentais relatados na literatura constituirão uma base de dados de valor preditivo substancial.

Estes parâmetros em conjunto com dados termodinâmicos, como energia livre de ligação (ΔG), que é a força pela qual o fármaco estará ligado na ASH, possibilita explicar a distribuição do fármaco eficiente na circulação sanguínea. Uma vez que esta variável determina a força de ligação entre o PGLD e a ASH, pois esta que transportará o PGLD através do plasma sanguíneo. Esse parâmetro determina o clearance (o tempo em que o fármaco permanecerá na corrente sanguínea antes de ser excretado).

A fim de prever os modos de ligação de PGLD em um dos dois principais locais de ligação do ligante na ASH (local I, sítio IIA), realizaram-se simulações de encaixe da interação desse complexo de proteína-ligante.

Para cada geração foram realizadas 100 simulações de encaixe e a análise de agrupamento com uma tolerância de desvio padrão dos átomos (RMSD) de 2.0 Å, em relação ao ligante, estão apresentadas na **Figura 49** [251].

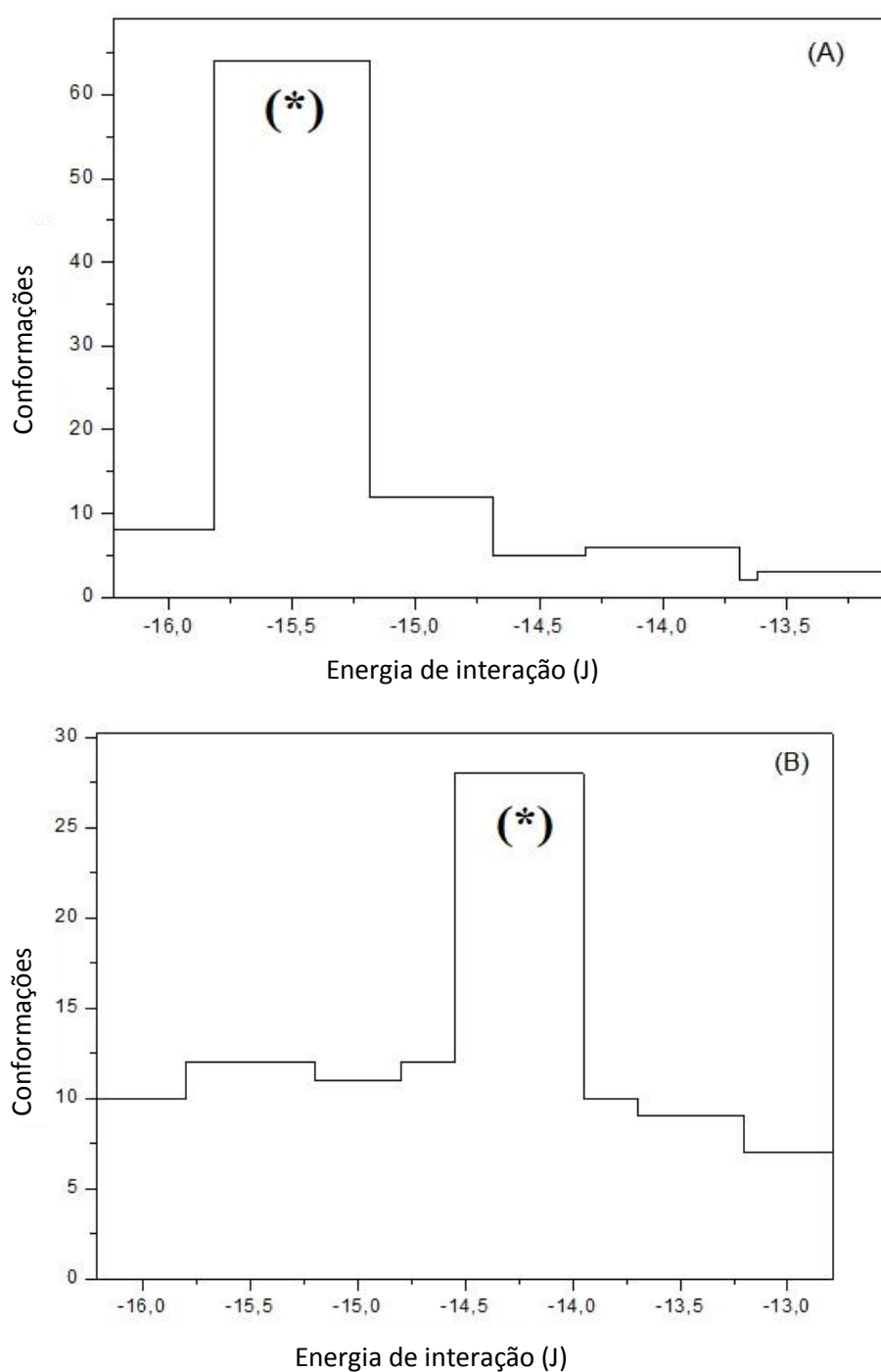


Figura 49 - Histogramas de aglomerados de energia de 100 conformações geradas pela ancoragem de ASH no local IIA (A) e I (B). As conformações geradas pelo AutoDock foram agrupadas em $\text{RMSD} = 2 \text{ \AA}$ e, em seguida, plotadas pela conformação de menor energia de cada cluster. (*) indica o mais abundante com o menor cluster de energia prevendo interação ASH-PGLD.

6.4. Interação PGLD-ASH

As aplicações complementares da modelagem de moléculas foram empregadas por métodos informáticos para melhorar a compreensão da interação de PGLD e ASH. O melhor resultado de ancoramento é apresentado na **Figura 50**.



Figura 50 - Principais conformações de encaixe para o G3 nos sites IIA.

Como previsto a partir dos dados de ancoramento entre o PGLD e a ASH, as interações deveriam ocorrer em locais específicos. A ASH interage de forma reversível com um amplo espectro de fármacos. Estes se ligam ao local com o qual têm maior afinidade, sendo que os relatos da literatura com base no deslocamento de sondas fluorescentes revelou que a maioria dos fármacos pode-se ligar com elevada afinidade a um ou a dois locais, denominados por local I e local II localizados nos subdomínios IIA e IIIA respectivamente [273]. O local I parece ser espaçoso e flexível, uma vez que se verificam ligações com elevada afinidade de ligantes com estruturas químicas muito diferentes. O local II parece ser menor ou mais estreito que o local I, uma vez que o PGLD não se liga a este local. Além disso, tem-se verificado que a substituição por ligantes com grupos químicos menores influencia fortemente esta ligação. Assim

apesar de vários ligantes conseguirem se ligar a este local com elevada afinidade, este aparenta ser mais restrito do que o local I [273].

6.5. Local de Ligação

No sítio de ligação II no subdomínio IIIA da ASH não foi encontrado nenhuma ligação com PGLD. Este local é descrito como o sítio II ou sítio da digitoxina uma pequena molécula com grupos funcionais hidroxilas similares aos do PGLD [274]. É muito provável que o PGLD não faça ligação com este sítio devido ao fato deste não comportar moléculas muito grandes. Os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação de PGLD com ASH foram previstos e as respectivas interações intermoleculares foram avaliadas e apresentadas na **Figura 51**.

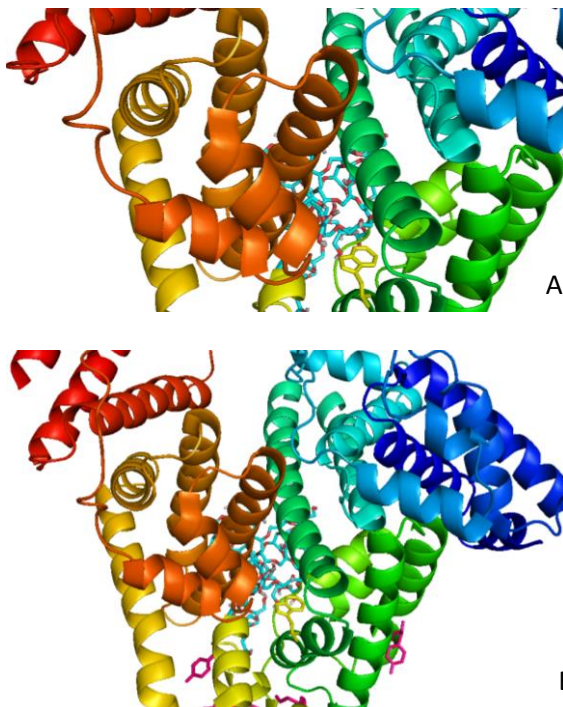


Figura 51 - Interações entre G3 com o resíduo de aminoácido Trp (A) e G3 (B) com os resíduos Trp e Tyr.

A interação entre PGLD e ASH não é exclusivamente de natureza hidrofóbica, uma vez que existem vários resíduos de aminoácidos iônicos (His146, Arg114, Arg186, Lys190), bem como resíduos de aminoácidos polares (Leu115, Leu182, Ser517, Pro146, Pro152) na proximidade do ligante. Esses resíduos polares provavelmente desempenham um papel importante na estabilização do PGLD através de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas. Os aminoácidos básicos como Arg, His e Lys na vizinhança, podem ser os alvos para interações com funções hidroxilas de carga negativa do PGLD. As ligações de hidrogênio ou as interações eletrostáticas atuam como “âncora” determinando a posição tridimensional de PGLD no sítio de ligação da ASH e facilita a interação hidrofóbica dos grupos hidroxila do dendrímero com a cadeia lateral da proteína.

6.7. Curva de Viabilidade Celular e Determinação do IC₅₀

A análise inicial da citotoxicidade contra as linhagens celulares SCC9, SCC25, CHO e HK indica quantitativamente a atividade quimioterápica do PGLDBC nas células tumorais (SCC9, SCC25) e seu efeito nas células saudáveis, nesse caso, as células CHO e HK. As linhagens celulares são expostas ao composto PGLDBC e sua velocidade de crescimento e multiplicação são medidas indiretamente utilizando o corante 2-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil-2H-tetrazólio) (MTS) e um acoplador de elétrons, o metassulfato de fenazina (PMS) na proporção 20:1. O MTS sofre redução pelas enzimas mitocondriais excretadas no meio de cultura pelas células vivas produzindo um composto colorido com λ_{max} em 490 nm cuja intensidade obedece à lei de Lambert-Beer e é diretamente proporcional ao número de células vivas presentes no meio de cultura [275-278].

A concentração de PGLDBC que produz uma redução em 50% na viabilidade celular foi considerada como um parâmetro de toxicidade para a linhagem celular estudada e denomina-se índice de citotoxicidade (IC₅₀). O IC₅₀ foi estimado a partir do percentual de células viáveis em relação ao controle versus a concentração do PGLDBC, expressa em mg/mL.

Os gráficos das **Figuras 53-55** ilustram a ação do PGLDBC na proliferação celular das linhagens celulares de carcinoma epidermóide (SCC9, SCC25) e células normais (CHO, HK). A fim de se facilitar a visualização, os gráficos dos controles denominados de positivo e negativo foram feitos a parte e estão ilustrados na **Figura 56**. Os resultados obtidos (**Fig. 53-55**) demonstram claramente a ação do PGLDBC inibindo significativamente a proliferação celular relativamente ao grupo controle, evidenciando o papel da macromolécula funcionalizada com Boro e curcumina no ciclo de morte celular das células tumorais estudadas. Entretanto, as linhagens celulares CHO e HK, consideradas sadias, não sofreram influência quanto às suas proliferações, o que demonstra a seletividade do PGLDBC pelas células tumorais. Tal fato pode estar associado a uma interação mais efetiva do PGLDBC com a membrana das células tumorais estudadas. Uma vez que há relatos na literatura de que P-selectina são expressas em células tumorais possibilitando o acúmulo seletivo de PGLD [279].

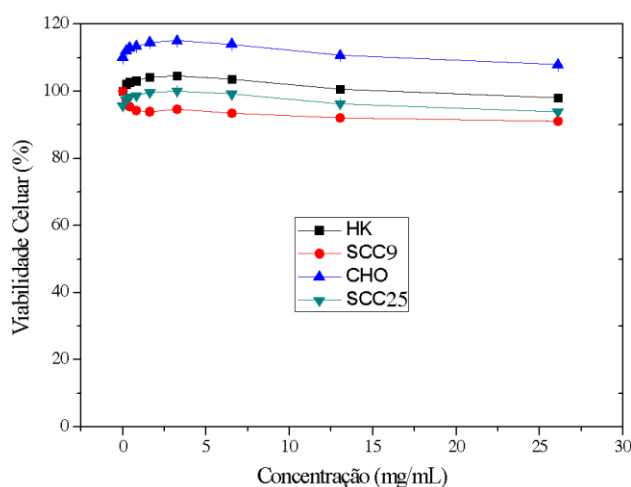


Figura 53 - Sensibilidade das linhagens celulares estudadas ao PGLDB. A concentração de células utilizadas no ensaio foi $1,0 \cdot 10^4$ por poço em 100 μ L do meio de cultura em poços de placas Elisa de 96 poços. A viabilidade celular foi medida depois de 24 horas de incubação após a aplicação do PGLDB. Cada ponto corresponde à média de três ensaios. Os desvios padrões são inferiores a 1,0% e por isso não estão destacados nos pontos.

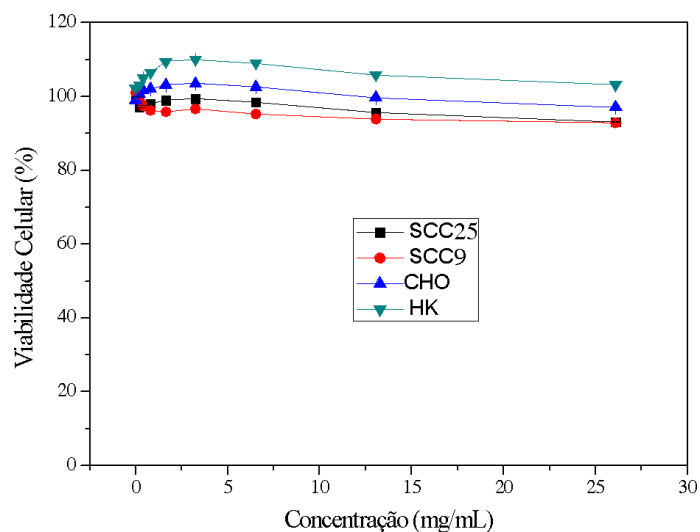


Figura 54 - Sensibilidade das linhagens celulares estudadas à curcumina. A concentração de células utilizadas no ensaio foi $1,0 \cdot 10^4$ por poço em 100 μ L do meio de cultura em poços de placas Elisa de 96 poços. A viabilidade celular foi medida depois de 24 horas de incubação após a aplicação da curcumina. Cada ponto corresponde à média de três ensaios. Os desvios padrões são inferiores a 1,0% e por isso não estão destacados nos pontos.

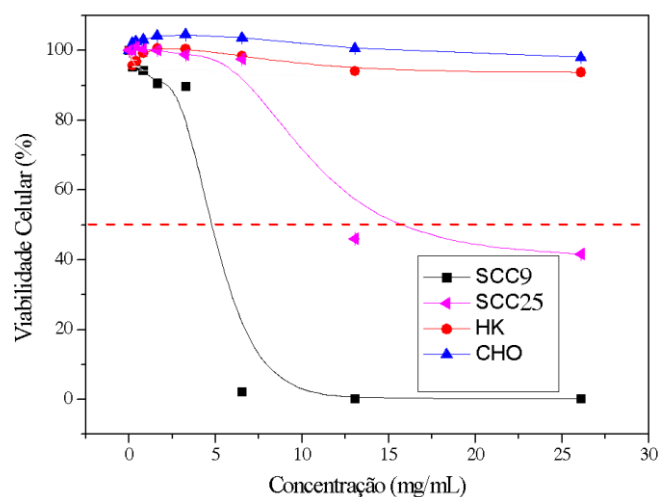


Figura 55 - Sensibilidade das linhagens celulares ao PGLDBC. A concentração de células utilizadas no ensaio foi $1,0 \cdot 10^4$ por poço em 100 μ L do meio de cultura em

poços de placas Elisa de 96 poços. A viabilidade celular foi medida depois de 24 horas de incubação após a aplicação do PGLDBC. Cada ponto corresponde à média de três ensaios. Os desvios padrões são inferiores a 1,0% e por isso não estão destacados nos pontos.

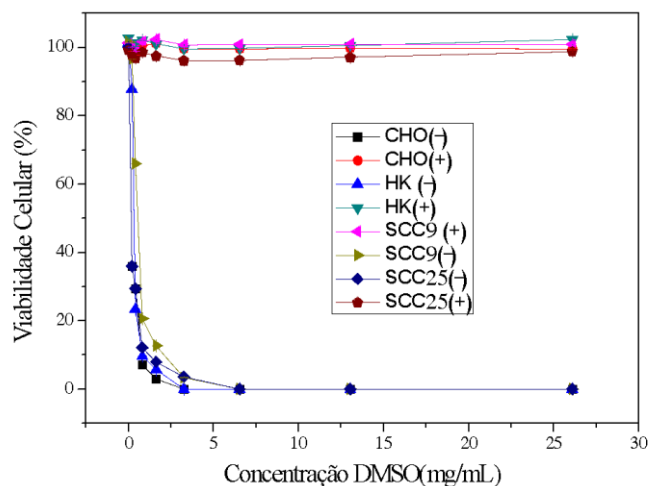


Figura 56 - Controle positivo (DMSO) e controle negativo para as linhagens celulares estudadas nesse trabalho. O controle negativo correspondeu às linhagens celulares CHO, HK, SCC25 e SCC9 em seu próprio meio de cultura após 24 horas. A concentração de células utilizadas no ensaio foi $1,0 \cdot 10^4$ por poço em 100 μ L do meio de cultura em poços de placas Elisa de 96 poços. A viabilidade celular foi medida depois de 24 horas de incubação após a aplicação do DMSO. Cada ponto corresponde à média de três ensaios. Os desvios padrões são inferiores a 1,0% e por isso não estão destacados nos pontos.

A partir dos resultados obtidos da curva de viabilidade celular (**Fig. 55**), foi possível a determinação da IC_{50} , ou seja; concentração inibitória de 50% da resposta biológica máxima do PGLDBC após 24 horas de incubação com as linhagens celulares das células neoplásicas SCC25 e SCC9. A diluição média mais adequada para a linhagem SCC25 e SCC9 foram de 15,44 mg/mL e 4,74 mg/mL, respectivamente. Portanto, a linhagem celular SCC9 parece ser mais sensível ao PGLDBC relativamente à linhagem celular SCC25.

6.8. Análise de Apoptose Celular pelo Método de Tunel.

A fim de se comprovar a morte celular por apoptose induzida pelo PGLDBC, foi efetuado a análise das células apoptóticas pelo método Tunel. Nas mesmas condições dos experimentos anteriores, as células do grupo controle e submetidas ao PGLDBC foram analisadas utilizando o kit Dead End Fluorometric Tunel System (Promega). Para a montagem das lamínulas com as células, foi utilizado o sistema de montagem Vecta Shield com DAPI (Vector Laboratories, Ind. Burlingame, CA, EUA). O DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol), é um marcador fluorescente sintético, muito utilizado para marcar células vivas e DNA em experimentos de microscopia de fluorescência (**Figura 57**) [280].

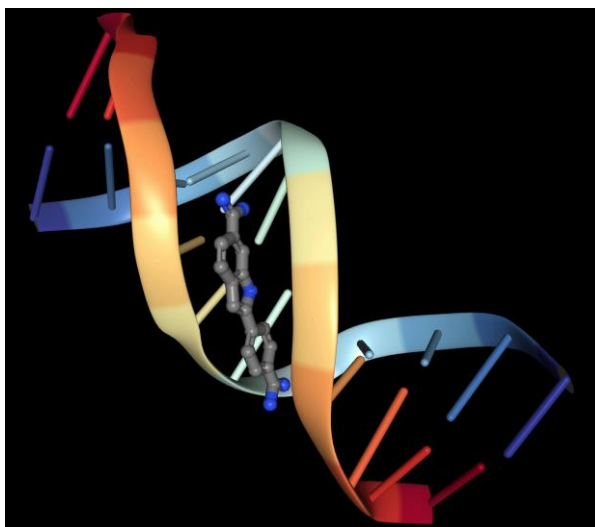


Figura 57 - A estrutura molecular do DAPI ligado no DNA obtido no RCSDB do pub. 1D30 [280].

O DAPI liga-se especificamente a sítios com três ou mais pares de bases AT (adenina-timina) [281] e aumenta drasticamente seu rendimento quântico de fluorescência após a ligação (**Figura 58**) [282].

As lamínulas contendo as células do grupo controle e as submetidas ao PGLDBC foram visualizadas e analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiophot II, Carl Zeiss).

Nas células tumorais em apoptose deverá ser observada a coloração verde enquanto que as células viáveis são observadas em azul.

A **Figura 60** ilustra o ensaio de Tunel para a observação das células em apoptose celular. Não foram observadas células apoptóticas no grupo controle (**Fig. 60 A, B**). Entretanto, após administração do PGLDBC, são observadas células apoptóticas coradas em verde nas linhagens celulares SCC9 e SCC25, respectivamente (**Fig. 60 C, D**).

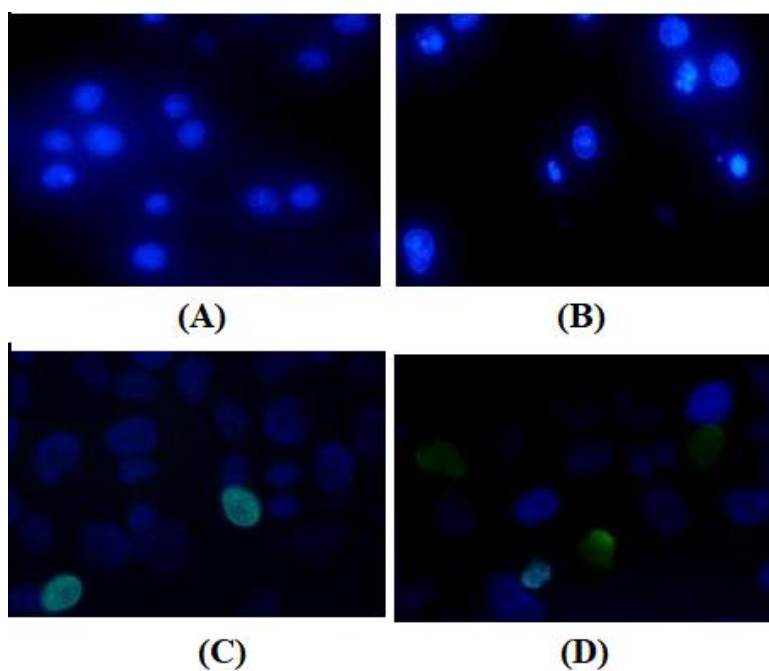


Figura 60 - Fotografia representativa dos ensaios pelo método de Tunel para apoptose dos grupos controles SCC9 (A), SCC25 (B) e após exposição ao PGLDBC: SCC9(C) e SCC25(D).

A partir dos resultados da **Figura 60** efetuou-se a contagem dos núcleos apoptóticos em três campos distintos e aleatórios para cada linhagem celular estudada

utilizando-se o software Axion Vision 4.7 Carl Zeiss. A porcentagem média de núcleos apoptóticos está representada no gráfico exibido na **Figura 61**.

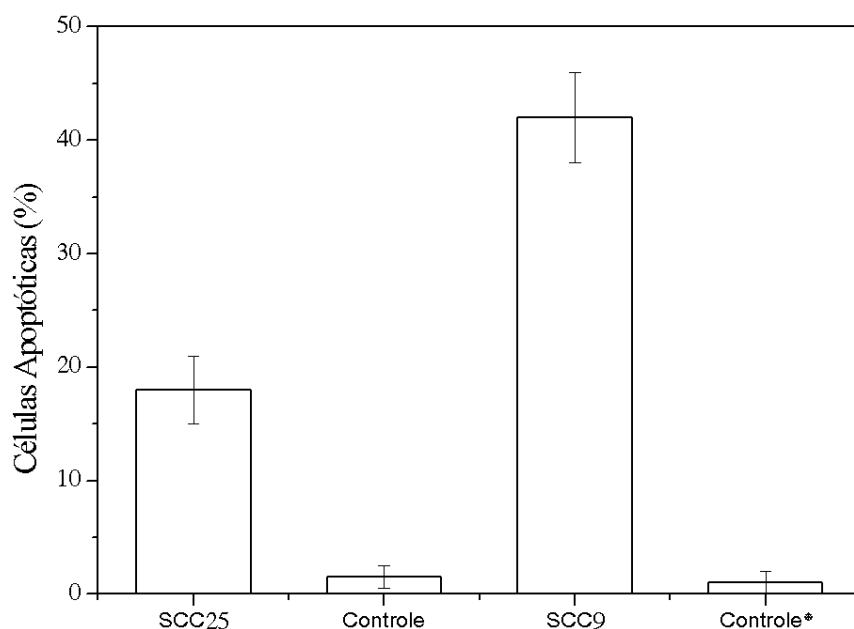


Figura 61 - Contagem de células em apoptose nas linhagens celulares SCC9 e SCC25 após administração do PGLDBC. A quantidade de PGLDBC adicionada às culturas celulares são equivalentes à IC₅₀.

A análise da **Figura 61** permite concluir que o PGLDBC nas concentrações de IC₅₀ promove a morte celular por apoptose em ambas às linhagens SCC9 e SCC25, respectivamente. Entretanto, a linhagem SCC9 parece ser mais sensível ao PGLDBC relativamente à linhagem SCC25. Não há relatos na literatura em relação ao mecanismo de transporte de dendrímeros através das células, o que poderia explicar esta diferença de atividade biológica entre as linhagens de células tumorais SCC9 e SCC25. No entanto um estudo sugeriu que o transporte de dendrímeros pode ocorrer por meio de endocitose [279]. Outra hipótese poderia ser atribuída à diferença na cinética de hidrólise do PGLDBC nestas células tumorais considerando a possibilidade de variação

de pH entre elas. Portanto compreender estes fatores relevantes na liberação do fármaco a partir do conjugado PGLDBC, são necessários outros estudos.

As análises dos dados obtidos nesta Tese contribuem para compreensão de fatores determinantes para desenvolvimento de novas estratégias de terapias do câncer de cabeça e pescoço. Com base em dados da literatura a indução de apoptose em células SCC25 deve ocorrer com a inibição da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) da via de sinalização AKT [284]. É relatado na literatura que 2 μ M de curcumina aplicado em células tumorais de cabeça e pescoço diminuíram os níveis do NF κ B [285]. Uma vez que o NF κ B realiza a regulação da expressão de vários genes, relacionados à carcinogênese [286], os resultados apresentados nesta Tese sugerem que o PGLDBC inibe a proliferação de células tumorais induzindo-as à apoptose. Assim foi demonstrado o efeito do PGLDBC em células epidermóide através de testes *in vitro* e seu possível mecanismo a nível molecular.

O PGLDBC inibiu a proliferação celular relacionando a dose e o tempo-dependente, tanto na SCC25 como em SCC9 de acordo com os dados apresentados. A coloração verde das células apoptóticas possibilitou a determinação da porcentagem de células em apoptose no tratamento com PGLDBC. Estes dados sugerem que o PGLDBC induz a sinalização da apoptose em células SCC25 e SCC9 através da coloração com DAPI. Essa técnica realizada pelo método TUNEL é fundamental neste processo, pois quando uma substância consegue eliminar células neoplásicas é preciso determinar se houve indução de apoptose ou necrose. Uma vez que a necrose das células desencadeará efeito colateral como um processo inflamatório, causando danos irreversíveis ao tecido e ao órgão, o que inviabilizará o quimioterápico. Assim o processo de apoptose é o ideal para a morte das células cancerígenas. De acordo com a literatura o mecanismo neste o processo de apoptose o citocromo é liberado da mitocôndria no citosol, onde se liga com o fator de ativação da protease apoptótica-1 (Apaf-1) em seguida este complexo citocromo/Apaf-1 ativa a caspase-9, que por sua vez ativa a caspase-3 levando assim a morte celular [287]. Portanto esta Tese sugere estudos de Polymerase Chain Reaction (PCR) de proteínas específicas que possibilitarão compreender o mecanismo da via de sinalização celular neste processo de carcinogênese.

Capítulo 7 - Conclusão

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- a. A espectroscopia RMN de carbono indicou que o PGLD G4 com grau de ramificação igual a 0,6, indicando que o material apresenta características de isomolecularidade, embora pareça haver defeitos distribuídos na cadeia molecular do dendrímero;
- b. A síntese do PGLDBC foi realizada com sucesso, obtendo um rendimento de 36%;
- c. A determinação IC_{50} da resposta biológica máxima do PGLDBC para as linhagens celulares das células neoplásicas SCC25 e SCC9 foram de 15,44 mg/mL e 4,74 mg/mL;
- d. O PGLDBC apresentou-se biocompatível com células normais;
- e. O PGLDBC induziu a apoptose das linhagens celulares SCC9 e SCC25;
- f. As propriedades da ligação de PGLD-HAS foram mapeadas por ancoragem molecular. Os resultados do ancoragem molecular consideraram o local I, site IIA como o melhor local de encaixe para o PGLD. Este trabalho oferece uma visão geral in silico e uma compreensão entre a interação molecular envolvendo PGLD e ASH.

Capítulo 8 - Perspectivas:

- a. A próxima etapa será quantificar a concentração de boro no dendrímero de PGL através da Radiografia Quantitativa de Captura de Nêutrons (QNCR).
- b. Melhorias para aumentar a concentração de boro no dendrímero e para o direcionamento específico para outros tipos de câncer estão atualmente sob investigação.
- c. Simulações computacionais de ancoragem molecular do dendrímero de PGL com fibrinogênio estão em andamento.
- d. Dinâmica molecular para simular a interação do dendrímero de PGL glicosilado com a membrana hematoencefálica através do transportador GLUT 1 também estão em andamento.
- e. Avaliar a expressões proteicas de AKT e NFkB nas linhagens de células tumorais estudadas.

Referências

- [1] Kelles, S. M. B. Tratamento de glioma de alto grau: Temozolamida ou nitrosuréias. Núcleo de Avaliação de Tecnologia em Saúde (NATS), p 1-18, 2011.
- [2] Instituto Nacional do Câncer – INCA. Distribuição das taxas de incidência, ajustadas por idade, segundo o RCBP e período de referência. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>. Acesso em: 15 de fev. 2019.
- [3] F. T. Arruda, G. A. Viani. Análise de 20 anos do modelo de remuneração do SUS para a radioterapia: precisamos mudá-lo? *Braz J Oncol*, 13(44):1-11, 2017
- [4] S. Supattapone, H. Wille, L. Uyechi, J. Safar, P. Tremblay, F.C. Szoka. Branched polyamines cure prion-infected neuroblastoma cells. *J Virol*;75:3453–61, 2001
- [5] G. Wu, W. Yang, R.F. Barth, S. Kawabata, M. Swindall, A.K. Bandyopadhyaya. Molecular targeting and treatment of an epidermal growthfactor receptor-positive glioma using boronated cetuximab. *ClinCancer Res*; 13:1260–8, 2007
- [6] K. M. Dhandapani, V. B. Mahesh, D.W. Brann: Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP–1 and NFkappaB transcription factors. *Journal of Neurochemistry* (102): 522–538, 2007
- [7] P. Sebastien, E. Tabruyn, A.W. Griffioen. NF-KB: a new player in angiostatic therapy. *Angiogenesis* 11:101–106, 2008
- [8] C.J. Hawker, J.M.J. Fréchet, Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture. A New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 7638-7647, 1990
- [9] F.J.C. Baratéla, O.Z. Higa, E.D. Passos, A.A.A. Queiroz. Fabrication of electrospun HPGL scaffolds via glycidyl methacrylate cross-linker: Morphology, mechanical and biological properties. *Materials Science and Engineering, C* 73, 72–79, 2017
- [10] S.J. Gonzalez, M.R. Bonomib, G.A. Santa Cruza, H.R. Blaumanna, O.A. Calzetta Larrieua, P. Menendezb, R. Jimenez Rebagliatia, J. Longhinoa, D.B. Felda, M.A. Dagrosaa, C. Argerichh , S.G. Castiglia, D.A. Batistonia, S.J. Libermana, B.M.C. Rothb. First BNCT treatment of a skin melanoma in Argentina: dosimetric analysis and clinical outcome. *Applied Radiation and Isotopes* 61 1101–1105 (2004)
- [11] L. Gales, R. Anghel, M. I. Gruia, V. Lungu, V. Negoita, I. Gruia. In vivo study of BPA (Boron10-phenilalanine) use in boron neutron capture radiotherapy as an alternative for hepatic cancer treatment. *Rom. Journ. Phys.*, Vol. 60, Nos. 3–4, P. 521–527, Bucharest, 2015
- [12] K. Yamasaki, V. T. G. Chuang, T. Maruyama, M. Otagiri. Albumin-drug interaction and its clinical implication. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830, 5435–5443, 2013

- [13] D.N. Louis, The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114(2): p. 97-109, 2007
- [14] W. Bernd. Scheithauer, N.G. Fuller, S.R. VandenBerg. The 2007 WHO Classification of Tumors of the Nervous System: Controversies in Surgical Neuropathology. *Brain Pathology* 18 307–316, 2008
- [15] A.C. Bruno-Machado. E.C.F.S. Fortes. M.C. Tijero. The physics of the boron neutron capture therapy. *Rev. Bras. Ensino Fís.* vol.32 no. 4 São Paulo Oct./Dec. 2010
- [16] C. Majós, J. Alonso, C. Aguilera, M. Serrallonga, J. Pérez-Martín, J. J. Acebes, C. Arús, J. Gili. Proton magnetic resonance spectroscopy (1H MRS) of human brain tumours: assessment of differences between tumour types and its applicability in brain tumour categorization. *Eur Radiol* 13:582–591, 2003
- [17] C. Majós, J. Alonso, C. Aguilera, M. Serrallonga, J. Pérez-Martín, J. J. Acebes, C. Arús, J. Gili. Adult Primitive Neuroectodermal Tumor: Proton MR Spectroscopic Findings with Possible Application for Differential Diagnosis. *Radiology* November. Volume 225 Number 2:556-566, 2002
- [18] M.D. Jenkinson, Advanced MRI in the management of adult gliomas. *Br J Neurosurg*, 21(6): p. 550-61, 2007
- [19] N. Upadhyay, A.D. Waldman, Conventional MRI evaluation of gliomas. *Br J Radiol*, 84 Spec No 2: p. S107-11, 2011
- [20] T. Nihashi, I.J. Dahabreh, T. Terasawa, PET in the clinical management of glioma: evidence map. *AJR Am J Roentgenol*, 200(6): p. W654-60, 2013.
- [21] R. Jain, Perfusion CT imaging of brain tumors: an overview. *AJNR Am J Neuroradiol*, 32(9):p. 1570-7, 2011.
- [22] S. Samnick, Clinical value of iodine-123-alpha-methyl-L-tyrosine single-photon emission tomography in the differential diagnosis of recurrent brain tumor in patients pretreated for glioma at follow-up. *J Clin Oncol*, 20(2): p. 396-404, 2002.
- [23] B. Gulyas, C. Halldin, New PET radiopharmaceuticals beyond FDG for brain tumor imaging. *QJ Nucl Med Mol Imaging* 56(2): p. 173-90, 2012.
- [24] B. Pirotte, Comparison of ¹⁸F-FDG and ¹¹C-methionine for PET-guided stereotactic brain biopsy of gliomas. *J Nucl Med*. 45(8): p. 1293-8, 2004
- [25] M. Hutterer, O-(2-18F-fluoroethyl)-L-tyrosine PET predicts failure of antiangiogenic treatment in patients with recurrent high-grade glioma. *J Nucl Med*, 52(6): p. 856-64, 2011.
- [26] R. P. Mendes, K. G. Couto, E. C. Tavares, L. D. S. Soares, Y. F. Magalhães, N. P. Mendes. Sensibility and Specificity of Nuclear Medicine Methods in Glioma Identification and Differentiation *J Bras Neurocirurg* 27 (2): 163 - 167, 2016.
- [27] M. Bruehlmeier, Assessment of hypoxia and perfusion in human brain tumors using PET with ¹⁸F-fluoromisonidazole and ¹⁵O-H₂O. *J Nucl Med*, 45(11): p. 1851-9 2004.
- [28] National Cancer Institute. Disponível em: <<http://www.cancer.gov>>. Acesso em: 09 de fev. 2016.

- [29] W. Wick, Bevacizumab and recurrent malignant gliomas: a European perspective. *J Clin Oncol*, 28(12): p. e188-9; author reply e190-2 2010.
- [30] Schutz, F.A., Bevacizumab increases the risk of arterial ischemia: a large study in cancer patients with a focus on different subgroup outcomes. *Ann Oncol*, 22(6): p. 1404-12 2011.
- [31] R. Stupp, M. Weller, Questions regarding the optimal use of bevacizumab in glioblastoma: a moving target. *Neuro Oncol*, 2014.
- [32] A. Walker, M. Neu, M. Burman, T. Batuwangala, G. Jones, C. Tang, M. Steward, M. Mullin, N. Tournier, A. Lewis, J. Korczynska, V. Chung, I. Catchpole. Novel interaction mechanism of a domain antibody based inhibitor of human vascular endothelial growth factor with greater potency than ranibizumab and bevacizumab and improved capacity over aflibercept. *J. Biol. Chem.* published online January 4, 2016
- [33] P. Basnet, N. Skalko-Basnet: Curcumin: An Anti-Inflammatory Molecule from a Curry Spice on the Path to Cancer Treatment. *Molecules* (16): 4567–4598, 2011
- [34] A.A. Oyagbemi, A.B. Saba, A.O. Ibraheem: Curcumin: from food spice to cancer prevention. *Asian Pacific journal of cancer prevention* (10): 963–937, 2009
- [35] S.C. Gupta, S. Patchva, W. Koh, B.B. Aggarwal: Discovery of Curcumin, a Component of the Golden Spice, and Its Miraculous Biological Activities. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (39): 283–299, 2012
- [36] H.A. Vogel, J. Pelletier: Examen chimique de la racine de curcuma. *Journal de Pharmacie* (1): 289–300, 1815
- [37] H. Zhou, C.S. Beevers, S. Huang: Targets of curcumin *Current Drug Targets* (3): 332–347, 2011
- [38] V. Lampe, J. Milobedzka: Studien über Curcumin. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* (46): 2235–2237, 1913
- [39] E. Kunchandy, M. N. A. Rao: Oxygen radical scavenging activity of curcumin. *International Journal of Pharmacology* (58): 237–240, 1990
- [40] E. Schraufstatter, H. Bernt: Antibacterial action of curcumin and related compounds. *Nature* (164): 456–457, 1949
- [41] R. Kuttan, P. Bhanumathy, K. Nirmala, M. C. George: Potential anticancer activity of turmeric (*Curcuma longa*). *Cancer Letters* (29): 197–202, 1985
- [42] H. K. Shin, J. Kim, E. J. Lee, S. H. Kim: Inhibitory effect of curcumin on motility of human oral squamous carcinoma YD–10B cells via suppression of ERK and NF–kappaB activations. *Phytotherapy Research* (24): 577–582, 2010
- [43] O.P. Sharma: Antioxidant activity of curcumin and related compounds. *Biochemical Pharmacology* (25): 1811–1812, 1976
- [44] R. C. Simal, B. N. Dhawan: Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a nonsteroidal antiinflammatory agent. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (25) 447–452, 1973
- [45] O. Albert: Turmeric (curcumin) in biliary diseases. *The Lancet* (229): 619–621, 1937

- [46] N. Chainani–Wu: Safety and anti–inflammatory activity of curcumin: A component of turmeric (*Curcuma longa*). *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* (9): 161–168, 1997
- [47] V. S. Santiago, G. P. M. Silva, D. R. Decoté, M. E. F. Lima. curcumina o pó dourado. *Açafrão da terra: Introspecções sobre química e atividades biológicas*. Quim. Nova, Vol. 38, No. 4, 538–552, 2015
- [48] F. Kiuchi, Y. Goto, N. Sugimoto, N. Akao, K. Kondo, Y. Tsuda: Nematocidal activity of turmeric: synergistic action of curcuminoids. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* (41): 1640–1643, 1993
- [49] G. Y. Kim, K. H. Kim, S. H. Lee, M. S. Yoon, H. J. Lee, D. O. Moon, C. M. Lee, S. C. Ahn, Y. C. Park, Y. M. Park: Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF–kappaB as potential targets. *The Journal of Immunology* (174): 8116–8124, 2005
- [50] S. Bhattacharyya, D. Mandal, B. Saha, G. S. Sen, T. Das, G. Sa: Curcumin prevents tumor–induced T–cell apoptosis through Stat–5a–mediated Bcl–2 induction. *The Journal of Biological Chemistry* (282):15954–15964, 2007
- [51] M. J. Park, E. H. Kim, I. C. Park, H. C. Lee, S. H. Woo, J. Y. Lee, Y. J. Hong, C. H. Rhee, S. H. Choi, B. S. Shim, S. H. Lee, S. I. Hong: Curcumin inhibits cell cycle progression of immortalized human umbilical vein endothelial (ECV304) cells by upregulating cyclin–dependent kinase inhibitor, p21WAF1/CIP1, p27KIP1 and p53. *International Journal of Oncology* (21): 379–383, 2002
- [52] M.C. Perry, M. Demeule, A. Régina, R. Moumdjian. Curcumin inhibits tumor growth and angiogenesis in glioblastoma xenografts. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1192–1201, 2010.
- [53] S. Bengmark: Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFkappaB cyclooxygenase–2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* (30): 45–55, 2006
- [54] R. C. Srimal, B. N. Dhawan: Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a nonsteroidal antiinflammatory agent. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (25): 447–452, 1973
- [55] S. Bhattacharyya, D. Mandal, B. Saha, G. S. Sen, T. Das, G. Sa: Curcumin prevents tumor–induced T–cell apoptosis through Stat–5a–mediated Bcl–2 induction. *The Journal of Biological Chemistry* (282):15954–15964, 2007
- [56] P.A. Baeuerle: IκB–NF–κB structures: at the interface of inflammation control. *The Journal of Cell Biology* (95): 729–731, 1998
- [57] P.A. Baeuerle, T. Henkel: Function and activation of NF–κB in the immune system. *Annual Review of Immunology* (12):141–179, 1994
- [58] H.J. Dyson, E.A. Komives: Role of disorder in IκB–NFκB interaction. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (64): 499–505 (2012)
- [59] M. Karin, Y. Cao, F. R. Greten, Z. W. Li: NF–kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nature Reviews Cancer* (2): 301–310, 2002

- [60] C. W. Muller, F. A. Rey, M. Sodeoka, G. L. Verdine, S.C. Harrison: Structure of the NF- κ B p50 homodimer bound to DNA *Nature* volume 373, pages 311–317, 26 January, 1995
- [61] A.L. Kasinski, Y. Du, S. L. Thomas, J. Zhao, S.Y. Sun, F. R. Khuri, C.Y. Wang, M. Shoji, A. Sun, J.P. Snyder, D. Liotta, H. Fu: Inhibition of I κ B Kinase Nuclear Factor- κ B Signaling Pathway by 3,5-Bis(2-fluorobenzylidene)piperidin 4-one (EF24), a Novel Monoketone Analog of Curcumin. *Molecular Pharmacology* (74):654–661, 2008
- [62] M.S. Hayden, S. Ghosh: Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* (132): 344–362, 2008
- [63] I.M.Verma, J.K. Stevenson, E.M. Schwarz, D. Van Antwerp, S. Miyamoto: Rel/NF- κ B/I κ B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes & Development* (9): 2723–2735, 1995
- [64] D. Cilloni, G. Martinelli, F. Messa, M. Baccarani, G. Saglio: Nuclear factor κ B as a target for new drug development in myeloid malignancies. *The hematology journal* (92): 1224–1229, 2007
- [65] S. Ghosh, M. Karin: Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell* (109): 81–96 Singh. N., Anand, S. (1995a): Apoptosis in health and disease. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology* (39): 91–94, 2002
- [66] S. Singh, B.B. Aggarwal: Activation of transcription factor NF- κ B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane). *The Journal of Biological Chemistry* (270): 24995–25000, 1995
- [67] A. Siomek: NF- κ B signaling pathway and free radical impact. *Acta Biochimica Polonica* (59): 323–331, 2012
- [68] M. Alj Bentires, V. Barbu, M. Fillet, A. Chariot, B. Relic, N. Jacobs, J. Gielen, M.P. Merville, and V. Bours: NF- κ B transcription factor induces drug resistance through MDR1 expression in cancer cells. *Oncogene* (22): 90–97, 2003
- [69] G. Gasparini: Biological and clinical role of angiogenesis in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* (36):103–107, 1995
- [70] A.S. Strimpakos, R.A. Sharma: Curcumin: preventive and therapeutic properties in laboratory studies and clinical trials. *Antioxidants & Redox Signaling* (10): 511–545, 2008
- [71] D. Subramaniam, R. May, S.M. Sureban, K.B. Lee, R. George, P. Kuppusamy, R. P. Ramanujam, K. Hideg, B.K. Dieckgraefe, C.W. Houchen, S. Anant: Diphenyl difluoroketone: a curcumin derivative with potent in vivo anticancer activity. *Cancer Research* (68): 1962–1969, 2008
- [72] J.F.R. Kerr: Shrinkage Necrosis: a Distinct Mode of Cellular Death. *The Journal of Pathology* (105): 13–20, 1971
- [73] J.F.R. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* (26): 239–257, 1972
- [74] P. Anand, A.B. Kunnumakkara, R.A. Newman, B.B. Aggarwal: Bioavailability of curcumin: problems and promises. *Molecular Pharmaceutics* (4): 807–818, 2007

- [75] G. Shoba, D. Joy, T. Joseph, M. Majeed, R. Rajendran, P.S. Srinivas: Influence of piperine on the pharmacokinetics of curcumin in animals and human volunteers. *Planta Medica* (64): 353–356, 1998
- [76] V. Ravindranath, N. Chandrasekhara: Metabolism of curcumin: Studies with [3H] curcumin. *Toxicology* (22): 337–344, 1981
- [77] G.M. Holder, J.L. Plummer, A.J. Ryan: The metabolism and excretion of curcumin (1,7-bis-(4-hydroxy-3 methoxyphenyl)-1,6- heptadiene-3,5-dione) in the rat. *Xenobiotica* (8): 761–768, 1978
- [78] Y. Sugiyama, S. Kawakishi, T. Osawa: Involvement of the β -diketone moiety in the antioxidative mechanism of tetrahydrocurcumin. *Biochemical Pharmacology* (52): 519–525, 1996
- [79] C.W. Muller, F.A. Rey, M. Sodeoka, G.L. Verdine. Structure of the NF-kappa B p50 homodimer bound to DNA *Nature* 373: 311-317, 1995
- [80] P. Sebastien, E. Tabruyn, A.W. Griffioen. NF-KB: a new player in angiostatic therapy. *Angiogenesis* 11:101–106, 2008
- [81] D. Suresh, K. Srinivasan: Studies on the in vitro absorption of spice principles–curcumin, capsaicin and piperine in rat intestines. *Food and Chemical Toxicology* (45): 1437–1442, 2007
- [82] C. Gzell, M. Back, H. Wheeler, D. Bailey, M. Foote Radiotherapy in Glioblastoma: the Past, the Present and the Future. *Clinical Oncology xxx 1e11*, 2016
- [83] G.L. Locher, Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons. *Am J Roentgenol*; 36: 1-13, 1936
- [84] R. D. Rogus, Design and dosimetry of epithermal neutron beams for clinical trials of boron neutron capture therapy at MITR reactor. (Thesis). MIT, Massachusetts, 1994.
- [85] D.N. Statin, A history of Boron neutron capture therapy of brain tumors. *Brain*, 114:1609-1629, 1991
- [86] R.F. Barth, J.A. Coderre, M.G. Vicente, T.E. Blue: Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clin Cancer Res*, 11:3987–4002, 2005
- [87] J.A. Coderre, G.M. Morris, The radiation biology of boron neutron capture therapy. *Radiation Research*; 151: 1-10, 1999
- [88] L. Pellettieri, A. Rezaei, V. Giusti, K. Skold: An investigation of boron neutron capture therapy for recurrent glioblastoma multiforme. *Acta Neurol Scand*, 117:191–197, 2008
- [89] T. Yamamoto, A. Matsumura, K. Nakai, Y. Shibata, K. Endo, F. Sakurai, T. Kishi, H. Kumada, K. Yamamoto, Y. Torii: Current clinical results of the Tsukuba BNCT trial. *Appl Radiat Isot* 2004, 61:1089–1093.
- [90] T. Yamamoto, K. Nakai, T. Kageji, H. Kumada, K. Endo, M. Matsuda, Y. Shibata, A. Matsumura: Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma. *Radiother Oncol*, 91:80–84, 2009
- [91] C. Gzell, M. Back, H. Wheeler, D. Bailey, M. Foote Radiotherapy in Glioblastoma: the Past, the Present and the Future. *Clinical Oncology xxx 1e11*, 2016

- [92] K. Leena, S. Kauko, M. Antti, V. Petteri, T. Mikko, J. Heikki. Boron neutron capture therapy (BNCT) followed by intensity modulated chemoradiotherapy as primary treatment of large head and neck cancer with intracranial involvement. *Letters to the Editor / Radiotherapy and Oncology* 99 97–100, 2011
- [93] T. Aihara, J. Hiratsuka, N. Morita, M. Uno, Y. Sakurai, A. Maruhashi, K. Ono, T. Harada: First clinical case of boron neutron capture therapy for head and neck malignancies using ¹⁸F-BPA PET. *Head Neck*, 28:850–855, 2006
- [94] I. Kato, K. Ono, Y. Sakurai, M. Ohmae, A. Maruhashi, Y. Imahori, M. Kirihata, M. Nakazawa, Y. Yura: Effectiveness of BNCT for recurrent head and neck malignancies. *Appl Radiat Isot*, 61:1069–1073, 2004
- [95] L.W. Wang, S.J. Wang, P.Y. Chu, C.Y. Ho, S.H. Jiang, Y.W. Liu, H.M. Liu, J.J. Peir, F.I. Chou, S.H. Yen, Y.L. Lee, C.W. Chang, C.S. Liu, Y.W. Chen, K. Ono. BNCT for locally recurrent head and neck cancer: preliminary clinical experience from a phase I/II trial at Tsing Hua Open-Pool Reactor. *Appl Radiat Isot*. Dec;69(12):1803-6; 2011
- [96] L. Kankaanranta, T. Seppala, H. Koivunoro, K. Saarilahti, T. Atula, J. Collan, E. Salli, M. Kortensniemi, J. Uusi-Simola, J. Valimaki: Boron neutron capture therapy in the treatment of locally recurrent head-and-neck cancer: final analysis of a phase I/II trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 82:e67–e75, 2012
- [97] S. Altieri, R.F. Barth, S. Bortolussi, L. Roveda, A. Zonta: In 13th International Congress on Neutron Capture Therapy, A New Option Against Cancer. *Appl Radiat Isot*, 67:S1–S379, 2009
- [98] A. Kreiner: 14th International Congress on Neutron Capture Therapy. *Appl Radiat Isot*, 69:1631–1939, 2011
- [99] R. K. Kainthan, C. Mugabe, H.M. Burt, D. E. Brooks, Unimolecular micelles based on hydrophobically derivatized hyperbranched polyglycerols: ligand binding properties. *Biomacromolecules*, 9, 886-896, 2008
- [100] Y.C. Huang, A.T. Royappa, S. Tundel, K. Tsukamoto, V. Sharma, Biocompatibility of Polyglycidol with Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J. Appl. Polym. Sci.*, 111, 2275, 2009
- [101] E.V. Batrakova, A.V. Kabanov. Pluronic block copolymers: Evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. *Journal of Controlled Release* 130 98–106, 2008
- [102] D. Howes, R. Wilson, C. T. James, The Fate of Ingested Glyceran Esters of Condensed Castor Oil Fatty Acids [Polyglycerol Polyricinoleate (PGPR)] in the Rat. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 719-738, 1998
- [103] H. Turk, A. Shukla, P. C. A. Rodrigues, H. Rehage, R. Haag, Water-Soluble Dendritic Core–Shell-Type Architectures Based on Polyglycerol for Solubilization of Hydrophobic Drugs. *Chem. Eur. J*, 15, 4178-4196, . 2007
- [104] R.J. Amir, N. Pessah, M. Shamis, D. Shabat, Self-immolative dendrimers. *Angew. Chem. Int. Ed*, 42, 4494-4499, 2003

- [105] K. Haba, M. Popkov, M. Shamis, R.A. Lerner, C. F. Barbas III, D. Shabat, Single-triggered trimeric prodrugs. *Angew. Chem. Int. Ed*, 44, 716-720, 2005
- [106] I.F. Tannock, D. Rotin, Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. *Cancer Res*, 49, 4373-4384, 1989
- [107] R. B. Greenwald, C.D. Conover, Y.H. Choe, Effective drug delivery by PEGylated drug conjugates. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*, 17, 101-161. 2000
- [108] K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Del. Rev*, 47, 113-131. 2001
- [109] Y. Li, G.S. Kwon, Methotrexate esters of poly(ethylene oxide)-block-poly(2-hydroxyethyl-L-aspartamide). Part I: Effects of the level of methotrexate conjugation on the stability of micelles and on drug release. *Pharm. Res*, 17, 607-611. 2000
- [110] B. Rihova, K. Kubackova, Clinical Implications of N-(2-Hydroxypropyl) Methacrylamide Copolymers. *Curr. Pharm. Biotechnol*, 4, 311-322, 2003
- [111] S. Xu, Y. Luo, R. Haag, Water-Soluble pH-Responsive Dendritic Core-Shell Nanocarriers for Polar Dyes Based on Poly(ethylene imine). *Macromol. Biosci*, 7, 968-974. 2007
- [112] M. Calderón, M.A. Quadir, S.K. Sharma, R. Haag, Dendritic polyglycerols for biomedical applications. *Adv. Mater*, 22, 190-218. 2010
- [113] K. Hideghéty, W. Sauerwein, A. Wittig, Tissue uptake of BSH in patients with glioblastoma in the EORTC 11961 phase I BNCT trial. *J Neurooncol*; 62:145–56, 2003
- [114] D. Smith, S. Chandra, R. Barth, W. Yang, D. Joel, J. Coderre. Quantitative imaging and microlocalization of boron-10 in brain tumors and infiltrating tumor cells by SIMS ion microscopy: relevance to neutron capture therapy. *Cancer Res*; 61:8179–87, 2001
- [115] L.E. Farr, W.H. Sweet, J.S. Robertson. Neutron capture therapy with boron in the treatment of glioblastoma multiforme. *Am J Roentgenol*; 71:279–91, 1954
- [116] H.R. Godwin, L.E. Farr, W.H. Sweet, J.S. Robertson. Pathological study of eight patients with glioblastoma multiforme treated by neutron-capture therapy using boron 10. *Cancer* ;8:601–15, 1955
- [117] H.R. Snyder, A.J. Reedy, W.J. Lennarz. Synthesis of aromatic boronic acids, aldehyde boronic acids and a boronic acid analog of tyrosine. *J Am Chem Soc*;80:835–8, 1958
- [118] A.H. Soloway, H. Hatanaka, M.A. Davis. Penetration of brain and brain tumor. VII. Tumor-binding sulfhydryl boron compounds. *J Med Chem*;10:714, 1967
- [119] M.T. Cruz, A.L. Cardoso, L.P. Almeida, S. Simões, M.C. Lima. Tf-lipoplex-mediated NGF gene transfer to the CNS: neuronal protection and recovery in an excitotoxic model of brain injury. *Gene Ther*; 12:1242–52, 2005
- [120] M.T. Cruz, S. Simões, M.C. Lima. Improving lipoplex-mediated gene transfer into C6 glioma cells and primary neurons. *Exp Neurol*;187:65–75, 2004

- [121] K.S. Rao, M.K. Reddy, J.L. Horning, V. Labhasetwar. TAT-conjugated nanoparticles for the CNS delivery of anti-HIV drugs. *Biomaterials*; 29 : 4429 – 38, 2008
- [122] M. Pulkkinen, J. Pikkarainen, T. Wirth, T. Tarvainen, V. Haapa-aho, H. Korhonen. Three-step tumor targeting of paclitaxel using biotinylated PLA-PEG nanoparticles and avidin–biotin technology: formulation development and in vitro anticancer activity. *Eur J Pharm Biopharm*; 70:66–74, 2008
- [123] S.V. Vinogradov, E.V. Batrakova, A.V. Kabanov. Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjug Chem*; 15:50–6, 2004.
- [124] R.S. Dhanikula, A. Argaw, J.F. Bouchard, P. Hildgen. Methotrexate loaded polyether-copolyester dendrimers for the treatment of gliomas: enhanced efficacy and intratumoral transport capability. *Mol Pharm*; 5:105–16, 2008
- [125] S. Supattapone, H.O.B. Nguyen, F.E. Cohen, S.B. Prusiner, M.R. Scott. Elimination of prions by branched polyamines and implications for therapeutics. *Proc Natl Acad Sci USA*; 96: 14529–34, 1999
- [126] L. Xu, H. Zhang, Y. Wu. Dendrimer Advances for the Central Nervous System Delivery of Therapeutics. *ACS Chem. Neurosci*, 5, 2–13, 2014
- [127] N. T. Pourianazar, P. Mutlu, U. Gunduz. Bioapplications of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers in nanomedicine. *J Nanopart Res* 16:2342 2014
- [128] M.T. Morgan, Y. Nakanishi, D.J. Kroll, A.P. Griset, M.A. Carnahan, M. Wathier. Dendrimer-encapsulated camptothecins: increased solubility, cellular uptake, and cellular retention affords enhanced anticancer activity in vitro. *Cancer Res*; 66:11913, 2006
- [129] R.F. Schinazi, W.H. Prusoff, Synthesis of 5-(dihydroxyboryl)-2'-deoxyuridine and related boron-containing pyrimidines. *J. Org. Chem.* 50, 841-847, 1985
- [130] R.F. Barth; J.A. Coderre; M.H.G. Vicente, T.E. Blue. Boron neutron capture therapy of cancer: Current status and future prospects. *Clin. Cancer Res.* 11, 3987-4002. 2005
- [131] S.R. Marepally, M.L. Yao, G. W Kabalka. Boronated carbohydrate derivatives as potential boron neutron capture therapy reagents. *Future Med. Chem.* 5(6), 693–704. 2013
- [132] H. Staudinger: *Über Polymerisation*. Eingegangen am 13. März 1920.
- [133] D.A. Tomalia, J.M.J. Fréchet, Synthesis, characterization, and application of melamine-based dendrimers supported on silica gel. *J. Polym. Sci, Part A: Polym. Chem*, 40, 2719-2728, 2002
- [134] A.D. Jenkins, P. Kratochvil, R.F.T. Stepto, U.W. Suter, Glossary of Basic Terms in Polymer Science. *Pure & Appl. Chem*, 68, 2287-2311, . 1996
- [135] A. Archut, F. Vögtle, Functional cascade molecules. *Chem. Soc. Rev*, 27, 233-240, 1998
- [136] M. Fischer, F. Vögtle, Dendrimers: From Design to Application—A Progress Report. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1999, 38, 884-905; *Angew. Chem*, 111, 934-955, . 1999

- [137] A. W. Bosman, H. M. Janssen, E. W. Meijer, About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications. *Chem. Rev.*, 99, 1665-1688.. 1999
- [138] B. Helms, J. L. Mynar, C. J. Hawker, J. M. J. Fréchet, Dendronized Linear Polymers via "Click Chemistry" *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 15020-15021, 2004
- [139] C. Gao, D. Yan, Hyperbranched polymers: from synthesis to applications. *Prog. Polym. Sci.*, 29, 183-275, 2004
- [140] C. Gao, D. Yan, H. Frey. Promising Dendritic Materials: An Introduction to Hyperbranched Polymers. John Wiley & Sons, Inc.p1-26. 2011
- [141] R. Haag, F. Kratz, Polymer Therapeutics *Angew. Chem.*, 118, 1218-1237, 2006
- [142] H. Duncan, R. Ringsdorf, S. Fainaro. Polymer therapeutics--polymers as drugs, drug and protein conjugates and gene delivery systems: past, present and future opportunitie.*Journal of Drug Targeting*, July; 14(6): 337–341, 2006
- [143] R. Haag, Dendrimers and Hyperbranched Polymers as High-Loading Supports for Organic Synthesis. *Chem. Eur. J.*, 2, 327-335. 2001
- [144] D. Astruc, F. Chardac, Dendritic Catalysts and Dendrimers in Catalysis. *Chem. Rev.*, 101, 2991-3024, 2001
- [145] R. van Heerbeek, P. C. J. Kamer, P. W. N. M. van Leeuwen, J. N. H. Reek, Dendrimers as Support for Recoverable Catalysts and Reagents. *Chem.Rev*, 102,3717-3756, 2002
- [146] D. Wilms, S.E. Stiriba, H. Frey. Hyperbranched Polyglycerols: From the Controlled Synthesis of Biocompatible Polyether Polyols to Multipurpose Applications. *Accounts of Chemical Research*. Vol. 43, No. 1 January 129-141 2010
- [147] M. Malkoch, A. Carlmark, A. Woldegiorgis, A. Hult, E. E. Malmström, Rapid and Efficient Synthesis of Aliphatic Ester Dendrons and Dendrimers. *Macromolecules*, 37, 322-329, 2004
- [148] C.C. Lee, M. Yoshida, J.M.J. Fréchet, E.E. Dy, F.C. Szoka. In Vitro and in Vivo Evaluation of Hydrophilic Dendronized Linear Polymers. *Bioconjugate Chem.*, 16, 535-541. 2005
- [149] R. Al-Hellani, A. D. Schlüter. A Series of First- and Second-Generation Dendronized Polymers with Orthogonally Protected Amine Groups in the Periphery. *Macromolecules*, 39, 8943-8951, 2006
- [150] F. Moingeon, P. Masson, S. Méry, Preparation of Multiallylic Dendronized Polymers via Anionic Polymerization *Macromolecules*, 40, 55-64, 2007
- [151] U. Boas, J.B. Christensen, Heegaard, P.M.B. Dendrimers in medicine and Biotechnology. *New Molecular Tools. Dendrimers: Design, Synthesis and Chemical Properties Synthesis Approx 182p.* 2006
- [152] G.R. Newcome, Z.Q. Yao, G. R. Baker, V. K. Gupta, Cascade Molecules: A New Approach to Micelles.' A [27]-Arbor 01 *J. Org. Chem.*, 50, 2003-2004.1985
- [153] D.A. Tomalia, H. Baker, J. R. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S. Martin, J. Roeck, J. Ryder, P. Smith, A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules *Polymer Journal (Tokyo)*, 17, 117-132, 1985

- [154] M. Fischer, F. Vogtle, Dendrimers: From Design to Application-A Progress Report. *Angew. Chem.Int. Ed.*, 38, 884-905, 1999
- [155] J. M. J. Frechet . Dendrimers and supramolecular chemistry. *PNAS*. April 16, 4782–4787, vol. 99, no. 8, 2002
- [156] F. Morgenroth, E. Reuther, K. Müllen, Polyphenylene Dendrimers: From Three-Dimensional to Two-Dimensional Structures *Angew. Chem.* 1997, 109, 647-649; F. Morgenroth, E.Reuther, K. Müllen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 36, 631-634, 1997
- [157] P.D. Hamilton. D.Z. Jacobs, B. Rapp. N. Ravi. Surface Hydrophobic Modification of Fifth-Generation Hydroxyl-Terminated Poly(amidoamine) Dendrimers and Its Effect on Biocompatibility and Rheology. *Materials (Basel)*. Sep; 2(3): 883–902, 2009
- [158] S.E. Stiriba, H. Frey, R. Haag, Dendritic Polymers in Biomedical Applications: From Potential to Clinical Use in Diagnostics and Therapy *Angew. Chem.* 2002, 114, 1385-1390; S.-E.Stiriba, H. Frey, R.Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002, 41, 1329-1334.
- [159] U. Lunig, Dendrimere: Das Forschungsgebiet wächst und verzweigt sich *Nachr. Chem*, 48, 134-137,. 2000
- [160] C. Kojima, K. Kono, K. Maruyama, T. Takagishi, *Bioconjugate Chem.*, 11, 910-917, 2000
- [161] C.Z. Chen, N.C. Beck-Tan, P. Dhurjati, T.K. vanDyk, R.A. LaRossa, S.L. Cooper, Quaternary Ammonium Functionalized Poly(propylene imine) Dendrimers as Effective Antimicrobials: Structure-Activity Studies. *Biomacromolecules*, 1, 473-480, 2000
- [162] D. Holtel; A. Burgath and H. Frey. Degree of branching in hyperbranched polymers. *Acta Polymer.*, 48, 30-35, 1997
- [163] G. Pistolis, A. Malliaris, D. Tsiourvas, C. M. Paleos, Study of Poly(amidoamine) Starburst Dendrimers by Fluorescence Probing .*Chem. Eur. J.*, 15, 4397- 4403, 1999
- [164] C. Kojima, Y. Haba, T. Fukui, K. Kono, T. Takagishi, Design of Biocompatible Dendrimers with Environment Sensitivity. *Macromolecules*, 36, 2183-2186, 2003
- [165] S. Silva, M.A.P. Camillo, O.Z. Higa, R.Pugliesi E.G.R. Fernandes, A. A.A. Queiroz. Synthesis and biological evaluation of boronated polyglycerol dendrimers as potential agent for neutron capture therapy. International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2005 Santos, SP, Brazil, August 28 to September 2, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ENERGIA NUCLEAR - ABEN ISBN: 85-99141-01-5, 2003
- [166] G. Wu, R. F. Barth, W. Yang, M. Chatterjee, W. Tjarks, M. J. Ciesielski, R.A. Fenstermaker. Site-Specific Conjugation of Boron-Containing Dendrimers to Anti-EGF Receptor Monoclonal Antibody Cetuximab (IMC-C225) and Its Evaluation as a Potential Delivery Agent for Neutron Capture Therapy. *Bioconjugate Chem.*, 15, 185–194, 2004
- [167] M.W. Baars, R. Kleppinger, M.H.J. Koch, S.-L. Yeu, E. W. Meijer, *Angew. Chem.* 2000, 112,1341-1344; M. W. Baars, R. Kleppinger, M. H. J. Koch, S.-L.Yeu, E. W. Meijer, *Angew. Chem.Int. Ed.*, 39, 1285-1288, 2000

- [168] M.W.P.L. Baars, A.J. Karlsson, V. Sorokin, B.F.W. Waal ir. E. W. Meijer. Supramolecular Modification of the Periphery of Dendrimers Resulting in Rigidity and Functionality *Angewandte Chemie. Volume 112, Issue 23*, 2000
- [169] R. Haag. Supramolecular Drug-Delivery Systems Based on Polymeric Core-Shell Architectures. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 43, 278 –282, 2004
- [170] R. Haag, M. Kramer, J.F. Stumbe, S. Krause, A. Komp, S. Prokhorova, pH-Responsive Molecular Nanocarriers Based on Dendritic Core-Shell Architectures *Polym. Prepr. (Am.Chem. Soc. Div. Polym. Chem.)*, 43, 328. 2002
- [171] P. J. Flory, Principles of Polymer Chemistry, Cornell University Press, Ithaca, NJ, 1953.
- [172] P. Müller, C. Worner, R. Mülhaupt. 1,3-Oxazoline intermediates in reactive processing applications, 2a) Multiphase polymer blends via in-situ cationic melt phase polymerization of 2-phenyl-1,3-oxazoline. *Macromol. Chem. Phys.* 1%, 1929-1936 (1995)
- [173] C.J. Hawker, R. Lee, J. M. J. Fréchet, One-Step Synthesis of Hyperbranched Dendritic Polyesters. *J. Am. Chem. Soc.*, 113, 4583-4588. 1991
- [174] R. Hanselmann, D. Holter, H. Frey, Hyperbranched Polymers Prepared via the Core-Dilution/Slow Addition Technique: Computer Simulation of Molecular Weight Distribution and Degree of Branching. *Macromolecules*, 31, 3790-3801. 1998
- [175] D. Holter, A. Burgath, H. Frey, Degree of branching in hyperbranched polymers *Acta Polymer.*, 48, 30-35. 1997
- [176] G.R. Newkome, C.N. Moorefield, F. Vogtle, Dendritic Molecules: Concepts, Syntheses, Perspectives, 2nd ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2001.
- [177] E.J. Vandenberg, Polymerization of Glycidol and Its Derivatives: A New Rearrangement Polymerization. *J. Polym. Sci.*, 23, 915-949. 1985
- [178] R. Tokar, P. Kubisa, S. Penczek, A. Dworak, Cationic Polymerization of Glycidol: Coexistence of the Activated Monomer and Active Chain End Mechanism. *Macromolecules*, 27, 320-322. 1994
- [179] A. Dworak, W. Waiach, B. Trzebicka, Cationic polymerization of glycidol. Polymer structure and polymerization mechanism. *Macromol. Chem. Phys.*, 196, 1963-1970. 1995
- [180] S. Gupta, R. Tyagi, V. S. Parmar, S. K. Sharma, R. Haag. Polyether based amphiphiles for delivery of active components. *Polymer* 53, 3053-3078, 2012
- [181] A. Sunder, R. Hanselmann, H. Frey, R. Muelhaupt, Controlled Synthesis of Hyperbranched Polyglycerols by Ring-Opening Multibranching Polymerization *Macromolecules*, 32, 4240-4246. 1999
- [182] A. Sunder, R. Mülhaupt, R. Haag, H. Frey, Hyperbranched Polyether Polyols: A Modular Approach to Complex Polymer Architectures. *Adv. Mater.*, 12, 235-239. 2000
- [183] R. Haag, A. Sunder, J.-F. Stumbé, An Approach to Glycerol Dendrimers and Pseudo-Dendritic Polyglycerols. *J. Am. Chem. Soc.*, 122, 2954-2955. 2000

- [184] R. Haag, J.F. Stumbé, A. Sunder, H. Frey, A. Hebel, An Approach to Core-Shell-Type Architectures in Hyperbranched Polyglycerols by Selective Chemical Differentiation. *Macromolecules*, 33, 8158-8166, 2000
- [185] T. Ooya, J. Lee, K. Park, Dendritic polyglycerol: a new versatile biocompatible material. *J. Control. Release*, 93, 121-127, 2003
- [186] T. Ooya, J. Lee, K. Park, Hydrotropic Dendrimers of Generations 4 and 5: Synthesis, Characterization, and Hydrotropic Solubilization of Paclitaxel. *Bioconjugate Chem.*, 15, 1221-1229, 2004
- [187] R.K. Kainthan, E.B. Muliwan, S.G. Hatzikiriakos, D.E. Brooks, Biocompatibility Testing of Branched and Linear Polyglycidol. *Macromolecules*, 39, 7708-7717, 2006
- [188] D. Wilms, F. Wurm, J. Nieberle, P. Böhm, U. Kemmer-Jonas, H. Frey, Double-Hydrophilic Linear-Hyperbranched Block Copolymers Based on Poly(ethylene oxide) and Poly(glycerol). *Macromolecules*, 42, 3230-3236, 2009
- [189] H. Frey, R. Haag, Dendritic polyglycerol: a new versatile biocompatible material. *J. Biotechnol.*, 90, 257, 2002
- [190] R.K. Kainthan, J. Janzen, E. Levin, D.V. Devine, D.E. Brooks, Biocompatibility Testing of Branched and Linear Polyglycidol. *Biomacromolecules*, 7, 703, 2006
- [191] R.K. Kainthan, D.E. Brooks, In vivo biological evaluation of high molecular weight hyperbranched polyglycerols. *Biomaterials*, 28, 4779, 2007
- [192] I.N. Kurniasih, H. Liang, S. Kumar, A. Mohr, Sunil K. Sharma, Jurgen P. Rabe, R. Haag. A bifunctional nanocarrier based on amphiphilic hyperbranched polyglycerol derivatives. *J. Mater. Chem. B*, 1, 3569, 2013
- [193] M.R. Dreher; W. Liu; C.R. Micheli; M.W. Dewhirst; Y. Fan, A. Chilkoti, Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 335-344. (2006)
- [194] J.A. Coderre, J.C. Turcotte, K.J. Riley, P.J. Binns, O.K. Harling, W.S. Kiger: Boron neutron capture therapy: cellular targeting of high linear energy transfer radiation. *Technol Cancer Res Treat*, 2:355-375, 2003
- [195] W.S. Kiger, X.Q. Lu, O.K. Harling, K.J. Riley, P.J. Binns, J. Kaplan, H. Patel, R.G. Zamenhof, Y. Shibata, I.D. Kaplan: Preliminary treatment planning and dosimetry for a clinical trial of neutron capture therapy using a fission converter epithermal neutron beam. *Appl Radiat Isot*, 61:1075-1081, 2004
- [195] J.R. Albritton: Computational aspects of treatment planning for neutron capture therapy. PhD thesis. Massachusetts Institute of Technology: Nuclear Science and Engineering; 2009.
- [196] Massachusetts Institute of Technology - Nuclear Reactor Laboratory. Disponível em: <http://nrl.mit.edu/research/reactor-physics> . Acessado em 02/02/2017.
- [197] K.J. Riley, P.J. Binns, D.D. Greenberg, O.K. Harling: A physical dosimetry intercomparison for BNCT. *Med Phys*, 29:898-904, 2002

- [198] Y. Imahori, S. Ueda, Y. Ohmori, T. Kusuki, K. Ono, R. Fujii, T. Ido: Fluorine-18-labeled fluoro-boronophenylalanine PET in patients with glioma. *J Nucl Med*, 39:325–333, 1998
- [199] K.J. Riley, P.J. Binns, O.K. Harling, J.R. Albritton, W.S. Kiger, A. Rezaei, K. Skold, T. Seppala, S. Savolainen, I. Auterinen: An international dosimetry exchange for BNCT part II: Computational dosimetry normalizations. *Med Phys*, 35:5419–5425, 2008
- [200] R.F. Barth, M. Graca, H. Vicente, O. K. Harling, W. S. Kiger, K. J. Riley, P. J. Binns, F. M. Wagner, M. Suzuki, T. Aihara, I. Kato, S. Kawabata, *Radiation Oncology*, 7:146 2012
- [201] J.R. Albritton, W.S. Kiger: Development of reference problems for neutron capture therapy treatment planning systems. In *Advances in Neutron Capture Therapy 2006*. Edited by Nakagawa Y, Kobayashi T, Fukuda H. Takamatsu, Japan: International Society for Neutron Capture Therapy; 496–499, 2006
- [202] D.N. Slatkin: A history of boron neutron capture therapy of brain tumours. Postulation of a brain radiation dose tolerance limit. *Brain*, 114:1609–1629 1991
- [203] O.K. Harling: Fission reactor based epithermal neutron irradiation facilities for routine clinical application in BNCT–Hatanaka memorial lecture. *Appl Radiat Isot*, 67:S7–S11, 2009
- [204] O.K. Harling, K.J. Riley: Fission reactor neutron sources for neutron capture therapy - a critical review. *J Neurooncol*, 62:7–17, 2003
- [205] Y. Zhou, Z. Gao, Y. Li, C. Guo, X. Liu: Design and construction of the inhospital neutron irradiator-1(HNI). In *Proceed of 12th ICNCT - Advances in Neutron Capture Therapy 2006*; October 9–13; Takamatsu, Japan. Edited by Nakagawa Y, Kobayashi T, Fukuda H:557–560: 2006
- [206] K.J. Riley, P.J. Binns, O.K. Harling: Performance characteristics of the MIT fission converter based epithermal neutron beam. *Phys Med Biol*, 48:943–958, 2003
- [207] IPEN-Instituto de Pesquisa Energética Nucleares. Centro de Reator de Pesquisa. Disponível em: https://www.ipen.br/portal_por/portal/interna.php?secao_id=729&campo=831. Acessado em:02/02/2017.
- [208] R. Muniz. Desenvolvimento de um Simulador Antropomórfico para Simulação e Medida de Dose e Fluxo de Nêutrons na Instalação de Estudos em BNCT (Mestrado), São Paulo, SP/Brasil, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN-CENEN-2010
- [209] D.W. Nigg: Neutron sources and applications in radiotherapy- A brief history and current trends. In *Advances in Neutron Capture Therapy 2006 - Proc 12th Intl Cong Neutron Capture Therapy*; Oct 9–13. Edited by Nakagawa Y, Kobayashi T, Fukuda H. Takamatsu, Japan; 2006.
- [210] H. Tanaka, Y. Sakurai, M. Suzuki, S. Masunaga, T. Mitsumoto, K. Fujita, G. Kashino, Y. Kinashi, Y. Liu, M. Takada, Experimental verification of beam characteristics for cyclotron-based epithermal neutron source (C-BENS). *Appl Radiat Isot*, 69:1642–1645, 2011

- [211] M. Dahlstrom, J. Capala, P. Lindström, A. Wassetson, A. Lindström. Accumulation of boron in human malignant glioma cells in vitro is cell type dependent. *J Neurooncol*; 68:199–205, 2004
- [212] K. Hideghéty, W. Sauerwein, A. Wittig. Tissue uptake of BSH in patients with glioblastoma in the EORTC 11961 phase I BNCT trial. *J Neurooncol*; 62:145–56, 2003
- [213] D. Smith, S. Chandra, R. Barth, W. Yang, D. Joel, J. Coderre. Quantitative imaging and microlocalization of boron-10 in brain tumors and infiltrating tumor cells by SIMS ion microscopy: relevance to neutron capture therapy. *Cancer Res*; 61:8179–87, 2001
- [214] M.V. Backer, T.I. Gaynutdinov, V. Patel, A.K. Bandyopadhyaya, B.T. Thirumamagal, W. Tjarks, R.F. Barth, Claffey, K. J.M. Backer: Vascular endothelial growth factor selectively targets boronated dendrimers to tumor vasculature. *Mol Cancer Ther*, 4:1423–1429, 2005
- [215] W. Yang, R.F. Barth, G. Wu, S. Kawabata, T.J. Sferra, A.K. Bandyopadhyaya, W. Tjarks, A.W. Ferketich, M.L. Moeschberger, P.J. Binns, Molecular targeting and treatment of EGFRvIII-positive gliomas using boronated monoclonal antibody L8A4. *Clin Cancer Res*, 12:3792–3802, 2006
- [216] W. Yang, R.F. Barth, G. Wu, T. Huo, W. Tjarks, M. Ciesielski, R.A. Fenstermaker, B.D. Ross, C.J. Wikstrand, K.J. Riley, P.J. Binns: Convection enhanced delivery of boronated EGF as a molecular targeting agent for neutron capture therapy of brain tumors. *J Neurooncol*, 95:355–365, 2009
- [217] W. Yang, R.F. Barth, G. Wu, W. Tjarks, P. Binns, K. Riley: Boron neutron capture therapy of EGFR or EGFRvIII positive gliomas using either boronated monoclonal antibodies or epidermal growth factor as molecular targeting agents. *Appl Radiat Isot*, 67:S328–S331, 2009
- [218] G.A. Santa Cruz, R.G. Zamenhof. The microdosimetry of the ^{10}B reaction in boron neutron capture therapy. A new generalized theory. *Radiat Res*; 162:702–10, 2004
- [219] G.W. Kabalka, T.L. Nichols, G.T. Smith, L.F. Miller, M.K. Khan, P.M. Busse. The use of positron emission tomography to develop boron neutron capture therapy treatment plans for metastatic malignant melanoma. *J Neurooncol*; 62:187–95, 2003
- [220] A.Z. Diaz. Assessment of the results from the phase I/II boron neutron capture therapy trials at the Brookhaven National Laboratory from a clinician's point of view. *J Neurooncol*, 62, 101–9, 2003
- [221] L.W. Wang, S.J. Wang, P.Y. Chu, C.Y. Ho, S.H. Jiang, Y.W. Liu, Y.H. Liu, H.M. Liu, J.J. Peir, F.I. Chou: BNCT for locally recurrent head and neck cancer: preliminary clinical experience from a phase I/II trial at Tsing Hua open-pool reactor. *Appl Radiat Isot*, 69, 1803–1806, 2011
- [222] K. Skold, B.H. Stenstam, A.Z. Diaz, V. Giusti, L. Pellettieri, J.W. Hopewell: Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: advantage of prolonged infusion of BPA-f. *Acta Neurol Scand*, 122, 58–62, 2010
- [223] K. Skold, T. Gorlia, L. Pellettieri, V. Giusti, J.W. Hopewell: Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma multiforme: an assessment of clinical potential. *Br J Radiol*, 83, 596–603, 2010

- [224] B.H. Stenstam, L. Pellettieri, W. Sorteberg, A. Rezaei, K. Skold: BNCT for recurrent intracranial meningeal tumours - case reports. *Acta Neurol Scand*, 115, 243–247, 2007
- [225] L. Pellettieri, A. Rezaei, V. Giusti, K. Skold: An investigation of boron neutron capture therapy for recurrent glioblastoma multiforme. *Acta Neurol Scand*, 117, 191–197, 2008
- [226] M.A. Rosenthal, B. Kavar, J.S. Hill. Phase I and pharmacokinetic study of photodynamic therapy for high-grade gliomas using a novel boronated porphyrin. *J Clin Oncol*, 19, 519–24, 2001
- [227] J.R. Perry, L.M. DeAngelis, S.C. Schold, Challenges in the design and conduct of phase III brain tumor therapy trials. *Neurology*, 49:912–17, 1997
- [228] M. Chadha, J. Capala, J.A. Coderre, E.H. Elowitz, J. Iwai, D.D. Joel, H.B. Liu, L. Wielopolski, A.D. Chanana: Boron neutron-capture therapy (BNCT) for glioblastoma multiforme (GBM) using the epithermal neutron beam at the Brookhaven National Laboratory. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 40:829–834, 1998
- [229] P.M. Busse, O.K. Harling, M.R. Palmer, W.S. Kiger, J. Kaplan, I. Kaplan, C.F. Chuang, J.T. Goorley, K. J. Riley, T.H. Newton: A critical examination of the results from the Harvard-MIT NCT program phase I clinical trial of neutron capture therapy for intracranial disease. *J Neurooncol*, 62:111–121, 2003
- [230] M.J. Vos, B. Turowski, F.E. Zanella, P. Paquis, A. Siefert, K. Hideghety, K. Haselsberger, F. Grochulla, T.J. Postma, A. Wittig, Radiologic findings in patients treated with boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme within EORTC trial 11961. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 61:392–399, 2005
- [231] L. Kankaanranta, T. Seppälä, H. Koivunoro, P. Valimäki, A. Beule, J. Collan, M. Kortelainen, J. Uusi-Simola, P. Kotiluoto, I. Auterinen: L-boronophenylalanine mediated boron neutron capture therapy for malignant glioma progressing after external beam radiation therapy: a Phase I study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 80:369–376, 2011
- [232] L. Pellettieri, A. Rezaei, V. Giusti, K. Skold: An investigation of boron neutron capture therapy for recurrent glioblastoma multiforme. *Acta Neurol Scand*, 117:191–197, 2008
- [233] T. Yamamoto, A. Matsumura, K. Nakai, Y. Shibata, K. Endo, F. Sakurai, T. Kishi, H. Kumada, K. Yamamoto, Y. Torii: Current clinical results of the Tsukuba BNCT trial. *Appl Radiat Isot*, 61:1089–1093, 2004
- [234] T. Yamamoto, K. Nakai, T. Kageji, H. Kumada, K. Endo, M. Matsuda, Y. Shibata, A. Matsumura: Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma. *Radiother Oncol*, 91:80–84, 2009
- [235] T. Kageji, S. Nagahiro, K. Matsuzaki, Y. Mizobuchi, H. Toi, Y. Nakagawa, H. Kumada: Boron neutron capture therapy using mixed epithermal and thermal neutron beams in patients with malignant glioma-correlation between radiation dose and radiation injury and clinical outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 65:1446–1455, 2006

- [236] T. Kageji, Y. Mizobuchi, S. Nagahiro, Y. Nakagawa, H. Kumada: Clinical results of boron neutron capture therapy (BNCT) for glioblastoma. *Appl Radiat Isot*, 69:1823–1825, 2011
- [237] T. Kageji, Y. Mizobuchi, S. Nagahiro, Y. Nakagawa, H. Kumada: Long-survivors of glioblastoma treated with boron neutron capture therapy (BNCT). *Appl Radiat Isot*, 69:1800–1802, 2011
- [238] S. Miyatake, S. Kawabata, Y. Kajimoto, A. Aoki, K. Yokoyama, M. Yamada, T. Kuroiwa, M. Tsuji, Y. Imahori, M. Kirihata, Modified boron neutron capture therapy for malignant gliomas performed using epithermal neutron and two boron compounds with different accumulation mechanisms: an efficacy study based on findings on neuroimages. *J Neurosurg*, 103:1000–1009, 2005
- [239] S. Kawabata, S. Miyatake, T. Kuroiwa, K. Yokoyama, A. Doi, K. Iida, S. Miyata, N. Nonoguchi, H. Michiue, M. Takahashi, Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma. *J Radiat Res (Tokyo)*, 50:51–60, 2009
- [240] Universidade do Estado de São Paulo (USP). Instituto de Química de São Carlos (IQSC). Disponível em: <http://caqi.iqsc.usp.br/tecnicas-espectroscopicas/espectrometro-de-rmn-500-mhz/>. Acessado em 12/06/2018
- [241] F. Bloch, Nuclear Induction, *Phys Rev* 70, 460-47, 92, 1946
- [242] G. A. Morris, R. Freeman. Enhancement of Nuclear Magnetic Resonance Signals by Polarization Transfer, *J Am Chem Soc* 101, 760-762, 1979
- [243] R. M. Silverstein and G. C. Bassler, 1 *Chem. Educ.* 39,546, 1962
- [244] Estudo de Sistemas Supramoleculares para Nanocompartimentação de Agentes Neurolépticos. Disponível em: https://repositorio.unifei.edu.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/579/tese_silva1_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acessado em 02/12/2017
- [245] B. Smith. *Fundamentals of Fourier Transform Infrared Spectroscopy*. CRC Press 2011
- [246] E. Hecht. *Optik*. Addison-Wesley, 1989
- [247] S. Vyazovkina A. K Burnhamb. J. M. Criadoc L. A Pérez-Maquedac. Popescud C., Sbirrazzuoli N. ICTAC Kinetics Committee recommendations for performing kinetic computations on thermal analysis data. *Thermochimica Acta* 520 1–19, 2011
- [248] S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi. *Protein Eng.*, 12, 439-446, 1999
- [249] HyperChem Program Release 7.51 for Windows; Hybercube, Inc.: Gainesville, FL, 2005
- [250] M. J. S. Dewar, E. G. Zoebisch, E. F. Healy, J. J. P. Stewart, *J. Am. Chem. SOC.*, Vol. 107, No. 13, 3903-3909, 1985
- [251] O. Trott, A. J. Olson, AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading, *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455-461, 2010

- [252] G.M. Morris, R. Huey, W. Lindstroml. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30 (16), 2785-2791, 2009
- [253] R. Wang, L. Lai, S. Wang, Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 16, 11–26, 2002
- [254] J. Nocedal, S.J. Wright. Numerical optimization. *Berlin: Springer Series in Operations Research*, Springer Verlag; 1999
- [255] M. Wyszogrodzka, R. Haag, A Convergent Approach to Biocompatible Polyglycerol “Click” Dendrons for the Synthesis of Modular Core–Shell Architectures and Their Transport Behavior. *Chemistry*, 14, 9202-9214, 2008
- [256] H. Frey, R.J. Haag, Dendrimeric micelles for controlled drug release and targeted delivery. *J. Biotechnol.*, 90, 257-267, 2002
- [257] M. Calderon, M.A. Quadir, S.K. Sharma, R. Haag, Dendritic Polyglycerols for Biomedical Applications. *Adv. Mater.*, 22, 190–218, 2010
- [258] J. Dervede, A.Rausch, M. Weinhart, S. Enders, R. Tauber , K. Licha , M. Schirner, U. Zügel, A. von Bonin, R. Haag, Dendritic polyglycerol sulfates as multivalent inhibitors of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 19679–19684, 2010
- [259] A.L. Sisson, D. Steinhilber, T. Rossow, P. Welker, K. Licha, R. Haag, Biocompatible Functionalized Polyglycerol Microgels with Cell Penetrating Properties. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48, 7540-7545, 2009
- [260] O.Z. Higa, H.A.M. Faria, A.A.A. de Queiroz, Fabrication of electrospun HPGL scaffolds via glycidyl methacrylate cross-linker: Morphology, mechanical and biological properties. *Rad. Phys. Chem.* 98, 118–123, 2014
- [261] F. Paulus, R. Schulze, D. Steinhilber, M. Zieringer, I. Steinke, P. Welker, K. Licha, S. Wedepohl, J. Dervede, R. Haag, The Effect of Polyglycerol Sulfate Branching On Inflammatory Processes. *Macromol. Biosci.*, 14, 643–654, 2014
- [262] E.G.R. Fernandes, A.A.A. de Queiroz, G.A. Abraham, J. San Roman, Antithrombogenic properties of bioconjugate streptokinase-polyglycerol dendrimers. *J. Mat. Sci.: Mater. Med.* 17, 105-111, 2006
- [263] H. Frey, R. Haag, Dendritic polyglycerol: a new versatile biocompatible material. *Rev. Mol. Biotechnol.* 90, 257–67, 2002
- [264] R.K. Kainthan, J. Janzen, E. Levin, D.V. Devine, D.E. Brooks, Biocompatibility Testing of Branched and Linear Polyglycidol. *Biomacromol.*, 703–709, 2006
- [265] S. K. Yang, S.C. Zimmerman, Water-Soluble Polyglycerol Dendrimers with Two Orthogonally Reactive Core Functional Groups for One-Pot Functionalization. *Macromolecules*, 48, 2504–2508, 2015
- [266] E. Bigaeva, F.-H. Paradis, A. Moquin, B.F. Hales, D. Maysinger, Assessment of the developmental toxicity of nanoparticles in an ex vivo 3D model, the murine limb bud culture system. *Nanotoxicology*, 9, 780–791, 2015

- [267] Y. Han, Y. Qian, X. Zhou, H. Hu, X. Liu, Z. Zhou, J. Tang, Y. Shen, Facile synthesis of zwitterionic polyglycerol dendrimers with a β cyclodextrin core as MRI contrast agent carriers. *Polym. Chem.* 7, 6354-6362, 2016
- [268] X. Zhou, Q. Zheng, C. Wang, J. Xu, J-P Wu, T.B. Kirk, D. Ma, W. Xue, Star-Shaped Amphiphilic Hyperbranched Polyglycerol Conjugated with Dendritic Poly(Llysine) for the Codelivery of Docetaxel and MMP-9 siRNA in Cancer Therapy. - *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8, 12609–12619, 2016
- [269] T. Ooya, J. Lee, K. Park, Hydrotropic Dendrimers of Generations 4 and 5: Synthesis, Characterization, and Hydrotropic Solubilization of Paclitaxel. *Bioconjug. Chem.* 15, 1221–1229, 2004
- [270] A. Sousa-Herves, P. Wurfel, N. Wegner, J. Khandare, K. Licha, R. Haag, P. Welker, M. Calderon, Dendritic polyglycerol sulfate as a novel platform for paclitaxel delivery: pitfalls of ester linkage. *Nanoscale*, 7, 3923–3932, 2015
- [271] N. A. Kratochwil, W. Huber, F. Muller, M. Kansy, P. R. Gerber Predicting plasma protein binding of drugs: a new approach *Biochemical Pharmacology*, 64 (9), 1355-1374, 2002
- [272] X. M. He, D. C. Carter. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 358, 209-215, 1992
- [273] F. Yang, Y. Zhang, H. Liang. Interactive Association of Drugs Binding to Human Serum Albumin. *Int. J. Mol. Sci.*, 15, 3580-3595, 2014
- [274] R. Matsuda, J. Anguizola, K.S. Joseph, D.S. Hage, Analysis of drug interactions with modified proteins by high-performance affinity chromatography: Binding of glibenclamide to normal and glycated human serum albumin. *Journal Chromatography A*, 1265, 114-122, 2012
- [275] ISO - International Organization for Standardization: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods. ISO 10993-5, 1992.
- [276] G. Malich, B. Markovic, C. Winder. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, 124, 179–192, 1997
- [277] M.F.G. Klingbeil, M.R. Herson, E.B. Cristo, D.S. Pinto Jr, D. Yoshito, M.B. Mathor. Comparasion of two cellular harvesting methods for primary human oral culture of keratinocytes. *Cell Tissue Bank.*;10(3):197-204 2009.
- [278] M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *BIOTECHNOLOGY ANNUAL REVIEW ELSEVIER B.V. VOLUME 11*, 127-152, 2005
- [279] S. Ferber, G. Tiram, A. Sousa-Herves, A. Eldar-Boock, A. Krivitsky, A. Scomparin, E. Yeini, P. Ofek, D. Ben-Shushan, L. I. Vossen, K. Licha, R. Grossman, Z. Ram, J. Henkin, E. Ruppin, N. Auslander, R. Haag, M. Calderón, R. Satchi-Fainaro. Co-targeting the tumor endothelium and P-selectin-expressing glioblastoma cells leads to a remarkable therapeutic outcome. *Cancer Biology*. ;6:e25281, eLife 1-34 p. 2017

- [280] A. W. Coleman, M.J. Maguire, J. R. Coleman. Mithramycin- and 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)-DNA Staining for Fluorescence Microspectrophotometric Measurement of DNA in Nuclei, Plastids, and Virus Particles. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Vol. 29, No. 8, pp. 959-968, 1981
- [281] J. Kapuscinski, W. Szer. Interactions of 4', 6-diamidine-2-phenylindole with synthetic polynucleotides. Volume 6, Number 11, *Nucleic Acids Research*, 1979
- [282] W.C. Russell, C. Newman, D.H. Williamson. A simple cytochemical technique for demonstration of DNA in cells infected with mycoplasmas and viruses. *Nature*. Feb 6;253(5491):461-2, 1975
- [283] Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB). Disponível em: www.rcsb.org/structure/2COE. Acessado em: 07/02/2019.
- [284] Alfredo A. Molinolo, Christina Marsh, Mohamed ElDinali, Nitin Gangane, Kaitlin Jennison, Stephen Hewitt, Vyomesh Patel, Tanguy Y. Seiwert and J. Silvio Gutkind. mTOR as a Molecular Target in HPV-Associated Oral and Cervical Squamous Carcinomas. *Clin Cancer Res*; 18(9) May 1, 2012
- [285] J. Dudas, A. Fullar, A. Romania, C. Pritza, I. Kovalszkyb, V. H. Schartingera, G. M. Sprinzla, H. Riechelmann. Curcumin targets fibroblast-tumor cell interactions in oral squamous cell carcinoma. *Experimental Cell Research*, 319, 800–809, 2013
- [286] B. B. Aggarwal, K. B. Harikumar. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular, pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 40–59, 2009
- [287] R. Rashmi¹, T.R. Santhosh Kumar¹, D. Karunakaran. Human colon cancer cells differ in their sensitivity to curcumin-induced apoptosis and heat shock protects them by inhibiting the release of apoptosis-inducing factor and caspases. *FEBS Letters* 538, 19-24, 2003
- [288] B. Zebib, Z. Mouloungui, V. Noiro. Stabilization of Curcumin by Complexation with Divalent Cations in Glycerol/Water System. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. Volume, Article ID 292760, 8 pages, 2010.
- [289] Z. Chen, Y. Xia, S. Liao, Y. Huang, Y. Li, Y. He, Z. Tong, B. Li. Thermal Degradation Kinetics Study of Curcumin With Nonlinear Methods. *Food Chemistry*, 155, 81-86, 2014.