

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO



Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

EFEITO DA METIL- β -CICLODEXTRINA E DE
ALGUNS TENSOATIVOS SOBRE A VIABILIDADE
CELULAR DE LINHAGENS CELULARES DE
CÂNCER DE OVÁRIO

NAHUN THIAGHOR LIPPAUS PIRES GONÇALVES

Vitória, ES
2012

Nahun Thiaghor Lippaus Pires Gonçalves

Efeito da metil- β -ciclodextrina e de alguns tensoativos sobre a viabilidade celular de linhagens celulares de câncer de ovário.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração em saúde. Orientador: Prof. Dr. Ian Victor Silva.

Vitória, ES
2012

Nahun Thiaghor Lippaus Pires Gonçalves

**Efeito da metil- β -ciclodextrina e de alguns tensoativos
sobre a viabilidade celular de linhagens celulares de câncer
de ovário.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da
Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção
do Grau de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração em saúde.
Aprovada em _____ de _____ de _____.

COMISSÃO EXAMINADORA

**Dr. Ian Victor Silva,
Universidade Federal do Espírito Santo,
Orientador.**

**Dr(a). Leticia Batista Azevedo Rangel,
Universidade Federal do Espírito Santo,
Co-orientadora.**

**Dr. Joselito Nardy Ribeiro,
Universidade Federal do Espírito Santo,
Membro interno.**

**Dr. Andre Romero da Silva,
Instituto Federal do Espírito Santo,
Membro externo.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Setorial de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

Eu aprendi...
...que ignorar os fatos não os altera;
Eu aprendi...
...que quando você planeja se nivelar com alguém, apenas está limitando a sua
capacidade;
Eu aprendi...
...que o amor e o tempo, curam todas as feridas;
Eu aprendi...
...que ninguém é perfeito até que você se apaixone por essa pessoa;
Eu aprendi...
...que a vida é dura, mas é por isso que vale ser vivida;
Eu aprendi...
...que as oportunidades nunca são perdidas; se não eu, alguém vai aproveitar.
Eu aprendi...
...que para ter felicidade, não basta só querer é necessário lutar;
Eu aprendi...
...que não posso escolher como me sinto, mas posso escolher o que fazer a
respeito;
Eu aprendi...
...que todos querem viver no topo da montanha, mas toda felicidade e
crescimento ocorrem quando você está escalando-a;
Eu aprendi...
...que quanto menos tempo tenho mais coisas consigo fazer;
Eu aprendi...
...que a gente não faz amigos, reconhece-os;
Eu aprendi...
...que é melhor dizer a verdade do que mentir, ser livre do que depender e até
certo ponto, saber do que ignorar.

(Adaptado de Henry Louis Mencken, Vinícius de Moraes e William
Shakespeare).

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ian pela credibilidade, determinação, incentivo e imposição de objetivos os quais fortaleceram e possibilitaram nosso crescimento e a realização deste trabalho.

À professora Letícia, pela oportunidade de iniciação na carreira científica e pelos desafios propostos durante essa jornada para produção de uma mentalidade mais ávida e crítica.

Aos amigos do laboratório, pela companhia, em especial ao Murilo por me acolher em sua casa, pela contribuição para a execução desse trabalho, em especial Lucas, Alice, Klésia e Renata e a todos que ajudaram a tornar as longas jornadas no laboratório mais leves e agradáveis, em especial Débora e Gabriela.

A minha família que aceitou por imposição a minha escolha de carreira científica, em especial minha mãe.

A meus amigos Cirlene, David, Lidia, Rizia que me acompanharam durante toda jornada e me proporcionaram momentos de alegria sem os quais não seria possível continuar, em especial ao Steferson, que contribuiu amplamente na construção dessa conquista.

Ao meu irmão Uriel, por toda compreensão, carinho, apoio, amizade, provocação, implicância, disponibilidade, atenção, respeito e honestidade, que minha vitória neste momento também seja motivo para seu orgulho.

RESUMO

No presente estudo é estabelecida uma correlação entre alguns tensoativos, um derivado de ciclodextrina, oligossacarídeo cíclicos originado da ação da ciclodextrina glicosiltransferase, a β -ciclodextrina metilada e as linhagens de câncer de ovário A 2780 e OVCAR 3, tentando abrir a possibilidade de utilização da ciclodextrina associada a medicamentos quimioterápicos padronizados à terapia contra o câncer de ovário, que é apontado como uma das principais causas de óbito entre as malignidades ginecológicas. O câncer de ovário apresenta alta taxa de mortalidade, além de possuir vários subtipos histo-clínicos, a cada ano aumenta cada vez mais o número de pacientes diagnosticadas, assim, é indispensável à continuidade das pesquisas científicas relacionadas a este tipo de câncer, visto que os conhecimentos até então elaborados são de extrema significância, porém insuficientes para que seja estabelecida uma cura. Através da viabilidade celular pelo método do MTT, onde se utiliza o sal de tetrazol para expressar de forma quantitativa a proliferação e sobrevivência das células e o método de BRADFORD, para normalização de dados, tenta-se estabelecer a influência de alguns tensoativos e do derivado de ciclodextrina sobre e entre as linhagens de câncer de ovário. A metil- β -ciclodextrina e os tensoativos SDS, TX100 E TW20 induziram uma redução da atividade mitocondrial dose-dependente em cultura de células de câncer de ovário da linhagem A 2780 e OVCAR 3. O derivado de ciclodextrina demonstrou indução gradativa da redução da atividade mitocondrial para duas das oito concentrações testadas (0,2% e 0,4%) com viabilidade celular próxima a 60% na linhagem A 2780. Na linhagem OVCAR 3 a metil- β -ciclodextrina apresenta potencial citotóxico capaz de inviabilizar 25% do crescimento celular em concentrações superiores a 0,003125%, a viabilidade celular perante as mesmas condições de tratamento é menor nesta linhagem quando comparada a linhagem A 2780. Devido às propriedades da ciclodextrinas os resultados das análises comparativas de viabilidade celular, nas linhagens de câncer de ovário, estes resultados apontam para possibilidades maiores em futuros estudos, podendo a pesquisa aqui apresentada ser tomada como referência.

Palavras-chave: Câncer de Ovário, β -ciclodextrina, Viabilidade Celular.

ABSTRACT

This study sets up a correlation between some surfactants, a derivate of cyclodextrin, cyclic oligosaccharide originated from the action of the glycosyltransferase cyclodextrin, a methylated β -cyclodextrin and the lines of ovarian cancer A 2780 and OVCAR 3, trying to offering the possibility of using cyclodextrin associated with standard chemotherapy drugs in therapy against ovarian cancer, which is pointed as one of the main causes of death among gynecological ills. Ovarian cancer is connected with high mortality rate and has several histo-clinical subtypes, raising the number of patient diagnosed each year, therefore there are the needy of continuing the scientific research which this kind of cancer is related, once the knowledge developed so far are extremely significant, yet it still is insufficient to generate a cure. Through the cellular viability by MTT method, which uses salt of tetrazol to express quantitatively the proliferation and survival of cells, and Bradford method for standardization data, it attempts to establish the influence of surfactants and some of the derivate of cyclodextrin on and between the lines of ovarian cancer. The methyl- β -cyclodextrin and the surfactant SDS, TX100 and TW20 induced a reduction in dose-dependent mitochondrial activity in cell cultures of ovarian cancer line A 2780 and OVCAR 3. The cyclodextrin derivate has demonstrated induction of gradual reduction of the mitochondrial activity of two from eight concentrations tested (0,2% and 0,4%) with cell viability of approximately 60% in strain A 2780. In the line OVCAR 3 the methyl- β -cyclodextrin shows potential cytotoxic able to tamper 25% of cell growth in conditions of treatment is reduced in this strain when compared with strain A 2780. Due to the properties of cyclodextrins, results of comparative analyzes of cell viability, in the strains of ovarian cancer, indicates to greater possibilities in future studies, enabling the research presented here as a reference.

Keywords: Ovarian Cancer, β -cyclodextrin, Cell Viability.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Taxa percentual de mortalidade por câncer no Brasil entre 2000-2007.....21
- FIGURA 2 – Epidemiologia do CAOV quanto à estimativa de novos casos e a taxa de mortalidade no mundo, subdividido entre países desenvolvidos e em desenvolvimento.....23
- FIGURA 3 – Tipos histológicos de CAOV. A- Adenocarcinoma seroso. B- Adenocarcinoma mucinoso. C- Adenocarcinoma endometrióide. D- Adenocarcinoma de células claras. Coloração por hematoxilina e eosina.....26
- FIGURA 4 – Estrutura molecular das drogas de primeira linha utilizadas contra o CAOV, carboplatina, cisplatina e taxol.....28
- FIGURA 5 – Estrutura molecular padrão das ciclodextrinas; Em destaque (verde) a unidade de glicopirranose (D-glicose), os derivados α , β e γ -CD são definidos por $n = 6, 7$ e 8 respectivamente.....32
- FIGURA 6 – Estrutura molecular das ciclodextrinas naturais, α -CD = alfa ciclodextrina; β -CD = beta ciclodextrina; γ -CD = gama ciclodextrina.....33
- FIGURA 7 – Representação tridimensional da estrutura tronco cônica das ciclodextrinas com características definidas pelo arranjo das unidades de glicose, parte externa hidrofílica e parte interna hidrofóbica.....34
- FIGURA 8 – Estrutura molecular de uma unidade de glicose com esquema de identificação dos pontos mais propícios para alterações nas CDs, vermelho C2, azul C3 e amarelo C6.....36
- FIGURA 9 – Esquema do processo de complexação, fármaco – ciclodextrina; A) formação do complexo de inclusão fármaco:CD com estequiometria de 1:1;

B) formação do complexo de inclusão fármaco:CD com estequiometria de 1:2.....39

FIGURA 10 – Conversão mitocondrial do MTT. De Tetrazol a Azul de Formazan.....43

FIGURA 11 – Cultura de células aderentes, linhagem OVCAR 3.....49

FIGURA 12 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem A2780 tratadas com solução de SDS (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.....59

FIGURA 13 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem A2780 tratadas com solução de TX100 (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.....60

FIGURA 14 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem A2780 tratadas com solução de TX100 (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.....60

FIGURA 15 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem A2780 tratadas com solução de metil- β -ciclodextrina (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.....61

FIGURA 16 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem OVCAR3 tratadas com solução de SDS (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.....62

FIGURA 17 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem OVCAR3 tratadas com solução de TX100 (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.....63

FIGURA 18 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem OVCAR3 tratadas com solução de TW20 (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.....63

FIGURA 19 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem OVCAR3 tratadas com solução de metil- β -ciclodextrina (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.....64

FIGURA 20 – Avaliação comparativa entre as linhagens A 2780 e OVCAR 3 do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário tratadas com solução de SDS (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem. * $P < 0,05$65

FIGURA 21 – Avaliação comparativa entre as linhagens A 2780 e OVCAR 3 do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário tratadas com solução de TX100 (0,003125% – 0,4%), durante um período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem. * $P < 0,05$66

FIGURA 22 – Avaliação comparativa entre as linhagens A 2780 e OVCAR 3 do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário tratadas com solução de TW20 (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem. * $P < 0,05$66

FIGURA 23 – Avaliação comparativa entre as linhagens A 2780 e OVCAR 3 do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário tratadas com solução de metil- β -ciclodextrina (0,003125% – 0,4%), durante um período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem. * P < 0,05.....67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Estadiamento das Neoplasias Malignas de Ovário.....	30
TABELA 2 – Características das ciclodextrinas (CD) naturais.....	35
TABELA 3 – Propriedades físico-químicas de β -ciclodextrinas e seus derivados.....	38
TABELA 4 – Avaliação da toxicidade das CDs naturais em ratos.....	41
TABELA 5 – Exemplificação da placa CTX. O modelo foi utilizado para as duas linhagens (OVCAR 3 e A2780) dando origem a duas placas (O3CTX e A2CTX). Legenda: Abs (Absorbância); NT (Não Tratadas); PBS1X; BRA (Branco).....	54
TABELA 6 – Exemplificação da placa STW. O modelo foi utilizado para as duas linhagens (OVCAR 3 e A2780) dando origem a duas placas (O3STW e A2STW). Legenda: Abs (Absorbância); NT (Não Tratadas); PBS1X; BRA (Branco).....	55
TABELA 7 – Comparação da viabilidade celular dos diferentes tratamentos frente às diversas concentrações na linhagem A2780.....	61
TABELA 8 – Comparação da viabilidade celular dos diferentes tratamentos frente às diversas concentrações na linhagem OVCAR3.....	64

LISTA DE SIGLAS

°C – Graus Celsius
BSA – Soro Albumina Bovina
CAOV – Câncer de Ovário
CD – Ciclodextrina(s)
CDM – Ciclodextrina Metilada (s)
CGTase – Ciclodextrina Glicosil Tranferase
cm² – Centímetro Quadrado
CO – Dióxido de Carbono
DIMEB – Dimetil-β-ciclodextrina
DLP – Doxorubicina Lipossomal Peguilada
DNA – Ácido desoxirribonucleico.
g – Grama
HCl – Ácido Clorídrico
Kg – Quilograma
MeCD – Metilciclodextrina
MeβCD – β Ciclodextrina Metilada
mg – Miligrama
ml – Mililitro
MTT – Sal de Tetrazol
nm – nanômetro
OMS – Organização Mundial de Saúde
OSE – Superfície Epitelial do Ovário
pH – potencial de hidrogênio iônico
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SFB – Soro Fetal Bovino
TPP – Poliestireno
TRIMEB – Trimetil-β-ciclodextrina
TW20 – Tween 20
TX100 – Triton X 100
UV – Ultra Violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 CÂNCER DE OVÁRIO (CAOV).....	20
2.1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CAOV.....	22
2.1.2 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CAOV.....	24
2.1.3 TRATAMENTO TERAPÊUTICO DO CAOV.....	27
2.1.4 TRATAMENTO CIRÚRGICO DO CAOV.....	30
2.2 CICLODEXTRINAS.....	32
2.2.1 CICLODEXTRINAS DERIVADAS.....	36
2.2.2 CICLODEXTRINAS METILADAS.....	37
2.2.3 SISTEMA DE COMPLEXAÇÃO DAS CICLODEXTRINAS.....	38
2.2.4 TOXICIDADE DAS CICLODEXTRINAS.....	40
2.3 TENSOATIVOS.....	41
2.4 VIABILIDADE CELULAR (MTT).....	42
2.5 BRADFORD.....	44
2.6 CULTURA DE CÉLULAS.....	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	50
3.1 CULTURA DE CÉLULAS.....	50
3.1.1 LINHAGEM CELULARES.....	50
3.1.2 DESCONGELAMENTO.....	50
3.1.3 MANUTENÇÃO.....	50
3.1.4 CRIOPRESERVAÇÃO.....	51
3.1.5 PLAQUEAMENTO.....	52
3.1.6 TRATAMENTO.....	53
3.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	55
3.2.1 CITOTOXICIDADE.....	55
3.2.2 MTT.....	56
3.2.3 CITOTOXICIDADE CELULAR DAS LINHAGENS.....	56
3.3 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS POR QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA.....	57
3.3.1 QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA.....	57

3.3.2 REAGENTE DE BRADFORD.....	57
3.3.3 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS.....	57
3.4 ESPECTOFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO.....	58
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4. RESULTADOS.....	59
4.1 LINHAGEM A2780.....	59
4.2 LINHAGEM OVCAR3.....	62
4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS A2780 E OVCAR3.....	65
5. DISCUSSÃO.....	68
6. CONCLUSÃO.....	70
7. REFERÊNCIAS.....	71
8. ANEXOS.....	84
8.1 ANEXO 1 – ESTRUTURA SDS.....	84
8.2 ANEXO 2 – ESTRUTURA TW20.....	85
8.3 ANEXO 3 – ESTRUTURA TX100.....	85

1. INTRODUÇÃO

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos originados da ação da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), que possuem número variável de moléculas de D-glicose (glicopiranoses). As CDs mais conhecidas são a α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e a γ -ciclodextrina, denominadas CDs naturais. Essas moléculas são usadas na indústria de alimentos, cosméticos e na agricultura, entre outras utilidades, são de grande serventia no desenvolvimento e investigação de formulações farmacêuticas, principalmente em sistemas de liberação controlada de drogas, possibilidade proveniente do complexo de inclusão (BIWER, 2002; SINGH, 2002; ARUNKUMAR ET AL; 2005; SENRA et al., 2010).

Este estudo estabelece uma correlação entre um derivado de CD, a β -ciclodextrina metilada (Me β CD), e duas linhagens de câncer de ovário (CAOV), linhagem A 2780 e OVCAR 3, baseando-se na possibilidade de utilização da CD associada aos medicamentos quimioterápicos padronizados à terapia contra o CAOV, de modo a propor uma adequação na formulação farmacêutica padrão que possa beneficiar os pacientes acometidos pela doença.

Apontado como uma das principais causas de óbito entre as malignidades ginecológicas, o CAOV é, atualmente, um desafio para ciência. Estima-se que irão surgir, aproximadamente, 200 mil novos casos de CAOV por ano. Como o diagnóstico é feito, na maioria das vezes, em estágio avançado, a doença encontra-se agravada e com possível metástase. Esses fatores associados a resistência aos quimioterápicos contribuem para alta taxa de mortalidade. Especula-se que 50% dos casos evoluam para o óbito logo no primeiro ano (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010; JEMAL et al., 2011).

O diagnóstico precoce aumenta, consideravelmente, as chances de cura do câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010). Contudo, as possibilidades de diagnóstico do CAOV nas fases iniciais da doença são mínimas, visto a característica assintomática da doença nesta fase. A inexistência de biomarcadores fidedignos e fatores de risco consistentes dificultam ainda mais

o diagnóstico do CAOV . Entretanto, a taxa de incidência do CAOV está concentrada nas mulheres com idade avançada, fato esse, responsável pela menor possibilidade de recuperação das pacientes acometidas pela doença (Aebi e CASTIGLIONE, 2008; JEMAL et al., 2009).

É observado um aumento do número de idosos na população mundial concomitante ao desenvolvimento dos países e a melhoria na qualidade de vida de seus habitantes. Assim, é plausível esperar que haja um aumento impactante no número total de casos de neoplasias malignas, entre elas, o CAOV que, atualmente, configura-se como um dos casos de grande importância para a saúde pública mundial e tende a assumir maior significância com o passar dos anos (JEMAL et al., 2009; JEMAL et al., 2011).

O tratamento para o CAOV é dividido em farmacológico e cirúrgico. A terapia com base farmacológica está padronizada na combinação de um derivado de platina (medicamentos mais antigos como carboplatina ou cisplatina) e um taxano (medicamentos mais novos como o paclitaxel), administrados em ciclos e intervalos (AEBI; CASTIGLIONE, 2008). Entretanto, as células tumorais podem se tornar resistentes aos fármacos, o que acaba por impossibilitar a continuidade do tratamento de primeira linha, direcionando a utilização de combinações com outros quimioterápicos, porém o resultado pode não ser sustentável e a substituição dos medicamentos procede apenas para minimizar os sintomas, promovendo o conforto da paciente e um pequeno aumento na taxa de sobrevida (SHERMAN-BAUST et al., 2003). Já a terapia cirúrgica relacionada ao estágio do CAOV é de grande importância na determinação da conduta terapêutica (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). Este tratamento envolve histerectomia abdominal total, salpingo-ooforectomia bilateral, em alguns casos salpingo-ooforectomia unilateral, omentectomia, e biópsias peritoneais (LIMA; GIRÃO; CARVALHO, 1999).

Desta forma, pesquisas científicas que venham por contribuir para o esclarecimento dos mecanismos da doença, métodos para diagnóstico precoce, biomarcadores, novos fármacos e formulações mais eficazes, são de fundamental importância para o desenvolvimento das ferramentas de combate

e prevenção ao CAOV, devendo ser incentivadas, tendo em vista que as perspectivas futuras, apresentadas através de dados epidemiológicos, confirmam que esta doença acometer ainda mais mulheres, aumentando ainda mais o número de óbitos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER DE OVÁRIO (CAOV)

Com melhores condições de qualidade de vida promovida pelo crescente desenvolvimento, as taxas de natalidade e a expectativa de vida têm aumentado, juntamente com o crescimento populacional e o envelhecimento estão aumentando as enfermidades, parte delas relacionadas à genética e parte aos hábitos de vida, o câncer é uma das enfermidades que se enquadra dentre as duas. O número de pessoas com câncer tem aumentado ano após ano e este pode ser caracterizado como uma das principais causas de morte em todo mundo. Nos países desenvolvidos, o câncer é classificado como a principal causa de morte, já nos países em desenvolvimento está em segundo lugar, esses valores podem estar relacionados às condições comportamentais. Embora as taxas de incidência de câncer em países em desenvolvimento sejam metade dos observados em países desenvolvidos em ambos os sexos, as taxas de mortalidade de câncer em geral são semelhantes, a questão pode ser pertinente ao diagnóstico tardio e acesso limitado a tratamento oportuno e padronizado (JEMAL et al., 2011). Essa enfermidade mata milhões por todo o mundo, indiferente, no Brasil a mortalidade é alta e tende a aumentar com os anos (FIGURA 1).

Mortalidade proporcional não ajustada por câncer, Brasil, homens e mulheres entre 2000 e 2007

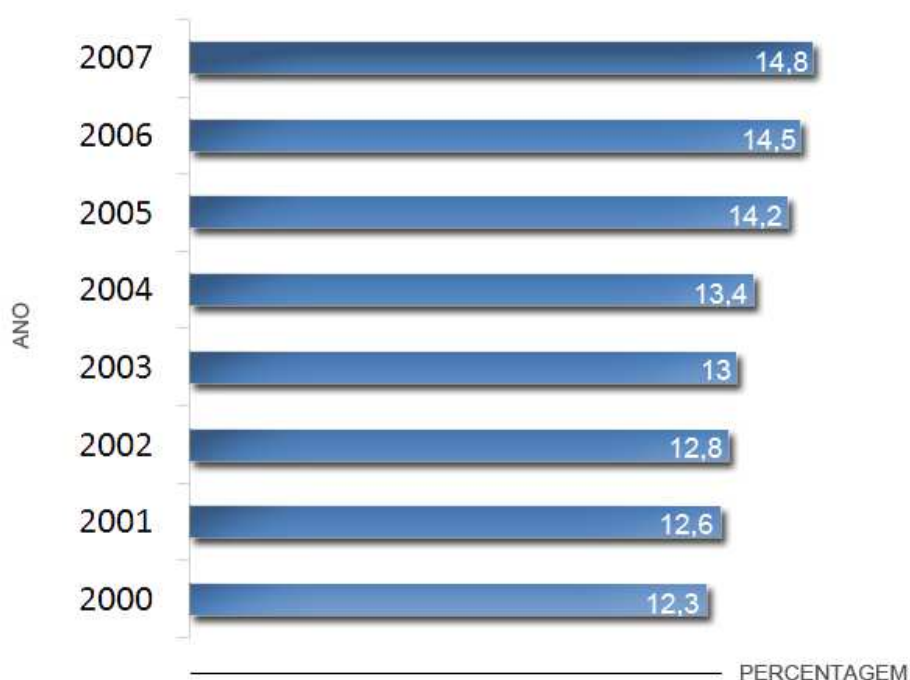


FIGURA 1 – Taxa percentual de mortalidade por câncer no Brasil entre 2000-2007 (Adaptado de <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/prepararModelo00.action>).

Parte significativa do número de pessoas com câncer poderia ser evitado através da aplicação de sistemas de detecção precoce e tratamento, bem como através de campanhas de saúde pública e uma ingestão alimentar saudável, onde os profissionais da área de saúde, com apoio de uma política pública bem formulada, podem desempenhar papel ativo de aplicação dessas intervenções a nível mundial (JEMAL et al., 2011). A cada dia, a medicina tem avançado e quebrado barreiras, porém a cura para o câncer ainda configura-se como um de seus desafios mais promissores.

Dentre os vários tipos de cânceres que atingem as mulheres, o câncer de ovário (CAOV) corresponde a apenas 3% dos cânceres diagnosticados, porém com uma baixa taxa de sobrevivência é a quinta principal causa de morte por câncer entre mulheres. A alta taxa de mortalidade se deve ao fato de que, quando diagnosticadas, a maioria das pacientes (62%) apresentam a doença em metástase. Além disso, esse câncer possui vários subtipos histo-clínicos e seu

desenvolvimento pode ser de diversas formas, o que evidencia alta heterogeneidade (LANDEN et al., 2008; LEVANON et al., 2008).

A carcinogênese ovariana baseia-se na hipótese de que incessantes ciclos ovulatórios levam a exposição do epitélio a um ambiente rico em estrogênio favorecendo, à longo prazo, a proliferação celular, formação de cisto de inclusão e, possivelmente, a transformação maligna. Assim, a ruptura contínua do epitélio superficial do ovário na ovulação e a conseqüente proliferação reparativa torna as células suscetíveis a danos genéticos e transformação maligna. As células normais do epitélio, assim como as células dos carcinomas de ovário, secretam e possuem receptores para hormônios, fatores de crescimento e citocinas. Tais fatores são candidatos para regulação da fisiologia normal do epitélio e da transformação e progressão de cânceres de ovário. Em particular, as alterações do hormônio, a produção do fator de crescimento e expressão do receptor são comuns em tumores ovarianos (PIKE, 2004; LANDEN et al., 2008; LEVANON et al., 2008).

Como resultado dos processos de mutação, silenciamento e exclusão, os cânceres epiteliais de ovário apresentam um elevado grau de heterogeneidade genética. A quimioterapia, radioterapia e a cirurgia configuram-se como principais métodos de tratamento para o CAO (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008), e as alterações na expressão gênica, através de mutação, o regulamento epigenético, ou eventos de splicing diferencial, a progressão, a resposta às drogas e a sobrevivência do paciente tornam a identificação do subtipo de tumor e de sua origem genética essencial para melhor eficácia da terapia (KURMAN, 2008; KOBEL et al., 2008).

2.1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CAO

Os dados epidemiológicos demonstram que a taxa de mortalidade mundial de CAO alcançou números alarmantes num representativo percentual maior que 50%, havendo prevalência de óbitos nos países em desenvolvimento, o que é justificado pelo maior identificação de novos casos. O número de novos casos já ultrapassa os 200.000 (FIGURA 2), superando as expectativas, esses dados

corroboram com a afirmação de que o CAOV poderá ser indicado no futuro como uma das grandes causas de morte entre as mulheres (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2010; JEMAL et al., 2011).

Apenas 10% dos CAOV são relacionados à herança familiar, o restante é classificado como de origem esporádica, porém, o histórico familiar é um importante fator de risco estabelecido para o desenvolvimento de neoplasias e não deve ser descartado. Foi verificado que as mulheres contendo os genes com mutação BRCA1/BRCA2 acabam desenvolvendo CAOV mais cedo, quando correlacionado aos casos esporádicos (LUX; FASCHING; BECKMANN, 2006). A presença desses genes é uma informação muito valiosa, visto que não existem confirmações quanto a fatores de pré-disposição ao CAOV, tampouco fatores protetores. É observado que nuliparidade, menarca precoce, menopausa tardia, histórico de infertilidade, idade avançada e etnia caucasiana estão associadas ao aparecimento de CAOV sendo relacionados como possíveis fatores de risco, já multiparidade e uso prolongado de contraceptivos orais como possíveis fatores protetores (LUX; FASCHING; BECKMANN, 2006; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

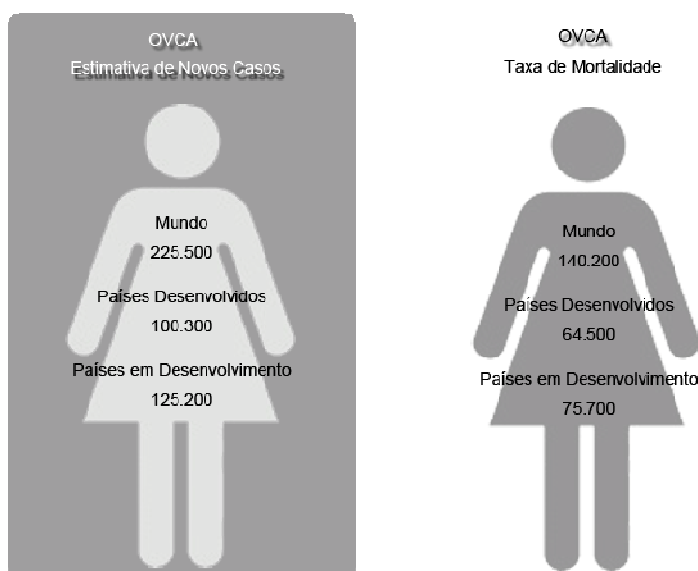


FIGURA 2 – Epidemiologia do CAOV quanto à estimativa de novos casos e a taxa de mortalidade no mundo, subdividido entre países desenvolvidos e em desenvolvimento (Adaptado de JEMAL et al., 2011).

No CAOV há prevalência dos casos esporádicos, o que, agregado às incertezas acerca dos fatores de proteção ou predisposição à doença e a inexistência de sintomas específicos nas fases iniciais, agravam ainda mais o cenário em torno das malignidades ovarianas. O sinal mais comum do CAOV é o alargamento do abdômen, ocasionado pelo acúmulo de líquido e caracterizando, muitas vezes, quadros de ascites que acompanham a progressão da doença em seus estadiamentos mais avançados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008). O diagnóstico tardio deve-se, principalmente, a ausência de sintomas específicos. Aproximadamente 70% dos casos são diagnosticados em estágio avançado tornando o CAOV o câncer ginecológico de maior letalidade (JACOBS; MENON, 2004; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008).

2.1.2 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CAOV

A Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica os cânceres de ovário com base no local de origem da neoplasia e em sua apresentação morfológica em seis grupos de neoplasias ovarianas: tumores epiteliais-estromais, tumores dos cordões sexuais-estroma, tumores de células germinativas, tumores mistos de células germinativas e cordões sexuais-estroma, tumores de rete ovarii e tumores de origem indeterminada (TAVASSOLI; DEVILLEE, 2003).

Aproximadamente 90% dos cânceres de ovário são derivados do epitélio superficial unicelular (LANDEN et al., 2008; LEVANON et al., 2008). Acredita-se que o epitélio ovariano, quando se transforma em um fenótipo maligno, morfológicamente, possa ser diferenciado em vários subtipos de carcinoma, tendo origem no mesotélio de revestimento ovariano ou a partir dos cistos de inclusão, que são formados através do processo de invaginação do mesotélio no estroma. Os tumores epiteliais, ou tumores epiteliais-estromais, devido à presença do estroma subjacente no tumor (LIMA; GIRÃO; CARVALHO, 1999), são as neoplasias de ovário mais comuns, sendo subclassificados de acordo com o tipo de diferenciação do componente epitelial, dividindo-se em serosos, mucinosos, endometrióides, células claras, células transicionais, células escamosas, mistos e indiferenciados (AUERSPERG et al., 2001; CANNISTRA,

2004; JEMAL et al., 2009). Também são classificados em tipo I e tipo II, onde tipo I são tumores de borderline benignos com genótipos relativamente estável, enquanto o tipo II inclui tumores agressivos e tumores de alto grau geneticamente instáveis e apresentam substanciais alterações genéticas (KURMAN, 2008; KOBEL et al., 2008) e de acordo com a apresentação macroscópica (cistos, papilas e predomínio estromal), essas características configuram o CAOv como um grade desafio à medicina (LIMA; GIRÃO; CARVALHO, 1999; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

Analisando os tumores ovarianos de origem epitelial-estromal (FIGURA 3), tumores ovarianos serosos são mais frequentes na forma de cistos e com arquitetura papilar (CARVALHO, 2002), formados por células similares às de revestimento tubário, em suas formas bem-diferenciadas (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). Tumores mucinosos são ordinariamente grandes, císticos, uni ou multiloculares (LIMA; GIRÃO; CARVALHO, 1999; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003) constituídos por epitélio mucossecretor, similar ao endocervical ou intestinal. Tumores endometrióides apresentam células de diferenciação similar às do endométrio normal e detêm grande participação estromal. Os tumores de células claras são comumente encontrados na forma de carcinomas e poucas vezes na forma de tumores benignos e *borderline*, dispostas em arranjos sólidos, tubulares, císticos ou papilíferos (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003), sendo formados por células de citoplasma claro com grande quantidade de glicogênio (LIMA; GIRÃO; CARVALHO, 1999).

Dentro da classe de tumores epiteliais-estromais há ainda tumores indiferenciados que são malignos, não apresentam diferenciação ou somente pequenos focos de diferenciação, tumores de células transicionais caracterizam-se por possuírem células semelhantes às de revestimento da bexiga, tumores de células escamosas compostos por células epiteliais escamosas e os tumores epiteliais mistos constituídos por mais de um tipo histológico e os (LIMA; GIRÃO; CARVALHO, 1999; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). Do ponto de vista quantitativo os tipos histológicos de CAOvs que mais se destacam são os tumores serosos (40-50%), endometrióide (20-25%), mucinosos (5-10%) e de células claras (5-10%) (CARVALHO, 2002).

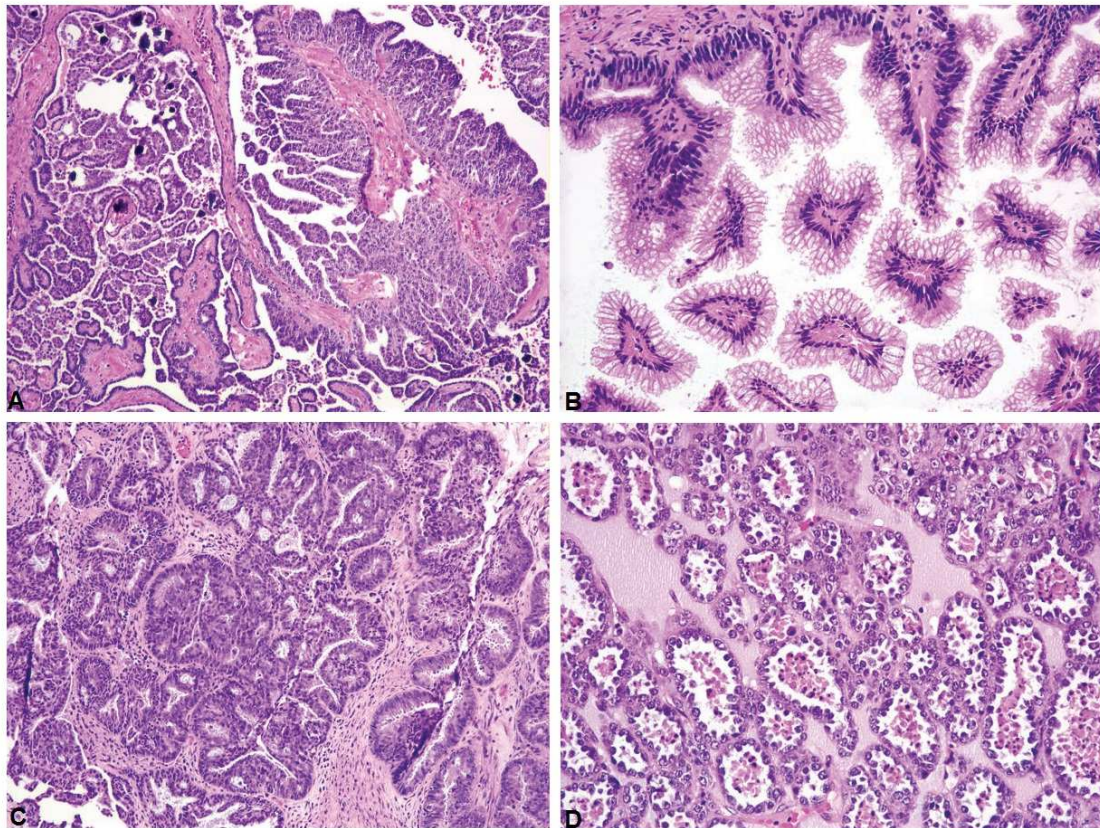


FIGURA 3 – Tipos histológicos de CAOV. A- Adenocarcinoma seroso. B- Adenocarcinoma mucinoso. C- Adenocarcinoma endometrióide. D- Adenocarcinoma de células claras. Coloração por hematoxilina e eosina (Adaptado de KARST; DRAPKIN, 2010).

Na maioria das vezes os cânceres epiteliais progridem de adenomas para células de adenocarcinoma e metástase, porém suspeitas indicam que a origem dos subtipos individuais podem variar, havendo uma maior contribuição das trompas de Falópio e do endométrio para cânceres mais agressivos (VOGELSTEIN; KINZLER, 1993; KARST; DRAPKIN, 2010). A célula de origem e a histologia do câncer de ovário possuem importância clínica, tanto na prevenção quanto no tratamento clínico, porém ainda existem controversas (BOYD, 2008; LANDEN et al., 2008; LEVANON et al., 2008; KURMAN; SHIH, 2010).

Anteriormente, era aceito que as mutações que geravam malignidade vinham a ocorrer no mesotélio pélvico que recobre o ovário e nas linhas de inclusão epitelial de cistos ovarianos (LANDEN et al., 2008; AUERSPERG et al., 2001). As células de superfície epitelial do ovário (OSE) eram, através de argumentos de evidência histopatológica (SCULLY, 1995; OKAMURA; KATABUCHI, 2004),

modelos experimentais (FLESKEN-NIKITIN et al., 2003; HAKIM et al., 2009) e história de desenvolvimento (AUERSPERG et al., 2001) combinado com a alta expressão de genes de manutenção de células-tronco (BOWEN, 2009), sugeridas como fornecedoras multipotenciais para a diversidade fenotípica entre os carcinomas de ovário, porém Lee et al. propuseram que a fímbria da trompa de Falópio pode ser a origem de carcinoma de células serosas “Tipo II” provenientes de amplificação de células epiteliais secretoras (LEE et al., 2007). Os carcinomas de ovário serosos são os mais comuns e mais letais de todas as neoplasias epiteliais de ovário. Esses surgem na fímbria das trompas de falópio e sofrem metástase de lá para células de superfície do ovário (PIEK et al., 2001; LEVANON et al., 2008).

A visão predominante nesta controvérsia é que, com a possível exceção de carcinoma de células de ovário endometrial e de células claras resultantes da endometriose do ovário, o câncer epitelial pode surgir tanto na OSE ou no epitélio da fímbria originado subtipos específicos preferenciais, em cada, embora ainda não esteja claro por que estes sítios de partes diferentes do órgão são suscetíveis à transformação neoplásica e devem dar origem a carcinomas serosos considerados, dentre os carcinomas de origem epitelial-estromal, como os mais comuns (CARVALHO, 2002; VANG, 2009).

2.1.3 TRATAMENTOS TERAPÊUTICOS CONTRA O CAO

A quimioterapia padronizada, ou de primeira linha, para o CAO, constitui-se da combinação de um derivado de platina (carboplatina ou cisplatina) e um taxano, o paclitaxel (FIGURA 4), administrados em 6 ciclos com intervalos de 3 semanas (AEBI; CASTIGLIONE, 2008). Essas combinações apresentam eficácia comparável, porém, quando utilizado paclitaxel com carboplatina, tem-se observado melhor tolerabilidade e menores frequências de efeitos adversos, melhorando a qualidade de vida das pacientes (DU BOIS et al., 2003). Entretanto, nos dois casos há possibilidades das células tumorais adquirirem fenótipo de resistência cruzada para os fármacos (SHERMAN-BAUST et al., 2003).

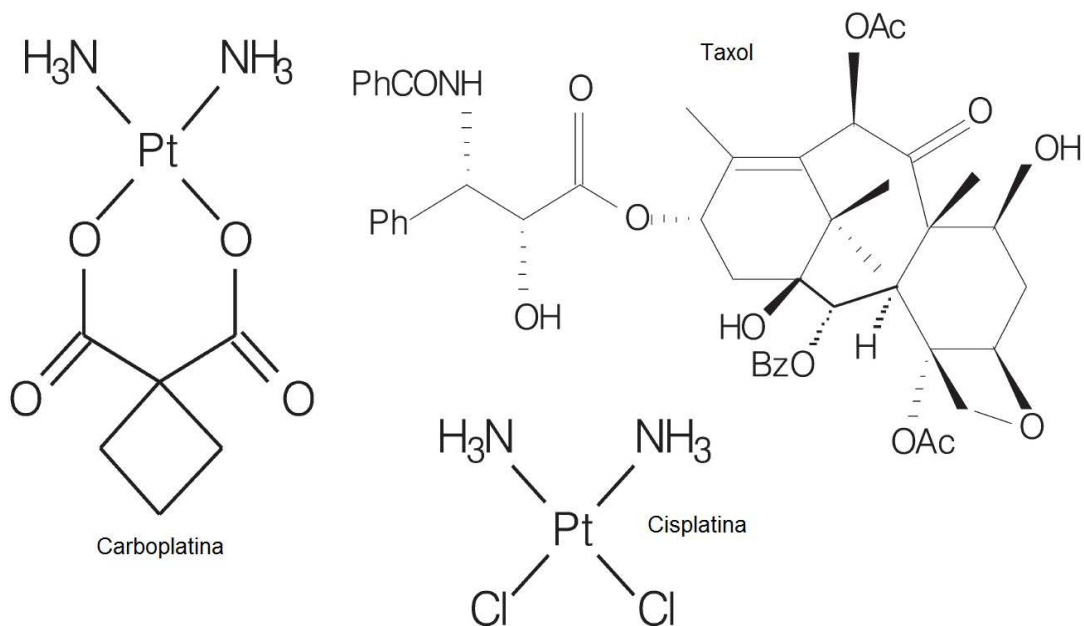


FIGURA 4 – Estrutura molecular das drogas de primeira linha utilizadas contra o CAOV, carboplatina, cisplatina e taxol (Adaptado de ALMEIDA et al., 2005).

Os casos tratados com terapia combinada com platina são divididos em dois grupos: refratários/resistentes à platina e sensíveis à platina. Os primeiros são caracterizados por não apresentarem resposta ao primeiro tratamento com platina ou por apresentarem progressão da doença em menos de 6 meses do fim do tratamento quimioterápico primário. Já os segundo grupo compreende aos casos que apresentam resposta, ainda que parcial, ao tratamento, e permanecem livres da doença por um intervalo de, no mínimo, 6 meses após o fim da quimioterapia (LIN; CHANGCHIEN, 2007).

Apenas 30% das pacientes tratadas com cirurgia e quimioterapia não apresentam recorrência da doença (OZOLS et al., 2003; PFISTERER et al., 2006). Além disso, estima-se que, dos casos diagnosticados em estágio avançado haja ainda possibilidades das pacientes serem resistentes à quimioterapia baseada em platina e taxanos (Mc GUIRE et al., 1996) ou mesmo desenvolverem resistência ao longo do tratamento (JAZAERI et al., 2005). Quando há desenvolvimento de resistência ao tratamento de primeira linha, a quimioterapia é feita com agentes de segunda ou terceira linhas, na tentativa de adiar a progressão tumoral aliviando os sintomas de modo a prolongar a sobrevida da paciente, mantendo a qualidade de vida. Em tumores relapsos, onde inicialmente eram sensíveis à platina, além do tratamento com

drogas de segunda e terceira linhas, é possível tentar regimes poli-terapêuticos baseados em platina e agentes citostáticos, de forma a alcançar maior eficácia e melhor resultado clínico (AEBI; CASTIGLIONE, 2008).

A doxorubicina lipossomal peguilada (DLP), antibiótico citostático que se intercala no DNA e diferente da formulação convencional, apresenta meia-vida plasmática longa, assim como taxa de resposta de aproximadamente 21% em pacientes refratárias à platina, porém a média de sobrevida das pacientes livre de progressão do CAOV foi de apenas 23 semanas, podendo chegar a menos de 4 semanas em alguns casos (KATSUMATA et al., 2008; GORUMLU et al., 2008). Essas características apresentadas possibilitam que pacientes com CAOV refratários/resistentes à platina denotam aplicabilidade imediata da DLP em pacientes com relapso de CAOV (LIN; CHANGCHIEN, 2007). O topotecan é outro quimioterápico que se apresenta com viabilidade em pacientes com CAOV pré-tratadas com regimes quimioterápicos convencionais (BODNAR et al., 2008).

Algumas alternativas para o tratamento do CAOV refratário/resistente à platina são o docetaxel, molécula similar ao paclitaxel, um inibidor da despolimerização dos microtúbulose, e a gemcitabina, um inibidor da síntese do DNA (BERKENBLIT et al., 2004; MUTCH et al., 2007). Ainda para o tratamento das pacientes com CAOV resistente/refratário, aos demais regimes terapêuticos já estabelecidos na clínica oncológica ovariana existe o bevacizumab, anticorpo monoclonal humanizado que bloqueia a secreção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) pelas células tumorais e o TLK286, um análogo da enzima glutatona S transferase isoforma P1-1 (AEBI; CASTIGLIONE, 2008; KAVANAGH et al., 2005).

A busca de novas combinações que permitam melhorar a resposta aos regimes quimioterapêuticos atuais devem ser constantes, assim como as pesquisas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, visto que o CAOV apresenta alta taxa de mortalidade, que reflete em baixas taxas de sobrevida. Assim, pesquisas que venham a esclarecer questões relacionadas ao CAOV quanto à terapia, à identificação de alvos terapêuticos, às bases moleculares

da tumorigênese, ao diagnóstico precoce e ao desenvolvimento da doença ovariana são de grande importância e devem ser incentivados.

2.1.4 TRATAMENTO CIRÚRGICO CONTRA O CAO V

Incontestavelmente, a cirurgia é um método pertinente ao estágio do CAO V (TABELA 1) que é estimado através da laparotomia explorativa, de acordo com os critérios estabelecidos pela *International Federation of Gynecology and Obstetrics* (FIGO), além disso, o estágio do tumor pode ser considerado como um dos aspectos terminantes na determinação da conduta terapêutica (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

O tratamento cirúrgico contra CAO V envolve histerectomia abdominal total, salpingo-ooforectomia bilateral, omentectomia e biópsias peritoneais. Através da cirurgia é possível determinar o estágio correto da doença, além de condicionar a extensão do tratamento cirúrgico. Nos tumores bem diferenciados de estádios Ia e Ib, a anexectomia bilateral e histerectomia são suficientes. Há ainda possibilidade de realização de cirurgias conservadoras em pacientes jovens, com a finalidade de manter a função endócrina e reprodutiva. A salpingo-ooforectomia unilateral também é considerada uma opção (LIMA; GIRÃO; CARVALHO, 1999).

<p>Estágio I - tumor limitado a um ou ambos os ovários</p>	<p>Ia - tumor limitado a um ovário; ausência de tumor na face externa da cápsula; cápsula intacta; ausência de células malignas no líquido ascítico ou lavadoperitoneal</p> <p>Ib - tumor em ambos os ovários com as mesmas características de Ia</p> <p>Ic - tumor em um ou ambos os ovários com extensão na face externa da cápsula e/ou cápsula rota e/ou células malignas no líquido ascítico ou no lavado peritoneal</p>
<p>Estágio II - tumor em um ou ambos os ovários e com extensão para estruturas pélvicas</p>	<p>Ila - extensão ao útero e/ou tuba uterina</p> <p>Ilb - extensão a outros tecidos pélvicos</p> <p>Ilc - tumor como nos estádios Ila ou Ilb, mas com extensão na superfície externa da cápsula e/ou cápsula rota e/ou células malignas no líquido ascítico ou no lavado peritoneal</p>

<p>Estágio III - tumor em um ou ambos os ovários, com extensão micro ou macroscópica para órgãos abdominais extrapélvicos</p>	<p>IIla - tumor clinicamente limitado à pelve verdadeira, com linfonodos retroperitoneais negativos mas com metástases microscópicas no peritônio</p> <p>IIlb - tumor em um ou ambos os ovários com implantes na superfície do peritônio, que não excedem 2 cm; linfonodos negativos</p> <p>IIlc - implantes peritoneais com mais de 2 cm de diâmetro e/ou linfonodos retroperitoneais ou inguinais positivos</p>
<p>Estágio IV - Tumor em um ou ambos os ovários e metástases distantes; efusão pleural com citologia positiva para malignidade. A metástase em parênquima do fígado iguala estágio IV</p>	

TABELA 1 – Estágios das Neoplasias Malignas de Ovário (Adaptado de TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

Nos casos onde os tumores apresentam-se nos estágios II, III e IV é recomendada a retirada de ambos os ovários e do útero e, posteriormente, deve ser realizada a citorredução, objetivando a excisão de todo o tumor e metástases (LIMA; GIRÃO; CARVALHO, 1999). A citorredução pode ser classificada de duas formas: ótima, quando o diâmetro tumoral residual é inferior a 2 cm, e subótima, quando é maior que 2 cm (CARVALHO, 2002). O volume tumoral residual é inversamente proporcional à obtenção de sucesso na terapia complementar, que pode ser radio ou quimioterapia, além de este ser considerado fator prognóstico de importância (LIMA; GIRÃO; CARVALHO, 1999).

Mesmo que suscetível à intervenção cirúrgica, inicialmente responsiva à quimioterapia e à radioterapia, o CAOv ainda é um definido como uma parábola terapêutica. A doença se apresenta sem sinais e sintomas específicos e com alta agressividade, comprometendo a sobrevida das pacientes. Embora haja grandes avanços no tratamento oncológico, fruto de inúmeras pesquisas, a sobrevida das pacientes acometidas pelo CAOv ainda se mantém em torno de 4 anos (PFISTERER et al., 2006), em parte devido ao diagnóstico tardio ou em estágio avançado. Quando o prognóstico da doença é ameaçador e associado às elevadas taxas de mortalidade. Menos de 20% dos casos são diagnosticados no estágio I, quando o tumor é, ainda, localizado e restrito ao ovário. A taxa de sobrevivência chega perto dos 5 anos, porém quando diagnosticado nos estágios III/IV, marcado por metástases disseminadas pelo

organismo da paciente, essa taxa cai bruscamente (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2008). Assim, é indispensável à continuidade das pesquisas científicas relacionadas ao CAOV, visto que os conhecimentos até então elaborados são de extrema significância, porém insuficientes para que seja estabelecida uma cura.

2.2 CICLODEXTRINA (CD)

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos provenientes da ação da ciclodextrina glicosiltransferase (CGTase), enzima extracelular com fraca atividade de hidrólise que atua sobre o amido e substâncias por meio da ciclização, reação de transglicosilação intramolecular, promovendo a união de unidades de glicopiranoses por ligações α -(1,4) produzindo diferentes CDs naturais. O número variável de moléculas de D-glicose (glicopiranoses) determina o tipo de ciclodextrina produzida (FIGURA 5). Com mínimo de seis unidades de glicose, as CDs mais conhecidas são a α -ciclodextrina, com seis unidades, a β -ciclodextrina, com sete unidades e a γ -ciclodextrina com oito unidades. As β -ciclodextrinas manifestam características relativamente peculiares de trocar água com o ambiente, pois agem de forma rápida e com extrema eficiência (BRETILLON, 1983; SZEJTLI, 1994; VEIGA, 1996; BIWER, 2002; SINGH, 2002; ARUNKUMAR ET AL; 2005; SENRA et al., 2010).

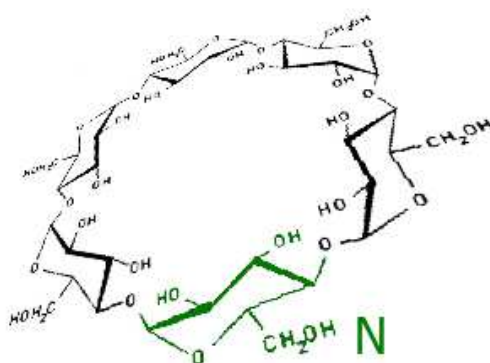


FIGURA 5 – Estrutura molecular padrão das ciclodextrinas; Em destaque (verde) a unidade de glicopiranosose (D-glicose), os derivados α , β e γ -CD são definidos por $n = 6, 7$ e 8 respectivamente (Adaptado de BRETILLON, 1983; WOUESSIDJEWÉ et al., 1996).

Esses oligossacarídeos foram descobertos no final do século XIX. As moléculas originadas da degradação do amido foram inicialmente isoladas por Villiers em 1891 e posteriormente classificadas como oligossacarídeos cíclicos, por Frank Schardinger, em 1904, que também descreveu alguns processos para sua obtenção, porém apenas em 1938 Freudeberg demonstrou que as ciclodextrinas eram formadas de acordo com fatores estereoquímicos por, no mínimo, seis unidades de glicopiranoses interligadas a assim classificadas como alfa, beta e gama ciclodextrinas (FIGURA 6). As CDs com mais de 8 unidades não apresentavam grande interesse (SCHARDINGER, 1911; DUCHÉNE, 1984; SZEJTLI, 1994; MIYAZAWA et al., 1995).

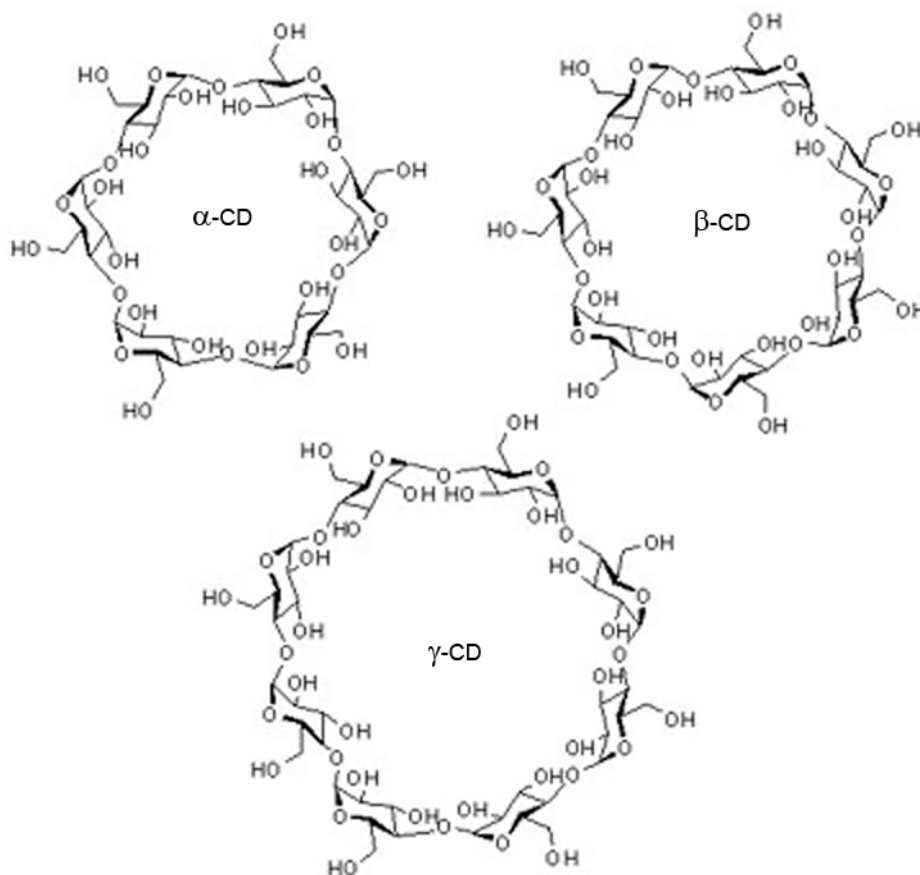


FIGURA 6 – Estrutura molecular das ciclodextrinas naturais, α -CD = alfa ciclodextrina; β -CD = beta ciclodextrina; γ -CD = gama ciclodextrina (Adaptado de BRETILLON, 1983; WOUESSIDJEWÉ et al., 1996; VIEIRA, 1999).

Moléculas de CDs naturais apresentam característica cristalina, higroscópica, homogênea com interior hidrofóbico e exterior hidrofílico, a estrutura é próxima

de um tronco cônico. O arranjo estrutural se deve à posição das ligações entre as hidroxilas secundárias realizadas entre C-2 e C-3 formando a base mais larga e as ligações das hidroxilas primárias em C-6 que originam a parte estreita. A presença de cavidade interna é uma das propriedades mais importantes dessas moléculas (FIGURA 7), esse alvéolo possui natureza relativamente apolar e pode ser usado para a formação de complexos de inclusão com uma gama de moléculas orgânicas e inorgânicas sem que haja o estabelecimento de ligações covalentes, quer no estado sólido ou líquido, atuando assim como moléculas hospedeiras (BENDER, 1978; VEIGA, 1996; SINGH, 2002).

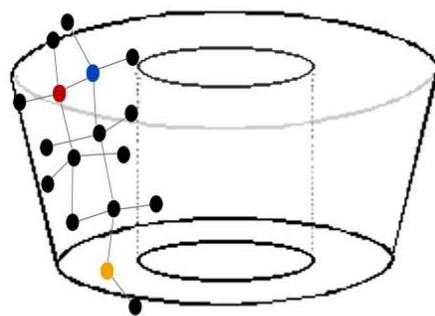


FIGURA 7 – Representação tridimensional da estrutura tronca cônica das ciclodextrinas com características definidas pelo arranjo das unidades de glicose apresenta parte externa hidrofílica e parte interna hidrofóbica (Adaptado de BRETILLON, 1983; WOUESSIDJEWÉ et al., 1996).

A obtenção de Ciclodextrinas naturais é realizada através do cultivo de microrganismos produtores de CGTase, entre eles temos a *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Thermoanaerobacterium*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus firmus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus lentus* e os mais usados que são *Bacillus macerans* e *Bacillus circulans*. Após a produção da enzima, esta será purificada e utilizada para degradar o amido em mistura de dextrinas, havendo a formação das ciclodextrinas que posteriormente serão separadas, purificadas e cristalizadas de acordo com suas diferentes propriedades físico-químicas, caracterizada pela variação de unidades de D-glicose (TABELA 2). Em geral, as CDs naturais são altamente solúveis em dimetilsulfóxido e pouco

solúveis em solventes como etanol, propanol e acetona (BRETILLON, 1983; SICARD, 1987; BIWER, 2002;).

TABELA 2 – Características das ciclodextrinas (CD) naturais

u.g	CD	MM	So 25°C (g/100ml ⁻¹)	DC (nm)	pK _a	Formato dos Cristais
6	A	972	14,50	0,47-0,52	12,332	Lâminas Hexagonais
7	B	1135	1,85	0,60-0,64	12,202	Paralelogramas Monoclínicos
8	γ	1297	23,30	0,75-0,83	12,081	Prismas Quadráticos

Propriedades físico-químicas de ciclodextrinas naturais. u.g = unidades de glicose; CD = ciclodextrina; So = solubilidade em água; DC = diâmetro da cavidade (Adaptado de BENDER, 1978; SZEJTLI, 1994; MIYAZAWA et al., 1995).

As CDs naturais são de grande serventia no desenvolvimento e investigação de formulações farmacêuticas, principalmente em sistemas de liberação controlada de drogas, possibilidade proveniente do complexo de inclusão (SENRA et al., 2010). Essas moléculas também são usadas na indústria de alimentos, cosméticos e na agricultura como estabilizadoras de substâncias voláteis e instáveis, solubilização de compostos insolúveis em água, mobilização de compostos tóxicos para proteção ambiental, entre outras utilidades. Todavia existem algumas limitações associadas, como a baixa solubilidade em solventes orgânicos, inadequações quanto ao transporte de fármacos (relacionadas ao tamanho da molécula e as interações químicas), toxicidade nas preparações parenterais (formulações mais complexas que exigem maiores cuidados quanto à composição e aplicação) ou mesmo a solubilidade em água (insuficiente à preparação) e as características superficiais. Com objetivo de suprir esses percalços, foram feitas alterações químicas como a introdução de substituintes nas hidroxilas disponíveis, obtendo-se vários tipos de derivados de maneira a expandir as propriedades físico-químicas e a capacidade de formação de complexos de inclusão

(UEKAMA, 1987; VEIGA, 1996; DEL VALLE, 2004; SZENTE, 2004; SZERMAN, 2006; LOFTSSON, 2007).

2.2.1 CICLODEXTRINAS DERIVADAS

As modificações nas CDs naturais podem ser realizadas através de síntese química ou seguindo a via enzimática, ocorrendo por meio de substituição regioselectiva, polimerização e reações de condensação, sendo possível inserir grupos metila, etila (alquílicos), carboximetila, hidroxietila, hidroxipropila e também sacarídeos. Entre os derivados de ciclodextrinas encontram-se as metilciclodextrinas (MeCD), hidroxipropilciclodextrina (HPCD) e as hidroxietilciclodextrinas (OHEtCD). Essas novas moléculas são classificadas em hidrofílicos, hidrofóbicos e ionizáveis (DUCHENE, 1984; UEKAMA, 1990; VEIGA, 1996; WOUESSIDJEW, 1996; MATSUDA, 1999). Na Figura 8 é possível observar os grupos mais propícios à modificações (SIKORSKI ET AL., 2003).

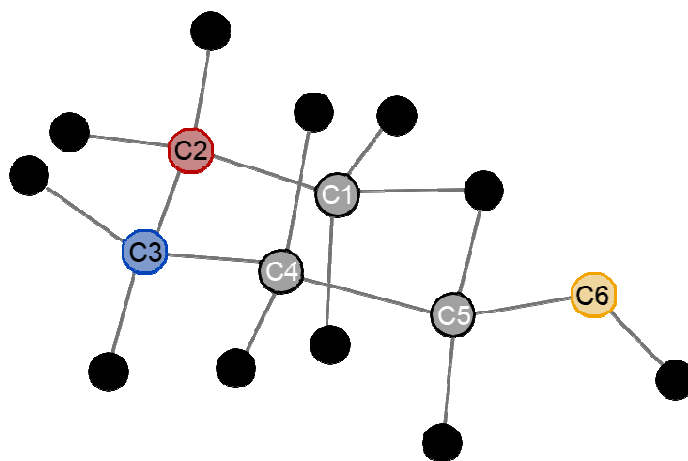


FIGURA 8 – Estrutura molecular de uma unidade de glicose com esquema de identificação dos pontos mais propícios para alterações nas CDs, vermelho C2 , azul C3 e amarelo C6 (Adaptado de BRETILLON, 1983).

Como descrito anteriormente, a produção de CDs derivadas veio da necessidade de aumentar as características físico-químicas das moléculas

naturais para que estas pudessem ser adaptadas a diferentes hóspedes ou meios. Assim foram formulados vários derivados das CDs naturais culminando numa gama de utilidades que facilitou a dispersão dessas moléculas em diferentes setores do mercado. No setor farmacêutico e alimentício é possível reduzir ou até mesmo eliminar o sabor amargo de qualquer substância dissolvida em solução aquosa ou na saliva através da formação de um complexo de inclusão do componente amargo com uma CD apropriada (SZEJTLI; SZENTE, 2005). Já no setor de cosméticos a complexação de moléculas com CDs é usada para diminuir a volatilidade de perfumes, como também converter ingredientes líquidos para a forma sólida. As ciclodextrinas ainda são utilizadas no setor têxtil para formar complexos com corantes usados no processo de tingimento (CIRELI; YURDAKUL, 2006; DEL VALLE, 2004).

As facilidades de adaptação dessas moléculas hospedeiras concomitante com a introdução dos derivados de CDs no mercado geraram uma queda nos preços, aumentando a disponibilidade, o que contribuiu para um crescimento no número de pesquisas neste campo. Assim, a aplicação das CDs tem sido alvo de inúmeros trabalhos em vista as melhorias surgidas nos métodos de produção, recuperação e purificação, além da grande gama de substratos para obtenção destes oligossacarídeos cíclicos (VEIGA, 1996; SZERMAN, 2006).

2.2.2 CICLODEXTRINAS METILADAS (CDM)

As CDs metiladas são comumente aplicadas devido ao aumento considerável de sua solubilidade (TABELA 3) relacionada ao grau de metilação da molécula, sendo relativamente alta quando comparadas com CDs naturais. Entre as β -CDMs, os principais oligossacarídeos são as dimetil- β -CD e trimetil- β -CD (DIMEB e TRIMEB), também referenciadas por heptakis-(2,6-di-O-metil) e heptakis-(2,3,6-tri-O-metil), respectivamente. A obtenção destes derivados de CDs ocorre através da metilação seletiva dos grupos hidroxila nos carbonos secundários 2 e nos carbonos primários 6, enquanto os carbonos 3, permanecem inalterados ou através de substituição total, trimetilciclodextrina (hidroxilas C-2, C-3, C-6) (DUCHÊNE, 1990; SZEJTLI, 1994; MIYAZAWA et al., 1995).

TABELA 3 – Propriedades físico-químicas de β -ciclodextrinas e seus derivados.

CD	MM	So 25°C (g/100ml ⁻¹)	PF (°C)
β -CD	1135	1,85	12,202
DiMe- β -CD	1331	57	295-300
TriMe- β -CD	1430	31	157

Comparação das propriedades físico-químicas da β -ciclodextrina e seus derivados CD = ciclodextrina; MM = massa molar; So = solubilidade em água; PF = ponto de fusão; DiMe = dimetil; TriMe = trimetil (Adaptado de DUCHÊNE, 1984; SZEJTLI, 1994; MIYAZAWA et al., 1995).

Os complexos formados com derivados de CDs como a DIME β apresentam estabilidade geralmente maior que a dos complexos formados com CDs naturais. Quanto ao derivado TRIME β ainda são necessários mais estudos (BERTOLINI, 1998; SENRA et al., 2010). Como citado anteriormente, observa-se com clareza na tabela acima que a solubilidade das moléculas derivadas é significativamente maior quando comparado a CD natural, porém as MeCD apresentam redução da hidrossolubilidade com aumento da temperatura (DUCHÊNE, 1984).

2.2.3 SISTEMA DE COMPLEXAÇÃO DAS CICLODEXTRINAS

No processo de complexação há preenchimento total ou parcial da cavidade interna da ciclodextrina por outra molécula qualquer (FIGURA 9). O interior da cavidade das CDs é relativamente apolar em relação a água, proporcionando às CDs a facilidade de formação dos complexos de inclusão com compostos orgânicos (RAJEWSKI; STELLA, 1996; VEIGA, 1996, LOFTSSON et al., 1999).

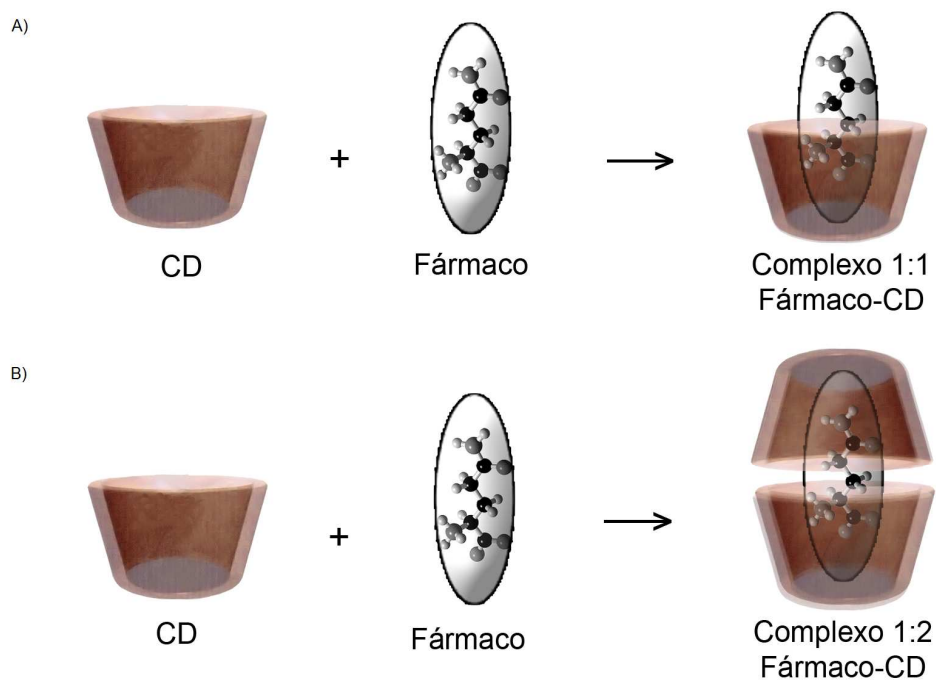


FIGURA 9 – Representação de esquema generalizado do processo de complexação, o fármaco é considerado como molécula hóspede; A) formação do complexo de inclusão fármaco:CD com estequeometria de 1:1; B) formação do complexo de inclusão fármaco:CD com estequeometria de 1:2 (Adaptado de RAJEWSKI; STELLA, 1996; VEIGA, 1996, LOFTSSON et al., 1999).

A condição estrutural das CDs possibilita a habilidade de formar complexos com compostos sólidos, líquidos e gasosos. Dentre os critérios para a complexação, deve ser avaliado essencialmente o tamanho da molécula a ser encapsulada, havendo compatibilidade com o tamanho da cavidade da ciclodextrina, a formação do complexo pode ser apropriada. Também há necessidade de avaliar as características químicas da molécula encapsulada, como a polaridade e a sua competição com os demais compostos presentes no meio. Os complexos de inclusão apresentam-se relativamente estáveis e facilmente separados das soluções em vista as suas características de cristalinidade (PSZCZOLA, 1988).

Com comportamento semelhante ao de enzimas as CDs exibem uma relação específica com o substrato “hospede” encapsulado, o que sugere formação de

ligações de hidrogenio, interaccoes de Van der Waals ou interações hidrofóbicas (FLASHL ET AL., 1984).

2.2.4 TOXICIDADE DAS CICLODEXTRINAS

Devido a naturalidades das CDs, suas características complexantes, a disponibilidade de matérias-primas de fácil acesso e barata, a simplicidade no processo enzimático de produção, a inexistência de subprodutos, o fato de ser biologicamente degradável e sua vasta utilidade, hoje já existe aprovação para o uso de algumas CDs e com o aumento progressivo no número de produtos (drogas, cosméticos e corantes, etc.) e processos químicos com CDs, são observadas cada vez mais exemplos convincentes do uso dessas moléculas (SZEJTLI, 1997; SZERMAN, 2006).

Em decorrência a grande aplicabilidade das CDs, houve necessidade de estudos acerca da sua toxicidade (TABELA 4), porém, inicialmente, o desenvolvimento do mercado das CDs teve que se confrontar com a falta de aprovação das autoridades, sobretudo na área farmacêutica, cosmética e alimentícia. Em consequência da intensa pesquisa realizada neste campo, houve êxito na produção de CDs e seus derivados em escala industrial e assim foram realizados ensaios confiáveis diminuindo as dúvidas em relação à toxicidade e possibilitando o aumento da aplicação dessas moléculas na área da biotecnologia (SZEJTLI,1994; LOFTSSON, 1998; YURDAKUL, 2006).

As CDs naturais e alguns de seus derivados são metabolizados pelas bactérias da flora intestinal, originando produtos de degradação semelhantes a do amido (água e dióxido de carbono). Assim como os derivados de amido, as CDs são hidrolisadas em meio ácido, em altas temperaturas. Cerca de 1% das β -ciclodextrinas podem ser hidrolisadas com HCl, quando submetidas a 60 °C durante 30 minutos (MAHMOUD ET AL., 1990). A velocidade de degradação é mais rápida no amido do que nas ciclodextrinas, onde a hidrolise das CDs ocorre de forma lenta através da enzima α -amilase. Em geral a introdução de substituintes nas hidroxilas das ciclodextrinas resulta em impedimentos

estéricos que impossibilitam a aproximação da enzima levando a uma diminuição da degradação (SZEJTLI, 1994; IRIE, UEKAMA, 1997).

TABELA 4 – Avaliação da toxicidade das CDs naturais em ratos.

CD	DL ₅₀ oral (mg/Kg)	DL ₅₀ iv (mg/Kg)	METABOLISMO
A	> 10000	500-750	Cólon
B	> 5000	450-790	Cólon, <i>cecum</i>
γ	> 8000	4000	TGI superior cólon

Dados referentes à toxicidade e o metabolismo das ciclodextrinas naturais (Adaptado de LOFTSSON, 1998).

Estudos de toxicidade indicam que a administração por via oral de β-CD em ratos a cães não apresentaram qualquer efeito adverso nos valores bioquímicos e hematológicos, quando esta é administrada em doses superiores a 600mg/Kg, como também não foi observado mutagenicidade e teratogenicidade administrando doses inferiores a 400mg/Kg (SZEJTLI, 1990). Quanto à administração intravenosa, as alterações bioquímicas observadas no sangue de ratos e coelhos foram dentro dos limites normais (YAMAMOTO et al. 1991).

2.3 TENSOATIVOS

No ramo biotecnológico são utilizados diferentes tipos de agentes tensoativos com diversos propósitos, como na purificação de produtos biológicos e na biocatálise em meio orgânico, uma das principais aplicações dos agentes tensoativos em biotecnologia é na solubilização de lipídios e de proteínas das membranas biológicas. A estrutura molecular dos compostos tensoativos (Anexo 1) e suas propriedades são de grande importância para a escolha adequada, devendo-se dar prioridade aos reagentes que não induzem alterações conformacionais nas proteínas que causem perdas das suas propriedades biológicas ou interfiram na atividade enzimática, devendo-se considerar a capacidade de degradação das proteínas, as possíveis interferências com os compostos solubilizados e a facilidade de remoção do

tensoativo. Esses fatores impossibilitam generalizar a escolha, porém os tensoativos não iônicos apresentam-se como menos desnaturantes para as proteínas solubilizadas quando comparado aos iônicos. (DANTAS et al., 2003, ELACHOURI et al., 2001; LUO et al., 1998).

Os tensoativos não iônicos, polietóxidos, formados por uma cadeia de polioxietileno (porção hidrofílica) são os mais usados nos ensaios bioquímicos, sendo a constituição química da porção hidrófoba, responsável por originar uma série de compostos com diferentes nomes comerciais, entre eles, temos o Triton X (p-t-octilfenol) e Tween (ésteres de sorbitol) (Anexo 2) (HELENIUS e SIMONS, 1975; LICHTENBERG *et al.*, 1983).

2.4 VIABILIDADE CELULAR (MTT)

A proliferação e sobrevivência de uma cultura celular podem ser avaliadas através de diferentes métodos. Dentre esses é possível citar o processo de contagem celular através do microscópio com inclusão ou exclusão das células mortas, métodos que medem a quantidade de proteína marcada, métodos radioativos e o MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Métodos radioativos que avaliam a quantidade de nucleotídeos radioativos incorporados ($[^3\text{H}]$ timidina) são utilizados para células em suspensão e podem ser parcialmente automatizados, permitindo a análise de um grande número de amostras, mesmo assim, o método não permite o processamento de centenas de amostras num mesmo dia (MOSMANN, 1983).

O MTT é uma metodologia onde se utiliza o sal de tetrazol para expressar de forma quantitativa a proliferação e sobrevivência das células. O método é capaz de identificar as células de mamíferos sem a necessidade de sinais de ativação (MOSMANN, 1983).

Após um período de incubação na presença do sal de tetrazol, a mitocôndria das células viáveis através das desidrogenases do citocromo b e c promovem, no meio intracelular, a conversão do sal amarelo de tetrazol em cristais de

coloração azul insolúveis (Azul de Formazan) (FIGURA 10). A solubilização deste produto é feita por meio de solvente adequado que, através do leitor de elisa, pode ser quantificado por espectrofotometria (HEO et al., 1990). Quanto maior a quantidade de Azul de Formazan formada, maior o número de células viáveis, ou seja, é feita uma análise diretamente proporcional. Uma das aplicações do MTT que tem mostrado bastante eficácia é a monitorização da sensibilidade de agentes quimioterápicos em cultura de células tumorais (FERRARI et al., 1990).

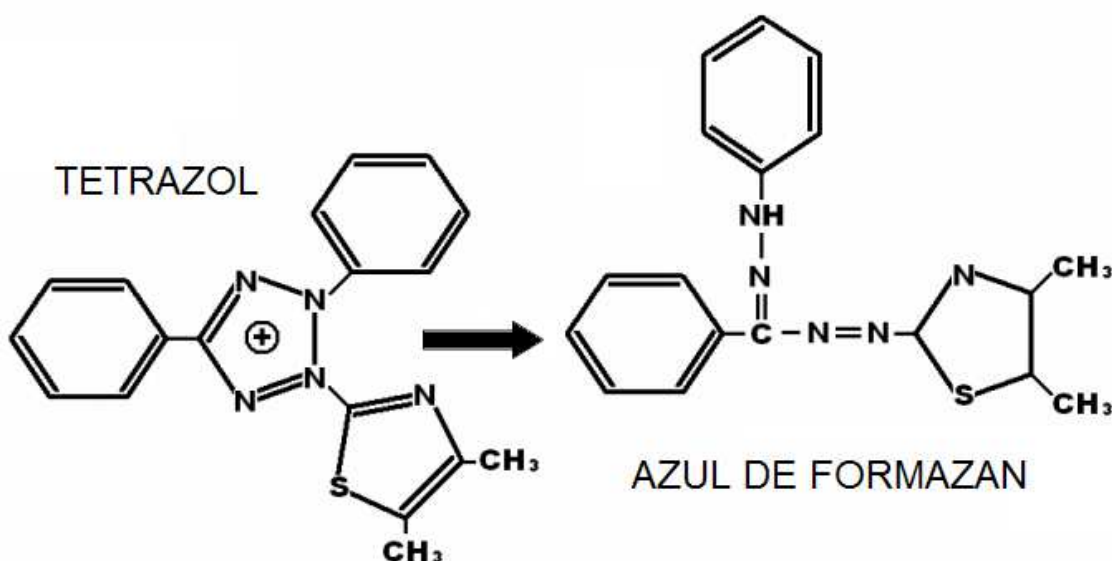


FIGURA 10 – Conversão mitocondrial do MTT. De Tetrazol a Azul de Formazan (Adaptado de HEO et al.,1990).

O método do MTT fornece resultados rápidos para um grande número de amostras, pode ser aplicado a diferentes tipos de linhagens celulares e não utiliza material radioativo, entretanto, o método só é capaz de agir em células aderidas, o que impossibilita a aplicação para células não aderentes, assim, a diminuição da aderência de algumas linhagens na cultura celular pode prejudicar a leitura das amostras (HEO et al., 1990).

Desde seu surgimento, diferentes autores fizeram várias modificações na metodologia do MTT. As adaptações estão relacionadas ao tempo de incubação, meio de incubação e comprimento de onda usado na leitura das microplacas. Porém, dentre as modificações, as com maior significância estão na etapa final do processo, onde ocorre a solubilização dos cristais de

formazan, ou seja, na escolha do solvente (MOSMANN & FONG, 1989). Tais modificações direcionam a substituição do solvente original, determinado por Mosmann como isopropanol HCl, por acetona com 0,5% de ácido tricloroacético (MAEHARA et al., 1986), por 10% de SDS a 0,01N (TADA et al., 1986), por dimetilsulfóxido (ALLEY et al., 1986) e por propanol e etanol puros (DENIZOT E LANG, 1986).

2.5 BRADFORD

Todos os métodos para determinação de proteínas apresentam limitações, assim a escolha baseia-se na natureza dos componentes da amostra, no tempo da reação, na precisão desejada e na sensibilidade da análise (BRADFORD, 1976). Em vista destas características, optou-se nesta pesquisa por realizar o método de Bradford para determinação da curva padrão de proteínas, este se apresenta de forma mais simples e mais sensível do que o de Lowry, o qual mesmo sendo mais utilizado, possui muitos interferentes, como a menor estabilidade no desenvolvimento da cor para a precipitação de proteínas com ácidos (PETERSON; 1979).

Bradford é utilizado na determinação do conteúdo de proteínas totais que se ligam ao corante Comassie Brilliant Blue G- 250 de modo proporcional à concentração. O corante utilizado existe em duas formas coloridas diferentes, a vermelha e a azul. A forma vermelha é convertida na forma azul após a ligação corante-proteína. No caso da forma azul, quanto maior o número de ligantes corante-proteína, maior a intensidade da cor. A estabilidade da coloração se estende por até uma hora e o método tem sensibilidade para detectar até 5µg/mL de proteína (BRADFORD, 1976; WILSON & WALKER, 1995).

A ligação corante-proteína ocorre entre o Coomassie BG-250 e os grupos funcionais básicos ou aromáticos das proteínas, que devem ter no mínimo de 8-9 ligações peptídicas, ou seja, possuir estrutura macromolecular. A ligação ocorre em dois minutos e dura aproximadamente duas horas (BRADFORD, 1976). A interação com a proteína de alto peso molecular desloca o equilíbrio do corante para a forma aniônica, que é fortemente absorvida em 595 nm (ZAIA et al, 1998).

Numa comparação entre os métodos, verificou-se que o método de Lowry indica menos proteínas e que a parte linear da curva compreendia a uma faixa mais estreita de concentrações, havendo um espalhamento maior dos pontos, dificultando o estabelecimento de uma curva padrão (BRADFORD, 1976).

2.6 CULTURA DE CÉLULAS

A técnica de cultura de células foi desenvolvida inicialmente por Ross Granville Harrison e desde então, vários experimentos vêm sendo realizados a partir de culturas de células, o que possibilita a investigação de interações específicas a nível celular, onde é possível realizar múltiplos experimentos sob as mesmas condições, além de diminuir o uso de animais (PIZZOFERRATO et al., 1994; PERES; CURI, 2005).

Nas condições apropriadas, tanto as células de origem animal, como as de origem vegetal, podem se desenvolver e expressar diversas propriedades. A observação de suas características morfológicas e bioquímicas pode ser realizada através do microscópio, possibilitando estudar a influência de substâncias específicas sobre a célula, interações, morte celular à proliferação por indução, de modo a contribuir para o desenvolvimento de terapias e descobertas que possam impulsionar a ciência durante sua constante evolução (BRUCE et al., 2002).

Originalmente, a cultura de células foi realizada através de fragmentos de fibras nervosas, ou cultura de explantes. Hoje, a cultura de células é viabilizada através de suspensões de células dissociadas dos tecidos, onde o sistema de cultura *in vitro* possibilita o estudo de cultura de órgãos, tecidos e células (BRUCE et al, 2002).

As culturas de células originadas de tecidos embriológicos se desenvolvem com maior facilidade quando comparadas às provenientes de tecido adulto. A obtenção dessas células pode ser feita através da desagregação enzimática, ou mecânica, de um pedaço de tecido ou pela migração espontânea de um explante. As células originadas da cultura *in vitro* mantêm suas características e funções originais, o que possibilita a realização de estudos que não seriam possíveis no tecido intacto. (BRUCE et al., 2002; PIZZOFERRATO et al., 1994).

O modo como deverá ser realizado a cultura de células está diretamente relacionada ao tipo de célula a ser cultivado. São necessárias condições específicas para que cada tipo de célula se multiplique. Deve ser claro que as condições do ambiente de cultivo e o meio de cultura afetam o crescimento celular, bem como a adesão ao substrato, a natureza do substrato, a metodologia utilizada durante o repique, entre outros fatores (RIZZO et al., 1993). Cabe ressaltar que o cultivo de uma linhagem celular requer cuidados específicos para que haja diminuição do risco de contaminação, de forma que esse não venha ocorrer e resultar em perda de tempo, reagentes e material biológico (PERES; CURI, 2005).

O meio de cultura para o cultivo de células é constitutivamente rico em nutrientes, o que aumenta a possibilidade de contaminação por microorganismos, assim é necessário que o trabalho seja realizado em ambiente estéril, de tal modo que a conduta durante os experimentos deva respeitar essas condições de forma a proporcionar a manutenção devida do estado estéril do ambiente. Assim, o local de trabalho (fluxo laminar), os objetos e equipamentos a serem utilizados devem estar sempre limpos e organizados (PERES; CURI, 2005).

Entre as condições essenciais para cultura de linhagens celulares tem-se a estufa de CO₂ como equipamento imprescindível, visto que proporciona a manutenção da temperatura, umidade, quantidade de gás carbônico e oxigênio, em níveis adequados, para a proliferação celular. Grande parte dos tipos celulares se desenvolve em temperatura de 37°C e umidade relativa > que 95%. Quanto ao CO₂, este é responsável pela manutenção da estabilidade do pH e apresenta-se numa concentração de 5% no interior do aparelho. Além da estufa, outro fator limitador do crescimento celular é caracterização de um meio de cultura adequado (FRESHNEY, 1994).

O meio de cultura deve dispor de nutrientes essenciais para o desenvolvimento celular, assemelhando-se, da melhor forma possível, ao ambiente *in vivo*. Assim, é indispensável que este forneça o material necessário para síntese das novas células, seja o substrato para o metabolismo energético, as vitaminas e ou minerais que apresentam função catalítica e ou fisiológicas. A solução salina composta pelos cátions cálcio, potássio e sódio deverá compreender às condições fundamentais ao crescimento celular, mantendo a osmolaridade e o pH adequados (EAGLE, 1995; FRESHNEY, 1994).

Tratando-se de cultura de células de mamíferos, essa requer, além dos sais, soro ou fluido corporal complexo para proliferação celular. Poucas células são capazes de crescer em ausência de soro e mesmo estas se desenvolvem melhor em sua presença. Na maioria dos casos, o meio de cultura é suplementado com soro fetal bovino (SFB). Vários estudos sugerem que as macromoléculas do soro sejam responsáveis pela ascensão do conteúdo celular (BATES; LEVENE, 1970). O soro de origem animal deve ser inativado a 55°C por, no máximo, uma hora com a finalidade de inativar o complemento e alguns vírus contaminantes (FRESHNEY, 1994). Além do teor nutritivo, as frações séricas de elevado peso molecular presente no soro podem implicar na adesão e achatamento das células ao substrato, porém a composição indefinida do soro também pode acarretar em uma ineficiente produtividade decorrente da variação do crescimento celular, assim, estão sendo realizados estudos para a substituição do soro derivado de animais por solução de

composição definidas para proporcionar uma padronização mais adequada aos experimentos (BUTLER, M. , 2005).

Durante o processo de cultura celular devem-se observar as características morfológicas das células, fazendo comparações nos diferentes estágios de crescimento, pois alterações no substrato e na constituição do meio de cultura podem resultar em modificações morfológicas contribuindo para resultados irregulares (GOULET et al., 1996).

A classificação das linhagens celulares é feita em dois tipos: linhagens aderentes e em suspensão ou não aderentes. A maior parte das linhagens estudadas é composta pelo tipo aderente que dependem da fixação à base dos frascos ou placas de cultura para proliferarem, ao contrário da linhagem em suspensão, que não depende de ancoragem (CARNEY et al., 1981). As culturas aderentes, ou em suspensão, são ainda classificadas em primárias ou permanentes. As culturas primárias possuem tempo limitado de vida e são provenientes do isolamento recente de tecidos, enquanto as linhagens permanentes são oriundas de células tumorais e possuem capacidade de crescimento contínuo e ilimitado (PEREIRA-SMITH; SMITH, 1988).

A manutenção de células aderentes (FIGURA 11) é feita substituindo periodicamente o meio a cada 48 horas, o que possibilita a eliminação dos metabólitos secretados e a nutrição adequada das células. Quando o crescimento celular chega próximo à capacidade total do recipiente em torno de 90%, ou seja, em estado de confluência, é realizada a repicagem da cultura descolando as células da superfície do frasco de cultura por meio da solução de tripsina. No caso das células em suspensão, adiciona-se meio sempre que estas se apresentam em alta densidade, o cálculo da densidade celular é necessário para obter a quantidade de meio que deverá ser adicionada (PERES; CURI, 2005).

A partir do momento em que a cultura entra em estado de confluência as células começam a soltar da superfície do frasco e é preciso repicá-las, para realização deste processo pode-se usar enzimas proteolíticas, agentes

quelantes ou técnicas de raspagem. A tripsina é uma das enzimas mais utilizadas para a repicagem de culturas, ela catalisa a hidrólise de ligações peptídicas entre o grupo carboxila da arginina ou lisina e o grupo amina de outro aminoácido, degradando a matriz protéica responsável pela união das células do tecido, o que ocasiona a liberação das células na suspensão antes que sejam gravemente danificadas. Antes da tripsinização do tecido, esse deverá ser lavado previamente com solução tampão ou meio de cultura sem soro. O tempo de ação da tripsina varia de acordo com o tipo de célula e a maior ou menor capacidade de adesão (FRESHNEY, 1994).

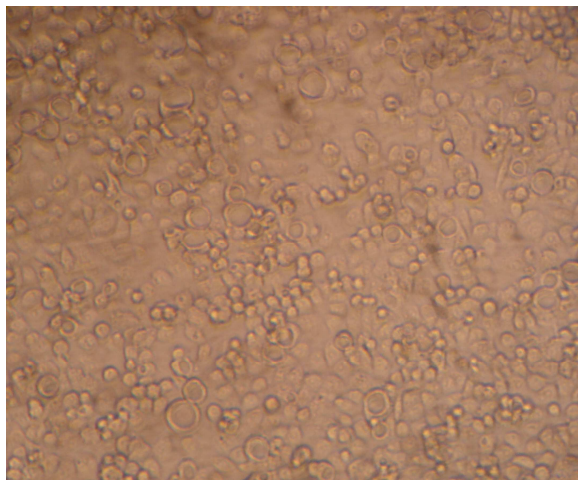


FIGURA 11 – Cultura de células aderentes, linhagem OVCAR 3.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CULTURA DE CÉLULAS

3.1.1 LINHAGENS CELULARES

Neste estudo foram utilizadas duas linhagens celulares de câncer, A2780 e OVCAR3, essas células apresentam morfologia epitelial e crescem de forma aderente em cultura. Analisando a histologia, as duas linhagens OVCAR 3 (adenocarcinoma) e A2780 são provenientes de carcinoma de ovário humano.

3.1.2 DESCONGELAMENTO

As linhagens celulares encontravam-se divididas em alíquotas de aproximadamente 1,5 ml, armazenadas em freezer a temperatura de -80°C. O descongelamento foi realizado de forma brusca a 37°C e o conteúdo transferido do micro tubo para um tubo Falcon de 50 ml estéril livre de DNase e RNase, posteriormente adicionou-se 10ml de meio RPMI-1640 (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA) acrescido de soro fetal bovino a 10% v/v (SFB, Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA), solução estabilizada de Penicilina-Streptomicina em concentração de 10000 unidades de Penicilina e 10 mg de Streptomicina por ml (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) e Fungizone – Anfotericina B a 250 µ/ml (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA). Logo após, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 1162g e *break zero* a 27°C havendo a formação de um pellet no fundo do tubo, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 15ml de meio RPMI suplementado de SFB, antifúngico e antibiótico, em seguida, as células foram transferidas para uma garrafa de poliestireno (TPP) de 75 cm² com tampa de rosca e encubada na estufa com 5% de CO₂.

3.1.3 MANUTENÇÃO

As linhagens celulares empregadas no estudo (OVCAR3 e A2780) foram mantidas em garrafas TPP de 75 cm² com tampa de rosca num volume final de 15ml em meio RPMI-1640 (Gibco/Invitrogen, Nova York, EUA) suplementado de SFB a 10% previamente inativado a 56°C por 1 hora, solução estabilizada de Penicilina-Streptomicina em concentração de 10000 unidades de Penicilina e 10 mg de Streptomicina por ml e Fungizone – Anfotericina B a 250 µ/ml. A manutenção das linhagens foi realizada em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ até que fosse alcançada a subconfluência. Diariamente, as garrafas eram analisadas em microscópio óptico de luz invertida para avaliação do meio e das células em cultivo quanto à taxa de crescimento e a confluência.

As células eram repicadas de duas a três vezes por semana, em fluxo laminar previamente limpo com álcool 70% e iluminado por luz UV por 30 minutos, o conteúdo da garrafa era desprezado sempre que observado o meio RPMI-1640 com aspecto amarelado. A alteração do aspecto é decorrente da acidificação, que pode ser identificada pela alteração da cor do indicador vermelho de fenol presente na composição do meio. Quando realizado o descarte do meio, as células aderidas em monocamada no fundo da garrafa (TPP) eram lavadas com solução de “phosphate buffered saline” 1X (PBS 1X), sendo esse procedimento realizado em triplicata. Ulteriormente era adicionado novo meio (suplementado) e as garrafas novamente incubadas na estufa com atmosfera úmida de 5% de CO₂. Portanto, as garrafas eram vistoriadas durante toda a semana e caso necessário, observando-se as condições do meio eram submetidas à lavagem (frequência média de três vezes na semana) e reposição do meio de cultura.

3.1.4 CRIOPRESERVAÇÃO

Nos casos em que se desejava realizar criopreservação, as garrafas (TPP) de cultivo contendo as linhagens celulares subconfluentes quando lavadas com solução PBS 1X por três vezes posteriormente era adicionado 3-5 ml de solução de tripsina às células aderidas, em seguida, agitava-se fortemente para promover o desprendimento das células do fundo da garrafa, quando

desligadas, acrescentava-se 3ml de meio RPMI para bloquear a ação da tripsina e a solução era transferida para um tubo Falcon de 50ml estéril, livre de DNase e RNase. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1162g, com *break* zero a 27°C, descartando o sobrenadante mantendo o pellet no fundo do tubo e adicionava-se 3 ml da solução de criopreservação (SFB com 10% de glicerol), por fim, a solução era homogeneizada com a pipeta e transferida para 3 microtubos de 1,5ml. As alíquotas nos microtubos foram mantidas durante 30 minutos a 0°C e duas horas a -20°C e, por último, armazenadas a -80°C.

3.1.5 PLAQUEAMENTO

Para o plaqueamento, foram adicionadas as garrafas com células aderidas sem meio, de 3-5 ml de solução de tripsina, e promovido forte agitação manual para total desprendimento das células. Logo após, acrescentou-se 10 ml de meio RPMI, a solução foi homogeneizada e retirada uma alíquota de 20 µl para preparação duma suspensão nas proporções de 1:5 com solução de Turk (traços de cristal violeta em ácido acético a 1%).

Para realização da contagem do número de células primeiramente obteve-se uma suspensão celular devidamente homogeneizada, da qual foi retirada uma alíquota para aplicar na câmara de contagem (hemacitômetro). Para avaliação da taxa de inviabilidade de cada cultura, é feita uma contagem com a alíquota da suspensão celular diluída em solução de azul de tripano em PBS-A. O azul de tripano é considerado um corante de exclusão, pois adentra apenas as células inviáveis, que possuem barreira celular permeável devido a alguma desintegração. Após a entrada na célula o corante atravessa o invólucro nuclear se concentrando nos núcleos, que ficam corados de azul.

Utilizando-se da câmara de Neubauer foi realizada a contagem do número de células. Encostando a ponta da pipeta na borda da lamínula preencheu-se cuidadosamente a câmara com a suspensão anteriormente preparada, esperando um tempo de aproximadamente 2 minutos para as células

sedimentarem e, ulterior, levou-se a câmara ao microscópio óptico (...), a área demarcada foi focalizada com objetiva de menor aumento (4x), e contaram-se as células nas quatro áreas de um lado da câmara. O cálculo do número total de células foi realizado através das fórmulas abaixo:

1º Equação:

$$\text{N}^\circ \text{ de células/ml} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de células}}{4 (\text{N}^\circ \text{ de quadrantes contados})} \times 10^5 \text{ (Fator de diluição)}$$

2º Equação:

$$\text{Volume final} = \text{Volume inicial} \times \frac{10^7 (\text{Concentração desejada/ml})}{\text{N}^\circ \text{ de células /ml da suspensão inicial}}$$

O valor obtido da primeira equação, que se refere ao número de células por ml é empregado a uma segunda equação com intuito de ajustar a concentração de células desejadas (10^5 células) em cada um dos 96 poços da placa de cultura. Assim, acrescenta-se o volume calculado e o volume de RPMI necessário. As duas linhagens celulares foram cultivadas até a subconfluência em garrafas (TPP) com tampa de rosca para realização dos tratamentos

3.1.6 TRATAMENTO

Para o tratamento das linhagens foram utilizadas placas (TPP) de 96 poços. As placas foram divididas em duas classes (placa O3 e placa A2). Na placa O3 foram tratadas as células da linhagem OVCAR 3, dessa classe originaram duas subclasses (placa O3-CTX e placa O3-STW), O mesmo procedimento foi realizado para placa A2 onde foram tratadas as células da linhagem A2780, originando duas subclasses (placa A2-CTX e placa A2-STW). Nas placas CTX foram empregados os reagentes metil- β -ciclodextrina (CDM) e triton x-100 (TX100). Todos os reagentes foram aplicados na forma de solução em oito diferentes concentrações [0,4%], [0,2%], [0,1%], [0,05%], [0,025%], [0,012%], [0,006%], [0,003%]. Os testes para cada concentração foram realizados em quintuplicata (TABELA 5).

Concentração	CDM					NT	TX100					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
[0,4000%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Ab NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	PBS 1X
[0,2000%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Ab NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	PBS 1X
[0,1000%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Ab NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	PBS 1X
[0,0500%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Ab NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	PBS 1X
[0,0250%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Ab NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	BRA
[0,0125%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Ab NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	BRA
[0,0062%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	BRA
[0,0031%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	BRA

TABELA 5 – Exemplificação da placa CTX. O modelo foi utilizado para as duas linhagens (OVCA 3 e A2780) dando origem a duas placas (O3CTX e A2CTX). Legenda: Abs (Absorbância); NT (Não Tratadas); PBS1X; BRA (Branco).

Nas placas STW foram empregados dodecil sulfato de sódio (SDS) e tween 20 (TW20). Todos os reagentes foram aplicados na forma de solução em oito diferentes concentrações [0,4%], [0,2%], [0,1%], [0,05%], [0,025%], [0,0125%], [0,00625%], [0,003125%]. Os testes referentes a cada concentração foram realizados em quintuplicata (TABELA 6).

Com exceção da β -ciclodextrina metilada (Me β CD), um oligossacarídeo cíclico, as demais substâncias utilizadas no tratamento (SDS, TX100, TW20) são conhecidas como tensoativos agentes muito utilizados na área de biotecnologia. Todas as placas do tratamento foram feitas em triplicata.

Concentração	SDS					NT	TW20					
	1	2	3	4	5		1	2	3	4	5	
[0,4000%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	PBS 1X
[0,2000%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	PBS 1X
[0,1000%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	PBS 1X
[0,0500%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	PBS 1X
[0,0250%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	BRA
[0,0125%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	BRA
[0,0062%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	BRA
[0,0031%]	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	Abs NT	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs 4	Abs 5	BRA

TABELA 6 – Exemplificação da placa STW. O modelo foi utilizado para as duas linhagens (OVCA3 e A2780) dando origem a duas placas (O3STW e A2STW). Legenda: Abs (Absorbância); NT (Não Tratadas); PBS1X; BRA (Branco).

3.2 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

3.2.1 CITOTOXICIDADE

O Potencial efeito citotóxico das substâncias utilizadas no tratamento foi avaliado através de teste colorimétrico utilizando o sal de tetrazol (3-(4,5-Dimetiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol brometo), descrito por Mosmann (1983). Avaliou-se a citotoxicidade através da capacidade das células metabolicamente ativas de reduzirem o sal de tetrazol (MTT) em cristais de formazan, de coloração púrpura que pôde ser analisado através de espectrofotometria.

3.2.2 MTT

Para que não houvesse comprometimento do material, a solução de MTT foi preparada em ambiente escuro. O sal que apresenta coloração amarelada e grânulos finos foi pesado em balança eletrônica devidamente calibrada dentro de um Falcon de 50 ml envolto com papel alumínio impedindo qualquer contato

com a luz, visto que é um elemento químico fotossensível. Para obtenção da solução de MTT em concentração de 5 mg/ml, o sal de tetrazol (Invitrogen) foi dissolvido em água destilada filtrada através de filtro Mili Q.

Depois de feita a solução, parte foi direcionada diretamente à utilização e o restante armazenado a -20°C fracionado em microtubos (envoltos em papel alumínio) em alíquotas de 2ml e guardados num período máximo de 2 semanas.

Para realização do teste de MTT, primeiramente preparou-se as placas (TPP) de 96 poços com as células deixando crescer por dois dias, depois foi adicionado a cada um dos poços, com as células previamente tratadas, 15 µl da solução de MTT 5 mg/ml e deixado em repouso durante um período de 4 horas dentro da estufa com atmosfera úmida de 5% de CO₂, a 37°C, concluído o tempo, adicionou-se 70 µl de solução de duodecil sulfato de sódio 10% (SDS 10%) por poço, deixando a placa em repouso durante 12 horas, de modo a provocar a solubilização do cristal de formazan, posteriormente foi realizada a leitura no leitor de ELISA.

3.2.3 CITOTOXICIDADE CELULAR DAS LINHAGENS

No ensaio de citotoxicidade foram utilizadas aproximadamente 10⁵ células/poço de cada linhagem, em placas (TPP) de 96 poços, incubadas com as substâncias durante 30 minutos, a 37°C. Decorrido este tempo, 15 µl da solução de MTT (5 mg/ml) foram acrescentados às culturas tratadas, e estas incubadas durante 4 horas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂. Após este período, foram adicionados 70 µl de SDS 10%, e o experimento mantido por 12 horas, a 37°C. A densidade óptica (DO) de cada poço foi obtida a 630 nm no espectrofotômetro, possibilitando a determinação do potencial citotóxico de cada substância testada em relação ao controle não tratado. Os ensaios foram realizados em quintuplicata e cada experimento repetido três vezes.

3.3 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS POR QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA

3.3.1 QUANTIFICAÇÃO PROTÉICA

A quantificação de proteínas totais foi realizada através do método de Bradford onde ocorre a ligação entre as proteínas da amostra e o corante Comassie Brilliant Blue G- 250 formando uma reação colorimétrica na qual a intensidade da cor é proporcional à concentração de proteínas na amostra, onde posteriormente essa relação é medida por espectrofotometria de absorção.

3.3.2 REAGENTE DE BRADFORD

Inicialmente foi dissolvido 10 mg do corante Comassie blue G-250 em 50 mL de etanol 95% e, posteriormente, adicionado 100 mL de ácido fosfórico 85%. A solução final foi diluída com água qsp 1L. Assim as concentrações finais são de 0,01% de Comassie, 8,5% de ácido fosfórico e 4,7% de etanol. Por fim, a solução foi colocada no agitador automático por 12 horas (overnight), em seguida, armazenada em frasco âmbar à temperatura de 20°C e etiquetada.

Para obtenção da curva padrão de proteínas foi utilizada uma solução de soro albumina bovina (BSA 1mg/mL) em água (TABELA). Com intuito de minimizar os erros de pipetagem, foram preparadas soluções de 20, 40, 60, 80 e 100µg de BSA/0,1mL, retirada uma alíquota de 0,1mL de cada uma e adicionado 5,0 mL do reagente Comassie Blue.

3.3.3 NORMALIZAÇÃO DOS DADOS

Depois de realizado o teste de viabilidade celular (MTT) e feito a leitura no espectrofotômetro, foram gerados dados referentes a cada poço. Como uma avaliação manual do crescimento celular de cada amostra se torna inviável devido às condições necessárias à realização do experimento, foi proposto que, através da quantidade de proteínas produzidas por poço, fosse correlacionado proporcionalmente ao número de células, visto que cada célula proveniente de uma mesma linhagem, em iguais condições, produziria a mesma quantidade de proteína.

A variação dos valores da leitura em amostras com condições idênticas podem ser provenientes da variação do número de células em cada poço e a quantificação de proteínas totais pode minimizar este desvio. Deste modo é gerada uma variável que pode ser adotada para normalizar os dados de viabilidade celular obtidos em uma mesma faixa de concentração do tratamento. Esta variável é adotada para normalização dos dados de modo a conferir maior confiabilidade em nossos resultados.

3.4 ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORÇÃO

Em um aparelho espectrofotômetro foram inseridas as placas de 96 poços, contendo as amostras anteriormente tratadas (MTT, BRADFORD), e realizada a leitura na faixa de absorção de 630nm .

Para construção da curva padrão, utilizou-se de soluções com concentrações pré-determinadas e reações colorimétricas específicas e, através do espectrofotômetro, foi feita a leitura da absorbância. A curva foi utilizada como padrão de comparação na determinação da concentração de proteínas totais (Bradford) das amostras nas linhagens celulares tratadas com a finalidade de normalizar os dados obtidos no teste de viabilidade celular (MTT).

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O programa utilizado para os cálculos das estatísticas foi o GraphPad Prim 5 para Windows (versão 5.00.288), t-Student e ANOVA.

RESULTADOS

4.1 LINHAGEM A2780

A metil- β -ciclodextrina e os tensoativos SDS, TX100 E TW20 induziram uma redução da atividade mitocondrial dose-dependente em cultura de células de câncer de ovário da linhagem A2780 (Figura 12 à figura 15). Sendo SDS a substância com maior potencial citotóxico, onde na menor das concentrações testadas (0,003125%) resultou em viabilidade celular próxima a 50%. Em seguida a solução de TX100 que também apresenta alto potencial citotóxico com baixa viabilidade celular perante as concentrações testadas e TW20 com viabilidade celular menor que 50% em presença da solução a 0,4%. A metil- β -ciclodextrina demonstrou indução gradativa da redução da atividade mitocondrial na linhagem A2780 para duas das oito concentrações testadas (0,2% e 0,4%) com viabilidade celular próxima a 60%.

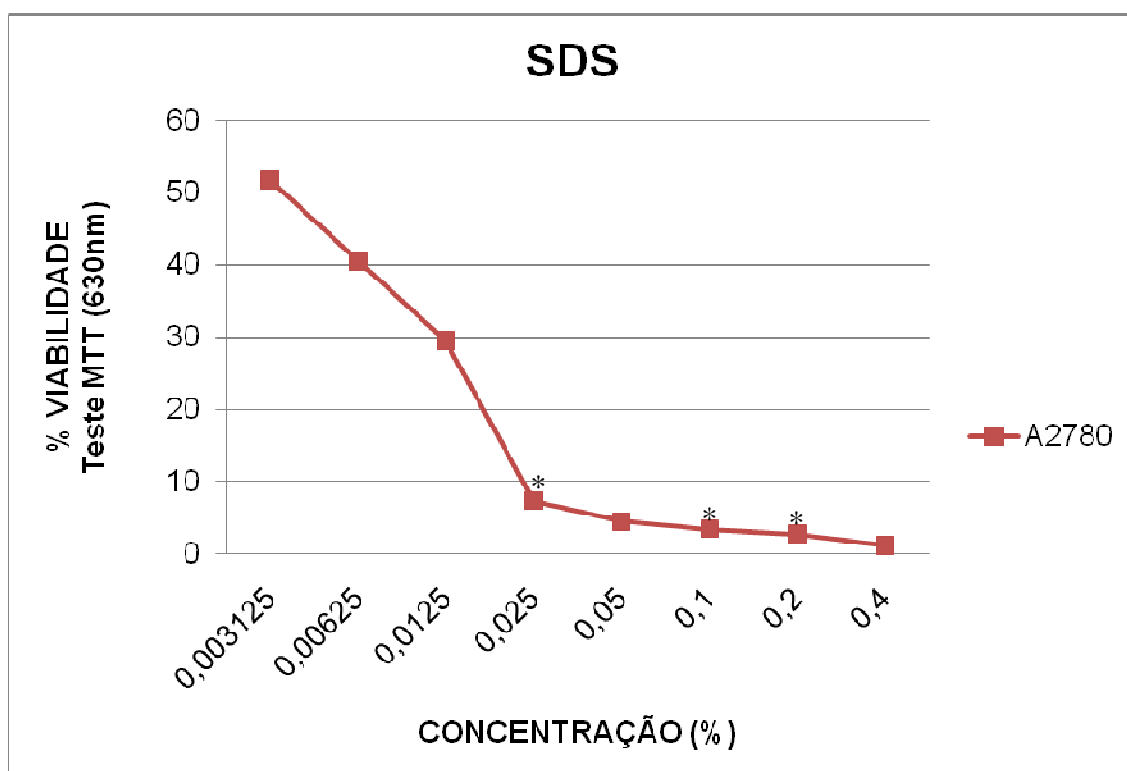


FIGURA 12 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem A2780 tratadas com solução de SDS (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.

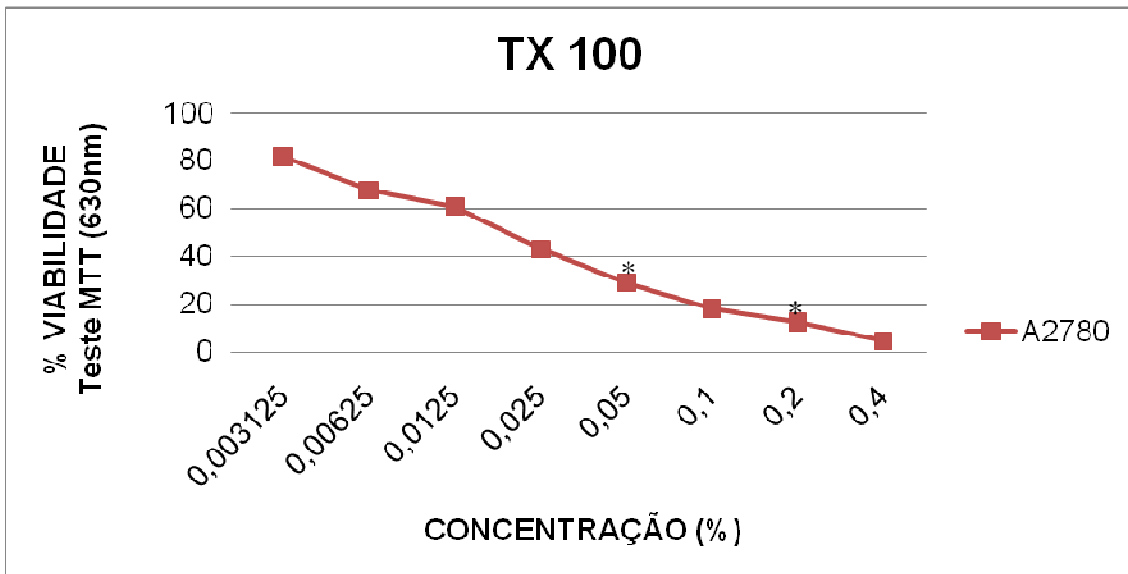


FIGURA 13 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem A2780 tratadas com solução de TX100 (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.

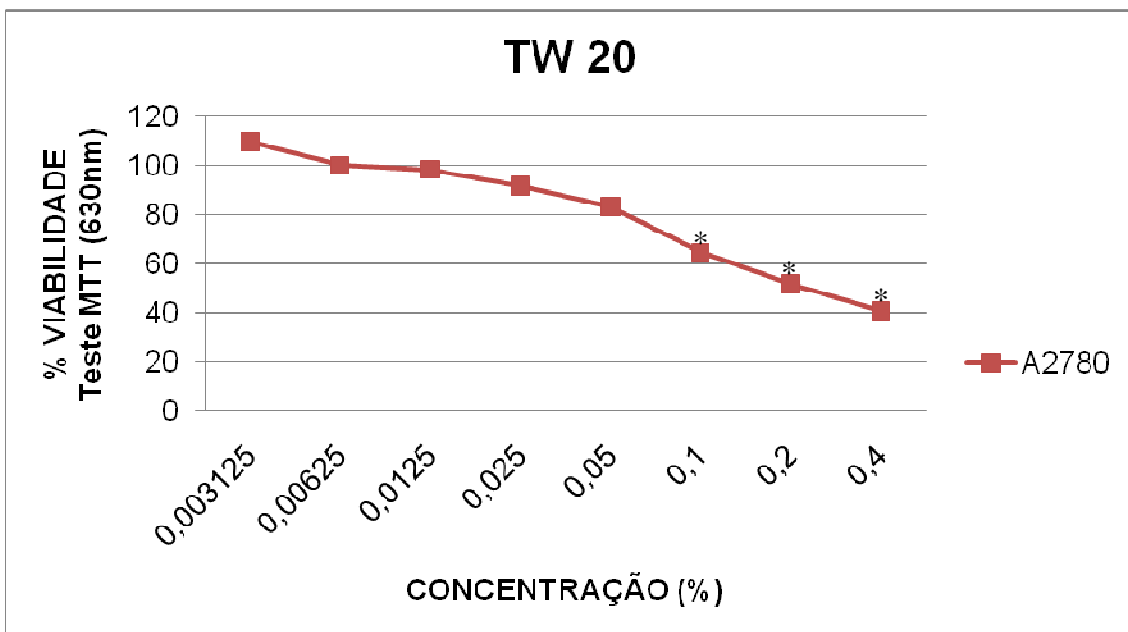


FIGURA 14 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem A2780 tratadas com solução de TW20 (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.

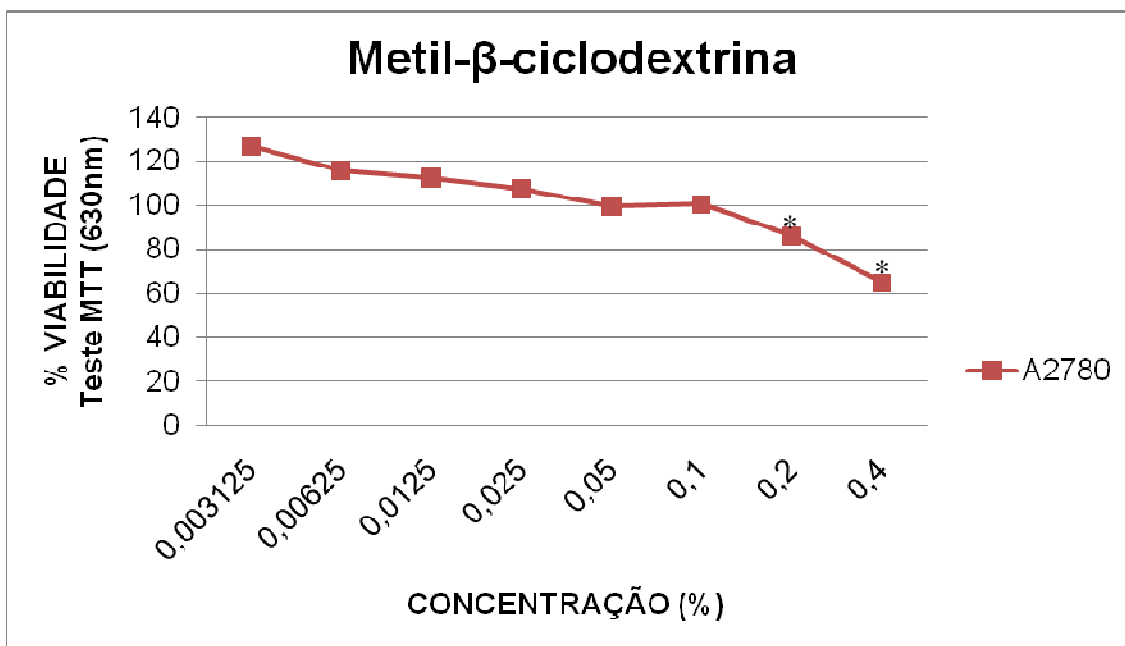


FIGURA 15 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem A2780 tratadas com solução de metil- β -ciclodextrina (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.

Na tabela 7 é possível observar os dados da viabilidade celular na linhagem A2780 referentes a cada substância frente às diversas concentrações, de modo a proporcionar uma análise comparativa.

TABELA 7 - Comparação da viabilidade celular dos diferentes tratamentos frente às diversas concentrações na linhagem A2780.

[%]	VbC - SDS	VbC - TX100	VbC - TW20	VbC - m β CD
0,003125	51,76	81,96	109,88	126,91
0,00625	40,51	67,75	100,17	115,76
0,0125	29,55	60,98	98,57	112,55
0,025	7,31	43,09	91,9	107,42
0,05	4,47	29,07	83,34	99,73
0,1	3,43	17,97	64,77	100,54
0,2	2,7	12,51	51,89	86,09
0,4	1,12	4,51	41,08	64,84

Concentração ([]), viabilidade celular (VbC %).

4.2 LINHAGEM OVCAR3

A metil- β -ciclodextrina e os tensoativos SDS, TX100 E TW20 induziram uma redução da atividade mitocondrial dose-dependente em cultura de células de câncer de ovário da linhagem OVCAR3 (Figura 16 à figura 19). Sendo SDS a substância com maior potencial citotóxico, onde na menor das concentrações testadas (0,003125%) resultou em viabilidade celular menor que 50%. Em seguida a solução de TX100 que também apresenta alto potencial citotóxico com baixa viabilidade celular perante todas as concentrações testadas, da mesma forma TW20 com viabilidade celular menor que 50% em presença da solução a 0,0125%. A metil- β -ciclodextrina demonstrou indução gradativa da redução da atividade mitocondrial na linhagem OVCAR3 para todas as oito concentrações testadas (0,003125% - 0,4%) com viabilidade celular próxima a 50%.

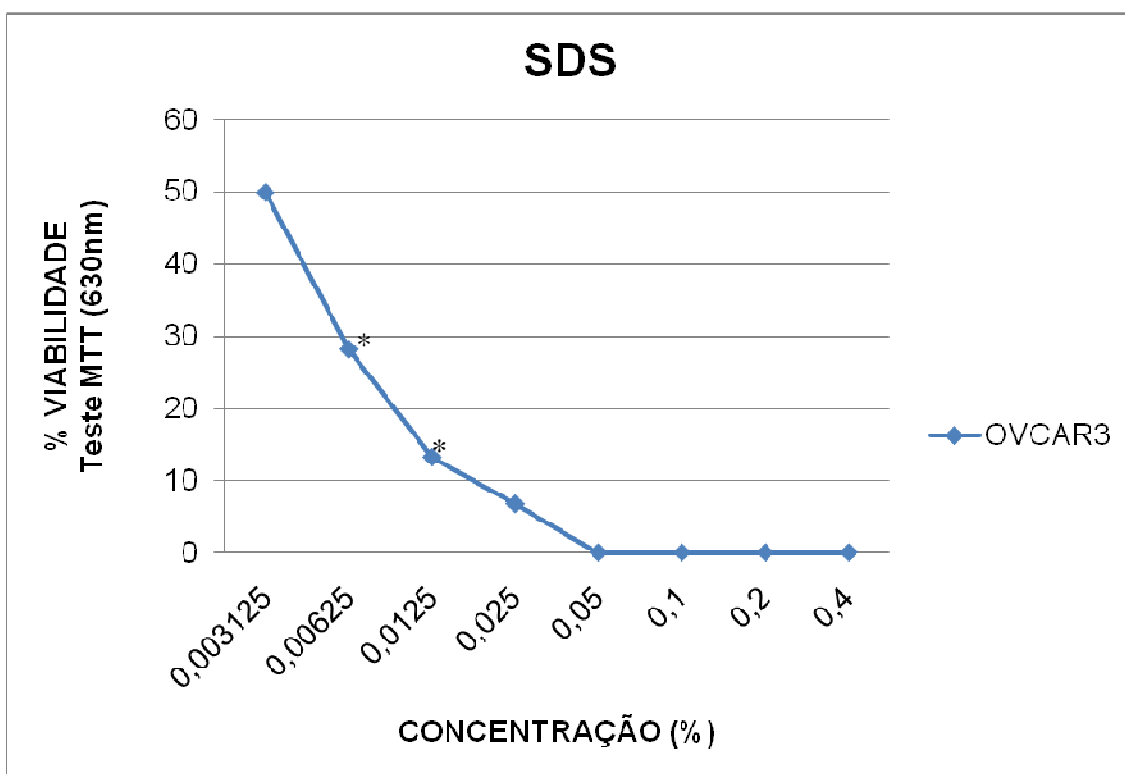


FIGURA 16 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem OVCAR3 tratadas com solução de SDS (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.

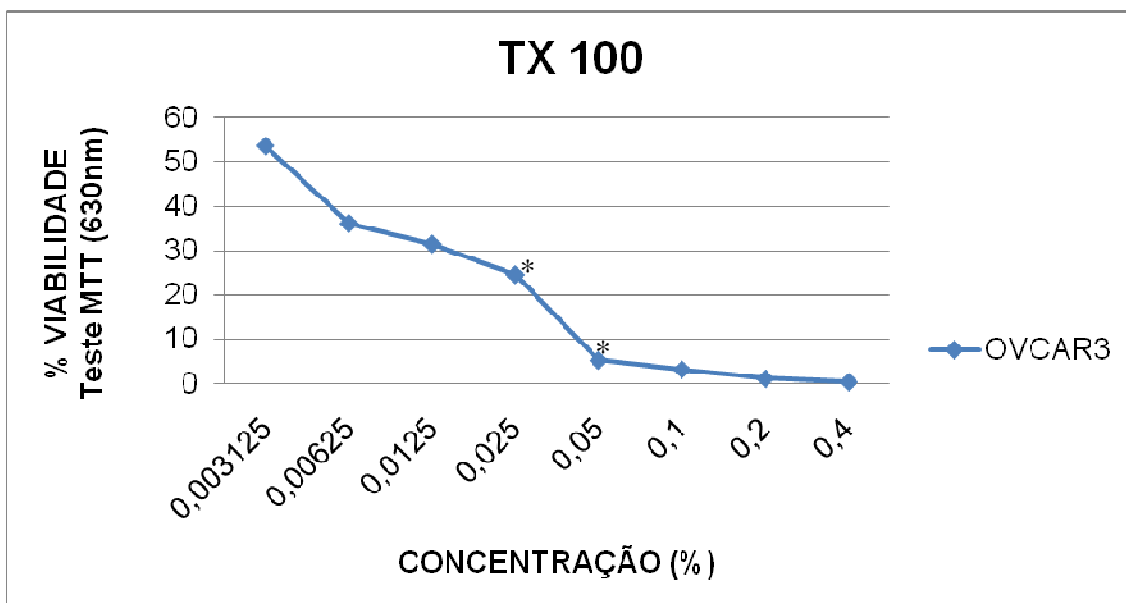


FIGURA 17 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem OVCAR3 tratadas com solução de TX100 (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em percentagem.

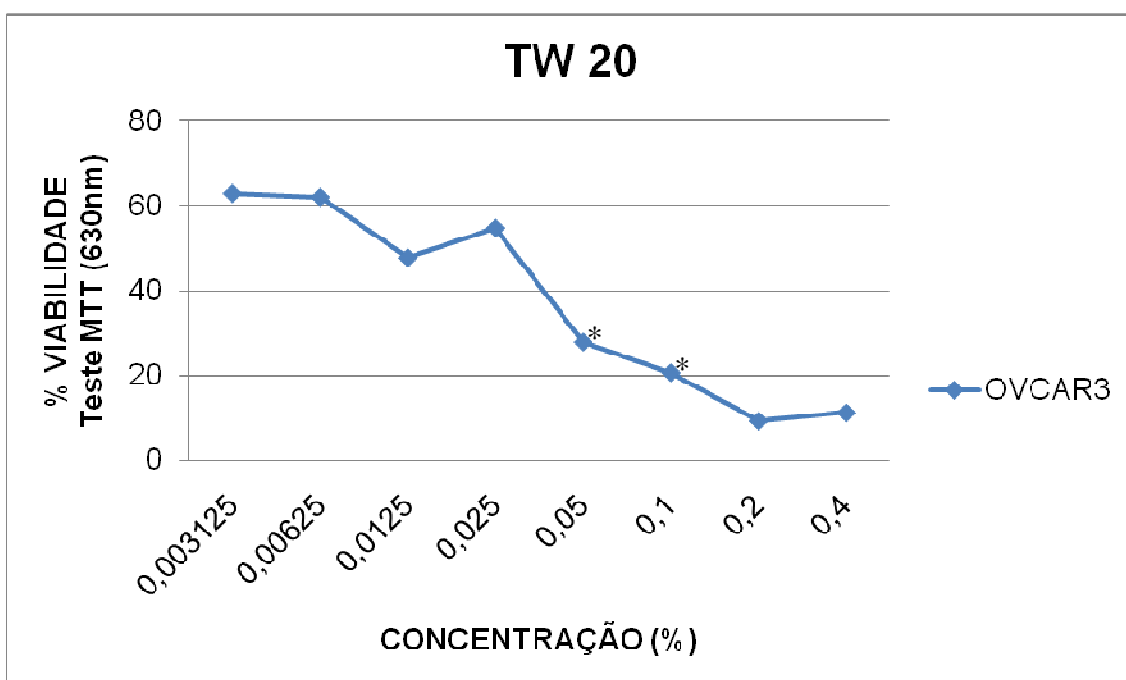


FIGURA 18 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem OVCAR3 tratadas com solução de TW20 (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em percentagem.

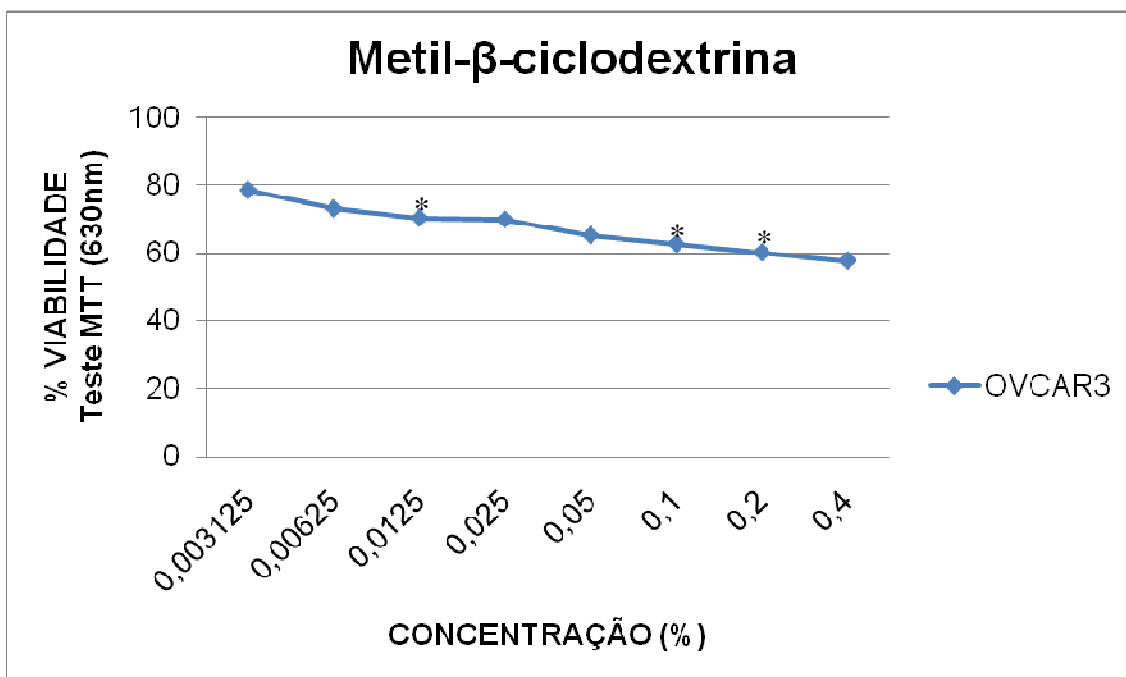


FIGURA 19 – Avaliação do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário da linhagem OVCAR3 tratadas com solução de metil-β-ciclodextrina (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem.

Na tabela 8 é possível observar os dados da viabilidade celular na linhagem OVCAR3 referentes a cada substância frente às diversas concentrações, de modo a proporcionar uma análise comparativa.

TABELA 8 - Comparação da viabilidade celular dos diferentes tratamentos frente às diversas concentrações na linhagem OVCAR3.

[%]	VBC - SDS	VBC - TX100	VBC - TW20	VBC - mβCD
0,003125	49,91	53,52	62,84	78,52
0,00625	28,16	36,12	61,98	73,05
0,0125	13,23	31,47	47,75	70,35
0,025	6,75	24,59	54,72	69,86
0,05	0	5,36	27,96	65,22
0,1	0	3,27	20,78	62,72
0,2	0	1,22	9,44	60,14
0,4	0	0,49	11,36	57,71

Concentração ([]), viabilidade celular (VbC %).

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS A2780 E OVCAR3

No estudo de avaliação da viabilidade celular no tratamento de linhagens celulares de câncer de ovário OVCAR3 e A2780 com metil- β -ciclodextrina foi analisado o potencial citotóxico das substâncias SDS, TX100 e TW20 nas culturas de células de câncer de ovário da linhagem CAOV3 e A2780 a partir do teste de viabilidade celular do MTT, de modo a determinar o potencial citotóxico da metil- β -ciclodextrina entre as linhagens. Determinado o potencial citotóxico do derivado de ciclodextrina nas duas linhagens foram estabelecidas comparações entre ambas (Figura 22 à figura 25).

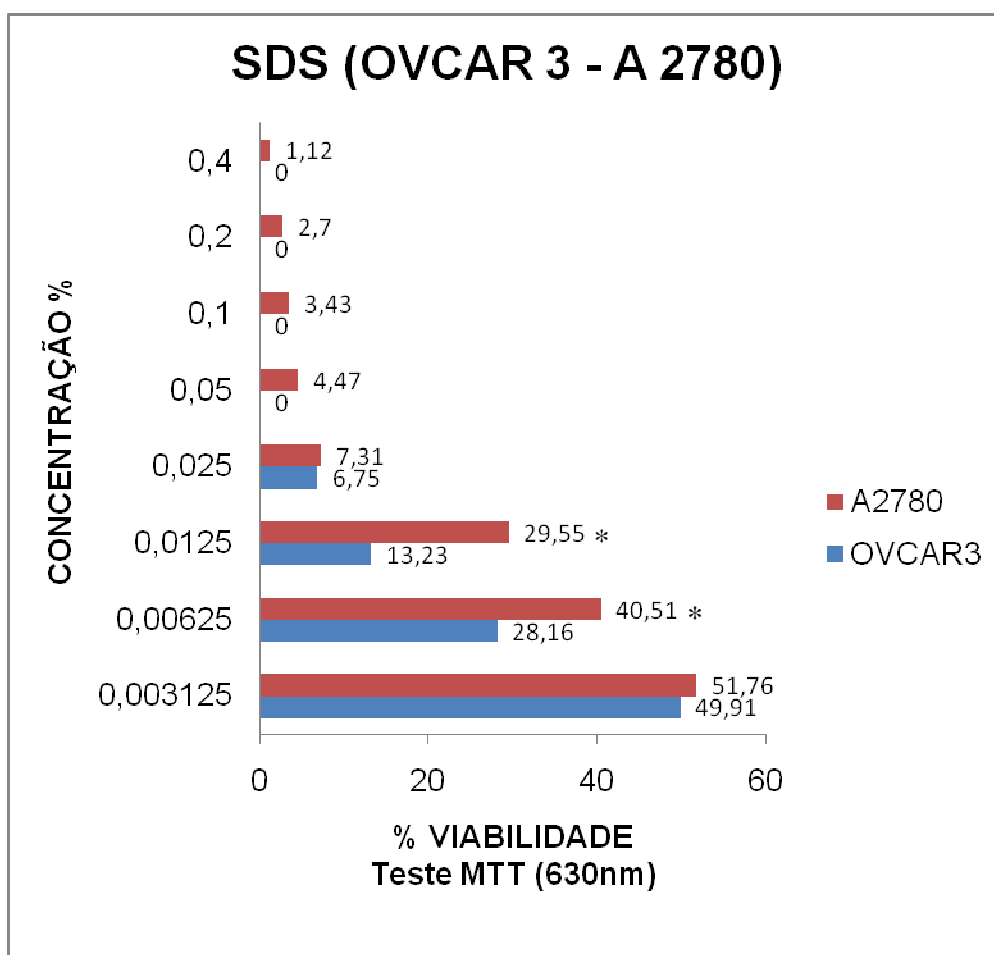


FIGURA 20 – Avaliação comparativa entre as linhagens A 2780 e OVCAR 3 do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário tratadas com solução de SDS (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem. * P < 0,05.

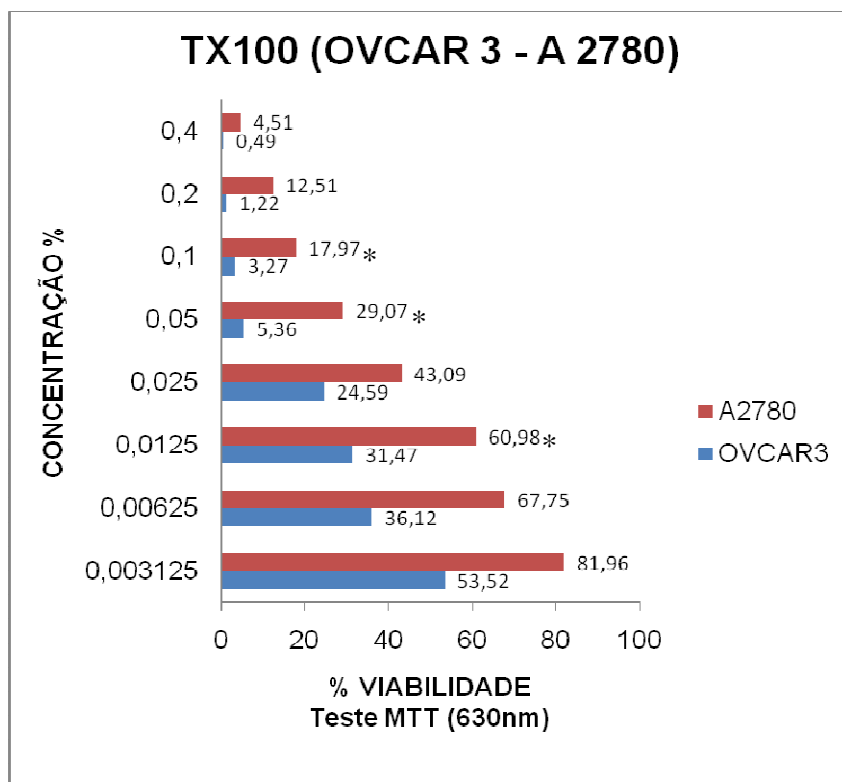


FIGURA 21 – Avaliação comparativa entre as linhagens A 2780 e OVCAR 3 do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário tratadas com solução de TX100 (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em porcentagem. * P < 0,05.

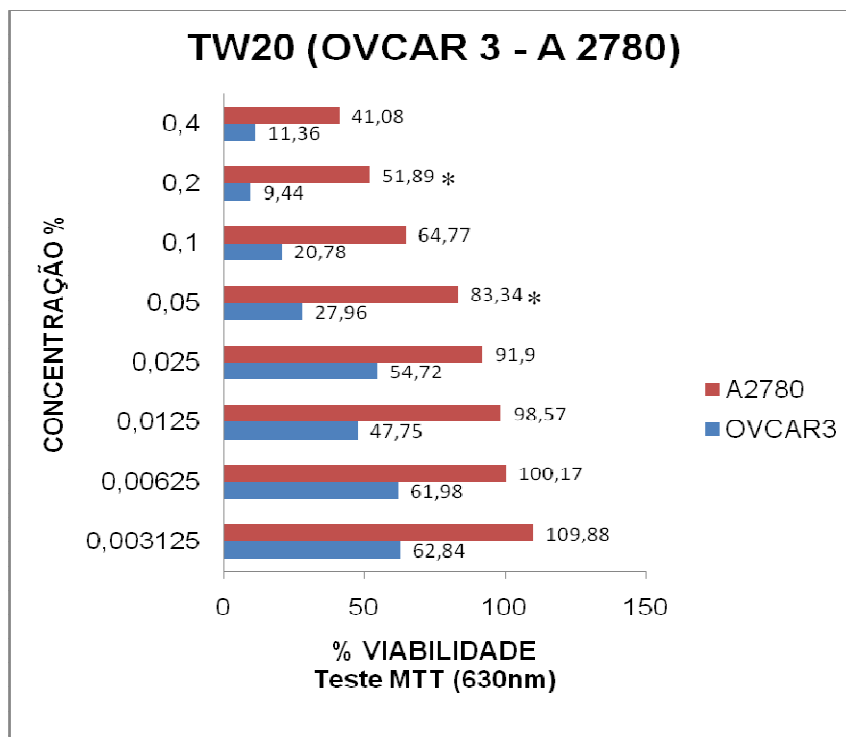


FIGURA 22 – Avaliação comparativa entre as linhagens A 2780 e OVCAR 3 do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário tratadas com solução

de TW20 (0,003125% – 0,4%), durante o período de 30 minutos. Resultados expressos em percentagem. * P < 0,05.

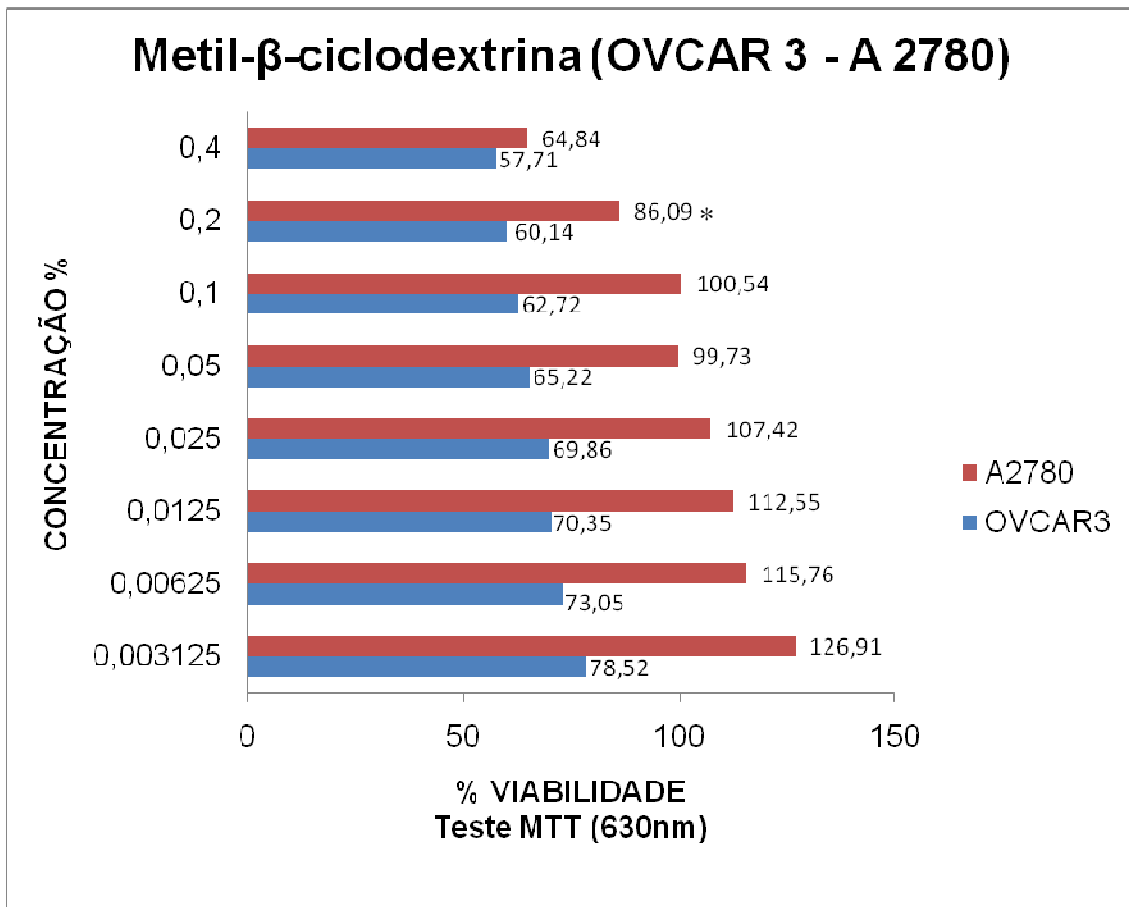


FIGURA 23 – Avaliação comparativa entre as linhagens A 2780 e OVCAR 3 do potencial citotóxico pelo teste do MTT em culturas de células de câncer de ovário tratadas com solução de metil-β-ciclodextrina (0,003125% – 0,4%), durante um período de 30 minutos. Resultados expressos em percentagem. * P < 0,05.

5. DISCUSSÃO

O processo de tratamento quimioterápico convencional sofre várias limitações, que variam da diversidade numérica dos efeitos colaterais ao aparecimento de resistência, causando desconforto ao paciente; essas condições corroboram para a necessidade de aprimorar a quimioterapia atual. As observações relatadas da possibilidade de formação de um sistema de inclusão permearam numa gama de estudos que contribuíram para modificações estruturais em diferentes tipos de fármacos, resultando em melhorias nas mais diversas terapias. Em 2000, Santos-Magalhães et al., já observado que as formas farmacêuticas encapsuladas poderiam ser usadas para veicular fármacos ao tratamento de infecções intracelulares, combinam o processo do complexo de inclusão na quimioterapia do cancro, resultando em algumas melhorias terapêuticas.

As propriedades das ciclodextrinas, até então, vinham sendo exploradas de diversas formas em vários setores. Na produção de fármacos, estudos relativos à formulação do itraconazol oral com ciclodextrina indicaram o aumento da biodisponibilidade do medicamento. Além disso, diversos estudos mostravam resultados esperançosos, sendo esta uma clara indicação clara para o uso do composto na atualidade (WINSTON et al., 2003).

Neste estudo a metil- β -ciclodextrina induziu redução significativa da atividade mitocondrial dose-dependente na cultura de células de câncer de ovário da linhagem A2780 em concentrações superiores a 0,2%, mesmo nesta concentração, a viabilidade celular diminui para 86,09%, quando a concentração da solução de tratamento é dobrada para 0,4% ocorre uma queda brusca da viabilidade para 64,84%, porém dentre as concentrações utilizadas, não foi possível alcançar potencial citotóxico superior a 50%, isso demonstra que dentro da linhagem A2780, a metil- β -ciclodextrina não possui grande toxicidade nestas concentrações.

Quando comparado os resultados de viabilidade celular entre a metil- β -ciclodextrina e as demais substâncias (SDS, TX100 e TW20) dentro da

linhagem A2780 observa-se que seu potencial citotóxico é inferior, chegando a ser sessenta vezes menor que o potencial citotóxico do SDS e quinze vezes menor do que o potencial citotóxico do TX100, diante da maior concentração utilizada no tratamento (0,4%), quando relacionado ao TW20, não apresenta valores significativos.

Na linhagem OVCAR 3 a metil- β -ciclodextrina apresentou potencial citotóxico capaz de inviabilizar 25% do crescimento celular em concentrações superiores a 0,003125%. A viabilidade celular perante as mesmas condições de tratamento é menor nesta linhagem quando comparada a linhagem A2780, analisando o aumento do potencial citotóxico concomitante com o aumento da concentração, em presença de solução de tratamento a 0,025% de concentração, a viabilidade celular na linhagem A2780 encontra-se superior a 100%, ou seja, a solução não apresenta potencial citotóxico, enquanto na linhagem OVCAR3, diante solução de mesma concentração, a viabilidade celular é de 69,86%, apresentando assim potencial citotóxico.

Estudos relatam que o complexo de inclusão de beta-ciclodextrina com carreador magnético ao quimioterápico metotrexato aumentam as possibilidades de diminuição dos efeitos adversos e aumentam a ação localizada do fármaco, podendo facilitar a terapêutica (BOCANEGRA, 2006) Também foi observado que a isotretinoína encapsulada promove ganho no índice terapêutico quando comparada a sua forma não encapsulada (DINIZ et al., 2007).

Nossos resultados indicam a possibilidade de formação de complexo de inclusão de quimioterápico utilizado contra o câncer de ovário com a beta-ciclodextrina tendo em vista seu potencial citotóxico relativamente alto na linhagem OVCAR3, desta forma a quimioterapia associada ao complexo poderia contemplar benefícios do processo de encapsulação, facilitando ou até mesmo aumentando a efetividade da terapia.

6. CONCLUSÃO

O SDS foi o tensoativo que apresentou maior potencial citotóxico, ou seja, aquele que proporcionou maior redução da atividade mitocondrial dose-dependente nas duas linhagens celulares de câncer de ovário. Essa afirmação confirma sua capacidade tensoativa superior quando comparado aos TX100 e TW20, tensoativos não iônicos. O TX100 demonstrou ter alto potencial citotóxico nas duas linhagens, já o tratamento com TW20 resultou num potencial citotóxico um pouco menor, porém impactante, o que condiz com a ação destes tensoativos.

A metil- β -ciclodextrina induziu uma redução da atividade mitocondrial dose-dependente em cultura de células de câncer de ovário das linhagens OVCAR3 e A2780 (FIGURAS). Sendo que, na linhagem OVCAR3 a metil- β -ciclodextrina apresenta maior potencial citotóxico. As mesmas concentrações de metil- β -ciclodextrina, que geraram citotoxicidade na cultura de células da linhagem OVCAR3 foram incapazes de alterar significativamente a atividade mitocondrial da cultura de células de câncer de ovário da linhagem A2780, o que denota maior resistência por parte desta linhagem.

Devido as propriedades da ciclodextrinas descritas na literatura e visto os resultados das análises comparativas de viabilidade celular, onde o derivado metil- β -ciclodextrina apresentou um significativo potencial citotóxico quando empregado nas linhagens de células de câncer de ovário A2780 e OVCAR3, onde a distinção do potencial citotóxico entre as linhagens, que define maior resistência a linhagem A2780 acredita-se está relacionada a constituição da parede celular poderia ser ainda mais explorado quanto ao câncer de ovário e quem sabe gerar adaptações às formulas farmacêuticas utilizadas na terapia contra o câncer de modo a proporcionar menores efeitos adversos, diminuição da resistência ao medicamento e até mesmo melhores resultados no tratamento. Cabe ressaltar que estes estudos são inconclusivos e devem ser tomados como base para continuação de novas pesquisas.

7. REFERÊNCIAS

AEBI, S.; CASTIGLIONE, M. Epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, v.19, s. 2, p.ii14-ii6, 2008.

ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D.A.; MONKS, A.; CZERWINSKI, M. J.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Validation of an automated microculture tetrazolium assay (MTA) to assess growth and drug sensitivity of human tumor cell lines. *Proc. Am. Cancer Research*, v. 27, p.389, 1986.

ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts e Figures 2008. Disponível em: <http://www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf>.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts e Figures 2010. Disponível em: <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/cancer-facts-and-figures-2010>.

ARUNKUMAR E., CHRISTOPHER C.FORBES and BRADLEY D.SMITH, Improving the Properties of Organic Dyes by Molecular Encapsulation, 2005.

AUERSPERG, N.; WONG, A. S. T.; CHOI, K-C.; KANG, S. K.; LEUNG, P. C. K. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews*, p. 255-288, 2001.

BATES, C. J.; LEVENE, C. I. Growth and macromolecular synthesis in the 3T6 mouse fibroblast II. The role of serum. *J. Cell Science*, v. 7, p. 683-693, 1970.

BENDER, M. L; KOMIYAMA, M. Reactivity and Structure Concepts in Organic Chemistry. Berlin: Springer, 1978.

BERKENBLIT, A. et al. A phase II trial of weekly docetaxel in patients with platinum-resistant epithelial ovarian, primary peritoneal serous cancer, or fallopian tube cancer. *Gynecologic Oncology*, v. 95, n. 3, p. 624-631, 2004.

BERTOLINI, A.C.; CEREDA, M. P.; CHUZEL, G. Fécula e Farelo de Mandioca como Substrato na Produção de Ciclodextrinas, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 18, n. 2, p. 224-229, 1998.

BIWER, A.; ANTRANIKIAN, G.; HEINZLE, E. Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 59, n. 6, p. 609-617, 2002.

BOCANEGRA, A. D.; OCHOA, R. B. Estudio por espectroscopia de absorción en La región infrarroja Del complejo de inclusión de un compuesto antineoplásico (metotrexato) en um cargador de fármaco magnéticamente dirigido. *Bistua*, v. 4, n. 2, p. 20-29, 2006.

BODNAR, L. et al. Salvage therapy with topotecan in heavily pretreated ovarian cancer patients. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, epub ahead of print, 2008.

BOWEN, N. J.; WALKER, D. L.; MATYUNINA, L.V. et al. Gene expression profiling supports the hypothesis that human ovarian surface epithelia are multipotential and capable of serving as ovarian cancer initiating cells. *BMC Medical Genomics*, p. 71–85, 2009.

BOYD, J. Whence epithelial ovarian carcinoma? *Gynecologic Oncology*, V. 109, p. 161-163, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v. 72, p. 248, 1976.

BRETILLON, A. Rapport de DEA de Pharmacie Industrielle, université de Paris-Sud, 1983.

BRUCE, A.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of the cell. Fourth Edition. New York and London, Garland Science, 2002.

BUTLER, M. Animal cell cultures: recent achievements and perspectives in the production of biopharmaceuticals. Appl. Microbiol. Biotechnology, v. 68, p. 283-291, 2005.

CANNISTRA, S. A. Cancer of the ovary. The New England Journal of Medicine, p. 2519–2529, 2004.

CARNEY, D. N.; BURN, P. A.; GAZADAR, A. F.; PAGAN, J. A.; MINNA, J. D. Selective growth in serum-free hormone-supplemented medium of tumor cells obtained by biopsy from patients with small cell carcinoma of lung. Proc. Natl. Academic Science, v. 78, p. 385-3189, 1981.

CARVALHO, F.M. de. Histopatologia do câncer do ovário e da tuba uterina. In: PIATO, S. Tratado de Ginecologia. São Paulo: Artes médicas, 2002. cap. 42, p.439-458.

CIRELI A.; YURDAKUL, B. Application of Cyclodextrin to the Textile Dyeing and Washing Processes, Journal of Applied Polymer Science, v. 100, p. 208-218, 2006.

DANTAS, T. N. C.; SANTANNA, V. C.; DANTAS NETO, A. A.; BARROS NETO, E. L.; ALENCAR MOURA, M. C. P. Rheological properties of a new surfactant based fracturing gel. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, p. 129-135, 2003.

DEL VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. Process Biochemistry, v. 39, p. 1033-1046, 2004.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedur giving improved sensitivity and reliability. J. Immunol. Methods, v. 89, p. 271, 1986.

DINIZ, D. G. A. et al. Avaliação da atividade antitumoral da isotretinoína encapsulada em lipossomas e nanocápsulas de PLA e PLGA. REF, v. 4, n. 2, p. 23-25, 2007

DU BOIS, A. et al. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel vs. carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. Journal of the National Cancer Institute, v. 95, n. 17, p. 1320-1329, 2003.

DUCHENE, D; DEBRUERES, B; DRETILLON, A. Les Cyclodextrins nature, origine et intérêt en pharmacie Galénique, Labopharma Probl. Tech; v.3, n.348, p.842-849, 1984.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science, v.122, n. 3168, p. 501-504, 1995.

EL-ACHOURI, M.; INFANTE, M. R.; IZQUIERDO, F.; KERTIT, S.; GOUTTAYA, H. M.; NCIRI, B. Synthesis of some cationic gemini surfactants and their inhibitive effect on iron corrosion in hydrochloric acid medium. Corrosion Science, p. 19-35. 2001.

FERRARI, M.; FORNASIERO, M. C.; ISETTA, A. M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. J. of Immunol. Methods, v. 131, p. 165-172, 1990.

FLASCHEL, E.; LANDERT, J-P.; SPIESSER, D.; RENKEN, A. The Production of α -Cyclodextrin by Enzymatic Degradation of Starch. Annals of the New York Academy of Sciences, NY, v. 434, p. 70-77, 1984.

FLESKEN-NIKITIN, A.; CHOI, K-C.; ENG J.P. et al. Induction of carcinogenesis by concurrent inactivation of p53 and Rb1 in the mouse ovarian surface epithelium. *Cancer Research*, p. 3459–63, 2003.

FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells - A manual of basic technique*. Third Edition. Wiley-liss, NY, 1994.

GORUMLU, G. et al. Pegylated liposomal doxorubicin in heavily pretreated epithelial ovarian cancer patients. *Journal of BUON: Official Journal of the Balkan Union of Oncology*, v. 13, n. 3, p. 349-352, 2008.

GOULET, F.; POITRAS, A.; ROUABHIA, M.; GERMAIN, L.; AUGER, F. A. Stimulation of human keratinocyte proliferation through grow factor exchanges with dermal fibroblast in vitro. *burns*, v. 22, n. 1, p. 107-112, 1996.

HAKIM, A. A.; BARRY, C. P.; BARNES, H. J. et al. Ovarian adenocarcinomas in the laying hen and women share similar alterations in p53, ras, and HER-2/neu. *Cancer Prevention Research*, p. 114-121, 2009.

HELENIUS, A. e SIMONS, K., Solubilization of membranes by detergents., *Biochim.Biophys. Acta*, 415, 29-79, 1975.

HEO, D.S.; PARK, J.G.; HATA, K.; DAY, R.; HERBERMAN, R. B.; WHITESIDE, T. L. Evaluation of tetrazoliu-based semiautomatic colorimetric assay for measurement of human antitumor cytotoxicity. *Cancer Research*, v. 50, p. 3681-3690, 1990.

IRIE, T.; UEKAMA, K. Pharmaceutical applications of cyclodextrins toxicological issues and safety evaluation. *Journal Pharm. Science*, v. 86, n. 2, p. 147-162, 1997.

JACOBS, I.J.; MENON, U. Progress and challenges in screening for early detection of ovarian cancer. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, v. 3, n. 4, p. 355-366, 2004.

JAZAERI, A.A. et al. Gene expression profiles associated with response to chemotherapy in epithelial ovarian cancers. *Clinical Cancer Research*, v. 11, n. 17, p. 6300-6310, 2005.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J. et al. Cancer statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*, v. 59, n. 4, 2009.

JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global cancer statistics. *A Cancer Journal for Clinicians*, v. 61, n. 2, 2011.

KARST, A. M.; DRAPKIN, R. Ovarian cancer pathogenesis: a model in evolution. *Journal of Oncology*, p. 1-13, 2010.

KATSUMATA, N. et al. Phase II clinical trial of pegylated liposomal doxorubicin (JNS002) in Japanese patients with mullerian carcinoma (epithelial ovarian carcinoma, primary carcinoma of fallopian tube, peritoneal carcinoma) having a therapeutic history of platinum-based chemotherapy: a Phase II Study of the Japanese Gynecologic Oncology Group. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, v. 38, n. 11, p. 777-785, 2008.

KAVANAGH, J.J. et al. Multi-institutional phase 2 study of TLK286 (TELCYTA, a glutathione S-transferase P1-1 activated glutathione analog prodrug) in patients with platinum and paclitaxel refractory or resistant ovarian cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, v. 15, n. 4, p. 593-600, 2005.

KOBEL, M. et al. Ovarian Carcinoma Subtypes Are Different Diseases: implications for biomarker studies. *Plos Medicine*, v. 5, p. 1749-1760, 2008.

KURMAN, R. J. Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int. Journal Gynecol. Pathol.*, p. 151–160, 2008.

KURMAN, R. J. M.D.; SHIH, I-M. M. D. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer- a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*, p. 433–443, 2010.

LANDEN Jr, C. N.; BIRRER, M. J.; SOOD, A. K. Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v. 26, n. 6, p. 995-1005, 2008.

LEE, Y. et al. A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *The Journal Pathology*, p. 26–35, 2007.

LEVANON, K.; CRUM, C.; DRAPKIN, R. New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *Journal of Clinical Oncology*, v. 26, n. 32, p. 5284-5293, 2008.

LICHTENBERG, D., ROBSON, R.J. e DENNIS, E.A., Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects., *Biochim. Biophys. Acta*, 737, 285-304, 1983.

LIMA, G.R.; GIRÃO, M.J.B.C.; CARVALHO, F.M. Ovário. Diagnóstico, classificação, estadiamento e terapêutica cirúrgica. In: LIMA, G.R. et al. *Ginecologia Oncológica*. São Paulo: Atheneu, 1999. cap. 23, p. 358-376.

LIN, H.L.; CHANGCHIEN, C.C. Management of relapsed/refractory epithelial ovarian cancer: current standards and novel approaches. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 46, n. 4, p. 379-388, 2007.

LOFTSSON, T. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations. The effects of polymers on their complexation efficacy and drug availability. A report for Nordic Industrial Fund., p. 5-7, 1998.

LOFTSSON, T.; MÁSSON, M.; SIGURJÓNSDÓTTIR, J. F. Methods to enhance the complexation efficiency of cyclodextrins. *S. T. P. Pharma Science*, v. 9, n. 3, p. 237-242, 1999.

LOFTSSON, T.; DUCHÊNE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 329, p. 1-11, 2007.

LUO, H.; GUAN, Y. C.; HAN, K. N. Corrosion inhibition of a mild steel by aniline and alkylamines in acidic solutions. *Corrosion*, p. 721-731. 1998.

LUX, M.P.; FASCHING, P.A.; BECKMANN, M.W. Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *Journal of Molecular Medicine*, v. 84, n. 1, p. 16-28, 2006.

MAEHARA, Y.; ANAI, H.; TAMADA, R.; SUGIMACHI, K. The ATP assay is more sensitive than succinate dehydrogenase inhibition test for predicting cell viability. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, v. 23, p. 276, 1986.

MAHMOUD, W. M.; EL-SAYED, A. H. M.; COUGHLIN, R. W. Effect of β -Cyclodextrin on Production of L-Phenylacetyl Carbinol by Immobilized Cells of *Saccharomyces Cerevisae*. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 36, p. 256-262, 1990.

MATSUDA, H; ARIMA, H. Cyclodextrin in transdermal and rectal delivery. *Adv. Drug Delivery Rev*; Amsterdam, v.36, p. 81-99, 1999.

McGUIRE, W.P. Cyclophosphamide and cisplatin compared with paclitaxel and cisplatin in patients with stage III and stage IV ovarian cancer. *The New England Journal of Medicine*, v. 334, n. 1, p. 1-6, 1996.

MIYAZAWA, I; UEDA, H; NAGASE, H; ENDO, T ; KOBAYASHI, S; NAGAI, T. Physicochemical properties and inclusion complex formation of δ -cyclodextrin. *Eur. J. Pharm. Sci*; Amsterdam, v.3, p. 153-162, 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. of Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOSMANN, T. A.; FONG, T. A. T. Specific assays for cytokine production by T cells. *J of Immunol. Methods*, v. 116, p. 151-158, 1989.

MUTCH, D.G. et al. Randomized phase III trial of gemcitabine compared with pegylated liposomal doxorubicin in patients with platinum-resistant ovarian

cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, v. 25, n. 19, p. 2811-2818, 2007.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. *Química Nova*, 25, p. 772-776. 2002.

OKAMURA, H.; KATABUCHI, H. Pathophysiological dynamics of human ovarian surface epithelial cells in epithelial ovarian carcinogenesis. *International Review of Cytology*, v. 242, p. 1-54, 2004.

OZOLS, R.F. et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology*, v. 21, n. 17, p. 31194-31200, 2003.

PEREIRA-SMITH, O. M.; SMITH, J. R. Genetic analysis of indefinite division in human cells: identification of four complementation groups. *Proc. Natl. Academic Science*, v. 85, n. 16, p. 6042-6046, 1988

PERES, C. M.; CURI, R. Como cultivar células. Guanabara Koogan, RJ, 2005.

PETERSON, G. L. Review of the Folin-phenol protein quantitation method of Lowry, rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.*, v. 100, p. 201-220, 1979.

PIEK, J.M.; VAN DIEST, P.J.; ZWEEMER, R. P. et al. Dysplastic changes in prophylactically removed fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *The Journal of Pathology*, v. 195, p. 451-456, 2001.

PIKE, M. C.; PEARCE, C. L.; WU, A. H. Prevention of cancers of the breast, endometrium and ovary. *Oncogene Nature Publishing Group*, v. 23, p. 6379-6391, 2004.

PIZZOFERRATO, A.; CIAPETTI, G.; STEA, S.; CENNI, E.; ARCIOLA, C. R. A.; GRANCHI, D.; SAVARINO, L. Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clinical Materials*, v. 15, p. 173-190, 1994.

PFISTERER, J, et al. Randomized phase III trial of topotecan following carboplatin and paclitaxel in first-line treatment of advanced ovarian cancer: a gynecologic cancer intergroup trial of the AGO-OVAR and GINECO. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 98, n. 15, p. 1036-1045, 2006.

PSZCZOLA, D.E. Production and Potencial Food Applications of Cyclodextrins, *Food Technology*, v. 42, p. 96-100, 1988.

RAJEWSKI, R.; STELLA, V. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. In vivo drug delivery. *Journal Pharm. Science*, NY, v. 85, n. 11, p. 1142-1169, 1996.

RIZZO, E.; TUCHIYA, H. H.; MARINEZ, C. H. Técnicas básicas de cultura celular. Instituto Butantan, Instituto Adolfo Lutz. SP, 1983.

SANTOS-MAGALHÃES, N., PONTES, A., PEREIRA, V., CAETANO, M. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Pharm.*, Amsterdam, v. 208, p. 71-80, 2000.

SCHARDINGER, F. Bildung kristallisierter Polysaccharide (Dextrin) aus Starkekleister durch Microbien. *Zentr. Bacteriol. Parasitenkr. Infektionskr.* v.29, p.188-197, 1911.

SCULLY, R. E. Early de novo ovarian cancer and cancer developing in benign ovarian lesions. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, p. s9-s15, 1995.

SENRA, J. D.; MALTA, L. F. B.; AGUIAR, L. C. S.; SIMAS, A. B. C.; ANTUNES, O. A. C. Catalytic Applications of Heterogeneous Systems Based on Cyclodextrins. *Current Organic Chemistry*, v. 14, n. 13, p. 1337-1355, 2010.

SHERMAN-BAUST, C.A. et al. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell*, v. 3, n. 4, p. 377-386, 2003.

SICARD, P; SAINÉZ, M. Biosynthesis of cycloglycosyltransferase and obtention of its enzymatic reaction products. In: DUCHÊNE, D; ed Cyclodextrins and their industrial uses. Paris: Editions Santé, p. 77-103, 1987.

SIKORSKI, M.; WILKINSON, F., Triplet State Decay of Xanthione (XT) and 4HBenzopyran- 4-hione (BPT) in Solid β -Ciclodextrin Complexes, University of A.Mickiewicz, Poland, Loughborough University, UK, 2003.

SINGH, M.; SHARMA, R.; BANERJEE, U.C. Biotechnological applications of cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, v. 20, p. 341-359, 2002.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins: properties and applications. *Drug Invest.*, v. 2, p. 11-21, 1990.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins. In: FROMMING, K; ASEJTLI, J; ed Cyclodextrin in Pharmacy. London: Kluwer Academic Publishers, v.5, p. 1-18, 1994.

SZEJTLI, J. Utilization of Cyclodextrins in Industrial Products and Process, *Journal Mater. Chem*, p. 575-587, 1997.

SZEJTLI, J.; SZENTE, L. Elimination of bitter, disgusting tastes of drugs and foods by cyclodextrins. *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 61, p. 115-1235, 2005.

SZERMAN, N.; SCHROH, I.; ROSSI, A. L.; ROSSO, A. M.; KRYMKIEWICZ, N.; FERRAROTTI, S. A. Cyclodextrin production by cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* DF 9R, v. 98, p. 2886-2891, 2006.

TADA, H.; SHIBO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol Methods*, v. 93, p. 157, 1986.

TAVASSOLI, F.A.; DEVILEE, P. Tumours of the ovary and peritoneum. In: World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: IARC Press, 2003.

UEKAMA, K; OTAGIRI, M. Cyclodextrins in drug carrier systems. CRC Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, New York, v.3, p. 1-40, 1987

UEKAMA, K; IRIE, T. New perspectives in cyclodextrin pharmaceutical applications cyclodextrin derivatives as new drugs carrier. Drug Investigation, Aucland, v.2, n.4, p. 22-28, 1990.

VANG, R.; SHIH, IE-M.; KURMAN, R. J. Ovarian low-grade and high grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. Adv. Anat. Pathologic, p. 267–282, 2009.

VEIGA, F. Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia. Universidade de Coimbra. Complexos de inclusão com ciclodextrinas hidrofílicas – Caracterização físico-química e biofarmacêutica, Coimbra, p.19-31, 1996.

VIEIRA, L. F. A técnica da reflectância difusa aplicada ao estudo da fluorescência de 2,3-Naftalimidias n-Substituídas com grupos alquila incluídas em β -Ciclodextrina e adsorvidas em celulose microcristalina, Quimica Nova, v. 22, n. 4, 1999.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. The multistep nature of cancer. Trends in Genetics, v. 9, p. 138–141, 1993.

WILSON, K.; WALKER, J. M. Principles and techniques of practical biochemistry. 4th New York, 586 p. 1995.

WINSTON DJ, MAZIARZ RT, CHANDRASEKAR PH, LAZARUS HM, GOLDMAN M, BLUMER JL et al. Intravenous and oral itraconazole versus intravenous and oral fluconazole for longterm antifungal prophylaxis in allogeneic hematopoietic stem-cell transplant recipients. A multicenter, randomized trial. Ann Intern Med, v. 138, p. 705-713, 2003.

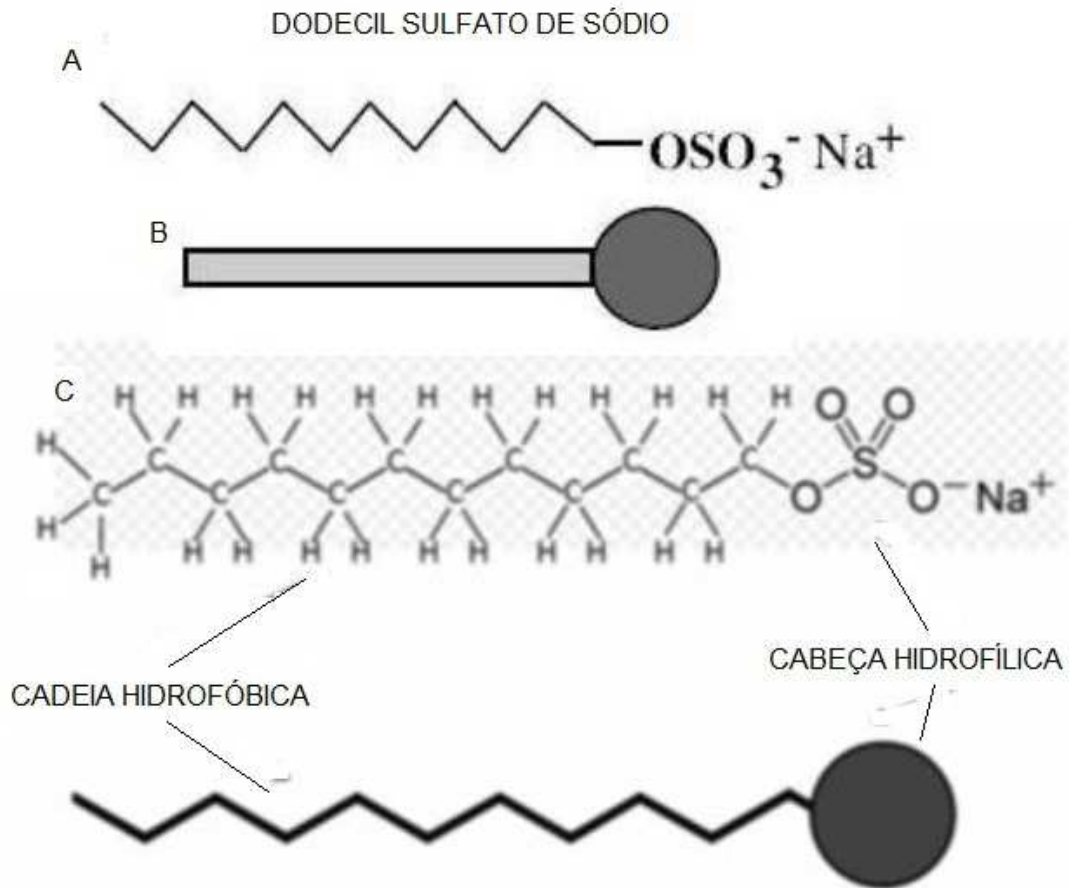
WOUESSIDJEWÉ, D; SKIBA, M; LEROY-LECHAT, F; LEMOS-SENNA, E; PUISIEUX, F; DUCHÊNE, D. A new concept in drug delivery based on “skirt-shaped cyclodextrin aggregates”. Presents state and future prospects. S.T.P.Pharma Sci, Paris, v.6, n.1, p. 21-28, 1996.

YAMAMOTO, M.; ARIMOTI, H.; IRIE, T.; HIRAYAMA, F.; UEKAMA, K. Biopharmaceutical evaluation of maltosyl-B-cyclodextrin as a parenteral drug carrier. S. T. P. Pharma Science, v. 1, n. 6, p. 397-402, 1991.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. Química Nova, v. 21, n. 6, p. 787-793, 1998.

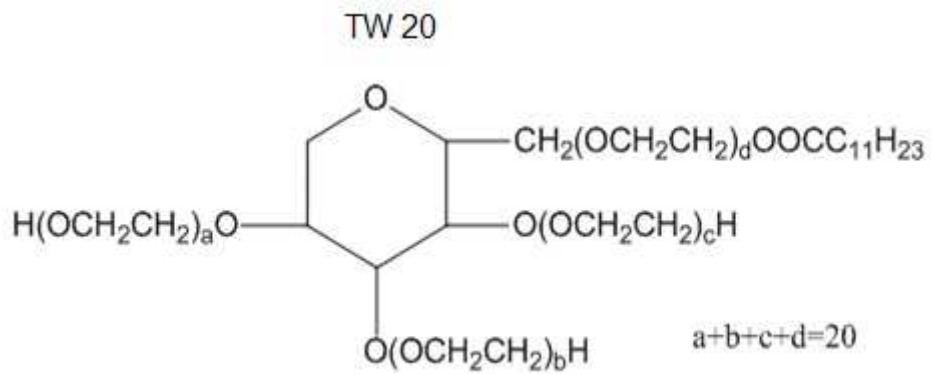
ANEXOS

ANEXO 1 – ESTRUTURA SDS



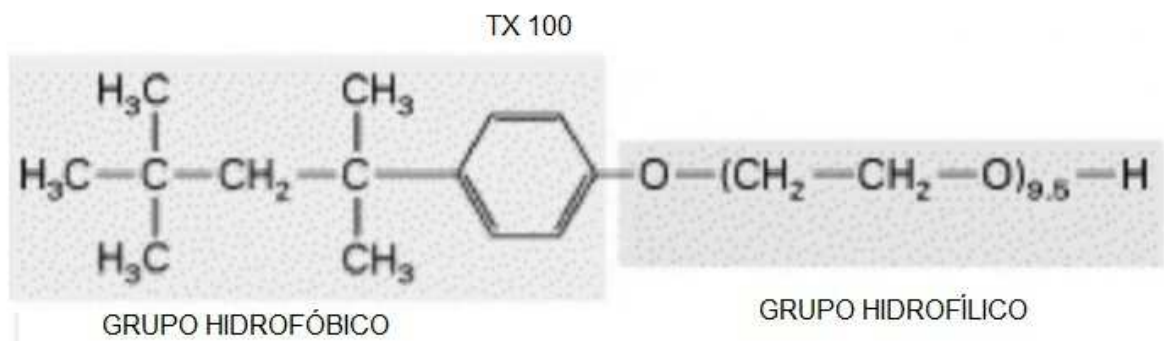
DODECIL SULFATO DE SÓDIO – SDS; A) ESTRUTURA; B) REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA; C) IDENTIFICAÇÃO DA PARTE HIDROFÓBICA E HIDROFÍLICA NAS ESTRUTURAS MOLECULAR E ESQUEMÁTICA.

ANEXO 2 – ESTRUTURA TW20



TWEEN 20 – ESTRUTURA MOLECULAR

ANEXO 3 – ESTRUTURA TX100



TRITON X100 – ESTRUTURA MOLECULAR