

Ana Mafalda Brandão Macedo

A atividade anticancerígena das ciclodextrinas: Realidade ou Ficção?

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Ana Rita Ramalho Figueiras e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ana Mafalda Brandão Macedo

A atividade anticancerígena das ciclodextrinas: Realidade ou Ficção?.

Monografia realizada no âmbito da unidade de Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Ana Rita Ramalho Figueiras e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2016



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, Ana Mafalda Brandão Macedo, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2011169440, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo desta Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 2 de setembro de 2016.

(Ana Mafalda Brandão Macedo)

Agradecimentos

Agora que estou prestes a finalizar uma das etapas mais marcantes da minha vida, é altura de agradecer a todos os que de alguma forma contribuíram para eu chegar até aqui:

Aos professores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra por todo o conhecimento partilhado.

À Professora Ana Rita Figueiras por todo o apoio e ajuda constante na realização deste trabalho, tendo sido fundamental para que este fosse possível.

A todos os meus amigos que foram imprescindíveis ao longo do meu percurso, incentivando-me sempre a dar o melhor de mim.

Um agradecimento muito especial ao Rafael por todo o apoio, carinho, força, amizade, compreensão. Por ter sido um dos pilares essenciais ao longo destes 5 anos, contribuindo para a minha plena felicidade.

O meu maior agradecimento é para as pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais, que sempre fizeram tudo para que eu chegasse até aqui com a maior dignidade possível. Obrigada por me terem inculcido os valores fundamentais para eu longe e por me terem proporcionado uma vida rica em oportunidades. Sem eles nada disto seria possível e, por isso, dedico-lhes esta vitória.

Por fim, a todos os que de alguma forma contribuíram para o meu sucesso ao longo de todo este percurso.

Um grande Obrigada a todos!

Resumo

As ciclodextrinas (CDs) poderão ser encaradas como valiosas ferramentas multifuncionais que têm vindo a ser extensivamente usadas na indústria farmacêutica. A sua bioadaptabilidade e versatilidade conferem-lhes a capacidade de atenuar propriedades indesejáveis dos fármacos mediante formação de complexos de inclusão ou conjugação. Inicialmente consideradas como excipientes farmacêuticos, as CDs rapidamente demonstraram elevado potencial para evoluir sendo utilizadas em áreas de investigação mais promissoras onde urge a necessidade de técnicas inovadoras. Um exemplo concreto é a terapia anticancerígena onde a investigação e a inovação são dotadas de um papel crucial para que se obtenha a máxima eficácia e o mínimo de efeitos secundários possíveis.

Atualmente, várias evidências demonstram que as CDs não são apenas excipientes, tendo aplicações nas mais variadas áreas, demonstrando vantagens na sua utilização. A sua estrutura e propriedades muito particulares permitem-lhes ter aplicações únicas que podem vir a revolucionar diferentes e variadas terapêuticas. Existem várias evidências que comprovam o uso das CDs na terapia anticancerígena, funcionando como prófarmacos para vectorização para um alvo terapêutico ou funcionando como promotores da estabilidade, solubilidade e das características físico-químicas dos fármacos.

Assim, o principal objetivo deste trabalho é realizar uma abordagem ao uso promissor das CDs na terapia anticancerígena, esclarecendo se este assunto se trata de um facto (realidade) ou de apenas um mito. Aqui, as CDs apresentam o papel principal pois a intenção é verificar se elas próprias são dotadas de atividade anticancerígena.

Inicialmente, será feita uma contextualização dos aspetos principais relacionados com as CDs, que se tornam importantes para introduzir vários conceitos relacionados com o tema e compreender a sua estrutura e aplicações terapêuticas. Posteriormente serão apresentadas algumas aplicações terapêuticas das mesmas, sendo alvo de destaque a atividade anticancerígena, como referido anteriormente. Por fim, serão apresentadas as perspectivas futuras da utilização das CDs e conclusões do trabalho.

Palavras-chave: ciclodextrinas; aplicações terapêuticas; atividade anticancerígena.

Abstract

Cyclodextrins (CDs) can be considered a valuable and multifunctional tool, being extensively used in the pharmaceutical industry. Their bio-adaptability and versatility are very important parameters, since these characteristics have influence on its ability to mitigate the undesirable properties of the drugs, through the formation of inclusion complexes or conjugation. Initially, regarded as simple pharmaceuticals excipients, CDs fastly demonstrated high potential to evolve, being used in the most promising areas of research, in which there is an urgent need for new strategies.

A concrete example is cancer therapy, where research and innovation are endowed with a crucial role in order to obtain maximum efficiency and minimum side effects.

Currently, several evidences show that the CDs are not only excipients, but can also be used for other applications in several areas, which demonstrate the advantages of these compounds. Thus, the particular structure and properties of CDs allow a unique range of applications that may well revolutionize different and several therapeutic strategies.

Regarding this, there are several studies demonstrating the use of CDs in cancer therapy, in which these compounds act as prodrugs that vectorize drugs for a target site or promote drug solubility and stability by inclusion complexes formation.

Thus, the aim of this work is to approach the promising use of CDs in cancer therapy, clarifying whether this matter it is a fact (reality) or just a myth. Here, they have the lead role since the intention of this work is to check if these molecules have anticancer activity.

Firstly, it will be presented an introduction about the main aspects related to the CDs once it is important taken into account various concepts, as well as, to understand the structure and therapeutic applications of these molecules. Secondly, it will be presented some therapeutic applications of cyclodextrins, highlighting the anticancer activity of CDs, as it was said before. Finally, it will be presented the future prospects of CDs utilization and conclusions.

Keywords: cyclodextrins, therapeutic applications, anticancer activity.

Lista de Abreviaturas

α -CD – α fa-ciclodextrina

ADME – Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação

β -CD – β eta-ciclodextrina

CDs – Ciclodextrinas

CGTase – Ciclodextrina-glicosil-transferase

DMSO – Dimetil sulfóxido

EGF – Fator de Crescimento Epidermal

EMA – Agência Europeia do Medicamento

EPR – Efeito de Permeabilidade e Retenção

FAM β CD – Folato conjugado com a M β CD

FDA – Administração de alimentos e fármacos, do inglês *Food and Drug Administration*

FS – Fotossensibilizador

δ -CD – δ ama-ciclodextrina

GI – Gastrointestinal

HMG CoA – Hidroxi-metil-glutaril coenzima A redutase

HP β CD – Hidroxi-propil- β eta-ciclodextrina

LMC – Leucemia Mielóide Crónica

M β CD – Metil- β eta-ciclodextrina

TFD – Terapia Fotodinâmica

VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial

Índice

Introdução	1
Parte I – Ciclodextrinas	3
1.1 – Origem e Obtenção.....	3
1.2 – Propriedades Físico-Químicas	5
1.3 – Derivados das Ciclodextrinas.....	10
Parte II – Algumas aplicações terapêuticas das ciclodextrinas	12
2.1 – Nanotransportadores de agentes antitumorais contendo ciclodextrinas	12
2.2 – Conjugado 5-fluoruracilo ácido acético: β -ciclodextrina (5-FUAC/ β CD) para vectorização no cólon	13
2.3 – O complexo Abendazol:2HP β CD – aumento da citotoxicidade nas células cancerígenas do ovário	14
2.4 – Sistema de entrega de fármacos baseados em nanotecnologia utilizados na terapia fotodinâmica.....	15
Parte III – A atividade anticancerígena das ciclodextrinas	17
3.1 – A importância do colesterol e das jangadas lipídicas.....	17
3.2 – Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD)	18
3.3 – Metil- β -ciclodextrina (M β CD).....	21
Parte IV – Conclusões e Perspetivas Futuras	25
Referências Bibliográficas	

Índice de Figuras

Figura 1 – Formação das dextrinas a partir do amido, por ação do CGT-ase.	3
Figura 2 – Estrutura tronco-cônica da α -CD (A), β -CD (B) e γ -CD (C).....	4
Figura 3 – Estrutura química (a) e forma tronco-cônica da β -CD (b)	5
Figura 4 – Formação de um complexo de inclusão na estequiometria de 1:1	7
Figura 5 – Formação de agregados de CDs	9
Figura 6 – Relação entre o tamanho dos agregados de CDs e a sua concentração.....	9
Figura 7 – Constantes de velocidade de hidrólise para diferentes pHs do 5-FUAC/ β CD, a 37°C.....	13
Figura 8 – Mecanismo do FS conjugado com CDs no tratamento do cancro	16

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Estrutura e algumas propriedades das CDs naturais.....	6
Tabela 2 – Influência de propriedades moleculares e físico-químicas na formação de complexos	8
Tabela 3 – Formação e Estabilidade dos agregados de CDs em solução aquosa.....	10

Introdução

O amido ao ser hidrolisado origina, geralmente, a formação de glucose, maltose e dextrinas lineares e ramificadas. Contudo, existem alguns microorganismos que têm a capacidade de produzir enzimas, tais como os ciclodextrina-glucosil-transferases (CGT-ases), que catalisam a hidrólise de algumas ligações glicosídicas do amido, havendo a produção de dextrinas e, por fim a ciclização destes fragmentos, originando as ciclodextrinas (CDs)¹.

As CDs são oligossacáridos macrocíclicos, solúveis em água, não redutoras, constituídas por unidades de D-glucopiranosose ligadas entre si por ligações α -1,4, que apresentam uma cavidade hidrofóbica e uma superfície hidrofílica². A cavidade hidrofóbica é uma característica muito particular e importante, na medida em que permite a inclusão de vários tipos de fármacos, resultando na formação de complexos de inclusão não covalentemente ligados³.

Na indústria farmacêutica, as CDs são usadas principalmente como excipientes com capacidade de melhorar as características físico-químicas e farmacocinéticas dos fármacos¹. Atualmente, assiste-se a uma mudança de paradigma na medida em que as CDs não são apenas excipientes farmacêuticos, tendo-se revelado bastante eficazes e úteis noutras áreas de aplicação, como é o caso da terapia anticancerígena. É possível verificar que a formação de conjugados ou complexos se traduz numa vantagem dado que aumenta a eficácia do tratamento, minimizando os efeitos secundários. É certo que, por um lado, estas são importantes para que se obtenha bons resultados com outras técnicas, como por exemplo na terapia fotodinâmica^{4,5}, mas por outro lado, começa a surgir o seu potencial de utilização de forma isolada, confirmando o seu real valor^{6,7}.

A utilização de CDs como agentes anticancerígenos é a mais recente potencial descoberta associada às suas aplicações. A terapia anticancerígena além de constituir uma vasta área de investigação científica apresenta algumas lacunas de eficácia para alguns tipos de cancro. Torna-se, por isso, bastante pertinente avaliar a potencial atividade das CDs como agentes anticancerígenos, de modo a que possam ser encaradas como uma solução para muitos doentes resistentes a terapias convencionais. Atualmente, sabe-se que as células cancerígenas apresentam níveis de colesterol mais elevados comparativamente às células saudáveis. O colesterol é um componente fundamental para o crescimento e proliferação das células tumorais, nas quais se encontra concentrado em microdomínios de sinalização, as jangadas lipídicas. Tendo por base este raciocínio pode-se assumir que agentes que perturbem a homeostase e o metabolismo do colesterol nestas células podem levar à rutura

das jangadas lipídicas e à perda da integridade da membrana, fatores que vão induzir a apoptose⁶.

Existem várias aplicações terapêuticas em que as CDs atuam como auxiliares. Contudo, por vezes a conjugação destas com outras substâncias é importante para que se verifique a atividade anticancerígena das CDs, como se exemplifica no estudo do folato conjugado com a M β CD, que será apresentado mais à frente neste trabalho.

Avançando neste sentido, o principal foco do presente trabalho é esclarecer se a atividade anticancerígena das CDs é uma realidade ou um mito.

Parte I – Ciclodextrinas

Ao longo deste capítulo serão apresentadas as noções gerais associadas às CDs, nomeadamente a sua origem e obtenção, as suas propriedades físico-químicas e os seus derivados, com o objetivo de fazer uma contextualização do tema, para que sejam mais facilmente perceptíveis as aplicações terapêuticas das CDs.

1.1 – Origem e Obtenção

Embora as CDs sejam reportadas por muitos cientistas como um novo grupo de excipientes farmacêuticos, é de referir que a sua existência tem mais de 100 anos⁸. Assim sendo, a descoberta química das CDs ocorreu por *Villiers*, que descreveu um oligossacárido cíclico resultante da degradação enzimática do amido. Mais tarde, *Schardinger* isolou o bacilo *Bacillus macerans* produtor de CDs pela ação do ciclodextrina-glicosil-transferase (CGT-ase)⁹, originando o registo da primeira patente de CDs em 1953. Surgiu assim, uma nova era, que teve início no passado século 19 com uns bonitos cristais observados por um cientista francês, permanecendo até à atualidade as inovações e descobertas associadas às CDs¹⁰. A figura seguinte representa a obtenção das dextrinas cíclicas e acíclicas a partir do amido, devido à ação do CGTase.

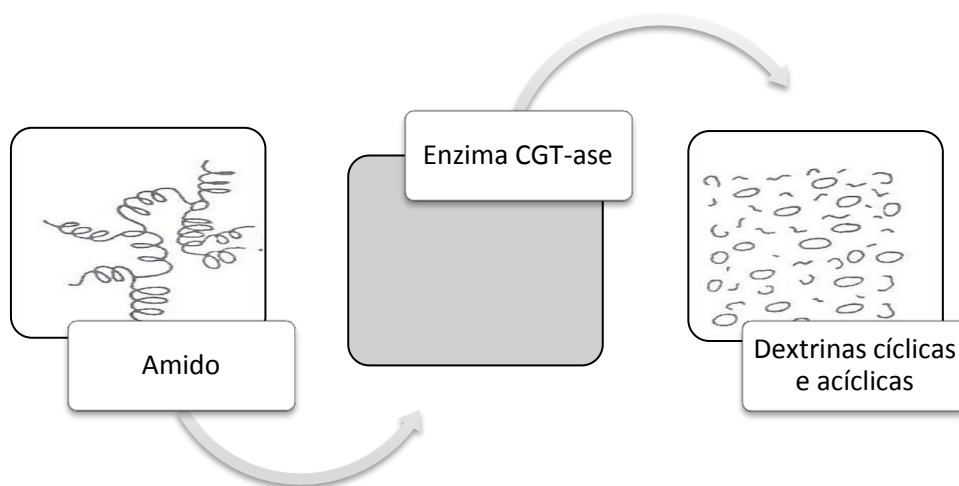


Figura 1 – Formação das dextrinas a partir do amido, por ação do CGT-ase. Adaptado de ²

As CDs são um grupo estrutural de produtos naturais formadas durante a digestão bacteriana do amido⁸, por ação do CGT-ase, sendo este o processo utilizado na produção industrial das mesmas⁹. Existem inúmeras bactérias produtoras de CGT-ase como o *Bacillus macerans* (que produz essencialmente α -CD), *Bacillus alcalofílico* (que produz essencialmente β -CD), entre outros, que convertem o amido em oligossacáridos cíclicos e acíclicos, devido à hidrólise das ligações glicosídicas. Dependendo do tipo de microrganismo que produz o

enzima e das condições de reação são obtidas diferentes tipos de CDs⁹. O CGT-ase, o ciclomaltodextrina glicosiltransferase e o ciclomaltodextrina gluconotransferase são membros da família dos alfa-amilase glicosil transferases. Como outros membros desta família, o CGT-ase apresenta capacidade para catalisar reações de hidrólise, clivar ligações na molécula de amido, resultando numa nova reação de redução. Contudo, a ciclização é a reação mais específica do CGT-ase em que há clivagem da ligação α -glicosídica do amido e consequente formação da ciclodextrina¹¹.

Vários anos após a sua descoberta, apenas uma pequena quantidade de CDs foi produzida devido aos custos elevados, o que impediu a sua utilização frequente nas formulações farmacêuticas. Os avanços biotecnológicos dos últimos 30 anos resultaram em melhorias dramáticas na produção e na redução dos custos associados a este processo⁸. As CDs têm despertado grande interesse na comunidade científica sendo descritas como “moléculas interessantes que atraem a atenção dos investigadores tanto no campo de pesquisa como no campo das tecnologias aplicadas”³.

As CDs são estruturas oligossacarídeas supramoleculares com uma cavidade hidrofóbica e uma superfície hidrofílica¹⁰. Embora o exterior polar permita a solvatação das CDs em solução aquosa, a sua cavidade central permite a encapsulação de moléculas não polares ou metades moleculares, uma propriedade que tem vindo a ser explorada por várias vertentes nomeadamente, pela vertente farmacêutica, química, alimentar e analítica¹². A cavidade apresenta um carácter hidrofóbico devido à presença de dois anéis com grupos C-H e pelo anel de átomos de oxigénio incluídos nas ligações glicosídicas. Assim, as CDs apresentam um microambiente heterogéneo, uma vez que a sua superfície externa é hidrófila e a sua cavidade interna é hidrofoba¹. Esta estrutura confere às CDs propriedades únicas, fundamentais para as suas aplicações¹³. Na figura 2 encontram-se esquematizadas as estruturas tronco-cónicas das CDs naturais.

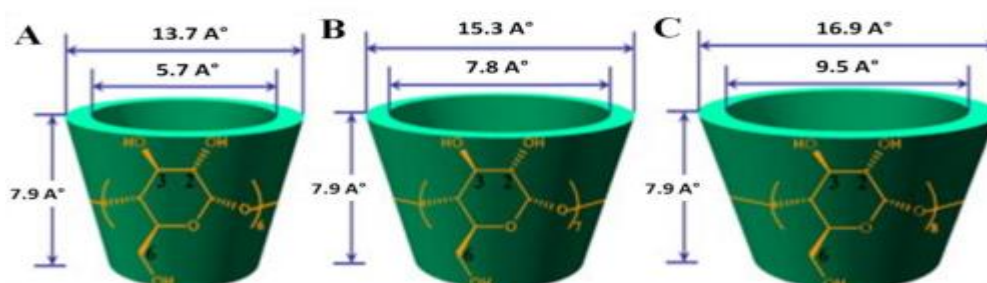


Figura 2 – Estrutura tronco-cónica da α -CD (A), β -CD (B) e γ -CD (C). Adaptado de ¹⁴

As CDs naturais mais comuns são a α -CD (ciclato-hexanose), a β -CD (ciclato-heptanose) e a γ -CD (ciclato-octanose) que apresentam, respetivamente, 6, 7 e 8 unidades de glucopiranosose¹³, unidas por ligações α -1,4¹. Não existem CDs com menos de 6 unidades, provavelmente devido a razões estéricas. Relativamente à conformação em cadeira da glucopiranosose, estes produtos possuem uma forma tronco-cónica e não de um cilindro perfeito¹.

As funções hidroxilo estão orientadas para o cone exterior, apresentando os grupos hidroxilo primários dos resíduos de açúcar na extremidade mais estreita e os grupos hidroxilo secundários na extremidade mais ampla. A cavidade central está alinhada com um esqueleto de carbonos e oxigénios etéreos dos resíduos de glucose, que origina um ambiente hidrofóbico.

De todas as CDs naturais, a β -CD é a que apresenta solubilidade mais reduzida que se deve ao elevado número de ligações de hidrogénio intramoleculares entre os grupos hidroxilo secundários existentes na ciclodextrina¹.

A β -CD é a ciclodextrina natural mais utilizada pela indústria farmacêutica como agente complexante não só pelo tamanho da sua cavidade como também pela sua disponibilidade e custo reduzido¹³. Na figura 3 está representada a estrutura química e a forma tronco-cónica da β -CD.

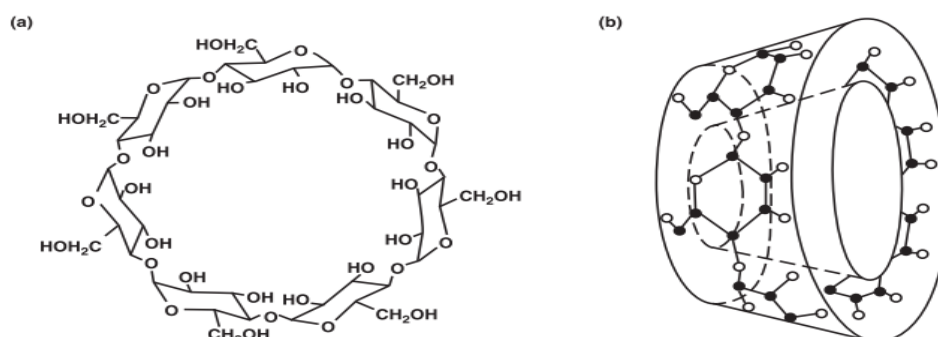


Figura 3 – Estrutura química (a) e forma tronco-cónica da β -CD (b). Adaptado de ⁸

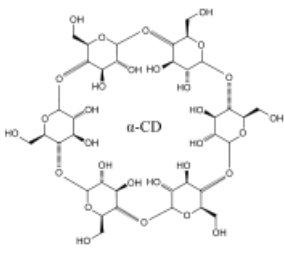
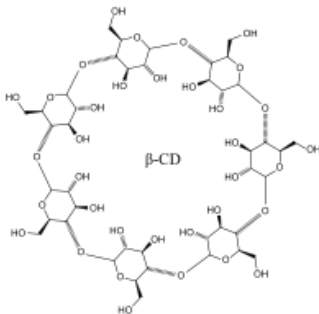
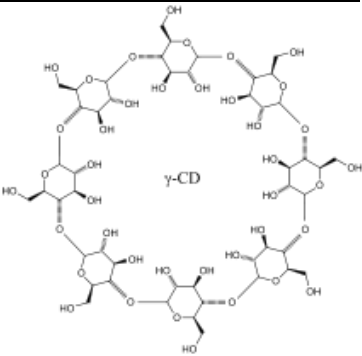
Como resultado da sua forma e estrutura molecular, as CDs exibem uma capacidade única para encapsular moléculas hóspedes na sua cavidade e funcionar como um transportador molecular⁸.

1.2 – Propriedades Físico-Químicas

As CDs naturais, α e β , ao contrário do que se sucede com a γ -CD, não são degradadas pelo amílase salivar humana, nem pelo amílase pancreática. Contudo, tanto a α -CD como a β -CD podem sofrer fermentação pela microflora intestinal. As CDs são

moléculas grandes e hidrofílicas, apresentando um número significativo de doadores e aceitadores de oxigênio, pelo que não podem ser absorvidas pelo trato gastrointestinal (GI) na sua forma intacta⁸. A tabela seguinte resume algumas propriedades das CDs.

Tabela I – Estrutura e algumas propriedades das CDs naturais. Adaptado de ¹⁵

			
N° unidades de glicose	6	7	8
Massa Molecular (g/mol)	972	1135	1297
Solubilidade e aquosa (g/100 mL a 25°C)	14,5	1,85	23,2
Diâmetro da cavidade interna (Å)	4,7-5,3	6,0-6,5	7,5-8,3
Forma dos cristais	Lâminas Hexagonais	Paralelogramos monocíclicos	Prismas Quadráticos
pKa (25°C)	12,333	12,202	12,081
Constante de Difusão a 40°C (m²/s)	3,443	3,223	3,000

A capacidade de formação de complexos de inclusão está relacionada com a grande e variada utilização das CDs. O tipo de complexo mais comum é o que ocorre na estequiometria de 1:1, onde uma molécula de fármaco forma complexo com uma molécula

de ciclodextrina¹⁶, devido à aceitação na cavidade central das CDs de diversos fármacos ou apenas da sua porção lipofílica⁸. Na figura abaixo representada encontra-se esquematizada a formação de um complexo de inclusão fármaco-ciclodextrina assim como algumas vantagens decorrentes da formação do mesmo.

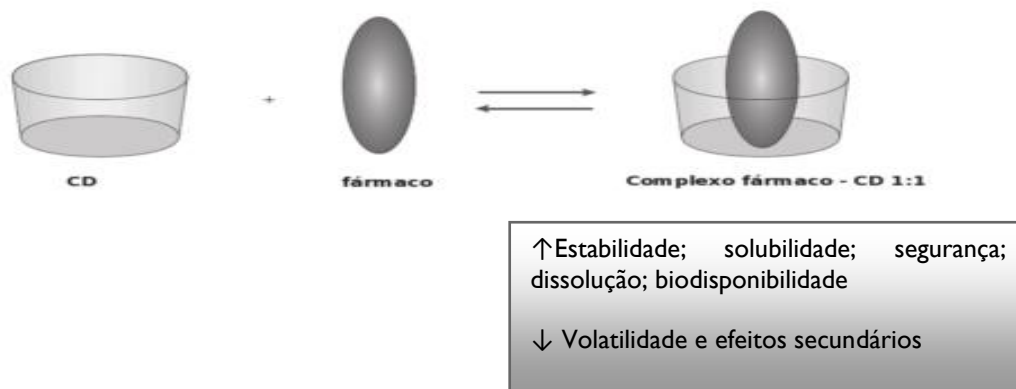


Figura 4 – Formação de um complexo de inclusão na estequiometria de 1:1. Adaptado de ^{9,14}

A cavidade das CDs tem afinidade preferencial para a forma neutra de um substrato, apresentando a capacidade de complexar e solubilizar compostos apolares. A formação de complexos de inclusão está dependente e limitada pela estrutura e propriedades físico-químicas, quer dos fármacos quer das CDs¹. Por exemplo, um fator muito importante a ter em conta é o tamanho da molécula que vai ser encapsulada, que tem que ser compatível com o tamanho da cavidade da ciclodextrina¹³. Durante a formação do complexo de inclusão, não há formação nem quebra de ligações covalentes e as moléculas de fármaco no complexo encontram-se num equilíbrio dinâmico rápido com as moléculas de fármaco livres em solução⁸. O facto de não se formarem ligações covalentes permite que os complexos sejam facilmente dissociáveis em condições fisiológicas¹. As moléculas de fármaco, uma vez dentro da cavidade da ciclodextrina, sofrem ajustamentos conformacionais de forma a obter o máximo partido das ligações não covalentes que se formam, como é o caso das interações de *Van der Waals*. A constante de estabilidade é uma propriedade fundamental que descreve a força de interação entre o fármaco e a ciclodextrina. A eficiência de complexação é outro fator bastante relevante que deve ser tido em conta na escolha da formulação mais adequada. Por razões variadas, deve ser usada a menor quantidade de CDs possível e, para isso, é importante ter em consideração a eficiência de complexação. Numa formulação, ao escolher qual a ciclodextrina mais adequada para aquele fármaco deve-se optar por aquela que apresenta maior eficiência de complexação¹⁶.

A complexação com CDs apresenta inúmeras vantagens, tais como o aumento da estabilidade físico-química, o aumento da solubilidade de fármacos problemáticos, o aumento da biodisponibilidade, proteção contra degradação, entre outros¹⁶.

Geralmente, quanto menor a solubilidade aquosa do fármaco, maior é o aumento relativo da sua solubilidade alcançado com a complexação com a respectiva ciclodextrina. As CDs carregadas conseguem ser efetivos solubilizadores embora este efeito esteja dependente da relativa proximidade da carga com a cavidade da ciclodextrina, uma vez que a capacidade de complexação aumenta assim que a carga se afasta da cavidade da ciclodextrina¹⁶. A tabela seguinte apresenta um resumo das observações gerais dos efeitos da estrutura molecular e das propriedades físico-químicas na formação de complexos fármaco:ciclodextrina.

Tabela 2 – Influência de propriedades moleculares e físico-químicas na formação de complexos. Adaptado de ¹⁶

Propriedade	Consequência
Tamanho da cavidade	Influencia a formação do complexo; A α -CD pode ser utilizada para moléculas pequenas ou para cadeias laterais de moléculas grandes. A β -CD é útil para complexar moléculas com grupos fenóis. A γ -CD é útil para acomodar moléculas grandes, como os antibióticos macrólidos.
Substituição molar ou grau de substituição	As CDs quimicamente modificadas com substituições molares inferiores são frequentemente melhores agentes de complexação do que os derivados com substituições molares superiores.
Solubilidade intrínseca do fármaco	Quanto menor a solubilidade intrínseca do fármaco, maior é o aumento relativo da solubilidade alcançado com a complexação com CDs.
Fármacos hidrofílicos com baixa solubilidade aquosa intrínseca	Fármacos polares com solubilidade aquosa limitada geralmente apresentam baixas capacidades de complexação.
Emparelhamento de iões	O aumento da complexação é observado quando o fármaco e a ciclodextrina têm cargas opostas.

Uma outra propriedade importante das CDs é a sua capacidade de auto-agregação. Em vários estudos utilizando soluções aquosas de CDs, mesmo quando utilizados derivados muito hidrossolúveis, verificou-se que o seu comportamento não seguia equações teóricas, apresentando alguns desvios a estas, devido à formação de agregados¹². Estudos recentes indicam que a presença de agregados de CDs unidos por ligações de hidrogénio em meio aquoso e a sua interação com moléculas de água são as responsáveis por este comportamento das CDs. Vários estudos demonstram que a agregação do tipo micelar das CDs dissolvidas e os seus complexos afetam a solubilização dos fármacos lipofílicos pelas

CDs em solução aquosa e como estes agregados impedem a permeação do fármaco através das membranas semipermeáveis. A figura seguinte representa a formação de agregados de CDs em solução aquosa.

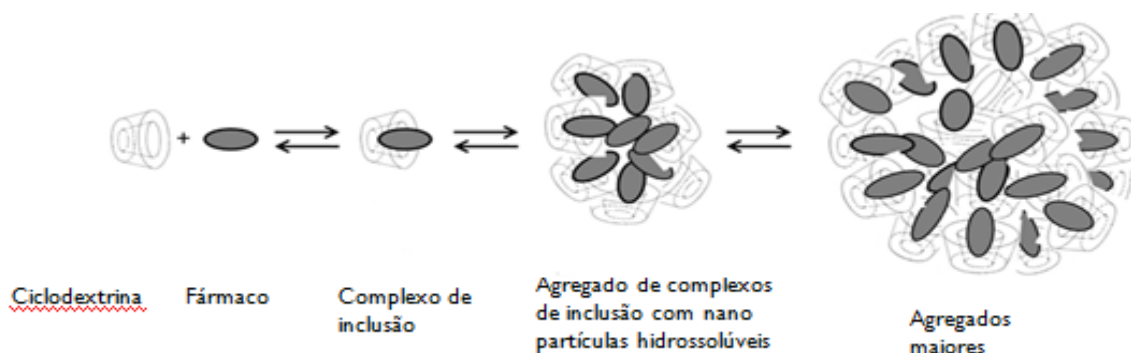


Figura 5 – Formação de agregados de CDs. Adaptado de ¹²

De seguida, são apresentados os resultados que demonstram a existência de uma relação entre o tamanho dos agregados e a concentração de CDs, sendo que a tendência geral é que o tamanho dos agregados aumente com o aumento da concentração das CDs.

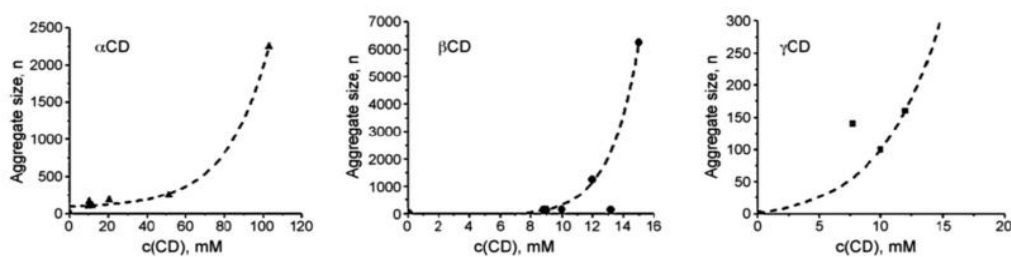


Figura 6 – Relação entre o tamanho dos agregados de CDs e a sua concentração. Adaptado de ¹²

Neste sentido, torna-se importante referir que as CDs formam agregados em solução aquosa e voltam a desagregar, num equilíbrio dinâmico. Por sua vez cada molécula de ciclodextrina tem o seu próprio comportamento dinâmico devido à rotação livre das unidades de glicopiranosose e da rotação molecular global. A estabilização destes agregados é controlada por interações específicas – forças de Van der Waals – e não específicas – ligações de hidrogénio – que se encontram sempre em competição¹².

A tabela seguinte apresenta uma relação entre as variáveis associadas à formação e estabilidade dos agregados de CDs e as propriedades associadas.

Tabela 3 – Formação e Estabilidade dos agregados de CDs em solução aquosa. Adaptado de ¹²

Variável	Propriedades
CDs naturais	As CDs naturais autoagregam-se em soluções aquosas puras de CDs. No entanto, a agregação é muito baixa, menos de 1% de CDs dissolvidas presentes na forma de agregados.
Formação de CI	Formação de complexos de inclusão (CI) favorece a agregação.
Diâmetro do agregado	Depende das propriedades do fármaco e da ciclodextrina e da concentração do CI, aumentando com o aumento da disponibilidade dos complexos.
Grau de agregação	Depende da disponibilidade do complexo fármaco/ciclodextrina em solução aquosa, aumentando com o aumento da disponibilidade destes complexos.
Efeito de solventes orgânicos	A adição de solventes orgânicos conhecidos, conduz a uma diminuição da complexação, reduzindo a agregação. O aquecimento destas soluções também conduz à diminuição da agregação.
Equilíbrio dinâmico	Em soluções aquosas, os agregados dos complexos fármaco:ciclodextrina estão em equilíbrio dinâmico com os complexos desagregados.
Solubilidade limitada	Complexos de CDs naturais apresentam solubilidade limitada em água e têm tendência para precipitar em soluções aquosas na forma de agregados sólidos.

1.3 – Derivados das Ciclodextrinas

As CDs naturais apresentam algumas limitações quer devido à sua baixa solubilidade aquosa e em solventes orgânicos, quer à toxicidade que apresentam quando utilizadas em preparações parenterais, devido ao risco de ocorrer a formação de precipitados¹⁷.

Com o objetivo de aumentar as propriedades físico-químicas e as capacidades de complexação das CDs naturais têm sido desenvolvidos vários derivados químicos destas⁹. A introdução de grupos funcionais nos grupos hidroxilo que formam as ligações de hidrogénio intramoleculares pode alterar a sua capacidade de complexação assim como aumentar consideravelmente a sua solubilidade². As CDs são modificadas nos grupos hidroxilo primários e/ou secundários, onde ocorre a ligação de diversos grupos funcionais¹.

As CDs naturais apresentam 18 (α -CD), 21 (β -CD) ou 24 (γ -CD) grupos hidroxilo passíveis de sofrer derivatização². A derivatização química pode resultar na transformação das CDs cristalinas em estruturas amorfas de diferentes derivados isoméricos, como é o caso da 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (2HP β CD), resultando num aumento da solubilidade aquosa^{1,9}. Por exemplo, a introdução de diferentes substituintes, mesmo com características hidrófobas, como os grupos metilo, num dos grupos hidroxilo que forma ligações de hidrogénio intramoleculares, culmina num aumento significativo da solubilidade da β -CD¹. Devido à diversidade de derivados existentes e aos diferentes posicionamentos que os substituintes podem apresentar, procedeu-se à classificação dos derivados das CDs⁹, que são

na maioria resultantes da β -CD natural¹⁷. É possível identificar três principais grupos de derivados de CDs: derivados hidrófilos, derivados hidrófobos e derivados ionizáveis¹.

Os derivados hidrófilos apresentam capacidade para modificar a taxa de libertação de fármacos pouco solúveis em água, melhorando a sua absorção através das membranas biológicas, resultando na formação de sistemas de libertação imediata de fármacos⁹. Nestes derivados, é possível distinguir três grupos principais. Os derivados metilados em que a hidrossolubilidade é muito superior à da ciclodextrina natural mas que diminui com o aumento da temperatura; estes derivados são muito solúveis em solventes orgânicos, são menos higroscópicos e possuem menor tensão superficial; resultando da metilação seletiva de todos os hidroxilos C₂ secundários e dos C₆ primários, ao passo que os hidroxilos dos C₃ permanecem inalterados¹³, o que se deve ao facto desta substituição favorecer a cavidade hidrófoba e não provocar qualquer impedimento estereoquímico². Os derivados hidroxialquilados em que a sua formação ocorre de forma não seletiva por condensação com os agentes hidroxialquilantes em meio alcalino. Por fim, os derivados ramificados em que os grupos hidroxilo primários ou secundários são substituídos por mono e dissacarídeos através de ligações α -1,6, que apresentam elevada hidrossolubilidade².

As CDs amorfas, como a HP β CD, são utilizadas para inibir o polimorfismo e a taxa de cristalização de fármacos pouco hidrossolúveis durante o seu armazenamento, mantendo as suas características de dissolução e biodisponibilidade oral⁹.

Os derivados hidrófobos, como as CDs etiladas e aciladas, apresentam a capacidade de controlar a taxa e o perfil de libertação de fármacos hidrossolúveis⁹, atuando nas formulações farmacêuticas como transportadores de libertação prolongada de fármacos².

Por outro lado, as CDs ionizáveis podem funcionar como promotores de absorção através de membranas biológicas, na medida em que têm a capacidade de modificar o perfil de libertação de um fármaco e de se ligarem à superfície das membranas celulares. Este grupo apresenta uma hidrossolubilidade e capacidade de complexação dependentes do pH¹³, comportamento que se deve à ionização dos grupos substituintes² sendo bastante requeridas para formulações de libertação retardada com o objetivo de promover a libertação do fármaco ao nível do intestino⁹.

Parte II – Algumas aplicações terapêuticas das ciclodextrinas

De seguida, serão apresentadas algumas aplicações terapêuticas das CDs. Como esta é uma área muito abrangente, apenas serão apresentadas aplicações na área do cancro, de modo a ir ao encontro do tema do presente trabalho.

2.1 – Nanotransportadores de agentes antitumorais contendo ciclodextrinas

Os avanços na quimioterapia e na terapia génica do cancro muito se devem ao progresso na nanotecnologia e biologia molecular. O desenvolvimento de novos sistemas de entrega e de novos esquemas de administração proporciona tratamentos mais efetivos e com menos efeitos secundários. As nanopartículas com um tamanho 100-10000 vezes mais pequeno do que o tamanho de uma célula permitem uma interação única com as biomoléculas, apresentando a capacidade de superar os mecanismos de resistência e assim aumentar a seletividade dos fármacos, diminuindo a toxicidade nos tecidos normais, constituindo uma das principais vantagens da nanotecnologia a entrega vetorizada e seletiva para o alvo terapêutico¹⁸.

A anormal estrutura vascular desempenha um papel importante para o efeito de permeabilidade e retenção (EPR) no tumor que consiste no mecanismo pelo qual um fármaco/prófarmaco constituído por moléculas de elevado peso molecular não direcionadas, é acumulado nos tecidos onde a permeabilidade vascular está aumentada, como se verifica em locais inflamados e em tecidos cancerígenos¹⁸.

Os nanotransportadores baseados em CDs são preparados utilizando uma combinação de duas abordagens num único sistema: a nanotecnologia e as CDs. Assim é importante referir dois aspetos: o fármaco anticancerígeno é complexado com uma ciclodextrina adequada havendo formação de um complexo de inclusão. Este é posteriormente encapsulado no nanotransportador. Assim sendo, na vectorização de fármacos a encapsulação do complexo fármaco:ciclodextrina num nanotransportador potencia as vantagens de ambos, nomeadamente aumenta a capacidade de carga, reduz a toxicidade, permite uma libertação sustentada, controlada e direcionada do fármaco. Resumindo, o complexo fármaco-ciclodextrina otimizado inclui menor agregação, melhor Absorção, Distribuição, Metabolização e Eliminação (ADME), menor toxicidade e maior aceitação pelo doente.

Por outro lado, a administração oral de agentes antitumorais diminui a necessidade de hospitalização, assistência médica e de equipamentos de infusão. As CDs são usadas para encapsulação de fármacos lipofílicos e, demonstraram também a capacidade para inibir a

glicoproteína-P (bomba de efluxo) e o citocromo P450, localizados na superfície dos enterócitos¹⁸.

Com o objetivo de estudar e explorar estas propriedades, o paclitaxel foi complexado com CDs tendo sido depois encapsulado em nanopartículas. O paclitaxel é um fármaco usado no tratamento do cancro do pescoço, pulmão e ovário avançado. Contudo, este fármaco apresenta uma grande desvantagem que é a sua hidrofobicidade que resulta em baixa biodisponibilidade. Foi desenvolvido um sistema transportador nanoparticulado com o objetivo de vetorizar o paclitaxel contra as células alvo, combinando o nanotransportador, a ciclodextrina e o paclitaxel. Curiosamente, a biodisponibilidade do complexo foi de 80%, sendo bastante notável para formulações orais. Este exemplo permite demonstrar o uso promissor das CDs em formulações orais para vectorização de agentes antitumorais¹⁰.

2.2 – Conjugado 5-fluoruracilo ácido acético:β-ciclodextrina (5-FUAC/βCD) para vectorização no cólon

A β-CD é dificilmente hidrolisada, ligeiramente absorvida no estomago e no intestino delgado e é degradada em pequenos sacarídeos pela microflora do cólon, sendo que estas propriedades biodegradativas a tornam um bom transportador para entrega vetorizada de fármacos no cólon. Assim sendo, os conjugados contendo β-CD, nos quais o fármaco se encontra covalentemente ligado à ciclodextrina, podem funcionar como uma fonte de entrega vetorizada no cólon. Recentemente, *Uekama et al.*, sintetizaram o conjugado 5FUAC/βCD visando expandir a aplicação deste fármaco anticancerígeno, constatando-se que o 5-FUAC foi quase completamente libertado do conjugado ao fim de 9 horas¹⁹.

A figura 6 representa a taxa de hidrólise em função do pH, em soluções aquosas. Estes resultados demonstraram que o conjugado não é significativamente sensível à hidrólise química até atingir o cólon, na medida em que após a administração oral em humanos demora cerca de 1-5 horas para que o fármaco passe o estomago e 4-5 horas para que passe o intestino delgado.

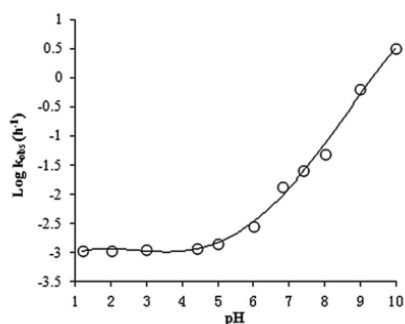


Figura 7 – Constantes de velocidade de hidrólise para diferentes pHs do 5-FUAC/βCD, a 37°C. Adaptado de ¹⁹

Este estudo permitiu demonstrar que é possível uma entrega vetorizada para o cólon através da obtenção de um conjugado que consiga passar pelo estômago e intestino delgado sem haver degradação, sendo que a maior parte do fármaco é libertada no cólon devido à ação de enzimas e bactérias aí existentes.

2.3 – O complexo Abendazol:2HP β CD – aumento da citotoxicidade nas células cancerígenas do ovário

O abendazol é um derivado do benzimidazol com largo espectro contra helmintas humanos e animais. No entanto, também são conhecidas propriedades antitumorais que foram observadas tanto em estudos em animais como em ensaios clínicos piloto. O abendazol é um inibidor do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e da angiogênese e também um potente indutor da apoptose em células resistentes ao paclitaxel-epotilona²⁰. Contudo, apresenta uma solubilidade extremamente baixa e, quando administrado oralmente apresenta uma absorção variável e limitada, devido ao efeito de 1ª passagem. Com o objetivo de ultrapassar estas limitações foi promovida a complexação do fármaco com a 2HP β CD, constituindo uma estratégia biocompatível que permite aumentar a solubilidade do fármaco e apresenta baixa toxicidade em humanos, elevada solubilidade e elevada capacidade para formar complexos²⁰.

O estudo foi realizado recorrendo a uma solução saturada de abendazol, observando-se um aumento linear da solubilidade do fármaco em função do aumento da concentração da ciclodextrina. Com a adição de ácido cítrico (50 mM), esta solubilidade foi ainda superior resultando num complexo de inclusão multicomponente altamente solúvel.

Analisando os resultados, os autores verificaram que o complexo conduziu a um maior grau de inibição celular, quando comparado com a preparação etanólica. A diferença na resposta celular a várias formulações foi mais evidente nas células SKOV-3, observando-se um profundo grau de inibição na presença de HP β CD + ácido cítrico, quando comparado com a HP β CD isolada ou etanol. Nos estudos de formação de colónias, a exposição das células à HP β CD + ácido cítrico levou a uma redução significativa do número de colónias formadas, indicando que a exposição das células aos complexos de inclusão com CDs resultou num efeito inibitório mais prolongado²⁰.

2.4 – Sistema de entrega de fármacos baseados em nanotecnologia utilizados na terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma alternativa bastante promissora para o tratamento de vários tipos de cancro. O seu mecanismo consiste no facto de um agente fotossensibilizador (FS) ter capacidade para transferir energia da luz para outras moléculas sendo administrado em doentes²¹ e depois ativado pela luz com um comprimento de onda específico, resultando numa sequência de processos fotoquímicos que gera, por fim, espécies citotóxicas. No meio delas, singletos de oxigénio levam a uma destruição marcável das estruturas celulares e um irreversível dano causado pela luz nos tecidos tumorais através de diferentes mecanismos moleculares⁴. Na TFD atuam três componentes essenciais: um agente FS, a luz e o oxigénio, sendo que os dois primeiros devem ser inofensivos para a célula alvo²¹.

Os tipos de cancro tratados com a TFD incluem cancros do trato digestivo e esófago, lesões da cabeça e do pescoço, pulmões, mesotelioma pleural maligno, bexiga, cancro de pele, entre outros. Contudo, os resultados clínicos apresentam muitas variações que podem estar relacionadas com a fraca entrega pela luz ao tecido alvo, resistências aos fármacos ou diferente metabolismo do FS em diferentes doentes²¹ e, para além disso, apresentam um perfil físico-químico desvantajoso uma vez que a sua elevada lipofilia e propensão para rápida agregação em meios aquosos fortemente diminui a sua atividade fotobiológica⁴. O sucesso da TFD é limitado devido à dificuldade em administrar o FS com baixa solubilidade aquosa, comprometendo o uso clínico de várias moléculas. A incorporação do FS em sistemas de vectorização nanoestruturados, como as CDs, é uma potencial estratégia que apresenta vantagens para o processo tais como a vectorização apenas para os tecidos tumorais, aumento da permeabilidade e tempo de retenção nos tecidos malignos, o que aumenta o intervalo entre fármaco-luz. Para além disso, também é importante referir que estes sistemas vectorizados para o tumor diminuem a acumulação do FS nos tecidos saudáveis diminuindo assim os efeitos adversos da fotossensibilidade²¹.

Também é de salientar que a conjugação do FS com estas moléculas não tóxicas pode aumentar a sua anfifilicidade, biocompatibilidade e disponibilidade na superfície das membranas das células cancerígenas⁵. A figura seguinte esquematiza sumariamente os pontos principais associados à TFD.

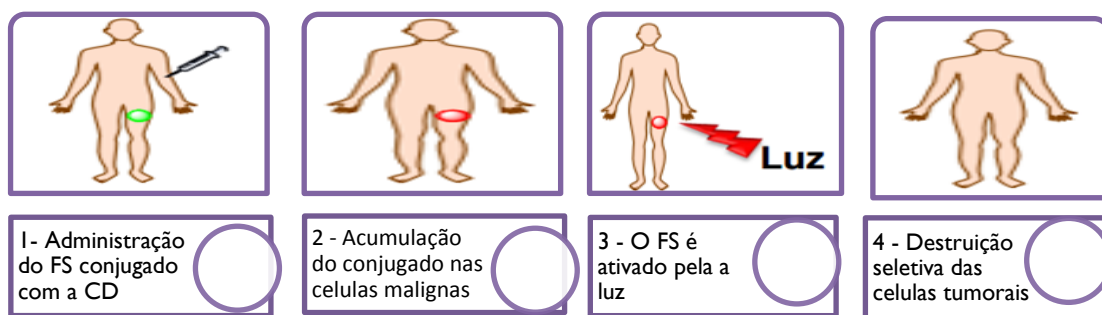


Figura 8 – Mecanismo do FS conjugado com CDs no tratamento do cancro. Adaptado de ²²

As ftalocianinas têm vindo a ser estudadas devido ao seu potencial como FS na TFD, contudo o seu uso na clínica tem sido limitado devido à sua fraca solubilidade aquosa e tendência para formar agregados. O uso de CDs neste campo tem interesse crescente devido à sua capacidade de atuar como molécula hospedeira para várias moléculas hidrofóbicas, estabelecendo ligações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogénio, levando à formação de complexos não covalentes, com propriedades biológicas distintas. No geral, as CDs anfífilas apresentam elevada flexibilidade para a complexação com o FS e elevado potencial para vectorização para os locais-alvo⁴.

Num estudo realizado, foi proposta a formação de nanopartículas contendo CDs incorporando o FS altamente hidrofóbico, Zn-ftalocianina, através do método de evaporação do solvente-emulsão e tendo sido caracterizadas em termos de tamanho, carga de superfície, morfologia e propriedades de libertação. Demonstrou-se que a nanomontagem fotossensibilizante contendo β -CD e Zn-ftalocianina permitiu a entrega do FS altamente lipofílico às células cancerígenas. Devido às suas características anfífilas, a β -CD evidencia capacidade para reunir vesículas biodegradáveis, permitindo uma forte interação com a Zn-ftalocianina que é incorporada na β -CD. Quando submetida a radiação, a nanomontagem demonstrou um efeito fotodinâmico nas células cancerígenas HeLa, comparativamente ao uso do fármaco livre em dimetilsulfóxido (DMSO) apontando assim para o seu potencial uso *in vivo*⁴.

Parte III – A atividade anticancerígena das ciclodextrinas

Anteriormente foram referidos exemplos de aplicações terapêuticas das CDs como transportadores que auxiliam a ação de outros fármacos através de complexação, conjugação e na TFD, melhorando a sua solubilidade, estabilidade, biodisponibilidade e as suas características farmacocinéticas. De seguida, será feita referência à atividade anticancerígena das CDs na sua forma isolada, com o objetivo de esclarecer se esta atividade é um mito ou uma realidade.

A quimioterapia é utilizada no tratamento do cancro sendo expectável que destrua as células tumorais ao mesmo tempo que os efeitos noutros órgãos sejam minimizados. Contudo, os agentes anticancerígenos convencionais, frequentemente, apresentam algumas limitações inesperadas, tais como a fraca distribuição, danos tecidulares e/ou falta de especificidade para o alvo terapêutico²³. Com o objetivo de ultrapassar estas limitações, os avanços nas tecnologias moleculares de vectorização têm revolucionado a terapia do cancro, uma vez que os fármacos vetorizados para um alvo molecular apresentam efeitos anticancerígenos superiores aos agentes anticancerígenos convencionais e por isso também apresentam menos efeitos secundários. Contudo, a resistência à quimioterapia continua, ainda, a ameaçar e a comprometer o tratamento de doentes oncológicos. Desta forma, é urgente a existência de alternativas terapêuticas que aumentem a morte de células cancerígenas, sem causar dano nas células saudáveis, de modo a alcançar um maior sucesso na terapêutica⁶.

3.1 – A importância do colesterol e das jangadas lipídicas

Na atualidade sabe-se que as membranas lipídicas estão muitas vezes associadas à morte celular. O colesterol é um componente abundante nas membranas plasmáticas das células cancerígenas, apresentando um papel essencial na regulação da fluidez, da permeabilidade, função de recetor e de canal iónico da membrana. A distribuição lateral do colesterol na membrana não é uniforme, estando concentrado nas jangadas lipídicas²⁴, que fornecem plataformas de sinalização capazes de ativar várias vias de sinalização celular⁶, de uma forma mais rápida do que se estivessem dispersas na membrana²⁵. Reporta-se que estes microdomínios atuam como plataformas moleculares que espacialmente organizam as moléculas recetoras da membrana, como por exemplo o recetor do fator de crescimento epidermal (EGF). Esta reorganização tem uma importância crucial no início e na regulação dos processos inflamatórios e da apoptose²⁴.

Um outro papel importante das jangadas lipídicas está relacionado com o desenvolvimento, *turnover* e capacidade para formar metástases das células cancerígenas. Como mediadores, ou inibidores, da sinalização entre células e a matriz extracelular, as jangadas lipídicas facilitam a homeostase da célula. Para além disso, vários estudos demonstraram que a sinalização apoptótica das células tumorais, induzida por fármacos ou por *stress*, é largamente mediada por estas. O comprometimento da integridade da membrana celular, através da rutura das jangadas lipídicas, pode quebrar a ativação destes sinais de pró-sobrevivência²⁶.

O metabolismo do colesterol é estritamente regulado de modo a manter o conteúdo apropriado de colesterol nas células saudáveis. Evidências clínicas e experimentais sugerem que perturbações no metabolismo do colesterol podem ter um papel importante na carcinogénese e desenvolvimento de tumores²⁷. Por exemplo, as linhas celulares cancerígenas da mama e da próstata contêm elevados níveis de colesterol e são mais sensíveis à morte por depleção do colesterol do que as células normais da mama e da próstata. Quando células cancerígenas da mama são tratadas com mevalonato, um precursor do colesterol, verifica-se um aumento do crescimento das células tumorais *in vivo* e um aumento da proliferação devido à aceleração da progressão do ciclo celular. Por outro lado, linhas celulares resistentes de leucemia mieloide exibem elevados níveis de hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG CoA), sugerindo que elevados níveis de colesterol celular também podem aumentar a sobrevivência das células leucémicas e proporcionar relativa resistência à quimioterapia⁶. Assim, o conteúdo de colesterol está geralmente aumentado devido à sobre-regulação da HMG CoA, o que leva à coalescência das jangadas lipídicas, causando a estimulação das vias cancerígenas²⁷. Com base neste raciocínio e, sabendo que o colesterol desempenha um papel importante na proliferação celular de várias células cancerígenas, pode-se assumir que agentes que modulam a homeostase do colesterol podem ter um efeito anticancerígeno.

3.2 – Hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPβCD)

Um novo campo de aplicação das CDs foi descoberto pelo grupo do Prof. Arima e Prof. Motoyama, uma vez que a HPβCD demonstrou ser efetiva na inibição da proliferação de células leucémicas em várias linhas celulares deste tipo. A HPβCD é usada clinicamente como excipiente farmacêutico para fármacos com fraca solubilidade aquosa. Esta encontra-se registada em produtos orais, bucais, retais, intravenosos e oftálmicos⁶. Para além disso, é um fármaco órfão aprovado tanto pela *Food and Drug Administration* (FDA) como pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) para o tratamento da doença de *Niemann Pick* tipo C, que

está relacionada com um distúrbio fatal do metabolismo do colesterol. Embora o mecanismo ainda não seja bem conhecido, o reduzido nível de colesterol no cérebro de crianças portadoras desta doença rara demonstra que a HP β CD tem influência na acumulação e no metabolismo do colesterol. Neste sentido, estudar este efeito da HP β CD parece ser bastante importante⁷.

As CDs interagem com componentes da membrana celular, como o colesterol e os fosfolípidos, resultando na indução da hemólise em concentrações mais elevadas⁶. A HP β CD pode ter um efeito anticancerígeno dado que é bem conhecida a sua capacidade de ligação ao colesterol. Foi este argumento que levou ao desenvolvimento da hipótese de trabalho de grupos japoneses que iniciaram o estudo com a leucemia⁷ e que serão apresentados de seguida.

Inicialmente foi avaliado o efeito da HP β CD na viabilidade das células leucémicas tendo sido utilizadas 14 linhas celulares nas experiências *in vitro*. A viabilidade destas linhas celulares foi inibida de uma forma tempo e concentração dependentes pela HP β CD. Os valores de IC₅₀ desta ciclodextrina para estas linhas celulares variaram entre 3.9 e 10.1 mM, ao passo que, em hepatócitos normais este valor foi de 18.7 mM, o que indica uma maior suscetibilidade destas células cancerígenas para a HP β CD comparativamente com células normais⁷, levando-nos a concluir que esta ciclodextrina pode inibir o crescimento de várias linhas celulares leucémicas.

Vários mecanismos que comprovam a inibição do crescimento celular através da indução da apoptose e do bloqueio do ciclo celular G2/M pela HP β CD têm sido postulados e evidenciados experimentalmente. A coloração com Anexina V foi utilizada para determinar a apoptose celular, demonstrando que a HP β CD induz a apoptose nas células de uma forma dependente do tempo e da dose⁷. A aceleração dos processos e sinais apoptóticos nas células cancerígenas é uma das estratégias da terapia anticancerígena²⁴. Foi também observado que a HP β CD impede o crescimento celular através da inibição do desenvolvimento celular normal, o que foi comprovado pela sub-expressão de alguns reguladores do ciclo celular G2/M nas células tratadas com HP β CD⁷.

Por outro lado, é conhecida a existência de doentes que são resistentes ao tratamento com os convencionais inibidores do tirosina cinase, como o imatinib, nilotinib e dasatinib, devido à presença da mutação T315I. No entanto, as leucémicas Ba/F3 que expressam esta mutação foram tratadas com sucesso com HP β CD com um IC₅₀ similar ao inibidor do tirosina cinase de terceira geração, o ponatinib, o único inibidor do tirosina cinase eficaz nas células portadoras desta mutação^{6,7}.

De forma a estudar o efeito em células leucémicas não diferenciadas, as células K562 e KCL22/HA foram tratadas com HP β CD. Foram obtidos valores de IC₅₀ semelhantes aos obtidos com as células parenterais, o que demonstra que a HP β CD é efetiva não só na proliferação de células leucémicas mas também de células leucémicas indiferenciadas inativas⁶.

Outro estudo realizado permitiu demonstrar que a formação de colónias de células mononucleares em doentes com leucemia mieloide crónica (LMC) foi inibida de uma forma concentração dependente na presença de HP β CD. Concluindo-se que esta ciclodextrina inibe a proliferação de células leucémicas adaptadas a hipoxia, bem como a formação de colónias de células humanas leucémicas primárias⁶.

Recentemente foi demonstrado que a metil- β -ciclodextrina (M β CD) induz a apoptose em algumas linhas celulares de cancros sólidos, possivelmente devido à depleção do colesterol a partir das membranas lipídicas. Com o objetivo de esclarecer se a apoptose induzida pela HP β CD está também associada à depleção do colesterol, avaliou-se o efeito das CDs no efluxo do colesterol em células leucémicas. O tratamento com M β CD ou com HP β CD resultou num aumento da libertação do colesterol de uma forma dependente do tempo e da dose. Concentrações mais elevadas de colesterol foram libertadas a partir das células tratadas com M β CD relativamente às células tratadas com HP β CD. Assim, a concentração intracelular de colesterol nas células incubadas com M β CD foi menor do que nas células tratadas com HP β CD. Curiosamente, o conteúdo de colesterol nos hepatócitos não foi afetado com o tratamento com a mesma concentração de HP β CD, ao contrário do que se passou com o tratamento com M β CD, que também diminuiu o conteúdo de colesterol nestas células⁶.

Assim sendo, o mecanismo de afinidade para o colesterol, necessário para a proliferação de células leucémicas, parece ser o fator mais importante, assumindo-se que o efeito seletivo da HP β CD poderá ter um papel importante na terapêutica⁷.

A expressão e o estado de fosforilação das proteínas de sinalização Akt, Erk, Stat5 e Lyn foram estudados com o objetivo de verificar se as vias de transdução do sinal estavam envolvidas no mecanismo. Nas linhas celulares leucémicas BV173, a fosforilação da Akt, Stat5 e Lyn foi inibida ao passo que nas linhas celulares ERK1/2 esta foi aumentada. Na linha celular leucémica K562, o nível de p-Lyn foi reduzido, em primeiro lugar devido ao tratamento com HP β CD e, mais tarde, devido à recuperação. Os níveis de ERK1/2 aumentaram. Com estes resultados, pode-se concluir que dependendo do tipo de célula, diferentes vias de transdução são alteradas pela HP β CD.

Todos estes resultados sugerem que a HP β CD é um potencial agente anticancerígeno, induzindo o efluxo do colesterol seletivamente nas linhas celulares leucémicas, a apoptose celular, a repressão do ciclo celular e afetando algumas proteínas de sinalização. Por outro lado, a HP β CD não apresentou toxicidade associada quando foi administrada em ratos nas concentrações mais elevadas.

O aumento da síntese endógena do colesterol parece ser uma propriedade comum do cancro uma vez que para as células proliferarem rapidamente necessitam de mais colesterol para a síntese de novas membranas⁶, e por isso, a HP β CD pode ser efetiva não apenas na leucemia mas também noutros tipos de cancro⁷.

Resumindo, este estudo evidenciou que o efluxo do colesterol mediado pela HP β CD inibe a proliferação das células leucémicas. Demonstrou-se que tanto a M β CD como a HP β CD são usadas como agentes depletos do colesterol. Também foi evidenciado que a M β CD tem uma maior capacidade de extração do colesterol do que a HP β CD, provavelmente devido ao aumento do espaço da cavidade hidrofóbica da ciclodextrina e, também por este motivo, a M β CD apresenta maior toxicidade. Os resultados deste estudo indicam que a administração de HP β CD inibe efetivamente não apenas o crescimento de várias células cancerígenas leucémicas mas também inibe o crescimento de células cancerígenas de LMC resistentes ao imatinib incluindo as que possuem a mutação T315I e as células LMC não diferenciadas, indicando que a HP β CD apresenta um potencial anti leucémico independente do tipo de leucemia e de diferentes características⁶.

In vivo, verificou-se que a administração sistémica de HP β CD em modelos de murino com leucemia demonstrou que esta ciclodextrina inibe a progressão da doença, resultando num aumento da sobrevivência⁶.

Por outro lado, a HP β CD induz a apoptose e o bloqueio do ciclo celular G2/M *in vitro*, prolongando a sobrevivência em modelos de murino com leucemia.

A toxicidade desta ciclodextrina foi também alvo de estudo concluindo-se que esta é bem tolerada em muitas espécies, demonstrando toxicidade limitada dependendo da dose e da via de administração⁶.

3.3 – Metil-beta-ciclodextrina (M β CD)

A M β CD é utilizada como agente disruptivo das jangadas lipídicas, devido à sua capacidade de extração do colesterol e dos esfingolípido destes microdomínios⁶, causando a depleção das suas reservas na membrana celular¹². Um elevado número de estudos também demonstrou que a rutura das jangadas lipídicas pode provocar dano nas células cancerígenas

e causar a morte celular. Embora o mecanismo fundamental para a indução da apoptose pela M β CD ainda não seja bem conhecido, acredita-se que tanto a concentração intracelular de cálcio como as vias de sinalização da mitocôndria desempenham um papel importante²⁶.

O recetor do folato é uma proteína de ligação de alta afinidade que se encontra ligada à membrana plasmática. Este recetor encontra-se sobreexpresso em muitas células tumorais apresentando uma baixa expressão em células normais. Recentemente numa tentativa de conferir atividade citotóxica seletiva para as células tumorais à M β CD, sintetizou-se o conjugado M β CD:folato²³. Quando comparado com anticorpos ligados a fármacos, o folato conjugado com esta ciclodextrina apresenta numerosas vantagens, tais como: elevada estabilidade físico-química; a farmacocinética depois de administração intravenosa é raramente afetada pelas proteínas do soro devido ao seu baixo peso molecular; não ocorre diferenças na bioatividade de lotes uma vez que o produto é quimicamente sintetizado¹⁰. De modo a esclarecer a atividade anticancerígena do conjugado, avaliou-se o seu efeito nas células KB (com recetor do folato positivo) e nas células A549 (com recetor do folato negativo). Analisando os resultados do estudo verificou-se que o conjugado exibiu atividade anticancerígena potente, comparando com a M β CD, nas células KB mas não nas células A549. Adicionalmente, nas células do colon 26 (com recetor de folato positivo), o conjugado demonstrou ter atividade anticancerígena potente, comparativamente à M β CD. Assim, estes resultados permitiram sugerir que o conjugado tem atividade anticancerígena seletiva para as células que expressam o recetor do folato²³.

Num outro estudo, investigou-se se o conjugado folato:M β CD apresentava um efeito anticancerígeno seletivo para as células do melanoma que expressam o recetor do folato alfa²⁸. Através dos resultados obtidos constatou-se que o conjugado induzia efeitos citotóxicos nas células lhara, linha celular de melanoma humano, expressando o recetor do folato, e promoveu a formação do autofagossoma *in vitro*, indicando o envolvimento da autofagia no efeito citotóxico. Além disso, o conjugado suprimiu o crescimento do tumor em ratos inoculados com células lhara. Estes resultados permitiram concluir que o FAM β CD pode ser utilizado como agente anticancerígeno, através da regulação da autofagia, na quimioterapia do melanoma²⁸.

Num estudo utilizando a videomicroscopia numa linhagem tumoral de mama verificou-se que as células cujas jangadas lipídicas foram desorganizadas pela M β CD migraram 80% menos do que as células controlo. Utilizando a mesma técnica numa linhagem tumoral do pulmão observou-se uma diferença de 40% entra as células tratadas com M β CD e as células do grupo controlo²⁵.

Estudos realizados permitiram observar que a ativação induzida pelas citocinas do sinal extracelular que regula a sinalização do cinase/esfingosina cinase I (ERK/SPKI) é bloqueada na presença de um pré-tratamento com M β CD. Estes resultados indicam que a via de sinalização ERK/SPKI tem um papel importante na mediação dos efeitos da M β CD. Os níveis de ERK e SPKI foram monitorizados para elucidar os mecanismos que estão subjacentes aos efeitos que ocorrem quando células com LMC são tratadas com M β CD. Verificou-se que a expressão destas duas moléculas, assim como a atividade da SPKI, estava sub-regulada depois do tratamento com M β CD, indicando que a sinalização do ERK/SPKI está envolvida na morte celular induzida por esta ciclodextrina²⁶.

Na LMC, o tirosina cinase Bcr-Abl está constitutivamente ativada. O imatinib ocupa o sítio de ligação de ATP no Bcr-Abl mantendo-o na conformação inativa e, por isso, é largamente utilizado no tratamento desta doença. Contudo, a resistência ao imatinib pode ocorrer, particularmente durante a fase de crise blástica, representando um obstáculo no tratamento de alguns doentes. Para ultrapassar esta resistência várias abordagens têm sido estudadas incluindo a conjugação do imatinib com um inibidor das jangadas lipídicas, a M β CD, cujo resultado se traduziu num efeito marcante e sinérgico nas células humanas de LMC, quando comparado com a administração do agente isolado²⁶. Assim, o tratamento com imatinib em combinação com a M β CD culminou numa maior sensibilidade das células ao imatinib e aumento da morte celular das células com LMC, comparativamente ao tratamento individual.

Estudos recentes indicam que a aquisição de resistências ao imatinib se deve a mutações no domínio do cinase Bcr-Abl. Neste estudo, a M β CD reduziu a expressão do Bcr-Abl, em doses elevadas. A combinação destes dois inibidores causou uma maior depleção dos níveis de Bcr-Abl e dos níveis de Bcr-Abl T3151, mais do que um agente isolado. Assim, com base nestes resultados pode-se concluir que a resistência ao imatinib pode ser ultrapassada pela atividade sinérgica de fármacos combinados²⁶.

Assim sendo, a M β CD apresenta capacidade para inibir a proliferação e a sobrevivência celular aumentando a apoptose das células cancerígenas por causar a depleção das suas reservas de colesterol e pelo bloqueio de vias de sinalização.

Num outro estudo realizado, verificou-se que a M β CD potencialmente provoca a apoptose nas células M213 (linha celular do colangiocarcinoma), células KB (linha celular do cancro oral escamoso), células Ihara (linha celular de melanoma humano muito pigmentado), devido à depleção do colesterol nas jangadas lipídicas. Para além disso, é muito provável que os efeitos solubilizadores da M β CD resultem na indução da apoptose porque esta apresenta

uma elevada atividade hemolítica através do efeito solubilizador do colesterol. Além disso, a atividade citotóxica da M β CD é potencialmente inibida quando há adição de colesterol ao meio de cultura e, neste sentido, os resultados sugerem que a depleção de colesterol nas jangadas lipídicas tem um papel crucial na indução da apoptose pela M β CD²⁴.

Por fim, foi demonstrado que a M β CD apresenta atividade anti tumoral *in vivo* depois de uma injeção intratumoral nas células 26 do cólon de rato. No mesmo estudo, constatou-se também que a atividade anti proliferativa da M β CD é superior à da doxorubicina após injeção intraperitoneal em ratinhos nus xenoenxertados com células tumorais MCF7 e A2789. Contudo, a administração intravenosa da M β CD não demonstrou atividade anti tumoral significativa, provavelmente devido à falta de especificidade para as células tumorais e rápida eliminação corporal²⁴.

Embora o efeito anticancerígeno da M β CD tenha vindo a ser conhecido, a toxicidade das CDs metiladas tem impedido o seu desenvolvimento enquanto fármacos⁷. O seu uso sistémico está limitado devido à potencial toxicidade, nomeadamente o efeito hemolítico nos eritrócitos, nefrotoxicidade, devido à sua elevada atividade superficial e capacidade de inclusão⁶.

Parte IV – Conclusões e Perspetivas Futuras

O presente trabalho permitiu constatar que as CDs passaram de simples excipientes farmacêuticos, a moléculas de grande interesse. As características multifuncionais das CDs naturais e dos seus derivados químicos estão cada vez mais a ser aproveitadas como ferramentas valiosas na conceção de novas aplicações terapêuticas, muito em particular na área anticancerígena, na qual se verifica a existência de vários estudos de investigação utilizando CDs.

Evidências científicas demonstram que as CDs poderão apresentar os requisitos mais importantes de um transportador de fármacos, devido à sua capacidade de libertar o fármaco apenas no seu alvo terapêutico. Diversos estudos realizados comprovam que, para tal, é necessária a formação de conjugados nos quais o fármaco se encontra covalentemente ligado à ciclodextrina, evitando a possibilidade de dissociação antes de atingir o alvo. Um exemplo concreto é a utilização das CDs como sistemas de libertação específica no cólon que permitem que os fármacos sejam libertados apenas no cólon, como resultado da sua degradação enzimática. Também se demonstrou a importância da complexação de fármacos com as CDs para melhorar as suas propriedades farmacocinéticas, nomeadamente a estabilidade, a solubilidade e a biodisponibilidade.

Por outro lado ficou também demonstrado que o colesterol desempenha um papel fundamental para a proliferação de células cancerígenas e, tendo este aspeto em consideração, conclui-se que agentes que modulam a homeostase do colesterol têm uma potencial atividade anticancerígena, como é o caso dos derivados hidrofílicos da β -CD, especificamente a HP β CD e a M β CD, provando-se assim a atividade anticancerígena das CDs na sua forma isolada.

Também se demonstrou que a HP β CD perturba a homeostase do colesterol e inibe a proliferação das células leucémicas, através da indução da apoptose e bloqueio do ciclo celular, sugerindo que apresenta um amplo efeito anticancerígeno independente das características celulares. A descoberta do efeito anticancerígeno da HPBCD na leucemia constitui provavelmente uma das mais importantes descobertas sobre CDs realizadas em 2015. Entretanto, estão a ser planeados ensaios clínicos em humanos para verificar a eficácia e a segurança da HPBCD no tratamento da leucemia.

Finalmente, conclui-se que são necessários mais estudos noutros tipos de cancros para que se possa aprofundar mais este assunto, nomeadamente a toxicidade associada e se verifique a aplicabilidade das CDs noutros cancros. Tendo em conta as evidências demonstradas pode-se concluir que a atividade anticancerígena das CDs é uma realidade.

Referências Bibliográficas

- 1 – VEIGA, F.; FIGUEIRAS, A.R. – **Libertação modificada por inclusão do fármaco em ciclodextrinas**. Em: *Novas Formas Farmacêuticas para administração de fármacos*, Porto: edições Universidade Fernando Pessoa, 2011, ISBN: 978-989-643-078-8, p. 347-357.
- 2 – VEIGA, F.; PECORELLI, C.; RIBEIRO, L. – **Ciclodextrinas e os seus complexos de inclusão**. Em: *As ciclodextrinas em Tecnologia Farmacêutica*, Coimbra: Edições MinervaCoimbra, 2006, ISBN: 972-798-174-7, p. 11-32.
- 3 – VENTURINI, C.G.; NICOLINI, J.; MACHADO, C.; MACHADO, V.G. (2008). Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. **Química Nova**, 31 (2), 360-368. DOI 10.1590/S0100-40422008000200032.
- 4 – CONTE, C.; SCALA, A.; SIRACUSANO, G.; LEONE, N.; PATANÈ, S.; UNGARO, F.; MIRO, A.; SCIORTINO, M.T.; QUAGLIA, F.; MAZZAGLIA, A. (2014). Nanoassembly of an amphiphilic cyclodextrin and Zn(II)-phthalocyanine with the potential for photodynamic therapy of cancer. **The Royal Society of Chemistry**, 4 (83), 43903-43911. DOI 10.1039/c4ra07847k.
- 5 – LOURENÇO, L.M.O.; PEREIRA, P.M.R.; MACIEL, E.; VÁLEGA, M.; DOMINGUES, F.M.J.; DOMINGUES, M.R.M.; NEVES, M.G.P.M.S.; CAVALEIRO, J.A.S.; FERNANDES, R.; TOMÉ, J.P.C. (2014). Amphiphilic phthalocyanine-cyclodextrin conjugates for cancer photodynamic therapy. **The Royal Society of Chemistry**, 50, 8363-8366. DOI 10.1039/c4cc02226b.
- 6 – YOKOO, M.; KUBOTA, Y.; MOTOYAMA, K.; HIGASHI, T.; TANIYOSHI, M.; TOKUMARU, H.; NISHIYAMA, R.; TABE, Y.; MOCHINAGA, S.; SATO, A.; SUEOKA-ARAGANE, N.; SUEOKA, E.; ARIMA, H.; IRIE, T.; KIMURA, S. (2015). 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin Acts as a Novel Anticancer Agent. **PLoS ONE** 10 (11) DOI 10.1371/journal.pone.0141946.
- 7 – CYCLOLAB (Dezembro 2015). HP β CD as anticancer drug. **Cyclodextrin News**, 29 (12), 1-4. ISSN 0951-256X. Acedido a 21 março 2016. Disponível em http://cyclolab.hu/images/CDNews/cdn_2015_dec.pdf

8 – JAMBHEKAR, S.; BREEN, P. (2016). Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: Structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**, 21 (2), 356-362. DOI 10.1016/j.drudis.2015.11.017.

9 – OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; COELHO, P. - Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa. 2009. 6, 70-83. ISSN 1646-0480.

10 – LAKKAKULA, J.R.; KRAUSE, R.W.M. (2014). A vision for cyclodextrin nanoparticles in drug delivery systems and pharmaceutical applications. **Nanomedicine**, 9 (6), 877-894. ISSN 1743-5889.

11 – HAN, R.; LI, J.; SHIN, H.; CHEN, R.; DU, G.; LIU, L.; CHEN, J. (2013) Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. **Biotechnology Advances** 32, 415-428. DOI 10.1016/j.biotechadv.2013.12.004.

12 – RYZHAKOV, A.; THI, T.D.; STAPPAERTS, J.; BERTOLETTI, L.; KIMPE, K.; COUTO, A.R.S.; SAOKHAM, P.; MOOTER, G.V.; AUGUSTIJNS, P.; SOMSEN, G.; KURKOV, S.; INGHELBRECHT, S.; ARIEN, A.; JIMIDAR, M.I.; SCHRIJNEMAKERS, K.; LOFTSSON, T. (2016) Self-Assembly of Cyclodextrins and Their Complexes in Aqueous Solutions. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 1-14. DOI 10.1016/j.xphs.2016.01.019.

13 – RIBEIRO, A.M. (2008). *Preparação, caracterização e aplicação de complexos de inclusão de miconazol com metil-β-ciclodextrina: administração bucal*. (Dissertação de Mestrado em Tecnologia Farmacêutica), Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Acedido a 18 julho 2016. Disponível em <https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/7375/2/Dissertao.doc>

14 – SUBHRASEEMA DAS (2016). Design and Physico-Chemical Properties of Cyclodextrin Incorporated Hydrogels: Application towards Controlled Delivery of Drugs. (Tese de Doutoramento), Department of chemistry national institute of technology, rourkela odisha. Acedido a 21 julho 2016. Disponível em

http://ethesis.nitrkl.ac.in/6961/1/2015_DasS_PhD_510CY302.pdf

15 – TEIXEIRA, A. C. L. S. (2012). *Interação de fármacos com ciclodextrinas: formação de complexos de inclusão em solução*. (Trabalho apresentado para obtenção do grau do Ciclo Integrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto. Acedido a 21 julho 2016. Disponível em http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/3573/6/T_11657.pdf

16 – JAMBHEKAR, S.; BREEN, P. (2016). Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: Structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**, 21 (2), 363-368. DOI 10.1016/j.drudis.2015.11.016.

17 – SALTÃO,R.; VEIGA, F. (2001) Ciclodextrinas em novos sistemas terapêuticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 37 (1), 1-17.

18 – GIDWANI, B.; VYAS, A. (2015). A Comprehensive Review on Cyclodextrin-Based Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Cytotoxic Anticancer Drugs. **BioMed Research International**, 1-15. DOI 10.1155/2015/198268.

19 – WEI, S. J.; LUO, S. X.; HUANG, Q.; XU, L. S.; WANG, Z. Z. (2015). Regioselective synthesis, stability and release behaviors of the secondary 5-fluorouracil acetic acid/ β -cyclodextrin conjugate for colon delivery. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, 84, 43-47. DOI 10.1007/s10847-015-0580-1.

20 – POURGHOLAMI, M. H.; WANGOO, K. T.; MORRIS, D. L. (2008). Albendazole-cyclodextrin complex: Enhanced cytotoxicity in ovarian cancer cells. **Anticancer Research**, 28, 2775-2780.

21 – CALIXTO, G. M. F.; BERNAGOSSI, J.; FREITAS, L. M.; FONTANA, C.R.; CHORILLI, M. (2016). Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. **Molecules**, 21, 1-18. DOI: 10.3390/molecules21030342.

22 – BASTOS, M.M.; BOECHAT, N.; GOMES, A. T. P. C.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. (2012). O uso de porfirinas em terapia fotodinâmica no

tratamento da leishmaniose cutânea. **Revista Virtual de Química**, 4 (3), 257-267. ISSN: 1984-6835.

23 – ONODERA, R.; MOTOYAMA, K.; OKAMATSU, A.; HIGASHI, T.; ARIMA, H. (2013). Potential use of folate-appended methyl- β -cyclodextrin as an anticancer agent. **Scientific reports**, 3, 1-9. DOI 10.1038/srep01104.

24 – ONODERA, R.; MOTOYAMA, K.; OKAMATSU, A.; HIGASHI, T.; KARIYA, R.; OKADA, S.; ARIMA, H. (2013). Involvement of cholesterol depletion from lipid rafts in apoptosis induced by methyl-beta-cyclodextrin. **International Journal of Pharmaceutics**, 453, 116-123. DOI 10.1016/j.ijpharm.2013.04.071.

25 – BIANCOVILLI, P. (2014). Portal do Programa de Oncobiologia. O papel do colesterol na migração celular. Acedido a 10 julho 2016. Disponível em http://www.oncobiologia.bioqmed.ufrj.br/noticias_onconews_detalhes.asp?id=711

26 – YAN, J.; LI, Q.; WANG, L.; WANG, H.; XIAO, F.; YANG, Y.; WU, C. (2012). Methyl- β -cyclodextrin induces programmed cell death in chronic myeloid leukemia cells and, combined with imatinib, produces a synergistic downregulation of ERK/SPK1 signaling. **Anticancer Drugs**, 23, 22-31. DOI 10.1097/CAD.0b013e32834a099c.

27 – RESNIK, N.; REPNIK, U.; KREFT, M.E.; SPECIC, K.; MACEK, P.; TURK, B.; VERANIC, P. (2015) Highly Selective Anti- Cancer Activity of Cholesterol-Interacting Agents Methyl- β -Cyclodextrin and Ostreolysin A/ Pleurotolysin B Protein Complex on Urothelial Cancer Cells. **PLoS ONE** 10(9), 1-19. DOI 10.1371/ journal.pone.0137878.

28 – MOTOYAMA, K.; ONODERA, R.; TANAKA, N.; KAMEYAMA, K.; HIGASHI, T.; KARIYA, R.; OKADA, S.; ARIMA, H. (2015). Evaluation of Antitumor Effects of Folate-Conjugated Methyl- β -cyclodextrin in Melanoma. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, 38 (3), 374-379.