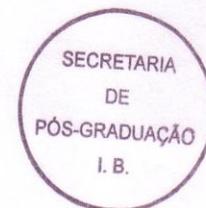


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



Marcélo Bispo de Jesus

**"UTILIZAÇÃO DE FERRAMENTAS NANOTECNOLÓGICAS PARA A INDUÇÃO
DE MORTE EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA"**

Este exemplar corresponde
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
MARCELO BISPO DE JESUS
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Eneida de Paula

Co-Orientadora: Dra. Carmen Veríssima Ferreira

Campinas

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

J499u	<p>Jesus, Marcelo Bispo de Utilização de ferramentas nanotecnológicas para a indução de morte em células de câncer de próstata / Marcelo Bispo de Jesus. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.</p> <p>Orientadores: Eneida de Paula, Carmen Veríssima Ferreira. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Próstata - Câncer. 2. Riboflavina. 3. Ciclodextrinas. 4. Nanopartículas lipídicas sólidas. 5. Técnicas de transferência de genes. I. Paula, Eneida de. II. Ferreira, Carmen Veríssima. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(scs/ib)</p>
--------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Título em inglês: Development of nanotechnology tools designed to induce death in prostate cancer cells.

Palavras-chave em inglês: Prostate – Cancer; Riboflavin; Cyclodextrins; Solid lipids nanoparticles; Gene transfer techniques.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Eneida de Paula, Pietro Ciancaglini, Nelson Duran Cabalero, Francisco Benedito Teixeira Pessine, Sergio Antonio Fernandes.

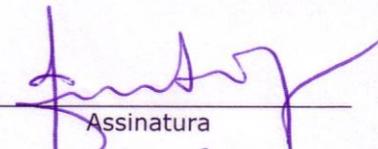
Data da defesa: 12/02/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

Campinas, 12 de Fevereiro de 2009

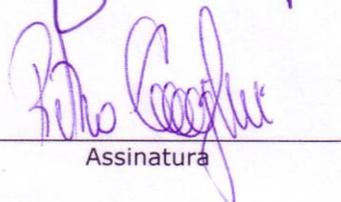
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Eneida de Paula (Orientadora)



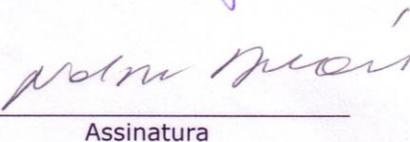
Assinatura

Prof. Dr. Pietro Ciancaglini



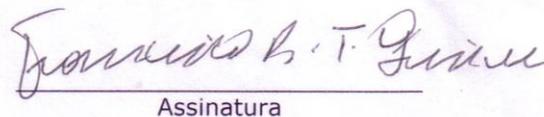
Assinatura

Prof. Dr. Nelson Eduardo Duran Caballero



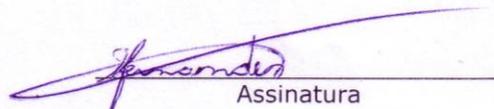
Assinatura

Prof. Dr. Francisco Bedito Teixeira Pessine



Assinatura

Prof. Dr. Sergio Antonio Fernandes



Assinatura

Prof. Dr. Alexandre Donizeti Martins Cavagis

Assinatura

Prof. Dr. Cláudio Chrysostomo Werneck

Assinatura

Profa. Dra. Daniele Ribeiro de Araújo

Assinatura

Agradecimentos

Ao Biomembranas de ontem: Luca, Nilce, Pô, Nonô, Ju, Morango, Hayda, Sô, Leo, Du, Japipa, Carlos, Dani Viu, Dna Cida, Josi, Beth, Ana Cláudia; aos de hoje: Cleyton, Carol, Maribel, Cíntia, Giovana, Marcião, Monica, Roberta; à nova geração: o fiel escudeiro Allan, Angélica, Bruna, “Vinícius”, Thaís, Camilla, Sheila, agregados: Baldasso, Ju Matoso. Pelas festinhas, bate-papos, e por fazerem um laboratório tão animado e agradável de trabalhar.

Ao Transdução de Sinal: Willian, Rodrigo, Paula, Antonio, Claudia, Deisy, Profa. Ana. Às técnicas Denise e Claudia pela extrema competência na árdua missão de administrar o lab. A todos pela animação, agradável companhia e pelas “células” e tudo mais que precisei, pois sempre se dispuseram a me fornecer prontamente.

Ao pessoal do laboratório do Prof. Nelson Duran da Química que me ajuda desde os tempos da iniciação, ao Chico por ter me suportado esse tempo todo, à Zaine pelas ajudas com o Zeta e, principalmente, à Priscyla que além do bom humor, paciência, me ajudou demais sempre que eu precisei.

Aos Amigos da infância Cristiano e Ju; de adolescência, Fausto, Binho, Má, Rudi, Ju, e aos da vida adulta, Luciano, Léo, Santoro, Willian, Java. E ainda Bruno M., Bread, Alessandro, Cacá, Bitá & Mary, Zapa, André & Luli, André & Anamaria, Renato & Michele. Pois, eles sempre estiveram presentes nos momentos em que eu precisei, é muito bom saber que posso contar com vocês.

Aos técnicos da Bioquímica que eu tive o prazer de trabalhar, sempre prestativos, alegres e competentes: Paulinho, Kiko, Ju Matoso e Erika.

Ao meu pai que sempre lutou pela minha educação, em todos os seus sentidos, e sempre esteve sossegado, essa sua tranquilidade frente às situações mais complexas me ajudou muito a viver a vida fora de casa, obrigado pai, você estará comigo onde quer que eu esteja.

À minha Mãe pelo seu amor incondicional, que me fortaleceu e fez com que eu sempre soubesse que alguém está do meu lado. Pela sua força incrível que serve de exemplo em todos os momentos da minha vida, qualquer dia você me conta o segredo.

À minha irmã pelo amor para com o seu irmão e pela amizade em todos os momentos.

Ao meu Avô pelo exemplo de fibra e vontade de viver, à minha Avó que tem certeza que eu sou seu filho e então me ama como tal, vocês são muito importantes pra mim.

É sempre importante agradecer àquelas pessoas que estão nos bastidores, mas que nem por isso tem a sua importância diminuída: Pascoal & Ana, pelo empurrão inicial, ao Seu Hélio & Dna. Sônia, por sempre terem dispensado uma atenção especial à minha pessoa, se preocupando e ajudando.

Ao apoio financeiro da FAPESP sem o qual o projeto não teria sido viabilizado.

Às prestativas, bem humoradas, eficientes e psicólogas secretárias Marina e Andréia.

Ao Wyllyerson e aos Profs. David e Omar do Instituto de Física por possibilitar as medidas de Microscopia de Força Atômica.

Ao Prof. Leonardo Fernandes Fraceto pelo exemplo de humildade e competência que faz dele mais que um amigo, mas uma pessoa ser tomada como exemplo, valeu por tudo Fii, você é o exemplo vivo de que não se precisa utilizar-se de atalhos ou artimanhas para conquistar o seu espaço e lutar pelos seus sonhos.

À Profa. Luciana por ter dispensado tanto tempo e dedicação na minha primeira orientação, mostrando como se faz ciência e sendo um exemplo de seriedade e profissionalismo.

Ao Prof. Dick Hoekstra e à Dra. Inge Zuhorn pela possibilidade e supervisão em meu estágio de três meses na Universidade de Medicina de *University Medical Center Groningen*. Aos amigos adquiridos no estrangeiro: Riuichi, Kaushal, Maria, Ana, Monica, Tommy, Magda, Mateusz, Carolina, Ana pelas e em especial à Karla & Arjan, pela atenção especial e companhia nas horas livres, fazendo a vida mais fácil longe de casa.

Aos Profs. da minha banca de qualificação: Profa. Monica, Prof. Pessine e Prof. Cláudio pelas valiosas contribuições ao trabalho e pelas dicas na aula e a Profa. Daniele pela revisão do trabalho.

À Profa. Carmen, pois poucas pessoas fazem seu trabalho com tanta alegria, vontade, inteligência e tudo isso sem perder a elegância. Com certeza tenho muito que aprender com você ainda. Não posso deixar de agradecer pelo voto de confiança.

À Profa. Dra. Eneida de Paula, pelo profissionalismo, dedicação, coerência, competência, e por me permitir escolher a minha própria linha de pesquisa, incentivando e dando todo o apoio necessário e principalmente por ter me suportado pelos 9 anos e qualquer coisa que eu tive o prazer de trabalhar nesse grupo maravilhoso.

À Rô, por ter me mostrado que a vida está muito além daquilo que estamos acostumados, que o mundo não tem limites. Você ao meu lado, com a sua alegria e beleza, faz com que minha vida seja mais feliz e completa.

"... porque ter a mente boa não é o bastante; o principal é aplicá-la bem. As maiores almas são capazes tanto das maiores virtudes quanto dos maiores vícios, e aqueles que marcham lentamente podem avançar muito mais, se seguirem o caminho certo, do que os que correm, porém deles se afastam"

Descartes - Discurso Sobre o Método, parte I

Resumo

Mesmo após mais de meio século de pesquisas e desenvolvimento em quimioterapia, o câncer ainda é uma das doenças mais difíceis de serem tratadas. Dentre os tipos de câncer, o de próstata aparece em destaque por ser a forma mais incidente entre os homens. O pequeno progresso alcançado até os dias de hoje no tratamento desta doença nos levou a pesquisar duas estratégias para intervir na multiplicação de células de câncer de próstata. Na primeira, um sistema de liberação de fármacos (*drug delivery*) baseado em ciclodextrinas e destinado a melhorar a biodisponibilidade da riboflavina (vitamina capaz de induz apoptose em células tumorais) foi preparado, caracterizado e testado. A segunda estratégia consistiu no desenvolvimento de um sistema de transferência de genes (*gene delivery*) baseado em nanopartículas lipídicas sólidas, para futura transferência de genes supressores de tumor e, portanto, indutores da morte das células de câncer prostático. Na primeira parte foi realizada a caracterização físico-química de complexos de riboflavina com beta (β -CD) e hidroxipropil beta (HP- β -CD) ciclodextrinas, seguida de avaliação da toxicidade em células de câncer de próstata. A associação da riboflavina com as ciclodextrinas aumenta a solubilidade desta vitamina e melhora sua eficiência contra células de câncer de próstata. Entretanto, a interação molecular da riboflavina, tanto com β -CD quanto com HP- β -CD, mostrou-se não usual, como comprovado por ressonância magnética nuclear, pelos ensaios de Efeito Nuclear Overhauser. Na segunda parte, foram desenvolvidas nanopartículas lipídicas sólidas de ca. 100 nm, compostas de ácido esteárico, dioleil-propanoato de trimetilamônio e Pluronic F68; foi também estudada a influência da adição de dioleil-fosfatidiletanolamina a essas formulações. As nanopartículas se mostraram bastante estáveis quanto ao tamanho e potencial Zeta, durante o período (140 dias) estudado. Elas também foram capazes de proteger o material genético transportado contra a ação da enzima DNase e apresentaram eficiência de transfecção comparável à da Lipofectamina 2000[®], um carreador comercial de uso consagrado para transfecção.

Palavras chave: Próstata – Câncer; Riboflavina; Ciclodextrinas; Nanopartículas lipídicas sólidas; Técnicas de transferência de genes.

Abstract

Even after more than half a century of research and development in chemotherapy, cancer remains one of the most difficult diseases to treat. Among the cancer types, prostate adenocarcinoma is the most incident in male. The insufficient advances attained so far in cancer treatment led us to explore two strategies designed to obstruct proliferation of prostate cancer cells. At the first, a drug delivery system based on cyclodextrins and aimed to improve the bioavailability of riboflavin (a vitamin able to induce apoptosis in tumor cells) was prepared, characterized and tested. The second strategy consisted in the development of a gene delivery system based on solid lipid nanoparticles for future transfer of tumor suppressor genes able to induce death of prostate cancer cells. The first part of this thesis comprises the physico-chemical characterization of beta (β -CD) and hydroxypropyl beta (HP- β -CD) cyclodextrins complexes with riboflavin, followed by evaluation of their toxicity against prostate cancer cells. Riboflavin complexation with cyclodextrins increased the solubility of this vitamin and its effectiveness against prostate cancer cells growth. However, the molecular interaction of riboflavin with either β -CD or HP- β -CD was unusual, as evidenced by nuclear magnetic resonance (Overhauser Nuclear Effect) experiments. In the second part solid lipid nanoparticles of ca. 100 nm and composed of stearic acid, 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane and Pluronic F68 (with or without 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) were prepared. Stability (evaluated by size and Zeta potential of the nanoparticles) was quite good during a 140 days storage period. The nanoparticles were able to protect genetic material against DNase action and showed a transfection capacity comparable to that of Lipofectamine 2000[®], a commercially available gene carrier.

Keywords: Prostate – Cancer; Riboflavin; Cyclodextrins; Solid lipid nanoparticles; Gene transfer techniques.

Lista de Abreviaturas

ADP: Adenosina Difosfato

AE: Ácido Esteárico

AFM (*Atomic Force Microscopy*): Microscopia de Força Atômica

AP-2 (*Adapter Complex 2*): proteínas adaptadoras de clatrina

BALB/3T3 (*Mouse embryonic fibroblast cell line*): Linhagem Celular de Fibroblasto Embrionário de Camundongo

CD: Ciclodextrina

CGTase: Ciclodextrina Glicosiltransferase

CLM: Cloropromazina

COS-1 (*Transformed African Green Monkey Kidney Fibroblast Cells*): Células Epiteliais de Rim de Macaco Verde Africano

DLS (*Dynamic Light Scattering*): Espalhamento Dinâmico de Luz

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA (*Desoxiribonucleic Acid*): Ácido Desoxiribonucleico

DNAp: Ácido Desoxiribonucleico Plasmidial

DOPE: Dioleilfosfatidiletanolamina

DOTAP: 1,2-dioleil-3-propanoato de trimetilamônio

EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*): Proteína Fluorescente Verde

EMSA (*Electroforetic Mobility Shift Assay*): Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética

FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*): Classificação Celular Ativada por Fluorescência.

FAD: Flavina Adenina Dinucleotídeo

FIII: Filipina III

FITC-OLN: Isotiocianato de Fluoresceína Conjugado a Oligonucleotídeos

FMN: Flavina Mononucleotídeo

HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus*): Vírus da Imunodeficiência Humana

HL60: Células de Leucemia Mielocítica Aguda Humana

HP- β -CD: Hidroxipropil- β -Ciclodextrina

INCA: Instituto Nacional de Câncer

LDL: Lipoproteínas de Baixa Densidade

LF2k (*Lipofectamine 2000*[®]): Lipofectamina 2000[®]

Meio LB: Meio Luria-Bertani

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bifenil tetrazólio

NLS : Nanopartícula Lipídica Sólida

OLN: Oligonucleotídeos

PC3: Células de Câncer de Próstata Humano Independente de Andrógeno

PDI (*Polydispersity Index*): Índice de Polidispersividade

PLF68: Pluronic F68 (copolímero de bloco, não iônico e com fórmula geral $\text{HO}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a(-\text{C}_3\text{H}_6\text{O})_b(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_a\text{H}$, a =polioxietileno, b =polioxipropileno)

PTEN: Proteína Tirosina Fosfatase Homóloga à Tensina

RF: Riboflavina

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

RNA (*Ribonucleic Acid*): Ácido Ribonucleico

RNAi: RNA de Interferência

siRNA (*small interfering RNA*): RNA de Interferência Curto

UV-Vis: Ultravioleta-Visível

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura da enzima glicosiltransferase (código pdb: 3CGT). Em detalhe observa-se o sítio ativo da enzima com seu principal produto, a β -ciclodextrina. ...	30
Figura 2: a) Estrutura geral de uma ciclodextrina; α , β e γ -CD são constituídas por n=6, 7 e 8, respectivamente. b) Representação esquemática da estrutura tridimensional das ciclodextrinas.	32
Figura 3: Linha do tempo com alguns aspectos históricos das ciclodextrinas.	33
Figura 4: Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão. .	40
Figura 5: Exemplos de estequiometrias para complexos de inclusão: A) 1:1, B) 1:2, ligante:ciclodextrina.	42
Figura 6: Tipos de relações de solubilidade de fases em complexos ligante:ciclodextrina.	45
Figura 7: Produtos gênicos que contribuem para a progressão e baixa eficiência terapêutica do câncer de próstata (adaptado de Lee <i>et al.</i> , 2008).....	82
Figura 8: Representação geral de uma NLS. A matriz lipídica constitui o interior sólido, com o ativo. Na interface o tensoativo, juntamente com o fosfolipídio, garantem a estabilidade da partícula (modificado de Manjunath <i>et al.</i> , 2005).	86
Figura 9: Estrutura química dos componentes das NLSs: a) Ácido Esteárico b) DOTAP c) DOPE d) Pluronic F68 (onde x representa os monômeros hidrofílicos e y os hidrofóbicos).....	93
Figura 10: Efeito das concentrações crescentes de PLF68 no tamanho das NLSs. .	101
Figura 11: Avaliação da interação DNAP:NLSs em formulações contendo concentrações crescentes de PLF68 (de 0,12 a 2,4mM, conforme Tabela 3).	103
Figura 12: Eficiência da transfecção <i>in vitro</i> em células PC3 de NLSs contendo diferentes concentrações de PLF68 (de 0,12 mM a 2,4 mM), Tabela 3. Os níveis de	

expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6). *p <0,05 entre NLS03 e a NLS04 e NLS3 e a NLS06..... 104

Figura 13: Eficiência da transfecção *in vitro* em células PC3 de diferentes volumes de NLSs, contendo diferentes concentrações de PLF68 (de 0,12 mM a 0,84 mM), Tabela 3. Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6). 105

Figura 14: Tamanho das NLSs preparadas com diferentes concentrações de DOTAP: 1,3 mM (diâmetro médio = 110,6±27,6 nm), 2,3 mM (diâmetro médio =105,8±25,9 nm), 3,3 mM (diâmetro médio =99,0±27,5 nm) e 4,3 mM (diâmetro médio =96,0±27,9 nm)..... 106

Figura 15: Avaliação da interação DNAP:NLSs em formulações contendo concentrações crescentes de DOTAP (composição descrita na Tabela 5). 108

Figura 16: Eficiência da transfecção *in vitro* em células PC3 de NLSs contendo diferentes concentrações de DOTAP (de 1,3 mM a 4,3 mM). Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6). *p <0,05 entre a NLS07 e a NLS08, NLS09 e NLS10. LF2k = Lipofectamina 2000®..... 109

Figura 17: Tamanho das NLSs com formulações de diferentes razões DOPE:DOTAP: s/ DOPE (diâmetro médio = 113,8±25,6nm), 1:10 (DOPE:DOTAP) (diâmetro médio =108,5±25,2), 1:3 (DOPE:DOTAP) (diâmetro médio =88,0±27,4) e 1:1 (DOPE:DOTAP) (diâmetro médio =105,4±30,1)..... 111

Figura 18: Avaliação da interação DNAP:NLSs em formulações contendo concentrações crescentes de DOPE. NLS11 sem DOPE e com diferentes razões molares DOPE:DOTAP; NLS12 (1:10) NLS13 (1:3) e NLS14 (1:1). 112

Figura 19: Eficiência da transfecção *in vitro* em células PC3 de NLSs contendo diferentes razões molares (DOPE:DOTAP), Tabela 6. Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6). *p <0,05 entre a LF2k e as formulações DOTAP:DOPE (1:10, 1:3 e 1:1); **p<0,01 entre a formulação s/ DOPE e as formulações DOTAP:DOPE (1:10, 1:3 e 1:1). LF2k = Lipofectamina 2000®..... 113

Figura 20: Eficiência da transfecção *in vitro* em células PC3 de NLSs contendo diferentes volumes de vetor sem ou com DOPE (1:10 DOPE:DOTAP correspondente à formulação NLS11, da Tabela 6). Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6). 114

Figura 21: Imagens de Microscopia de Força Atômica das NLS11 (a) e NLS12 (b) sobre suporte de mica (5X5 µm)..... 115

Figura 22: Eficiência da transfecção *in vitro* em células PC3 de NLSs sem ou com DOPE (1:10 DOPE:DOTAP, formulação NLS11 da Tabela 6) contendo diferentes quantidades de DNAp (de 0,8 a 1,2 µg). Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6)..... 117

Figura 27: Medidas de diâmetro médio das nanopartículas em função do tempo. Armazenados a 4°C. ■ NLS11, □ NLS12, ●NLS13, ○ NLS14. 119

Figura 28: Valores de PDI das nanopartículas em função do tempo. Armazenados a 4°C. ■ NLS11, □ NLS12, ●NLS13, ○ NLS14. A linha tracejada indica o limite máximo de PDI (0,25) aceitável para administrações parenterais (Müller *et al.*, 2004). 120

Figura 29: Medidas do potencial Zeta das nanopartículas em função do tempo. Armazenados a 4°C. ■ NLS11, □ NLS12, ●NLS13, ○ NLS14.	121
Figura 23: Ensaio de proteção do DNAP à ação de DNase I. Poço 1: Controle negativo, somente DNAP; Poço 2: Controle positivo, DNAP e DNase I; Poço 3: complexo NLS11:DNAP e DNase I; Poço 4: complexo NLS12:DNAP e DNase I; Poço 5: complexo NLS13:DNAP e DNase I; Poço 6: complexo NLS14:DNAP e DNase I.....	123
Figura 24: Avaliação do efeito dos inibidores de endocitose na transfecção de células PC3 mediada por NLSs, indicando a porcentagem de redução na eficiência, em relação à eficiência do grupo controle. CPM e FIII referem-se aos inibidores de endocitose clorpromazina e Filipina III, respectivamente. Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6).	125
Figura 25: Microscopia de células PC3 após 1 h de transfecção com a formulação NLS11. a) Microscopia de fluorescência do FITC-OLN nas células PC3, após 1 h de transfecção. b) Microscopia de luz das células PC3, após 1 h de transfecção. c) Sobreposição das microscopias de luz e fluorescência. Aumento de 60x.	127
Figura 26: Microscopia de células PC3 após 4 h de transfecção com a formulação NLS11. a) Microscopia de luz de PC3. b) Microscopia de fluorescência com núcleo corado com Hoechst. c) microscopia de fluorescência do FITC-OLN. d) Sobreposição das microscopias de luz e fluorescência. Aumento de 60x.	128
Figura 30: Avaliação da citotoxicidade das NLSs: a) células 3T3 e b) células PC3, pelo teste de redução do MTT. ■ NLS11, □ NLS12, ●NLS13, ○ NLS14.....	130

Lista de Tabelas

Tabela 1 Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais.	38
Tabela 2 Exemplos de β -ciclodextrinas modificadas*, bem como o radical R substituinte do hidrogênio das hidroxilas na molécula de ciclodextrina natural....	39
Tabela 3 Formulações de NLSs contendo diferentes concentrações de PLF68.....	100
Tabela 4 Efeito da concentração de PLF68 na distribuição populacional das NLSs: diâmetro médio e porcentagem das partículas (ver Figura 10).	102
Tabela 5 Formulações de NLSs contendo diferentes concentrações de DOTAP. ..	106
Tabela 6 Formulações de NLSs contendo diferentes razões molares DOPE:DOTAP.	110

Índice

Parte 1	19
Introdução.....	20
Câncer de Próstata.....	20
Riboflavina.....	22
Ciclodextrinas.....	24
Ciclodextrinas: Aspectos históricos e características químicas.....	27
Aplicações.....	34
Propriedades das Ciclodextrinas.....	36
Fenômeno de Inclusão	39
Equilíbrio no Fenômeno de Inclusão	43
Caracterização dos Complexos.....	46
Preparo de Complexos.....	47
Resultados.....	51
Riboflavin-Cyclodextrin Non-Inclusion Complexes: Characterization and Effect in Prostate Cancer Cells Death Induction	52
ABSTRACT.....	53
INTRODUCTION.....	53
MATERIALS & METHODS	55
RESULTS & DISCUSSION	57
CONCLUSION.....	70
REFERENCES.....	71
Conclusão.....	76
Parte 1	76

Parte 2.....	78
Introdução.....	79
Terapia Gênica e o Câncer de Próstata.....	79
Transferência de Genes (<i>Gene delivery</i>).....	83
Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs).....	85
Objetivos	89
Materiais e Métodos	90
Materiais.....	90
Cultura de células.....	90
Viabilidade Celular.....	91
Amplificação e purificação do plasmídeo	91
Preparação das NLSs.....	92
Determinação do diâmetro das partículas e do potencial Zeta	93
Microscopia de Força Atômica	94
Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA)	94
Viabilidade Celular.....	95
Transfecção	95
Citometria de Fluxo.....	96
Microscopia de Fluorescência	96
Estudo de proteção à DNase I.....	97
Análise estatística	97
Resultados e Discussão	98
Preparo das Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	98
Preparo das formulações das NLSs	100
Variação da concentração de Pluronic F68	101
Variação da concentração de DOTAP	105

Efeito da DOPE nas formulações	109
Estrutura das NLSs.....	115
Estabilidade das formulações contendo DOPE.....	116
Avaliação da estabilidade física das partículas.....	118
Ensaio de proteção à DNase I	122
Internalização e tráfego intracelular das partículas.....	124
Avaliação do efeito citotóxico das NLSs	129
Conclusão.....	131
Parte 2.....	131
Referências.....	133
Atividades acadêmicas e produção científica no período da tese	152

Parte 1

Liberação de Fármacos ***(Drug delivery)***

Introdução

Câncer de Próstata

Mais de meio século de pesquisas em quimioterapia não foi suficiente para desenvolver uma terapêutica eficaz contra o câncer, que continua sendo uma das doenças mais difíceis de serem tratadas. Isso se deve a diversos fatores como o limitado número de modelos animais, a alta diversidade de tumores, a resistência destes a fármacos e aos acentuados efeitos colaterais das terapias atuais (Bradbury, 2007). Salvo exceções, como a do câncer de testículos, a quimioterapia atual é capaz de oferecer apenas um modesto aumento do tempo de sobrevivência dos pacientes. Somado a isso o número de idosos em todo mundo vem crescendo e com isso as novas estimativas de incidência da doença apontam para 20 milhões de novos casos por ano, nos próximos 20 anos (Bradbury, 2007).

Em homens, o câncer de próstata apresenta a maior estimativa de incidência, além de ser o segundo em número de mortes entre homens norte-americanos, sendo menor apenas que o câncer de pulmão (Jemal *et al.*, 2007). 670 mil novos casos são registrados por ano em todo mundo, sendo que, só nos

Introdução

Estados Unidos, estapatologia é responsável por 9% das mortes entre homens, o que significa cerca de 27 mil mortes por ano (Jemal *et al.*, 2007; Teillac & Mongiat-Artus, 2007). O número de casos novos de câncer de próstata estimados para o Brasil, no ano de 2008, foi de 49.530. Esses valores correspondem a um risco estimado de 52 casos novos a cada 100 mil homens (INCA, 2008¹). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata é o mais frequente em todas as regiões, com risco estimado de 69/100.000 na região Sul, 63/100.000 na região Sudeste, 47/100.000 na região Centro-Oeste, 38/100.000 na região Nordeste, e 22/100.000 na região Norte (INCA, 2008¹). Mesmo crescendo menos que na década de 90, a incidência de câncer de próstata ainda aumenta, fato que pode ser atribuído, em parte, a testes mais sensíveis, capazes de detectar a doença em estágios iniciais tais como o teste do antígeno próstata-específico. Além disso, o aumento da expectativa de vida é outro fator que tem contribuído grandemente para o contexto epidemiológico do câncer de próstata. Este tipo de câncer apresenta significativa relação com a idade, já que 75% dos casos acometem homens com 65 anos ou mais (Jemal *et al.*, 2007).

Como o câncer de próstata raramente é sintomático, de 38% a 51% dos pacientes já apresentam metástase quando diagnosticados, o que diminui drasticamente a sobrevida (Papatsoris & Papavassilou, 2001; Thompson, 2007). O órgão alvo da metástase relacionada ao câncer de próstata é o osso, sendo a metástase óssea uma das maiores causas de mortalidade. Acredita-se que fatores produzidos pelas células do câncer estimulam a proliferação dos osteoclastos, células ósseas responsáveis pela reabsorção da matriz óssea (Inoue *et al.*, 2005).

¹ <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>

Introdução

Mesmo diante de tantas informações a respeito do câncer de próstata, pouco progresso tem sido alcançado no tratamento desta doença. Atualmente, várias estratégias têm sido definidas como promissoras para seu tratamento, mas a quimioterapia ainda é o protocolo terapêutico de escolha (Sonpavde & Hutson, 2006). Perspectivas otimistas indicam que, em algumas décadas, avanços na prevenção, detecção e tratamento transformem o câncer em uma doença crônica e não mais em uma fatalidade (Bradbury, 2007).

Dentre os quimioterápicos, a daunorubicina e a mitoxantrona são os fármacos mais efetivos para o tratamento de câncer de próstata, mama, leucemia e linfomas. Os mecanismos propostos para o efeito desses fármacos são a intercalação no DNA e a inibição da topoisomerase II (Kostrzewa-Nowak *et al.*, 2007).

Em nosso trabalho, a linhagem de células PC3, provenientes de câncer de próstata humano andrógeno-independente foi utilizada como modelo experimental. Esta linhagem foi escolhida por conservar características importantes de sua origem e por apresentar alta agressividade, o que possibilita boas correlações com a fisiologia do tumor.

Riboflavina

Desde sua descoberta e caracterização química, as flavinas têm sido correlacionadas com diferentes processos celulares envolvendo transferência de elétrons, tendo participação na oxidação de vários substratos orgânicos na cadeia de transporte de elétrons presente na mitocôndria, bem como nas reações envolvendo o complexo citocromo P₄₅₀ (Massey, 2000; Souza *et al.* 2005). O papel biológico desta vitamina é vasto, mas podemos destacar sua ação como:

Introdução

a) Cofator de enzimas - a riboflavina é pertencente ao grupo de vitaminas do complexo B, sendo um componente importante das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN). Ela desempenha, portanto, importante papel para o metabolismo celular, atuando como cofator de várias enzimas de óxido-redução de vias catabólicas (Ciclo de Krebs, Ciclo de Lynen) e outras como a glutathione redutase, importante na resposta celular ao estresse oxidativo (Hustad *et al.*, 1999; Bender, 2003; Ball, 2004).

b) Prooxidante e antioxidante (sequestradora de radicais livres) - as flavinas podem contribuir para o estresse oxidativo por produzir superóxido, mas também podem reduzir hidroperóxidos e outros radicais de oxigênio (Massey, 2000). Minami e col. (1999) demonstraram que a citotoxicidade da riboflavina irradiada sobre fibroblastos foi devida à produção de peróxido de hidrogênio.

c) Quimioprotetor - Webster e col. (1996) demonstraram que a deficiência da riboflavina na dieta provocou aumento da expressão de enzimas de reparo do DNA (poli-ADP-ribose polimerase, DNA polimerase β e DNA ligase), quando ratos deficientes de riboflavina foram tratados com carcinógenos, enquanto que a suplementação com riboflavina provocou diminuição na expressão destas enzimas, sugerindo menor grau de danos no DNA.

d) Agente citotóxico - na presença de triptofano e riboflavina irradiada é possível obter vários produtos (formação do aduto triptofano-riboflavina), os quais podem ser tóxicos (Mancini *et al.*, 2000). Edwards e col. (1994 e 1999) demonstraram que fotoprodutos obtidos a partir do ácido indol-acético na presença da riboflavina induziram a morte por apoptose das células HL60 e das células NOS/2 (tumor murino).

e) Agente antitumoral - recentemente o grupo de pesquisa da Dra. Carmen Veríssima Ferreira demonstrou, em detalhes, o mecanismo pelo qual fotoprodutos

Introdução

da riboflavina causam apoptose em células tumorais (leucemia e câncer de próstata). O processo de indução da apoptose se dá através da ativação do receptor do Fas e síntese da ceramida (Souza *et al.*, 2006). Além disso, a riboflavina *per si* é capaz de potencializar a ação da mitoxantrona em até 20 vezes, além de acelerar sua ação (Ferreira *et al.*, 2005).

Ciclodextrinas

As ciclodextrinas foram descritas pela primeira vez em literatura em 1891 por Villiers que, enquanto estudava a ação da bactéria *Bacillus amylobacter* sobre o amido de batata, isolou em pequena quantidade uma substância cristalina que ele denominou de celulosina, graças à sua semelhança com a celulose. Esta substância, que hoje é conhecida como ciclodextrina (CD) recebeu, no decorrer de sua história, diversas denominações como: cicloamilose, ciclomaltose ou dextrina de Schardinger (Matioli, 2000; Del Valle, 2004).

CDs são polímeros cíclicos de alfa-glicopiranoses e naturalmente os oligômeros naturais mais comuns possuem 6, 7 ou 8 monômeros, denominados, respectivamente de: α , β e γ -ciclodextrina. Essas moléculas apresentam conformação espacial toroidal, onde a região exterior apresenta grupamentos hidroxila que garantem a solubilidade dessas moléculas e seu interior apresenta hidrogênios com caráter hidrofóbico. Essa estrutura possibilita que esses oligômeros acomodem, em seu interior, moléculas “hóspedes” de dimensões e características apropriadas, funcionando assim, como carreadores de fármacos (Matioli, 2000; Szejtli, 2004).

Em 1953, Freudenberg, Cramer e Plieninger obtiveram a primeira patente de uma formulação contendo CD; nela os autores descrevem os principais benefícios da utilização de ciclodextrinas como carreadores de fármacos, dentre os quais podemos destacar o aumento da solubilidade aquosa do composto complexado,

Introdução

efeito protetor à oxidação e redução ou perda da volatilidade (Davis & Brewster, 2004).

A partir de 1970 houve um crescimento exponencial no número de publicações relatando o uso de CDs como carreadores de fármacos, principalmente depois que estudos de toxicidade demonstraram que efeitos indesejáveis e inicialmente atribuídos às ciclodextrinas eram, na verdade, originados de impurezas e de formas inadequadas de administração das mesmas (Loftsson & Duchene, 2007).

Uma das mais importantes propriedades das CDs é a habilidade em formar complexos de inclusão (complexos hóspede-hospedeiro) com uma grande variedade de substâncias no estado sólido, líquido ou gasoso através de interações moleculares (Brewster & Davis, 2004). A principal força de interação para a formação de complexos é a liberação de moléculas de água fortemente associadas ao interior da cavidade (em ligações hidrogênio); assim, quando a molécula hóspede se insere na cavidade das CDs ela desloca moléculas de água presentes no seu interior, fazendo com que ocorra uma associação do tipo apolar, resultando em um estado energético mais favorável, isto é, de menor energia (Loftsson & Duchene, 2007). Além disso, interações moleculares fracas como hidrofóbicas, de van der Waals, dipolo-dipolo, ligações de hidrogênio hóspede-hospedeiro e de transferência de carga determinam características da complexação como a estequiometria e a constante de associação (Brewster and Loftsson, 2007).

Como relatado anteriormente, a interação com CDs pode trazer diversos benefícios, dentre os quais destacamos o aumento na solubilidade do fármaco. Isso pode contribuir para que uma dose menor seja efetiva, garantindo diminuição dos efeitos citotóxicos, além de proteger fármacos lábeis da desidratação, hidrólise, oxidação e fotodegradação. A somatória desses fatores contribui significativamente para aumento da biodisponibilidade do fármaco complexado (Challa *et al.*, 2005).

Introdução

Como a toxicidade de novos excipientes é uma das principais características levadas em consideração para seu uso em farmacologia é importante ressaltar alguns pontos importantes (Stella & He, 2008). As CDs são pouco absorvidas na quando administradas oralmente, não passando de 1% da dose absorvida para α , β e γ -ciclodextrina em ratos (Stella & He, 2008). Administrações intravenosas de CDs são rapidamente eliminadas da circulação, de forma intacta, através dos rins (Stella & He, 2008). Entretanto, ensaios *in vitro* mostram que a β -CD é capaz de interagir com membranas celulares e, por exemplo, causar hemólise através de um complexo mecanismo que envolve, principalmente, a remoção de colesterol, e também lipídios e proteínas (Irie & Uekama, 1997). Além disso, a β -CD tem sua administração parenteral impedida por sua limitante solubilidade aquosa (causada pelas numerosas pontes de hidrogênio intramolecular), em decorrência dos danos causados pela eliminação renal do complexo β -CD:colesterol e, até mesmo pela precipitação de microcristais destes, causando sérios danos ao tecido renal (Irie & Uekama, 1997). Essas limitações levaram ao desenvolvimento de CDs modificadas na esperança de impedir/diminuir a agregação molecular, evitando assim a formação dos microcristais de complexos, i.e. β -CD:colesterol e facilitando a eliminação das CDs e complexos de inclusão (Irie & Uekama, 1997; Gould & Scott, 2005; Stella & He, 2008). Isso levou a inúmeras substituições com as mais variadas utilidades, dentre elas a hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD) é uma das CDs modificadas mais importantes (Gould & Scott, 2005). Sua notoriedade é devida sua capacidade de inclusão (semelhante a da β -CD) que é acompanhada por uma solubilidade sensivelmente grande e efeitos colaterais bastante amenizados, em relação à β -CD. Com base em dados clínicos a HP- β -CD é considerada como não tóxica, quando usada em doses menores que 16g (Davis & Brewster, 2004; Gould & Scott, 2005).

Introdução

Para o presente trabalho foram empregadas uma ciclodextrina natural (β -CD) e uma modificada (HP- β -CD). A seguir passamos a uma revisão histórica sobre ciclodextrinas, suas características químicas e aplicações como carreadores de fármacos em *drug delivery*, que consistiu em um manuscrito que está aceito para publicação na revista *Química no Brasil* (Anexo 1).

Ciclodextrinas: Aspectos históricos e características químicas

A primeira menção em literatura que se tem relato sobre as ciclodextrinas (CDs) foi de Villiers (em 1891) que, enquanto estudava a ação da bactéria *Bacillus amylobacter* sobre amido de batata isolou uma pequena quantidade de uma substância cristalina (3g/kg de amido), que ele denominou de celulosina, graças a sua semelhança com a celulose. No decorrer de sua história as CDs tiveram outras denominações como cicloamiloses, ciclomaltoses ou dextrinas de Schardinger (Clarke *et al.*, 1988; Del Valle, 2004). Nesse mesmo trabalho Villiers determinou a fórmula estrutural $(C_6H_{10}O_5)_n \cdot H_2O$ dessas substâncias cristalinas, o que posteriormente levou outros autores a concluírem que sua amostra poderia ser uma mistura de CDs, ou ainda, estar contaminada.

Em 1903, Schardinger estudava microorganismos que haviam sido considerados como causa de alguns casos de envenenamento alimentar. Ele constatou que algumas dessas bactérias resistentes à temperatura (termófilas) eram capazes de dissolver o amido, formando polissacarídeos cristalinos (dextrinas). Ele distinguiu dois desses polissacarídeos que chamou de dextrinas cristalinas A e B as quais considerou posteriormente, serem provavelmente aquelas isoladas por Villiers (Clarke *et al.*, 1988; Szenté & Szejtli, 2004).

Introdução

Schardinger teve seu interesse despertado pelos polissacarídeos cristalinos, imaginando que esses fizessem parte do processo de síntese ou degradação do amido, ou mesmo de sua composição (Clarke *et al.*, 1988; Szenté & Szejtli, 2004). Dois anos após, em 1905, ele retomou os estudos com as dextrinas; entretanto, a linhagem anteriormente isolada não apresentava mais a capacidade de degradar o amido. Foi quando acidentalmente, após uma contaminação, ele isolou uma linhagem capaz de degradar o amido formando as dextrinas, denominando-a de *Bacillus macerans*. Inicialmente ele se referia ao produto formado como amilose cristalina e amilodextrina cristalina mas, posteriormente, julgou inadequado e passou a chamá-las de dextrina cristalina α e dextrina cristalina β . Em 1911, Schardinger finalizou seus trabalhos com as dextrinas cristalinas, tendo chegado as seguintes conclusões:

(1) Quando uma pasta de amido é submetida à ação de microorganismos obtêm-se substâncias hidrofílicas que possuem características químicas semelhantes às dextrinas.

(2) Diferentes tipos de amido (*i.e.* batata e arroz) sob as mesmas condições, geram proporções diferentes dessas dextrinas, quando submetidos à ação de *Bacillus macerans*, provavelmente em vista das diferenças na constituição do amido.

(3) Uma parte das dextrinas produzidas é cristalina, outra parte é amorfa e com consistência de goma, com um rendimento de 25-30% do amido usado de batatas e araruta.

(4) Foi possível obter as dextrinas cristalinas de diferentes fontes de amido, como: batata, araruta, arroz e trigo. Em todos os casos foram obtidos os dois tipos de dextrinas: α e β , sempre com um rendimento maior da primeira.

(5) As dextrinas cristalinas são passíveis de serem precipitadas de solução aquosa por álcool, assim como por éter, clorofórmio e solução de iodo. As

Introdução

dextrinas não reduzem sais de cobre (solução de Fehling) e leveduras são incapazes de fermentá-las.

(6) A reação com iodo é uma forma simples de diferenciar as dextrinas α e β . Um fino filme de dextrina cristalina α na presença de iodo torna-se azul quando umedecida e verde quando seca. Já o produto da reação da dextrina cristalina β com iodo é acastanhado quando seco ou úmido.

Mesmo sem propor a estrutura cristalina das ciclodextrinas, Schardinger, realizou várias observações que hoje atribuímos à estrutura cíclica das CDs (Clarke *et al.*, 1988; Szente & Szejtli, 2004).

De 1911 até 1938, pouco foi descoberto sobre a química das ciclodextrinas. Os autores Pringsheim e Karrer destacaram-se nesse período; entretanto, a literatura é repetitiva e cheia de controvérsias e muitas vezes baseada em conceitos errôneos (Inoue *et al.*, 1993).

Em 1939, Tilden e Hudson, demonstraram que uma enzima do tipo amilase, obtida do *Bacillus macerans*, era responsável pela produção das ciclodextrinas. Estes autores comprovaram que as ciclodextrinas não eram produtos do metabolismo das bactérias, mas sim resultado da ação de enzimas extracelulares que hidrolisavam o amido e compostos relacionados. Sabe-se atualmente, que estas enzimas, as Ciclodextrina Glicosiltransferases (CGTases), fazem parte da família das amilases (CGTase, Figura 1) e são produzidas por uma grande variedade de microorganismos como: *Bacillus macerans*, *Klebsiella oxytoca*, *Bacillus circulans* e *Alkalophilic bacillus* (French, 1957; Szente & Szejtli, 2004).

A razão pela qual esses microorganismos possuem diferentes formas de CGTases ainda permanece obscura. Uma possível explicação evolutiva seria a de que os oligômeros cíclicos são pouco susceptíveis a degradação por beta amilases além de serem lentamente degradados por alfa amilases, comumente encontradas

Introdução

em outros microorganismos, garantindo assim aos primeiros uma forma de reserva de unidades de glicose. As CGTases são extracelulares o que sugere que a produção de ciclodextrinas seria uma forma de armazenamento de energia pelos microorganismos que apresentam essa classe de enzimas, mesmo na presença de outros microorganismos (Clarke, 1988).

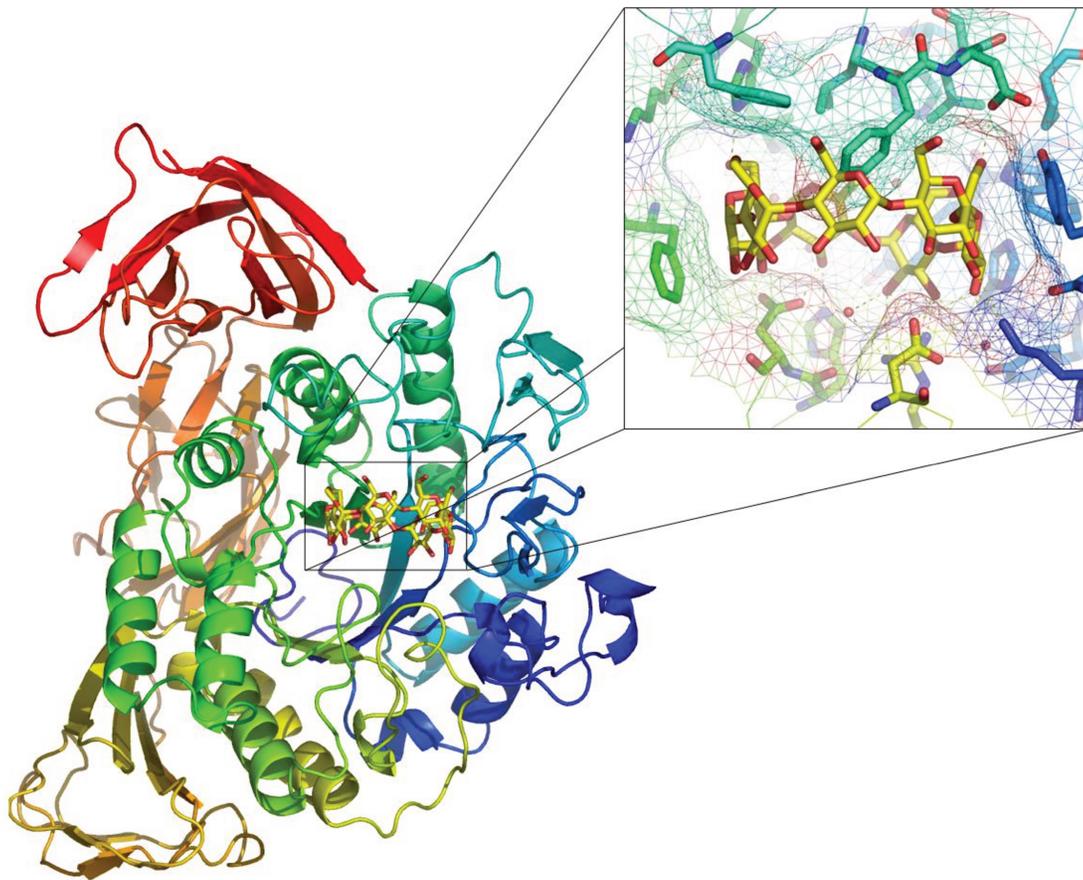


Figura 1: Estrutura da enzima glicosiltransferase (código pdb: 3CGT). Em detalhe observa-se o sítio ativo da enzima com seu principal produto, a β -ciclodextrina.

Finalmente em 1942 as estruturas das CDs naturais foram elucidadas por French e Rundle. Além disso, eles determinaram a massa molar e o número de

Introdução

subunidades da α e β -CD; em 1948, Freudenberg e Cramer, fizeram o mesmo para a γ -CD. Eles demonstraram as CDs que eram derivados cíclicos, explicando seu baixo poder de redução, e que possuíam 6, 7 ou 8 resíduos de glicose (Figura 2), respectivamente. No entanto, não há relatos de ciclodextrinas com menos de 6 unidades de α -D-glicopiranosil, provavelmente em virtude de limitações estéricas (Clarke *et al.*, 1988; Szente & Szejtli, 2004). Juntamente com essas informações veio a observação de que essas moléculas apresentavam uma interessante peculiaridade: de formar complexos de inclusão molecular. Cramer, em 1950, descobriu que as ciclodextrinas eram capazes de catalisar reações específicas, o que possibilitou sua utilização como sistema mimético de sítios enzimáticos de catálise e, no ano seguinte, demonstrou que as ciclodextrinas eram capazes de acomodar moléculas em sua cavidade (Inoue *et al.*, 1993; Loftsson & Duchene, 2007). Outras formas naturais: δ -, ζ -, ξ - e η -ciclodextrinas, contendo de 9 a 12 resíduos de glicose, foram isoladas posteriormente; porém, demonstrou-se que são menos importantes, por serem de difícil obtenção e não apresentarem a mesma capacidade de inclusão molecular, uma vez que são maiores e não possuem uma rigidez suficiente no anel macrocíclico para garantir formato fixo da cavidade (Del Valle, 2004).

Em 1953 Freudenberg, Cramer e Plieninger obtiveram a primeira patente de uma formulação contendo CD. Nela os autores descrevem os principais benefícios da utilização de ciclodextrinas como carreadores de fármacos, dentre os quais podemos destacar o aumento da solubilidade aquosa do fármaco, seu efeito protetor à oxidação e a redução ou perda da volatilidade (French, 1957; Szejtli, 1998).

Introdução

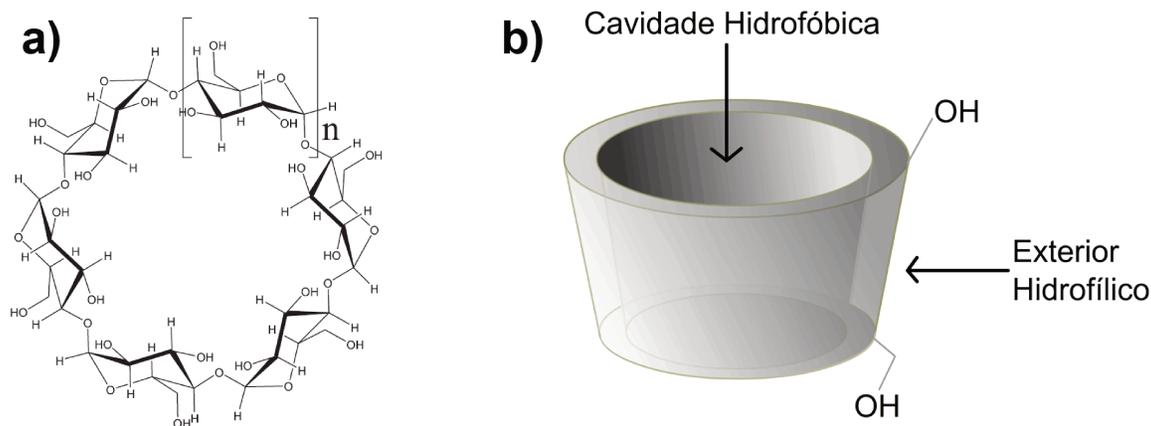


Figura 2: a) Estrutura geral de uma ciclodextrina; α , β e γ -CD são constituídas por $n=6$, 7 e 8, respectivamente. b) Representação esquemática da estrutura tridimensional das ciclodextrinas.

Os primeiros trabalhos visando avaliar a toxicidade das CDs em animais foram desastrosos. French substituiu boa parte dos carboidratos da dieta de ratos por β -CD e os animais evitavam a comida ou comiam em pequenas quantidades e dentro de uma semana vinham a falecer. Autópsias não revelavam a causa das mortes. Assim, muitos pesquisadores da época foram desencorajados a estudar esses compostos. Foram necessários 25 anos para que estudos mais detalhados de toxicidade de CDs mostrassem que, provavelmente, o que French imaginava estar puro para os testes poderia conter contaminantes, como solventes dos processos de purificação na obtenção de CDs (French, 1957).

A partir de 1970 houve um crescimento exponencial no número de publicações envolvendo ciclodextrinas como carreadores, principalmente depois que estudos de toxicidade demonstraram que efeitos indesejáveis e inicialmente atribuídos as ciclodextrinas eram, na verdade, originados de impurezas e de formas inadequadas de administração das mesmas (French, 1957).

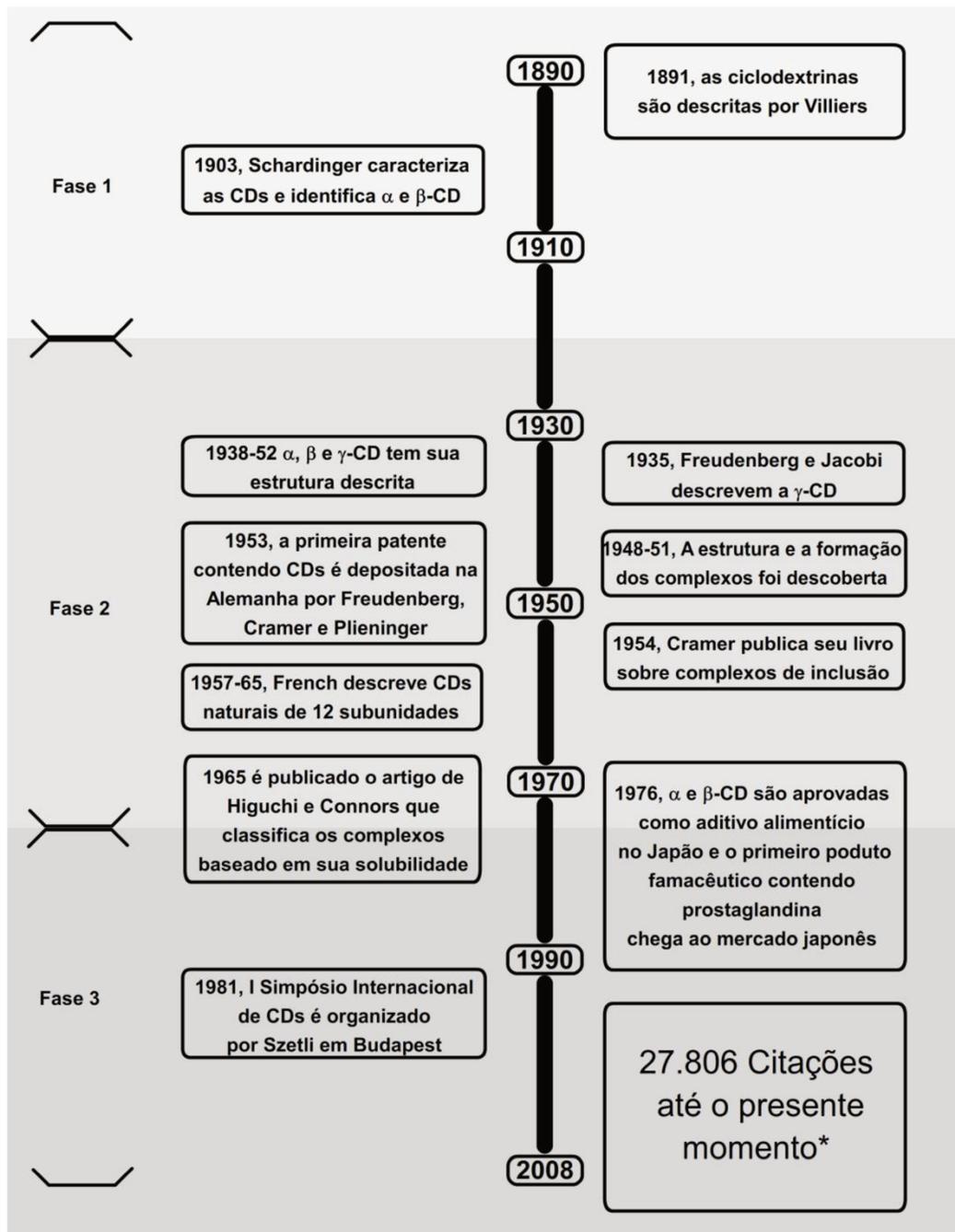


Figura 3: Linha do tempo com alguns aspectos históricos das ciclodextrinas.

*Fonte: base de dados ISI web of knowledge (02/09/2008).

No início da década de 70 a β -CD custava em torno de US\$ 2.000/kg. Porém, graças ao aumento na demanda, este valor baixou para US\$ 3-4/kg para uso

Introdução

industrial, em 2002 (French, 1957; Buschmann & Schollmeyer, 2002). Além disso, foi crescente o desenvolvimento de derivados das CDs naturais com propriedades melhoradas e aplicações variadas envolvendo administração oral, ocular, nasal, anal e intravenosa, entre outras (Szejtli, 1998). Em 1980 Saenger publicou uma revisão sobre CDs mencionando algumas de suas aplicações farmacêuticas e no ano seguinte aconteceu o primeiro simpósio internacional de ciclodextrinas, organizado por Joaquim Szejtli, em Budapest. Em 1982 Szejtli publicou seu primeiro livro sobre o tema e, desde então, o interesse acadêmico e farmacêutico acerca das CDs só fez crescer (Loftsson & Duchene, 2007). A Figura 3 apresenta a linha do tempo com os principais acontecimentos na história das ciclodextrinas, indo desde sua descoberta até os dias atuais.

Aplicações

Recentemente as ciclodextrinas têm sido extensivamente utilizadas na pesquisa e desenvolvimento farmacêutico, com cerca de 30-40 produtos comerciais em todo o mundo. Nesta área, sua principal aplicação se dá como excipiente farmacêutico sendo muito prática, além de ser capaz de aumentar a solubilidade, reduzir o amargor, aumentar a estabilidade e diminuir a toxicidade de ativos (Biwier *et al.*, 2002; Davis & Brewster, 2004; Szente & Szejtli, 2004).

Entretanto, suas aplicações são mais amplas, uma vez que ciclodextrinas são capazes de formar complexos de inclusão com moléculas hidrofóbicas, sendo úteis também em outras áreas. A indústria farmacêutica consome cerca de 10% de todas as ciclodextrinas produzidas enquanto os grandes consumidores são as indústrias de cosméticos e a alimentícia (Szente & Szejtli, 2004).

Na produção de cosméticos, as ciclodextrinas são usadas para: solubilizar e estabilizar componentes sensíveis; estabilizar emulsões; aumentar a absorção de

Introdução

compostos ativos na pele; reduzir ou eliminar odores desagradáveis de determinados componentes presentes em formulações; reduzir a perda de componentes ativos por volatilização ou oxidação; reduzir efeitos de fotodecomposição de ativos (Loftsson & Brewster, 1996; Loftsson & Duchene, 2007), etc.

Na indústria alimentícia, as ciclodextrinas auxiliam na estabilidade de flavorizantes e também de emulsões água em óleo. São utilizadas, ainda, para produção de manteigas com baixos teores de colesterol, uma vez que a interação da molécula de colesterol com a ciclodextrina é estável, podendo então ser removido dos alimentos (Szejtli, 1982; Szejtli, 1997; Szente & Szejtli, 2004; Carrier *et al.*, 2007).

Na indústria têxtil, uma pequena revolução é esperada para um futuro próximo, uma vez que as ciclodextrinas possuem várias possibilidades de utilização, sendo uma delas a capacidade de se fixar nas fibras naturais ou sintéticas de tecidos. Estas ciclodextrinas imobilizadas poderiam formar complexos de inclusão com moléculas voláteis, como componentes presentes no suor, fumaça de cigarros, ou poderá ser previamente complexadas com fragrâncias, repelentes de insetos ou até fármacos para liberação transdérmica (Savarino *et al.*, 1999; Buschmann *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2002; Szejtli & Szente, 2005).

Na indústria química, o número de exemplos de aplicações aumenta rapidamente. Por exemplo, cita-se a conservação de produtos naturais pela incorporação de fungicidas insolúveis em água e complexados em ciclodextrina, impregnados em estruturas como portas e janelas. Inseticidas, herbicidas e fungicidas podem ser complexados com ciclodextrinas, reduzindo as doses utilizadas (em consequência da liberação modificada do princípio ativo) e por consequência diminuindo também a poluição ambiental gerada por agroquímicos

Introdução

sintéticos. CDs podem ainda ser utilizadas para produção de sensores, kits diagnósticos e em química analítica, particularmente na técnica de cromatografia líquida. Na área de cromatografia líquida as ciclodextrinas apresentam grande importância, uma vez que são capazes de separar estereoisômeros (Szejtli, 2003).

Em biotecnologia, a maioria dos processos utiliza transformações em meio aquoso de substratos por enzimas catalíticas. Ciclodextrinas podem auxiliar no sentido de aumentar a solubilidade de substratos hidrofóbicos, remover do meio reacional inibidores que podem ser produzidos no processo de transformação de um substrato, estabilizar o produto ou substrato nas condições de transformação enzimática e no isolamento de substâncias de interesse de um meio reacional heterogêneo (Buschmann *et al.*, 2001).

Uma utilização biotecnológica inovadora para as ciclodextrinas é a possibilidade de utilização destas como agentes de transfecção celular para terapia gênica. Neste caso são utilizadas ciclodextrinas ligadas a policações, para que estas consigam complexar-se com a molécula de DNA de interesse (Szejtli, 1998; Redenti *et al.*, 2001; Cryan *et al.*, 2004; Dass, 2004; Dodziuk, 2006).

Propriedades das Ciclodextrinas

As ciclodextrinas possuem forma de cone truncado (Figura 2b), com uma cavidade demarcada por um esqueleto carbônico, átomos de hidrogênio e oxigênio, que formam uma zona de alta densidade eletrônica e caracterizam uma região hidrofóbica. A polaridade da cavidade é estimada como sendo muito similar à de uma solução aquosa de etanol. As hidroxilas secundárias (-CH₂-OH, Figura 2b) estão situadas na extremidade mais estreita da molécula de CD, caracterizando uma região chamada de coroa, enquanto na extremidade maior, chamada de borda, temos as hidroxilas primárias (-OH) (French, 1957; Davis & Brewster, 2004).

Introdução

As ciclodextrinas como moléculas “hospedeiras” são importantes, pois (French, 1957; Szejtli, 1998):

(1) São produtos seminaturais, provenientes de uma fonte renovável, o amido, e obtidas através de uma conversão enzimática relativamente simples;

(2) São produzidas em grande escala (centenas de toneladas anuais), sem causar grandes impactos para o meio ambiente;

(3) Em razão do consumo e produção mundial crescentes, seus preços são aceitáveis para a produção industrial;

(4) Através de sua habilidade de formar complexos de inclusão, importantes propriedades das moléculas convidadas são alteradas;

(5) Sua toxicidade é desprezível, desde que seja escolhida a ciclodextrina e a via de administração adequadas;

(6) Podem ser utilizadas pelo homem como excipiente em formulações medicamentosas, alimentos e cosméticos;

(7) Não induzem resposta imunológica, em humanos.

Introdução

A Tabela 1 contém algumas propriedades das três ciclodextrinas naturais de maior abundância: α , β e γ .

Tabela 1 Propriedades físico-químicas das ciclodextrinas naturais.

<i>Propriedade</i>	<i>α-CD</i>	<i>β-CD</i>	<i>γ-CD</i>
Número de resíduos de glicose	6	7	8
Massa Molar (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade aquosa 25 °C (g/100mL)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro externo (Å)	14,6	15,4	17,5
Diâmetro interno da cavidade (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Altura da cavidade (Å)	7,9	7,9	7,9
Volume da cavidade (Å ³)	174	262	427

A solubilidade em água da β -CD é de 1,85 g/100mL (16 mM), sendo a menor dentre as três formas naturais mais abundantes de ciclodextrinas. No entanto, substituições nos grupamentos hidroxila da β -CD produzem derivados muito mais solúveis, como é o caso da 2-hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD), que tem as hidroxilas secundárias substituídas por radicais hidroxipropil e cuja solubilidade em água é de 60 %, isto é, mais que 600 g/L. Além da HP- β -CD, outros derivados da β -CD como a metil- β -ciclodextrina e a sulfobutiléter- β -ciclodextrina, têm sido utilizados como carreadores de fármacos de formulações comerciais em países como os Estados Unidos, Japão e na Europa (Szejtli, 1998). A Tabela 2 apresenta algumas das ciclodextrinas modificadas mais utilizadas.

Introdução

Tabela 2 Exemplos de β -ciclodextrinas modificadas*, bem como o radical R substituinte do hidrogênio das hidroxilas na molécula de ciclodextrina natural.

Ciclodextrinas Modificadas	Abreviatura	Radical
Carboximetil- β -ciclodextrina	CM- β -CD	CH ₂ CO ₂ H ou H
Carboximetil-etil- β -ciclodextrina	CME- β -CD	CH ₂ CO ₂ H, CH ₂ CH ₃ ou H
Dietil- β -ciclodextrina	DE- β -CD	CH ₂ CH ₃ ou H
Dimetil- β -ciclodextrina	DM- β -CD	CH ₃ ou H
Metil- β -ciclodextrina	M- β -CD	CH ₃ ou H
Metil- β -ciclodextrina randômica	RM- β -CD	CH ₃ ou H
Glicosil- β -ciclodextrina	G ₁ - β -CD	Glicosil ou H
Maltosil- β -ciclodextrina	G ₂ - β -CD	Maltosil ou H
Hidroxietyl- β -ciclodextrina	HE- β -CD	CH ₂ CH ₂ OH ou H
Hidroxiopropil- β -ciclodextrina	HP- β -CD	CH ₂ CHOHCH ₃ ou H
Sulfobutiléter- β -ciclodextrina	SBE- β -CD	(CH ₂) ₄ SO ₃ Na ou H

* as ciclodextrinas modificadas apresentam substituições em posições randômicas e com diferentes graus de substituições.

Fenômeno de Inclusão

Uma das mais importantes propriedades das ciclodextrinas é a habilidade em formar complexos de inclusão (hóspede-hospedeiro) com uma grande variedade de substâncias sólidas, líquidas e gasosas, através de inclusão molecular (Szejtli, 2003). Nestes complexos (Figura 4), a molécula hóspede é inserida parcial ou completamente na cavidade da molécula de ciclodextrina, sendo a formação do complexo muito influenciada pelas propriedades dimensionais da molécula hospedeira (cavidade das ciclodextrinas) e da molécula hóspede (Li & Loh, 2008).

Introdução

De fato, a habilidade das ciclodextrinas em formar complexos de inclusão com moléculas hóspede é determinada por dois fatores. O primeiro é estérico, ou seja, depende da relação entre o tamanho da cavidade da ciclodextrina e o tamanho da molécula hóspede. O segundo e mais crítico fator refere-se as interações termodinâmicas entre os diferentes componentes do sistema (ciclodextrina, molécula hóspede, solvente).



Figura 4: Representação esquemática da formação de um complexo de inclusão.

Para que uma molécula hóspede se insira na cavidade das ciclodextrinas é necessário deslocar as moléculas de água do seu interior, ocorrendo uma associação apolar-apolar e, conseqüentemente, resultando em um estado termodinamicamente mais favorável ou de menor energia (French, 1957).

As interações entre compostos e ciclodextrinas não são fixas ou permanentes e sim um equilíbrio dinâmico das espécies (livres e incorporadas), sendo que as forças de associação dependem de interações locais específicas entre as superfícies atômicas destas moléculas.

Os complexos podem ser formados em solução ou no estado cristalino, sendo a molécula de água um típico solvente de escolha. A inclusão em

Introdução

ciclodextrinas exerce profundos efeitos nas propriedades físico-químicas da molécula hóspede, fornecendo benéficas modificações nesta, não presentes anteriormente (Muñoz-Botella *et al.*, 1995).

Sendo assim, o número de unidades de glicose para formar os três tipos de ciclodextrina, determina o diâmetro da cavidade e seu volume. Baseado nestas dimensões, as α -ciclodextrinas podem tipicamente complexar moléculas com baixa massa molar ou compostos com cadeias alifáticas. Já as β -ciclodextrinas podem incluir compostos com anéis aromáticos e heterocíclicos e as γ -ciclodextrinas pode acomodar grandes moléculas, como macrociclos e esteróides (Li & Loh, 2008).

Em geral, existem quatro interações energéticas favoráveis que deslocam o equilíbrio no sentido de formação de complexos de inclusão (Figura 4):

- A remoção de moléculas polares de água da cavidade apolar das ciclodextrinas.
- O aumento no número de ligações de hidrogênio na água, formadas pela remoção das moléculas de água da cavidade interna para o meio aquoso.
- A redução das interações repulsivas entre a molécula hóspede (hidrofóbica) e o ambiente aquoso.
- O aumento nas interações hidrofóbicas quando as moléculas hóspedes se inserem na cavidade apolar das ciclodextrinas.

Enquanto as interações iniciais para que ocorra a formação do complexo são muito rápidas (alguns minutos), o equilíbrio pode demorar muito tempo para se alcançado (horas, dias). No entanto, uma vez inserida na cavidade interna das ciclodextrinas, a molécula hóspede provoca ajustes conformacionais, de forma a aumentar o número de interações fracas do tipo van der Waals (Del Valle, 2004) o que favorece a formação do complexo.

Introdução

Diversas estequiometrias de complexação podem ser encontradas; dentre elas as mais comuns são a 1:1 e 1:2 ligante:ciclodextrina (French, 1957; Schmid, 1989; Pinto *et al.*, 2005; de Jesus *et al.*, 2006), como exemplificadas na Figura 5. No entanto outras possibilidades de estequiometria também são possíveis, mesmo em um único sistema, como 2:1, 2:2 (ligante:ciclodextrina) e outras mais complexas (French, 1957; Schmid, 1989; Pinto *et al.*, 2005; de Jesus *et al.*, 2006).

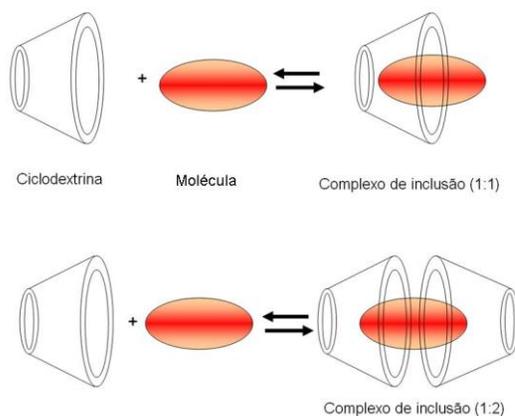


Figura 5: Exemplos de estequiometrias para complexos de inclusão: A) 1:1, B) 1:2, ligante:ciclodextrina.

A interação molecular pode ser avaliada por modificações nas propriedades tanto da molécula hospedeira como da molécula convidada e pode ser detectada por diversas técnicas como fluorescência, espectroscopia UV-Vis, Ressonância Magnética Nuclear (RMN), infravermelho, entre outras. Além disso, a reatividade da molécula é alterada, sendo que, na maioria dos casos a reatividade do ligante diminui, dando estabilidade maior para a molécula convidada.

No entanto, os grupamentos hidroxila da porção externa da molécula de ciclodextrina são capazes de formar complexos de não-inclusão com outras moléculas, assim como acontece com polissacarídeos e oligossacarídeos não cíclicos,

Introdução

capazes de formar, com compostos lipofílicos, complexos solúveis em água. Por exemplo, α -CD é capaz de formar complexos de inclusão e não-inclusão com ácidos dicarboxílicos e estes dois tipos de interação coexistem em solução (Szejtli, 2003). Isso pode exemplificar o fato de que, em alguns casos, o valor da constante de equilíbrio de formação do complexo seja dependente da concentração de CD, sendo seu valor numérico relacionado ao método utilizado para avaliar a formação do complexo de inclusão (Szejtli, 2003).

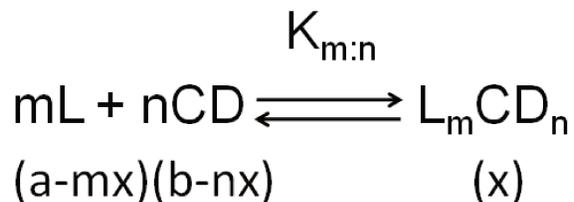
Equilíbrio no Fenômeno de Inclusão

Em solução, as moléculas hóspedes com geometria e polaridade apropriadas são capazes de formar complexos de inclusão dinâmicos em ciclodextrinas. Este equilíbrio de complexação pode ser descrito através da constante de estabilidade, também conhecida como constante de equilíbrio (K_c) ou constante de associação (K_a) (Davis & Brewster, 2004).

Muitos métodos para determinação dos valores da constante de associação são baseados em mudanças das propriedades físico-químicas do composto hóspede. As medidas de valores de K_a podem ser determinadas por: solubilidade aquosa (Brewster *et al.*, 1989; Hussain *et al.*, 1993; Fraceto *et al.*, 2007), reatividade química (Lineweaver & Burk, 1934; Siguroardottir & Loftsson, 1995), absortividade molar e outras propriedades óticas (Bettinetti *et al.*, 1989; Bekers *et al.*, 1990; Xiang & Anderson, 1990; Adachi *et al.*, 1992), mudanças de deslocamento químico em espectros de Ressonância Magnética Nuclear (Nishijo *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1992), medidas de solubilidade de fases (Easton & Lincoln, 1999), medidas de variação de pH (Higuchi & Connors, 1965), titulação calorimétrica (Boudeville & Burgot, 1995), cromatografia líquida (Uekama *et al.*, 1978; Moraes *et al.*, 2007; Grillo *et al.*, 2008), etc.

Introdução

A constante de associação, sendo expressa como $K_{m:n}$ para indicar a melhor razão estequiométrica do complexo formado, pode ser descrita como:



onde, L, CD e $L_m CD_n$ referem-se à molécula ligante, ciclodextrina e complexo, respectivamente; m e n são as proporções estequiométricas para formação de complexo. Considerando “a” e “b” as concentrações iniciais de ligante e ciclodextrina, respectivamente, (a-mx), (b-nx) e (x) representam as concentrações das espécies (ligante, ciclodextrina e complexo, respectivamente), no equilíbrio.

$$K_{\text{associação}} = K_{m:n} = \frac{[x]}{[a - mx]^m \cdot [b - nx]^n} \quad (1)$$

Um dos métodos mais usuais para a determinação desta constante é a solubilidade de fases, descrito por Higuchi & Connors (1965). A análise, através deste método, envolve o efeito do solubilizante (ciclodextrina) no comportamento da solubilidade do ligante de interesse.

Experimentalmente, o ligante é adicionado em excesso, em vários recipientes, com concentrações crescentes de ciclodextrina. Estes recipientes são agitados à temperatura constante, até que o equilíbrio seja atingido (até que não haja mais variação no aumento da solubilidade da molécula hóspede). O ligante sólido (não solubilizado) é então removido e a concentração total de ligante solubilizado pode ser determinada. A isoterma de solubilidade (Figura 6) é construída através de um

Introdução

gráfico de concentração molar total solubilizada do ligante de interesse (eixo y) em função da concentração de ciclodextrina (eixo x).

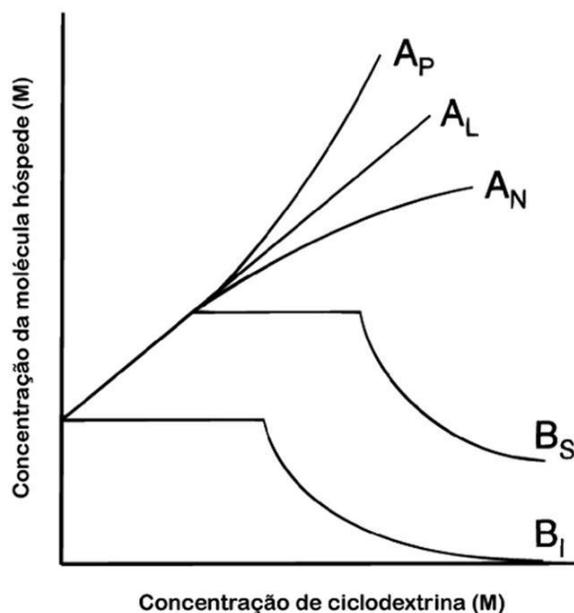


Figura 6: Tipos de relações de solubilidade de fases em complexos ligante:ciclodextrina.

Os diagramas de solubilidade obtidos a partir deste experimento são classificados em dois tipos: A e B. As curvas tipo A são indicativas de formação de complexos solúveis, enquanto comportamentos do tipo B sugerem a formação de complexos com baixa solubilidade.

Respostas do tipo B_S indicam complexos com limitada solubilidade e curvas do tipo B_I são indicativas de complexos insolúveis. As curvas do tipo A são subdivididas em: A_L (aumento linear da solubilidade do composto em função da concentração de ciclodextrina), A_P (isoterma com desvio exponencial positivo) e A_N (isotermas com desvio exponencial negativo).

Para complexos solúveis (de estequiometria 1:1), com isotermas do tipo A_L, a constante de associação pode ser obtida através da solubilidade inicial (S₀) do

Introdução

composto de interesse e da inclinação da reta obtida pelo diagrama de solubilidade como descrito por (Easton & Lincoln, 1999) e representado pela Equação 2.

$$K_a = \frac{\text{inclinação}}{S_o \cdot (1 - \text{inclinação})} \quad (2)$$

Caracterização dos Complexos

A caracterização físico-química dos complexos de inclusão se dá através da determinação de, pelo menos, três características: 1) estequiometria de complexação, 2) constante de estabilidade e 3) geometria do complexo.

A determinação da estequiometria de complexação é o primeiro passo da caracterização físico-química dos complexos de inclusão, uma vez que as outras propriedades dependem dessa informação para serem determinadas. O método clássico para determinação da estequiometria é dado pela técnica de variação contínua, ou *Job Plot* (Job, 1928; Huang, 1982). Nesta técnica quaisquer valores experimentais que sejam influenciados pela formação do complexo são determinados em diferentes razões molares (hóspede:hospedeiro), mantendo-se sempre a soma das frações constante. Os valores do produto da fração molar do hóspede pela variação induzida pela complexação são analisados em função da fração molar da molécula hospedeira (CD). A razão da fração molar ($X_{\text{hóspede}}:X_{\text{hospedeiro}}$) que apresentar maior variação do efeito avaliado indica a estequiometria do complexo formado. Diversas técnicas podem ser utilizadas para determinar a estequiometria, como: dicroísmo circular (Nakamura & Inoue, 2003; Mieusset *et al.*, 2004;) e RMN (Nakamura & Inoue, 2003; Fielding, 2003; Dodziuk *et al.*, 2004; de Jesus *et al.*, 2006; Moraes *et al.*, 2007; Grillo *et al.*, 2008) e fluorescência (Schmid, 1989; Loukas, 1997; Liu *et al.*, 2006).

Introdução

Outra característica importante para estudo de complexos de inclusão é a determinação da constante de associação e, para sua determinação, mudanças nas propriedades físico-químicas do composto hóspede são medidas. As medidas de valores de K_a podem ser obtidas por experimentos de: solubilidade aquosa (Brewster *et al.*, 1989; Hussain *et al.*, 1993; Fraceto *et al.*, 2007), reatividade química (Lineweaver & Burk, 1934; Siguroardottir & Loftsson, 1995), absorvidade molar e outras propriedades óticas (Bettinetti *et al.*, 1989; Bekers *et al.*, 1990; Xiang & Anderson, 1990; Adachi *et al.*, 1992), mudanças de deslocamento químico em espectros de RMN (Nishijo *et al.*, 1991; Schneider *et al.*, 1998; Fielding, 2003; Fernandes *et al.*, 2007), medidas de solubilidade de fases (Easton & Lincoln, 1999), medidas de variação de pH (Higuchi & Connors, 1965), titulação calorimétrica (Boudeville & Burgot, 1995), cromatografia líquida (Uekama *et al.*, 1978; Moraes *et al.*, 2007; Grillo *et al.*, 2008), etc.

Uma terceira característica de grande importância é a geometria do complexo, uma vez que a maioria das moléculas que formam os complexos de inclusão com CDs está apenas parcialmente incluída na cavidade. Para a determinação da geometria tem sido útil o uso de ferramentas teóricas, como modelagem molecular, com a confirmação dos resultados através de experimentos de RMN ou mesmo a determinação da estrutura cristalina de complexos de ciclodextrinas, por técnicas de difração de raios-X. Em solução, a única técnica capaz de fornecer informações sobre a geometria de complexação é a RMN, através de medidas de efeito nuclear Overhauser (Schmid, 1989; Kodaka, 1998).

Preparo de Complexos

Vários métodos e técnicas podem ser utilizados para o preparo de complexos de inclusão com ciclodextrinas, dentre eles destacam-se:

Introdução

- Método de co-precipitação

Este é o método mais utilizado em laboratório. Consiste na solubilização da ciclodextrina em água e o composto a ser incorporado é adicionado enquanto a solução de ciclodextrina está sob agitação. A concentração de ciclodextrina utilizada neste caso é bastante alta e, após a formação do complexo em solução, esta é resfriada, o que faz com que ocorra a precipitação do complexo. Este precipitado pode ser coletado por decantação, filtração ou centrifugação. O precipitado é então lavado com pequenas quantidades de água ou outro solvente miscível em água, como álcool etílico, metanol ou acetona, previamente testado e escolhido para cada complexo (Loftsson *et al.*, 1993; Pitha & Hoshino, 1992; Hedges, 1998).

- Método de complexação por agitação

Neste método não é necessário dissolver os compostos completamente para formar o complexo de inclusão. A ciclodextrina pode ser adicionada em água em concentrações acima de 50-60%, sob agitação. A fase aquosa está, desta forma, saturada com ciclodextrina em solução. As moléculas hóspedes irão formar complexos com ciclodextrinas em solução e o complexo satura a fase aquosa, de forma que este irá formar cristais ou reprecipitar. Mais cristais de ciclodextrina irão dissolver e continuar a saturar a fase aquosa, para formar o complexo que irá precipitar/cristalizar para fora da fase aquosa, sendo que o complexo pode ser coletado da mesma forma descrita no método de co-precipitação (Hedges, 1998; Del Valle, 2004). O tempo necessário para completar a complexação é variável e depende das características da molécula hóspede, sendo necessária a determinação deste, para cada composto a ser estudado. Normalmente este método de preparo de complexos é realizado à temperatura ambiente, porém para alguns compostos é necessário aquecimento para que ocorra um aumento na taxa de formação do

Introdução

complexo. No entanto, é preciso ter muito cuidado com o aquecimento, que pode desestabilizar o complexo, impedindo que a reação de complexação ocorra. A principal vantagem deste método é a redução na quantidade de água necessária, bem como o tamanho do reator a ser utilizado (Hedges, 1998; Del Valle, 2004).

- Método de complexação pastosa

Este método é uma variação do método de agitação, onde somente uma pequena quantidade de água é adicionada para formar uma pasta, a qual é misturada com ciclodextrina, usando-se um almofariz e pistilo. O tempo necessário para a complexação depende das características da molécula hóspede. O complexo resultante deste método pode ser seco ou lavado com pequenas quantidades de água e coletado por filtração ou centrifugação. A pasta formada, em alguns casos pode secar e formar uma massa dura ao invés de um pó fino. Isto depende do composto a ser incorporado e da quantidade de água usada na pasta. Geralmente a massa dura pode ser seca completamente e moída para obtenção de um complexo na forma de pó (Hedges, 1998; Del Valle, 2004).

- Método de mistura úmida e aquecimento

Este método de preparo de complexo é realizado com muito pouca água ou, em alguns casos, sem adição desta. A quantidade de água pode variar de acordo com a quantidade de água de hidratação das ciclodextrinas e composto hóspede podendo alcançar entre 20-25% em uma base seca. Esta quantidade de água é tipicamente encontrada no filtrado obtido pelos métodos descritos acima. O composto hóspede e a ciclodextrina são misturados cuidadosamente e colocados em um recipiente selado. Este recipiente e seu conteúdo são aquecidos até 100 °C e então o conteúdo interno é removido e seco. A quantidade de água a ser adicionada, o grau de mistura e o tempo de aquecimento tem que ser otimizados para cada composto (Hedges, 1998; Del Valle, 2004).

Introdução

- Método de co-solubilização

Este método consiste inicialmente na solubilização da molécula hóspede em solvente orgânico miscível em água (exemplo, etanol, acetona) seguido da mistura deste em uma solução aquosa contendo ciclodextrina. Este sistema é mantido sob agitação até que seja atingido o equilíbrio e o complexo esteja solúvel. O tempo para que seja atingido o equilíbrio depende das características físico-químicas da molécula hóspede e deve ser determinado para cada situação. Após esta etapa o solvente é removido totalmente sob baixa pressão, resultando em um filme seco que é ressuscitado em água, no volume desejado, sendo liofilizado e armazenado para utilização futura (de Azevedo *et al.*, 2000; Pinto *et al.*, 2005).

Resultados

Os resultados desta primeira parte da tese, envolvendo riboflavina em ciclodextrinas, serão apresentados na forma de um trabalho científico, em fase de revisão para ser submetido à publicação e que descreve a formação de um complexo de não-inclusão entre RF e β -CD e entre RF e HP- β -CD, além da sua eficiente aplicação contra células de câncer de próstata (PC3).

**Riboflavin–Cyclodextrin Non–Inclusion
Complexes: Characterization and Effect in
Prostate Cancer Cells Death Induction**

Marcelo Bispo de Jesus¹, Leonardo Fernandes Fraceto², Carmen Veríssima Ferreira¹,
Eneida de Paula^{1*}

¹Department of Biochemistry, Institute of Biology, CP 6109, State University of
Campinas – UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

²Department of Environmental Engineering, State University of São Paulo,
Sorocaba, São Paulo, Brazil

*e-mail: depaula@unicamp.br

ABSTRACT

Despite the progress of chemotherapeutic protocols, cancer can be considered the most difficult disease to conquer. Among the several types of cancer, prostate cancer is the most prevalent in male, being the second cause of death in man. Therefore, new anticancer agents are needed, mainly those with low side effects. Recently our research group has demonstrated that irradiated riboflavin (RF) induces leukemia and prostate cancer cells death. However, to face the relative low solubility of RF and its photosensitivity we decided to prepare complexes of this vitamin with β -cyclodextrin and its hydroxypropyl substituted derivative. Characterization of the RF association to both cyclodextrins was carried out by UV-Vis absorption, fluorescence and NMR techniques that indicated an unusual interaction, i.e., non-inclusion complexation. The interaction with cyclodextrins increased RF solubility and improved its antitumoral action towards prostate cancer cells. Our findings indicate that RF:cyclodextrin non-inclusion complexes might be useful for improving RF concentration into cancer cells, and consequently to potentiate the antitumoral effect of the vitamin.

INTRODUCTION

Prostate cancer is the most common neoplasia in man and can be considered as a public health problem (Jemal *et al.*, 2007; Teillac and Mongiat-Artus, 2007). The Brazilian National Institute of Cancer (INCA) estimates that there will be 49,530 prostate cancer diagnoses in Brazil in 2008 (INCA, 2008). The clinical management of prostate cancer remains highly challenging and novel adjuvant strategies are urgently required.

We have previously shown that both in leukaemia and prostate cancer, the photoproducts of riboflavin (RF) act through the activation of FasL-Fas-dependent

Resultados

signalling, which in addition to diminished survival signalling seems to be responsible for the antitumoral action of RF (Souza *et al.*, 2006; Queiroz *et al.*, 2007). Another important finding regards the importance of riboflavin to inhibit tumorigenesis, as described by Figueiredo *et al.*, 2008. These authors examined the correlation between the dietary and circulating plasma levels of B vitamins and the risk of colorectal adenomas in humans, and they found that plasma riboflavin levels are inversely associated with the risk of advanced lesions, which is an indication of the preventive effect of RF against colorectal adenomas.

In this way riboflavin has a great pharmacological potential, taking into consideration its physiological role, relative low cost and the capacity to inhibit cancer cells proliferation. However, the relative low water solubility (Aniceto *et al.*, 2000; Bender, 2003; Ball, 2004) and photosensitivity of RF curbs its application.

To convey this limitation we decided to prepare complexes of RF and cyclodextrin (CD), since these cyclic oligosaccharides have been extensively described in the literature as successful *drug delivery* carriers to increase the solubility of (guest) amphiphile compounds, to diminish their effective doses, to decrease toxic side effects and to protect the compounds against dehydration, hydrolysis, oxidation and photodegradation. Such effects of CD complexation contribute for the improved the pharmaceuticals properties of many pharmaceutical drugs (Davis and Brewster, 2004; Challa *et al.*, 2005; de Jesus *et al.*, 2006).

In this paper, using different methodologies, we demonstrate that RF interacts with both β -cyclodextrin (β -CD) and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD), increasing its water solubility and antiproliferative action towards prostate cancer.

MATERIALS & METHODS

Riboflavin, benzocaine and β -CD were obtained from Sigma Chem. Co. and HP- β -CD (Kleptose HP®) was a kind gift from Roquette Serv. Tech. Lab. (Lestrem, Cedex, France).

Preparation of Riboflavin: β -CD and Riboflavin:Hydroxypropil- β -CD

To prepare RF:CD complexes, we have combined appropriate amounts of RF (300 μ M) and equivalent molar fractions of cyclodextrins (β -CD or HP- β -CD), in water. Solutions were mixed for 3 h to assure the equilibrium and the samples were freeze dried and lyophilized for storage (at -20 °C) and further use.

A pure RF sample was also submitted to freeze-drying, in order to serve as control for the biological tests. All samples were stored and technical procedures were conducted in darkness, to prevent RF photodegradation.

Kinetics of complexation

To follow the kinetics of complexation 1mM solutions of RF were added to β -CD or HP- β -CD, up to 1:15 and 1:120 (RF:CD molar ratios), respectively; the samples were kept under agitation, at 25 °C. Complex formation was followed by changes in the absorption spectra of RF at 374 nm.

Phase solubility isotherms

Solubility studies were performed according to the methodology described by Higuchi and Connors (1965). Briefly, different CD amounts (0, 1, 2, 4, 8, 12, 16 mM for β -CD and 0, 10, 20, 40, 80, 120, 160 mM for HP- β -CD) were added to a saturated (1 mM) RF solution. Samples were kept under agitation for 3 h, for equilibrium (as determined by the kinectic experiments). Aliquots were filtered in 0.22 μ m membranes and RF quantification was spectrophotometric determined at 444 nm, accordingly to a previously determined analytic curve (absorbance = 0.012. concentration (M), $r = 0.999$). The experiments were carried out in triplicate.

Resultados

Fluorescence experiments

Samples of RF were excited at 374 nm and the emission was followed from 450 nm to 650 nm. Benzocaine (BZC) used as control for complexation, was excited at 284 nm and its emission was detected between 300 nm to 450 nm (Pinto *et al.*, 2000). Fluorescence spectra were recorded in a F-4500 (Hitachi, Japan) fluorimeter, using freshly prepared samples, at 25 °C.

Nuclear Magnetic Resonance

One and two-dimensional ^1H -NMR spectra were recorded at 20 °C on a Varian Inova 500 MHz (11.75 Tesla) belonging to the Brazilian Synchrotron Light Laboratory (LNLS/Campinas, SP). Samples of equivalent concentration (150 μM) of RF and β -CD or HP- β -CD were prepared in D_2O homogenized for 3 h and transferred afterwards, to 5 mm tubes for spectrum acquisition. The residual water peak (4.87 ppm) was considered as reference. No external references were employed to avoid possible interactions with β -CD (Matsui and Tukuraga, 1996).

Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY) experiments were carried out using the BPPSTE (Bipolar Pulse Pairs Stimulated Echo) sequence (Johnson Jr, 1999). The duration of the total diffusion-phase encoding the gradient pulse was 2 ms, the diffusion delay was 0.05 s and the minimum gradient strength was set to 0.3 Gauss/cm. The diffusion coefficients were measured for RF, β -CD and HP- β -CD alone, and for the 1:1 RF:CD complexes.

Longitudinal relaxation times were obtained by the conventional inversion-recovery technique (Schneider *et al.*, 1998) in RF and 1:1 RF: β -CD samples. Typical acquisition parameters consisted of 10-15 μs 90° pulses, 16 scans, 12 ppm window and 16 recovering time intervals; the recycling time was set to 5 times the largest T_1 (those of the aromatic protons of RF).

Resultados

The Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy (ROESY) experiments (Bax and Davies, 1985) were carried out using the standard pulse sequence of the equipment (Schneider *et al.*, 1998). Typical acquisition parameters were: magnetic field strength = 11.75 Tesla, 300 ms of mixing time, 2048 k in F2 and 324 increments, spectral window = 10 ppm. Data processing was conducted with NMRView and NMRpipe programs.

Cell culture

The PC3 cell line was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD) and it was routinely grown in RPMI 1640 medium (Sigma Chemical Co.) containing 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂.

Cell viability

Cells were incubated in 96-well plates until they reach the semiconfluence and then they were treated with different CDs, RF or RF:CDs complexes, for 24 h. Cell viability was assessed by the MTT reduction assay.

MTT reduction assay

The medium containing CDs, RF or RF:CDs complexes was removed and 0.1 mL of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) solution (0.5 mg/mL of culture medium) was added to each well. After incubation for 4 h at 37 °C, the medium was removed and the formazan crystals were solubilized in 0.1 mL of DMSO. The plate was shaken for 5 min. on a plate shaker and the absorbance was measured at 570 nm (Mosmann, 1983).

RESULTS & DISCUSSION

Riboflavin interaction with β-CD and HP-β-CD

Resultados

Initially the kinetics of complexation was followed through changes in RF absorbance (at 444 nm), for an 8 h period. Changes were not registered after the first hour, suggesting a fast solubilization between riboflavin and both CDs (data not shown). Afterwards, phase solubility experiments (Higuchi and Connors, 1965) were conducted, as shown in Fig. 1.

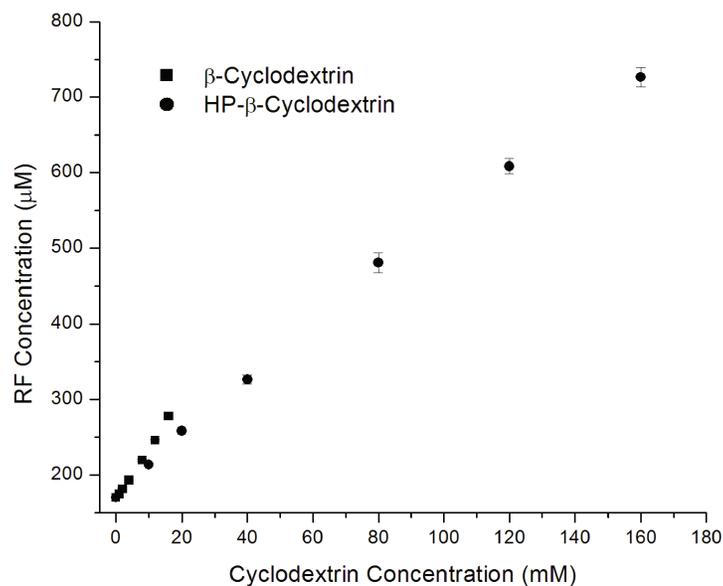


Figure 1 Phase-solubility diagrams of RF in β -CD (■) and HP- β -CD (●) at 25 °C (n=3).

In the case of β -CD, its limited water solubility did not allow the experiments to be conducted at concentrations higher than 16 mM. The solubility isotherms in Fig.1 reveal a linear increase in RF solubility with addition of either β -CD or HP- β -CD, suggesting a first order and a 1:1 stoichiometry of complexation. Nevertheless, Loftsson *et al.* (2005) have shown that solubility isotherms are not conclusive to describe the mode of complexation, since CDs are able to form non-inclusion complexes and aggregates, which can solubilize guest molecules in micelle-like structures. RF's solubility increased 1.6 (up to 16 mM) and 4.2 times, in the presence of β -CD and HP- β -CD, respectively (Fig. 1).

Resultados

Wang and Chen (1996) used the slight changes in RF emission spectra observed in the presence of β -CD to determine the association constant between them as 230 M^{-1} at 25° C ; these authors also proposed a 1:1 RF: β -CD stoichiometry of complexation. Loukas and coworkers (1996), using fluorescence spectroscopy have shown that HP- β -CD protects Riboflavin-5-phosphate from photodecomposition. Additionally, they determined an RF:HP- β -CD association constant of 3321 M^{-1} , what would indicate the formation of a rather stable complex (Loukas *et al.*, 1996).

From the solubility isotherms in Fig. 1 and considering a 1:1 stoichiometry of complexation, we have determined low association constants for RF in β -CD (39.7 M^{-1}) and HP- β -CD (20.6 M^{-1}).

The interaction of RF with both CDs was investigated through changes in the UV-Vis absorption spectrum (Fig. 2), which could provide information about transfer of guest molecules from water to the apolar cavity of CD (Beckers *et al.*, 1991).

Resultados

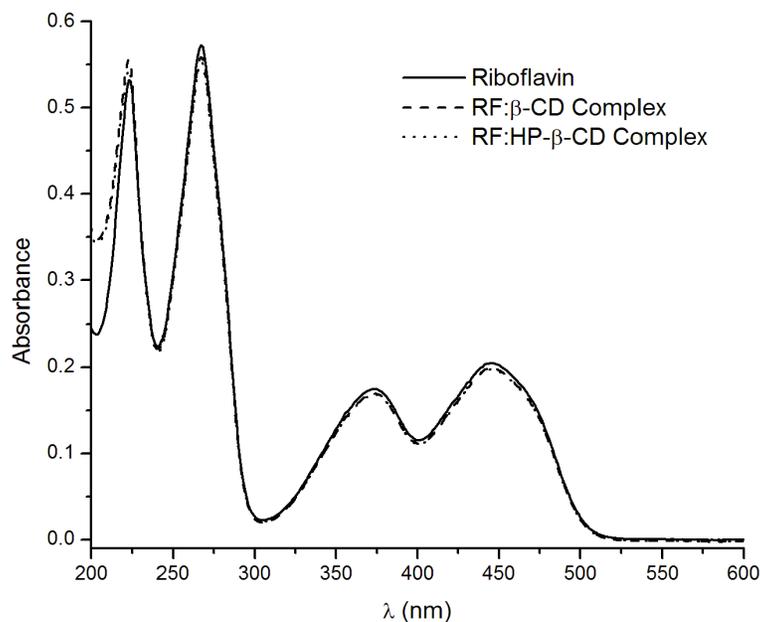


Figure 2 UV-VIS absorption spectra of RF (10 μ M), in the presence of equivalent β -CD or HP- β -CD concentrations; (n=3).

A slight decrease in RF absorption for the peaks at 266 nm, 374 nm and 444 nm was observed, in agreement with the previous observation of Wang and Chen (1996). Besides these authors also found a hypsochromic change in the 374 nm peak of RF, leading them to propose that RF absorption properties in the presence of CDs were compatible to those observed in an ethanol solution.

We have also investigated the intrinsic fluorescence of RF in the presence of β -CD and HP- β -CD but no evidence of inclusion complex formation was taken from those experiments (Fig. 3 and 4). For the sake of comparison, we have included (panel B of Fig. 3 and 4) results obtained with the local anesthetic BZC, which inclusion complex with β -CD has been described (Pinto *et al.*, 2005).

Resultados

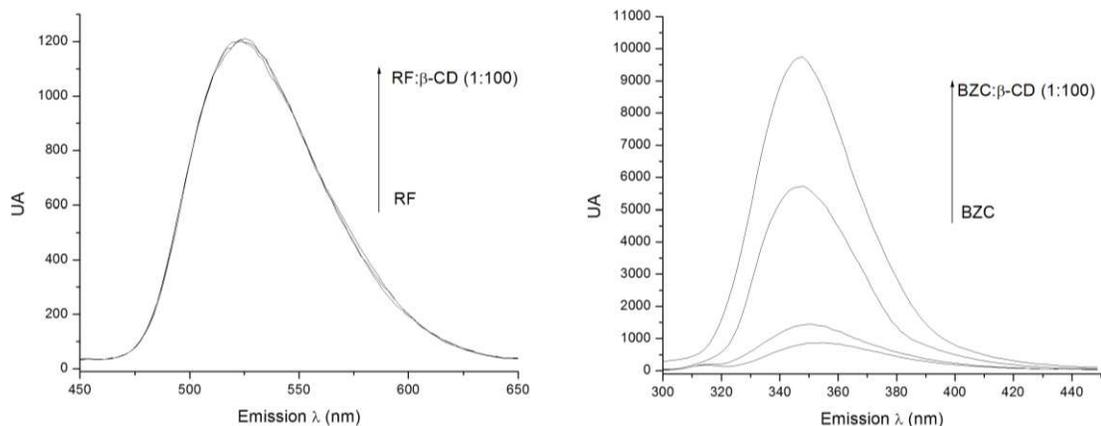


Figure 3 Fluorescence emission spectra of RF (10 μM) in the absence and presence of β-CD (1:1 and 1:100 RF:CD molar ratio); B) BZC (10 μM) in the absence and presence of β-CD (1:1, 1:10 and 1:100 BZC:CD molar ratio).

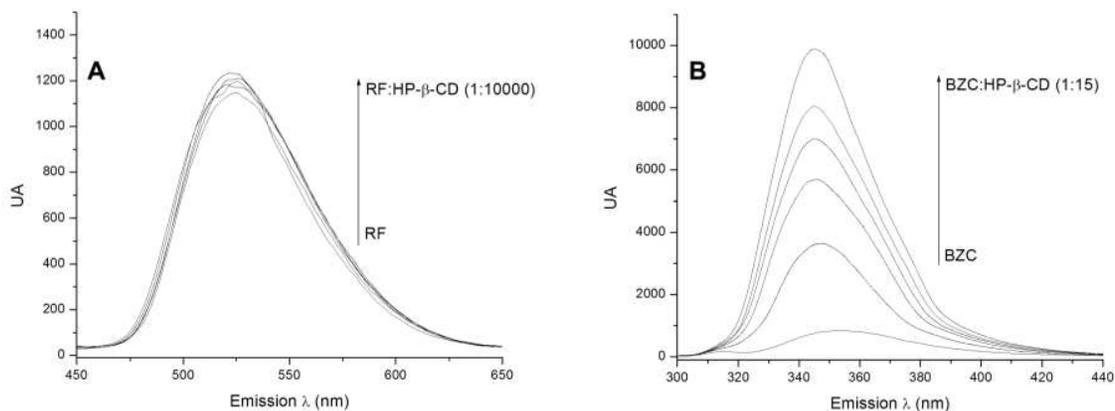


Figure 4 Fluorescence emission spectra of A) RF (10 μM) in the absence and presence of HP-β-CD (1:1, 1:10, 1:100 and 1:1000 RF:CD molar ratio); B) BZC (10 μM) in the absence and presence of HP-β-CD (1:3, 1:6, 1:9, 1:12 and 1:15 BZC:CD molar ratio).

We have previously demonstrated, using different methodological approaches, that BZC forms a stable ($K_a = 549 \text{ M}^{-1}$) inclusion complex with β-CD, in a 1:1 stoichiometry. In the presence of higher concentrations of β-CD (Fig. 3b) and HP-β-CD (Fig. 4b) BZC shows an increase in its fluorescence intensity and a significant hypsochromic change in the wavelength of maximal fluorescence, as a

Resultados

result of its insertion into the β -CD cavity (Pinto *et al.*, 2005). In contrast, RF fluorescence was not significantly affected in the presence of any of the CDs.

In spite of the solubility enhancement effect of CDs upon RF, the different behavior of RF and BZC after β -CD (Fig 3) and HP- β -CD (Fig 4) addition in the fluorescence experiments led us to suggest that RF does not form inclusion complexes with CDs. Moreover it is worthwhile to note that RF does show an increase in its fluorescence quantum yields and a significant change in the wavelength for maximal fluorescence in apolar environments (data not shown).

There are many reports in the literature on the formation of non-inclusion complexes involving CDs (Storsberg *et al.*, 2000; Loftsson *et al.*, 2002; Magnúsdóttir *et al.*, 2002; Duan *et al.*, 2005; Loftsson *et al.*, 2005; Hazekamp *et al.*, 2006) and, according to Loftsson *et al.* (2005), the single observation of enhanced solubility of the guest compound is not enough to prove the formation of inclusion complexes with CDs. Instead, evidences from other methodological approaches such as spectroscopic (UV-Vis absorption, fluorescence and Nuclear Magnetic Resonance) methods are required to provide molecular details on the guest-CD interaction.

These results led us to try different $^1\text{H-NMR}$ approaches, searching for molecular evidences on the guest-host interaction (de Jesus *et al.*, 2006; Cabeça *et al.*, 2008; de Araújo *et al.*, 2008; Grillo *et al.*, 2008).

The $^1\text{H-NMR}$ spectrum and assignment of riboflavin peaks in D_2O are given in Fig 5 and Table 1. Peak assignment is in good agreement with the literature (Edwards *et al.*, 1999; Chienthavorn *et al.*, 2004).

In the presence of β -CD no significant changes in the chemical shift of RF (or β -CD) hydrogens were detected (Table 1), in accordance with UV-Vis (Fig. 2) and fluorescence (Figs 3, 4) results. Similar results were found with HP- β -CD (data not shown).

Resultados

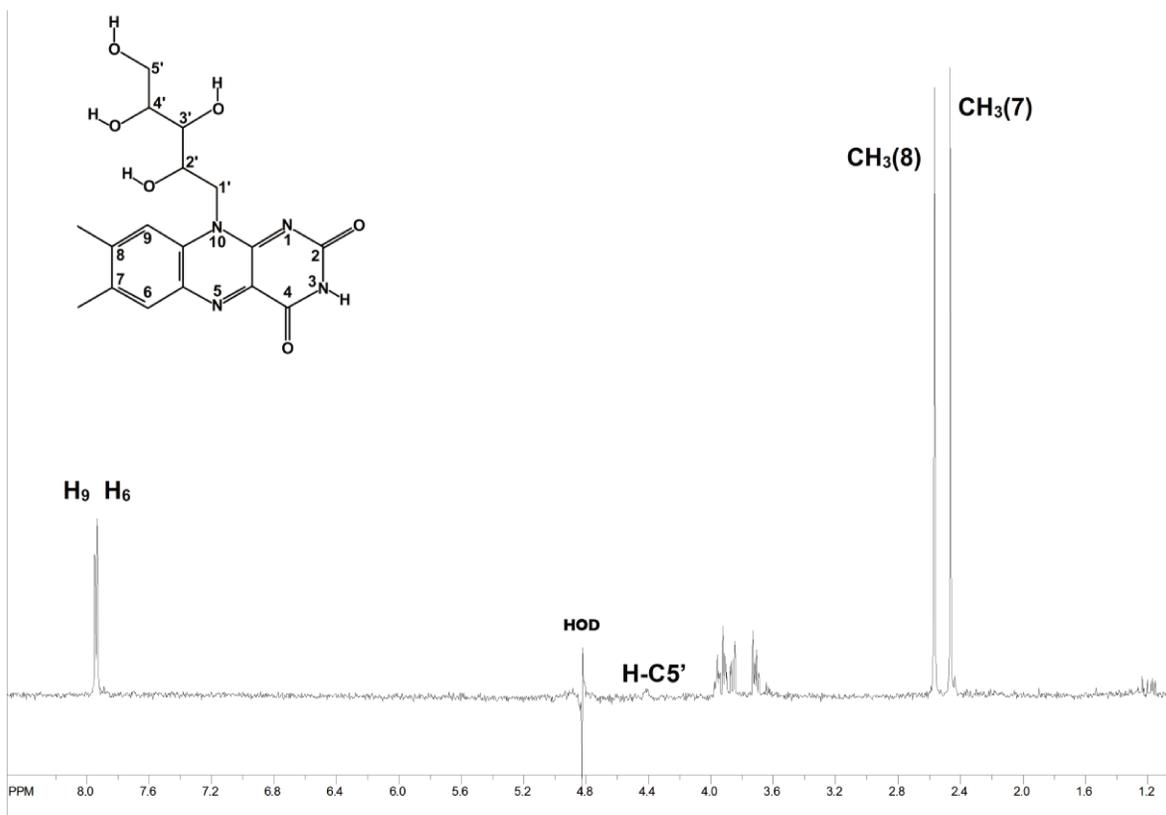


Figure 5 ¹H-NMR spectra of RF (150 μM) in D₂O, at 20 °C, 500 MHz.

The lack of changes in ¹H-NMR chemical shifts (Table 1), mainly in the H₃ and H₅ peaks of CDs, which are known to monitor the CD cavity interior (Pinto *et al.*, 2005; Moraes *et al.*, 2007; Grillo *et al.*, 2008) is a strong evidence that RF does not form an inclusion complex with neither β-CD nor HP-β-CD.

Resultados

Table 1: ^1H -NMR Chemical shift of RF (0.15 mM) hydrogens and β -CD (0.15 mM) in D_2O , at 20°C , 500 MHz. Assignment of RF and CD as in Figure 5 and Pinto *et al.* (2005), respectively.

RF				β -CD			
^1H	In D_2O	with β -CD	Δ (ppm)	^1H	In D_2O	with RF	Δ (ppm)
7- CH_3	2.41	2.43	0.03	H_4	3.56	3.55	0.01
8- CH_3	2.52	2.53	0.01	H_2	3.62	3.61	0.01
1'-4'	3.6-4.0	n.d.	n.d.	H_5	3.84	3.84	0.00
5'	4.4	4.4	0.00	H_6	3.85	3.85	0.00
6	7.93	7.92	0.01	H_3	3.94	3.93	0.01
9	7.94	7.92	0.02	H_1	5.05	5.04	0.01

n.d. values not determined due to overlapping peaks in this region.

T_1 values are known to be strongly affected by the local environment of the nucleus, decreasing as far as it interacts with the molecular net around it (Macomber, 1998); this causes the longitudinal relaxation times of guest compounds to decrease, upon complexation with CDs (Fraceto *et al.*, 2007; Grillo *et al.*, 2008). The results in Fig. 6 revealed no changes in T_1 values of the methyl group hydrogens of the aromatic atoms 7, 8 nor in the other aromatic hydrogens (at carbons 6 and 9) of RF. Peak superposition did not allow the precise measurement of T_1 values for the ribitol RF hydrogens.

Resultados

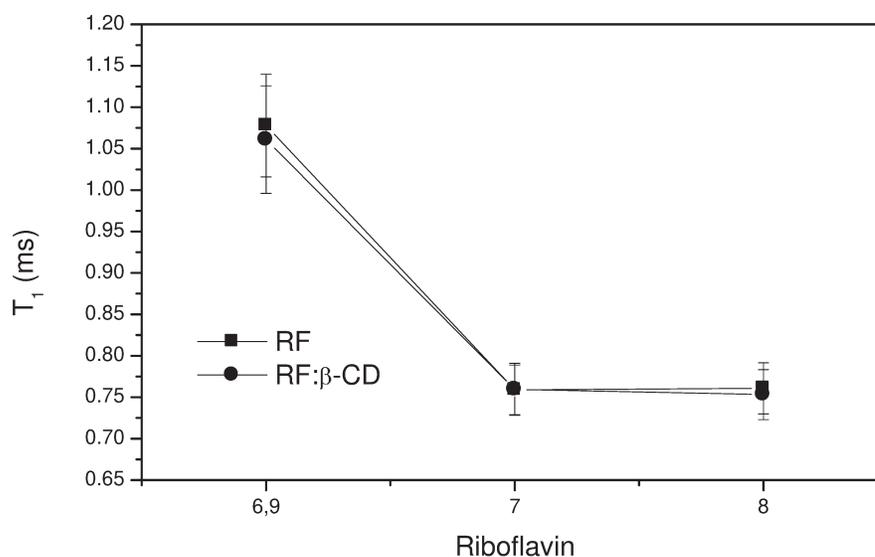


Figure 6 Longitudinal relaxation times (T_1 , ms) of the aromatic RF hydrogens, in D_2O and in the presence of β -CD. Assignment as in Figure 5.

Another very useful NMR tool to detect guest/host complex formation is the Diffusion Ordered Spectroscopy (DOSY). The diffusion coefficient is a microscopic parameter that reflects molecular collision, solute-solute and solvent-solute interactions being straightforward to unravel structural modifications (intra or intermolecular interactions) in colloidal or macromolecular systems in solution (Morris and Johnson, 1992; de Souza and Laverde Jr.; 2002, Cabeça *et al.*, 2008).

The diffusion coefficient (mean \pm SD) of RF alone ($3.23 \pm 0.16 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) and in the presence of β -CD ($3.13 \pm 0.14 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) and HP- β -CD ($3.15 \pm 0.14 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$) were determined through DOSY. Minor changes in the diffusion coefficient of RF were detected in the presence of β -CD or HP- β -CD, in clear opposition with the results obtained when guest-host inclusion complexes are formed (de Souza and Laverde Jr., 2002; Cabeça *et al.*, 2008).

Resultados

To conclude we have employed the nuclear Overhauser (ROESY) experiment in order to check for dipolar-dipolar (through the space) interactions between RF and CDs. The ROESY technique has been found very useful to characterize guest-host interactions (Spamer *et al.*, 2002; Pinto *et al.*, 2005; de Jesus *et al.*, 2006), giving details on the topology of the inclusion complexes (Pinto *et al.*, 2005; de Jesus *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2007).

Fig. 7 shows expansions of the ROESY spectra of RF in the presence of β -CD (A) and HP- β -CD (B). The aromatic hydrogens H₆ and H₉ as well as ribitol hydrogens of RF (see assignment in Fig. 5) interact with the H₁ hydrogens of β -CD, which are placed in the external face of the cyclodextrin macrocyclic ring (Fig. 7A). The aromatic H₆ and H₉ hydrogens of RF also show intermolecular crosspeaks with residual water hydrogens, at 4.9 ppm. Identical crosspeaks were determined between RF and HP- β -CD (Fig 7B), in addition to an extra crosspeak, between the ribitol hydrogens and H₈ of HP- β -CD, belonging to the hydroxypropyl substituent, in the ring external face.

Moreover but less important, intramolecular interactions (riboflavin:riboflavin) NOEs were detected between the aromatic (H₆, H₉) and ribitol hydrogens of the RF molecule in presence of β -CD (Fig. 7A) revealing dynamics of the riboflavin molecule. In the case of HP- β -CD (Fig. 7B) intramolecular NOEs include aromatic (H₆, H₉ vs. ribitol and N(3)-H vs. ribitol) hydrogens of the RF molecule.

Resultados

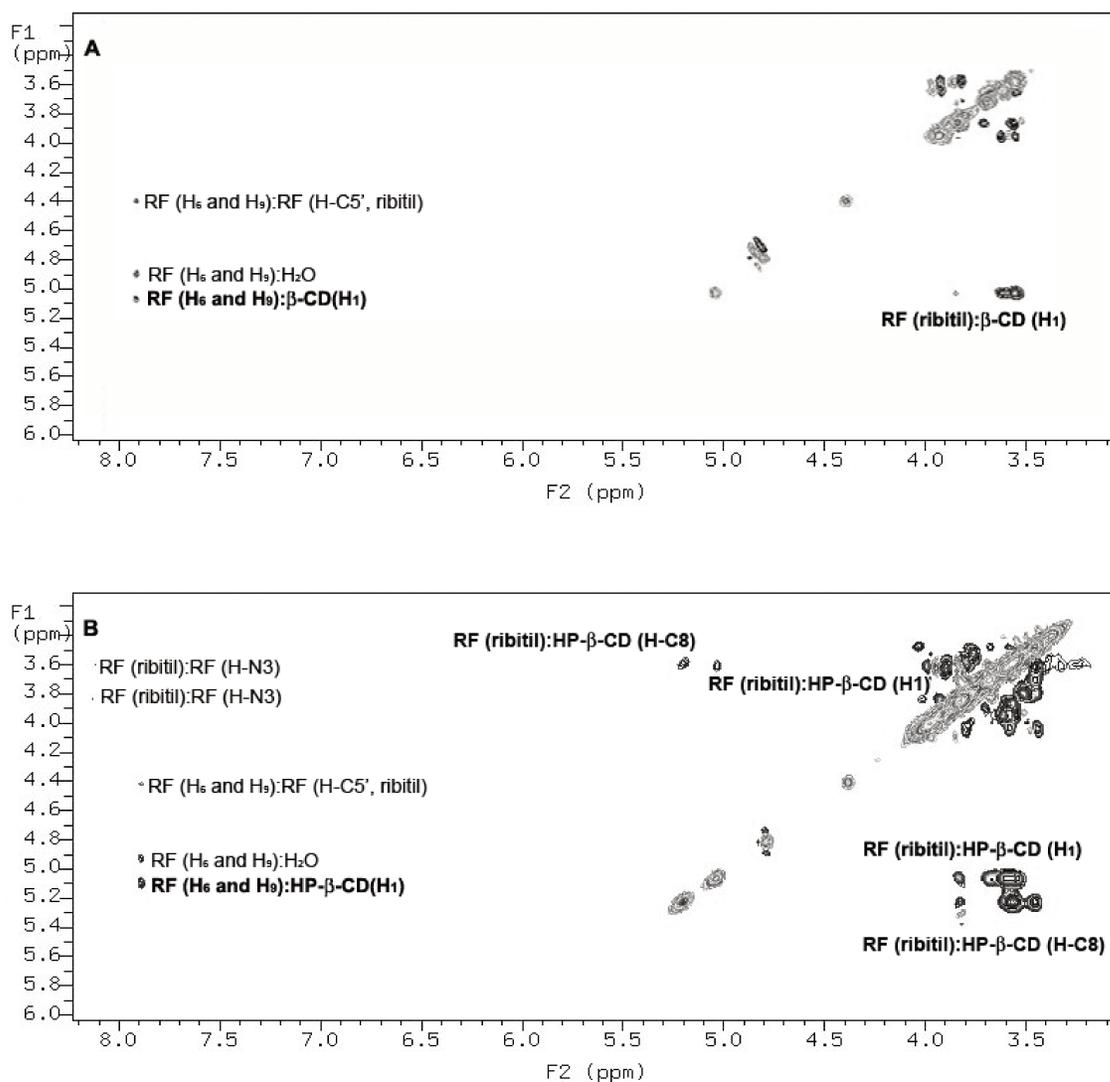


Figure 7 Expansion of the bidimensional ¹H-NMR ROESY spectra of A) RF:β-CD, 1:1 molar ratio, 150 μM. B) RF:HP-β-CD, 1:1 molar ratio, 150 μM at 500 MHz, 20 °C, and mixing time=250 ms.

NOE results strongly support the idea that RF interacts with hydrogens on the external face of the macrocyclic CD rings, forming no inclusion complexes with β-CD or HP-β-CD. In fact, other reports in the literature show that, as for inclusion complexes formation, such non-inclusion interactions involving CDs are also able to induce changes in the solubility of the guest molecules (Storsberg *et al.*, 2000;

Resultados

Loftsson *et al.*, 2002; Magnúsdóttir *et al.*, 2002; Duan *et al.*, 2005; Loftsson *et al.*, 2005; Hazekamp *et al.*, 2006), as observed here for RF.

In a recent review on the pharmaceutical applications of CDs, Loftsson and Duchene (2007) gave a picture of the possible interactions between guest molecules and cyclodextrins other than the classic complexation into the cavity of CD. Hydroxyl groups on the external face of the CD ring or either on linear oligosaccharides, for instance, can form hydrogen bonds with lipophilic molecules, increasing their solubility. Aoyama *et al.* (1992) demonstrated that linear glucose oligomers interact with fluorescent probes (8-anilino-1-naphthalene sulfonate and 6-toluidino-2-naphthalene sulfonate) changing their fluorescence properties. These authors have also shown that the association constants of the fluorescent probes with cyclic heptamers were noticeable larger than with acyclic heptamers.

The capacity of CDs to form both inclusion and non-inclusion complexes with interacting molecules in solution helps to explain the concentration-dependence as well as the different values of the association constants determined by different methodologies (Loftsson and Duchene, 2007).

In light of the results described so far we conclude that RF does not form any inclusion complex with the internal cavity of β -CD or HP- β -CD. Nevertheless non-inclusion complexes are formed between RF and both CDs which act as co-solvents of the vitamin, increasing its water solubility and explaining the slight changes in UV-Vis and fluorescence spectra, as well as ROESY results.

Despite the unusual interaction between RF and CDs we have examined the effect of RF, CDs (β -CD or HP- β -CD) and RF:CDs non-inclusion complexes towards prostate cancer cells (PC3). PC3 is a fast growing cell type remarkably resistant to chemotherapeutic intervention. It is important to mention that the RF sample used here was also submitted to the same methodological procedure steps

Resultados

employed for preparing the non-inclusion complexes. Cyclodextrins are able to remove cholesterol from both raft and non-raft domains of cell membranes as well as to change the distribution of cholesterol between plasma and intracellular membranes (Zidovetzi and Levitan, 2007; Loftsson and Duchene, 2007). Therefore, CDs might have an influence on the cell physiology by affecting, for instance, the organization and function of receptors. In our tests, neither β -CD nor HP- β -CD present any toxic effect on PC3 cells. This result indicates that, under the experimental conditions employed in this paper, the concentration of CDs was not enough to deplete the membrane cholesterol content.

Figure 8 shows that the most expressive effect of RF on prostate cancer cells was observed at 100 μ M. Interestingly PC3 cells got more sensitive to RF when the vitamin forms a non-inclusion complex with β -CD or RF:HP- β -CD (IC_{50} values decreased, in both cases).

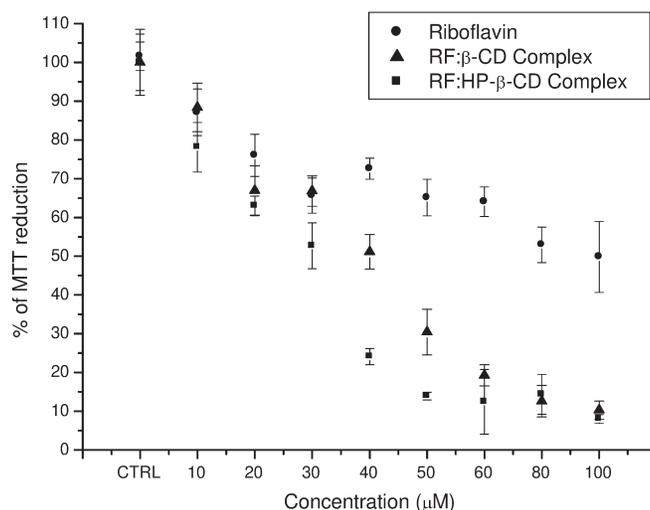


Figure 8 Cytotoxic effect of RF, RF: β -CD and RF:HP- β -CD on PC3 prostate cells. PC3 cells were treated with RF, RF: β -CD or RF:HP- β -CD for 24 h afterwards the cell viability was measured by MTT assay and the cell viability of non-treated cells was considered as 100%.

Resultados

The different cytotoxic profile observed for RF and RF:CDs non-inclusion complexes could be explained by the increased RF solubility in the last case. Besides, as for the classic inclusion complexation, RF and CDs interaction is weak and do not curb the association between the vitamin and the cell membrane. Therefore, the interaction with CDs might favour the RF uptake by prostate cancer cells, via receptor-mediated endocytosis. Recently, Swaan's group published an elegant study about the RF absorption by breast cancer cells (Bareford *et al.*, 2008) showing that the concentration of RF can be crucial to determine the mechanism of transport as well as to maintain the cellular homeostasis of this micronutrient as a dynamic and controlled process.

In the presence of high RF concentration the exocytosis of this vitamin can be activated. Therefore, we can speculate that the interaction of RF with CD is important to promote its absorption as a dominant cell response. This effect, in turn, guarantees the intracellular concentration of RF and also its action on specific targets. However, more studies are required to prove this hypothesis.

Our findings reveal that RF:CD interaction might be useful for controlling the concentration of RF into prostate cancer cells. In this way, other experiments to define the biochemical mechanism by which RF:CD induces cancer cell death are currently in progress in our laboratory.

CONCLUSION

Due to lack of evidences for inclusion complex interactions we propose that riboflavin forms non-inclusion complexes with both β -CD and HP- β -CD. This unusual interaction has been described before (Loftsson and Duchene, 2007) and the results obtained here, with several different spectroscopic approaches, demonstrate it by the low association constant and absence or almost undetectable

Resultados

changes in the physico-chemical properties of RF (but solubility). Moreover, ¹H-NMR NOE experiments detected through the space correlations between hydrogens H₆ and H₉ of RF and hydrogens on the external face of the β-CD and HP-β-CD cavities, compatible with an out-of-ring RF interaction. Despite the non-inclusion complexation, solubility of RF increases as an effect of its interaction with both CDs as well as the cytotoxicity of RF against PC3 prostate cancer cells. Altogether these results indicate that RF non-inclusion complexation with CDs is potentially useful for the enhancement of the vitamin effect against cancer cells.

REFERENCES

- Aniceto, C., Canaes, L.S., Fatibello-Filho, O., Cavaleiro, C.C.S., 2000. Determinação espectrofotométrica de vitamina b2 (riboflavina) em formulações farmacêuticas empregando sistema de análises por injeção em fluxo. *Quim. Nova* 23 (5), 637-640.
- Aoyama, Y., Otsuki, J., Nagai, Y., Kobayashi, K., Toi, H., 1992. Host-guest complexation of oligosaccharides: interaction of maltodextrins with hydrophobic fluorescence probes in water. *Tetrahedron Lett.* 33 (26), 3775-3778.
- Ball, G.F.M., 2004. *Vitamins. Their Role in the Human Body.* Blackwell Publishing, London.
- Bareford, L.M., Phelps, M.A., Foraker, A.B., Swaan, P.W., 2008. Intracellular processing of riboflavin in human breast cancer cells. *Mol. Pharm.* 5 (5), 839-848.
- Bax, A., Davis, D.G., 1985. Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. *J. Magn. Res.* 63 (207), 207-213.
- Bekers, O., Uijtendaal, E.V., Beijnen, J.H., Bult, A., Underberg, J.M., 1991. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Develop. Ind. Pharm.* 17 1503-1549.
- Bender, D.A., 2003. *Nutritional Biochemistry of the Vitamins.* 2 edn, Cambridge, Cambridge.

Resultados

- Cabeça, L.F., Fernandes, S.A., de Paula, E., Marsaioli, A.J., 2008. Topology of a ternary complex (proparacaine-beta-cyclodextrin-liposome) by STD NMR. *Magn. Reson. Chem.* 46 (9), 832-837.
- Challa, R., Ahuja, A., Ali, J., Khar, R.K., 2005. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS. Pharm. Sci. Tech.* 6 (2), E329-E357.
- Chienthavorn, O., Smith, R.M., Saha, S., Wilson, I.D., Wright, B., Taylor, S.D., Lenz, E.M., 2004. Superheated water chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry of vitamins. *J Pharm Biomed. Anal* 36 (3), 477-482.
- Davis, M.E., Brewster, M.E., 2004. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (12), 1023-1035.
- de Araújo, D.R., Tsuneda, S.S., Cereda, C.M., Del, G.F.C., Prete, P.S., Fernandes, S.A., Yokaichiya, F., Franco, M.K., Mazzaro, I., Fraceto, L.F., de, F.A.B., de Paula, E., 2008. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. *Eur. J. Pharm. Sci.* 33 (1), 60-71.
- de Jesus, M.B., Pinto, L.M.A., Fraceto, L.F., Takahata, Y., Lino, A.C., Jaime, C., de Paula, E., 2006. Theoretical and experimental study of a praziquantel and beta-cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and H1-nuclear magnetic resonance. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (4), 1428-1432.
- Queiroz, K.C.S., Zambuzzi, W.F., Souza, A.C.S., da Silva, R.A., Machado, D., Justo, G.Z., Carvalho, H.F., Peppelenbosch, M.P., Ferreira, C.V., 2007. A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Lett.* 258 (1), 126-134.
- de Souza, A.A., Laverde Jr., A., 2002. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. *Quim. Nova* 25 (6), 1022-1026.
- Duan, M.S., Zhao, N., Ossurardottir, I.B., Thorsteinsson, T., Loftsson, T., 2005. Cyclodextrin solubilization of the antibacterial agents triclosan and triclocarban: formation of aggregates and higher-order complexes. *Int. J. Pharm.* 297 (1-2), 213-222.

Resultados

- Edwards, A.M., Bueno, C., Saldano, A., Silva, E., Kassab, K., Polo, L., Jori, G., 1999. Photochemical and pharmacokinetic properties of selected flavins. *J Photochem. Photobiol. B* 48 (1), 36-41.
- Fernandes, S.A., Cabeça, L.F., Marsaioli, A.J., de Paula, E., 2007. Investigation of tetracaine complexation with beta-cyclodextrins and p-sulphonic acid calix[6]arenes by nOe and PGSE NMR. *J. Inclusion. Phenom. Macroscopic. Chem.* 57 395-401.
- Figueiredo, J.C., Levine, A.J., Grau, M.V., Midttun, O., Ueland, P.M., Ahnen, D.J., Barry, E.L., Tsang, S., Munroe, D., Ali, I., Haile, R.W., Sandler, R.S., Baron, J.A., 2008. Vitamins B2, B6, and B12 and risk of new colorectal adenomas in a randomized trial of aspirin use and folic acid supplementation. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 17 (8), 2136-2145.
- Fraceto, L.F., Gonçalves, M.M., Moraes, C.M., de Araújo, D.R., Zanella, L., de Paula, E., 2007. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína:beta-ciclodextrina. *Quim. Nova* 30 1203-1207.
- Grillo, R., de Melo, N.F., Moraes, C.M., de Lima, R., Menezes, C.M., Ferreira, E.I., Rosa, A.H., Fraceto, L.F., 2008. Study of the interaction between hydroxymethylnitrofurazone and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2), 295-302.
- Hazekamp, A., Verpoorte, R., 2006. Structure elucidation of the tetrahydrocannabinol complex with randomly methylated beta-cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 29 (5), 340-347.
- Higuchi, T., Connors, K.A., 1965. Phase-solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* 4 (117), 212.
- INCA. Estimate 2008: Brazilian cancer incidence. Ministry of Health. Secretariat for Health Assistance. National Cancer Institute. Prevention and Surveillance Coordination Unit. 2008.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Murray, T., Xu, J., Thun, M.J., 2007. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J. Clin.* 57 (1), 43-66.
- Johnson Jr, C.S., 1999. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* 34 203-256.
- Loftsson, T., Duchene, D., 2007. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* 329 (1-2), 1-11.

Resultados

- Loftsson, T., Jarho, P., Masson, M., Jarvinen, T., 2005. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 2 (2), 335-351.
- Loftsson, T., Magnusdottir, A., Masson, M., Sigurjonsdottir, J.F., 2002. Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs. *J. Pharm. Sci.* 91 (11), 2307-2316.
- Loukas, Y.L., Vraka, V., Gregoriadis, G., 1996. Use of a nonlinear least-squares model for the kinetic determination of the stability constant of cyclodextrin inclusion complexes. *Int. J. Pharm.* 144 (2), 225-231.
- Loukas, Y.L., Vraka, V., Gregoriadis, G., 1997. Fluorimetric studies of the formation of riboflavin-beta-cyclodextrin inclusion complex: determination of the stability constant by use of a non-linear least-squares model. *J. Pharm. Pharmacol.* 49 (2), 127-130.
- Macomber, R.S., 1998. *A complete introduction to modern NMR spectroscopy* John Wiley & Sons, New York.
- Magnusdottir, A., Masson, M., Loftsson, T., 2002. Self Association and Cyclodextrin Solubilization of NSAIDs. *J. Incl. Phen. Macroc. Chem.* 44 (1-4), 213-218.
- Matsui, Y., Tokunaga, S., 1996. Internal Reference Compounds Available for the Determination of Binding Constants for Cyclodextrin Complexes by ¹H NMR Spectrometry. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 69 (9), 2477-2480.
- Moraes, C.M., Abrami, P., de Paula, E., Braga, A.F., Fraceto, L.F., 2007. Study of the interaction between S(--) bupivacaine and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 331 (1), 99-106.
- Morris, K.F., Johnson, C.S., 1992. Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 114 (8), 3139-3141.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65 (1-2), 55-63.
- Pinto, L.M., Fraceto, L.F., Santana, M.H., Pertinhez, T.A., Junior, S.O., de Paula, E., 2005. Physico-chemical characterization of benzocaine-beta-cyclodextrin inclusion complexes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39 (5), 956-963.
- Schneider, H.J., Hacket, F., Rudiger, V., Ikeda, H., 1998. NMR Studies of Cyclodextrins and Cyclodextrin Complexes. *Chem. Rev.* 98 (5), 1755-1786.

Resultados

- Souza, A.C.S., Kodach, L., Gadelha, F.R., Bos, C.L., Cavagis, A.D., Aoyama, H., Peppelenbosch, M.P., Ferreira, C.V., 2006. A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death. *Apoptosis*. 11 (10), 1761-1771.
- Spamer, E., Muller, D.G., Wessels, P.L., Venter, J.P., 2002. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and sulfobutyl ether-7-beta-cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* 16 (4-5), 247-253.
- Storsberg, J., Ritter, H., Pielartzik, H., Groenendaal, L., 2000. Cyclodextrins in Polymer Synthesis: Supramolecular Cyclodextrin Complexes of Pyrrole and 3,4-Ethylenedioxythiophene and Their Oxidative Polymerization. *Adv. Mater.* 12 (8), 567-569.
- Teillac, P., Moiate-Artus, P., 2007. Prostate Cancer: Highlights from 2006. *Eur. Urol. Suppl.* 6 728-736.
- Wang, X.M., Chen, H.Y., 1996. A spectroelectrochemical study of the interaction of riboflavin with beta-cyclodextrin. *Spectrochim. Acta, Part A* 51 599-605.
- Zidovetzki, R., Levitan, I., 2007. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta* 1768 (6), 1311-1324.

Conclusão

Parte 1

- A riboflavina é capaz de interagir com β -CD e HP- β -CD, como evidenciado pelo significativo aumento de sua solubilidade, em presença das CDs.
- Os complexos formados são de difícil caracterização, provavelmente devido à baixa constante de ligação ou ainda porque a interação não se dá de maneira convencional. Não foram obtidas evidências da formação de complexos de inclusão através dos métodos de fluorescência, espectroscopia UV-Vis, Ressonância magnética nuclear (experimentos de ^1H -RMN, DOSY e NOE, além das medidas de T_1),
- Além disso, medidas de ^1H -RMN (NOE) detectaram interações entre os hidrogênios da riboflavina e da face externa do anel da β -CD e da HP- β -CD,

Conclusões

indicando a formação de complexos de não-inclusão entre a RF e ambas CDs.

- Testes de citotoxicidade com a RF livre e na presença das CDs comprovaram a interação entre RF: β -CD e RF:HP- β -CD, já que a sensibilidade das células PC3 à RF aumentou na presença dos complexos.

Parte 2

Transferência de Genes *(Gene delivery)*

Esta segunda parte da tese traz os resultados referentes ao desenvolvimento de um sistema de transferência de genes (*gene delivery*), baseado em Nanopartículas Lipídicas Sólidas.

Diferentemente da primeira parte, os resultados serão apresentados na íntegra, já que não foram, ainda, submetidos à publicação.

Introdução

Terapia Gênica e o Câncer de Próstata

Diversas doenças estão relacionadas com a disfunção ou ausência de determinada(s) proteína(s), o que pode ser causado por mutação ou deleção gênica. A disfunção/ausência de uma proteína pode induzir um quadro patológico por diversos motivos, como por exemplo: pelo comprometimento de uma via metabólica, pela modificação de um ligante ou receptor, através da desregulação do ciclo celular, por danos a proteínas extracelulares, ou ainda através da alteração da estrutura ou função do citoesqueleto. Esse quadro patológico pode ter origem genética (como na fibrose cística, hemofilia, hemoglobinopatias,...) ou mesmo ser adquirido (câncer, distúrbios neurológicos, doenças cardiovasculares, doenças infecciosas) (Sullivan, 2003).

Com isso as eras genômica e proteômica juntamente com o refinamento do estudo de transdução de sinal têm contribuído sobremaneira para o entendimento das bases moleculares do câncer e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de novos fármacos (Gascón & Pedraz, 2008). Em um contexto maior, esta melhor

Introdução

caracterização do tumor proporciona uma possível definição do padrão tumoral bem como predição do prognóstico.

Apesar do progresso na área de diagnóstico do câncer de próstata em estágios iniciais, este tipo de câncer continua a ser a principal causa de morte entre os homens. Uma característica importante do câncer de próstata, em termos terapêuticos, é que após o tumor se tornar independente de hormônio a eficiência terapêutica também se torna extremamente baixa. Embora várias estratégias tenham sido definidas como promissoras, a quimioterapia ainda é o protocolo terapêutico de escolha (Sonpavde & Hutson, 2006). Dentre os quimioterápicos, a daunorubicina e a mitoxantrona são os fármacos de escolha por serem mais efetivos para o tratamento desse câncer, assim como o de mama, leucemias e linfomas (Kostrzewa-Nowak *et al.*, 2006). No entanto, o grande obstáculo no tratamento do câncer de próstata e de outros tipos é o desenvolvimento de resistência ao quimioterápico, pelas células tumorais. Portanto, novas estratégias terapêuticas são extremamente desejáveis e necessárias. Neste contexto, a terapia gênica apresenta grande potencial para inibir a proliferação, agressividade, migração e resistência das células tumorais. No entanto, para que esta estratégia terapêutica seja utilizada é importante que se conheça em detalhes a biologia/bioquímica das células tumorais, para que o alvo terapêutico seja satisfatório em termos de respostas finais: morte das células tumorais e garantia da qualidade de vida do paciente.

O conceito de terapia gênica envolve a transferência de fragmento de material genético para uma célula, tecido ou todo um organismo com o objetivo de prevenir, tratar ou curar uma doença, modificando a expressão de genes envolvidos no quadro patológico (Verma & Weitzman, 2005; Bhavsar & Amiji, 2007). Recentemente o conceito de material genético foi bastante ampliado com a

Introdução

descoberta de diversos tipos de RNAs funcionais e do silenciamento de genes através da tecnologia do RNA de interferência (RNAi) (Gascón & Pedraz, 2008). Portanto, o objetivo da terapia gênica é manipular a expressão de um determinado gene, por tempo suficiente para que o funcionamento normal do organismo seja restabelecido. Para isso, utilizam-se duas estratégias: a *ex vivo* e a *in vivo*. Na primeira, *ex vivo*, as células do paciente são extraídas e transfectadas com o material de interesse e, em seguida, são reintroduzidas no indivíduo. A segunda, *in vivo*, consiste na administração do transgene diretamente no indivíduo (Sullivan, 2003). O sucesso dessa intervenção terapêutica depende muito da eficiência do transporte do material genético para o interior celular, processo também conhecido como transfecção (Oyewumi & Rice, 2006). Atualmente, a terapia gênica tem sido amplamente considerada para tratamento dessas doenças e os resultados obtidos recentemente em testes clínicos vêm confirmando a terapia gênica como uma ferramenta terapêutica bastante promissora (Gascón & Pedraz, 2008).

Levando- em consideração que o câncer de próstata pode ser decorrente de mutações e alterações de vários genes envolvidos na regulação de vias de transdução de sinal e do ciclo celular, a terapia gênica pode ser uma boa alternativa para seu tratamento. A Figura 7 resume alguns produtos gênicos que contribuem para a progressão e diminuição da eficiência terapêutica do câncer de próstata (Lee *et al.*, 2008). Dentre os possíveis alvos uma estratégia baseada no gene da proteína tirosina fosfatase homóloga à tensina (PTEN) pode ser considerada. Essa proteína tem seu gene localizado no locus 10q23 do cromossomo 10q, que frequentemente está deletado (50-80%) nos tumores de próstata e é conhecida por regular negativamente a cascata de transdução da PI3K/Akt. A via de transdução PI3K/Akt é conhecida por seu papel na mediação da sobrevivência celular, bem como na progressão do ciclo celular e transformações neoplásicas (Chung *et al.*, 2005; Kim &

Introdução

Mak, 2006; Lee *et al.*, 2008). Além do câncer de próstata, em muitos outros tumores humanos como os de cérebro, mama, endométrio e rins, é possível encontrar esse gene mutado ou mesmo deletado do genoma (Huang, 2001; Chung *et al.*, 2005). Essa deleção desempenha papel crítico para a progressão do câncer de próstata, com inativação total da PTEN em estágios bem avançados da doença (Huang *et al.*, 2001).

Tian e col. (2006) demonstraram que uma transfecção bem sucedida do gene para a PTEN selvagem inibiu o crescimento de células de glioblastoma humano em 69,3 %. Portanto, essa pode ser uma ferramenta valiosa para indução de morte celular em células PC3 (células humanas de adenocarcinoma de próstata), uma vez que estas também possuem o gene para a PTEN deletado (Chung *et al.*, 2005).

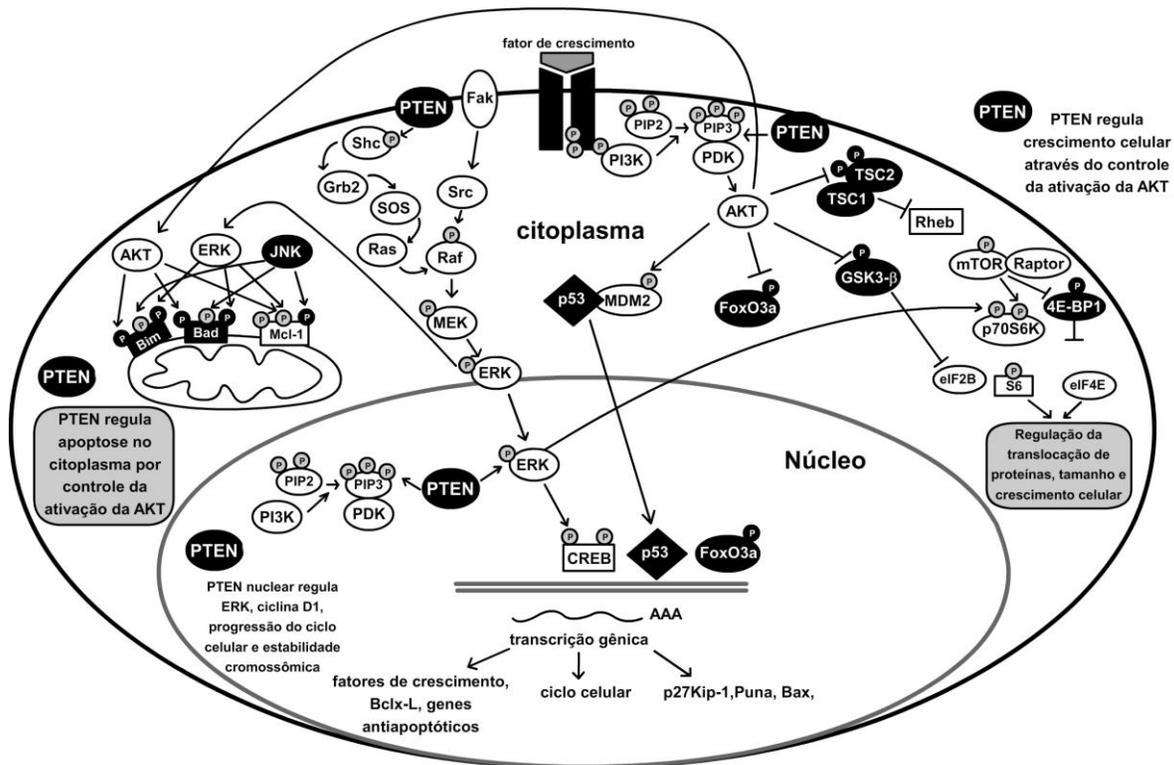


Figura 7: Produtos gênicos que contribuem para a progressão e baixa eficiência terapêutica do câncer de próstata (adaptado de Lee *et al.*, 2008).

Introdução

Uma revolução na terapêutica acontecerá quando a terapia gênica estiver consagrada na clínica, que levará os profissionais da saúde a tratar as causas das doenças e não apenas seus sintomas (Sullivan, 2003; Karmali & Chaudhuri, 2007).

Transferência de Genes (*Gene delivery*)

Como os oligonucleotídeos (OLN) não apresentam direcionamento celular intrínseco, nem estabilidade durante circulação no interior celular nem a capacidade de atravessar barreiras biológicas (membranas), faz-se necessária a utilização de vetores para auxiliar seu transporte. Esta é uma área multidisciplinar denominada transferência de genes ou *gene delivery* e que vem despertando, cada vez mais, a atenção de cientistas e da indústria farmacêutica (Pack *et al.*, 2005; Asatjarit *et al.*, 2007). É possível classificar os principais tipos de transportadores de genes em duas grandes classes: os virais e os não-virais (Sullivan, 2003).

Veículos virais são aqueles onde vírus são modificados geneticamente com propósito de transportar o material genético de interesse. De forma geral, eles apresentam grande eficiência de transfecção. Entretanto, apresentam sérios problemas quanto à toxicidade, principalmente relacionados à mutagenicidade e carcinogênese, além da dificuldade de produção em larga escala com qualidade (Liu & Huang, 2002; Conwell & Huang, 2005; Kawakami *et al.*, 2008). Existe ainda o risco de, por meio de repetidas administrações, os veículos virais desencadearem resposta imune, o que compromete a expressão do gene de interesse, além de limitar sua administração (Liu & Huang, 2002; Kawakami *et al.*, 2008).

Vetores não-virais são mais seguros, baratos, mais reprodutíveis e não apresentam restrição quanto ao tamanho do material transportado, mas tem a eficiência de transfecção (Pozo-Rodríguez *et al.*, 2009). Entretanto, muito progresso tem sido feito desde o advento do primeiro vetor não-viral de genes. Muitos tipos

Introdução

de vetores sintéticos têm sido desenvolvidos explorando várias abordagens, mas sempre com o mesmo objetivo, que é o de compactar o material genético e protegê-lo contra a degradação em seu longo percurso até seu objetivo final, seja ele o núcleo celular (DNA) ou o citoplasma (RNA) (Ragusa *et al.*, 2007). Compostos catiônicos têm se apresentado como promissores transportadores de material genético, em virtude das interações eletrostáticas entre o material genético e o transportador, sendo polímeros catiônicos e lipossomas os principais veículos não-virais. Estes, quando interagem com o OLN são chamados, respectivamente, de poliplex e lipoplex (Kawakami *et al.*, 2008). Dentre os diferentes tipos de estratégias para transferência gênica podemos destacar sistemas baseados em lipídios catiônicos, polímeros catiônicos, nanopartículas de ouro, nanopartículas magnéticas, *quantum dots*, nanopartículas de sílica, fulerenos, nanotubos de carbono, entre outras (Ragusa *et al.*, 2007).

Dentre os diversos tipos de nanopartículas existentes, os sistemas coloidais constituem uma boa alternativa para a problemática de candidatos a fármacos, melhorando seu transporte como relatado, há décadas (Boyd, 2008). Nanopartículas sólidas, como sistemas de administração de fármacos (ou seja, partículas com núcleo sólido e praticamente homogêneo), podem ainda ser classificadas em três grandes grupos: nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs), nanopartículas poliméricas e nanopartículas de fármaco sólidas (*solid drug nanoparticles*) (Boyd, 2008). O interesse por estes sistemas vem crescendo, principalmente na terapia do câncer e na obtenção de imagens para diagnóstico (Boyd, 2008) e ainda no desenvolvimento e melhoria de sistemas de transferência de genes baseados em lipídios catiônicos, com milhares de formulações testadas, como evidenciam o crescente número de patentes e as publicações científicas sobre o assunto (Gascón & Pedraz, 2008).

Introdução

O controle do tamanho dessas partículas é de vital importância para garantir a sua efetividade, uma vez que a estrutura dos capilares sanguíneos é bastante variada entre órgãos e tecidos. Fígado, rim e medula óssea, por exemplo, apresentam vasos sinusóides que facilitam a permeação. Entretanto, de maneira geral, moléculas de alta massa molar são incapazes de penetrar as barreiras epiteliais e o endotélio, sendo assim, incapazes de extravasar para o espaço intersticial. A utilização de sistemas nanoestruturados torna possível condensar o material transportado, garantindo um tamanho funcional, além de direcionar e favorecer a entrada em células-alvo (Kawakami *et al.*, 2007).

Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLSs)

As NLSs (Figura 8) consistem em sistemas carreadores formados por lipídios sólidos nas temperaturas ambiente e corporal, sendo estabilizadas por tensoativos. Uma vantagem das NLSs é a utilização de lipídios fisiológicos de baixa toxicidade e, portanto, de baixa toxicidade aguda ou crônica. Os lipídios utilizados na preparação de NLSs são triglicerídeos, mistura de glicerídeos, ácidos graxos, esteróides ou ceras (Tabatt *et al.*, 2004; Üner, 2006; Saupe & Rades, 2007). Como os tensoativos apresentam diferenças quanto à carga e peso molecular, sua escolha é baseada no tipo de lipídio e via de administração. Exemplos de tensoativos incluem lecitina de soja, lecitina de ovo, Poloxamer 188 e colato de sódio (Saupe & Rades, 2007).

NLSs são extremamente versáteis, o que as tornam propícias para diversas aplicações. A produção de NLSs é simples de ser escalonada e sua estabilidade pode ser aumentada pelo processo de liofilização, garantindo uma longa duração à temperatura ambiente (de 12 – 24 meses), além de não requerer a utilização de

Introdução

solventes orgânicos durante o processo de preparação, diminuindo assim a toxicidade e custo das partículas (Choi *et al.*, 2007; Vighi *et al.*, 2007).

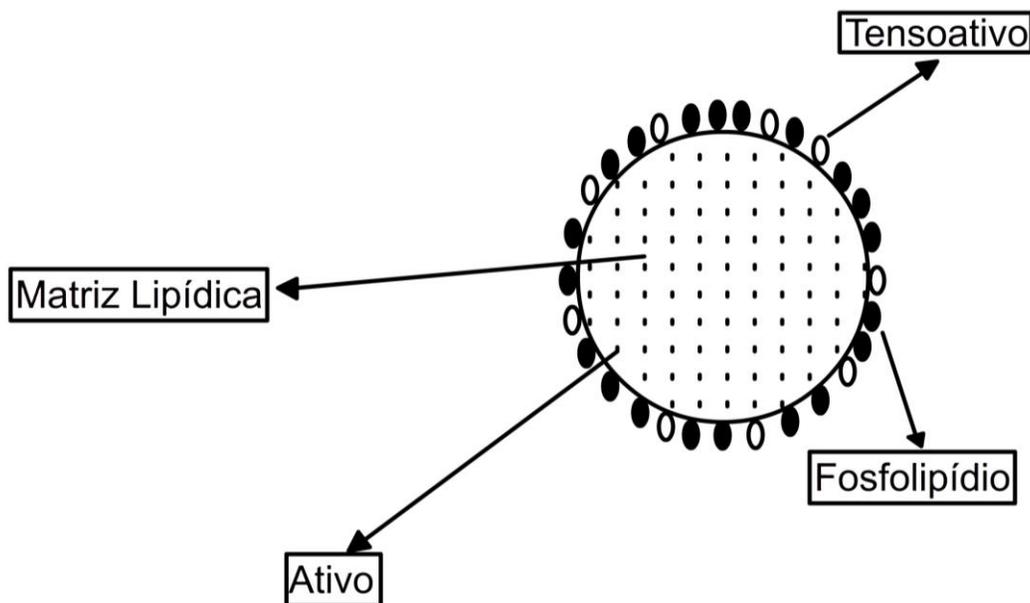


Figura 8: Representação geral de uma NLS. A matriz lipídica constitui o interior sólido, com o ativo. Na interface o tensoativo, juntamente com o fosfolipídio, garantem a estabilidade da partícula (modificado de Manjunath *et al.*, 2005).

NLSs podem ser administradas através de diferentes vias, as quais incluem administração tópica, intravenosa, intramuscular, subcutânea e em infiltrações nervosas (Muller *et al.*, 2000; Toogswan *et al.*, 2004). NLSs aumentam a estabilidade de compostos lábeis (Jee *et al.*, 2006), a biodisponibilidade de fármacos (Üner *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Luo *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Xiang *et al.*, 2007), ou requerem menores quantidades do ativo para atingir o mesmo efeito biológico (Lu *et al.*, 2006). NLSs atravessam facilmente a barreira hematoencefálica, sendo úteis na aplicação na administração de ativos que atuem no

Introdução

sistema nervoso central ou no transporte de partículas magnéticas, utilizadas no diagnóstico de câncer cerebral (Koo *et al.*, 2006).

Olbrich e col. (2001) foram os primeiros a propor as NLSs como um sistema não-viral de transferência de genes e, a partir de então, outros estudos têm demonstrado bons resultados com relação à utilização das mesmas para transferência de genes.

Rudolph e col. (2004) propuseram um sistema de transferência gênica baseado em NLSs e contendo um *motif* rico em arginina, da proteína TAT do vírus HIV-1. Tabatt e col. (2004a) utilizaram diferentes lipídios catiônicos na produção de NLSs e testaram sua eficiência e toxicidade em células COS-1. Como principais conclusões os autores demonstram que lipídios de cadeia simples apresentam alta toxicidade, também observada em lipossomas produzidos com esses lipídios; além disso, NLSs preparadas com 1,2-dioleoil-3-propanoato de trimetilamônio (DOTAP) como lipídio catiônico e uma matriz de cetilpalmitato apresentaram boa tolerância e boa eficiência de transfecção, mesmo na presença de soro. Em um segundo trabalho Tabatt e col. (2004b) compararam a eficiência da transfecção de NLSs e lipossomas à base de lipídios catiônicos idênticos, tendo encontrado eficiências de transfecção equivalentes, *in vitro*.

Montana e col. (2007) estudaram o uso de NLSs como transportadores de RNA. Num estudo *in vitro* essas partículas se difundiram através da membrana celular e liberaram o RNA, demonstrando seu potencial como transportador na terapia genética em humanos. Choi e col. (2007) mostraram que NLSs apresentam maior eficiência de transfecção do que Lipofectin®, uma formulação contendo lipossomas catiônicos, para o tratamento de câncer de pulmão. Já Vighi e col. (2007) produziram NLSs liofilizadas e sem crioprotetores que, ainda assim, foram eficientes no transporte de DNA *in vivo*. Pedersen e col. (2007) mostraram que

Introdução

NLSs são capazes de condensar o DNA e mantê-lo estável em condições fisiológicas, além de apresentarem baixa toxicidade sobre células em cultura.

Kim e col. (2008) produziram NLSs a partir da reconstituição de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), livres de proteínas, e as utilizaram para o transporte de siRNA. A utilização de lipoproteínas reconstituídas se deveu ao fato de muitos tumores, como leucemia mielóide, de colo, rim e tumores cerebrais, apresentarem elevados níveis de receptores para lipoproteínas de baixa densidade. A partir dos bons resultados obtidos na supressão gênica utilizando siRNA, os autores propuseram a utilização desses sistemas como vetores sistêmicos de siRNA que, atualmente, estão testando para o tratamento de tumores em modelos animais (Kim *et al.*, 2008). Pozo-Rodríguez e col. (2008) avaliaram a capacidade de transfecção das NLSs em linhagem de células do epitélio pigmentado da retina humana (ARPE-19) com o intuito de utilizar estas partículas como vetor para o tratamento de doenças na retina; estes autores utilizaram esse modelo para elucidar o tráfego intracelular dessas partículas, demonstrando que as NLSs são internalizadas, predominantemente pela via da clatrina, informação muito importante para o desenvolvimento racional de vetores (Pozo-Rodríguez *et al.*, 2008).

Objetivos

A segunda parte do trabalho teve como objetivos gerais desenvolver e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas para transferência de genes (*gene delivery*) comparáveis a sistemas comerciais disponíveis (Lipofectamine 2000®), para carrear o gene da proteína PTEN (proteína tirosina fosfatase homóloga à tensina) para futura aplicação na terapia gênica do câncer de próstata.

Objetivos específicos:

- Preparo e determinação de características físico-químicas de NLSs apropriadas para futuro uso em transferência de genes.
- Avaliação da estabilidade das NLSs.
- Avaliação da citotoxicidade das formulações preparadas.
- Comparação da eficiência de transfecção das NLSs com Lipofectamina 2000®.
- Determinação do tráfego intracelular das NLSs.

Materiais e Métodos

Materiais

O ácido esteárico (Figura 9a) foi gentilmente cedido pela PharmaSpecial, Pluronic F68 (Figura 9d) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e os lipídios DOTAP (1,2-dioleil-3-propanoato de trimetilamônio, Figura 9b) e DOPE (Dioleilfosfatidiletanolamina, Figura 9c) foram obtidos da Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, EUA).

Cultura de células

As células de câncer de próstata independentes de andrógeno (PC3) foram obtidas da ATCC (*American Type Cell Collection*) e cultivadas em meio RPMI-1640 contendo antibióticos (100 U/mL de penicilina G e 100 µg/mL de estreptomicina), suplementado com 10 % de soro fetal bovino e mantidas em atmosfera umedecida com 5 % de CO₂, a 37 °C. As células PC3 foram utilizadas até o limite de 30 passagens.

Viabilidade Celular

Para os ensaios de viabilidade celular, as células (4.00×10^4 células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços (Corning), cultivadas por 24 h e tratadas na semiconfluência. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por 100 μ L de outra alíquota, contendo as diferentes formulações testadas.

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-bifenil tetrazolium (MTT). A redução do MTT indica atividade mitocondrial, pela redução enzimática do sal brometo de tetrazólio catalisada, principalmente, por desidrogenases mitocondriais em células viáveis (Mosmann, 1983).

O sal de MTT (0,5mg/mL) foi solubilizado em meio RPMI sem soro fetal bovino e as células foram incubadas por 3 h em condições normais de cultura. Para a análise do formazan formado após este tempo, o meio com o tratamento foi substituído por 100 μ L de DMSO e a absorbância foi medida em 570 nm.

Amplificação e purificação do plasmídeo

Os plasmídios pcDNA 3.1/V5-His-Topo contendo o gene para a proteína fluorescente verde (EGFP) foram amplificados utilizando bactérias *E. coli* competentes. As colônias contendo o plasmídeo foram selecionadas e colocadas em erlenmeyer contendo 50 mL de meio LB com ampicilina. O erlenmeyer foi agitado durante a noite, a 37 °C. Uma alíquota foi congelada com adição de 10% de glicerina, para utilização futura.

O DNA plasmidial (DNAp) foi isolado utilizando o kit *GenElute™ Plasmid Miniprep*, da Sigma Chem. Co.

Preparação das NLSs

As NLSs catiônicas foram preparadas utilizando uma microemulsão em banho quente contendo ácido esteárico (AE, Figura 9a) a 7 mM, o lipídio catiônico DOTAP (Figura 9b) variando de 1,3 – 4,3 mM, o surfatante Pluronic F68 (PLF68, Figura 9d) variando de 0,12 – 2,4 mM e em algumas formulações foi adicionado DOPE (Figura 9c) com concentrações variando de 0 – 1,25 mM. Os lipídios foram aquecidos 10 °C acima da temperatura de transição de fase sólido-líquida do AE, em seguida foram misturados a uma solução aquecida de surfatante (0,12 – 2,4 mM), sob agitação mecânica. A microemulsão obtida foi então extrudada através de membranas de policarbonato de 100 nm de diâmetro (Isopore™, Millipore) em uma mini-extrusora (Avanti Polar Lipids, Inc., Alabaster, AL) por 15 vezes para obtenção de uma população homogênea de partículas; em seguida a suspensão foi resfriada em um banho de 2 °C para evitar que as partículas coalescessem.

Metodologia

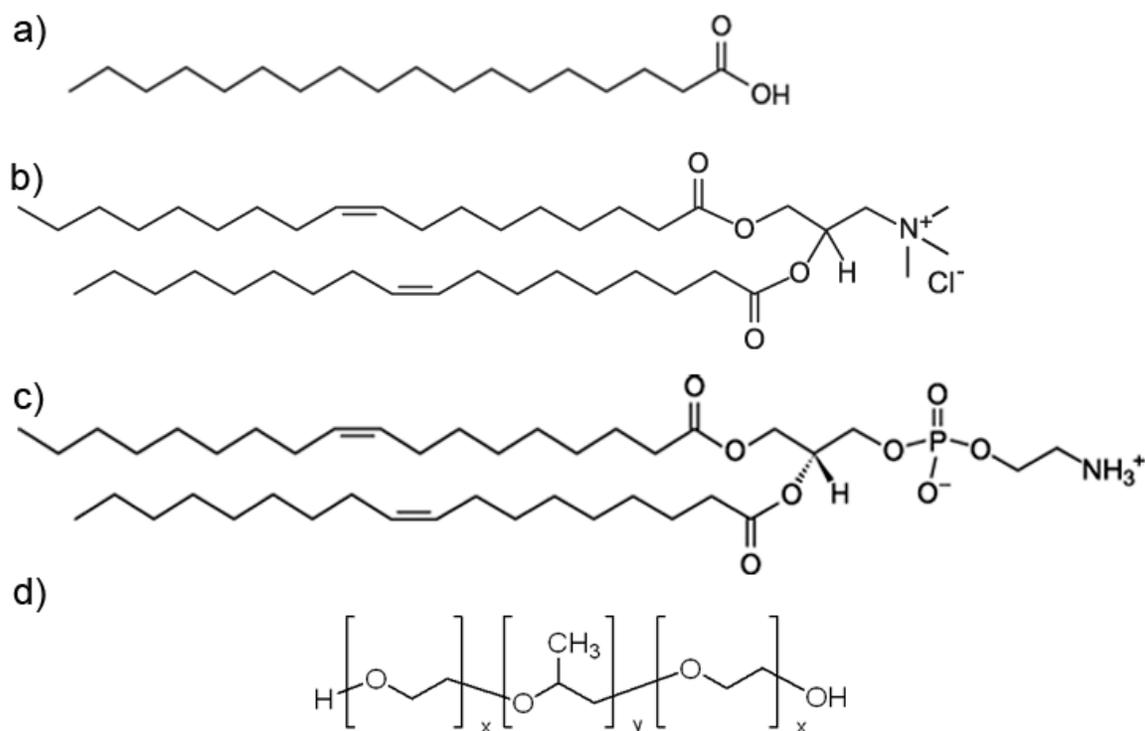


Figura 9: Estrutura química dos componentes das NLSs: a) Ácido Esteárico b) DOTAP c) DOPE d) Pluronic F68 (onde x representa os monômeros hidrofílicos e y os hidrofóbicos).

Determinação do diâmetro das partículas e do potencial Zeta

As diferentes formulações foram caracterizadas em termos do diâmetro médio das partículas e do índice de polidispersidade, através de espalhamento de luz dinâmico (DLS). A determinação do potencial Zeta foi realizada observando-se o espalhamento a 173°, depois de adequada diluição das amostras em água, em equipamento Zetasizer Nano series (Malvern Instruments, Malvern, UK).

Quando submetidas a um meio polar a maioria das moléculas apresentam cargas. Quando uma partícula carregada é submetida a uma solução contendo íons, estas atraem para sua superfície moléculas de carga oposta. Com o

Metodologia

movimento da partícula toda a camada de íons adsorvida é mobilizada, formando então uma dupla camada elétrica. Um potencial é formado entre a superfície da partícula e o líquido circundante, que varia de acordo com a espessura da dupla camada elétrica. É possível determinar um plano de ruptura entre o que fica adsorvido na partícula e o meio circundante, cujo potencial elétrico é chamado de potencial eletrocinético ou potencial Zeta.

As medidas de potencial Zeta permitem realizar previsões sobre a estabilidade de dispersões coloidais. Geralmente, dispersões que apresentam valores de potencial Zeta maiores que ± 30 mV são consideradas fisicamente estáveis, graças à repulsão eletrostática (Saupe & Rades, 2007).

Microscopia de Força Atômica

As amostras de NLSs (25 μ L) foram depositadas sobre substrato de mica e após secagem (24 h) o substrato foi submetido à inspeção no equipamento Thermo Microscope Autoprobe. A varredura na faixa de 5 μ m foi feita em ar, no modo de não contato, em temperatura ambiente.

Ensaio de Retardamento da Mobilidade Eletroforética (EMSA)

Para o ensaio de EMSA foram diluídos 0,8 μ g de DNAP em 20 μ l de água desionizada enquanto 2 μ l de NLSs foram diluídos em outros 20 μ l de água desionizada. As amostras foram misturadas e incubadas por 20 min.; em seguida foram aplicadas em um gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio e submetidas à eletroforese, sob tensão de 50 V, por 2 h. Foram utilizados dois controles nesses testes, um deles contendo DNAP e tampão de corrida e outro

Metodologia

contendo DNAP em uma solução de glicerol a 10%. A solução de glicerol a 10% foi usada durante as corridas para evitar possíveis interferências do azul de bromofenol, presente no tampão de corrida, na interação DNAP:NLSs. A análise foi realizada em câmara sob luz UV, onde os resultados foram visualizados e fotografados.

Viabilidade Celular

Para os ensaios de viabilidade celular foram utilizadas células fibroblásticas (Balb-3T3) de camundongo e células de câncer de próstata PC3, em placas de 96 poços (8 x 12), inoculadas com 10^4 células por poço e cultivadas por 24 h, até que as culturas se tornassem semiconfluentes. Após esse período o meio de cultura foi substituído por 100 μ L de meio contendo diferentes concentrações de NLSs.

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de redução do MTT, como descrito acima.

Transfecção

As células PC3 foram plaqueadas (1 mL) a uma densidade de $1,5 \times 10^5$ /mL por poço, em uma placa de 24 poços. Após 24 h as células apresentavam uma confluência em 70 % da área total do poço.

Os complexos (DNAP:NLSs) foram preparados diluindo, separadamente, as NLSs (2 μ l) e DNAP (0,8 μ g) em meio sem soro (150 μ l); a solução contendo DNAP foi então adicionada à suspensão contendo as NLSs e o sistema foi incubado por 20 min. Essas condições iniciais (de volume e tempo) foram estabelecidas de acordo com o protocolo constante no manual da Lipofectamina 2000® (Invitrogen, Breda, The Netherlands), um sistema de transfecção comercial baseado em lipídios e amplamente utilizado, que adotamos como padrão de transfecção, para

Metodologia

comparação com as NLSs. Em seguida, 100 µl do complexo (DNAp:NLSs) foram adicionados em cada poço da triplicata e incubados com as células, por 4 h. Logo após, o meio de cultura foi trocado por um meio completo, contendo soro fetal bovino.

As células PC3 foram transfectadas utilizando-se preparações contendo NLSs e os resultados foram comparados com os obtidos utilizando kit comercial Lipofectamina 2000®. A eficiência da transfecção foi determinada após 24 h, por medidas de citometria de fluxo para células positivas para a EGFP.

Citometria de Fluxo

As células transfectadas com EGFP foram tripsinizadas 24 h após a transfecção e ressuspensas em 300 µl de solução salina. Em seguida as amostras foram mantidas em gelo até a realização da análise de eficiência de transfecção através da expressão de EGFP ($E_{\lambda_{ex}}$ 488 nm, $E_{\lambda_{em}}$ 530 nm) em um citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA), com pelo menos 5.000 eventos por amostra.

Microscopia de Fluorescência

As células foram plaqueadas (5 ml) a uma densidade de $7,5 \times 10^5$ / poço, em uma placa de 6 poços, cada um contendo uma lamínula. Após 24 h as células apresentavam uma confluência de 70% da área total do poço. O complexo FITC-OLN:NLS foi formado diluindo-se 1 µl de OLN marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC-OLN) em 400 µl de meio sem soro e 2 µl de NLSs em 400 µl de meio sem soro; as soluções foram misturadas e incubadas por 20 min. As células foram transfectadas por 1 e 4 h.

Metodologia

Posteriormente as células foram lavadas por 3 vezes com solução salina, para eliminar o excesso de partículas não internalizadas. O material foi fixado com solução de paraformaldeído a 4% por 30 min., a 37 °C. Em seguida os núcleos celulares foram corados com uma solução do corante Hoechst 33528, que tem a capacidade de penetrar a célula e se ligar ao DNA. As lamínulas foram então montadas em uma lâmina e o material analisado em um microscópio de fluorescência (Olympus, Tóquio, Japão).

Estudo de proteção à DNase I

O ensaio de proteção à DNase I foi realizado adicionando DNase I ao complexo NLSs:DNAP a fim de se obter uma concentração final de 1U DNase I para cada 2,5 µg DNAP e as misturas foram incubadas a 37 °C por 30 min. Uma solução de SDS (2 %) foi adicionada para liberar o DNAP não digerido das partículas. As amostras foram submetidas a um gel de agarose (1,3 %), corado com brometo de etídio e analisadas em câmara sob luz UV, onde os resultados foram visualizados e fotografados.

Análise estatística

Para comparação das eficiências de transfecção foi realizada análise de variância, utilizando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para isso foram utilizados os programas Excel® versão 2003 (Microsoft, EUA) e BioEstat versão 5.0.

Resultados e Discussão

Preparo das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

Para a produção das NLSs os métodos comumente encontrados na literatura são a homogeneização em alta pressão e a técnica de microemulsão (Manjunath *et al.*, 2005). Basicamente estes métodos consistem na fusão do lipídio utilizado para a formação da matriz, em temperatura cerca de 10 °C acima de sua temperatura de fusão, num processo mecânico (em homogeneizador de alta pressão ou em um agitador homogeneizador) que determina o tamanho das partículas formadas (Manjunath *et al.*, 2005).

Entretanto, nesse trabalho foi empregada uma maneira alternativa para o preparo das NLSs. O AE, utilizado na matriz (interior hidrofóbico das NLSs), foi fundido 10 °C acima de sua temperatura de fusão e em seguida homogeneizado em uma suspensão pré-aquecida contendo o surfatante, o PLF68. Para alterar a carga da superfície da partícula foi utilizado DOTAP, um lipídio catiônico bastante empregado para transferência de genes (*gene delivery*) (Gascón & Pedraz, 2008); em algumas formulações foi adicionado dioleil fosfatidil etanolamina (DOPE), um

Resultados e Discussão

diacilfosfolipídio zwitteriônico e considerado como lipídio assistente (*helper*) em algumas formulações lipossomais de transferência de genes (Zuhorn *et al.*, 2005). Zuhorn e col. (2005) demonstraram que a presença de DOPE em formulações lipossomais leva a um aumento na eficiência de transfecção graças a seu papel na dissociação do DNAP de lipossomas catiônicos. A DOPE induz a formação de fases hexagonais, o que leva a uma perturbação e/ou desestabilização da membrana endossomal (Zuhorn *et al.*, 2005; Gascón & Pedraz, 2008), que é uma das mais importantes barreiras para a eficiência de agentes não-virais de transfecção (Ragusa *et al.*, 2007; Morille *et al.*, 2008).

A suspensão aquecida foi extrudada através de filtros de 100 nm de diâmetro, como descrito em métodos. Esta metodologia se baseou naquela de produção de lipossomas contendo lipídios de alta temperatura de transição de fases, como lecitina de soja hidrogenada (Almeida *et al.*, 2008).

Esse método apresentou algumas vantagens, quando comparado aos sistemas convencionais, como: i) economia dos componentes, uma vez que foi possível a produção em pequena escala, ii) a possibilidade de alteração dos constituintes das NLSs, permitindo avaliar suas características e eficiência de transfecção sem um dispêndio significativo de materiais, iii) não utilização de solvente orgânico em qualquer etapa do processo de produção e iv) possibilidade de utilizar filtros de diferentes tamanhos de poro durante a extrusão, levando assim, ao preparo de partículas de diferentes tamanhos, o que permite avaliar a influência do tamanho das partículas no processo de transfecção de células eucarióticas.

Preparo das formulações das NLSs

As concentrações iniciais para desenvolvimento das NLSs levaram em consideração proporções entre os componentes empregadas em três artigos da literatura (Olbrich *et al.*, 2001; Tabatt *et al.*, 2004; e Pozo-Rodriguez *et al.*, 2007). Iniciamos então, num processo de tentativa e erro, ensaios para detectar as concentrações mais adequadas dos componentes para o processo de extrusão, evitando ainda a saturação (com conseqüente entupimento e/ou ruptura) das membranas de extrusão. Uma concentração cerca de 5 vezes menor que aquelas preconizadas na literatura teve que ser adotada. As primeiras partículas obtidas – constituídas de 7 mM de AE, 1,3 mM de DOTAP e 0,5 mM de PLF68 - se mostraram extremamente instáveis, coalescendo horas após sua preparação. Para aumentar a estabilidade do sistema modificamos a concentração de surfatante PLF68, como mostrado na Tabela 3, visto que a garantia das propriedades físico-químicas de vetores não-virais é essencial para permitir sua fabricação em grandes escala, transporte e armazenamento de forma a serem comercializáveis, como produto farmacêutico (Anchoroquy & Koe, 2000).

Tabela 3 Formulações de NLSs contendo diferentes concentrações de PLF68.

Formulação	AE (mM)	PLF68 (mM)	DOTAP (mM)
NLS01	7	0,12	1,3
NLS02	7	0,36	1,3
NLS03	7	0,6	1,3
NLS04	7	0,84	1,3
NLS05	7	1,2	1,3
NLS06	7	2,4	1,3

Variação da concentração de Pluronic F68

Observarmos então o efeito da variação da concentração de PLF68 no tamanho das NLSs (Figura 10). As concentrações iniciais (com 0,12 e 0,36 mM do surfatante) apresentaram um único pico na distribuição do tamanho das partículas, compatível com o tamanho dos poros da membrana utilizada para extrusão (~100 nm). As formulações contendo concentrações maiores que 0,6 mM de PLF68 apresentaram um segundo pico, indicando que duas populações de partículas foram formadas no processo. Além disso, as formulações contendo dois picos se apresentaram instáveis, em decorrência da aglomeração das partículas, visível horas após a preparação. É provável que o excesso de PLF68 tenha propiciado a formação de partículas de natureza diferente, como lipossomas formados predominantemente por DOTAP e/ou micelas mistas de AE, separadamente.

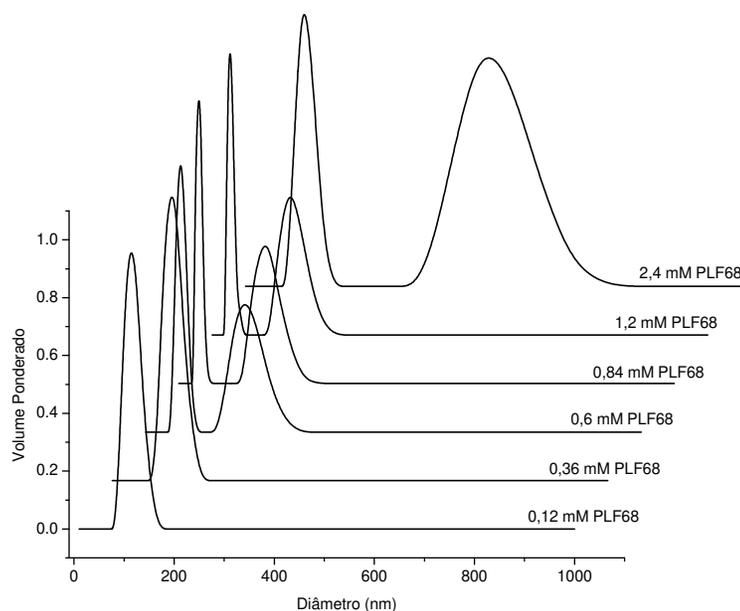


Figura 10: Efeito das concentrações crescentes de PLF68 no tamanho das NLSs.

Resultados e Discussão

Tabela 4 Efeito da concentração de PLF68 na distribuição populacional das NLSs: diâmetro médio e porcentagem das partículas (ver Figura 10).

Formulação	Pico 1 Diâmetro Médio (nm)	%	Pico 2 Diâmetro Médio (nm)	%
NLS01	98,3	100,0	--	--
NLS02	104,3	100,0	--	--
NLS03	80,4	68,0	210,8	32,0
NLS04	50,3	66,2	184,4	33,8
NLS05	46,6	66,0	168,2	34,0
NLS06	127,3	54,2	496,8	45,8

Após a análise do efeito da concentração de PLF68 no tamanho (Tabela 4) e estabilidade das partículas foi avaliada a capacidade dessas partículas interagirem com o DNA plasmidial (DNAP). Esta interação é fundamental para o processo de transfecção, uma vez que, a compactação do material genético é um dos papéis dos vetores não-virais (Hoekstra *et al.*, 2007).

Para isso foi utilizado o teste de mobilidade eletroforética (EMSA) e o padrão de migração pode ser visto na Figura 11. Nota-se que todas as NLSs apresentaram, pelo menos parcialmente, a capacidade de interação com o DNAP. A interação é observada pela diminuição na intensidade das bandas referentes ao DNAP no gel, pois este ao interagir com as NLSs não penetra o gel, ficando retido no poço onde foi aplicado. Entretanto, não foi possível estabelecer uma relação direta entre a capacidade de interação da partícula com o DNAP e a concentração de PLF68 usada nas formulações. Apenas as NLS02 e NLS03, contendo 0,36 e 0,6 mM do detergente, apresentaram uma menor capacidade de interação com o material genético.

Resultados e Discussão

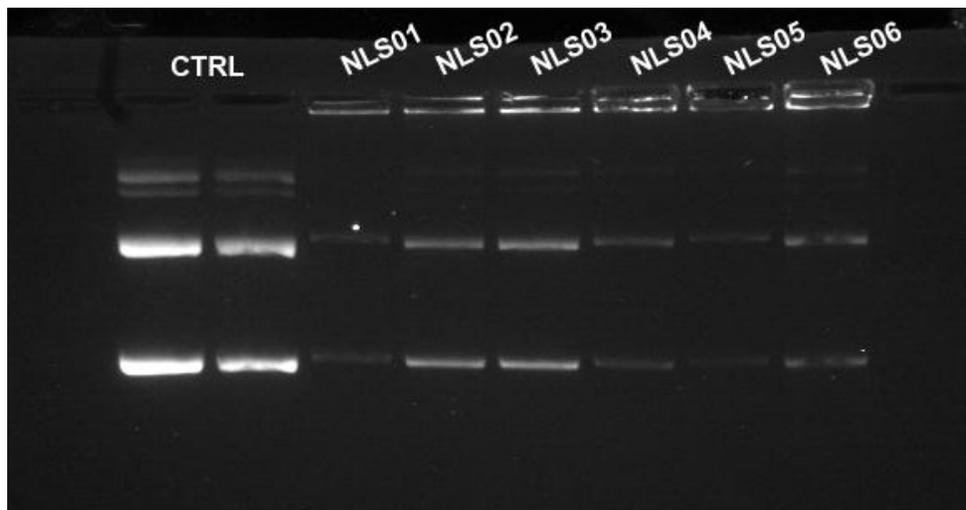


Figura 11: Avaliação da interação DNAp:NLSs em formulações contendo concentrações crescentes de PLF68 (de 0,12 a 2,4mM, conforme Tabela 3).

Por outro lado, a formulação NLS03, contendo 0,6 mM de PLF68, foi a que apresentou maior eficiência de transfecção, como avaliado pela porcentagem de células EGFP positivas (Figura 12). A formulação contendo 0,6 mM de PLF68 aumentou significativamente ($p < 0,05$) a porcentagem de células positivas para EGFP, em relação aos grupos contendo 0,84 e 2,4 mM de PLF68. Entretanto a formulação contendo 0,6 mM não apresentou diferença estatística, quando comparada aos outros grupos (formulações com 0,12; 0,36 e 1,2 mM de PLF68).

Apesar desta aparente vantagem, a formulação contendo 0,6 mM se mostrou instável (Figura 10) e com uma interação parcial com o DNAp (Figura 11). Além disso, quando aumentamos o volume do veículo, de 2 para 4 μ l (Figura 13) no ensaio de transfecção, a aparente vantagem na eficiência de transfecção apresentada pela formulação NLS03 foi revertida, e não foi detectada diferença, em relação as demais formulações (Figura 13).

Resultados e Discussão

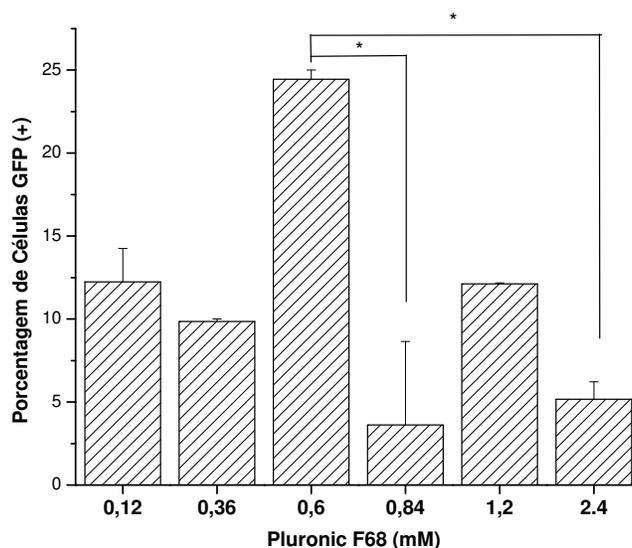


Figura 12: Eficiência da transfecção *in vitro* em células PC3 de NLSs contendo diferentes concentrações de PLF68 (de 0,12 mM a 2,4 mM), Tabela 3. Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6). *p <0,05 entre NLS03 e a NLS04 e NLS3 e a NLS06.

A partir desses dados foi adotada a concentração de 0,12 mM de PLF68 para a produção das NLSs, considerando-se a estabilidade física da mesma e também que não houve ganho na eficiência da transfecção, com concentrações maiores do surfatante. Cabe, contudo, ressaltar que com o aumento do volume do veículo de transfecção de 2 para 4 μ l a melhora na eficiência de transfecção, possivelmente se deve ao aumento na concentração de cargas positivas (atrativas para o DNAP). Esses resultados nos levaram a preparar formulações com diferentes concentrações de DOTAP.

Resultados e Discussão

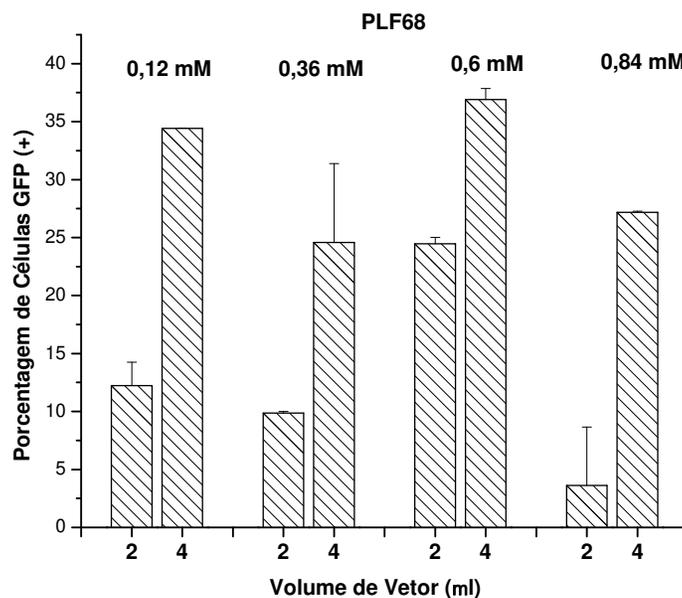


Figura 13: Eficiência da transfecção *in vitro* em células PC3 de diferentes volumes de NLSs, contendo diferentes concentrações de PLF68 (de 0,12 mM a 0,84 mM), Tabela 3. Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6).

Variação da concentração de DOTAP

A partir dos dados obtidos, variamos a concentração de DOTAP para avaliar um possível benefício em relação à eficiência de transfecção, que até então não havia ultrapassado 40% (Figura 13).

As concentrações de DOTAP testadas variaram de 1,3 a 4,3 mM, como mostrado na Tabela 5.

Resultados e Discussão

Tabela 5 Formulações de NLSs contendo diferentes concentrações de DOTAP.

Formulações	AE (mM)	PLF68 (mM)	DOTAP (mM)
NLS07	7,0	0,12	1,3
NLS08	7,0	0,12	2,3
NLS09	7,0	0,12	3,3
NLS10	7,0	0,12	4,3

Diferentemente do PLF68 o efeito do DOTAP, nas concentrações testadas, sobre o diâmetro médio das partículas foi discreto (Figura 14): aparentemente houve uma ligeira diminuição no diâmetro médio das partículas, de ca. 5 nm a cada 1 mM de DOTAP acrescentado. Esta diminuição pode estar relacionada à variação do potencial elétrico e estabilidade de cargas na superfície das nanopartículas, já que o DOTAP é carregado positivamente.

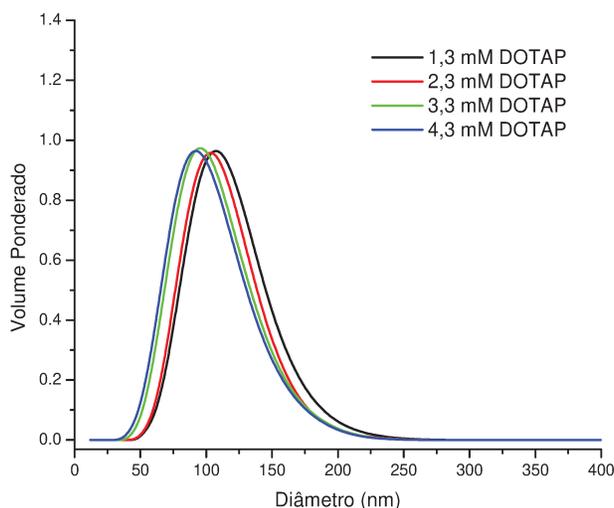


Figura 14: Tamanho das NLSs preparadas com diferentes concentrações de DOTAP: 1,3 mM (diâmetro médio = $110,6 \pm 27,6$ nm), 2,3 mM (diâmetro médio = $105,8 \pm 25,9$ nm), 3,3 mM (diâmetro médio = $99,0 \pm 27,5$ nm) e 4,3 mM (diâmetro médio = $96,0 \pm 27,9$ nm).

Resultados e Discussão

O ensaio de EMSA revelou uma completa imobilização do DNAP para as formulações NLS07 a NLS10 (Figura 15), efeito provavelmente relacionado ao aumento na quantidade de cargas positivas destas, fundamentais para o processo de interação com o DNAP.

A NLS08, que causou imobilização completa do DNA com a menor concentração de DOTAP, apresenta uma relação massa-massa de aproximadamente 10:1 (NLS08:DNAP), bastante satisfatória ao compararmos com as outras formulações da literatura: Olbrich e col. (2001) testaram NLSs preparadas com Compritol, Tween 80, Span 85 e EQ1 (EQ1, cloreto de N,N-di-(b-estearoiletil)-N,N-dimetilamonio) e necessitaram de uma razão 100:1 (NLS:DNAP) para a imobilização completa do DNAP. Asasutjarit e col. (2007) utilizaram planejamento fatorial para aperfeiçoar formulações de NLSs contendo cetilpalmitato, colesterol, brometo de dimetildioctadecil amônio e uma mistura de Tween 80 e Span 85 e em seu ensaio de EMSA foram necessárias relações de NLSs:DNAP de 1000:1, 5000:1 e até 10000:1 para a imobilização completa do DNAP, para as diferentes formulações testadas.

Resultados e Discussão

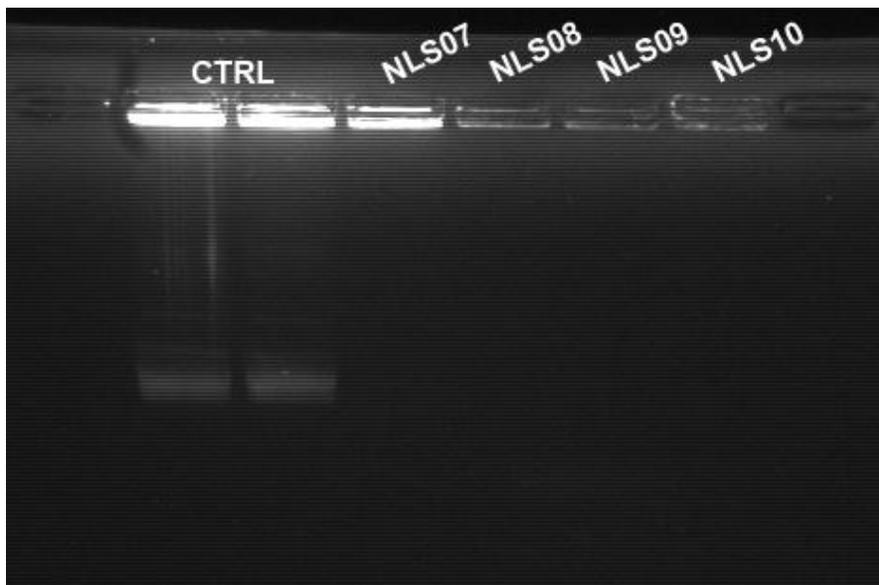


Figura 15: Avaliação da interação DNA:NLSs em formulações contendo concentrações crescentes de DOTAP (composição descrita na Tabela 5).

Foi então avaliada a eficiência de transfecção dessas partículas (Figura 16). Como, nestas novas formulações, as partículas apresentavam-se mais estáveis, decidimos introduzir controle com o agente de transfecção comercial LF2k. Nenhum grupo testado apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, apresentando uma eficiência de transfecção pelo menos equivalente àquelas geradas pelo kit comercial. Entretanto, entre as NLSs os grupos contendo 2,3; 3,3 e 4,3 mM de DOTAP a transfecção foi estatisticamente maior ($p < 0,05$) que no grupo contendo 1,3 mM, deixando clara a vantagem em aumentar a concentração do DOTAP na melhora na eficiência na transfecção para, pelo menos, 2,3 mM (Figura 16). Quando comparada a outras formulações de literatura essa concentração de DOTAP é baixa, pois Pozo-Rodriguez (2008) produziram NLS contendo 0,4 % (massa/volume) de DOTAP, o que equivaleria a, aproximadamente, 6 mM do lipídio catiônico, e obtiveram eficiência de aproximadamente 15% de células EGFP positivas.

Resultados e Discussão

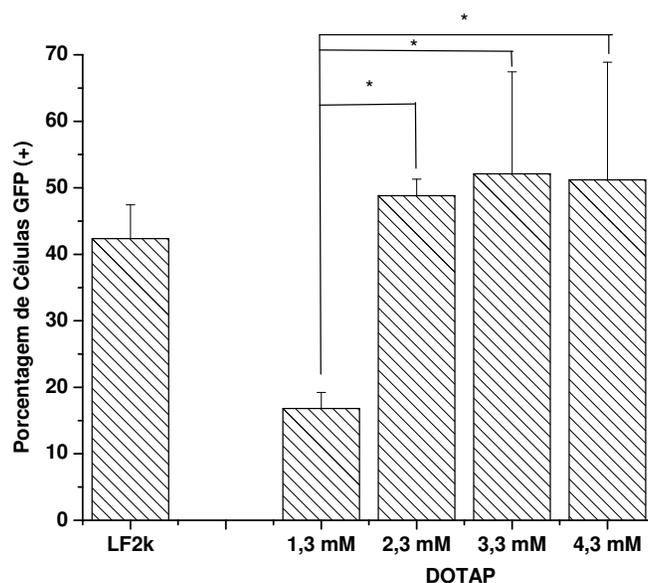


Figura 16: Eficiência da transfecção *in vitro* em células PC3 de NLSs contendo diferentes concentrações de DOTAP (de 1,3 mM a 4,3 mM). Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6). *p < 0,05 entre a NLS07 e a NLS08, NLS09 e NLS10. LF2k = Lipofectamina 2000®.

Efeito da DOPE nas formulações

Após esta etapa, foi testada a adição de DOPE as formulações. O DOPE é tido como um lipídio assistente (*helper*) em formulações lipossomais de transferência gênica (Zuhorn *et al.*, 2005) aumentando a dissociação do DNAP dos lipoplex e a eficiência da transfecção, provavelmente graças ao pequeno volume de sua cabeça polar e capacidade de formar ligações de hidrogênio (Yeagle, 2005), que lhe permite interagir com outros lipídios de cabeça polar volumosa como o DOTAP e fosfolipídios da membrana endossomal, modulando a estabilidade dessas.

Resultados e Discussão

Foram então preparadas formulações de NLSs com diferentes razões molares DOPE:DOTAP (1:10, 1:3 e 1:1), como mostrado na Tabela 6. É importante ressaltar que a concentração total de lipídios (DOPE e DOTAP) foi mantida constante, em 2,5 mM, para todas essas formulações.

Tabela 6 Formulações de NLSs contendo diferentes razões molares DOPE:DOTAP.

Formulações	AE (mM)	PLF68 (mM)	DOTAP (mM)	DOPE (mM)	Razão DOPE:DOTAP
NLS11	7,0	0,12	2,5	--	--
NLS12	7,0	0,12	2,25	0,25	1:10
NLS13	7,0	0,12	1,88	0,63	1:3
NLS14	7,0	0,12	1,25	1,25	1:1

Como para as formulações anteriores, iniciou-se a caracterização pelas medidas de diâmetro médio das partículas (Figura 17). O efeito da adição de DOPE no diâmetro médio das partículas foi discreto, como também observado com concentrações crescentes de DOTAP (Figura 14). Todas as formulações apresentaram um diâmetro médio em torno de 100 nm, e apenas na relação 1:3 DOPE:DOTAP a formulação apresentou um tamanho um pouco inferior ($88 \pm 27,4$ nm).

Resultados e Discussão

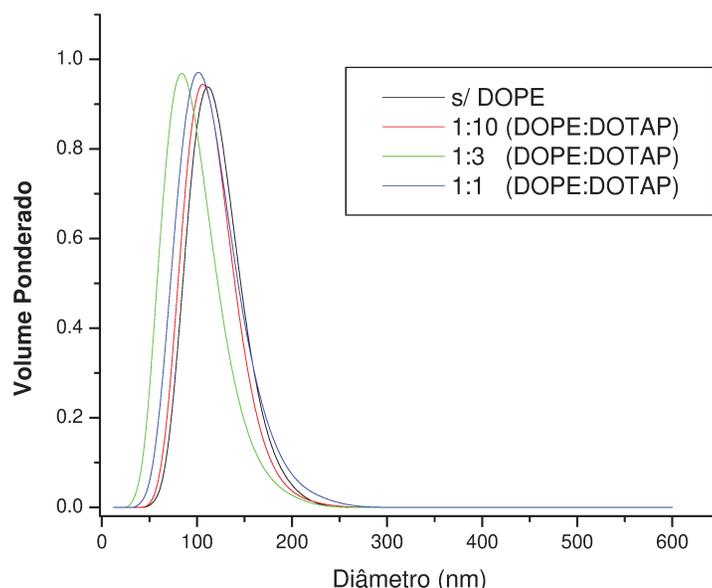


Figura 17: Tamanho das NLSs com formulações de diferentes razões DOPE:DOTAP: s/ DOPE (diâmetro médio = $113,8 \pm 25,6$ nm), 1:10 (DOPE:DOTAP) (diâmetro médio = $108,5 \pm 25,2$), 1:3 (DOPE:DOTAP) (diâmetro médio = $88,0 \pm 27,4$) e 1:1 (DOPE:DOTAP) (diâmetro médio = $105,4 \pm 30,1$).

O teste de retardamento na mobilidade eletroforética foi realizado com o mesmo volume testado inicialmente ($2 \mu\text{l}$). Nota-se que, para as formulações de maior concentração de DOPE (razão molar DOPE:DOTAP 1:3 e 1:1) há um arraste (Figura 18), indicando que uma certa fração do DNAP está livre, e que a capacidade de interação das partículas ficou comprometida. Acreditamos que, com o aumento da proporção de DOPE, as concentrações decrescentes de DOTAP utilizadas, prejudicaram a interação com o DNAP, uma vez que apenas o DOTAP contribui com as cargas positivas líquidas das NLSs.

É possível observar também, na presença de DOPE, um intenso brilho no poço (formulações NLS12 a 14), mostrando que o brometo de etídio teve acesso ao

Resultados e Discussão

DNAp, o que não foi visualizado nas formulações sem DOPE. Esta observação aponta para uma menor compactação do DNAp complexado com as partículas com DOPE ou que este lipídio, que tende a formar fases não lamelares (Lewis *et al.*, 1989), aumente a hidratação e favoreça a interdigitação de bicamadas modelo (Yeagle, 2005), conferindo menor grau de organização às NLSs, favorecendo assim o acesso do brometo de etídio ao DNAp (Zuhorn *et al.*, 2005).

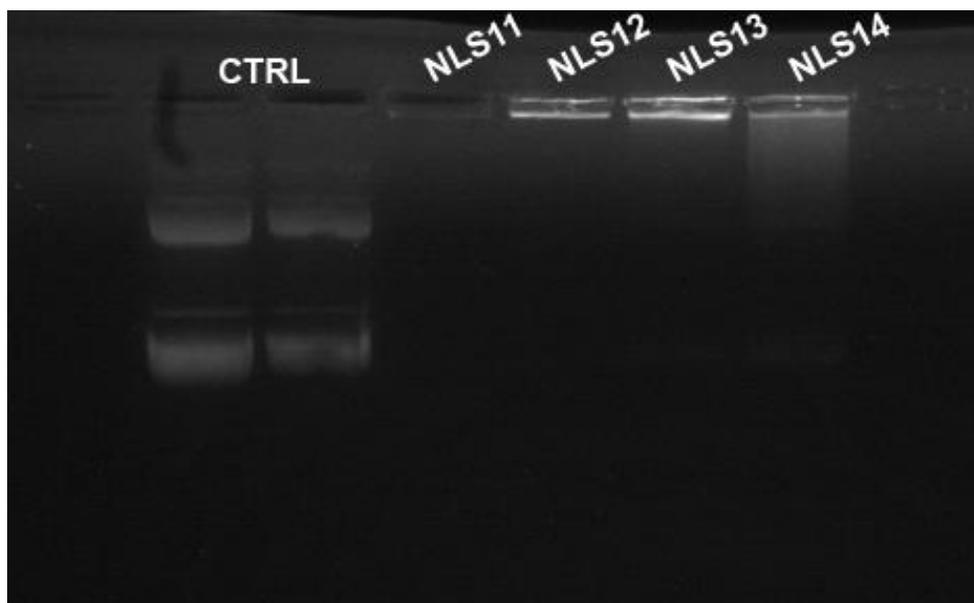


Figura 18: Avaliação da interação DNAp:NLSs em formulações contendo concentrações crescentes de DOPE. NLS11 sem DOPE e com diferentes razões molares DOPE:DOTAP; NLS12 (1:10) NLS13 (1:3) e NLS14 (1:1).

A eficiência de transfecção das formulações contendo concentrações crescentes de DOPE foi testada, revelando baixa eficiência para essas formulações (Figura 19). De fato, para todos os grupos contendo DOPE houve uma diminuição significativa da transfecção ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, contendo LF2k e em relação ao grupo sem DOPE ($p < 0,01$). É importante notar que, na formulação de relação DOPE:DOTAP igual a 1:10, a concentração de DOTAP é pequena, cerca

Resultados e Discussão

de 10% aquela da formulação sem DOPE, que apresentou uma boa interação com o DNAP, como mostrado na Figura 18.

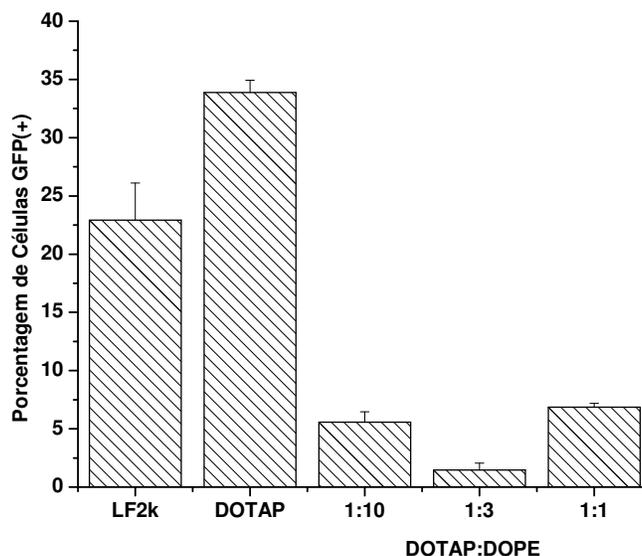


Figura 19: Eficiência da transfecção *in vitro* em células PC3 de NLSs contendo diferentes razões molares (DOPE:DOTAP), Tabela 6. Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6). *p <0,05 entre a LF2k e as formulações DOTAP:DOPE (1:10, 1:3 e 1:1); **p<0,01 entre a formulação s/ DOPE e as formulações DOTAP:DOPE (1:10, 1:3 e 1:1). LF2k = Lipofectamina 2000®.

Para tentar entender o porquê desta diferença foi realizado um novo ensaio, variando o volume das formulações de NLSs usado para transfecção: 1, 2, 4, 6, 8 μ l. O resultado obtido (Figura 20) mostra que, para a formulação contendo DOPE na razão molar de 1:10 em relação ao DOTAP houve aumento na eficiência de transfecção, diretamente proporcional ao volume de NLSs utilizado. Na formulação sem DOPE (Figura 20) não houve melhora na transfecção com

Resultados e Discussão

aumento do volume utilizado, i.e., o efeito máximo foi alcançado com 2 μ L de volume. Estes resultados indicam que a quantidade de DOTAP nas formulações é, de fato, o fator determinante na eficiência da transfecção.

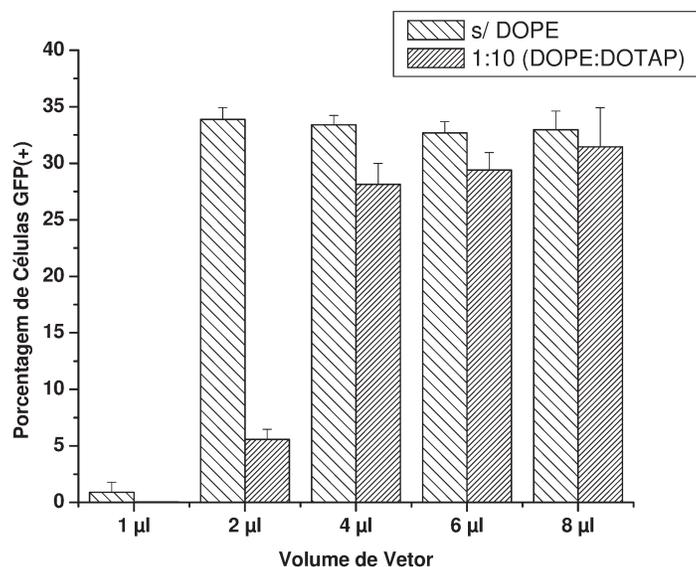


Figura 20: Eficiência da transfecção *in vitro* em células PC3 de NLSs contendo diferentes volumes de vetor sem ou com DOPE (1:10 DOPE:DOTAP correspondente à formulação NLS11, da Tabela 6). Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6).

Choi e col. (2007) prepararam formulações de NLSs contendo DOPE e não obtiveram taxas de transfecção maiores que 25 %, o que nos leva a crer que a DOPE não presente em NLSs os mesmo benefícios já demonstrados para lipossomas catiônicos.

Estrutura das NLSs

As NLS11 e NLS12 tiveram suas estruturas analisadas através da microscopia de força atômica (AFM). A Figura 21a mostra a estrutura das NLS11, onde é possível ver partículas de formato esférico e diâmetros de 206 nm a 974 nm, para as NLS12 (Figura 21b) também foi possível observar que as partículas apresentam um formato esférico e valores de diâmetro variando de 271 nm a 821 nm. Para a maior parte das partículas (Figura 21) os diâmetros são compatíveis com aqueles obtidos pelas medidas de tamanho utilizando-se de espalhamento de luz dinâmico (Figura 23). No entanto, observamos que o processo de preparo das amostras sobre superfície de mica (carregada negativamente) teve influência sobre a estabilidade das partículas, provocando a fusão de algumas, o que justifica as presenças maiores (~800 – 1000 nm) observadas por AFM.

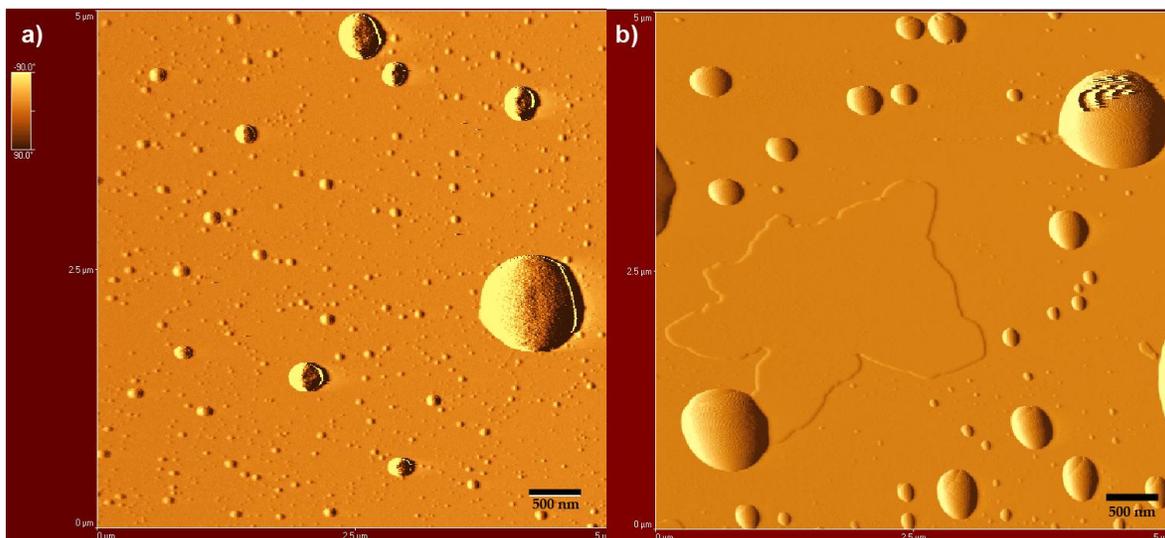


Figura 21: Imagens de Microscopia de Força Atômica das NLS11 (a) e NLS12 (b) sobre suporte de mica (5X5 μm).

Estabilidade das formulações contendo DOPE

Uma semana após o preparo das NLSs (Tabela 6) repetimos o teste de eficiência de transfecção dessas duas formulações (NLS11 e NLS12), variando a quantidade de DNAP e observamos diminuição na eficiência de transfecção com o aumento das concentrações de DNAP, para ambas formulações (Figura 22). Surpreendentemente, obtivemos resultados inesperados (Figura 22), pois a baixa capacidade de transfecção observada anteriormente com a formulação contendo DOPE na proporção de 1:10 para o DOTAP (Figura 19), desapareceu.

Como o aumento na quantidade de DNAP não favoreceu a eficiência de transfecção, nem para a formulação sem DOPE nem para a formulação contendo DOPE:DOTAP (1:10), é possível que as maiores concentrações de DNAP tenham sido tóxicas para as células PC3, pois não foi possível observar um efeito de platô máximo de transfecção, como anotado para o aumento no volume/quantidade de vetor (Figura 20). Além disso, é preciso destacar que não detectamos evidências de efeitos tóxicos das NLSs nos testes de transfecção, quando testados diferentes volumes/quantidades (Figura 20), nem nos testes de citotoxicidade frente a células 3T3 (como mostramos na Figura 30).

Quanto às formulações que contém DOPE, cogitamos a possibilidade de: i) elas aumentarem o tempo de equilíbrio para estruturação das nanopartículas, como discutimos adiante, em virtude de características físicas como diâmetro (Figura 23) e polidispersidade (Figura 24) das partículas, justificando os efeitos similares aos obtidos com as formulações sem DOPE, após uma semana. Ou ainda a DOPE esteja sendo expelida das partículas com o passar do tempo. Este resultado merece uma investigação mais aprofundada sobre a organização estrutural das NLSs.

Resultados e Discussão

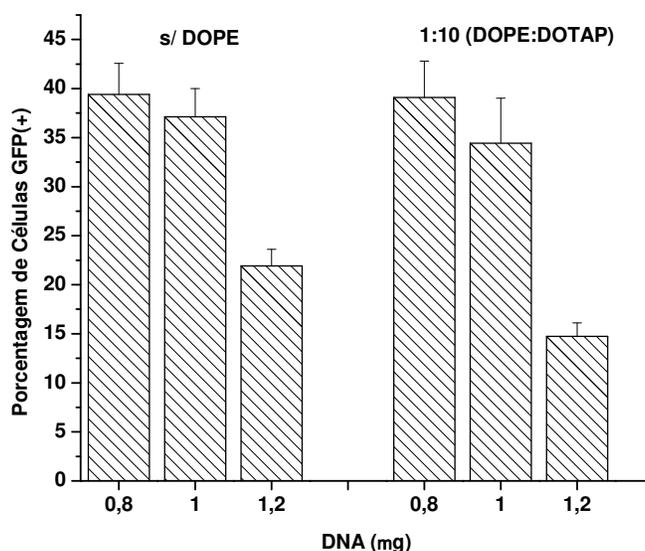


Figura 22: Eficiência da transfecção *in vitro* em células PC3 de NLSs sem ou com DOPE (1:10 DOPE:DOTAP, formulação NLS11 da Tabela 6) contendo diferentes quantidades de DNAp (de 0,8 a 1,2 μ g). Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6).

Entretanto, cabe notar que as eficiências de transfecção obtidas pelas NLSs até aqui se apresentam equivalentes ou melhores do que aquelas descritas na literatura. Choi e col. (2007) testaram a eficiência de transfecção de NLSs contendo Tridecanoato de glicerol, dimetilaminoetanol carbamoil colesterol, DOPE e Tween 80 e obtiveram valores máximos de transfecção de 20 %, utilizando uma razão de massas entre o lipídio catiônico:DNA de 9:1, enquanto que em nossos testes utilizamos 2:1 (DOTAP:DNAP) e obtivemos eficiências de 40 % na maioria dos testes, sendo possível observar valores de até 60 % para a NLS11 (Figura 27).

Avaliação da estabilidade física das partículas

Nanopartículas como as descritas na Tabela 6 foram preparadas e tiveram seu diâmetro médio (Figura 23) e potencial Zeta (Figura 25) acompanhados por um período de 140 dias de armazenamento, a 4 °C. Os resultados da Figura 23 mostram que as NLSs preparadas tem diâmetro médio semelhante, independentemente da presença de DOPE na formulação, indicando que a matriz das nanopartículas (AE) tem maior contribuição na determinação do tamanho das nanopartículas do que o DOPE (Figura 17), e/ou o DOTAP (Figura 14) nas concentrações testadas, constituintes da interface da partícula, nas concentrações testadas. Todas as formulações, com exceção da NLS14 (180 nm), apresentaram um diâmetro médio entre 120-140 nm e boa uniformidade populacional, como indicado pelos baixos valores de polidispersidade (Figura 24), i.e., dentro de valores aceitáveis para administrações parenterais (Müller *et al.*, 2004). A presença de DOPE parece exercer um pequeno efeito sobre a polidispersidade, possivelmente por seu efeito sobre o arranjo lipídico das NLSs, como indicaram dados de ligação ao DNAP (Figura 18) e proteção à DNase (Figura 26), aumentando a heterogeneidade das partículas (Figura 24).

Resultados e Discussão

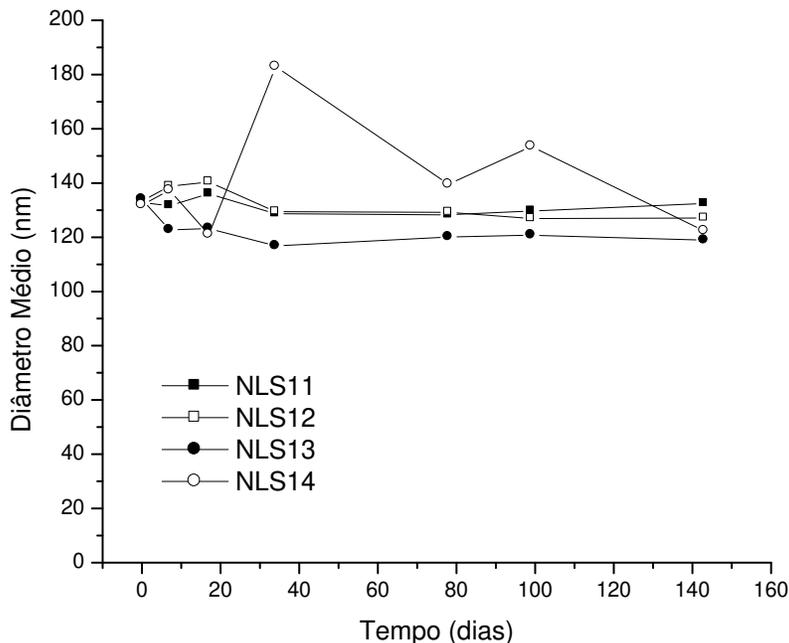


Figura 23: Medidas de diâmetro médio das nanopartículas em função do tempo. Armazenados a 4°C. ■ NLS11, □ NLS12, ● NLS13, ○ NLS14.

Outra característica importante das nanopartículas é a carga de superfície das mesmas, determinada pelo potencial Zeta. Geralmente dispersões com valores de potencial Zeta maiores que ± 30 mV são consideradas fisicamente estáveis, graças à repulsão eletrostática entre as partículas (Saupe & Rades, 2007).

Para as NLSs utilizadas como sistema de transferência de genes o Potencial Zeta, além de ser um parâmetro da estabilidade da suspensão, é importante porque contabiliza as cargas totais de superfície (incluindo aquelas positivas do DOTAP) que determinam a interação da partícula com o DNAp, como mostrado anteriormente (Figura 18).

A Figura 25 traz os valores de potencial Zeta (em mV) e desvio padrão para as formulações Tabela 6, no dia do preparo e após até 140 dias de armazenamento.

Resultados e Discussão

É possível observar alterações nos valores de carga iniciais, principalmente nos primeiros 40 dias que, mesmo assim, apresentam-se dentro dos valores de desvio padrão. Evidencia-se também uma ligeira tendência a aumento do potencial Zeta com o passar do tempo sendo que, após 80 dias, as partículas praticamente não diferem mais umas das outras.

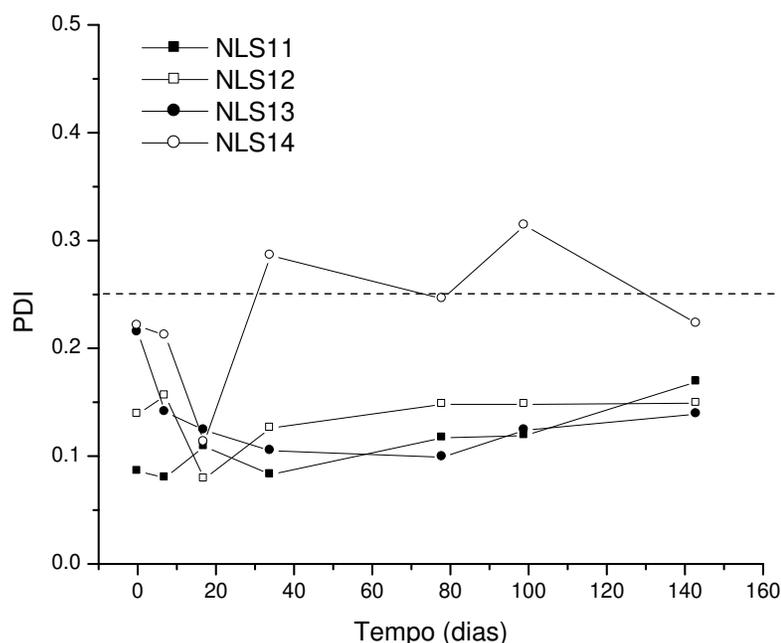


Figura 24: Valores de PDI das nanopartículas em função do tempo. Armazenados a 4°C. ■ NLS11, □ NLS12, ●NLS13, ○ NLS14. A linha tracejada indica o limite máximo de PDI (0,25) aceitável para administrações parenterais (Müller *et al.*, 2004).

Este longo tempo de equilíbrio das cargas na superfície das NLSs pode ser um indício de que rearranjos importantes na organização de seus componentes acontecem com o passar do tempo, justificando a necessidade de se monitorar lipídios e surfatantes no complexo, ao longo do tempo. Neste sentido, medidas espectroscópicas ou de difração de Raios-X poderiam ser bastante úteis,

Resultados e Discussão

identificando alterações na fração ligada ao complexo, grau de imobilização de cada componente e ajudando a identificar a estruturação das nanopartículas (matriz hidrofóbica, região de interface com a água,...). Estas análises esclareceriam também a aparente instabilidade das vesículas contendo DOPE em função do tempo (Figura 23 e Figura 24) que pode ser devido a um maior tempo requerido para que as NLSs com este fosfolipídio atinjam equilíbrio ou ainda à exclusão da DOPE dessas nanopartículas.

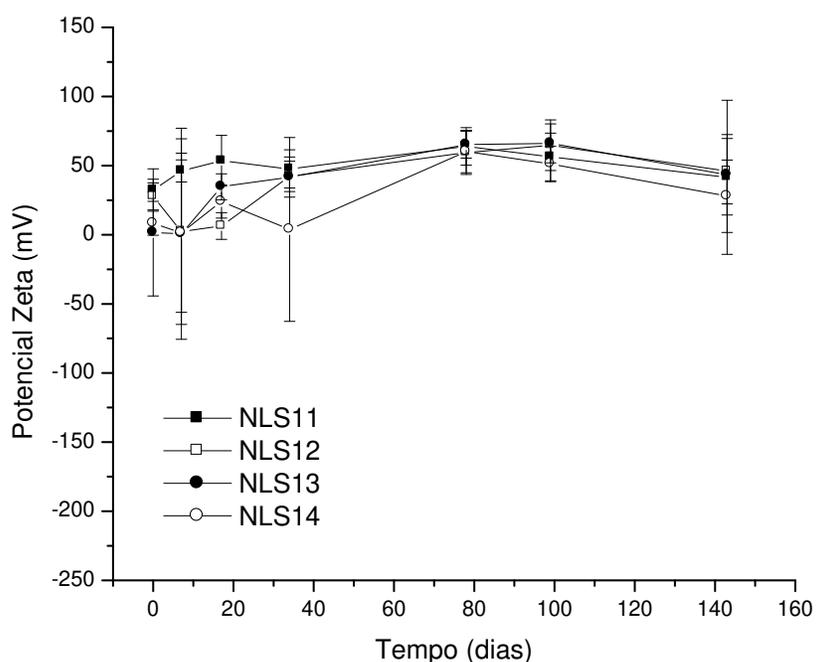


Figura 25: Medidas do potencial Zeta das nanopartículas em função do tempo. Armazenados a 4°C. ■ NLS11, □ NLS12, ● NLS13, ○ NLS14.

Com o armazenamento, as três primeiras formulações (NLS11, NLS12 e NLS13) se apresentam satisfatoriamente estáveis durante o período estudado (140 dias), quanto ao seu tamanho médio (Figura 23), valores de PDI (Figura 24) e potencial Zeta (Figura 25). Os valores médios de diâmetro das partículas não

Resultados e Discussão

sofreram grandes alterações e a polidispersidade apresentou valores próximos (Figura 24); até mesmo em relação ao discreto efeito do DOPE na formulação NLS14.

Os resultados das Figura 23 e Figura 25 indicam que as NLSs apresentam uma estabilidade satisfatória quanto a dois parâmetros físico-químicos: diâmetro médio e potencial Zeta, importantes na caracterização deste tipo de nanopartículas, uma vez que determinam a estabilidade física, bem como propriedades biofarmacêuticas da preparação (Asasutjarit *et al.*, 2007, Choi *et al.*, 2007; Vighi *et al.*, 2007). Além disso, demonstram uma melhor capacidade de estocagem das NLSs quando comparadas a lipossomas catiônicos, utilizados como vetores não-virais, que apresentam uma estabilidade de aproximadamente 2 - 3 meses, quando estocados em suspensão a 4 °C (Anchordoquy & Koe, 2000).

Ensaio de proteção à DNase I

Uma importante capacidade dos sistemas de transferência de genes não-virais é a de proteger o material genético carregado da ação de DNases (Pozo-Rodríguez *et al.*, 2007, 2009).

Para avaliar essa capacidade as formulações preparadas com frações molares crescentes de DOPE foram complexadas com DNAP e em seguida submetidas a ação da DNase I, por 30 min. a 37 °C.

A análise foi realizada através de um gel de agarose a 1,3 % (Figura 26). No gel é possível observar no primeiro poço o controle negativo, constituído de DNAP íntegro, i.e., não digerido; o segundo poço contém o controle positivo, em que o DNAP foi completamente digerido pela DNase e os pequenos fragmentos obtidos não são passíveis de serem visualizados nessa região no gel. Na ausência de DOPE

Resultados e Discussão

(NLS11) houve boa proteção do DNAp contra a ação enzimática. Nos grupos testados com concentrações crescentes de DOPE (NLS12 a NLS14) é possível observar um decréscimo na intensidade das bandas, acompanhando o aumento da proporção de DOPE nas formulações, o que indica uma menor capacidade de proteger o material genético, ou menor compactação do DNAp nessas nanopartículas, ficando o material genético mais exposto e passível de ser digerido pela DNase. Estes achados estão de acordo com uma menor compactação do DNAp nas formulações contendo DOPE, como foi sugerido anteriormente pela maior incorporação de brometo de etídio nestas NLSs (Figura 18).

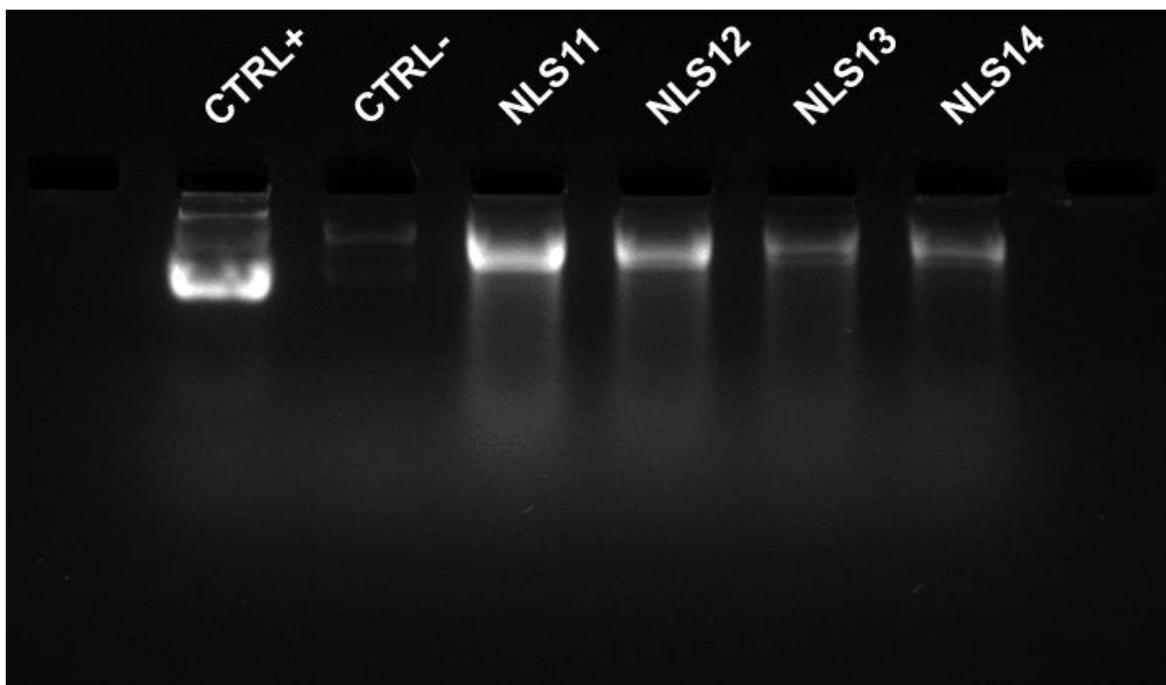


Figura 26: Ensaio de proteção do DNAp à ação de DNase I. Poço 1: Controle negativo, somente DNAp; Poço 2: Controle positivo, DNAp e DNase I; Poço 3: complexo NLS11:DNAp e DNase I; Poço 4: complexo NLS12:DNAp e DNase I; Poço 5: complexo NLS13:DNAp e DNase I; Poço 6: complexo NLS14:DNAp e DNase I.

Resultados e Discussão

É importante ressaltar que a formulação sem DOPE apresentou recuperação do material próxima de sua totalidade, mostrando que as NLSs são bastante eficaz também na proteção do material carregado, além da excelente capacidade de transfecção (Figura 26).

Os resultados obtidos aqui estão de acordo com aqueles obtidos por Pozo-Rodríguez e col. (2007) que, utilizando NLSs produzidas com o lipídio Precirol® ATO 5, DOTAP e Tween 80 demonstraram que o grau de compactação do DNAP determina o grau de proteção à ação de DNase I. Esses autores demonstraram que a condensação e proteção do material carregado da degradação citoplasmática é uma característica muito importante em um sistema de sistemas de transferência de genes (Pozo-Rodríguez *et al.*, 2007).

Internalização e tráfego intracelular das partículas

O entendimento dos processos de internalização e tráfego no interior das células é muito útil para o desenvolvimento racional e mais eficiente de agentes de transfecção (Pozo-Rodríguez *et al.*, 2008). Diferentes mecanismos de internalização são possíveis para a endocitose de vetores não-virais como: fagocitose, pinocitose, internalização mediada por clatrina ou caveolina (Pozo-Rodríguez *et al.*, 2009).

Para avaliar o mecanismo pelo qual as NLSs obtidas são internalizadas pelas células eucarióticas, utilizamos como modelo células PC3. O primeiro ensaio foi realizado utilizando dois inibidores de endocitose, a Filipina III (FIII) e a Clorpromazina (CPM). Através de sua ligação com o colesterol, componente dos microdomínios que contêm caveolina, FIII é capaz de perturbar a organização dos domínios de membrana (*rafts*), comprometendo assim essa via de internalização. Já

Resultados e Discussão

a CPM inibe a endocitose mediada por receptores dependentes de clatrina, através da redução do número de invaginações associadas aos receptores de superfície celular, o que leva a um acúmulo de clatrina e proteínas adaptadoras de clatrina (AP-2) em um compartimento endossomal (Orlandi & Fishman, 1998; Rejman *et al.*, 2006; Pozo-Rodríguez *et al.*, 2009).

A Figura 27 revela a clara influência exercida pela clorpromazina na eficiência da transfecção mediada pelas NLSs aqui preparadas. Em comparação com os ensaios sem nenhum inibidor, aqueles contendo CPM levaram a redução na eficiência de transfecção de quase 70%, para ambas as formulações de NLSs testadas (NLS11 e NLS 12, sem e com DOPE, respectivamente). Essa diferença foi corroborada pela análise estatística, que revelou uma diferença significativa ($p < 0,05$) nas células tratadas com CPM em relação as células que foram tratadas com FIII e ao grupo controle, indicando também que a FIII não exerce qualquer efeito sobre a eficiência de transfecção das NLSs.

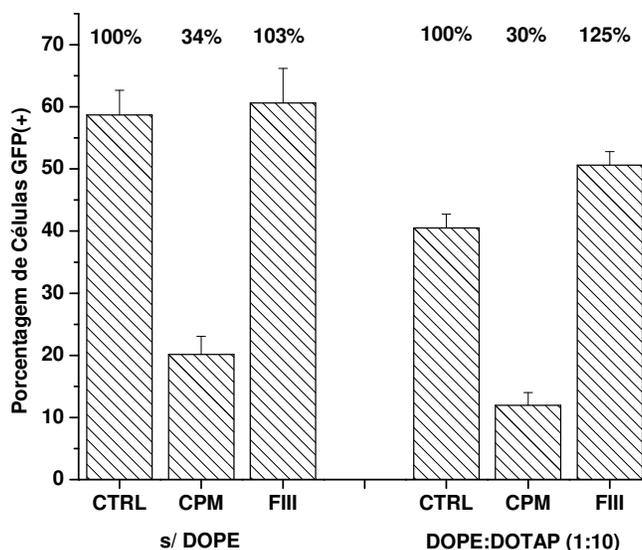


Figura 27: Avaliação do efeito dos inibidores de endocitose na transfecção de células PC3 mediada por NLSs, indicando a porcentagem de redução na eficiência, em relação à eficiência do

Resultados e Discussão

grupo controle. CPM e FIII referem-se aos inibidores de endocitose clorpromazina e Filipina III, respectivamente. Os níveis de expressão de EGFP nas células PC3 foram determinados por citometria de fluxo 24 h após a transfecção. Os valores são a média + DP da eficiência de transfecção (n = 6).

Esse resultado evidencia a participação da endocitose mediada por clatrina na transfecção por NLSs, sendo um indício de que o tamanho das partículas está determinando o tipo de endocitose que o sistema vai sofrer. Como sugerido por Rejman e col. (2006) partículas em torno de 100 nm têm seu processo de endocitose nas células eucarióticas mediado por clatrina, enquanto partículas maiores que 500 nm são internalizadas através da via dependente de caveolina. A internalização das nanopartículas nas células também foi analisada através da microscopia de fluorescência (Figura 28), 1 h após a transfecção, usando-se OLN marcados com isotiocianato de fluoresceína, como descrito em métodos.

Na Figura 28b é observada a fluorescência do FITC-OLN, utilizado na formação do complexo FITC-OLN:NLS, na formulação NLS11, i.e., sem DOPE. A imagem indica que o FITC-OLN está concentrado em pequenos pontos verdes, sugerindo assim que esteja formando complexo com as NLSs, uma vez que o FITC-OLN não associado às partículas apresenta-se de distribuído de maneira difusa no interior celular, como será mostrado adiante (Figura 29c).

A Figura 28a apresenta a microscopia óptica das células PC3; sua sobreposição com a imagem de fluorescência (Figura 28c) auxilia na localização das partículas, sobre ou no interior das células. É interessante ressaltar que, no período de 1 h, uma parcela significativa do FITC-OLN estava ainda complexada com as NLSs.

Resultados e Discussão

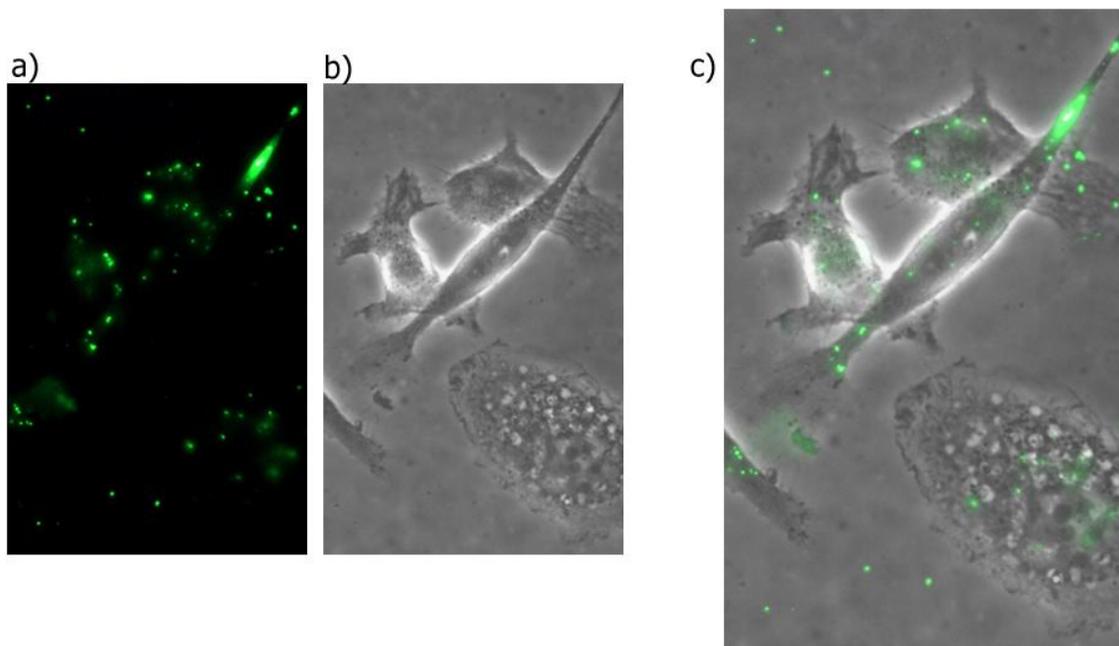


Figura 28: Microscopia de células PC3 após 1 h de transfecção com a formulação NLS11. a) Microscopia de fluorescência do FITC-OLN nas células PC3, após 1 h de transfecção. b) Microscopia de luz das células PC3, após 1 h de transfecção. c) Sobreposição das microscopias de luz e fluorescência. Aumento de 60x.

O mesmo experimento foi realizado 4 h após a transfecção, para acompanhar a distribuição celular do FITC-OLN e sua possível migração para o núcleo. Na Figura 29a vê-se uma célula PC3 em microscopia de luz, cercada por diversas nanopartículas que não foram endocitadas, e que permaneceram complexadas com o OLN mesmo após as 4 h (como evidenciado pelos pontos verdes na Figura 29c). Na Figura 29b a demarcação nuclear é visualizada pela coloração azul característica do fluoróforo Hoechst e sugere uma co-localização com o FITC-OLN (Figura 29c). A Figura 29c mostra que, após 4h da transfecção, o material genético previamente marcado com FITC está difuso, tanto no citoplasma quanto no núcleo das células PC3. A Figura 29d mostra a sobreposição das

Resultados e Discussão

imagens Figura 29b e Figura 29c, confirmando a sobreposição das marcações do FITC-OLN com a do fluoróforo Hoechst (núcleo celular).

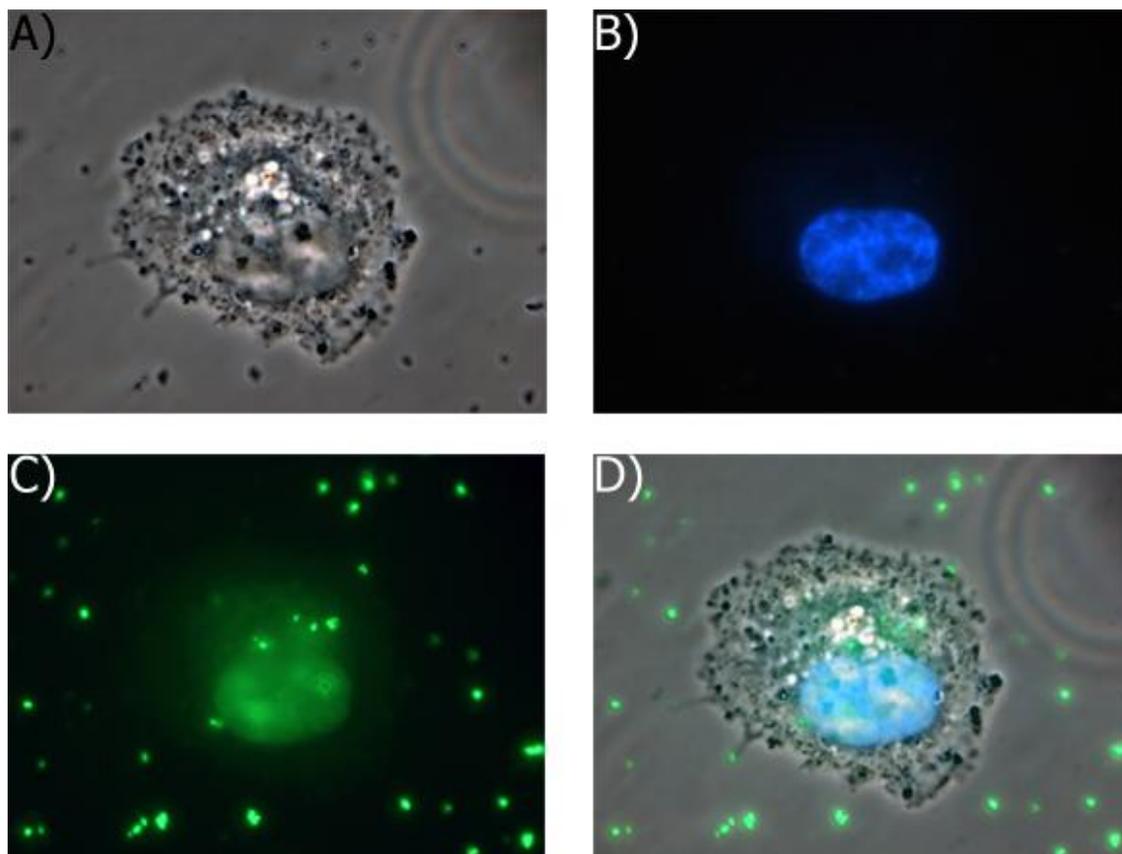


Figura 29: Microscopia de células PC3 após 4 h de transfecção com a formulação NLS11. a) Microscopia de luz de PC3. b) Microscopia de fluorescência com núcleo corado com Hoechst. c) microscopia de fluorescência do FITC-OLN. d) Sobreposição das microscopias de luz e fluorescência. Aumento de 60x.

Esse estudo sugere que as formulações de NLSs testadas são capazes de direcionar o material genético transportado ao núcleo da célula, de maneira bastante efetiva.

Essas informações são muito importantes, uma vez que uma melhor compreensão dos mecanismos que regem a eficiência de transfecção, desde a

Resultados e Discussão

formação do complexo até a sua liberação intracelular, nos levará ao desenvolvimento de vetores não-virais eficientes para terapia gênica (Gascón & Pedraz, 2008).

Avaliação do efeito citotóxico das NLSs

A avaliação da citotoxicidade das NLSs em células 3T3 (Figura 30a) e células PC3 (Figura 30b) foi feita através do teste do MTT, como descrito em métodos. Foram testadas as formulações sem DOPE e nas diferentes razões molares DOPE:DOTAP, variando em 1:10, 1:3 e 1:1 (Tabela 6). As concentrações testadas equivalem a 0,8, 4, 8, 20 e 40 vezes a concentração utilizada nos testes para determinar a eficiência de transfecção das NLSs.

Como esperado, as partículas não apresentaram efeito citotóxico nas concentrações testadas nas células 3T3 (Figura 30a), uma vez que são produzidas com lipídios de baixa citotoxicidade intrínseca, biocompatíveis e biodegradáveis (Toogswan *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2000).

Entretanto, as NLSs apresentaram certa citotoxicidade quando testadas em células PC3 (Figura 30b). A concentração de 19 mg/mL das NLSs testadas, equivalente a 40 vezes o utilizado nos testes de transfecção, atingiu 50% de viabilidade, o que ainda nos permite utilizar concentrações até 5 vezes maior que a utilizada nos testes anteriores sem grande preocupação com o efeito tóxico das partículas em células PC3.

Mas nem todas as formulações de NLSs apresentam baixa citotoxicidade, a escolha do lipídio catiônico pode ser fundamental para a toxicidade dos sistemas. Asasutjarit e col. (2007) utilizaram brometo de dimetildioctadecil amônio como lipídio catiônico em suas formulações, que apresentaram maior toxicidade *in vitro*.

Resultados e Discussão

Esses autores demonstraram que, a partir de 0,3 mg/ml do lipídio catiônico já se obtinha um efeito tóxico considerável, atingindo de 20 – 40 % de viabilidade. Toxicidade esta atribuída ao fato das ligações éster da molécula de DOTAP serem metabolizados facilmente em células de mamíferos, enquanto brometo de dimetildioctadecil amônio, contem duas cadeias alifáticas ligadas diretamente ao grupo amina, que as torna de difícil metabolização (Asasutjarit *et al.*, 2007).

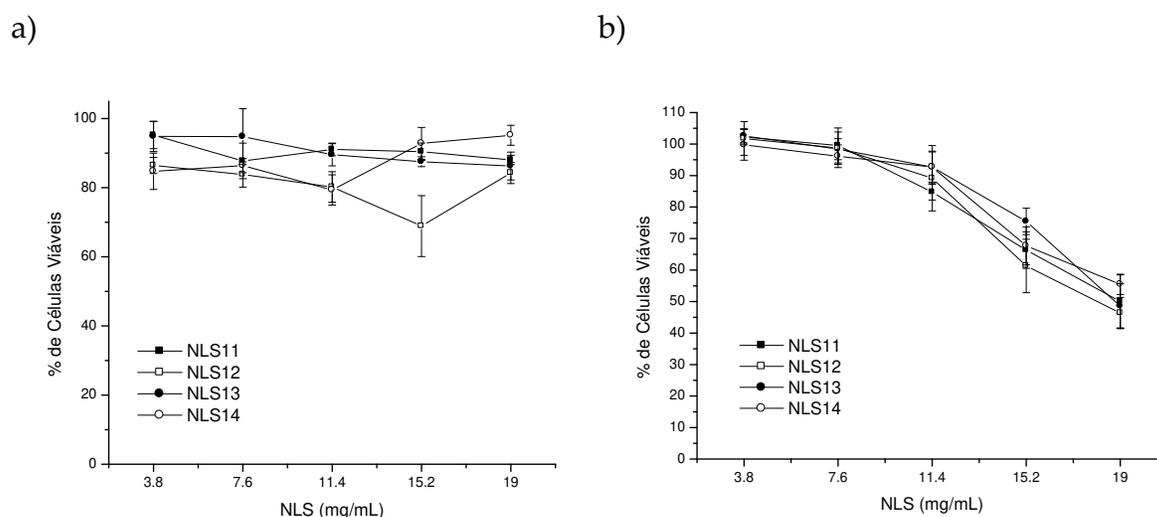


Figura 30: Avaliação da citotoxicidade das NLSs: a) células 3T3 e b) células PC3, pelo teste de redução do MTT. ■ NLS11, □ NLS12, ●NLS13, ○ NLS14.

Testes de citotoxicidade em cultura de células são considerados como bom parâmetro preliminar da toxicidade de novos fármacos e este resultado indica que as NLSs aqui preparadas tem uma boa perspectiva de emprego futuro, como sistema de transferência de genes (*gene delivery*).

Conclusão

Parte 2

- Uma nova metodologia, utilizando extrusão, se mostrou satisfatória para a produção das nanopartículas lipídicas sólidas constituídas de ácido esteárico, Pluronic F68 e DOTAP (com ou sem DOPE), em diferentes razões molares.
- Dentre as formulações testadas a NLS11 (AE, 7 mM, DOTAP, 2,5mM e PLF68, 0,12 mM) foi a que apresentou melhores resultados quanto à estabilidade, proteção à ação da DNase e eficiência de transfecção.
- As formulações tiveram sua composição aperfeiçoada e foi possível obter NLSs com diâmetro médio de 100 nm e potencial Zeta médio de + 40 mV e com estabilidade bastante satisfatória, por até 140 dias.

Conclusões

- A eficiência de transfecção em células eucarióticas PC3 foi comparável a da Lipofectamina 2000® (sistema de transfecção disponível no mercado).
- As formulações apresentaram baixa toxicidade contra células fibroblásticas 3T3, em cultura.
- As formulações contendo DOPE não apresentaram vantagens em relação a formulação NLS11, quanto à eficiência de transfecção, ligação ao DNA, proteção frente à DNase e estabilidade, não justificando sua utilização em NLSs.
- Foi demonstrada a participação do sistema de endocitose celular mediado por clatrina na internalização das NLSs preparadas, nas células PC3.
- A microscopia de fluorescência evidenciou eficiente transporte do material transportado (DNAP) pelas NLSs até o núcleo celular, após um período de 4 h da transfecção.

Os resultados aqui obtidos mostram que as NLSs são bastante promissoras para o transporte de material genético. Na sequência deste trabalho pretendemos usar as NLSs como sistemas de transferência de genes, para incorporar o gene da PTEN, uma proteína supressora de tumores e indutora de apoptose, em células de câncer de próstata.

Referências

- ADACHI, H.; IRIE, T.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Stabilization of prostaglandin-E1 in fatty alcohol propylene-glycol ointment by acidic cyclodextrin derivative, ortho-carboxymethyl-ortho-ethyl-beta-cyclodextrin. *Chem. Pharm. Bull.* v. 40, p. 1586-1591, 1992.
- AHMAD, I.; FASIHULLAH, Q.; NOOR, A.; ANSARI, I.A.; ALI, Q.N. Photolysis of riboflavin in aqueous solution: a kinetic study. *Int. J. Pharm.* v. 280, p. 199-208, 2004.
- ALMEIDA, A. C. P. **Lidocaína lipossomal produzida em processo escalonável: formulação, caracterização e testes biológicos.** Tese de Doutorado - Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas 2008.
- ANCHORDOQUY, T.J. & KOE, G.S. Physical stability of nonviral plasmid-based therapeutics. *J. Pharm. Sci.* v. 89, p. 289-296, 2000.
- ANICETO, C.; CANAES, L.S.; FATIBELLO-FILHO, O.; CAVALHEIRO, C.C.S. Determinação espectrofotométrica de vitamina B2 (riboflavina) em formulações farmacêuticas empregando sistema de análises por injeção em fluxo. *Quim. Nova* v. 23, p. 637-640, 2000.
- AOYAMA, Y.; OTSUKI, J.; NAGAI, Y.; KOBAYASHI, K.; TOI, H. Host-guest complexation of oligosaccharides: interaction of maltodextrins with hydrophobic fluorescence probes in water. *Tetrahedron Lett.* v. 33, p. 3775-3778, 1992.

Referências

- ASASUTJARIT, R.; LORENZEN, S.I.; SIRIVICHAYAKUL, S.; RUXRUNGTHAM, K.; RUKTANONCHAI, U.; RITTHIDEJ, G.C. Effect of solid lipid nanoparticles formulation compositions on their size, zeta potential and potential for in vitro pHIS-HIV-hugag transfection. *Pharm. Res.* v. 24, p. 1098-1107, 2007.
- BALL, G.F.M. **Vitamins. Their role in the human body.** London, Blackwell Publishing, 2004.
- BAREFORD, L.M.; PHELPS, M.A.; FORAKER, A.B.; SWAAN, P.W. Intracellular processing of riboflavin in human breast cancer cells. *Mol. Pharm.* v. 5, p. 839-848, 2008.
- BAX, A. & DAVIS, D.G. Practical aspects of two-dimensional transverse NOE spectroscopy. *J. Magn. Res.* v. 63, p. 213, 1985.
- BEKERS, O.; BEIJNEN, J.H.; OTAGIRI, M.; BULT, A.; UNDERBERG, W.J.M. Inclusion complexation of doxorubicin and daunorubicin with cyclodextrins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 8, p. 671-674, 1990.
- BEKERS, O.; UIJTENDAAL, E.V.; BEIJNEN, J.H.; BULT, A.; UNDERBERG, J.M. Cyclodextrins in the pharmaceutical field. *Drug Develop. Ind. Pharm.* v. 17, p. 1503-1549, 1991.
- BENDER, D.A. **Nutritional biochemistry of the vitamins.** Cambridge, Cambridge, 2003.
- BETTINETTI, G.P.; MURA, P.; LIGUORI, A.; BRAMANTI, G.; GIORDANO, F. Solubilization and interaction of naproxen with cyclodextrins in aqueous-solution and in the solid-state. *Farmaco* v. 44, p. 195-213, 1989.
- BHAVSAR, M.D. & AMIJI, M.M. Polymeric nano- and microparticle technologies for oral gene delivery. *Expert. Opin. Drug Deliv.* v. 4, p. 197-213, 2007.
- BIWER, A.; ANTRANIKIAN, G.; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v. 59, p. 609-617, 2002.
- BOUDEVILLE, P. & BURGOT, J.L. A new pH-metric methodology for the determination of thermodynamic inclusion constants of guest cyclodextrin complexes. *J. Pharm. Sci.* v. 84, p. 1083-1089, 1995.

Referências

- BOYD, B.J. Past and future evolution in colloidal drug delivery systems. *Expert. Opin. Drug Deliv.* v. 5, p. 69-85, 2008.
- BRADBURY, R. **Cancer**. Berlin, Springer, 2007.
- BREWSTER, M.E.; ESTES, K.S.; BODOR, N. Development of a non-surfactant formulation for alfaxalone through the use of chemically-modified cyclodextrins. *J. Parenter. Sci. Technol.* v. 43, p. 262-285, 1989.
- BREWSTER, M.E. & LOFTSSON, T. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* v. 59, p. 645-666, 2007.
- BUSCHMANN, H.J.; KNITTEL, D.; SCHOLLMEYER, E. New textile applications of cyclodextrins. *J. Incl. Phen. Macroc. Chem.* v. 40, p. 169-172, 2001.
- BUSCHMANN, H.J. & SCHOLLMEYER, E. Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. *J. Cosm. Sci.* v. 53, p. 185-191, 2002.
- CABECA, L.F.; FERNANDES, S.A.; DE PAULA, E.; MARSAIOLI, A.J. Topology of a ternary complex (propraracaine-beta-cyclodextrin-liposome) by STD NMR. *Magn. Reson. Chem.* v. 46, p. 832-837, 2008.
- CAI, Y.; TARR, M.A.; XU, G.; YALCIN, T.; COLE, R.B. Dication induced stabilization of gas-phase ternary beta-cyclodextrin inclusion complexes observed by electrospray mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* v. 14, p. 449-459, 2003.
- CARRIER, R.L.; MILLER, L.A.; AHMED, M. The utility of cyclodextrins for enhancing oral bioavailability. *J. Control. Rel.* v. 123, p. 78-99, 2007.
- CHALLA, R.; AHUJA, A.; ALI, J.; KHAR, R.K. Cyclodextrins in drug delivery: an updated review. *AAPS. Pharm. Sci. Tech.* v. 6, p. E329-E357, 2005.
- CHIENHAVORN, O.; SMITH, R.M.; SAHA, S.; WILSON, I.D.; WRIGHT, B.; TAYLOR, S.D.; LENZ, E.M. Superheated water chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry of vitamins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 36, p. 477-482, 2004.
- CHOI, S.H.; JIN, S.E.; LEE, M.K.; LIM, S.J.; PARK, J.S.; KIM, B.G.; AHN, W.S.; KIM, C.K. Novel cationic solid lipid nanoparticles enhanced p53 gene transfer to lung cancer cells. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 68, p. 545-554, 2008.

Referências

- CHUNG, J.H.; GINN-PEASE, M.E.; ENG, C. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein. *Cancer Res.* v. 65, p. 4108-4116, 2005.
- CLARKE, R.J.; COATES, J.H.; LINCOLN, S.F. Inclusion complexes of the cyclomalto-oligosaccharides (cyclodextrins). *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* v. 46, p. 205-249, 1988.
- CONWELL, C.C. & HUANG, L. Recent advances in non-viral gene delivery. *Adv. Genet.* v. 53PA, p. 3-18, 2005.
- CRYAN, S.A.; HOLOHAN, A.; DONOHUE, R.; DARCY, R.; O'DRISCOLL, C.M. Cell transfection with polycationic cyclodextrin vectors. *Eur. J. Pharm. Sci.* v. 21, p. 625-633, 2004.
- CUNNIFF, J.B. & VOUIROS, P. False positives and the detection of cyclodextrin inclusion complexes by electrospray mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* v. 6, p. 437-447, 1995.
- DASS, C.R. Cyclodextrins and oligonucleotide delivery to solid tumours. *J. Drug Target.* v. 12, p. 1-9, 2004.
- DASS, C.R. & CHOONG, P.F.M. Carrier-mediated delivery of peptidic drugs for cancer therapy. *Peptides* v. 27, p. 3020-3028, 2006.
- DAVIS, M.E. & BREWSTER, M.E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: Past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* v. 3, p. 1023-1035, 2004.
- DE ARAÚJO, D.R.; TSUNEDA, S.S.; CEREDA, C.M.; DEL, G.F.C.; PRETE, P.S.; FERNANDES, S.A.; YOKAICHIYA, F.; FRANCO, M.K.; MAZZARO, I.; FRACETO, L.F.; DE, F.A.B.; DE PAULA, E. Development and pharmacological evaluation of ropivacaine-2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin inclusion complex. *Eur. J. Pharm. Sci.* v. 33, p. 60-71, 2008.
- DE AZEVEDO, M.B.M.; ALDERETE, J.; RODRIGUEZ, J.A.; SOUZA, A.O.; RETTORI, D.; TORSONI, M.A.; FALJONI-ALARIO, A.; HAUN, M.; DURAN, N. Biological activities of violacein, a new antitumoral indole derivative, in an inclusion complex with beta-cyclodextrin. *J. Incl. Phenom. Macro. Chem.* v. 37, p. 93-101, 2000.

Referências

- DE JESUS, M.B.; PINTO, L.D.M.A.; FRACETO, L.F.; TAKAHATA, Y.; LINO, A.C.S.; JAIME, C.; DE PAULA, E. Theoretical and experimental study of a praziquantel and beta-cyclodextrin inclusion complex using molecular mechanic calculations and H-1-nuclear magnetic resonance. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 41, p. 1428-1432, 2006.
- DE SOUZA, A.A. & LAVERDE JR., A. Aplicação da espectroscopia de ressonância magnética nuclear para estudos de difusão molecular em líquidos: a técnica DOSY. *Quim. Nova* v. 25, p. 1022-1026, 2002.
- DEL VALLE, E.M.M. Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochem.* v. 39, p. 1033-1046, 2004.
- DODZIUK, H.; KOZMINSKI, W.; EJCHART, A. NMR studies of chiral recognition by cyclodextrins. *Chirality* v. 16, p. 90-105, 2004.
- DODZIUK, H. **Cyclodextrins and their complexes**. Weinheim, Wiley-VCH, 2006.
- DOTSIKAS, Y. & LOUKAS, Y.L. Efficient determination and evaluation of model cyclodextrin complex binding constants by electrospray mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* v. 14, p. 1123-1129, 2003.
- DUAN, M.S.; ZHAO, N.; OSSURARDOTTIR, I.B.; THORSTEINSSON, T.; LOFTSSON, T. Cyclodextrin solubilization of the antibacterial agents triclosan and triclocarban: formation of aggregates and higher-order complexes. *Int. J. Pharm.* v. 297, p. 213-222, 2005.
- EASTON, C.J. & LINCOLN, S.F. **Modified cyclodextrins. Scaffolds and templates for supramolecular chemistry**. London, Imperial College Press, 1999.
- EDWARDS, A.M.; SILVA, E.; JOFRE, B.; BECKER, M.I.; DE IOANNES, A.E. Visible light effects on tumoral cells in a culture medium enriched with tryptophan and riboflavin. *J Photochem. Photobiol. B* v. 24, p. 179-186, 1994.
- EDWARDS, A.M.; BUENO, C.; SALDANO, A.; SILVA, E.; KASSAB, K.; POLO, L.; JORI, G. Photochemical and pharmacokinetic properties of selected flavins. *J Photochem. Photobiol. B* v. 48, p. 36-41, 1999.
- FERNANDES, S.A.; CABEÇA, L.F.; MARSAIOLI, A.J.; DE PAULA, E. Investigation of tetracaine complexation with beta-cyclodextrins and p-sulphonic acid

Referências

- calix[6]arenes by nOe and PGSE NMR. *J. Inclusion. Phenom. Macrocyclic Chem.* v. 57, p. 395-401, 2007.
- FIELDING, L. NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Curr. Top. Med. Chem.* v. 3, p. 39-53, 2003.
- FIGUEIREDO, J.C.; LEVINE, A.J.; GRAU, M.V.; MIDTTUN, O.; UELAND, P.M.; AHNEN, D.J.; BARRY, E.L.; TSANG, S.; MUNROE, D.; ALI, I.; HAILE, R.W.; SANDLER, R.S.; BARON, J.A. Vitamins B2, B6, and B12 and risk of new colorectal adenomas in a randomized trial of aspirin use and folic acid supplementation. *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* v. 17, p. 2136-2145, 2008.
- FRACETO, L.F.; GONÇALVES, M.M.; MORAES, C.M.; DE ARAUJO, D.R.; ZANELLA, L.; DE PAULA, E. Caracterização do complexo de inclusão ropivacaína:beta-ciclodextrina. *Quim. Nova* v. 30, p. 1203-1207, 2007.
- FRENCH, D. The Schardinger dextrans. *Adv. Carbohydr. Chem.* v. 12, p. 189-280, 1957.
- GABELICA, V.; GALIC, N.; DE, P.E. On the specificity of cyclodextrin complexes detected by electrospray mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* v. 13, p. 946-953, 2002.
- GALLAGHER, R.T.; BALL, C.P.; GATEHOUSE, D.R.; GATESA, P.J.; LOBELL, M.; DERRICK, P.J. Cyclodextrin-piroxicam inclusion complexes: analyses by mass spectrometry and molecular modelling. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes* v. 165/166, p. 523-531, 1997.
- GAO, H.; WANG, Y.N.; FAN, Y.G.; MA, H.B. Interactions of some modified mono- and bis-beta-cyclodextrins with bovine serum albumin. *Bioorg. Med. Chem.* v. 14, p. 131-137, 2006.
- GARDLÍK, R.; PÁLFFY, R.; HODOSY, J.; LUKÁCS, J.; TURNA, J.; CELEC, P. Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med. Sci. Monit.* v. 11, p. RA110-RA121, 2005.
- GASCÓN, A.R. & PEDRAZ, J.L. Cationic lipids as gene transfer agents: a patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* v. 18, p. 515-524, 2008.

Referências

- GOULD, S. & SCOTT, R.C. 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HP-beta-CD): a toxicology review. *Food Chem. Toxicol.* v. 43, p. 1451-1459, 2005.
- GRILLO, R.; DE MELO, N.F.S.; MORAES, C.M.; DE LIMA, R.; MENEZES, C.M.S.; FERREIRA, E.I.; ROSA, A.H.; FRACETO, L.F. Study of the interaction between hydroxymethylnitrofurazone and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 47, p. 295-302, 2008.
- HAZEKAMP, A. & VERPOORTE, R. Structure elucidation of the tetrahydrocannabinol complex with randomly methylated beta-cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* v. 29, p. 340-347, 2006.
- HE, J.; HOU, S.X.; FENG, J.F.; CAI, B.Q. [Effect of particle size on oral absorption of silymarin-loaded solid lipid nanoparticles]. *Zhongguo Zhong. Yao Za Zhi.* v. 30, p. 1651-1653, 2005.
- HEDGES, A.R. Industrial applications of cyclodextrins. *Chem. Rev.* v. 98, p. 2035-2044, 1998.
- HIGUCHI, T. & CONNORS, K.A. Phase solubility techniques. *Adv. Anal. Chem. Instrum.* v. 4, p. 117-212, 1965.
- HOEKSTRA, D.; REJMAN, J.; WASUNGU, L.; SHI, F.; ZUHORN, I. Gene delivery by cationic lipids: in and out of an endosome. *Biochem. Soc. Trans.* v. 35, p. 68-71, 2007.
- HUANG, C.Y. Determination of binding stoichiometry by the continuous variation method - the Job Plot. *Methods Enzymol.* v. 87, p. 509-525, 1982.
- HUANG, H.; CHEVILLE, J.C.; PAN, Y.; ROCHE, P.C.; SCHMIDT, L.J.; TINDALL, D.J. PTEN induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression. *J. Biol. Chem.* v. 276, p. 38830-38836, 2001.
- HUNT, K.K. & VORBURGER, S.A. Tech.Sight. Gene therapy. Hurdles and hopes for cancer treatment. *Science* v. 297, p. 415-416, 2002.
- HUSSAIN, M.A.; DILUCCIO, R.C.; MAURIN, M.B. Complexation of moricizine with nicotinamide and evaluation of the complexation constants by various methods. *J. Pharm. Sci.* v. 82, p. 77-79, 1993.

Referências

- HUSTAD, S.; UELAND, P.M.; SCHNEEDE, J. Quantification of riboflavin, flavin mononucleotide, and flavin adenine dinucleotide in human plasma by capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection. *Clin. Chem.* v. 45, p. 862-868, 1999.
- INCA (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER). **Estimate 2008: Brazilian cancer incidence.** 2008.
- INOUE, H.; NISHIMURA, K.; OKA, D.; NAKAI, Y.; SHIBA, M.; TOKIZANE, T.; ARAI, Y.; NAKAYAMA, M.; SHIMIZU, K.; TAKAHA, N.; NONOMURA, N.; OKUYAMA, A. Prostate cancer mediates osteoclastogenesis through two different pathways. *Cancer Lett.* v. 223, p. 121-128, 2005.
- INOUE, Y.; HAKUSHI, T.; LIU, Y.; TONG, L.H.; SHEN, B.J.; JIN, D.S. Thermodynamics of molecular recognition by cyclodextrins .1. Calorimetric titration of inclusion complexation of naphthalenesulfonates with alpha-cyclodextrin, beta-cyclodextrin, and gamma-cyclodextrin - Enthalpy entropy compensation. *J. Am. Chem. Soc.* v. 115, p. 475-481, 1993.
- IRIE, T. & UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. III. Toxicological issues and safety evaluation. *J. Pharm. Sci.* v. 86, p. 147-162, 1997.
- IVANOV, P.M.; SALVATIERRA, D.; JAIME, C. Experimental (NMR) and computational (MD) studies on the inclusion complexes of 1-bromoadamantane with alpha-, beta-, and gamma-cyclodextrin. *J. Org. Chem.* v. 61, p. 7012-7017, 1996.
- JEE, J.P.; LIM, S.J.; PARK, J.S.; KIM, C.K. Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* v. 63, p. 134-139, 2006.
- JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; THUN, M.J. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J. Clin.* v. 57, p. 43-66, 2007.
- JOB, P. Studies on the formation of complex minerals in solution and on their stability. *Annales de Chimie France* v. 9, p. 113-203, 1928.

Referências

- JOHNSON JR, C.S. Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications. *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* v. 34, p. 203-256, 1999.
- KARMALI, P.P. & CHAUDHURI, A. Cationic liposomes as non-viral carriers of gene medicines: resolved issues, open questions, and future promises. *Med Res Rev* v. 27, p. 696-722, 2007.
- KAWAKAMI, S.; HIGUCHI, Y.; HASHIDA, M. Nonviral approaches for targeted delivery of plasmid DNA and oligonucleotide. *J Pharm Sci* v. 97, p. 726-745, 2008.
- KIM, H.R.; KIM, I.K.; BAE, K.H.; LEE, S.H.; LEE, Y.; PARK, T.G. Cationic solid lipid nanoparticles reconstituted from low density lipoprotein components for delivery of siRNA. *Mol Pharm* v. 5, p. 622-631, 2008.
- KIM, R.H. & MAK, T.W. Tumours and tremors: how PTEN regulation underlies both. *Br. J. Cancer* v. 94, p. 620-624, 2006.
- KODAKA, M. Application of a general rule to induced circular dichroism of naphthalene derivatives complexed with cyclodextrins. *J. Phys. Chem. A* v. 102, p. 8101-8103, 1998.
- KOO, Y.E.; REDDY, G.R.; BHOJANI, M.; SCHNEIDER, R.; PHILBERT, M.A.; REHEMTULLA, A.; ROSS, B.D.; KOPELMAN, R. Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplatforms. *Adv Drug Deliv Rev* v. 58, p. 1556-1577, 2006.
- KOSTRZEWA-NOWAK, D.; PAINE, M.J.; KORYTOWSKA, A.; SERWATKA, K.; PIOTROWSKA, S.; WOLF, C.R.; TARASIUK, J. Bioreductive activation of mitoxantrone by NADPH cytochrome P450 reductase. Implications for increasing its ability to inhibit the growth of sensitive and multidrug resistant leukaemia HL60 cells. *Cancer Lett.* v. 245, p. 252-262, 2007.
- KURIEN, B.T. & SCOFIELD, R.H. Western blotting. *Methods* v. 38, p. 283-293, 2006.
- LAKOWICZ, J.R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer, 1999.
- LEE, J.T.; LEHMANN, B.D.; TERRIAN, D.M.; CHAPPELL, W.H.; STIVALA, F.; LIBRA, M.; MARTELLI, A.M.; STEELMAN, L.S.; MCCUBREY, J.A.

Referências

- Targeting prostate cancer based on signal transduction and cell cycle pathways. *Cell Cycle* v. 7, p. 1745-1762, 2008.
- LI, J. & LOH, X.J. Cyclodextrin-based supramolecular architectures: Syntheses, structures, and applications for drug and gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* v. 60, p. 1000-1017, 2008.
- LI, S.D. & HUANG, L. Non-viral is superior to viral gene delivery. *J. Control. Rel.* v. 123, p. 181-183, 2007.
- LINEWEAVER, H. & BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. *J. Am. Chem. Soc.* v. 56, p. 658-666, 1934.
- LIU, F. & HUANG, L. Development of non-viral vectors for systemic gene delivery. *J. Control. Rel.* v. 78, p. 259-266, 2002.
- LIU, F.Y.; KILDSIG, D.O.; MITRA, A.K. Cyclodextrin weak-electrolyte complexation - Interpretation and estimation of association constants from phase solubility diagrams. *Pharm. Res.* v. 9, p. 1671-1672, 1992.
- LIU, Y.; ZHANG, N.; CHEN, Y.; CHEN, G.S. Secondary assembly of bile salts mediated by beta-cyclodextrin-terbium(III) complex. *Bioorg. Med. Chem.* v. 14, p. 6615-6620, 2006.
- LOFTSSON, T.; OLAFSDOTTIR, B.J.; FRIORIKSDOTTIR, H.; JONSDOTTIR, S. Cyclodextrin complexation of NSAIDS - Physicochemical characteristics. *Eur. J. Pharm. Sci.* v. 1, p. 95-101, 1993.
- LOFTSSON, T. & BREWSTER, M.E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins .1. Drug solubilization and stabilization. *J. Pharm. Sci.* v. 85, p. 1017-1025, 1996.
- LOFTSSON, T.; MAGNUSDOTTIR, A.; MASSON, M.; SIGURJONSDOTTIR, J.F. Self-association and cyclodextrin solubilization of drugs. *J. Pharm. Sci.* v. 91, p. 2307-2316, 2002.
- LOFTSSON, T.; JARHO, P.; MASSON, M.; JARVINEN, T. Cyclodextrins in drug delivery. *Expert. Opin. Drug Deliv.* v. 2, p. 335-351, 2005.
- LOFTSSON, T. & DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *Int. J. Pharm.* v. 329, p. 1-11, 2007.

Referências

- LOUKAS, Y.L.; VRAKA, V.; GREGORIADIS, G. Use of a nonlinear least-squares model for the kinetic determination of the stability constant of cyclodextrin inclusion complexes. *Int. J. Pharm.* v. 144, p. 225-231, 1996.
- LOUKAS, Y.L.; VRAKA, V.; GREGORIADIS, G. Fluorimetric studies of the formation of riboflavin-beta-cyclodextrin inclusion complex: determination of the stability constant by use of a non-linear least-squares model. *J. Pharm. Pharmacol.* v. 49, p. 127-130, 1997.
- LU, B.; XIONG, S.B.; YANG, H.; YIN, X.D.; CHAO, R.B. Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. *Eur J Pharm Sci* v. 28, p. 86-95, 2006.
- LUO, Y.; CHEN, D.; REN, L.; ZHAO, X.; QIN, J. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability. *J Control Release* v. 114, p. 53-59, 2006.
- MACOMBER, R.S. **A complete introduction to modern NMR spectroscopy**. New York, John Wiley & Sons, 1998.
- MAGNUSDOTTIR, A.; MASSON, M.; LOFTSSON, T. Self association and cyclodextrin solubilization of NSAIDs. *J. Incl. Phenom. Macro.* v. 44, p. 213-218, 2002.
- MANCINI, M.; EDWARDS, A.M.; BECKER, M.I.; DE, I.A.; SILVA, E. Reactivity of monoclonal antibodies against a tryptophan-riboflavin adduct toward irradiated and non-irradiated bovine-eye-lens protein fractions: an indicator of in vivo visible-light-mediated phototransformations. *J. Photochem. Photobiol. B* v. 55, p. 9-15, 2000.
- MANJUNATH, K.; REDDY, J.S.; VENKATESWARLU, V. Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Methods Find. Exp. Clin Pharmacol* v. 27, p. 127-144, 2005.
- MASSEY, V. The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.* v. 28, p. 283-296, 2000.
- MASTROBATTISTA, E.; BRAVO, S.; VAN DER AA, M.; CROMMELIN, D. Nonviral gene delivery systems: From simple transfection agents to artificial viruses. *Drug Discov. Today* v. 2, p. 103-109, 2005.

Referências

- MATIOLI, G. **Ciclodextrinas e suas aplicações em: alimentos, fármacos, cosméticos, agricultura biotecnologia, química analítica e produtos gerais.** Maringá, EDUEM, 2000.
- MATSUI, Y. & TOKUNAGA, S. Internal reference compounds available for the determination of binding constants for cyclodextrin complexes by ¹H NMR spectrometry. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* v. 69, p. 2477-2480, 1996.
- MIEUSSET, J.L.; KROIS, D.; PACAR, M.; BRECKER, L.; GIESTER, G.; BRINKER, U.H. Supramolecular recognition and structural elucidation of inclusion complexes of an achiral carbene precursor in beta and permethylated beta-cyclodextrin. *Org. Lett.* v. 6, p. 1967-1970, 2004.
- MINAMI, H.; SATO, K.; MAEDA, T.; TAGUCHI, H.; YOSHIKAWA, K.; KOSAKA, H.; SHIGA, T.; TSUJI, T. Hypoxia potentiates ultraviolet A-induced riboflavin cytotoxicity. *J. Invest. Dermatol.* v. 113, p. 77-81, 1999.
- MONTANA, G.; BONDÌ, M.L.; CARROTTA, R.; PICONE, P.; CRAPARO, E.F.; BIAGIO, P.L.S.; GIAMMONA, G.; CARLO, M.D. Employment of cationic solid-lipid nanoparticles as RNA carriers. *Bioconjug. Chem.* v. 18, p. 302-308, 2007.
- MORAES, C.M.; ABRAMI, P.; DE PAULA, E.; BRAGA, A.F.A.; FRACETO, L.F. Study of the interaction between S(-) bupivacaine and 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* v. 331, p. 99-106, 2007.
- MORILLE, M.; PASSIRANI, C.; VONARBOURG, A.; CLAVREUL, A.; BENOIT, J.P. Progress in developing cationic vectors for non-viral systemic gene therapy against cancer. *Biomaterials* v. 29, p. 3477-3496, 2008.
- MORRIS, K.F. & JOHNSON JR, C.S. Diffusion-ordered two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* v. 114, p. 3139-3141, 1992.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* v. 65, p. 55-63, 1983.

Referências

- MULLER, R.H.; MADER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* v. 50, p. 161-177, 2000.
- MULLER, R.H.; SCHMIDT, S.; BUTTLE, I.; AKKAR, A.; SCHMITT, J.; BROMER, S. SolEmuls-novel technology for the formulation of i.v. emulsions with poorly soluble drugs. *Int. J. Pharm.* v. 269, p. 293-302, 2004.
- MUÑOZ-BOTELLA, S.; DEL CASTILLO, B.; MARTYN, M.A. Cyclodextrin properties and applications of inclusion complex formation. *Ars. Pharm.* v. 36, p. 187-198, 1995.
- NAKAMURA, A. & INOUE, Y. Supramolecular catalysis of the enantiodifferentiating [4+4] photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate by gamma-cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.* v. 125, p. 966-972, 2003.
- NISHIJO, J.; YASUDA, M.; NAGAI, M. Interaction of 8-anilidonaphthalene-1-sulfonate with alpha-cyclodextrin. *Chem. Pharm. Bull.* v. 39, p. 5-9, 1991.
- OLBRICH, C.; BAKOWSKY, U.; LEHR, C.M.; MULLER, R.H.; KNEUER, C. Cationic solid-lipid nanoparticles can efficiently bind and transfect plasmid DNA. *J Control Release* v. 77, p. 345-355, 2001.
- ORLANDI, P.A. & FISHMAN, P.H. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J. Cell Biol.* v. 141, p. 905-915, 1998.
- OYEWUMI, M.O. & RICE, K.G.: DNA nanoparticle gene delivery systems. In: Gupta, R. and Kompella, U. eds. **Nanoparticle Technology for Drug Delivery**. New York, Taylor & Francis Group, 2006, pp 361-380.
- PACK, D.W.; HOFFMAN, A.S.; PUN, S.; STAYTON, P.S. Design and development of polymers for gene delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* v. 4, p. 581-593, 2005.
- PANNIER, A.K. & SHEA, L.D. Controlled release systems for DNA delivery. *Mol. Ther.* v. 10, p. 19-26, 2004.
- PAPATSORIS, A.G. & PAPAVALASSILIOU, A.G. Prostate cancer: horizons in the development of novel anti-cancer strategies. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* v. 1, p. 47-70, 2001.

Referências

- PEDERSEN, N.; HANSEN, S.; HEYDENREICH, A.V.; KRISTENSEN, H.G.; POULSEN, H.S. Solid lipid nanoparticles can effectively bind DNA, streptavidin and biotinylated ligands. *Eur J Pharm Biopharm* v. 62, p. 155-162, 2006.
- PINTO, L.M.A.; FRACETO, L.F.; SANTANA, M.H.A.; PERTINHEZ, T.A.; JUNIOR, S.O.; DE PAULA, E. Physico-chemical characterization of benzocaine-beta-cyclodextrin inclusion complexes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* v. 39, p. 956-963, 2005.
- PITHA, J. & HOSHINO, T. Effects of ethanol on formation of inclusion complexes of hydroxypropylcyclodextrins with testosterone or with methyl-orange. *Int. J. Pharm.* v. 80, p. 243-251, 1992.
- POZO-RODRIGUEZ, A.; DELGADO, D.; SOLINIS, M.A.; GASCON, A.R.; PEDRAZ, J.L. Solid lipid nanoparticles: formulation factors affecting cell transfection capacity. *Int. J. Pharm.* v. 339, p. 261-268, 2007.
- POZO-RODRIGUEZ, A.; DELGADO, D.; SOLINIS, M.A.; GASCON, A.R.; PEDRAZ, J.L. Solid lipid nanoparticles for retinal gene therapy: transfection and intracellular trafficking in RPE cells. *Int. J. Pharm.* v. 360, p. 177-183, 2008.
- POZO-RODRIGUEZ, A.; SOLINIS, M.A.; GASCON, A.R.; PEDRAZ, J.L. Short- and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 71, p. 181-189, 2008.
- POZO-RODRIGUEZ, A.; PUJALS, S.; DELGADO, D.; SOLINIS, M.A.; GASCON, A.R.; GIRALT, E.; PEDRAZ, J.L. A proline-rich peptide improves cell transfection of solid lipid nanoparticle-based non-viral vectors. *J. Control. Rel.* v. 133, p. 52-59, 2009.
- QUEIROZ, K.C.S.; ZAMBUZZI, W.F.; SOUZA, A.C.S.; DA SILVA, R.A.; MACHADO, D.; JUSTO, G.Z.; CARVALHO, H.F.; PEPPELENBOSCH, M.P.; FERREIRA, C.V. A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours. *Cancer Lett.* v. 258, p. 126-134, 2007.
- RAGUSA, A.; GARCIA, I.; PENADES, S. Nanoparticles as nonviral gene delivery vectors. *IEEE Trans. Nanobioscience.* v. 6, p. 319-330, 2007.

Referências

- RAMANATHAN, R. & PROKAI, L. Electrospray ionization mass spectrometric study of encapsulation of amino acids by cyclodextrins. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* v. 6, p. 866-871, 1995.
- RANADE, V.V. Drug delivery systems. 1. site-specific drug delivery using liposomes as carriers. *J. Clin. Pharmacol.* v. 29, p. 685-694, 1989.
- REDENTI, E.; PIETRA, C.; GERLOCZY, A.; SZENTE, L. Cyclodextrins in oligonucleotide delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* v. 53, p. 235-244, 2001.
- REJMAN, J.; CONESE, M.; HOEKSTRA, D. Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis. *J. Liposome Res.* v. 16, p. 237-247, 2006.
- RUDOLPH, C.; SCHILLINGER, U.; ORTIZ, A.; TABATT, K.; PLANK, C.; MULLER, R.H.; ROSENECKER, J. Application of novel solid lipid nanoparticle (SLN)-gene vector formulations based on a dimeric HIV-1 TAT-peptide in vitro and in vivo. *Pharm Res* v. 21, p. 1662-1669, 2004.
- SAUPE, A. & RADES, T.: Solid lipid nanoparticles. In: Mozafari, M. ed. **Nanocarrier Technologies: Frontiers of Nanotherapy.** Dordrecht, The Netherlands, Springer, 2006, pp 41-50.
- SAVARINO, P.; VISCARDI, G.; QUAGLIOTTO, P.; MONTONERI, E.; BARNI, E. Reactivity and effects of cyclodextrins in textile dyeing. *Dyes and Pigments* v. 42, p. 143-147, 1999.
- SCHMID, G. Cyclodextrin glycosyltransferase production - Yield enhancement by overexpression of cloned genes. *Trends Biotechnol.* v. 7, p. 244-248, 1989.
- SCHNEIDER, H.J.; HACKET, F.; RUDIGER, V.; IKEDA, H. NMR studies of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *Chem. Rev.* v. 98, p. 1755-1785, 1998.
- SHARATA, H.H. & KATZ, K.H. Liposomes. *Int. J. Dermatol.* v. 35, p. 761, 1996.
- SHIRAKAWA, T.; FUJISAWA, M.; GOTOH, A. Gene therapy in prostate cancer: past, present and future. *Front. Biosci.* v. 13, p. 2115-2119, 2008.

Referências

- SIGUROARDOTTIR, A.M. & LOFTSSON, T. The effect of polyvinylpyrrolidone on cyclodextrin complexation of hydrocortisone and its diffusion through hairless mouse skin. *Int. J. Pharm.* v. 126, p. 73-78, 1995.
- SIKORSKI, M.; SIKORSKA, E.; KOZIOLOWA, A.; GONZALEZ, M.R.; BOURDELANDE, J.L.; STEER, R.P.; WILKINSON, F. Photophysical properties of lumichromes in water. *J. Photochem. Photobiol. B* v. 60, p. 114-119, 2001.
- SILVERTEIN, M.R.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York, John Wiley & Sons, 2005.
- SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnol. Adv.* v. 20, p. 341-359, 2002.
- SONPAVDE, G. & HUTSON, T.E. New approaches in hormone refractory prostate cancer. *Am. J. Clin. Oncol.* v. 29, p. 196-201, 2006.
- SOUZA, A.C.S.; FERREIRA, C.V.; JUCÁ, M.B.; AOYAMA, H.; CAVAGIS, A.D.M.; PE; ELENBOSCH, M.P. Riboflavina: Uma vitamina multifuncional. *Quim. Nova* v. 28, p. 887-891, 2005.
- SOUZA, A.C.S.; KODACH, L.; GADELHA, F.R.; BOS, C.L.; CAVAGIS, A.D.; AOYAMA, H.; PEPPELENBOSCH, M.P.; FERREIRA, C.V. A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death. *Apoptosis*. v. 11, p. 1761-1771, 2006.
- SPAMER, E.; MULLER, D.G.; WESSELS, P.L.; VENTER, J.P. Characterization of the complexes of furosemide with 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin and sulfobutyl ether-7-beta-cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci.* v. 16, p. 247-253, 2002.
- STELLA, V.J. & HE, Q. Cyclodextrins. *Toxicol. Pathol.* v. 36, p. 30-42, 2008.
- STORSBERG, J.; RITTER, H.; PIELARTZIK, H.; GROENENDAAL, L. Cyclodextrins in polymer synthesis: supramolecular cyclodextrin complexes of pyrrole and 3,4-ethylenedioxythiophene and their oxidative polymerization. *Adv. Mater.* v. 12, p. 567-569, 2000.

Referências

- SULLIVAN, S.M.: Introduction to gene therapy and guidelines to pharmaceutical development. In: Rolland, M. and Sullivan, S.M. eds. **Pharmaceutical Gene Delivery Systems**. New York, Marcel Dekker, Inc., 2003, pp 1-16.
- SZEJTLI, J. **Cyclodextrins and their inclusion complexes**. Budapest, Akademiai Kiado, 1982.
- SZEJTLI, J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *J. Mater. Chem.* v. 7, p. 575-587, 1997.
- SZEJTLI, J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.* v. 98, p. 1743-1753, 1998.
- SZEJTLI, J. Cyclodextrins in the textile industry. *Starch-Starke* v. 55, p. 191-196, 2003.
- SZEJTLI, J. **Past, present, and future of cyclodextrin research**. *Pure Appl. Chem.* v. 76, p. 1825-1845, 2004.
- SZEJTLI, J. & SZENTE, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 61, p. 115-125, 2005.
- SZENTE, L. & SZEJTLI, J. Cyclodextrins as food ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* v. 15, p. 137-142, 2004.
- TABATT, K.; SAMETI, M.; OLBRICH, C.; MÜLLER, R.H.; LEHR, C.M. Effect of cationic lipid and matrix lipid composition on solid lipid nanoparticle-mediated gene transfer. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 57, p. 155-162, 2004.
- TABATT, K.; KNEUER, C.; SAMETI, M.; OLBRICH, C.; MULLER, R.H.; LEHR, C.M.; BAKOWSKY, U. Transfection with different colloidal systems: comparison of solid lipid nanoparticles and liposomes. *J Control Release* v. 97, p. 321-332, 2004.
- TEILLAC, P. & MOIATE-ARTUS, P. Prostate Cancer: Highlights from 2006. *Suppl. Eur. Urol.* v. 6, p. 728-736, 2007.
- THOMPSON, I.M. Chemoprevention of prostate cancer: Agents and study designs. *J. Urol.* p. S9-S13, 2007.

Referências

- TIAN, X.X.; ZHANG, Y.G.; DU, J.; FANG, W.G.; NG, H.K.; ZHENG, J. Effects of cotransfection of antisense-EGFR and wild-type PTEN cDNA on human glioblastoma cells. *Neuropathology* v. 26, p. 178-187, 2006.
- TOONGSUWAN, S.; LI, L.C.; ERICKSON, B.K.; CHANG, H.C. Formulation and characterization of bupivacaine lipospheres. *Int J Pharm* v. 280, p. 57-65, 2004.
- UDDIN, S.N. Cationic lipids used in non-viral gene delivery systems. *Biotech. Mol. Biol. Rev.* v. 2, p. 58-67, 2007.
- UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; NASU, S.; MATSUO, N.; IRIE, T. Determination of stability-constants for inclusion complexes of cyclodextrins with various drug molecules by high-performance liquid-chromatography. *Chem. Pharm. Bull.* v. 26, p. 3477-3484, 1978.
- UNER, M. Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie* v. 61, p. 375-386, 2006.
- VERMA, I.M. & WEITZMAN, M.D. Gene therapy: twenty-first century medicine. *Annu. Rev. Biochem.* v. 74, p. 711-738, 2005.
- VIGHI, E.; RUOZI, B.; MONTANARI, M.; BATTINI, R.; LEO, E. Re-dispersible cationic solid lipid nanoparticles (SLNs) freeze-dried without cryoprotectors: characterization and ability to bind the pEGFP-plasmid. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* v. 67, p. 320-328, 2007.
- WANG, X.M. & CHEN, H.Y. A spectroelectrochemical study of the interaction of riboflavin with beta-cyclodextrin. *Spectrochim. Acta, Part A* v. 51, p. 599-605, 1996.
- WEBSTER, R.P.; GAWDE, M.D.; BHATTACHARYA, R.K. Modulation of carcinogen-induced DNA damage and repair enzyme activity by dietary riboflavin. *Cancer Lett.* v. 98, p. 129-135, 1996.
- WIMMER, R.; AACHMANN, F.L.; LARSEN, K.L.; PETERSEN, S.B. NMR diffusion as a novel tool for measuring the association constant between cyclodextrin and guest molecules. *Carbohydr. Res.* v. 337, p. 841-849, 2002.

Referências

- XIANG, Q.Y.; WANG, M.T.; CHEN, F.; GONG, T.; JIAN, Y.L.; ZHANG, Z.R.; HUANG, Y. Lung-targeting delivery of dexamethasone acetate loaded solid lipid nanoparticles. *Arch. Pharm Res* v. 30, p. 519-525, 2007.
- XIANG, T.X. & ANDERSON, B.D. Inclusion complexes of purine nucleosides with cyclodextrins .2. Investigation of inclusion complex-geometry and cavity microenvironment. *Int. J. Pharm.* v. 59, p. 45-55, 1990.
- YEAGLE, P.L. **The structure of biological membranes**. Boca Raton, Crc Press, 2005.
- ZELPHATI, O. & SZOKA, F.C. Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* v. 93, p. 11493-11498, 1996.
- ZHANG, M.; SHI, Z.; BAI, Y.; GAO, Y.; HU, R.; ZHAO, F. Using Molecular Recognition of beta-Cyclodextrin to Determine Molecular Weights of Low-Molecular-Weight Explosives by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* v. 17, p. 189-193, 2006.
- ZHANG, N.; PING, Q.; HUANG, G.; XU, W.; CHENG, Y.; HAN, X. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. *Int J Pharm* v. 327, p. 153-159, 2006.
- ZIDOVETZKI, R. & LEVITAN, I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1768, p. 1311-1324, 2007.
- ZUHORN, I.S.; BAKOWSKY, U.; POLUSHKIN, E.; VISSER, W.H.; STUART, M.C.A.; ENGBERTS, J.B.F.N.; HOEKSTRA, D. Nonbilayer phase of lipoplex-membrane mixture determines endosomal escape of genetic cargo and transfection efficiency. *Mol. Ther.* v. 11, p. 801-810, 2005.

Atividades acadêmicas e produção científica

no período da tese

EXPERIÊNCIA DIDÁTICA

- Disciplina ministrada, Bioquímica Básica – Ciências Biológicas, Faculdade de Americana (FAM), Americana-SP (carga horária: 60 h), 2007.
- Minicurso intitulado “*Gene delivery*” ministrado na II Jornada de Biotecnologia da Universidade de Sorocaba (UNISO), Sorocaba-SP (3 h), 15/06/2007
- Aulas ministradas no curso de formação continuada, programa “Teia do Saber”, para professores da Rede Estadual de Ensino, 2007.
- Monitor (bolsista do programa PED/Unicamp) na disciplina de Bioquímica Básica para o curso de Enfermagem/UNICAMP, (carga horária semestral = 75h), 1º sem. 2005 e 1º sem. 2006.
- Palestra intitulada “Entendendo a Terapia Gênica” ministrada no I Workshop de Biotecnologia da Universidade de Sorocaba (UNISO), (3 h), 20/10/2006.

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- **Participações em Congressos com apresentação de painéis**

Lima, R.A.F., **de Jesus, M. B.**, de Paula, E., "Tetracaine inclusion Complex with Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin: Characterization and in Vitro Tests" **XXXVII Reunião Anual da SBBq e XI Pan Am. Biochem. & Mol. Biology Congress**, Águas de Lindóia, maio/2008.

Lima, R.A.F., **de Jesus, M. B.**, de Paula, E. “Avaliação de formulações anestésicas de Tetracaína com Beta-Ciclodextrina e Hidroxipropil Beta-Ciclodextrina” **XXXI Reunião Anual da Soc. Bras. Química**, Águas de Lindóia, SP, maio/2008.

Scarelli, C., **de Jesus, M.B.**, de Paula, E. “Encapsulação de oxibuprocaina em lipossomas” **I Encontro Sobre Estruturas Auto-Organizadas em Soluções e Interfaces (AutoOrg)**, São Pedro, SP, outubro/2008.

de Jesus, M.B.; Queiroz, K.C.S.; Zambuzzi, W.F.; Ferreira, C.V.; de Paula, E. Development of “Riboflavin/Cyclodextrin Complex for Treatment of Prostate Cancer” **XXXVI Reunião Anual da SBBq**, Salvador, BA, junho/2007.

-

Produção no Período

- **Artigos Completos Publicados em Revistas Científicas Especializadas**

- **Marcelo Bispo de Jesus**; Willian F. Zambuzzi; Roberta R. R. Sousa, Carlos. Areche; Ana Carolina S. Souza; Hiroshi Aoyama; Guillermo Schmeda-Hirschmann, Jaime A. Rodríguez, Alba R.M.S. Brito, Maikel P. Peppelenbosch,; J. den Hertog; Eneida de Paula; Carmen V. Ferreira. Ferruginol suppresses survival signaling pathways in androgen-independent human prostate cancer cells. *Biochimie* (2008), 90:843-854 (Anexo 2).

- Sílvio Luís Toledo de Lima, **Marcelo Bispo de Jesus**, Roberta Regina Ruela de Sousa, André Kimura Okamoto, Renata de Lima e Leonardo Fernandes Fraceto. Estudo da Atividade Proteolítica de Enzimas Presentes em Frutos. *Química Nova Na Escola* (2008), 28:47-49.

- **Marcelo Bispo de Jesus**, Luciana de Matos Alves Pinto, Leonardo Fernandes Fraceto. Ciclodextrinas: Aspectos históricos e características químicas. *Química no Brasil* (2009), *in press*.

- Cíntia Maria Saia Cereda, Giovana Radomille Tófoli, Rui Barbosa de Brito Junior, **Marcelo Bispo de Jesus**, Leonardo Fernandes Fraceto, Francisco Carlos Groppo, Daniele Ribeiro de Araujo, Eneida de Paula. Stability and Local Toxicity Evaluation of a Liposomal Prilocaine Formulation. *Journal of Liposome Research* (2008), 18:329-339.

Artigos submetidos ou em reformulação

- **Marcelo Bispo de Jesus**, Luciana de Matos Alves Pinto, Leonardo Fernandes Fraceto, Eliana Maria Zanotti-Magalhães, Luiz Augusto Magalhães, Eneida de Paula. Improvement of anthelmintic effect of oral praziquantel by inclusion in β -cyclodextrin for the treatment of schistosomiasis. *Intl. J. Pharm.* (2009).

- **Marcelo Bispo de Jesus**, Leonardo Fernandes Fraceto, Carmen Veríssima Ferreira, Eneida de Paula, Riboflavin-Cyclodextrin Non-Inclusion Complexes: Characterization and Effect in Prostate Cancer Cells Death Induction.

Produção no Período

ATIVIDADES EXTRACURRICULARES

- Estágio de doutorado sanduíche: realizado no *Department of Cell Biology*, seção *Membrane Cell Biology*, da *University Medical Center Groningen*, Holanda, de 24/03 a 20/06/2008. Durante esse período foram realizados estudos em diferentes aspectos *in vitro* de *gene delivery*. O trabalho foi supervisionado pela Dra. Inge Zuhorn e pelo Prof. Dr. Dick Hoekstra.
- Escuela Binacional de Nano-Ciencia “Autoorganización Molecular Controlada de Nano-Bio-Estructuras y Biosuperficies”, Coordenador Dr. Bruno di Maggio (Fac. de Ciencias Químicas de la Univ. Nacl Córdoba, Argentina), 30 h, de 27 a 30 de Outubro de 2008.
- Curso: Biomarcadores de Processos oxidativos, Coordenadores Profs. Drs. Pio Colepicolo e Paolo Di Mascio (IQ, USP), carga horária 6 h, de 21 a 25 de Maio de 2007.
- Curso de Extensão: Bioquímica Aplicada as Laboratório Clínico, carga horária 112 h, de junho a dezembro de 2006.
- Curso: “*Frontiers in Biomedical Research*”, Coordenadores PhD Maikel P. Peppelenbosch (Department of Cell Biology, Groningen University, Groningen, Holanda) e Profa. Dra. Carmen V. Ferreira (IB, UNICAMP), carga horária 20 h, de 12 a 16 de Junho de 2006.

CICLODEXTRINAS: Aspectos históricos e características químicas

Cyclodextrins: historical aspects and chemical characteristics

Marcelo Bispo de Jesus

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil

Luciana de Matos Alves Pinto

Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

Leonardo Fernandes Fraceto*

Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Avenida Três de Março, 511, Alto da Boa Vista, CEP: 18087-180, Sorocaba, São Paulo, Brasil

* leonardo@sorocaba.unesp.br

Anexo I

RESUMO

As ciclodextrinas são oligossacarídeos cíclicos sintetizados naturalmente por amilases bacterianas. As principais ciclodextrinas naturais são oligômeros formados, em sua maioria, por 6, 7 e 8 unidades de resíduos de glicose sendo denominadas α -, β - e γ -ciclodextrinas, respectivamente. As aplicações das ciclodextrinas envolvem diversas áreas, dentre elas as indústrias: farmacêutica, alimentícia, química, agroquímica e de cosméticos. O desenvolvimento de novas ciclodextrinas, bem como de novas aplicações vem dando um lugar de destaque para essas moléculas tanto na área científica quanto tecnológica, melhorando, desta forma a qualidade de vida da sociedade.

ABSTRACT

Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides naturally obtained by bacterial amylases. Natural cyclodextrins are oligomers formed by 6, 7 or 8 glucose residues, being denominated α , β or γ -cyclodextrins, respectively. Cyclodextrins are employed in different areas, among them the pharmaceutical industry and also food, chemistry, agrochemical, cosmetics and toiletries industries. The development of new cyclodextrins, as well as new applications is setting a remarkable place for those molecules even in the scientific or in the technological aspect, thus improving life quality in the society.

Keywords: Cyclodextrins, Inclusion complexes, historical aspects



Research paper

Ferruginol suppresses survival signaling pathways in androgen-independent human prostate cancer cells

Marcelo Bispo de Jesus^{a,1}, Willian Fernando Zambuzzi^{a,1}, Roberta Regina Ruela de Sousa^a, Carlos Areche^b, Ana Carolina Santos de Souza^a, Hiroshi Aoyama^a, Guillermo Schmeda-Hirschmann^b, Jaime A. Rodríguez^b, Alba Regina Monteiro de Souza Brito^c, Maikel P. Peppelenbosch^d, Jeroen den Hertog^e, Eneida de Paula^a, Carmen Veríssima Ferreira^{a,*}

^a Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cidade Universitária, Zeferino Vaz, Barão Geraldo, 13083-970 Campinas, SP, Brazil

^b Laboratorio de Química de Productos Naturales, Instituto de Química de Recursos Naturales, Universidad de Talca, Casilla 747, Talca, Chile

^c Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil

^d Department of Cell Biology, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, The Netherlands

^e Hubrecht Institute, Utrecht, The Netherlands

Received 24 June 2007; accepted 29 January 2008

Available online 3 February 2008

Abstract

Ferruginol, a bioactive compound isolated from a Chilean tree (Podocarpaceae), attracts attention as a consequence of its pharmacological properties, which include anti-fungal, anti-bacterial, cardioprotective, anti-oxidative, anti-plasmodial and anti-ulcerogenic actions. Nevertheless, the molecular basis for these actions remains only partly understood and hence we investigated the effects of ferruginol on androgen-independent human prostate cancer cells (PC3), a known model for solid tumor cells with an exceptional resistance to therapy. The results show that ferruginol induces PC3 cell death via activation of caspases as well as apoptosis-inducing factor (AIF) as confirmed by its translocation into the nucleus. In order to clarify the biochemical mechanism responsible for the anti-tumor activity of ferruginol, we analyzed a set of molecular mediators involved in tumor cell survival, progression and aggressiveness. Ferruginol was able to trigger inhibition/downregulation of Ras/PI3K, STAT 3/5, protein tyrosine phosphatase and protein kinases related to cell cycle regulation. Importantly, the toxic effect of ferruginol was dramatically impeded in a more reducing environment, which indicates that at least in part, the anti-tumoral activity of ferruginol might be related to redox status modulation. This study supports further examination of ferruginol as a potential agent for both the prevention and treatment of prostate cancer.

© 2008 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Natural compound; Ferruginol; Apoptosis; Prostate cancer

Abbreviations: AIF, apoptosis-inducing factor; Bax, Bcl-2 associated x protein; CDKIs, cyclin-dependent kinase inhibitors; CDKs, cyclin-dependent kinases; DISC, death-inducing signaling complex; ERK, extracellular signal-regulated kinase; ERK1/2, extracellular signal-regulated protein kinase 1/2; GSK-3 β , glycogen synthase kinase-3 β ; Hsp27, heat shock protein 27; MAPK, mitogen-activated protein kinase; MEK, MAPK/ERK kinase; p21, tumor suppressor protein; PC3, androgen-independent prostate cancer cell line; PI3K, phosphoinositide 3-kinase; Rb, retinoblastoma; STAT, signal transducer and activator of transcription; TNFR, tumor necrosis factor receptor; FADD, Fas-associated death domain protein; AKT/PKB, protein kinase B; PCNA, proliferating cellular nuclear antigen; NF κ B, nuclear factor kappa B; IKK, inhibitory-kappa B kinase; LMWPTP, low molecular weight protein tyrosine phosphatase; JAK, Janus kinase.

* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 6659; fax: +55 19 3521 6129.

E-mail address: carmenv@unicamp.br (C.V. Ferreira).

¹ These authors contributed equally to this work.

1. Introduction

Prostate cancer is a major cause of cancer-related death among males and the second leading cause of cancer death in Western countries. Although recent years have seen an improvement in prostate cancer diagnosis, only a few novel therapeutic strategies have emerged and there has been little progress in improving survival [1,2]. Therefore, novel strategies for dealing with this disease are called for. Our research group has a long-standing interest in the possible beneficial biological effects of natural compounds and/or their derivatives, such as antioxidants [3] and anti-tumor agents [4–10], and hence we were interested whether we could define novel compounds with therapeutic potential for prostate cancer. Among the different classes of natural compounds, the diterpenoids have been shown to present a potent anti-proliferative action [4,11]. Ferruginol, an active compound isolated from the Chilean tree *Persea nubigena* and from the stem bark of *Podocarpus andina* (Podocarpaceae), is an abietane diterpene occurring in plants belonging to the Podocarpaceae, Cupressaceae, Lamiaceae and Verbenaceae families. This diterpene presents promising biological activities, such as anti-fungal and anti-bacterial [12], mitocidal [13], cardioactive [14], anti-oxidative [15], anti-plasmodial [16] and anti-ulcerogenic [17] properties.

We decided to investigate the potential effects of ferruginol in prostate cancer. In this work we show for the first time the molecular mechanism by which ferruginol, induces resistant prostate cancer cell death. Ferruginol was able to trigger inhibition/downregulation of Ras/PI3K, STAT 3/5, protein tyrosine phosphatase and protein kinases related to cell cycle regulation. Importantly, the toxic effect of ferruginol was dramatically impeded under the condition of more reducing environment, which indicates that at least in part, the anti-tumoral activity of ferruginol might be related to redox status modulation. This study supports further examination of ferruginol as a potential agent for both the prevention and treatment of prostate cancer.

2. Material and methods

2.1. Cell line and reagents

PC3 cells were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Ferruginol (Fig. 1A) was extracted from the wood of *P. nubigena* Lind. and from the stem bark of *P. andina* (Poepp. ex Endl.) de Laub. (Podocarpaceae) as previously described [18].

Polyclonal antibodies against phospho p38MAPK, phospho-p42/p44 MAPK (ERK1/2) Thr202/204, ERK1/2, phospho-MEK1/2 Ser217/221, pan-AKT, phospho-AKT Ser473, phospho-Hsp27 Ser82, phospho-c-Raf Ser338, phospho-GSK-3 β Ser9, AIF, phospho-cdc2 Thr15, phospho-Rb Ser795, phospho-STAT5 Tyr694, phospho-PI3K p85 subunit, CDK6, CDK4, cyclin D1, cyclin D3, PCNA, tubulin, anti-rabbit, anti-goat and anti-mouse peroxidase-conjugated antibodies were purchased from Cell Signaling Technology

(Beverly, MA). Antibodies against p21, NF κ B p65 subunit, phospho-STAT3 Tyr705, phospho-STAT3 Ser727, Bcl2, Bax, TNF receptor 1, FADD, IKK α and β -actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). LMWPTP antibody was from Abcam. Caspases 3, 8 and 9 Colorimetric Assay Kits were obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN).

2.2. Cell culture

PC3 cells were cultured in RPMI containing 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 10% fetal bovine serum, at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. In all experiments, cells at semi-confluence were treated for 24 h with different concentrations of ferruginol.

2.3. MTT assay for cellular viability

Cell viability was assessed by MTT reduction assay as previously reported [19,20]. The effect of ferruginol on cell growth was assessed as the percentage of inhibition in cell growth where non-treated cells were taken as 100% of viability. IC₅₀ values were determined from three independent experiments.

2.4. Western blotting analysis

Following treatment of cells with ferruginol, the medium was aspirated and the cells were washed with cold physiological solution. The cells were then incubated in 200 μ l of lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 20 mmol/L NaF, 1 mM Na₃VO₄, 0.25% sodium deoxycholate and protease inhibitors (1 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, and 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride)) over ice for 30 min. Protein extracts were cleared by centrifugation and protein concentrations were determined using the Lowry method [21]. An equal volume of 2 \times sodium dodecyl sulfate (SDS) gel loading buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 200 mM DTT, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue and 20% glycerol) was added to samples which were subsequently boiled for 10 min. Cell extracts, corresponding to 50 μ g of protein, were resolved by SDS-polyacrylamide gel (12%) electrophoresis (PAGE) and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked in 1% fat-free dried milk or bovine serum albumin (1%) in Tris-buffered saline (TBS)-Tween 20 (0.05%) and incubated overnight at 4 °C with appropriate primary antibody at 1:1000 dilution. After washing in TBS-Tween 20 (0.05%), membranes were incubated with anti-rabbit, anti-mouse or anti-goat horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, at 1:2000 dilutions (in all Western blotting assays), in blocking buffer for 1 h. The detection was made using enhanced chemiluminescence ECL.

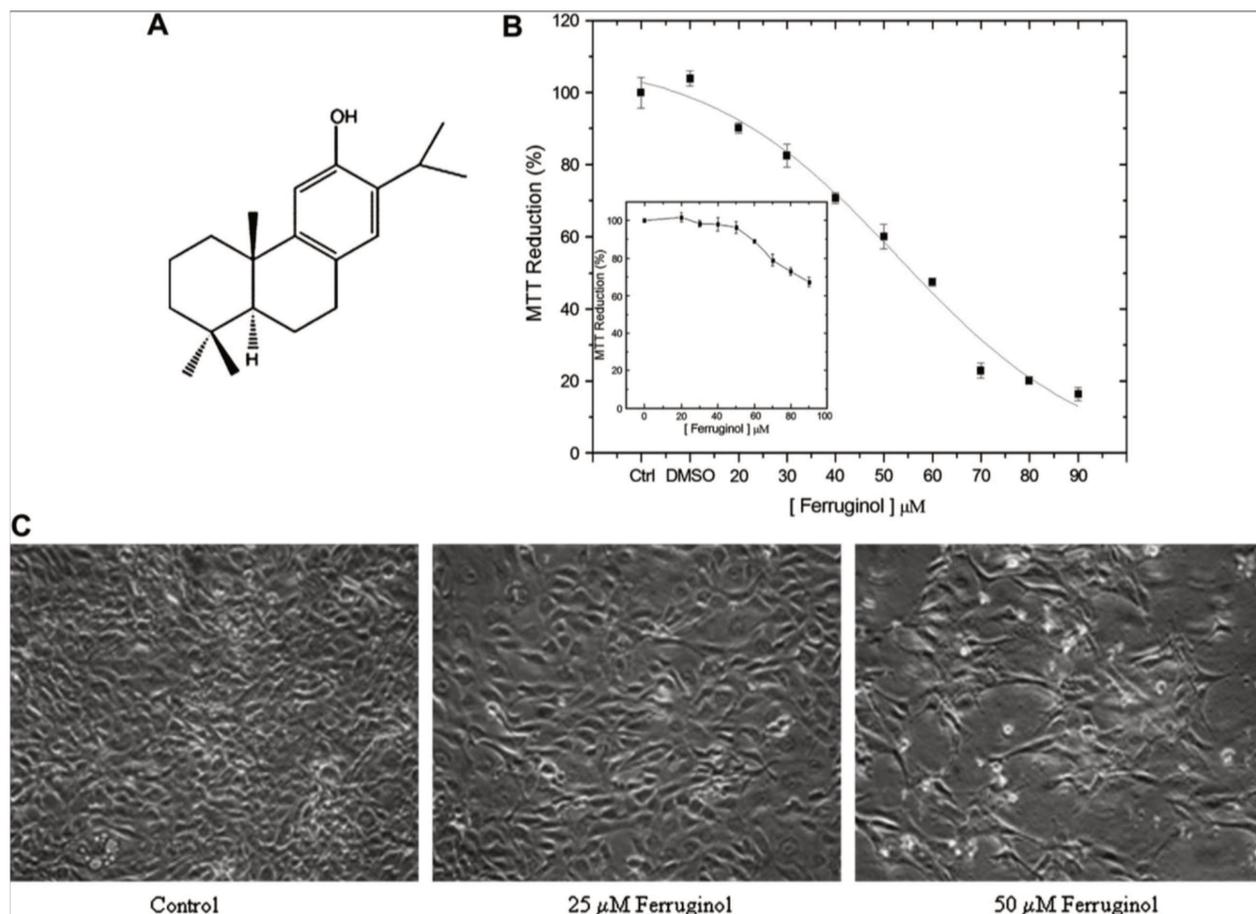


Fig. 1. Ferruginol induces toxic effects in PC3 cells. Cells were treated with specified concentrations of ferruginol (A) for 24 h. (B) Mitochondria function was evaluated through the MTT reduction. The results are expressed as the mean % of absorbance (ratio of absorbance in ferruginol treated and control cells); cell viability was also evaluated when the cells were pre-treated for 1 h with 10 mM GSH (inset plot). (C) Morphological analysis of PC3 cells treated with 25 µM and 50 µM ferruginol for 24 h (100× magnification). Ferruginol was dissolved in DMSO and the final concentration of this solvent was remained at 0.1%.

2.5. Immunoprecipitation of LMWPTP

After treatment of the cells with ferruginol for 24 h, whole-cell lysates were prepared with lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.7, 2.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1% Nonidet-P40 (NP40), 1 mM 4-(2-amino-ethyl)-benzenesulfonylfluoride hydrochloride), 1 mM DTT, 10 µg/ml aprotinin, and 10 µg/ml leupeptin) and chilled on ice for 2 h. After centrifugation, lysates were rotated with anti-LMWPTP and Protein A–Sepharose at 4 °C for 2 h. The beads were washed three times with lysing buffer and twice with 0.5 M Mes, pH 6.0. Next, the phosphatase activity was determined using pNPP as a substrate.

2.6. Caspases 3, 8 and 9 activity assays

Caspase activities were determined by the measurement at 405 nm of *p*-nitroaniline (pNA) released from the cleavage of Ac-DEVD-pNA, IETD-pNA and LEHD-pNA as substrates of caspases 3, 8 and 9, respectively. The enzyme activities were

expressed in pmol/min and the extinction coefficient of pNA was 10,000 M⁻¹ cm⁻¹.

2.7. NFκB p65 and AIF nuclear translocation

Briefly, 2 × 10⁷ cells were harvested and washed twice with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in 0.2 ml ice-cold cell extract buffer (10 mM HEPES (*N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid)–KOH pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KC1, 0.5 mM DTT, and 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)). The cells were kept on ice for 10 min to allow them to swell, mixed by vortex for 10 s, and microfuged at 4 °C at 14,000 × *g* for 30 s. The supernatant was discarded, and the pellet was resuspended in 30 µl nuclear extraction buffer (20 mM HEPES–KOH pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 0.5 mM DTT, and 0.2 mM PMSF), placed on ice for 20 min, and centrifuged at 4 °C at 14,000 × *g* for 2 min. The supernatant was saved as the nuclear extract and used in Western blotting assay.

2.8. Quantification of reduced and oxidized glutathione

Cells were washed twice with PBS, detached with 5 mM EDTA in PBS and washed twice again with cold PBS. Cell number was counted using a hemocytometer; afterwards the cells were centrifuged and equal volumes of cold PBS and 6% 5-sulfosalicylic acid (SSA) were added to cell pellets. The samples were sonicated, centrifuged at 10,000 rpm for 5 min and the supernatants used for the assays. Total glutathione (GSH + GSSG) and glutathione disulfide (GSSG) were determined by using recycling assays involving the reaction of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) and glutathione reductase. The total amount of glutathione was calculated from a reduced glutathione standard curve prepared in SSA. For GSSG assay, 100 μ l of supernatant was incubated with 2 μ l of 2-vinylpyridine for 60 min on ice. The amount of GSSG was calculated from the GSSG standard curve. The amount of reduced GSH per cell was calculated by subtracting the amount of GSSG per cell from the amount of total glutathione per cell [22].

2.9. Annexin V and 7-amino-actinomycin D assays

Control and ferruginol-treated cells were collected and resuspended in 1 \times binding buffer (0.01 M HEPES–NaOH (pH 7.4), 0.14 mM NaCl and 2.5 mM CaCl₂) at a concentration of 2 \times 10⁷ cells/ml. Subsequently, 100 μ l of cell suspension was transferred to a 5 ml tube and 5 μ l each of Annexin V-APC and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) was added. Cells were incubated at room temperature for 15 min, after which 400 μ l of 1 \times binding buffer was added and apoptosis detected by flow cytometry (Becton Dickinson FACSCalibur, Rockville, MD), the data obtained were analyzed using the software Cell Quest Pro BD Biosciences Pharmingen (Erembodegem, Belgium).

2.10. Flow cytometry

After treatment of PC3 cells with ferruginol for 24 h, cells were harvested by the addition of 5 mM EDTA and gently washed off the plate. Cells were pelleted along with the previously collected media. Cell pellets were fixed with 70% ethanol for 30 min on ice and then rinsed three times with 1 ml of 0.1% glucose in PBS (20 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl), repelleted and resuspended in propidium iodide (PI) staining solution (10 μ l of 10 mg/ml RNase A, 5 μ l of 10 mg/ml PI per 1 ml of PBS with 0.1% glucose). After 30 min the cells were analyzed using a flow cytometer.

2.11. Statistical analysis

All experiments were performed in triplicate and the results shown in the graphs represent the means and standard errors. Cell viability data were expressed as the mean \pm standard error of three independent experiments carried out in triplicate. Data from each assay were analyzed statistically by ANOVA. Differences were considered significant when the *P* value was

less than 0.05. Western blots represent three independent experiments. Quantitative analysis of the proteins was performed by volume densitometry after scanning the film (data are presented as the protein to β -actin or tubulin ratio).

3. Results

3.1. Inhibition of PC3 growth by ferruginol

PC3 cells were treated with ferruginol in concentrations up to 100 μ M and the effect of ferruginol on cell viability was determined employing the MTT method. As shown in Fig. 1B, ferruginol caused a dose-dependent reduction in the cell number displaying an IC₅₀ value of 55 μ M. Importantly, pre-treatment of the cells with 10 mM GSH prevented the toxic action of ferruginol (inset plot). In agreement, the microscopy analysis also demonstrated a decrease of the cell number (Fig. 1C).

3.2. Ferruginol induces apoptosis of PC3 cells via caspases and AIF activation

In the next series of experiments, it was determined whether treatment of PC3 cells to ferruginol led to apoptosis. Ferruginol caused around 15% and 30% (in the presence of 25 and 50 μ M ferruginol, respectively) of cell death via apoptosis as detected through phosphatidylserine exposure (Fig. 2A). In agreement, we also observed activation of caspases 8, 9 and 3 (Fig. 2B). Additionally, at the lowest concentration, ferruginol led to an overexpression of TNFR1; however, FADD expression was not affected. We also examined the possible participation of mitochondria in response to ferruginol. Bcl2:Bax ratio was not significantly affected; however the expression of AIF was dramatically increased at 50 μ M ferruginol. Accordingly, AIF nuclear translocation was detected (Fig. 2C). These findings suggest that PC3 cell response toward ferruginol involves activation of caspases and release of AIF from mitochondrial intermembrane space.

3.3. Ferruginol treatment impairs prostate cancer cell survival

To obtain more insight into the molecular mechanisms mediating ferruginol effects on PC3 cells, the phosphorylation/expression state of a panel of signal transduction mediators in response to ferruginol was examined. As shown in Fig. 3, PC3 cell treatment with 50 μ M ferruginol provoked downregulation of p85 subunit of PI3K and inhibition of AKT. The results presented above indicate that ferruginol should produce a decrease of the survival and anti-apoptotic relevant kinase activities. Accordingly, cells treated with 50 μ M ferruginol displayed activation of MAPK p38, an important apoptosis inducer, and a slight inhibition of ERK2. However, the upstream activator of ERK, MEK, was not affected. Apparently, ferruginol impairs prostate cancer proliferation by modulating survival and proliferation signaling cascades.

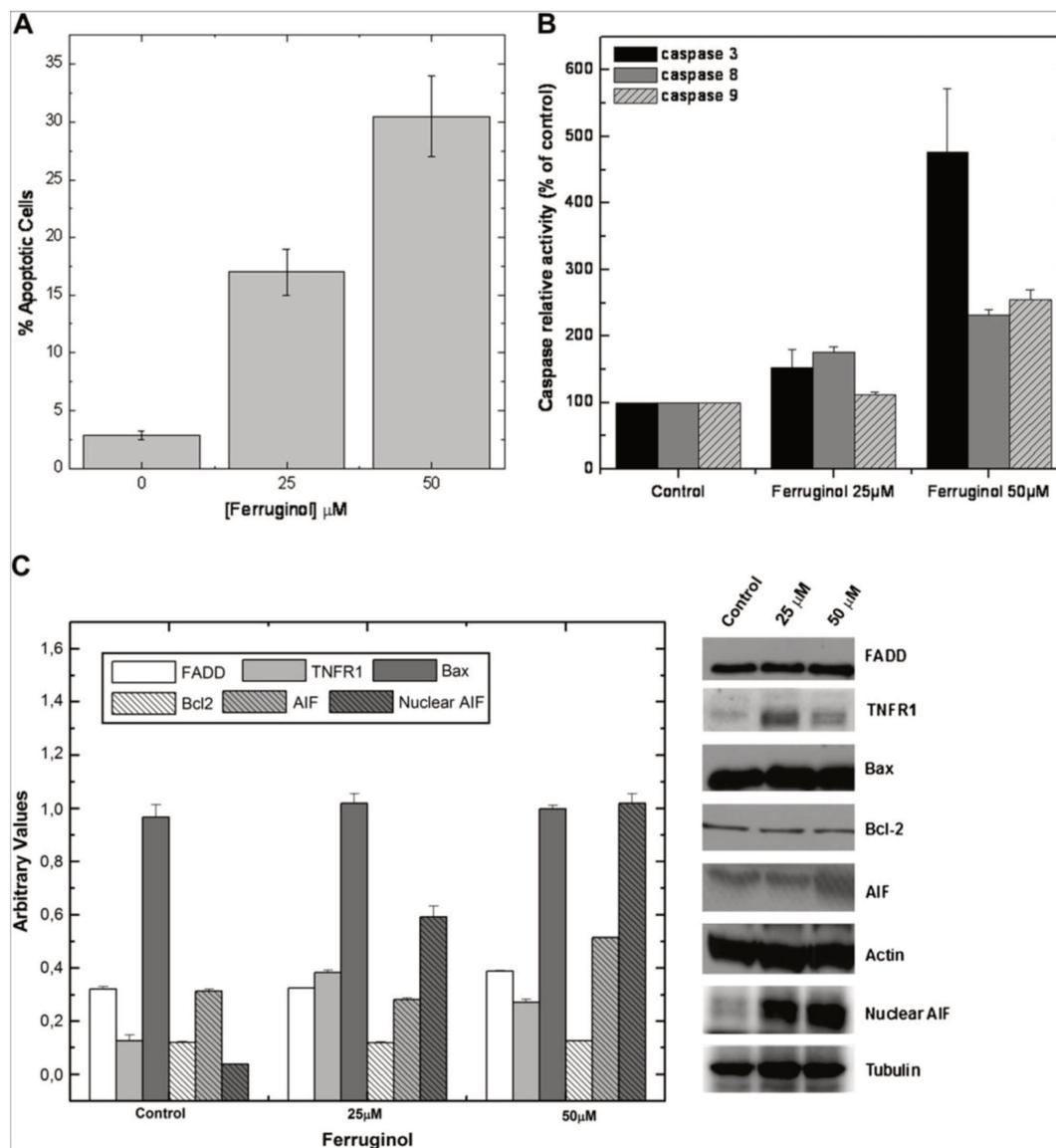


Fig. 2. Apoptosis induction of PC3 cells by ferruginol. (A) Cell samples were prepared as described in Section 2 and Annexin V-positive, 7-AAD-positive and Annexin V/7-AAD-positive populations were analyzed by flow cytometry. (B) Caspases 3, 8 and 9 activities were determined by using colorimetric assay. (C) The expression of pro- and anti-apoptotic proteins was determined by Western blot analysis. Soluble lysates were matched for protein content and analyzed on Western blot and immunoblots were probed with actin antibody to ensure equal loading. Nuclear translocation of AIF was also determined.

3.4. Inhibition of cell cycle progression by ferruginol

By plotting the ratio of the cells in G_0 plus G_1 against cells in G_2/M plus S-phase it is apparent that PC3 cells undergo G_0/G_1 -phase cell cycle arrest after ferruginol treatment (Fig. 4A). Approximately 2.5-fold of the PC3 population was at phase G_0/G_1 after exposure to ferruginol for 24 h.

We therefore turned to characterize the effect of ferruginol treatment on direct regulators of cell cycle progression. As shown by immunoblot analysis (Fig. 4B), the expression of

p21 was increased even at the lowest concentration of ferruginol. On the other hand, the phosphorylated Rb protein and the expression of PCNA were not affected. The level of phospho-cdc2, the key protein of the cell cycle progression from G_2 to M phase, remained unchanged. Ferruginol decreased the level of CDK4, CDK6, cyclin D1 and cyclin D3. This response directly mirrored the ability of ferruginol to induce cell cycle arrest in PC3 cells. We conclude that the combination of reduced mitotic activity and induction of apoptosis accounts for the observed cytotoxic effect of ferruginol on PC3 cells.

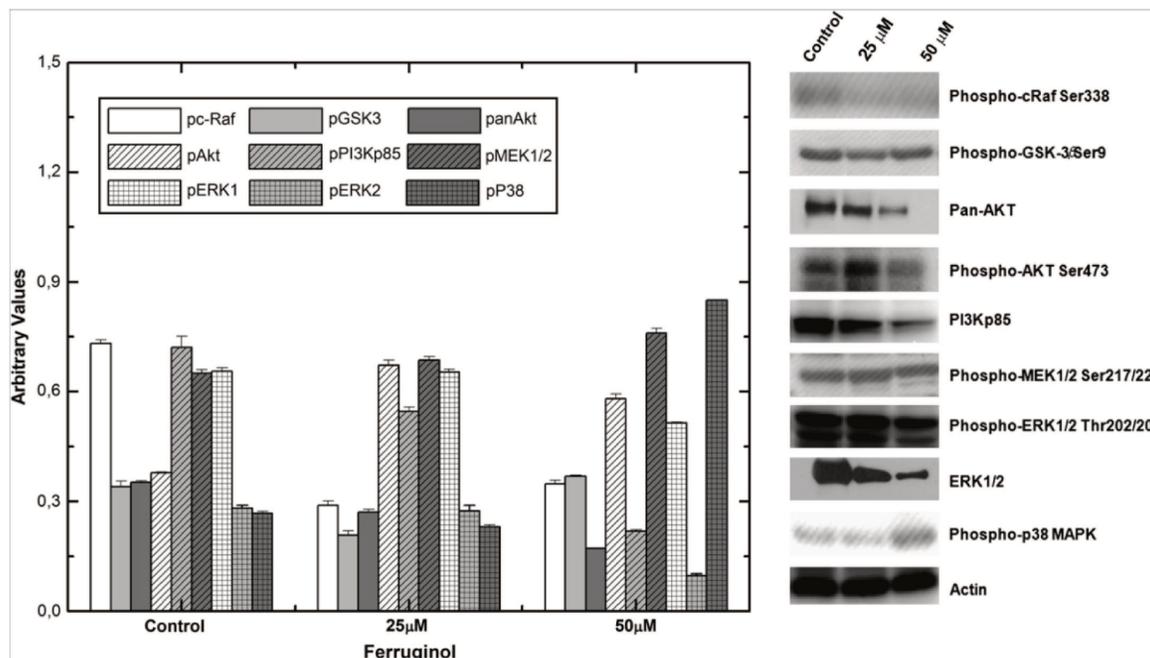


Fig. 3. Effect of ferruginol treatment on the function of key mediators involved in the PC3 cells proliferation/survival. Cells were treated with specified concentrations of ferruginol for 24 h and the expression or phosphorylation of the proteins determined by Western blot. Equal loading was confirmed by reprobing them for β -actin.

3.5. Ferruginol causes downregulation of *IKK α* and hypophosphorylation of *STAT3*

The immunoblot analysis data showed that the expression of *IKK α* was significantly decreased after treatment with ferruginol; however, the total level of *NF κ B* remained unchanged (Fig. 5). In addition, ferruginol caused a decrease of this transcription factor into the nucleus.

The phosphorylation status of *STAT3* and *STAT5*, key signaling molecules for many cytokines and growth-factor receptor response, was also evaluated by Western blot. The treatment of PC3 with 50 μ M ferruginol was able to decrease the phosphorylation levels of *STAT3* (Tyr705) and *STAT5* (Tyr694). Interestingly, 50 μ M ferruginol caused a strong decline in *Hsp27* expression, which can be associated with the increase in the number of apoptotic cells.

3.6. Redox status on PC3 cells treated with ferruginol

Based on the diterpene chemical properties, which can lead to antioxidant and/or oxidant action depending on its concentration, and the importance of reducing equivalents for PC3 cells survival [23], we investigated the effect of ferruginol on PC3 cell GSH metabolism. PC3 cells treated with ferruginol displayed a more oxidizing environment as defined by a decrease of GSH and an increase of GSSG levels (Fig. 6). Both effects were dose dependent and the highest concentration of ferruginol employed caused a 2-fold change. It is important to note that even at the highest concentration of ferruginol, GSH:GSSG

ratio remained almost in equilibrium (GSH:GSSG = 4.4, 2.7 and 1.1 at 0, 25 and 50 μ M ferruginol, respectively).

3.7. Low molecular weight protein tyrosine phosphatase is modulated by ferruginol

Besides the fact that protein tyrosine phosphatases are highly sensitive to cell redox status, there is some evidence that this class of phosphatases can contribute to tumor cell progression and aggressiveness. Especially LMWPTP has been recognized as a positive regulator of tumor growth [24]. Therefore, to address the possible modulation of LMWPTP by ferruginol, we examined the LMWPTP activity as well as expression. LMWPTP immunoprecipitated from PC3 cells was inhibited around 30% by 50 μ M ferruginol (Fig. 7). On the other hand, when the LMWPTP activity was checked after treating the cells for 24 h, this enzyme displayed only 20% of residual activity. Reduced LMWPTP activity is consistent with the change in redox status in response to ferruginol. In addition, treated cells demonstrated downregulation of LMWPTP expression.

4. Discussion

Prostate cancer is commonly malignant and it is the second leading cause of cancer-related deaths (after lung cancer) of males in Brazil, with a similar trend in many Western countries (data from Instituto Nacional do Câncer—INCA). Since prostate cancer usually occurs in men aged 50 years and older

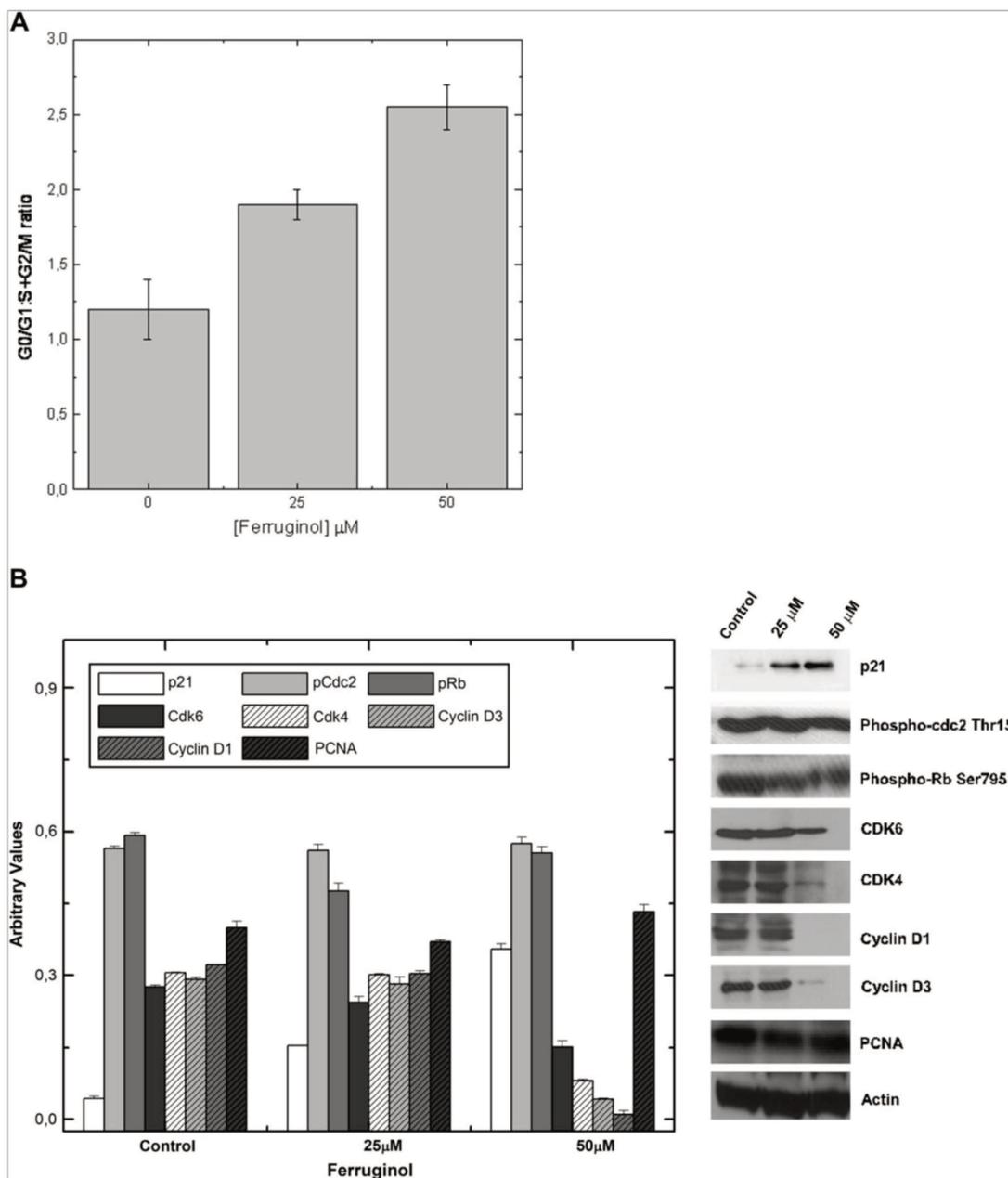


Fig. 4. Ferruginol impedes prostate cancer cell proliferation by targeting key cell cycle mediators. After treating PC3 cells with ferruginol for 24 h, cells were harvested, stained with PI and analyzed by flow cytometry (A) or lysed for Western blotting analysis (B). The number of cells in each phase of the profile and ratios of cells in resting phase (G0/G1) versus those undergoing mitosis (S, G2/M) was determined. The expression or phosphorylation of the proteins was determined by Western blot. Equal loading was confirmed by reprobating them for β -actin.

and because of the increasing life expectancy, its incidence is expected to further rise in the years to come [25]. Chemoprevention and intervention strategies using anticancer agents are considered as promising therapeutic options. The search for new chemopreventive and/or chemotherapeutic agents that are more effective without toxic side-effects has generated

great interest in phytochemicals with potential activity in this respect [26]. Suppression of tumorigenesis often involves modulation of signal transduction pathways, leading to alterations in gene expression, cell cycle progression or apoptosis. Apoptosis is considered as an ideal way for destroying damaged cells and also a potential target for chemopreventive

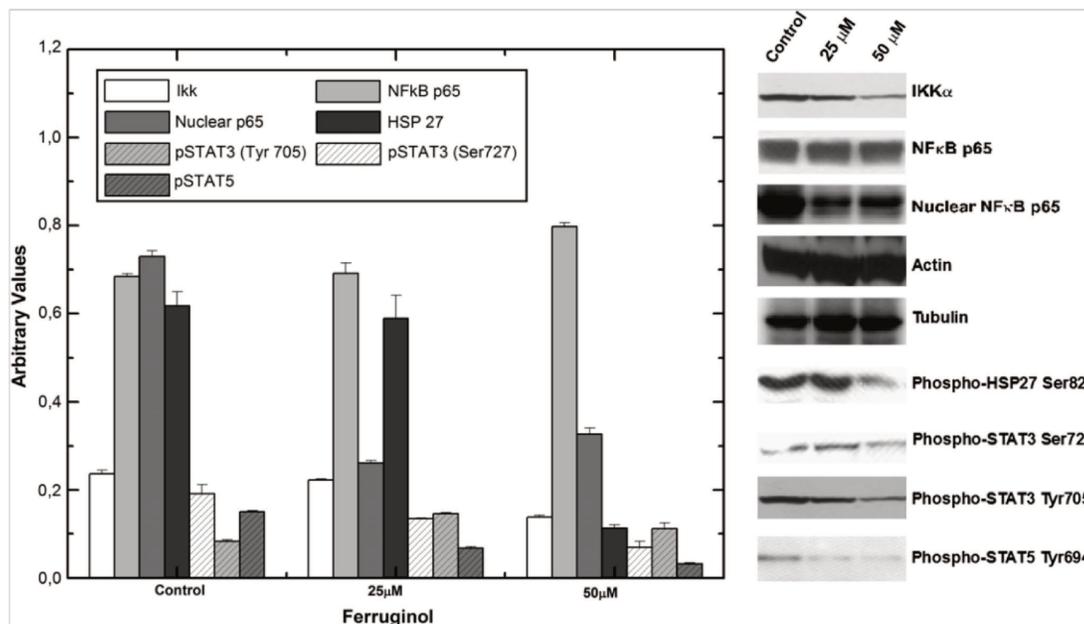


Fig. 5. Ferruginol modulates molecules that play a crucial role in the prostate cancer aggressiveness. Cells were treated with specified concentrations of ferruginol for 24 h, harvested and total cell lysates were prepared. The expression of IκB kinase, cytosolic and nuclear NFκB, and phosphorylation status of Hsp27 and STAT 3 and 5 were determined by Western blot analysis. Equal loading was probed with actin antibody to ensure equal loading.

elimination of cancer cells [27] and as a consequence targeting signaling elements controlling apoptosis may open novel therapeutic avenues [28,29]. Several plant-derived bioactive agents may have such action, at least as judged from model systems [4,9,30–33]; the present study may add ferruginol to this growing list.

Our results suggest that ferruginol is a negative regulator of cancer cell proliferation. Androgen-independent human prostate cancer cells (PC3 cells) a model that exhibits extreme therapy resistance exhibited, upon treatment with this phyto-compound, remarkable induction of apoptosis via extrinsic

and intrinsic pathways, as demonstrated by the observation of overexpression of TNFR1 and activation of caspases 8, 9 and 3. The extrinsic pathway for cell death involves plasma membrane death receptors [34]. These receptors trimerize and recruit the adaptor molecule FADD which, in turn, activates caspase 8 and also leads to the activation of downstream execution caspases [35–38]. In both pathways, activation of effector caspases leads to a series of morphological changes that are characteristic for apoptosis [28].

Ferruginol-induced apoptosis and cell growth inhibition were also accompanied by an increase of apoptosis-inducing

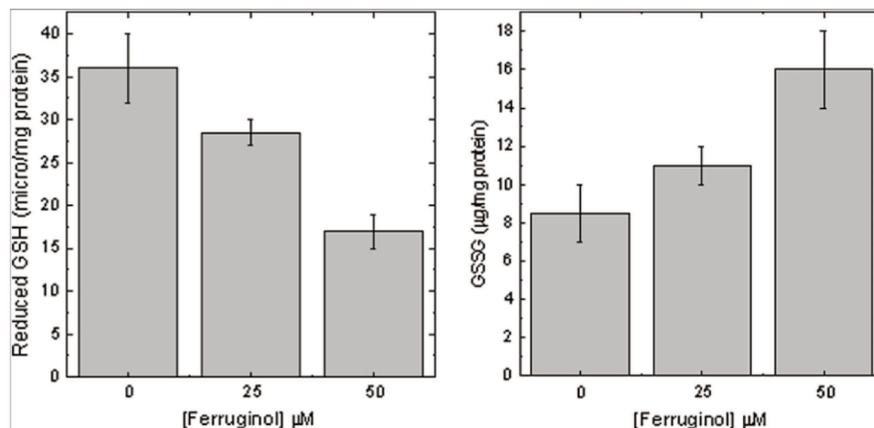


Fig. 6. Influence of ferruginol on the level of intracellular GSH and GSSG. Cells were treated with ferruginol for 24 h and the concentration of GSH and GSSG determined as described in Section 2.

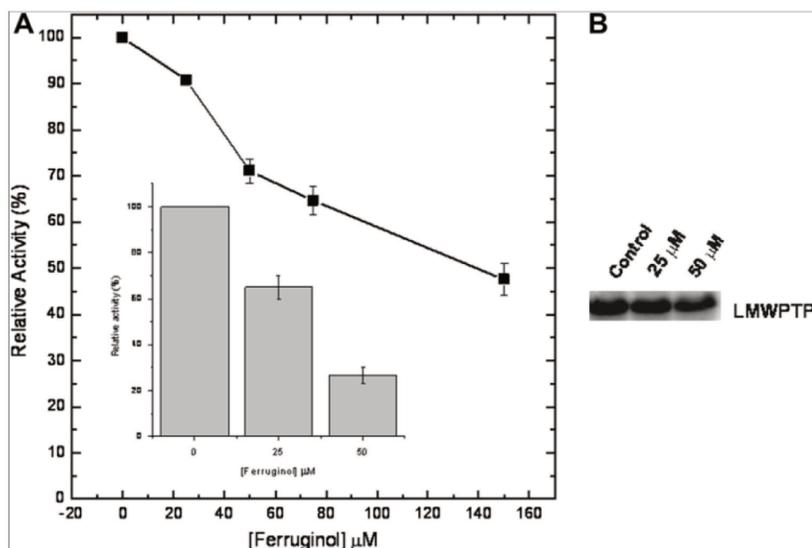


Fig. 7. Ferruginol affects low molecular weight protein phosphatase activity and expression. (A) The effect of ferruginol was examined directly in the LMWPTP immunoprecipitated from non-treated PC3 cells and also after PC3 treatment with ferruginol (inset plot). The LMWPTP specific activity was used to determine the relative activity. (B) Expression of LMWPTP was checked by Western blotting.

factor (AIF) expression and maintenance of Bax and Bcl-2 levels. AIF was identified as a mitochondrial intermembrane space protein, which is released from mitochondria and translocated to the nucleus, in response to apoptotic stimuli, and participates in peripheral chromatin condensation and the exposure of phosphatidylserine in the outer leaf of the plasma membrane. Increasing evidence supports the notion that AIF plays an important role in caspase-independent apoptosis [39,40].

Ferruginol, even at lower concentration, caused inhibition of Ras/PI3K cascade and suppression of downstream mitogenic targets such as cyclin D1. Additionally, this diterpene also induced activation of MAPK p38. The phosphatase and tensin homologue (PTEN) gene is deleted in PC3 cells. This phosphatase is defined as a tumor suppressor, since it is the major negative modulator of AKT protein, an important mediator of cell survival. It is therefore important to identify agents that can overcome the therapeutic resistant properties of PTEN deficient tumor cells. Importantly, in accordance with cell survival diminishing, ferruginol caused cell cycle arrest. Eukaryotic cell cycle progression is regulated by sequential activation and subsequent inactivation of a series of CDKs at different phases [41]. Ferruginol caused an overexpression of protein p21 a member of the cyclin-dependent kinase inhibitors, and downward expression of cyclin D1, cyclin D3, CDK4 and CDK6. These data showed the involvement of p21 in ferruginol-induced G₁ phase arrest, through binding to and subsequently inhibiting the cyclin-CDK activity. The active complex of cyclin D/CDK4 targets the Rb protein for phosphorylation, allowing the release of E2F transcription factors that activate G₁/S-phase gene expression. Importantly cdc-2, a key protein responsible for the entry of the cell from G₂ to M phase, remained unchanged. Cell cycle regulation and its

modulation by various plant-derived agents are gaining widespread attention in recent years. A large number of phytochemicals has been shown to inhibit cell cycle progression of various cancer cells [42].

Ferruginol decreased the phosphorylation level of STAT3, STAT5 and Hsp27. STATs are latent cytoplasmic transcription factors consisting of seven mammalian members. They become phosphorylated on Tyr residues upon activation, a post-translational modification that is critical for dimerization, nuclear import, DNA binding, and transcriptional activation [43]. The activation of STATs is mediated by the action of an upstream Janus kinase (JAK), usually JAK1 or JAK2, showing that the JAK cascade might itself be a target for therapy in prostate cancer. Ahoen and coworkers [44] demonstrated that STAT5 is activated in a significant number of human prostate cancer specimens. Additionally, these authors also reported induction of apoptosis via caspases 9 and 3 activation dependent on inhibition of STAT5 phosphorylation. Activated STAT3 was reported in many types of malignancies, such as myeloma, head and neck cancer, breast cancer, and prostate cancer [45]. Recently, it has been demonstrated that inhibition of STAT3 in tumors impeded vascular endothelial growth factor production [46]. Data from the literature have identified Hsp27 as a modulator of STAT3-regulated apoptosis after androgen ablation. Hsp27 is a 27 kDa protein of which expression is seen to be correlated with an increase of survival in response to a wide variety of physiological and environmental insults including heat, reactive oxygen species and anticancer drugs. Indeed analysis by co-immunoprecipitation and immunofluorescence confirmed that Hsp27 is able to interact with STAT3 and that STAT3 levels correlate directly with Hsp27 levels. There are some reports in the literature demonstrating that the prostate cancer Hsp27 level increases

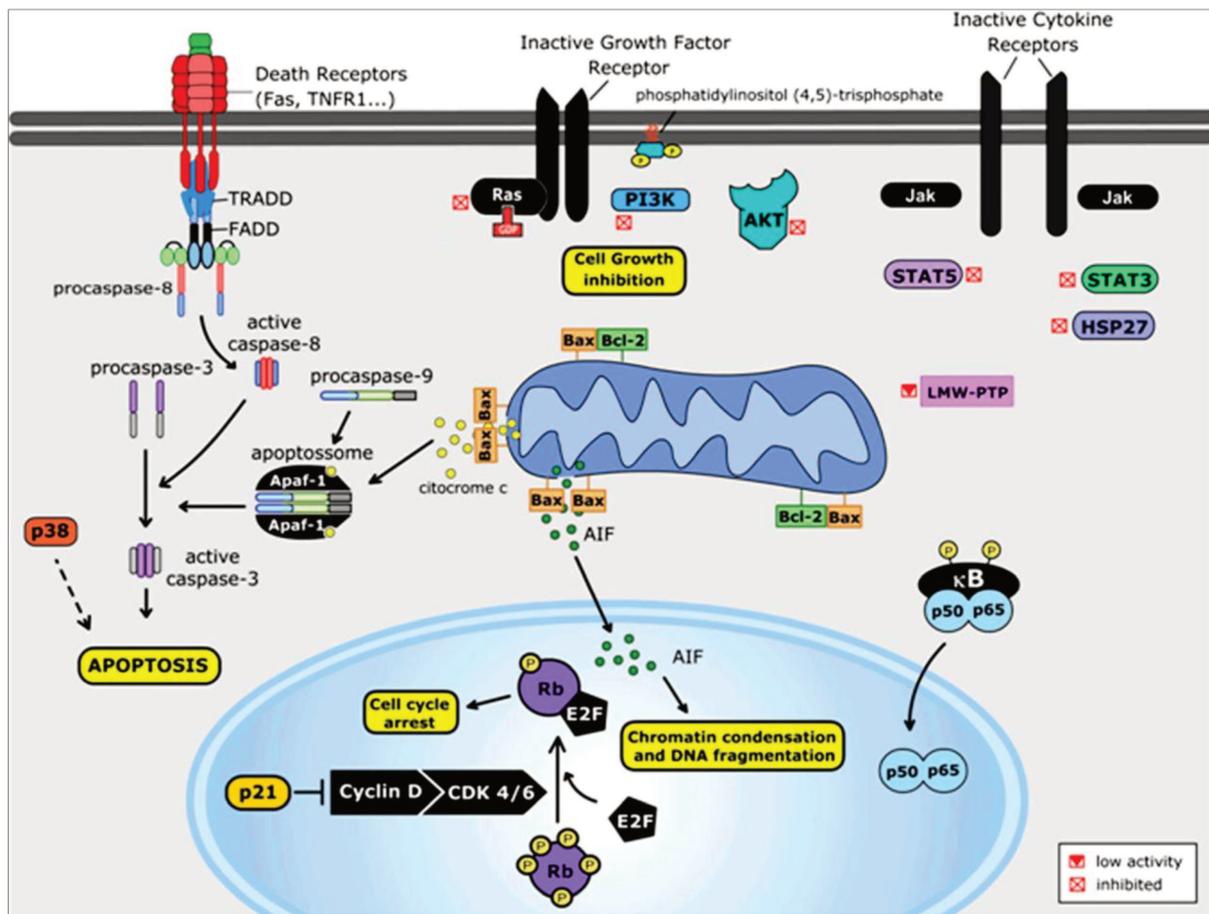


Fig. 8. Schematic representation of the molecular mechanism of ferruginol-induced PC3 cell death. Data presented in this report revealed that ferruginol exhibits multi-activities, which culminate with apoptosis induction of prostate cancer. Ferruginol caused inhibition of two important signaling cascade pathways involved in the cell survival/proliferation (Ras/PI3K and Jak/STAT). Additionally treated prostate cancer cells displayed a decrease in the phosphorylated form of Hsp27. Ferruginol-induced apoptosis was accompanied by activation of caspase 3, an increase of AIF expression and maintenance of Bax and Bcl-2 levels. AIF is released from mitochondria and translocated to the nucleus, and participates in peripheral chromatin condensation. In accordance with cell survival diminishing, ferruginol caused cell cycle arrest. Ferruginol caused an overexpression of protein p21 (a member of the cyclin-dependent kinase inhibitors), and downward expression of cyclin D1, cyclin D3, CDK4 and CDK6, which indicates cell cycle arrest at G₀/G₁. Importantly, LMWPTP was directly and indirectly modulated by ferruginol, which indicates that this enzyme can be a target for this natural compound.

after androgen ablation and that this protein is highly expressed in androgen-independent tumors, and inhibition of Hsp27 in prostate cancer cells can increase the number of apoptotic cells (G₀–G₁), an event that seems to be associated with the decrease in the STAT3 levels [47]. These findings indicate that the anti-apoptotic effects of Hsp27 are associated with its ability to interact and stabilize the STAT3 molecule, leading to more resistant prostate cancer cells. In accordance with this notion, our results show a decrease in the phosphorylated forms of Hsp27 and STAT3, when PC3 cells were treated with ferruginol at the concentration of 50 μ M, suggesting that the pro-apoptotic and anti-proliferative actions of ferruginol might be associated with diminished function of STAT3 through the decrease of Hsp27 levels.

Another important finding is that ferruginol did not induce the NF κ B translocation to the nucleus; this result is in

agreement with the findings of Rodriguez and coworkers [17] related to the anti-inflammatory effect of ferruginol.

Recently, Chaiswing and collaborators [23] reported in a very well designed paper the effect of cellular redox state on prostate cancer cell growth *in vitro*. These authors demonstrated that during PC3 cells growth, these cells require higher ratio of reduced glutathione (GSH)/glutathione disulfide (GSSG). Based on this observation, we evaluated the redox status toward PC3 cell treatment with ferruginol. This diterpene caused a decrease of GSH and increase of GSSG, indicating a dominant effect in favor of oxidizing equivalent. Several signaling mediators can be modulated by redox modifiers, including protein tyrosine phosphatases [48,49]. To investigate the effect of ferruginol on PTPs we chose LMWPTP. The rational reason for this was based on the following aspects: (a) we have observed a high level of this phosphatase in PC3 cells

and (b) Chiarugi and collaborators [24] have reported the importance of this enzyme for cancer cell growth. Interestingly, we observed a direct effect of ferruginol on LMWPTP but also there was a correlation between cellular oxidizing equivalents and inhibition of this enzyme. The oxidation of catalytic site cysteine of PTPs, such as LMWPTP, leads to the transformation of the sulfhydrylic residue in sulfenic acid and the consequent inactivation of the enzyme due to its inability to form cysteinyl-phosphate intermediate during the first step of the catalysis [48]. Altogether, our results demonstrate that ferruginol can act as a chemical and genetic modulator of LMWPTP. These data indicate that at least in part, the anti-proliferative action of ferruginol is dependent on changing cellular redox, which is in agreement with the protective effect of GSH. This observation also confirms the importance of reducing equivalents for PC3 cell survival, as recently reported [23]. Further experiments to clarify the role of LMWPTP on prostate cancer progression are currently in progress in our laboratory.

5. Conclusion

One of the challenges of cancer therapy is to combine efficacy with few side effects and consequently improve the quality of life of the patient. Prostate cancer represents a spectrum of diseases in which the cost of cure may be substantial, with short- and long-term side effects. Therefore, new agents are needed to extend survival, improve cure rates, and avoid undesired treatment-related toxicities. In this scenario, there are at least two aims: (a) to provide therapeutic agents with a very specific target and (b) to discover agents which present differential action mechanisms in comparison with the traditional chemotherapy. In this context, ferruginol appears as an interesting bioactive compound, since it exhibits multi-activities in the signal transduction/biochemical aspects in prostate cancer cells. In summary, ferruginol negatively modulates signaling cascades, which are known to be defective in some types of prostate cancers, namely Ras/PI3K and Jak/STAT, as well as cell cycle regulators (Fig. 8). Importantly, we demonstrated for the first time that LMWPTP is directly and indirectly modulated by ferruginol, which indicates that this enzyme can be a target for this natural compound. Besides affecting signal transduction triggered by TNFR1, ferruginol also affected mitochondria permeability as demonstrated by the presence of nuclear AIF (protein involved with chromatin condensation and DNA fragmentation); however, the Bax:Bcl2 ratio remained unchanged. In general, this study provides an overview of biochemical aspects which were affected by ferruginol and in turn confirms its anti-tumor activity. This type of investigation can contribute to the development of “smart” drugs.

Acknowledgments

Financial support by FONDECYT (Grant No. 1060841) and the Programa de Productos Bioactivos, University of Talca is gratefully acknowledged. C.A. thanks the Universidad de Talca for a doctoral grant. The authors acknowledge financial

support by the Brazilian Agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico and Fundo de Apoio ao Ensino, à Pesquisa e à Extensão.

References

- [1] J. Moul, Report from Durham, Prostate Cancer Prostatic Dis. 8 (2005) 1.
- [2] N. Dawson, New molecular targets in advanced prostate cancer, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 6 (2006) 993–1002.
- [3] M.A. Miranda, A.K. Okamoto, C.V. Ferreira, T.L. Silva, J.M. Granjeiro, H. Aoyama, Differential effects of flavonoids on bovine kidney low molecular mass protein tyrosine phosphatase, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 21 (2006) 419–425.
- [4] A.G. Freire, P.S. Melo, M. Haun, N. Duran, H. Aoyama, C.V. Ferreira, Cytotoxic effect of the diterpene lactone dehydrocrotonin from *Croton cajucara* on human promyelocytic leukaemia cells, *Planta Med.* 69 (2003) 67–69.
- [5] C.V. Ferreira, C.L. Bos, H.H. Versteeg, G.Z. Justo, N. Duran, M.P. Peppelenbosch, Molecular mechanism of violacein-mediated human leukemia cell death, *Blood* 104 (2004) 1459–1464.
- [6] A.D. Martins Cavagis, C.V. Ferreira, H.H. Versteeg, C.F. Assis, C.L. Bos, S.A. Bleuming, S.H. Diks, H. Aoyama, M.P. Peppelenbosch, Tetrahydroxyquinone induces apoptosis of leukemia cells through diminished survival signaling, *Exp. Hematol.* 34 (2006) 188–196.
- [7] L.L. Kodach, C.L. Bos, N. Durán, M.P. Peppelenbosch, C.V. Ferreira, J.C. Hardwick, Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells, *Carcinogenesis* 27 (2006) 508–516.
- [8] A.C.S. de Souza, L. Kodach, F.R. Gadelha, C.L. Bos, A.D. Cavagis, H. Aoyama, M.P. Peppelenbosch, C.V. Ferreira, A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death, *Apoptosis* 11 (2006) 1761–1771.
- [9] R.R.R. Sousa, A.C.S. Souza, K.C. Queiroz, M.P. Peppelenbosch, C.V. Ferreira, H. Aoyama, Phosphoprotein levels, MAPK activities and NFκB expression are affected by fisetin, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 22 (2007) 439–444.
- [10] K.C. de Souza Queiroz, W.F. Zambuzzi, A.C. Santos de Souza, R.A. da Silva, D. Machado, G.Z. Justo, H.F. Carvalho, M.P. Peppelenbosch, C.V. Ferreira, A possible anti-proliferative and anti-metastatic effect of irradiated riboflavin in solid tumours, *Cancer Lett.* 258 (2007) 126–134.
- [11] M. Iwamoto, T. Minami, H. Tokuda, H. Ohtsu, R. Tanaka, Potential antitumor promoting diterpenoids from the stem bark of *Thuja standishii*, *Planta Med.* 69 (2003) 69–72.
- [12] J. Becerra, C. Flores, J. Mena, P. Aqueveque, J. Alarcón, M. Bittner, V. Hernández, M. Hoeneisen, E. Ruiz, M. Silva, Antifungal and antibacterial activity of diterpenes isolated from wood extractables of Chilean Podocarpaceae, *Boletín de la Sociedad Chilena de Química* 47 (2002) 151–157.
- [13] S. Chang, P. Chen, S. Wang, H. Wu, Antimite activity of essential oils and their constituents from Taiwan cryptomerioides, *J. Med. Entomol.* 38 (2001) 455–457.
- [14] A. Ulubelen, H. Birman, S. Oksuz, G. Topcu, U. Kolak, A. Barla, W. Voelter, Cardioactive diterpenes from the roots of *Salvia eriophora*, *Planta Med.* 68 (2002) 818–821.
- [15] M. Ono, M. Yamamoto, C. Masuoka, Y. Ito, M. Yamashita, T. Nohara, Diterpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*, *J. Nat. Prod.* 62 (1999) 1532–1537.
- [16] C. Clarkson, W.E. Campbell, P. Smith, In vitro antiparasitic activity of abietane and totarane diterpenes isolated from *Harpagophytum procumbens* (devil's claw), *Planta Med.* 69 (2003) 720–724.
- [17] J.A. Rodríguez, C. Theoduloz, T. Yanez, J. Becerra, G. Schmeda-Hirschmann, Gastroprotective and ulcer healing effect of ferruginol in mice and rats: assessment of its mechanism of action using in vitro models, *Life Sci.* 78 (2006) 2503–2509.

- [18] C. Areche, J.A. Rodríguez, I. Razmilic, T. Yáñez, C. Theoduloz, G. Schmeda-Hirschmann, Gastroprotective and cytotoxic effect of semi-synthetic ferruginol derivatives, *J. Pharm. Pharmacol.* 59 (2007) 289–300.
- [19] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63.
- [20] F. Denizot, R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods* 89 (1986) 71–77.
- [21] E.F. Hartree, Determination of proteins: a modification of Lowry method that give a linear photometric response, *Anal. Biochem.* 48 (1972) 422–427.
- [22] N. Li, T.D. Oberley, Modulation of antioxidant enzymes, reactive oxygen species, and glutathione levels in manganese superoxide dismutase-over-expressing NIH/3T3 fibroblasts during the cell cycle, *J. Cell Physiol.* 177 (1998) 148–160.
- [23] L. Chaiswing, J.M. Bourdeau-Heller, W. Zhong, T.D. Oberley, Characterization of redox state of two human prostate carcinoma cell lines with different degrees of aggressiveness, *Free Radic. Biol. Med.* 43 (2007) 202–215.
- [24] P. Chiarugi, M.L. Taddei, N. Schiavone, L. Papucci, E. Giannoni, T. Fiaschi, S. Capaccioli, G. Raugei, G. Ramponi, LMW-PTP is a positive regulator of tumor onset and growth, *Oncogene* 23 (2004) 3905–3914.
- [25] A. Jemal, R.C. Tiwari, T. Murray, A. Ghaffor, A. Samuels, E. Ward, E.J. Feuer, M.J. Thun, American Cancer Society Cancer statistics, *Cancer J. Clin.* 54 (2004) 8–29.
- [26] A.S. Tsao, E.S. Kim, W.K. Hong, Chemoprevention of cancer, *CA Cancer J. Clin.* 54 (2004) 150–180.
- [27] R.P. Singh, S. Dhanakakshmi, R. Agarwal, Phytochemicals as cell cycle modulators: a less toxic approach in halting human cancer, *Cell Cycle* 1 (2002) 156–161.
- [28] W. Hu, J.J. Kavanagh, Anticancer therapy targeting the apoptotic pathway, *Lancet Oncol.* 4 (2003) 721–729.
- [29] S. Fulda, K.M. Debatin, Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy, *Oncogene* 25 (2006) 4798–4811.
- [30] M. D-Huang, J.-H. Guh, Y.-T. Huang, S.-C. Chueh, P.-C. Chian, C.-M. Teng, Induction of mitotic arrest and apoptosis in human prostate cancer pc-3 cells by evodiamine, *J. Urol.* 173 (2005) 256–261.
- [31] G.Z. Justo, C.V. Ferreira, Coagulation and cancer therapy: the potential of natural compounds, *Curr. Genomics.* 6 (2005) 461–469.
- [32] J.C. Hsu, A. Dev, A. Wing, C.T. Brew, L.F. Bjeldanes, G.L. Firestone, Indole-3-carbinol mediated cell cycle arrest of LnCap human prostate cancer cells requires the induced production of activated p53 tumor suppressor protein, *Biochem. Pharmacol.* 72 (2006) 1714–1723.
- [33] L. Gapter, Z. Wang, J. Glinski, K.-Y. Ng, Induction of apoptosis in prostate cancer cells by pachymic acid from *Poria cocos*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332 (2005) 1153–1161.
- [34] E. Solary, N. Droin, O. Sordet, Cell death pathways as targets for anticancer drugs, in: B.C. Baguley, D.J. Kerr (Eds.), *Anticancer Drug Development*, Academic Press, San Diego 2002, pp. 55–76.
- [35] N. Thornberry, Y. Lazebnik, Caspases: enemies within, *Science* 281 (1998) 1312–1316.
- [36] A. Ashkenazi, V.M. Dixit, Death receptors: signaling and modulation, *Science* 281 (1998) 1305–1308.
- [37] A.M. Chinnaiyan, K. O'Rourke, M. Tewari, V.M. Dixit, FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis, *Cell* 81 (1995) 505–512.
- [38] M.E. Peter, P.H. Krammer, Mechanisms of CD95 (APO-1/ Fas)-mediated apoptosis, *Curr. Opin. Immunol.* 10 (1998) 545–551.
- [39] C. Pepper, T. Hoy, D.P. Bently, Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance, *Br. J. Cancer* 76 (1997) 935–938.
- [40] C. Cande, I. Cohen, E. Daugas, L. Ravagnan, N. Larochette, N. Zamzami, G. Kroemer, Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria, *Biochimie.* 84 (2002) 215–222.
- [41] C.J. Sherr, G1 phase progression: Cycling on cue, *Cell* 79 (1994) 551–555.
- [42] J.-M. Yun, M.-H. Kweon, H. Kwon, J.-K. Hwang, H. Mukhtar, Induction of apoptosis and cell cycle arrest by a chalcone panduratin A isolated from *Kaempferia pandurata* in androgen-independent human prostate cancer cells PC3 and DU145, *Carcinogenesis* 27 (2006) 1454–1464.
- [43] C.P. Lim, X. Cao, Structure, function, and regulation of STAT proteins, *Mol. Biosyst.* 2 (2006) 536–550.
- [44] T.J. Ahonen, J. Xie, M.J. LeBaron, J. Zhu, M. Nurmi, K. Alanen, H. Rui, M.T. Nevalainen, Inhibition of transcription factor Stat5 induces cell death of human prostate cancer cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 27287–27292.
- [45] B.E. Barton, J.G. Karras, T.F. Murphy, A. Barton, H.F. Huang, Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) activation in prostate cancer: Direct STAT3 inhibition induces apoptosis in prostate cancer lines, *Mol. Cancer Ther.* 3 (2004) 11–20.
- [46] G. Niu, K.L. Wright, M. Huang, L. Song, E. Haura, J. Turkson, S. Zhang, T. Wang, D. Sinibaldi, D. Coppola, R. Heller, L.M. Ellis, J. Karras, J. Bromberg, D. Pardoll, R. Jove, H. Yu, Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis, *Oncogene* 21 (2002) 2000–2008.
- [47] P. Rocchi, E. Beraldi, S. Ettinger, L. Fazli, R.L. Vessella, C. Nelson, M. Gleave, Increased Hsp27 after androgen ablation facilitates androgen-independent progression in prostate cancer via signal transducers and activators of transcription 3-mediated suppression of apoptosis, *Cancer Res.* 65 (2005) 11083–11093.
- [48] J. den Hertog, A. Groen, T. van der Wijk, Redox regulation of protein-tyrosine phosphatases, *Arch. Biochem. Biophys.* 434 (2005) 11–15.
- [49] C.V. Ferreira, G.Z. Justo, A.C.S. Souza, K.C. Queiroz, W.F. Zambuzzi, H. Aoyama, M.P. Peppelenbosch, Natural compounds as a source of protein tyrosine phosphatase inhibitors: application to the rational design of small-molecule derivatives, *Biochimie* 88 (2006) 1859–1873.