

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANDRÉ LUÍS BRANCO DE BARROS

**EMPREGO DO COMPLEXO ^{99m}Tc -HYNIC-BOMBESINA₍₇₋₁₄₎ LIVRE E
ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS NA IDENTIFICAÇÃO DE TUMORES
EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

BELO HORIZONTE

-2012-

ANDRÉ LUÍS BRANCO DE BARROS

**EMPREGO DO COMPLEXO ^{99m}Tc -HYNIC-BOMBESINA₍₇₋₁₄₎ LIVRE E
ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS NA IDENTIFICAÇÃO DE TUMORES
EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

Tese, como requisito parcial, para obter o grau de doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso

Co-Orientadora: Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira

Colaboradores: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes – UFMG/ICB

Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali – UFMG/ICB

Prof. Dr. Abass Alavi – University of Pennsylvania

Prof. Dr. Andrew Tsourkas – University of Pennsylvania

BELO HORIZONTE

-2012-

B277e Barros, André Luís Branco de
Emprego do complexo ^{99m}Tc -Hynic-bombesina₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado em lipossomas na identificação de tumores em modelos experimentais / André Luís Branco de Barros. – 2012.
152 f. : il.

Orientador: Dr. Valbert Nascimento Cardoso.
Co-Orientadora: Dra. Mônica Cristina de Oliveira.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Bombesina, cintilografia – Teses. 2. Ehrlich – Teses. 3. MDA-MB-231m - Teses. 4. Tecnécio-99m - Teses. 5. Câncer de mama - Teses. I. Cardoso, Valbert Nascimento. II. Oliveira, Mônica Cristina de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD:616.994


FOLHA DE APROVAÇÃO

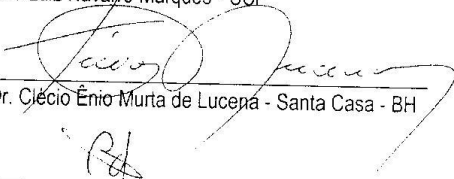
ANDRÉ LUÍS BRANCO DE BARROS


**"EMPREGO DO COMPLEXO ^{99m}Tc - HYNIC - BOMBESINA (7-14)
LIVRE E ENCAPSULADO EM LIPOSSOMAS NA IDENTIFICAÇÃO DE
TUMORES EM MODELOS EXPERIMENTAIS"**

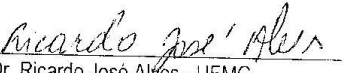
Tese, como requisito parcial para obter o grau de Doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em quatro de maio de 2012.

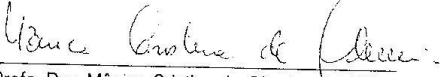
COMISSÃO EXAMINADORA

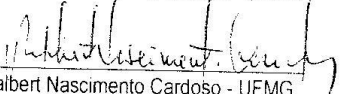

Dr. Fábio Luiz Navarro Marques - USP


Prof. Dr. Clécio Ênio Murta de Lucena - Santa Casa - BH


Prof. Dr. Frederic Jean Georges Frezard - UFMG


Prof. Dr. Ricardo José Alves - UFMG


Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira - UFMG


Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso - UFMG

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial, a minha mãe e meus irmãos (Átila e Carla) pelo carinho e apoio incondicional durante toda minha vida.

À Flaviana pelo incentivo, amor e companheirismo. Por estar sempre ao meu lado em todos os momentos, mesmo que a quilômetros de distância.

Ao Valbert, meu orientador, pela amizade e confiança depositada, pelos muitos ensinamentos e conselhos.

À Mônica por estar sempre disposta a ajudar, pela amizade e pelo apoio.

Aos grandes amigos, Luciene e Guilherme, por estarem sempre presentes e dispostos a ajudar seja na vida pessoal ou profissional. Obrigado por tudo!

A todos os professores (Mônica, Ricardo, Gilson, Lucas, Armando, Valbert, Simone, Geraldo Brasileiro, Geovanni, Alfredo, Abass Alavi e Andrew Tsoukas) que de alguma forma fizeram parte deste período, sempre dispostos a colaborar seja com as excelentes aulas, ou simplesmente com conselhos e ideias, que nortearam meu caminho durante o doutorado.

A todos os amigos do Laboratório de Radioisótopos. Ao Vanderli e a Etna, por sempre serem tão prestativos. Aos colegas pós-graduandos das ciências farmacêuticas e de alimentos, pelo companheirismo e pelos excelentes momentos compartilhados, especialmente ao Leo, Rosana, Mirelle, Simone e Iara. A todos os alunos de IC que passaram pelo laboratório, obrigado pela ajuda.

As minhas queridas alunas de iniciação, Carol e Marina, por toda a ajuda prestada e pela amizade.

Aos amigos do laboratório de Farmacotécnica pela amizade e por todos os momentos felizes que passamos juntos, em especial para os amigos Cristiane, Dani, Daniel, Diego, Eduardo, Elaine, Juliana e Sália.

Ao professor Geovanni e a Cristina, pela importante colaboração nas análises histopatológicas e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Ao professor Alfredo Góes e suas alunas Caryne, Cristiane e Natássia por colaborarem com este trabalho cedendo as células tumorais.

A todos os professores (Abass Alavi e Andrew Tsoukas) e colegas (Ajlan, James, Ching, Kido, Babak, Alex, Tom, Ann-Marie e Roushan) da Universidade de Pensilvania pelos excelentes momentos vividos durante o período de doutorado sanduíche.

Aos funcionários do biotério da Faculdade de Farmácia (Adelaide e Batista) por serem sempre prestativos. Um agradecimento especial a Adelaide pela grande ajuda com os animais nude.

A todos os amigos da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela convivência agradável.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de doutorado e doutorado sanduíche concedidas.

A todos que, de alguma maneira, colaboraram para a realização desse trabalho.

RESUMO

O câncer de mama é um dos tumores de maior incidência entre a população feminina apresentando elevados índices de mortalidade. Por isso, tem-se a busca incessante por técnicas de diagnóstico precoce que facilitem o tratamento, aumentando as chances de cura dos pacientes. Nos últimos anos, o uso de peptídeos radiomarcados para diagnóstico e/ou tratamento tem gerado bastante interesse devido a maior expressão de receptores para esses peptídeos em certos tipos de tumores. O peptídeo bombesina é um tetradecapeptídeo de origem anfíbia que se liga, de maneira específica, a receptores para o peptídeo liberador de gastrina presente em diversos tumores como mama, próstata e pulmão. Assim, os derivados deste peptídeo, se radiomarcados, podem ser úteis na identificação destes tipos de cânceres. Na grande maioria dos procedimentos em medicina nuclear convencional são utilizados átomos de tecnécio-99m como emissores das radiações que irão gerar as imagens cintilográficas, pois este apresenta adequada meia-vida (6,01 h), emissão γ de baixa energia (140 keV), além de um custo relativamente baixo. Para a marcação de peptídeos são utilizados agentes quelantes, como o ácido hidrazinonicotínico (HYNIC), que é facilmente conjugado ao peptídeo e apresenta bons rendimentos de marcação. Lipossomas são pequenas vesículas constituídas de uma bicamada lipídica e que podem ser usados para transportar substâncias até o local de interesse, como tumores. Os lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada apresentam boa seletividade para o tecido tumoral devido a sua instabilidade em locais de menor pH, como inflamações, infecções e tumores, podendo aumentar a disponibilidade do radiotraçador no tecido em análise. Neste trabalho é relatada a marcação do derivado HYNIC- β Ala-bombesina₍₇₋₁₄₎ com átomos de tecnécio-99. Além da avaliação do complexo formado, livre ou encapsulado em lipossomas pH-sensíveis, quanto seu potencial para a identificação de tumores de Ehrlich e mama da linhagem MDA-MB-231. Os resultados obtidos demonstraram a especificidade deste ligante para os modelos experimentais analisados. As relações alvo/não alvo foram superiores a 1,5 em todos os estudos realizados, e sugerem que este complexo pode ser utilizado na identificação destes tumores.

Palavras-chave: Bombesina, cintilografia, diagnóstico, Ehrlich, MDA-MB-231, Tecnécio-99m, tumor

ABSTRACT

Breast cancer is one of the most common tumors in women, showing high levels of mortality. Thus, many efforts have been made to produce diagnostic techniques that can assist in the treatment, increasing the chances of cure of the patients. Over the past years, radiolabeled peptides for diagnosis and/or therapy has gained enormous interest due to the over expression of receptors for those peptides on the surface of cancer cells. Bombesin (BBN) is a tetradecapeptide, isolated from a frog, which binds specifically to receptors for gastrin releasing peptide (GRP). A variety of tumors have been found to express receptors for this peptide, such as lung, prostate, and breast. Therefore, radiolabeled BBN analogs with a high affinity for these receptors might be used for scintigraphic imaging of these tumor types. Technetium-99m has been mostly used for labeling radiopharmaceuticals due to its suitable characteristics, such as half-life (6.02 hours), gamma emission in low energy (140 keV), and inexpensive isotope cost. 2-Hydrazinonicotinamide (HYNIC) is an attractive bifunctional chelating ligand for preparing ^{99m}Tc -labeled peptides, because it shows a high labeling efficiency. Liposomes are spherical vesicles that form when phospholipids are exposed to an aqueous environment. These vesicles can be used to deliver substances to specific tissues, including tumors. In this sense, long-circulating, pH-sensitive liposomes show high selectivity to tumor due to their instability toward areas of lower pH, such as inflammation, infection and tumors. This work reported the technetium-99m labeling of a bombesin derivative (HYNIC- β Ala-bombesin₍₇₋₁₄₎). In addition, the radiolabeled peptide, free or encapsulated into long-circulating pH-sensitive liposomes, was evaluated regarding its ability to identify Ehrlich tumor and MDA-MB-231 tumor in animal models. Results obtained from this work showed high specificity to tumors tested. As a result, target/non-target ratios were higher than 1.5 during the whole experiment. These findings, suggest that ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-bombesin₍₇₋₁₄₎ can be used to identify those tumors.

Keywords: Bombesin, Scintigraphic imaging, diagnosis, Ehrlich, MDA-MB-231, Technetium-99m, tumor

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo celular.....	25
Figura 2. Classificação dos modelos tumorais (adaptado de NI et al., 2009).....	32
Figura 3. Estrutura dos agentes quelantes para o tecnécio-99m (JURISSON, 1993).....	35
Figura 4. Seqüência de aminoácidos dos peptídeos PLG ₁₈₋₂₇ (Peptídeo liberador de gastrina), bombesina e NMB (Neuromedina B) - (Adaptado de PATEL <i>et al.</i> , 2006).....	36
Figura 5. Representação esquemática da estrutura dos lipossomas.....	38
Figura 6. Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro e número de bicamadas (Adaptado de LASIC, 1998).....	39
Figura 7. Representação esquemática dos lipossomas de circulação prolongada.....	40
Figura 8. Estruturas químicas de CHEMS (A), DOPE (B) e DSPE-PEG ₂₀₀₀ (C).....	41
Figura 9. Representação esquemática da organização estrutural de derivados da PE na ausência e na presença de CHEMS.....	42
Figura 10. Comportamento de fases das membranas lipídicas (Adaptado de FRÉZARD <i>et al.</i> , 2005).....	43
Figura 11. Estrutura química do lisofosfolípide da DOPE (1-oleil 2-hidroxi glicero-3-fosfoetanolamina).	46
Figura 12. Representação esquemática da interação fosfolípide-açúcar.....	47
Figura 13. Perfil cromatográfico do peptídeo HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎	59
Figura 14. Radiocromatograma do complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ no momento da marcação com os átomos de tecnécio-99m (pico de maior intensidade) e após 24 horas (pico de menor intensidade).....	60
Figura 15. Biodistribuição do complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em animais C57/Bl6 sadios.....	64
Figura 16. Imagens cintilográficas após administração endovenosa do complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em camundongos C57/Bl6 sadios. A-1 hora; B- 4 horas.....	64
Figura 17. Biodistribuição do complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em animais Swiss sadios.....	65
Figura 18. Imagens cintilográficas após administração endovenosa do complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em camundongos Swiss sadios. A – 1 hora; B – 4 horas; C – 8 horas.....	65
Figura 19. Depuração sanguínea para o complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em animais C57/Bl6 (n=3).....	66
Figura 20. Depuração sanguínea para o complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em animais Swiss (n=3).....	67
Figura 21. Teor de encapsulação, em presença de glicose e trealose (razão crioprotetor/fosfolípide igual a 2:1), do complexo em lipossomas SpHL com diferentes concentrações lipídicas (n=3).....	82
Figura 22. Perfil de liberação do complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ encapsulado em SpHL.....	84
Figura 23. Estudo de biodistribuição do complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em SpHL, em animais C57/Bl6 sadios.....	85

Figura 24. Imagens cintilográficas horas após a administração endovenosa em animais C57/Bl6 sadios do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em SpHL. Os painéis A e B representam os tempos de 1 e 4 horas, respectivamente, após a administração	85
Figura 25. Estudo de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em SpHL, em animais Swiss sadios.....	86
Figura 26. Imagens cintilográficas após a administração endovenosa em animais Swiss sadios do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em SpHL. Os painéis A, B e C representam os tempos de 1, 4 e 8 horas, respectivamente, após a administração.....	86
Figura 27. Depuração sanguínea para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em SpHL, em animais C57/Bl6 sadios.....	87
Figura 28. Depuração sanguínea para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em SpHL, em animais Swiss sadios.....	88
Figura 29. Diâmetro médio das vesículas para os SpHL liofilizados armazenados em geladeira (5°C). O asterisco (*) significa que o valor em 180 dias é estatisticamente diferente (p<0,05) daquele obtido em 1 dia de armazenamento (n=3).....	89
Figura 30. Teor de encapsulação do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em SpHL liofilizados armazenados em geladeira (5°C). (n=3).....	89
Figura 31. Perfil de liberação do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ encapsulado em nSpHL	91
Figura 32. Depuração sanguínea para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em nSpHL, em animais Swiss sadios (n=3).....	91
Figura 33. Imagem do tumor de Ehrlich corados pelo método HE. As setas indicam a presença de vasos no tecido.....	100
Figura 34. Captação do complexo pelas células de tumor de Ehrlich com e sem bloqueio do receptor. *p<0,01; **p<0,001.....	101
Figura 35. Internalização do complexo pelas células de tumor de Ehrlich, com e sem bloqueio do receptor. *p<0,01; **p<0,001.....	102
Figura 36. Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5).....	103
Figura 37. Relações tumor/não alvo para os estudos de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5) T/M – Tumor/Músculo; T/S – Tumor/Sangue; T/C – Tumor/Coração.....	103
Figura 38. Relações pâncreas/não alvo para os estudos de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5) T/M – Tumor/Músculo; T/S – Tumor/Sangue; T/C – Tumor/Coração.....	104
Figura 39. Imagens cintilográficas obtidas 1, 4 e 8 horas após a administração do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em animais com tumor de Ehrlich implantado na pata posterior direita (seta). A – 1 hora; B – 4 horas; C – 8 horas.....	104
Figura 40. Relações tumor/músculo obtidas nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ . (n=5).....	105
Figura 41. Valores de captação no tecido tumoral nos estudos com e sem bloqueio de receptor. (n=3) * p < 0,05; ** p < 0,001.....	105
Figura 42. Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em SpHL, em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5).....	106

Figura 43. Captação pelo tumor do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado em SpHL, em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5) * p<0,05; ** p<0,001.....	107
Figura 44. Relações tumor/não alvo para os estudos de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , em SpHL, em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5) T/M – Tumor/Músculo; T/S – Tumor/Sangue; T/C – Tumor/Coração.....	108
Figura 45. Relações tumor/músculo para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado em SpHL após administração em animais com tumor de Ehrlich. (n=5) * p<0,05; **p<0,001.....	108
Figura 46. Valores de captação no pâncreas o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado em SpHL. (n=5) * p<0,05.....	109
Figura 47. Imagens cintilográficas obtidas 1, 4 e 8 horas após a administração do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em SpHL, em animais com tumor de Ehrlich implantado na pata posterior direita (seta). A – 1 hora; B – 4 horas; C – 8 horas.....	109
Figura 48. Relações tumor/músculo obtidas nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ encapsulado em SpHL quando administrado em animais com tumor de Ehrlich (n=5).....	110
Figura 49. Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em nSpHL, em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5).....	111
Figura 50. Captação pelo tumor 1, 4 e 8 horas após a administração do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ encapsulado em lipossomas pH-sensíveis (SpHL) e não pH-sensíveis (nSpHL) em animais com tumor de Ehrlich implantado (n=5). * p<0,05; ** p<0,01, *** p<0,001.....	111
Figura 51. Captação dos complexos ^{99m}Tc -DTPA e ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ (^{99m}Tc -BBN) no tecido tumoral. * p<0,05; ** p<0,01, *** p<0,001.....	113
Figura 52. Cortes histológicos de tumor de mama (MDA-MB-231) corados pelo método HE. A – Visão geral do tumor (2x); B – Vacúolos aparentes e áreas de necrose (20x); C – Figuras de mitose, pleomorfismo evidente e áreas de necrose (60x).....	122
Figura 53. Imagem do tumor de mama (MDA-MB-231) corados pelo método HE. A seta representa o vaso presente no tecido tumoral.....	122
Figura 54. Captação do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ pelas células MDA-MB-231 com e sem bloqueio do receptor. *p<0,05; **p<0,001	123
Figura 55. Internalização do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ pelas células MDA-MB-231, com e sem bloqueio do receptor. *p<0,01; **p<0,001.....	124
Figura 56. Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em camundongos NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado. (n=5).....	125
Figura 57. Relações tumor/não alvo para os estudos de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em camundongos NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado. (n=5) T/M – Tumor/Músculo; T/S – Tumor/Sangue; T/C – Tumor/Coração. * p<0,01; ** p<0,001; *** p<0,0001.....	127
Figura 58. Relações Tumor/Músculo obtidas com e sem bloqueio do receptor para bombesina. (n=3). * p<0,05.....	127
Figura 59. Imagens cintilográficas obtidas 1 e 4 horas após a administração do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em animais com tumor mama (MDA-MB-231) implantado na pata posterior direita (seta). A – 1 hora; B – 4 horas.....	128

Figura 60. Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em SpHL, em camundongos NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado. (n=5).....	129
Figura 61. Relações tumor/não alvo para os estudos de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , em SpHL, em camundongos NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado. (n=5) T/M – Tumor/Músculo; T/S – Tumor/Sangue; T/C – Tumor/Coração. * p<0,01; **p<0,001.....	130
Figura 62. Relações tumor/músculo para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado em SpHL para estudos em animais NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado (n=5) *p<0,001.....	130
Figura 63. Valores de captação no pâncreas o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado em SpHL em animais NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado (n=5) * p<0,001.....	131
Figura 64. Imagens cintilográficas obtidas 1 e 4 horas após a administração do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em SpHL, em animais NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado na pata posterior direita (seta). A – 1 hora; B – 4 horas; C – 8 horas.....	131
Figura 65. Relações tumor/músculo obtidas nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ encapsulado em SpHL quando administrado em animais NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) (n=5).....	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais peptídeos, suas principais funções e tecidos de maior expressão de receptores (WEINER; THAKUR, 2002).....	34
Tabela 2. Estudo de estabilidade para o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em solução de NaCl 0,9% (p/v) a temperatura ambiente (n=6).....	61
Tabela 3. Estudo de estabilidade para o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em plasma de camundongo a 37°C (n=6).....	61
Tabela 4. Estudo de estabilidade do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ na presença equimolar cisteína (n=6).....	62
Tabela 5. Estudo de estabilidade do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em presença de cisteína, na razão 1:10, respectivamente (n=6).....	62
Tabela 6. Estudo de estabilidade do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em presença de cisteína, na razão 1:100, respectivamente (n=6).....	63
Tabela 7. Estudo de estabilidade dos kits liofilizados e armazenados em freezer (n=3).....	68
Tabela 8. Diâmetro médio e índice de polidispersão (IP) de SpHL após extrusão em membranas de policarbonato (n=4).....	79
Tabela 9. Influência da presença de crioprotetores no diâmetro e índice de polidispersão de lipossomas após processo de congelamento/descongelamento (n=3).....	80
Tabela 10. Influência da presença de crioprotetores no diâmetro e índice de polidispersão de lipossomas após processo de liofilização (n=3).....	81
Tabela 11. Influência da concentração lipídica no teor e eficiência de encapsulação do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em SpHL em presença de glicose, (razão crioprotetor/fosfolípide igual a 2:1) ^a	83
Tabela 12. Influência da concentração lipídica no teor e eficiência de encapsulação do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em SpHL em presença de trealose, (razão crioprotetor/fosfolípide igual a 2:1) ^a	83
Tabela 13. Diâmetro médio e índice de polidispersão (IP) de nSpHL após extrusão em membranas de policarbonato (n=3).....	90
Tabela 14. Coeficiente de partição tecido/sangue (Kp) para diferentes órgãos de camundongos com tumor de Ehrlich implantado após administração do complexo encapsulado em SpHL (A) ou nSpHL (B).....	112

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CHEMS	Hemisuccinato de colessterila
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPC	Dioleilfosfatidilcolina
DOPE	Dioleilfosfatidiletanolamina
DSPE-PEG ₂₀₀₀	Diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol ₂₀₀₀
DTPA	Ácido dietilenotriamino pentaacético
EDDA	Ácido etilenodiamino- <i>N,N'</i> -diacético
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
FDG	Fluordesoxiglicose
HYNIC	Ácido hidrazinonicotínico
IP	Índice de polidispersão
LUV	Lipossomas unilamelares grandes
MDP	Metilenodifosfonato
MLV	Lipossomas multilamelares
nSpHL	Lipossomas não pH-sensíveis de circulação prolongada
PEG	Polietilenoglicol
PET	Tomografia por emissão de pósitron
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocitário mononuclear
SpHL	Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada
SUV	Lipossomas unilamelares pequenos

SUMÁRIO

REVISÃO DA LITERATURA.....	22
1 Neoplasias.....	23
2. Câncer de mama.....	26
2.1 Métodos de diagnóstico.....	28
2.1.1 Diagnóstico convencional.....	28
2.1.2 Medicina Nuclear.....	28
2.1.2.1 O isótopo tecnécio-99m.....	29
2.1.2.2 Cintilografia mamária.....	30
2.2 Pesquisas na área.....	31
2.2.1 Linhagens de células.....	31
2.2.2 Modelo animal.....	31
2.2.3. Marcadores específicos.....	32
2.2.3.1 Bombesina.....	35
3 Lipossomas.....	37
3.1 Definição.....	37
3.2 Classificação.....	38
3.2.1 Lipossomas unilamelares e multilamelares.....	38
3.2.2 Lipossomas convencionais e de circulação prolongada.....	39
3.2.3 Lipossomas pH-sensíveis.....	40
3.3 Propriedades físicas e físico-químicas dos lipossomas.....	42
3.3.1 Transição de fase dos lípides.....	42

3.3.2 Diâmetro das vesículas.....	43
3.3.3 Potencial Zeta.....	44
3.3.4 Teor e eficiência de encapsulação.....	44
3.4 Estabilidade física e química dos lipossomas	45
3.5 Liofilização.....	46
3.6 Crioproteção.....	46
4 Considerações finais.....	47
OBJETIVOS E OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
TRABALHO EXPERIMENTAL	51
CAPÍTULO 1 - Marcação do peptídeo HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ com tecnécio-99m e estudos de estabilidade.....	52
1 Introdução.....	53
2 Material e métodos.....	54
2.1 Material.....	54
2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o peptídeo HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎	54
2.3 Formação do complexo ^{99m} Tc- HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎	55
2.4 Determinação da pureza radioquímica.....	55
2.5 Coeficiente de partição.....	55
2.6 Estabilidade de marcação <i>in vitro</i>	56
2.6.1 Solução de NaCl 0,9% (p/v)	56
2.6.2 Plasma de camundongo.....	56
2.7 Transquelação com cisteína.....	56

2.8 Estudo de biodistribuição em animais C57/Bl6 sadios.....	56
2.9 Imagens cintilográficas em animais C57/Bl6 sadios.....	57
2.10 Estudo de biodistribuição em animais Swiss sadios.....	57
2.11 Imagens cintilográficas em animais Swiss sadios.....	57
2.12 Depuração sanguínea em animais sadios.....	57
2.13 Preparação do kit liofilizado para marcação do peptídeo HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎	58
2.14 Estudo de estabilidade do kit formado.....	58
2.15 Análise estatística.....	58
3 Resultados e Discussão.....	59
3.1 CLAE para o peptídeo HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎	59
3.2 Pureza radioquímica e Coeficiente de partição.....	59
3.3 Estudos de estabilidade.....	60
3.4 Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas em animais C57/Bl6 sadios....	63
3.5 Estudo de biodistribuição e imagens cintilográficas em animais Swiss sadios.....	64
3.6 Depuração sanguínea em animais sadios.....	65
3.7 Preparação e estabilidade do kit liofilizado para marcação do peptídeo HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎	67
4 Conclusões.....	69
CAPÍTULO 2 - Preparação e caracterização de lipossomas contendo o complexo	
^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎	70
1 Introdução.....	71
2 Material e Métodos.....	72

2.1 Material.....	72
2.2 Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada (SpHL).....	72
2.2.1 Preparo dos SpHL.....	72
2.2.2 Caracterização da formulação.....	73
2.2.2.1 Diâmetro das vesículas e índice de polidispersão.....	73
2.2.2.2 Potencial Zeta.....	73
2.2.2.3 Teor de fosfolípidos (PL).....	73
2.2.3 Teste com crioprotetores.....	74
2.2.3.1 Testes preliminares (congelamento/descongelamento)	74
2.2.3.2 Testes com lipossomas liofilizados.....	74
2.2.4 Teor e eficiência de encapsulação.....	75
2.2.5 Perfil de liberação.....	75
2.2.6 Biodistribuição em animais C57/Bl6 sadios.....	76
2.2.7 Imagens cintilográficas em animais C57/Bl6 sadios.....	76
2.2.8 Biodistribuição em animais Swiss sadios.....	76
2.2.9 Imagens cintilográficas em animais Swiss sadios.....	77
2.2.10 Depuração sanguínea em animais sadios.....	77
2.2.11 Produção do kit liofilizado.....	77
2.2.12 Estudo de estabilidade.....	77
2.2.13 Análise estatística	77
2.3 Lipossomas não pH-sensíveis de circulação prolongada (nSpHL).....	78
2.3.1 Preparo dos nSpHL	78

2.3.2 Caracterização da formulação.....	78
2.3.2.1 Diâmetro das vesículas e índice de polidispersão.....	78
2.3.2.2 Potencial zeta.....	78
2.3.2.3 Teor de encapsulação.....	78
2.3.2.4 Depuração sanguínea em animais sadios.....	78
3 Resultados e discussão.....	79
3.1 SpHL.....	79
3.1.1 Preparo e caracterização dos SpHL	79
3.1.2 Teste com crioprotetores.....	79
3.1.2.1 Testes preliminares (congelamento/descongelamento).....	79
3.1.2.2 Testes com lipossomas liofilizados.....	80
3.1.3 Teor e eficiência de encapsulação.....	82
3.1.4 Perfil de liberação.....	84
3.1.5 Biodistribuição e Imagens cintilográficas em animais C57/Bl6 sadios.....	84
3.1.6 Biodistribuição e imagens cintilográficas em animais Swiss sadios.....	86
3.1.7 Depuração sanguínea em animais sadios.....	87
3.1.8 Produção e estudo de estabilidade do kit liofilizado.....	88
3.2 nSpHL.....	90
3.2.1 Preparo e caracterização dos nSpHL.....	90
3.2.2 Teor e eficiência de encapsulação.....	90
3.2.3 Perfil de liberação.....	90
3.2.4 Depuração sanguínea em animais sadios.....	91

4 Conclusões.....	92
CAPÍTULO 3 - Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado, em lipossomas, em modelo experimental de tumor de Ehrlich.....	93
1 Introdução.....	94
2 Material e Métodos.....	95
2.1 Material.....	95
2.2 Implante do tumor líquido (ascite) de Ehrlich.....	95
2.3 Implante de tumor sólido de Ehrlich em camundongos Swiss.....	96
2.4 Estudo histopatológico do tumor.....	96
2.5 Estudo de afinidade do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ pelas células de Ehrlich.....	96
2.6 Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em animais com tumor de Ehrlich.....	97
2.7 Imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em animais com tumor de Ehrlich.....	98
2.8 Biodistribuição, em animais com tumor de Ehrlich, do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em SpHL.....	98
2.9 Imagens cintilográficas, em animais com tumor de Ehrlich, do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em SpHL.....	99
2.10 Biodistribuição, em animais com tumor de Ehrlich, do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ , encapsulado em nSpHL.....	99
2.11 Coeficiente de partição tecido/sangue.....	99
2.12 Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -DTPA em animais com tumor de Ehrlich.....	99
2.13 Análise estatística.....	99
3 Resultados e discussão.....	100
3.1 Implante do tumor de Ehrlich sólido e estudos histopatológicos.....	100
3.2 Estudo de afinidade do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ pelas células de Ehrlich.....	100

3.3 Biodistribuição e Imagens cintilográficas do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em animais com tumor de Ehrlich.....	102
3.4 Biodistribuição e imagens cintilográficas, em animais com tumor de Ehrlich, do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL.....	106
3.5 Biodistribuição, em animais com tumor de Ehrlich, do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, encapsulado em nSpHL.....	110
3.6 Coeficiente de partição tecido/sangue.....	111
3.7 Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ em animais com tumor de Ehrlich.....	112
4 Conclusões.....	114
CAPÍTULO 4 - Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ livre e encapsulado em SpHL utilizando modelo experimental de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231.....	115
1 Introdução.....	116
2 Material e Métodos.....	117
2.1 Material.....	117
2.2 Cultivo das células de mama (MDA-MB-231).....	117
2.3 Implante das células MDA-MB-231 em animais C57BL/6.Cg-Foxn1 ^{nu} /NTacUnib (NUDE)	117
2.4 Estudo histopatológico do tumor.....	118
2.5 Estudo de afinidade do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ pelas células MDA-MB-231.....	119
2.6 Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em animais NUDE com tumor de mama.....	119
2.7 Imagens cintilográficas do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em animais NUDE com tumor de mama.....	120
2.8 Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL, em animais NUDE com tumor de mama.....	120
2.9 Imagens cintilográficas do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL, em animais NUDE com tumor de mama.....	121
2.10 Análise estatística.....	121

3 Resultados e discussão.....	122
3.1 Implante das células MDA-MB-231 em animais C57BL/6.Cg-Foxn1 ^{nu} /NTacUnib (NUDE) e estudo histopatológico do tumor.....	122
3.2 Estudo de afinidade do complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ pelas células de MDA-MB-231	122
3.3 Biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ em animais NUDE com tumor de mama.....	124
3.4 Biodistribuição e imagens cintilográficas, em animais NUDE com tumor de mama, do complexo ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ encapsulado em SpHL.....	128
4 Conclusões.....	133
Conclusões integradas.....	134
Referências bibliográficas.....	135
ANEXOS E APÊNDICES.....	151
Anexo A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais.....	152

REVISÃO DA LITERATURA

1 Neoplasias

As neoplasias são uma das principais causas de morte na atualidade. Em 2008 foram registrados aproximadamente 12,7 milhões de novos casos e cerca de 7,6 milhões de mortes em todo o mundo (FERLAY, 2010). Dentre os tumores de maior incidência estão os cânceres de pulmão (1,52 milhões de casos novos), mama (1,29 milhões), cólon e reto (1,15 milhões). Em homens, o mais comum é o câncer de próstata. Já nas mulheres, o mais frequente é o câncer de mama (WHO, 2009).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 são de 518.510 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata (60180 novos casos) e de pulmão (17 mil) no sexo masculino e os cânceres de mama (53 mil) e do colo do útero (17 mil) no sexo feminino, mostrando perfil semelhante ao observado nas estatísticas mundiais (INCA, 2012).

O termo neoplasia ou tumor indica uma massa anormal de tecido, cujo crescimento é descontrolado e ultrapassa o do tecido normal, persistindo da mesma maneira excessiva após o término dos estímulos que provocaram a alteração. Um tumor pode ser classificado como benigno, quando suas características micro e macroscópicas sugerirem que o novo tecido permanecerá localizado e, portanto, na maioria das vezes é inofensivo ao paciente. Os tumores malignos, também denominados câncer, são aqueles cuja lesão poderá invadir tecidos adjacentes e se disseminar para locais distantes (metástases) podendo, muitas vezes, causar a morte do paciente (ROBBINS; COTRAN, 2006).

Os tumores benignos, em geral, são designados pelo nome do tecido de origem acrescido do sufixo – oma, como por exemplo, fibroma, condroma e papiloma. Já os tumores malignos recebem uma nomenclatura em função do tipo de tecido envolvido, tumores de tecido mesenquimal são chamados de sarcoma (ex. fibrosarcoma, condrossarcoma). As neoplasias malignas originadas de tecido epitelial são denominadas carcinomas. Dentre os carcinomas, aqueles que se desenvolvem com padrão glandular são chamados de adenocarcinomas (ex. mama, cólon, pâncreas), e aqueles que produzem células escamosas recebem o nome de carcinoma de células escamosas (ex. pulmão, esôfago, cérvix). Existem, ainda, outros tipos de malignidades que não se enquadram nos casos citados acima, como por exemplo, os tumores hematopoiéticos (leucemias, mielomas e linfomas) e os teratomas (WEINBERG, 2008).

O surgimento do câncer se dá quando células normais perdem seus mecanismos regulatórios que controlam a multiplicação e diferenciação celular (PATRICK, 2005). Estas

alterações podem ser causadas por diversos fatores, como vírus, bactéria, parasitas, agentes químicos e físicos. Esses agentes carcinogênicos podem atuar de duas maneiras, primeiro causando danos aos genes que controlam a proliferação e migração celular. E segundo, promovendo a multiplicação das células tumorais. Isso gera modificações nas funções celulares ocasionando alterações nas propriedades de membrana, nas interações célula-célula e no metabolismo celular, propiciando a formação de tumores (PAUWELS *et al.*, 1998).

Os genes envolvidos na formação dos cânceres normalmente apresentam funções relacionadas ao controle do ciclo celular, reparo do DNA e apoptose. Estes genes podem ser classificados em oncogenes e genes supressores de tumor, dependendo da função que desempenham nas células, porém ambos são extremamente importantes para a manutenção do equilíbrio celular (WEINBERG, 2008).

Os oncogenes são produtos da ativação, por agentes mitogênicos, de proto-oncogenes. Após esta ativação os oncogenes passam a não controlar as funções destinadas ao seu antecessor, os proto-oncogenes. Como resultado desta alteração pode ocorrer aumento ou falha na síntese do produto deste gene, que pode ser um receptor ou um fator de crescimento, em ambos os casos ocorrerá proliferação desordenada das células tumorais. São exemplos de oncogenes os genes *ras* e *myc* que estão envolvidos no desenvolvimento na maioria dos tumores (BOS, 1989; BISHOP, 1991, WEINBERG, 2008).

Os genes supressores de tumor apresentam funções no reparo do DNA e na regulação do ciclo celular, portanto o seu envolvimento na formação do câncer acontece quando eles estão desativados. Assim as células perdem um importante aliado na contenção da formação do tumor, este mecanismo é tão importante quanto à ativação de oncogenes na patogênese desta doença. Dentre os genes supressores destaca-se o gene *p53*, envolvido em inúmeros processos, como crescimento celular, reparo e síntese de DNA, diferenciação celular e apoptose. Este gene, juntamente com o gene *Rb*, está inserido em uma complexa via de regulação do ciclo celular, desta forma, mutações em um ou ambos os genes são determinantes para a formação dos cânceres (ROBBINS; COTRAN, 2006).

Toda célula eucariótica apresenta um ciclo celular, como o mostrado na Figura 1, composto por quatro etapas: G₁ (fase na qual a célula está aumentando de tamanho e se preparando para a cópia do material genético em resposta a fatores de crescimento e sinais internos), S (etapa de replicação do DNA), G₂ (preparação da célula para a mitose) e M (mitose celular).

Há, ainda, uma quinta fase (G_0) que é considerada como um estado de repouso. Certas células, nesta fase, podem entrar no ciclo após indução (KENNY *et al.*, 2004).

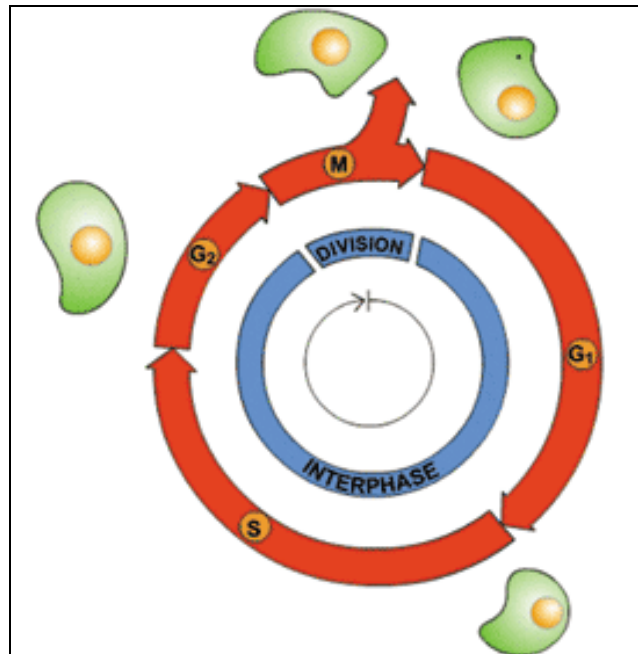


Figura 1. Desenho esquemático das fases do ciclo celular.

Normalmente, o ciclo celular é regulado pelo equilíbrio entre células em estado de proliferação e células em repouso. A perda dessa regulação é determinante para o desenvolvimento do câncer. Durante o crescimento da massa tumoral, grande parte das células tumorais encontra-se na fase S do ciclo celular e, portanto em alta atividade metabólica (BELKACÉMI *et al.*, 2007).

A despeito de todas as mutações ocorridas nas células, os tumores não podem crescer mais do que 1 a 2 mm de diâmetro, sem que eles sejam vascularizados. As células neoplásicas, assim como as células normais, necessitam de nutrientes para a manutenção de seu elevado metabolismo. A angiogênese é o desenvolvimento de uma nova rede de vasos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes e/ou de células tronco endoteliais circulantes, e é fundamental no processo de crescimento tumoral e metástase (VIREY *et al.*, 2008; JUN *et al.*, 2010; CHUA *et al.*, 2010). Dentre os fatores envolvidos neste processo podemos citar os fatores de crescimento pró-angiogênico (fator de crescimento do endotélio vascular – VEGF, fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF, fator de crescimento de fibroblasto – PGF), e as enzimas proteolíticas (metaloproteinases, plasmina). A hipoxia presente no tumor estimula as células a secretar estes fatores no interstício levando a degradação da membrana basal ao redor dos vasos pré-existentes permitindo a migração de células endoteliais e conseqüente, formação de novos vasos (DESHPANDE *et al.*, 2010;

VERBRIDGE *et al.*, 2010). No entanto, a vasculatura tumoral é anormal. Os vasos são permeáveis, dilatados e possuem um padrão irregular de conexão, podendo apresentar poros de até 800 nm (YUAN, 1995; MUNN, 2003; GOSH *et al.*, 2008).

Uma característica marcante dos tecidos tumorais é o fato de pH extracelular (pH_e) ser mais baixo que o pH dos tecidos normais. O pH intracelular (pH_i) de ambos os tecidos é relativamente similar devido à necessidade de se manter um ambiente favorável para as várias atividades citoplasmáticas. Portanto, o pH_e substancialmente reduzido no tumor quando comparado com o tecido normal promove um gradiente de pH celular diferente nestes dois tecidos. Uma das hipóteses mais aceitas para explicar o baixo pH_e nos tecidos tumorais é o *clearance* ineficiente dos metabólitos ácidos produzidos durante a glicólise aeróbica intensa da células cancerosa (STUBBS *et al.*, 1999; PATRICK, 2005).

2 Câncer de mama

O câncer de mama, uma doença do epitélio mamário, pode acometer tanto homens como mulheres, porém na população feminina apresenta elevada importância devida a sua alta incidência. É o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, respondendo por 23% dos casos novos a cada ano. Se diagnosticado e tratado oportunamente, o prognóstico é relativamente bom. Porém, no Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados (INCA, 2012).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento desta patologia são o histórico familiar, fatores reprodutivos e hormonais, densidade mamográfica, doenças benignas da mama, além de outros fatores como obesidade, dieta, alcoolismo e tabagismo (AMIR *et al.*, 2010).

Os principais genes envolvidos na progressão do câncer de mama são os genes *BRCA1* e *BRCA2*. O produto destes genes supressores é uma proteína responsável pela manutenção do DNA evitando o desenvolvimento de anomalias genéticas que poderiam levar ao câncer. No entanto, quando estes genes estão mutados, por herança familiar ou silenciamento epigenético, os riscos de desenvolver o tumor de mama aumentam substancialmente (VENKITARAMAN, 2002; WILSON; ELLEDGE, 2002; HONRADO *et al.*, 2006; PAPOUTISIS *et al.*, 2010).

Outro gene de elevada importância na patogenia do câncer de mama é o gene *HER2/neu* que codifica uma glicoproteína que é membro de uma família de receptor de fator de

crescimento epidermal e são superexpressos em 20-25% dos tumores de mama. A superexpressão do produto deste gene (p185^{HER2/neu}) é correlacionada a um mau prognóstico para o paciente (MADARNAS *et al.*, 2008). Tratamentos anti-HER2/neu, com trastuzumab e lapatinib, tem obtido resultados satisfatórios em tumores que são positivos para este gene (RYAN *et al.*, 2008; ROSS *et al.*, 2009).

O câncer de mama é uma doença heterogênea caracterizada por uma grande variação na apresentação clínica, na agressividade e na resposta ao tratamento. Esta variedade conduz a identificação de subtipos deste tumor com comportamentos biológicos potencialmente diferentes (LEE *et al.*, 2010). Desta forma, é possível dividi-los em tumores dependentes de estrógeno e tumores independentes deste hormônio (MIYAZAKI *et al.*, 1998).

A presença de receptores para estrógeno nas biopsias serve como indicador da resposta terapêutica para tratamentos endócrinos, como tamoxifeno e acetato de medroxiprogesterona. Estes receptores também são utilizados para indicar o prognóstico da doença (HALMOS *et al.*, 1995, REXHEPAJ *et al.*, 2008; BOUCLIER *et al.*, 2010; VALACHIS *et al.*, 2010). Alguns progressos foram alcançados no diagnóstico e terapia, aumentando a sobrevida de pacientes com tumor de mama do tipo dependente de estrógeno, porém em tumores não dependentes o prognóstico normalmente é ruim, pois as opções de tratamento disponíveis não são completamente satisfatórias (BAJO *et al.*, 2002; MOURIDSEN *et al.*, 2003).

Existe, ainda, outra classe de tumor de mama (10-15%) que não expressam receptores para hormônios como estrógeno e progesterona e também, são negativos para o gene *HER2/neu*. Este tipo de câncer é classificado como triplo negativo e as técnicas convencionais hormonais de tratamento não são eficazes. Já o tratamento com outros quimioterápicos, como cisplatina, é efetivo apenas por um tempo limitado (GRÜNDKER *et al.*, 2010).

Além dos receptores já citados as células tumorais, de uma maneira geral, podem apresentar em sua superfície quantidades significativas de diversos tipos de receptores que, muitas vezes, podem ser utilizados com fins de terapia e/ou diagnósticos deste tipo de doença. São exemplos os receptores para o peptídeo liberador de gastrina, receptores para o peptídeo intestinal vasoativo, receptores de somatostatina, entre outros (WEINER;THAKUR, 2002).

2.1 Métodos de diagnóstico

2.1.1 Métodos convencionais

Os métodos rotineiramente utilizados para a identificação de possíveis focos de tumores de mama são o auto-exame, exame clínico e a mamografia. O auto-exame é um método que pode aumentar as possibilidades de um diagnóstico precoce da doença e consequentemente, aumentar a sobrevivência dos pacientes. No entanto, aproximadamente 70 a 75% dos nódulos, malignos ou não, encontrados por este método apresentam tamanho em torno de 2,5 cm, e desta forma a possibilidade do surgimento de metástase é de 50%. (NARDERI; BAHRAMPOOR, 2003)

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) não recomenda o auto-exame como método isolado para a identificação precoce do câncer de mama, pois pode trazer consequências negativas para as pacientes, como aumento do número de biópsias de lesões benignas, falsa sensação de segurança nos exames falsamente negativos e impacto psicológico negativo nos exames falsamente positivos. Desta forma, o exame clínico realizado por profissional capacitado é um dos métodos sugeridos como auxiliares no diagnóstico precoce do tumor de mama.

A mamografia é usualmente o método de imagem empregado em pacientes com suspeita clínica de câncer de mama, além de ser a técnica recomendada para programas de *screening*. Sua sensibilidade está entre 80-95% para mulheres acima de 65 anos, porém é inferior a 60% em mulheres abaixo de 40 anos. Além disso, outros fatores podem reduzir a sensibilidade desta técnica, como a densidade da mama, antecedentes cirúrgicos ou radioterápicos, a presença de patologias benignas e implantes mamários. Em casos de dúvidas no diagnóstico, métodos complementares podem ser empregados como ultrassonografia, ressonância magnética e cintilografia (HIRONAKA *et al.*, 2008, ADDLER; WHAL, 1995).

2.1.2 Medicina nuclear

Em cintilografia a imagem do corpo é obtida através da captação da radioatividade emitida pelo radiotraçador empregado. Os radiotraçadores são administrados, em sua maioria, por via endovenosa e o diagnóstico é baseado em alterações bioquímicas e fisiológicas do órgão em exame, sem a necessidade de alterações anatômicas, fornecendo o diagnóstico da doença de forma não invasiva e em um estágio inicial (CONTI *et al.*, 1996; THRALL; ZIESSMAN, 2003).

Radiofármacos são compostos radioativos usados no diagnóstico e no tratamento de doenças. Em medicina nuclear cerca de 95% dos radiofármacos são utilizados para fins de diagnósticos. A maioria é formada por uma combinação de um componente radioativo (radionuclídeo), que emite a radiação necessária para a detecção externa do órgão em análise, e um componente químico (ligante orgânico), que é responsável pelo direcionamento no organismo. Essas substâncias não apresentam ação farmacológica, pois são administradas em doses extremamente baixas. O radionuclídeo deve emitir uma radiação que será facilmente detectável por um instrumento nuclear e a dose dessa radiação para o paciente deverá ser mínima (SAHA, 1998; THRALL; ZIESSMAN, 2003).

Existe uma grande variedade de radionuclídeos usados em medicina nuclear como: iodo-131 (^{131}I), índio-111 (^{111}In), tálio-201 (^{201}Tl), flúor-18 (^{18}F), tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), gálio-67 (^{67}Ga), entre outros (SAHA, 1998).

2.1.2.1 O isótopo tecnécio-99m

O tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) é o radionuclídeo mais usado em medicina nuclear, por apresentar propriedades físicas e químicas ideais para um radiofármaco, tais como: meia-vida física de 6,01 horas, emissão gama de baixa energia (140 keV), alta disponibilidade do radioisótopo a partir de um sistema gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$), além de apresentar um custo relativamente baixo (JURISSON, 1993; JONES, 1995; MARQUES *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2003).

O tecnécio é um metal de transição da família VII B e tem número atômico 43, podendo existir em oito estados de oxidação (-1 a +7). A estabilidade desses estados de oxidação depende do tipo de ligação e do ambiente químico. Os estados +7 e +4 são mais estáveis e são representados em óxidos, sulfetos, haletos e pertecnetatos (DEWANJEE, 1990; SAHA, 1998).

O íon pertecnetato ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) tem estado de oxidação +7 para o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, isso o torna uma espécie não reativa e incapaz de ligar a algum composto, sendo necessária a redução do tecnécio, do estado +7 para um estado de oxidação menor. O cloreto de estanho II ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) é o agente redutor mais comum usado na preparação de compostos ligados ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (NOWOTNIK, 1990; SAHA, 1998).

O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ reduzido é uma espécie quimicamente reativa e combina com uma grande variedade de agentes quelantes. O agente quelante geralmente é doador de elétrons e forma uma ligação covalente coordenada com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ reduzido. (SAHA, 1998).

2.1.2.2. Cintilografia mamária

Os estudos em medicina nuclear buscando a identificação de tumor de mama primário teve início em 1946 com LOW-BEER e colaboradores, utilizando fósforo-32 como radiofármaco. Desde então, muitas outras substâncias tem sido utilizadas com este intuito. Porém apenas poucas delas são utilizadas atualmente, como tálio-201, ^{99m}Tc -sestamibi e ^{99m}Tc -tetrofosmin (TAILLEFER, 1999).

O uso de tálio-201 no diagnóstico de tumor de mama foi inicialmente relatado por Hisada *et al.* (1978), porém as respostas não foram totalmente satisfatórias visto que o tálio-201 não apresenta propriedades físicas ideais para um radionuclídeo, fato que prejudicou a qualidade das imagens e portanto, o diagnóstico preciso. Além disso, a maioria dos estudos foi realizada em pacientes com lesões palpáveis e, portanto a eficiência deste na identificação de tumores não palpáveis não pode ser avaliada.

Na década de 1990 os radiofármacos ^{99m}Tc -sestamibi e ^{99m}Tc -tetrofosmin tornaram-se disponíveis comercialmente e começaram a ser utilizados como alternativa ao emprego do tálio-201 nas imagens de perfusão cardíaca, devido as vantagens físicas apresentadas pelos átomos de tecnécio-99m (TAILLEFER, 1999). O uso do ^{99m}Tc -sestamibi na detecção do câncer de mama foi primeiramente relatado por Aktulon *et al.* (1992), e Rambaldi em 1996 foi quem primeiro sugeriu o uso do ^{99m}Tc -tetrofosmin para este fim.

A cintilografia mamária, nos dias atuais, pode ser utilizada como complementação diagnóstica em casos duvidosos, diminuindo o número de biópsias (LANDHEER *et al.*, 2005; KAO *et al.*, 1994). A captação dos radiofármacos empregados (^{99m}Tc -sestamibi e ^{99m}Tc -tetrofosmin) está relacionada a hiperplasticidade das lesões e não sofre interferência da idade da paciente ou da densidade mamária, a sensibilidade e especificidade estão próximas a 85%. Existe ainda, a possibilidade do estudo em PET através da utilização do fluordesoxiglicose (^{18}F -FDG), porém a sensibilidade é limitada (25%), principalmente em tumores menores que 1 cm (HIRONAKA *et al.*, 2008; TAILLEFER, 1999, NGUYEN *et al.*, 2009).

Outro papel importante da medicina nuclear no câncer de mama é a avaliação da recorrência e da metástase. Apesar dos grandes avanços em tratamentos cirúrgicos, radioterápicos e quimioterápicos, as recorrências e as metástases tem sido os maiores problemas encontrados no controle do câncer de mama. Os riscos do paciente, ao longo do curso da doença, apresentar recorrência são de 7 a 35% e as chances de desenvolver metástases a distância são de 45 a 90% (PAN *et al.*, 2010). Desta forma, o diagnóstico

precoce é extremamente importante para a escolha da estratégia terapêutica e para aumentar as chances de cura (SCHMIDT *et al.*, 2008).

No estadiamento a distância são empregados a cintilografia óssea com ^{99m}Tc -MDP ou estudo com ^{18}F -FDG. Os estudos com PET/FDG apresentam sensibilidade e especificidade na ordem de 90% e as cintilografias ósseas demonstraram sensibilidade entre 77 e 98%, porém menor especificidade devido a outras patologias benignas, como fraturas e osteoartrose, também apresentarem alta captação (HIRONAKA *et al.*, 2008).

2.2 Pesquisas na área oncológica

2.2.1. Linhagens de células

São relatadas inúmeras linhagens de células de tumor de mama utilizadas para fins de diagnóstico e terapia. Dentre as células de origem humana, destacam-se as células da linhagem MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-435, SKBR3, entre outras (RIAZ *et al.*, 2009; HOLLESTELLE *et al.*, 2010)

As células MDA-MB-231 são uma linhagem derivada de metástase de adenocarcinoma de glândula mamária com característica triplo negativa, ou seja, negativa para os hormônios estrógeno e progesterona e também para o gene *HER2/neu*. São células altamente agressivas, invasivas e pouco diferenciadas. É uma linhagem bem caracterizada e estabelecida como modelo para desenvolvimento de câncer de mama humano (KAITHAN *et al.*, 2009; GRÜNDKER *et al.*, 2010; PETERSON *et al.*, 2010; OKARVI; JAMMAZ, 2012) , além de ser a de escolha para os estudos de tumores negativos para receptores de estrógeno (HONG *et al.*, 2010).

Dentre as linhagens de origem murina, destacam-se as células 4T1, muito utilizadas em modelos de metástase, e as células de tumor de Ehrlich (MI *et al.*, 2004; MI *et al.*, 2007; GU *et al.*, 2007, SHI *et al.*, 2008; BROMBERG *et al.*, 2010). Células de tumor de Ehrlich são células transplantáveis, provenientes de adenocarcinoma mamário, de camundongos fêmeas que se desenvolvem rapidamente. Tais células têm sido utilizadas como modelo no estudo de diversas substâncias, como agentes terapêuticos e agentes de diagnóstico (SEGURA *et al.*, 2000; OLORIS *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2008, de BARROS *et al.*, 2010).

2.2.2 Modelo animal

Os modelos animais, que tem por finalidade buscar uma aproximação da realidade, são extremamente importantes para o bom desenvolvimento de métodos de diagnóstico e terapia, visto que estudos em humanos apresentam sérias limitações como custo elevado, tempo prolongado e restrições éticas. Além disso, cultura de células e ensaios bioquímicos fornecem resultados que, muitas vezes, não refletem as condições *in vivo* (TALMADGE *et al.*, 2007).

Uma variedade de modelos tumorais em ratos e camundongos tem sido testada na oncologia experimental e podem ser classificados de acordo com diversos aspectos (Figura 2).

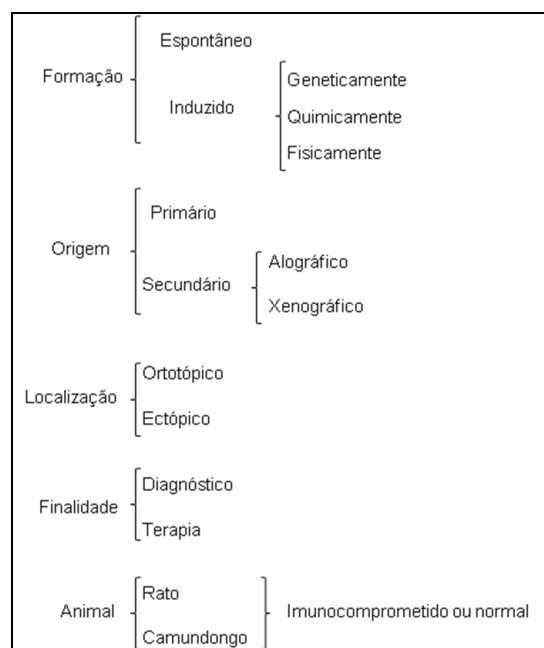


Figura 2. Classificação dos modelos tumorais (adaptado de NI *et al.*, 2009).

Tumores malignos podem ser desenvolvidos na forma alográfica (mesma espécie) ou xenográfica (espécies diferentes). Os tumores sólidos de origem humana transplantados em animais somente podem se desenvolver em animais imunocomprometidos como camundongos *nude*, que são deficientes em células T ou em camundongos imunodeficientes severos (SCID), que não apresentam células T e B. Estes animais demandam cuidados especiais nas condições experimentais, uma vez que devem ser mantidos em ambiente livre de patógenos. No entanto, estes modelos são, hoje em dia, os mais utilizados para o desenvolvimento de tumor para fins de diagnóstico e/ou terapia (PETERSON; HOGHTON, 2004; TALMADGE *et al.*, 2007; NI *et al.*, 2009).

2.2.3. Marcadores específicos

Na oncologia clínica as imagens auxiliam na detecção, localização, caracterização e estadiamento das lesões nos pacientes com câncer, além de direcionar intervenções terapêuticas e dar respostas sobre evolução do tratamento e prognóstico. Desta forma, atualmente é difícil imaginar avanços na área de oncologia sem a contribuição de imagens em nível bioquímico e molecular.

As imagens moleculares são definidas como a visualização, caracterização e medida de processos biológicos a nível molecular e celular em organismos vivos (THAKUR; LENTLE, 2005; MANKOFF, 2007; SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009). Os agentes de imagens moleculares podem ser utilizados no câncer de mama para *screening*, estadiamento e avaliações de resposta ao tratamento. Dentre as técnicas empregadas para a obtenção destas imagens destacam-se as imagens cintilográficas realizadas por tomografia por emissão de pósitron (PET) e aquelas fornecidas pela tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT) (ECKELMAN *et al.*, 2008; MUNNINK *et al.*, 2009).

Para a marcação de tumores muitas alternativas podem ser utilizadas, por exemplo, marcadores do metabolismo de glicose ([¹⁸F]fluordesoxiglicose) e da síntese de DNA ([¹⁸F]flúor-L-timidina), ambos aumentados nas células tumorais. As superfícies das células podem apresentar maior concentração de receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e de fatores de crescimento (HER2, EGFR), que podem ser úteis no diagnóstico do câncer. Há ainda, outros alvos que tem papel importante na progressão tumoral, e que normalmente não ocorrem no tecido normal, como fatores envolvidos na angiogênese (VEGF) e na hipoxia (MUNNINK *et al.*, 2009).

Uma grande variedade de agentes de imagem tumoral, incluindo peptídeos, proteínas, anticorpos e fragmentos de anticorpos têm sido desenvolvidos para detecção *in vivo* de receptores supraexpressos em diversos tipos de tumores. Dentre estes compostos os peptídeos apresentam maior aceitação. A escolha pelos peptídeos se deve as melhores características apresentadas por estas moléculas, como velocidade de depuração, estabilidade metabólica e principalmente, tolerância a modificações em sua estrutura. (SCHOTELIUS; WESTER, 2009).

Nos últimos anos uma variedade de receptores para peptídeos tem sido identificada em maior proporção em tecidos tumorais, como é demonstrado na Tabela 1 (WEINER; THAKUR, 2002). Assim, peptídeos radiomarcados podem fornecer compostos que apresentem aplicações para a terapia e/ou diagnóstico de diversos tumores (DURKAN *et al.*, 2007).

Tabela 1 - Principais peptídeos, suas principais funções e tecidos de maior expressão de receptores (WEINER; THAKUR, 2002).

Peptídeo	Funções	Tumores com maior expressão de receptores
Bombesina	Contração do TGI ¹ .	Glioblastoma e tumores de próstata, mama, estômago, cólon e pâncreas.
Colecistoquinina B	Contração da vesícula biliar e secreção de ácido.	Tumores gastrointestinais, ovarianos tireoidianos.
Somatostatina	Inibição da liberação de fatores de crescimento.	Adenocarcinoma de próstata com diferenciação neuroendócrina, tumores de pulmão e mama.
VIP ²	Vasodilatador, promotor do crescimento.	Tumores de pulmão, pâncreas, próstata, bexiga e ovário.
Substância P	Vasodilatador e neuro-modulador.	Tumores gliais, tireoidianos e de mama.
Neurotensina	Regula funções de crescimento.	Meningiomas, tumores de próstata, pâncreas, pulmão e cólon.
¹ TGI = Trato gastrointestinal ² VIP = Peptídeo intestinal vasoativo		

Os dois radionuclídeos mais utilizados na marcação de peptídeos são o tecnécio-99m e o índio-111. O índio-111 (¹¹¹In) tem sido muito usado como marcador de anticorpos e peptídeos. O primeiro peptídeo radiomarcado aprovado para uso clínico foi o OctreoScan®, um análogo da somatostatina marcado com ¹¹¹In. Este isótopo apresenta tempo de meia-vida de 67 horas que o torna ideal para radiomarcagem de imunoglobulinas, onde a imagem é realizada num intervalo de até sete dias após a sua administração. No entanto, devido a sua baixa disponibilidade e alto custo (produzido em ciclotron) o ¹¹¹In apresenta características inferiores ao ^{99m}Tc para fins de diagnóstico (LANGER; BECK-SICKINGER, 2001).

Portanto, peptídeos radiomarcados com tecnécio-99m (^{99m}Tc) são bons candidatos para fornecer imagens de boa qualidade, pois, conforme descrito anteriormente, os peptídeos apresentam rápida depuração sanguínea e facilitada perfusão pelos tecidos, proporcionando uma boa relação alvo/não alvo para o tecido em análise. A radiomarcagem de peptídeos pode ser realizada de três maneiras distintas: marcação direta, o radionuclídeo se liga diretamente ao peptídeo que se deseja estudar. É uma técnica simples e de fácil realização, porém é um processo limitado a peptídeos que apresentem ligações dissulfeto (S-S), como, por exemplo, a somatostatina. As outras duas formas de marcação de peptídeos utilizam agentes quelantes que são capazes de complexar com o radionuclídeo desejado. O agente quelante pode ser

acoplado ao peptídeo antes ou após sua radiomarcagem. Sendo o primeiro método mais utilizado, pois após a formação e purificação do composto final (peptídeo + agente quelante), este é, então, radiomarcado com o isótopo desejado em uma etapa rápida, sem múltiplos passos de preparação e purificação (LANGER; BECK-SICKINGER, 2001).

Os agentes quelantes para o ^{99m}Tc exibem baixa taxa de dissociação e o átomo de tecnécio no estado de oxidação desejado. Uma variedade de quelantes tem sido desenvolvida para a marcação com ^{99m}Tc , dentre eles encontram-se os triaminotiois (N_3S), os diaminoditiois (N_2S_2), o hexametilpropilenoaminóxima (HMPAO) e o ácido hidrazinonicotínico (HYNIC), mostrados na Figura 3 - (LANGER; BECK-SICKINGER, 2001, BLOK *et al.*, 2004).

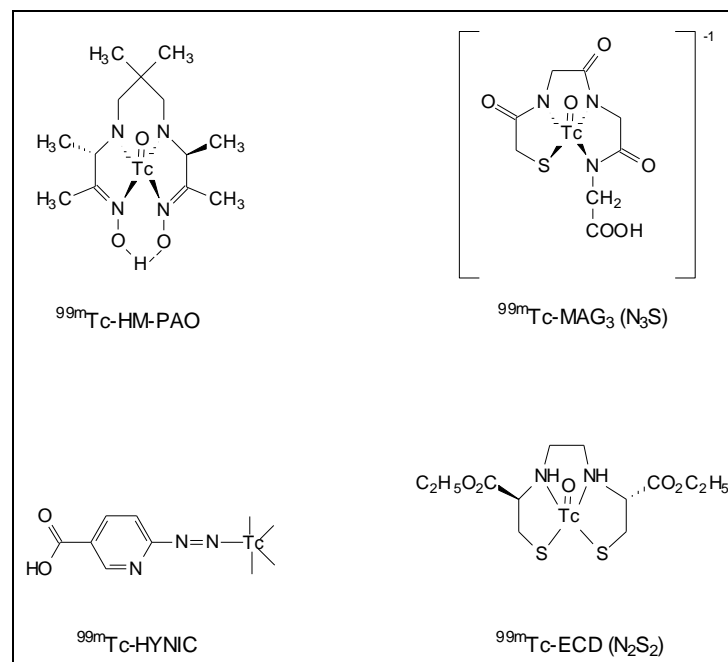


Figura 3. Estrutura dos agentes quelantes para o tecnécio-99m (JURISSON, 1993)

O HYNIC complexa-se com tecnécio-99m de maneira rápida e com bons rendimentos e pode ser acoplado a moléculas como proteínas, polipeptídeos e glicoproteínas (LAVERMAN *et al.*, 1999, WELLING *et al.*, 2004, BENERJEE *et al.*, 2005; KING *et al.*, 2007; ANANIAS *et al.*, 2012). Devido as suas características, a complexação do HYNIC com átomos de tecnécio-99m é realizada em presença de co-ligantes, como tricina e ácido etilendiaminodiacético (EDDA), que estabilizam o complexo formando uma ligação estável (GANDOMKAR *et al.*, 2007, MIRANDA-OLVERA *et al.*, 2007).

2.2.3.1 Bombesina

Bombesina é um tetradecapeptídeo (Figura 4) isolado da pele do sapo *Bombina bombina* e apresenta alta afinidade pelo receptor para o peptídeo liberador de gastrina presente nos

mamíferos. A bombesina pertence à família de peptídeos que inclui o peptídeo liberador de gastrina, composto por 27 aminoácidos, e a neuromedina B, composta por 10 aminoácidos, que é derivada de suínos (PATEL *et al.*, 2006).

PLG ₍₁₈₋₂₇₎	Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂
Bombesina	pGlu-Gln-Arg-Leu- Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂
NMB	Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met-NH₂

Figura 4. Seqüência de aminoácidos dos peptídeos PLG₁₈₋₂₇ (Peptídeo liberador de gastrina), bombesina e NMB (Neuromedina B) - (Adaptado de PATEL *et al.*, 2006).

As atividades farmacológicas deste peptídeo incluem estimulação da liberação de hormônios como gastrina e somatostatina, além de estimular a contração do músculo liso do estômago e intestino. Além disso, os receptores para PLG e bombesina apresentam efeitos mitogênicos e estimulam a proliferação tumoral (LANGER; BECK-SICKINGER, 2001).

Existem quatro subtipos de receptores para a família de peptídeos liberadores de gastrina que são conhecidos como BB1-R, BB2-R, BB3-R e BB4-R, sendo todos receptores acoplados a proteína G. Uma grande variedade de tumores apresenta expressão acentuada destes receptores como os tumores de pulmão, mama, pâncreas, cólon e próstata (MARKWALDER; REUBI, 1999, ZHANG *et al.*, 2006, ZHANG *et al.*, 2007).

Breeman *et al.* (1999) relataram estudos com análogos de bombesina radiomarcados com ¹¹¹In e encontraram que agonistas foram internalizados pelas células com receptores para este peptídeo enquanto que antagonistas não apresentaram esta característica, mostrando que para utilização como agentes de radiodiagnóstico os agonistas são mais adequados. Os análogos marcados com tecnécio-99m foram primeiramente testados em 1998 por Baidoo *et al.* e também apresentaram boa afinidade pelos receptores para PLG.

Vários estudos têm sido realizados utilizando análogos de bombesina acoplados a um agente quelante para o radionuclídeo desejado, geralmente, índio-111 ou tecnécio-99m e estes compostos foram utilizados com o intuito de identificar tumores (BREEMAN *et al.*, 2002; HOFFMAN *et al.*, 2003, SCOPINARO *et al.*, 2003, VARVARIGOU *et al.*, 2004, DURKAN *et al.*, 2007; SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009; JACKSON *et al.*, 2012). Alguns destes radiofármacos apresentaram elevada seletividade pelos receptores nas células tumorais, utilizando a seqüência completa do peptídeo ou uma seqüência truncada contendo apenas oito aminoácidos (Bombesina₍₇₋₁₄₎NH₂). Isto demonstrou que a porção C-terminal da seqüência de aminoácidos é necessária para a manutenção da afinidade pelo sítio de

ligação no receptor, desta forma a região oposta (N-terminal), normalmente é utilizada para a radiomarcagem (FAINTUCH *et al.*, 2009).

Gugger e Reubi (1999) demonstraram que 62% dos carcinomas de mama e 100% das metástases destes cânceres apresentaram maior expressão dos receptores para bombesina, confirmando a possibilidade da utilização de análogos destes peptídeos para fins de diagnóstico e terapia.

Estudo realizado por Scopinaro *et al.* (2002) utilizando um análogo de bombesina radiomarcado com tecnécio-99m apresentou maior afinidade pelo tecido tumoral quando comparado com o radiofármaco ^{99m}Tc-sestamibi, utilizado na clínica como ferramenta complementar no diagnóstico de câncer de mama. Este fato demonstra a relevância da utilização destes peptídeos para a obtenção de métodos de diagnóstico cada vez mais precisos e precoces.

3 Lipossomas

3.1 Definição

Lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos freqüentemente por fosfolípidos, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas. Essas bicamadas circundam uma cavidade aquosa interna e se encontram envolvidas por um meio aquoso (Figura 5). Considerando que os lipossomas são constituídos por moléculas anfifílicas, os mesmos são capazes de encapsular substâncias hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas. Moléculas hidrofílicas são encapsuladas na sua cavidade interna, onde estão presentes os grupos polares dos fosfolípidos. As substâncias lipofílicas são acomodadas na região apolar da bicamada e as anfifílicas ao longo de toda sua extensão, interagindo com a região apolar e polar. Esses sistemas lipídicos foram descritos, na década de 60, por Bangham e colaboradores (1965) como modelos de membranas biológicas. A utilização dos lipossomas como sistemas de liberação de fármacos foi proposta na década de 70. Entretanto, as primeiras formulações de lipossomas estudadas não produziram os resultados esperados, devido à instabilidade das vesículas, à baixa taxa de encapsulação dos fármacos e à escolha inadequada da via de administração (LASIC, 1998).

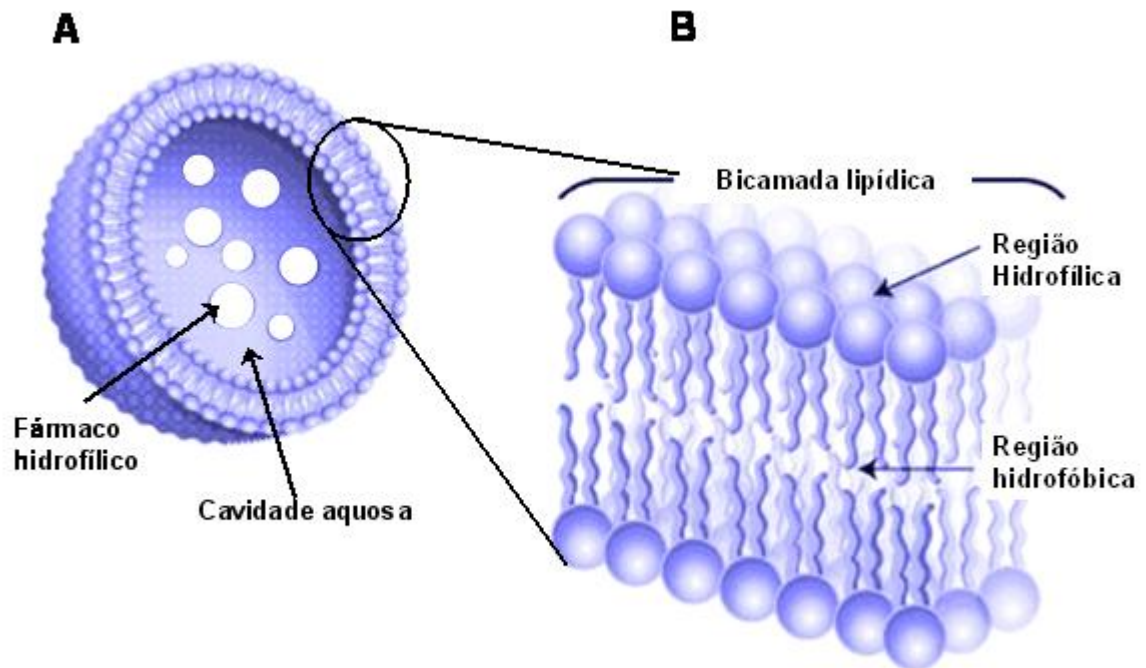


Figura 5. Representação esquemática da estrutura dos lipossomas.

3.2 Classificação

As propriedades químicas e físico-químicas dos lipossomas variam de acordo com sua composição lipídica, diâmetro vesicular, lamelaridade, carga superficial e método de preparação.

3.2.1 Lipossomas unilamelares e multilamelares

Os lipossomas são classificados de acordo com o diâmetro e número de bicamadas em (i) vesículas unilamelares pequenas (SUV), (ii) vesículas unilamelares grandes (LUV) e (iii) vesículas multilamelares (MLV). As vesículas unilamelares, formadas por uma bicamada única, são denominadas SUV quando possuem diâmetro compreendido entre 25-50 nm e em LUV, quando são maiores que 100 nm (Figura 6). Os lipossomas multilamelares são formados por bicamadas sucessivas, separadas por compartimentos aquosos, com diâmetro compreendido entre 100-1000 nm (NEW, 1990; SAHOO, 2003).

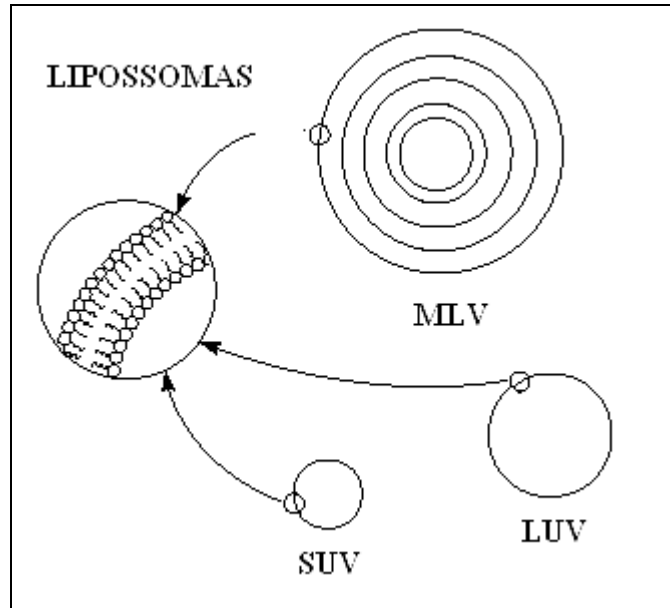


Figura 6. Classificação de lipossomas quanto ao diâmetro e número de bicamadas (Adaptado de LASIC, 1998).

3.2.2 Lipossomas convencionais e de circulação prolongada

Os lipossomas convencionais, quando administrados por via intravenosa, sofrem adsorção de proteínas séricas (opsoninas), ocasionando sua captura pelas células do sistema fagocitário mononuclear (SFM), sobretudo no fígado, baço e medula óssea. Foi observado que a incorporação, na membrana dos lipossomas, de lipídeos acoplados a polímeros de etilenoglicol (PEGs), altera sua interação com o ambiente, sendo o efeito mais importante o impedimento da captura pelos macrófagos e a prolongação de sua presença na corrente sanguínea. Esses lipossomas (Figura 7), denominados lipossomas de circulação prolongada, permitem uma distribuição do fármaco para outros órgãos além daqueles do SFM (FONTES *et al.*, 2005). Concentrações de 5-10 % de fosfatidiletanolamina acoplado a PEG (PE-PEG) de massa molecular 1000-2000 Da conferem excelente estabilidade às formulações (ULRICH, 2002).

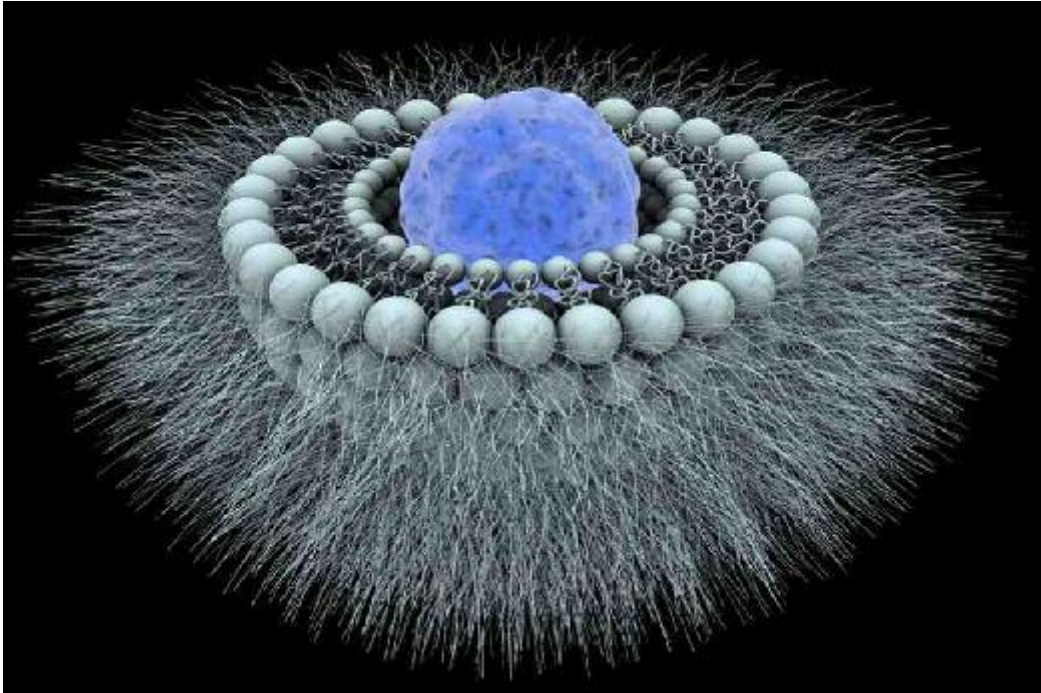


Figura 7. Representação esquemática dos lipossomas de circulação prolongada.

3.2.3 Lipossomas pH-sensíveis

O uso de lipossomas pH-sensíveis como sistemas de liberação de fármacos foi sugerido a partir da observação de que tecidos enfermos (tumores, inflamações e infecções) apresentam um pH menor do que os tecidos normais (GULINO *et al.*, 1967), além do fato de que alguns tipos de vírus desenvolveram estratégias para aproveitar-se da acidificação do meio do lúmen endossomal para infectar células (SIMÕES *et al.*, 2004). Esses lipossomas exibem transições de fases, características dos seus constituintes fosfolipídicos, que são responsáveis pela desestabilização das vesículas em meio ácido e são estáveis em pH fisiológico (pH 7,4).

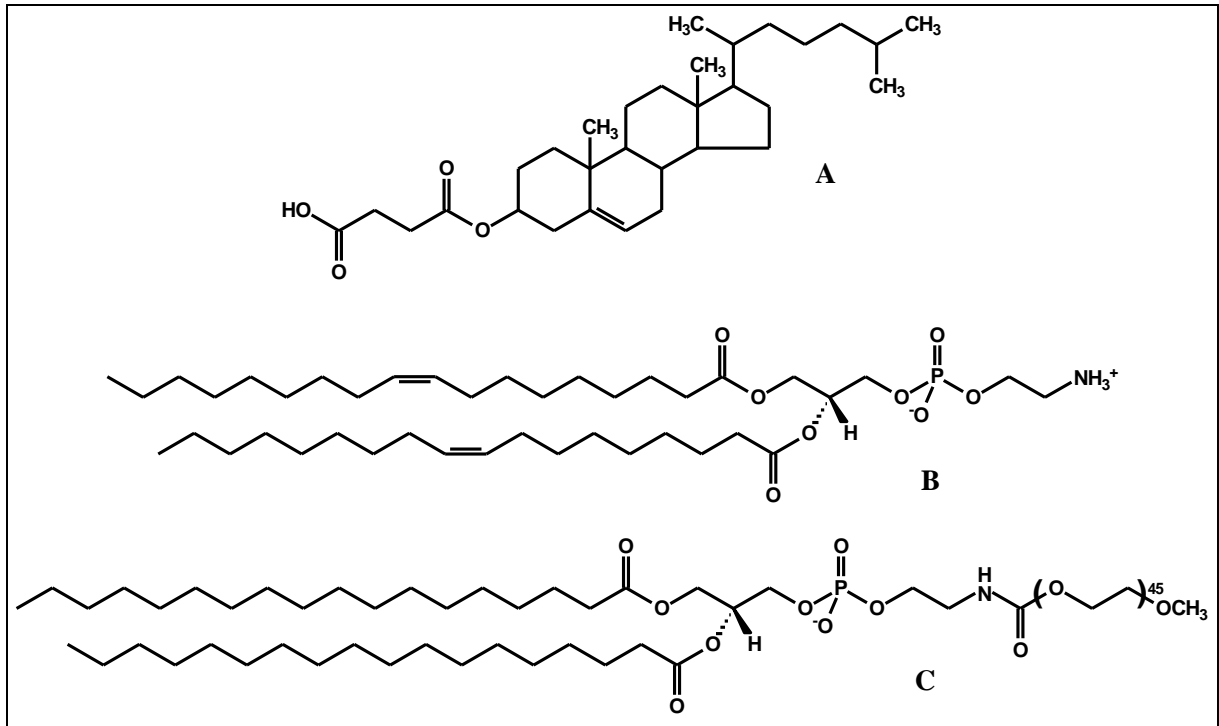


Figura 8. Estruturas químicas de CHEMS (A), DOPE (B) e DSPE-PEG₂₀₀₀ (C).

Os lipossomas pH-sensíveis são constituídos por fosfolípides derivados da fosfatidiletanolamina (PE), como por exemplo, a dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE). Estes derivados organizam-se em meio aquoso, a temperatura ambiente, sob a forma hexagonal, não sendo capazes de se apresentar na forma de vesículas (SIEGEL, 1986). A formação de lipossomas com estes fosfolípides requer a adição de agentes estabilizantes, normalmente lípides carboxilados, como o hemisuccinato de colesterila (CHEMS), que em pH fisiológico se encontram sob a forma ionizada (Figura 8). Esses estabilizantes são capazes de se inserirem entre as moléculas de fosfolípides, e o aparecimento de repulsões eletrostáticas entre os grupamentos carboxila, presentes no estabilizante, e os grupos fosfato dos fosfolípides favorecem a organização lamelar (Figura 9), possibilitando a formação dos lipossomas. A exposição dos lipossomas pH-sensíveis a um meio ácido resulta na protonação dos agentes estabilizantes, com conseqüente desestabilização das vesículas e a liberação do material encapsulado (OLIVEIRA *et al.*, 2000).

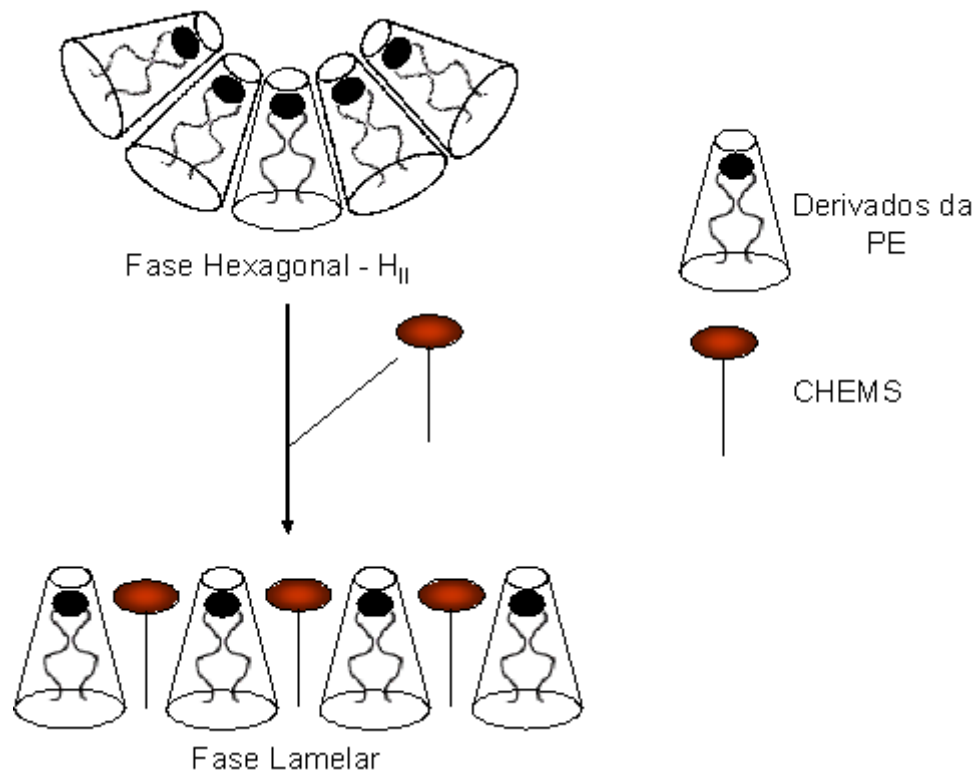


Figura 9. Representação esquemática da organização estrutural de derivados da PE na ausência e na presença de CHEMS.

3.3 Propriedades físicas e físico-químicas dos lipossomas

As propriedades e aplicações dos lipossomas dependem das características físicas e físico-químicas de suas membranas.

3.3.1 Transição de fase dos lipídes

A fluidez da bicamada, quando constituída de um único tipo de lípide, depende da temperatura de transição de fase (T_m) do estado gel (sólido) para o estado líquido-cristalino (fluido) (Figura 10). Quando a temperatura do meio é igual a T_m , as cadeias carbônicas dos lípides passam do estado ordenado (sólido) para o estado fluido no qual estas cadeias encontram-se desordenadas e têm grande liberdade de movimento. Portanto, de acordo com a T_m , as membranas lipossomais de diferentes composições podem exibir diferentes níveis de fluidez sob as mesmas condições de temperatura. A permeabilidade da bicamada depende da fluidez da membrana e da natureza do soluto encapsulado. A taxa de permeabilidade mais elevada ocorre na T_m , e é menor no estado “gel” em comparação com o estado fluido (FRÉZARD, 1999).

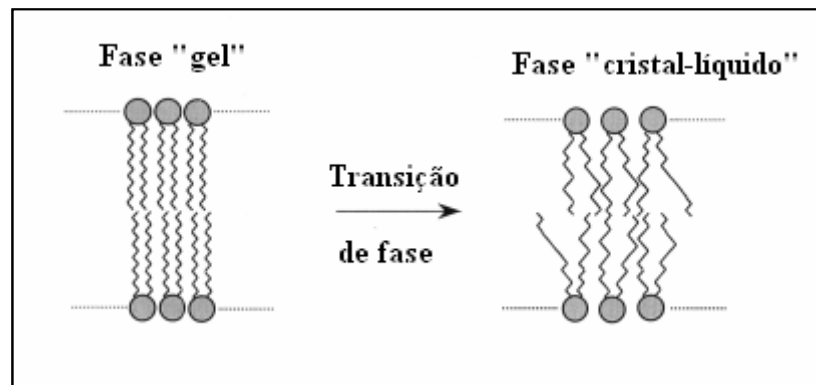


Figura 10. Comportamento de fases das membranas lipídicas (Adaptado de FRÉZARD *et al.*, 2005).

Um componente lipídico importante, muito utilizado na composição dos lipossomas, é o colesterol. Este aumenta a rigidez das membranas no estado "cristal-líquido" e reduz a rigidez e os defeitos estruturais das membranas no estado "gel".

3.3.2 Diâmetro das vesículas

A obtenção de lipossomas com diâmetro reduzido e distribuição homogênea das vesículas é um importante fator para garantia da estabilidade dessa forma farmacêutica. Muitos estudos utilizam lipossomas unilamelares homogêneos com diâmetro compreendido entre 50 e 150 nm. Essa faixa é um meio termo entre a eficiência de encapsulação (aumenta de acordo com o aumento do diâmetro), a estabilidade do lipossoma (diminui com o aumento do diâmetro acima da faixa ótima de 80-200 nm) e capacidade de extravasamento (diminui com o aumento do diâmetro). Além disso, para preparações de uso intravenoso o limite de 5 μm apresenta relevância fisiológica, por ser um preventivo da oclusão da microvasculatura, uma vez que os capilares sanguíneos possuem diâmetro interno entre 4 e 9 μm (LASIC, 1998).

São utilizadas diferentes técnicas para análise do diâmetro e distribuição dos lipossomas. Dentre estas estão compreendidas técnicas de espalhamento da luz (BERGER, N. *et al.*, 2001; CASALS *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2006) e microscopia, como microscopia de criofratura (BERGER *et al.*, 2001) e microscopia de força atômica (RUOZI *et al.*, 2005; RAMACHANDRAN *et al.*, 2006). Neste trabalho foi empregada a técnica denominada espectroscopia de correlação de fótons (PCS) ou espalhamento dinâmico da luz (*Dynamic Light Scattering*) na análise do diâmetro das vesículas lipossomais.

A técnica de PCS consiste em atravessar determinada amostra com um feixe de laser, de modo que as partículas presentes espalhem a luz. O espalhamento da luz está relacionado ao movimento browniano das partículas de modo que a intensidade da luz espalhada por estas forme um padrão de movimento. Por meio da dispersão da luz, torna-se possível

determinar o diâmetro médio das partículas. Partículas menores são capazes de movimentarem mais rapidamente e causam rápidas modificações no espalhamento da luz. Por outro lado, partículas de maior diâmetro, as quais possuem menores coeficientes de difusão, resultam em menores flutuações na intensidade do espalhamento da luz (HASKELL *et al.*, 1998). Esta técnica permite a medida de partículas cujos diâmetros estejam compreendidos na faixa de 1 a 5000 nm (MALVERN INSTRUMENTS, 1996a).

3.3.3 Potencial Zeta

A medida do potencial zeta é uma ferramenta muito útil na detecção da magnitude de interações repulsivas entre as partículas coloidais e é comumente utilizada para avaliar a estabilidade dos colóides (CASALS *et al.*, 2003).

O potencial zeta pode ser definido como a carga existente na fronteira entre a superfície de uma partícula individual e seus íons associados. A carga não pode ser medida diretamente, mas pode-se determinar a grandeza da carga elétrica pelas medidas da mobilidade eletroforética das partículas submetidas à aplicação de um determinado campo elétrico (FLORENCE; ATTWOOD, 2003).

Para a determinação do potencial zeta dos lipossomas foi utilizado um método que consiste na incidência de um feixe de luz e aplicação de um campo elétrico de força conhecida através da amostra. Neste método, as partículas carregadas se deslocam com velocidades distintas induzindo deslocamentos da frequência do feixe de luz incidente, gerando um espectro de frequências. As frequências são então utilizadas para os cálculos das velocidades, as quais são convertidas para valores de mobilidades eletroforéticas e em seguida os dados são transformados em valores de potencial zeta. (MALVERN INSTRUMENTS, 1996b).

3.3.4 Teor e eficiência de encapsulação

O teor e a eficiência de encapsulação de uma substância em lipossomas são dois parâmetros importantes que devem ser considerados na escolha do método de preparação. Esses parâmetros podem ser otimizados através da escolha do método de encapsulação e da manipulação da composição lipídica da membrana. É importante a obtenção de altas taxas de encapsulação, particularmente quando o fármaco possui doses elevadas ou quando não é possível o reaproveitamento do fármaco não-encapsulado. A relação fármaco/lípide também deverá ser maximizada, visto que determina a quantidade de lípide a ser administrada ao paciente. Assim, quanto menor for a quantidade de lípide veiculada,

menores serão os riscos de efeitos colaterais associados aos mesmos (SWARBRICK;BOYLAN, 1994; FRÉZARD *et al.*, 2005).

3.4 Estabilidade física e química dos lipossomas

Para funcionar efetivamente como um vetor de fármacos, é importante que os lipossomas mantenham-se suficientemente estáveis por um período de tempo razoável. Esses podem sofrer mudanças tanto físicas quanto químicas durante a estocagem. As mudanças físicas podem ocorrer nas vesículas fosfolípídicas, incluindo agregação e fusão. Já as mudanças químicas incluem hidrólise das ligações éster dos fosfolípides em dispersões aquosas de lipossomas e oxidação dos fosfolípides que contêm ácidos graxos insaturados, bem como a oxidação do colesterol. Todas essas transformações podem causar a perda do material encapsulado (CHOW *et al.*, 1995).

Um dos aspectos mais importantes relacionados a estabilidade física dos lipossoma é a mudança do tamanho das partículas e de sua distribuição. A agregação e a fusão das vesículas são as principais fontes desta instabilidade. Agregação de lipossomas neutros é causada por interações de Van der Waals, e tende a ser mais pronunciada em vesículas grandes. Embora fatores como resíduos de solventes e traços de elementos possam potencializar esse processo, a formação de agregados de lipossomas é um fenômeno natural e inevitável para membranas sem carga. A maneira mais simples de contornar essa situação é utilizar lípides carregados na formulação (NEW, 1990). Casals e colaboradores (2003) afirmam que a presença de 25 % de lípides carregados confere uma suficiente estabilidade eletrostática que evita a agregação e fusão de vesículas por um período de 3 meses, a 4°C. Outra forma de aumentar a estabilidade dos lipossomas é revesti-los com polímeros hidrofílicos não-iônicos, como PEG, o que leva ao aparecimento da repulsão de hidratação caracterizada pela presença de uma barreira estérica que impede a aproximação das vesículas (ULRICH, 2002).

Muitas dispersões de fosfolípides contêm lípides insaturados (cadeias acila) como parte de sua cadeia molecular. Os lípides insaturados sofrem degradação oxidativa ou peroxidação lipídica. Essas reações podem ocorrer durante a preparação, o armazenamento ou no momento do uso. A peroxidação é um processo complexo envolvendo reações radiculares que resultam na formação de peróxidos cíclicos e hidroperóxidos. Essa degradação oxidativa acontece rapidamente se os lípides insaturados não forem protegidos durante a preparação e o armazenamento. Devem ser protegidos pela manutenção em atmosfera de gás inerte, como nitrogênio ou argônio; pela remoção de metais pesados (adição de EDTA) ou pela adição de antioxidantes, como alfa-tocoferol ou butilhidroxitolueno.

A hidrólise dos lípides leva a formação de lisofosfolípides (Figura 11) e ácidos graxos livres. Os lisofosfolípides podem ser posteriormente hidrolisados em glicerofosfocompostos e ácidos graxos. Esses produtos de reação podem alterar a rigidez da bicamada lipossomal, a retenção do material encapsulado e o diâmetro das vesículas e, portanto, devem ser mantidos em níveis mínimos (VEMURI *et al.*, 1995).

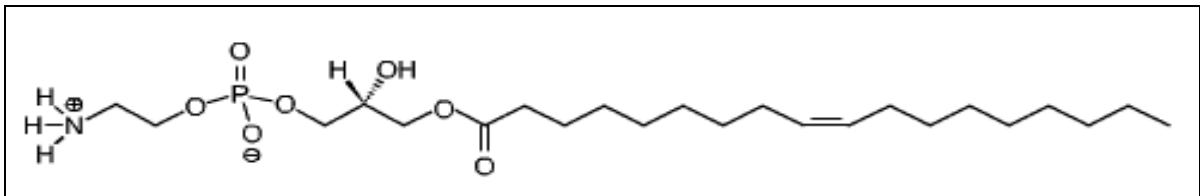


Figura 11. Estrutura química do lisofosfolípide da DOPE (1-oleil 2-hidroxi glicero-3-fosfoetanolamina).

3.5 Liofilização

Com o objetivo de aumentar a estabilidade física e química dos lipossomas, o processo de liofilização tem sido utilizado, aumentando dessa forma a vida de prateleira das formulações lipossomais (YANG *et al.*, 2006). Em relação à estabilidade desta forma farmacêutica, a utilização de uma suspensão aquosa como um produto comercial é questionável. Em contraste, uma preparação “seca” para ser hidratada imediatamente antes da sua utilização pode evitar muitos problemas associados com as dispersões aquosas de lipossomas. O processo pode ser aplicado sobre os lípides ou sobre os lipossomas propriamente ditos (PAYNE *et al.*, 1986). Tem sido relatado que lipossomas contendo moléculas encapsuladas podem ser liofilizados e reconstituídos com significativa retenção da taxa de encapsulação e sem alterações significativas no tamanho das vesículas (VEMURI *et al.*, 1995; WIEBER *et al.*, 2012).

Liofilização é o processo empregado na desidratação de substâncias extremamente sensíveis ao calor. Nesse processo, a solução ou suspensão líquida é inicialmente congelada; em seguida, a pressão sobre a matéria congelada é reduzida e, por fim, a água é removida por sublimação (AULTON, 2005). O processo de liofilização envolve 3 estágios: (i) congelamento da suspensão lipossomal; (ii) secagem primária (perda de água por sublimação até 0,5 %) e (iii) secagem secundária (remoção da água residual e obtenção de pó seco poroso) (AULTON, 2005; MOHAMMED *et al.*, 2006).

3.6 Crioproteção

Como descrito anteriormente, a liofilização é bastante utilizada para prolongar a vida de prateleira dos lipossomas. Entretanto, tanto o congelamento quanto a secagem podem induzir a danos, resultando no aparecimento de fenômenos relacionados à agregação e/ou

fusão das vesículas. Os lipossomas podem ter seu diâmetro alterado durante a liofilização e/ou durante a subsequente reidratação se estabilizantes apropriados não forem empregados (MOHAMMED *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2010). Assim sendo, para promover estabilidade física durante o processo de liofilização, agentes crioprotetores como açúcares (por exemplo, sacarose, trealose e glicose) e seus derivados podem ser utilizados. Aminoácidos também têm sido estudados quanto a sua capacidade crioprotetora (MOHAMMED *et al.*, 2007).

Os açúcares inserem-se entre as porções polares do fosfolípide no estado seco, levando à formação de ligações de hidrogênio (Figura 12). Essas interações entre os açúcares e os fosfolípides permitem a manutenção do estado físico das membranas no estado seco de forma similar à existente no estado hidratado. (van WINDEN *et al.*, 1997). Além disso, a manutenção da integridade da membrana lipídica na presença de açúcares está associada com a formação de uma matriz vítrea dos açúcares à temperatura ambiente. Esta é amorfa, termodinamicamente instável e caracterizada por alta viscosidade e baixa mobilidade molecular. A formação dessa matriz vítrea evita a fusão da membrana lipídica, sendo isto importante para a manutenção do diâmetro das vesículas e a retenção do conteúdo encapsulado (CACELA; HINCHA, 2006; RICKER *et al.*, 2003; van WINDEN *et al.*, 1997).

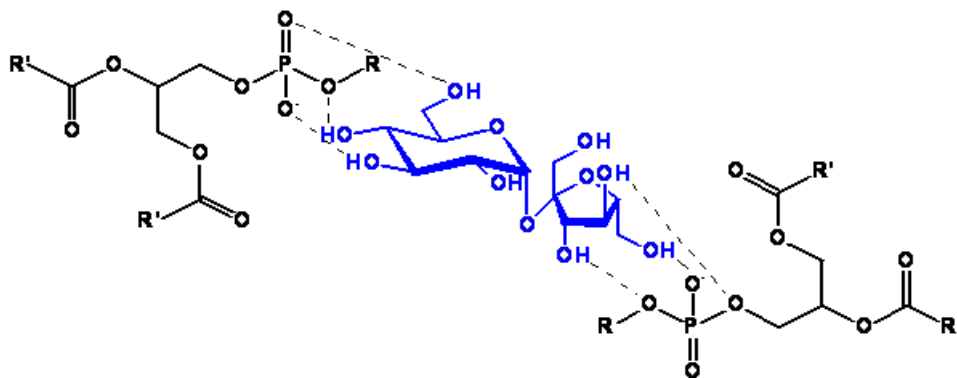


Figura 12. Representação esquemática da interação fosfolípide-açúcar.

4 Considerações finais

Com base no exposto, torna-se evidente o interesse em desenvolver métodos de diagnóstico precoces e de elevada especificidade para a identificação de tumores de mama, um dos cânceres de maior incidência entre a população mundial e que ainda apresenta elevada mortalidade. Neste contexto, peptídeos radiomarcados, como a bombesina, assumem papel relevante devido a suas características favoráveis como radiotraçadores.

Com o intuito de melhorar a qualidade do diagnóstico seria interessante a utilização de lipossomas pH-sensíveis, de circulação prolongada, como carreadores deste peptídeo para o local em análise (tumor), aumentando sua concentração no sítio alvo, e conseqüentemente, melhorando a qualidade das imagens cintilográfica.

OBJETIVO E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Objetivo

Avaliar o potencial do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-bombesina}_{(7-14)}$ livre e encapsulado em lipossomas pH-sensíveis, de circulação prolongada, na identificação de tumores em modelos experimentais.

Objetivos específicos

- Avaliar a estabilidade do complexo formado em solução de NaCl 0,9% (p/v), plasma e em presença de cisteína;
- Avaliar a biodistribuição do complexo em animais Swiss e C57/Bl6 sadios;
- Avaliar o uso de crioprotetores no processo de liofilização dos lipossomas;
- Encapsular o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-bombesina}_{(7-14)}$ nos lipossomas pH-sensíveis e determinar a eficiência de encapsulação;
- Investigar a biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-bombesina}_{(7-14)}$ livre e encapsulado em lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada nos animais citados acima;
- Comparar o uso de lipossomas pH-sensíveis com lipossomas não pH-sensíveis quanto a capacidade de direcionar o radiofármaco para o sítio tumoral;
- Obter imagens cintilográficas de qualidade utilizando o radiofármaco livre ou encapsulado nos modelos experimentais propostos.
- Analisar quantitativamente as imagens cintilográficas por meio da determinação da radioatividade nas regiões de interesse (ROIs).

TRABALHO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 1

Marcação do peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ com tecnécio-99m e estudos de estabilidade

Marcação do peptídeo HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ com tecnécio-99m e estudos de estabilidade

1 Introdução

Peptídeos radiomarcados, atualmente, são uma alternativa para obtenção de agentes de diagnóstico de diversas doenças, entre elas o câncer. O peptídeo bombesina pode ser utilizado em estudos cintilográficos para identificação de diversos tumores (LANGER; BECK-SICKINGER, 2001).

O principal radionuclídeo utilizado nos processos de medicina nuclear é o tecnécio-99m, pois este isótopo apresenta propriedades físicas e químicas ideais para um radioisótopo, tais como: meia-vida física de 6,01 horas, emissão gama de baixa energia (140 keV), alta disponibilidade do radioisótopo a partir de um sistema gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$), além de apresentar um custo relativamente baixo (JURISSON, 1993; JONES, 1995; MARQUES *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2003).

Existem diversas maneiras de realizar a complexação entre o isótopo radioativo e o peptídeo a ser estudado. A maneira frequentemente empregada utiliza um quelante, específico para o tecnécio-99m, covalentemente ligado à molécula em análise. O HYNIC complexa-se com tecnécio-99m de maneira rápida e com bons rendimentos, podendo ser acoplado a moléculas como proteínas, polipeptídeos e glicoproteínas (LAVERMAN *et al.*, 1999, WELLING *et al.*, 2004, BENERJEE *et al.*, 2005; KING *et al.*, 2007). Devido ao seu caráter monodentado a complexação com átomos de tecnécio-99m é realizada em presença de co-ligantes, como tricina e ácido etilenediamodiácético (EDDA), que estabilizam o metal formando uma ligação estável (GANDOMKAR *et al.*, 2007, MIRANDA-OLVERA *et al.*, 2007).

Esta parte do trabalho experimental relata a marcação e estudos de estabilidade do peptídeo HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ radiomarcados com átomos de tecnécio-99m, além dos estudos *in vivo* de biodistribuição e imagens cintilográficas em dois modelos animais distintos (Swiss e C57/Bl6). Ao final, é relatado a preparação e os estudos de estabilidade de um kit liofilizado para a radiomarcação do referido peptídeo.

2 Material e método

2.1 Material

O peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foi adquirido da GL BioChem (Shanghai/China).

O tecnécio-99m foi obtido de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (IPEN/Brasil).

Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (EUA).

Os camundongos C57/Bl6 foram adquiridos do Centro de Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP) e mantidos sem restrição de água e ração, no biotério do laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Os camundongos Swiss foram adquiridos do centro de bioterismo da Faculdade de Farmácia da UFMG e mantidos, sem restrição de água e ração, no biotério do laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Todos os experimentos realizados em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), nº protocolo: 34/2010 (ANEXO 1).

2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para o peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎

Após a aquisição do produto foi realizado a CLAE para confirmação da pureza do material recebido. O equipamento utilizado consistia de duas bombas modelo 515, um auto-injetor modelo 717 Plus e um detector UV/Visível de duplo comprimento de onda modelo 2487 (Waters Instruments, Milford, MA, EUA) monitorados por um computador utilizando o software Empower Pro[®] versão 6.00.00.00. Utilizou-se uma coluna Symmetry[®] C-18, 4,6 mm x 150 mm, 5 μ m (Waters Instruments, Milford, MA, EUA).

Foram utilizados dois sistemas de eluentes: Eluente A: 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) em água; Eluente B: 0,1% de TFA em acetonitrila. O sistema de gradiente iniciou com 95% do eluente A e 5% do eluente B por 0,1 minuto, em seguida a composição do eluente foi, de maneira linear, alterada para 30% de A e 70% de B durante 10 minutos, do minuto 10 ao minuto 15, utilizou-se 5% de A e 95% de B. O volume de injeção das soluções foi de 20 μ L, com tempo de corrida de 15,0 minutos, sendo mantida a velocidade de fluxo da fase móvel igual a 1,0 mL/min. O material eluído foi detectado no comprimento de onda de 220 nm.

2.3 Formação do complexo ^{99m}Tc - HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎

Em um frasco âmbar foram adicionados 5 mg de ácido etilenodiamino-*N, N'*-diacético (EDDA) e 20 mg de tricina e, em seguida, foram solubilizados em 0,5 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v). Foram adicionados ao frasco 10 μg do peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ e 10 μL de uma solução de cloreto estano em HCl 0,25 N (1mg/mL) e o pH foi ajustado para 7-8 com solução de NaOH 0,1N. O frasco foi lacrado e realizou-se vácuo. Em seguida, 0,5 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v) contendo 37 MBq de pertecnetato de sódio foram adicionados ao frasco. A mistura reagente foi mantida em banho-maria fervente (100 °C) por 15 minutos e resfriada em água corrente.

2.4 Determinação da pureza radioquímica

O rendimento de marcação foi determinado por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando como fase móvel metiletilcetona para a determinação do percentual de TcO_4^- e solução acetonitrila:água (1:1) para avaliar a quantidade de TcO_2 . O rendimento de marcação foi considerado segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ marcação} = 100 - (\% \text{ TcO}_4^- + \% \text{ TcO}_2)$$

A pureza radioquímica do produto formado também foi avaliada por radiocromatografia utilizando o mesmo sistema de eluentes descrito no item 2.2. Foram obtidos dois radiocromatogramas, sendo o primeiro logo após a formação do complexo e o segundo, 24 horas após a radiomarkação. Para a aquisição do perfil radiocromatográfico foi utilizado o analisador Flow Scintillation Radiomatic 610TR (Perkin Elmer, USA)

2.5 Coeficiente de partição

O coeficiente de partição foi avaliado em uma mistura de octanol/água na razão de 1:1 (v/v). Uma alíquota de 0,1 mL da solução contendo 0,37 MBq do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foi colocada em um tubo de ensaio contendo 2 mL da mistura octanol/água, o tubo foi vortexado por 3 minutos e deixado em repouso até a completa separação das fases. Em seguida, recolheram-se alíquotas de 0,5 mL de cada fase (octanol e água) e determinou-se a radiação presente na fase orgânica e na fase aquosa. O coeficiente de partição foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\text{Coeficiente de Partição} = \log (\text{cpm fase orgânica}) / (\text{cpm fase aquosa})$$

2.6 Estabilidade de marcação *in vitro*

Foram realizados testes de estabilidade de marcação *in vitro* em presença de solução de NaCl 0,9% (p/v) e plasma de camundongo.

2.6.1 Solução de NaCl 0,9% (p/v)

Após a marcação o frasco contendo o peptídeo radiomarcado foi mantido a temperatura ambiente e após os tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas alíquotas foram retiradas para a verificação do teor de impurezas através de CCD como descrito anteriormente no item 2.4.

2.6.2 Plasma de camundongo

Após a marcação uma alíquota de 0,09 mL da solução contendo 0,37 MBq do peptídeo radiomarcado foi retirada e incubada em 1,00 mL de plasma de camundongo a 37°C sob agitação. Após os tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas alíquotas foram retiradas para a verificação do teor de impurezas através de CCD como descrito no item 2.4.

2.7 Transquelação com cisteína

Alíquotas de 0,1 mL do complexo ^{99m}Tc - HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foram incubadas a 37°C com solução de NaCl 0,9% (p/v) contendo diferentes concentrações do aminoácido cisteína. As concentrações de cisteína utilizadas nos teste basearam-se na relação mol/mol entre o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ e cisteína. As relações utilizadas foram 1:1, 1:10 e 1:100, respectivamente, seguindo metodologia descrita por Durkan *et al.* (2007) com algumas modificações . Após os tempos de 1, 2, 4, 6 e 24 horas alíquotas de 0,1 mL foram retiradas para a verificação do teor de impurezas através de CCD como descrito no item 2.4.

2.8 Estudo de biodistribuição em animais C57/Bl6 sadios

Foram utilizados 10 camundongos fêmeas C57/Bl6, pesando 17-23 g. Estes animais foram divididos em dois grupos onde cada animal recebeu, pela veia caudal, 3,7 MBq da solução contendo o complexo ^{99m}Tc - HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. Após os tempos de 1 (5 animais) e 4 (5 animais) horas os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg) e, em seguida, submetidos a eutanásia. Órgãos e tecidos como: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, bexiga, músculo, osso, tireóide, pâncreas, pele, cérebro, intestino delgado e intestino grosso foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade, e os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama (%ID/g).

2.9 Imagens cintilográficas em animais C57/Bl6 sadios

Em três animais C57/Bl6 fêmeas foram administrados, por via intravenosa, 37 MBq da solução de ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. As imagens foram adquiridas nos tempos de 1 e 4 horas após a administração do complexo radiomarcado, os camundongos foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob a gama câmara (Nuclide™ TH 22, Mediso, Hungria). Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256.

2.10 Estudo de biodistribuição em animais Swiss sadios

Foram utilizados 15 camundongos machos Swiss, pesando 20-25 g. Estes animais foram divididos em três grupos onde cada animal recebeu, pela veia da cauda, 3,7 MBq da solução contendo o complexo ^{99m}Tc - HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. Após os tempos de 1 (5 animais), 4 (5 animais) e 8 (5 animais) horas os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg) e, em seguida, submetidos a eutanásia. Órgãos e tecidos como: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, bexiga, músculo, tireóide, pâncreas foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade, e os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama (%ID/g).

2.11 Imagens cintilográficas em animais Swiss sadios

Em três animais Swiss machos foram administrados, por via intravenosa, 37 MBq da solução de ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. As imagens foram adquiridas nos tempos de 1, 4 e 8 horas após a administração do complexo radiomarcado, os camundongos foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob a gama câmara (Nuclide™ TH 22, Mediso, Hungria). Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia de 140 keV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256.

2.12 Depuração sanguínea em animais sadios

Uma alíquota de 0,1 mL da solução contendo o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foi administrada, pela veia caudal, em camundongos Swiss machos ou C57/Bl6 fêmeas. Foi realizada uma incisão na cauda dos animais e o sangue foi coletado, em tubos previamente pesados, nos tempos de 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a administração do radiofármaco. Os tubos foram pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade. Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de sangue (%ID/g).

2.13 Preparação do kit liofilizado para marcação do peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎

Em um frasco âmbar foram adicionados 5 mg de EDDA e 20 mg de tricina e solubilizados em 0,5 mL de solução de NaCl 0,9% (p/v). Foram adicionados ao frasco 10 μ g do peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ e 50 μ L de uma solução de cloreto estano em HCl 0,25 mol/L (1mg/mL) e o pH foi ajustado para 7-8 com solução de NaOH 0,1 mol/L. O frasco foi congelado em nitrogênio líquido por 5 minutos e levado ao liofilizador por 24 horas. Após a liofilização o frasco foi lacrado a vácuo. Em seguida, o produto liofilizado foi ressuspensionado com 1 mL da solução contendo o 37 MBq de pertecnetato de sódio, mantido em banho-maria fervente (100 °C) por 15 minutos e resfriado em água corrente. A pureza radioquímica foi determinada conforme descrita no item 2.4.

2.14 Estudo de estabilidade do kit formado

Quinze frascos lacrados do kit liofilizado foram armazenados em freezer a -20°C. Após os tempos de 30, 60, 90, 120, 180 dias o liofilizado foi ressuspensionado conforme descrito no item anterior e a pureza radioquímica foi determinada por cromatografia em camada delgada.

2.15 Análise estatística

Os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas foram comparados quantitativamente pelo teste t e/ou pelo teste de Tukey-Kramer utilizando o programa GraphPad Prism 5. Um nível de $p < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo.

3 Resultados e Discussão

3.1 CLAE para o peptídeo HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎

Antes do início dos experimentos de marcação o peptídeo foi avaliado por CLAE para determinação do grau de pureza do produto (Figura 13). Os resultados obtidos demonstraram elevada pureza (99%) para o derivado analisado e credenciam o produto aos estudos de marcação com os átomos de tecnécio-99m.

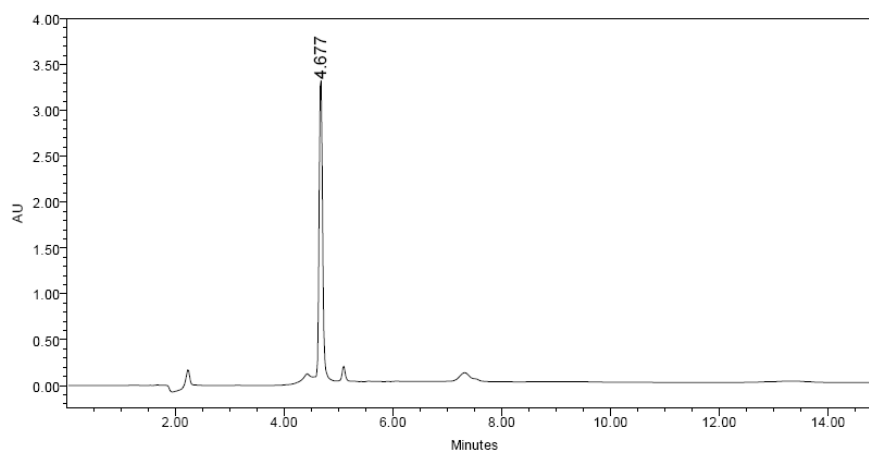


Figura 13. Perfil cromatográfico do peptídeo HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎

3.2 Pureza radioquímica e Coeficiente de partição

O complexo ^{99m}Tc -HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foi avaliado por cromatografia em camada delgada e apresentou pureza radioquímica igual a $97,8\% \pm 0,9$ no sistema de eluentes utilizado. Estes resultados foram reprodutíveis durante todo o período de experimentos.

A pureza radioquímica também foi avaliada por HPLC e apresentou resultados satisfatórios, confirmando os valores obtidos por CCD. O radiocromatograma do complexo radiomarcado é apresentado na Figura 14.

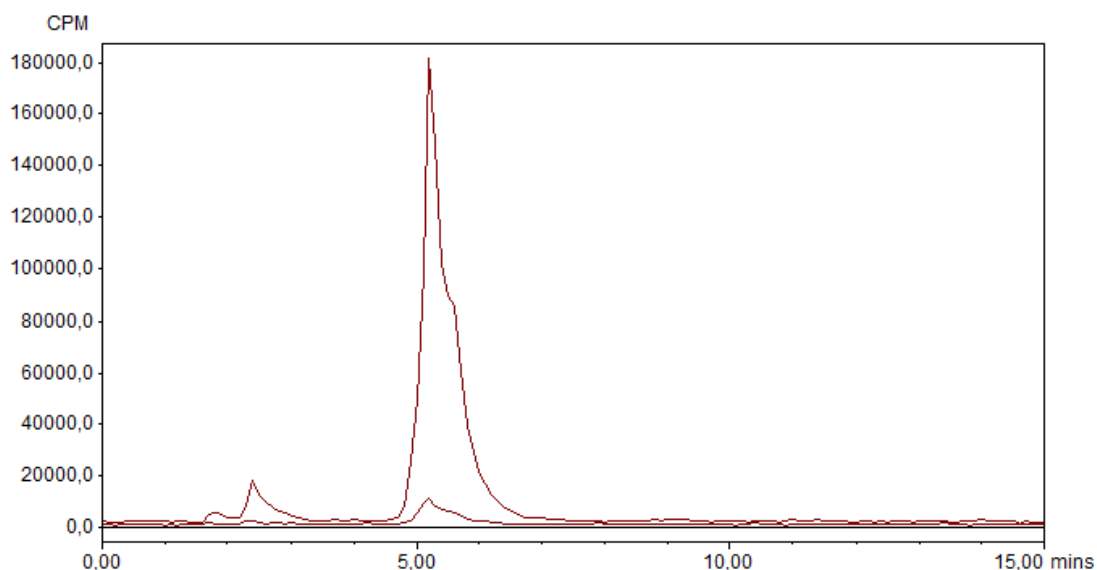


Figura 14. Radiocromatograma do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ no momento da marcação com os átomos de tecnécio-99m (pico de maior intensidade) e após 24 horas (pico de menor intensidade).

A presença de impurezas radioquímicas resulta em imagens de baixa qualidade devido à alta radiação de fundo ao redor dos tecidos e no sangue, além de expor o paciente a uma dose desnecessária de radiação (THEOBALD, 1990). Desta forma, é preconizado na literatura que o rendimento de marcação de um produto para estudos de biodistribuição seja superior a 90% (SAHA, 1998; TRHALL; ZIESSMAN, 2003; USP, 2011). Assim, o composto testado apresentou resultados satisfatórios nos dois testes realizados, mostrando que o referido complexo pode ser utilizado em estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas. Além disso, pela análise do radiocromatograma observa-se elevada estabilidade para complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, pois mesmo após 24 horas do processo de marcação, o tempo de retenção se manteve constante confirmando a estabilidade do produto formado.

O coeficiente de partição foi determinado em triplicata, utilizando os solventes octanol e água, e o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ apresentou valores negativos ($-1,78 \pm 0,10$), indicando caráter hidrofílico para o composto formado. Os dados são congruentes com aqueles apresentados por Faintuch *et al.* (2009) para este complexo.

3.3 Estudos de estabilidade

A estabilidade dos complexos radiomarcados é de extrema importância para a sua utilização nos estudos *in vivo*. Como relatado no item anterior, valores de impurezas superiores a 10% prejudicam a obtenção de imagens cintilográficas de qualidade e, portanto, inviabilizam os

experimentos em animais. Para a determinação da estabilidade são normalmente realizados testes em plasma a 37°C e/ou em presença de cisteína (FAINTUCH et al., 2009; OKARVI; JAMMAZ, 2012). Neste trabalho, além dos experimentos já citados acima foi avaliado também o comportamento do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ em solução de NaCl 0,9% (p/v) a temperatura ambiente.

Nos estudos de estabilidade em solução de NaCl 0,9% (p/v) e em plasma a 37°C o complexo radiomarcado apresentou acentuada estabilidade nos tempos avaliados como demonstrado na Tabela 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2. Estudo de estabilidade para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ em solução de NaCl 0,9% (p/v) a temperatura ambiente (n=6).

Tempos (horas)	% de marcação
1	98,6 ± 0,1
2	98,1 ± 0,8
4	97,4 ± 1,3
6	96,8 ± 1,2
24	95,1 ± 1,3

Tabela 3. Estudo de estabilidade para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ em plasma de camundongo a 37°C (n=6).

Tempos (hora)	% de marcação
1	97,2 ± 0,8
2	96,1 ± 0,7
4	94,3 ± 1,3
6	94,8 ± 1,5
24	91,6 ± 1,3

Uma das principais formas de instabilidade de peptídeos radiomarcados se deve a transquelação do tecnécio-99m para outros sítios de alta afinidade. Visto que o tecnécio apresenta elevada ligação a moléculas contendo átomos de enxofre, a tendência de esta transquelação ocorrer pode ser medida *in vitro* pelo ensaio em presença de cisteína (STALTERI et al., 1999).

Na avaliação da estabilidade do complexo formado em presença de cisteína pode-se observar alta afinidade do derivado HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelos átomos de tecnécio-^{99m}Tc, conforme apresentado nas Tabelas 4, 5 e 6. Mostrando que mesmo em presença de um quelante forte, como a cisteína, não houve transferência significativa do radionuclídeo para as moléculas do aminoácido. Estes achados estão de acordo com dados apresentados em outros trabalhos utilizando o HYNIC com o agente quelante (ANANIAS *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2012). Além disso, Faintuch *et al.*, 2009 e Hernandez-Cairo *et al.*, 2012, utilizando os mesmos co-ligantes avaliados neste estudo, relataram valores de estabilidade superiores a 90%, corroborando com os dados apresentados para o complexo ^{99m}Tc-HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎.

Tabela 4. Estudo de estabilidade do complexo ^{99m}Tc-HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ na presença equimolar cisteína (n=6).

Tempos (hora)	% de marcação
1	97,0 \pm 0,5
2	95,5 \pm 0,9
4	95,7 \pm 1,8
6	92,9 \pm 3,2
24	93,6 \pm 2,9

Tabela 5. Estudo de estabilidade do complexo ^{99m}Tc-HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ em presença de cisteína, na razão 1:10, respectivamente (n=6).

Tempos (horas)	% de marcação
1	94,6 \pm 2,3
2	96,0 \pm 1,9
4	94,6 \pm 0,7
6	94,6 \pm 2,3
24	94,1 \pm 2,4

Tabela 6. Estudo de estabilidade do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ em presença de cisteína, na razão 1:100, respectivamente (n=6).

Tempos (horas)	% de marcação
1	95,8 \pm 0,2
2	95,3 \pm 1,2
4	96,2 \pm 1,9
6	97,6 \pm 0,4
24	96,9 \pm 1,5

3.4 Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas em animais C57/Bl6 sadios

Nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas em camundongos da linhagem C57/Bl6 sadios foi possível observar que o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ apresentou acentuada excreção renal e rápida depuração sanguínea, como demonstrado nas Figuras 15 e 16, respectivamente. O valor de coeficiente de partição para o complexo radiomarcado apresentado anteriormente sugere carácter hidrofílico para o produto formado. Dados da literatura mostram que moléculas hidrossolúveis são eliminadas mais rapidamente pelo sistema renal (RANG *et al.*, 2004). Portanto, os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os dados encontrados na literatura, atestando a rápida eliminação renal deste produto.

Além disso, pode-se observar que os demais órgãos avaliados, principalmente estômago, tireóide, fígado e baço, apresentaram baixa captação durante todo o experimento. Este dado é de extrema relevância, pois sugere que o teor de impurezas radioquímicas ($^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$) estão dentro dos limites preconizados. Sabe-se pela literatura que o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ uma vez presente na circulação é captado preferencialmente por tireóide e estômago, enquanto que o $^{99m}\text{TcO}_2$ é captado pelo fígado e baço (THRALL; ZIESSMAN, 2003).

Outro dado relevante é a maior captação apresentada pelo pâncreas quando comparado com tecidos como fígado, baço, sangue e músculo. Este dado sugere que a bombesina está atuando como vetor para direccionar o radiofármaco de forma específica para os receptores do peptídeo liberador de gastrina, presentes no pâncreas (SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009).

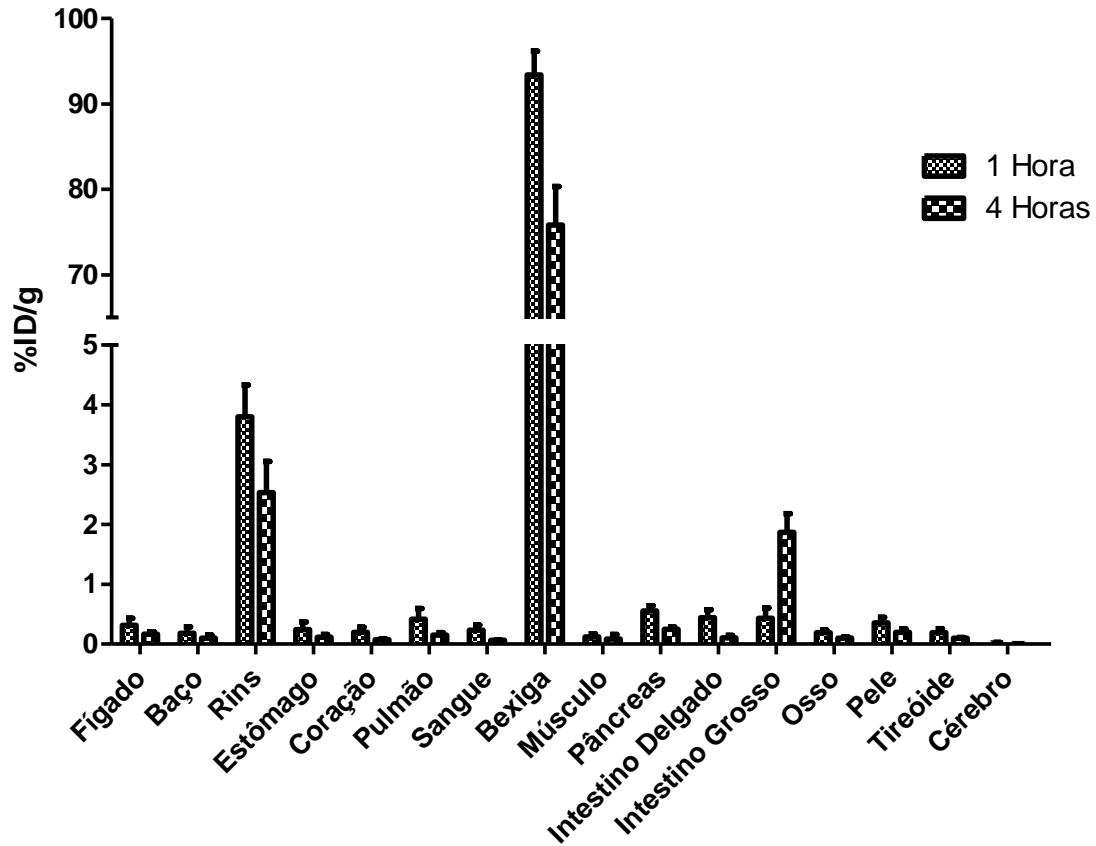


Figura 15. Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em animais C57/Bl6 sadios.

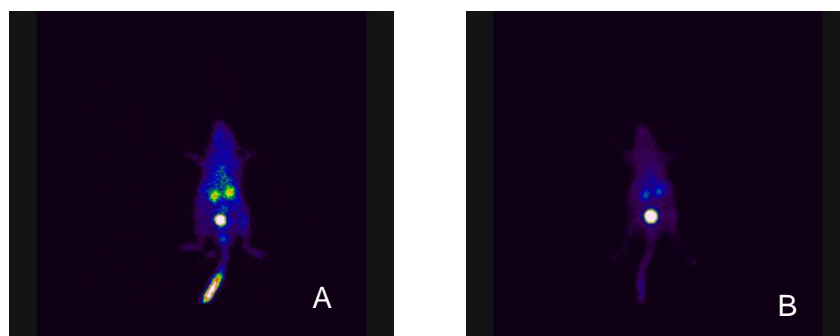


Figura 16. Imagens cintilográficas após administração intravenosa do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em camundongos C57/Bl6 sadios. A-1 hora; B- 4 horas.

3.5 Estudo de biodistribuição e imagens cintilográficas em animais Swiss sadios

Os experimentos com camundongos Swiss sadios apresentaram perfil de biodistribuição e imagens cintilográficas semelhantes àqueles demonstrados pelos estudos em camundongos C57/Bl6 (Figura 17 e 18, respectivamente).

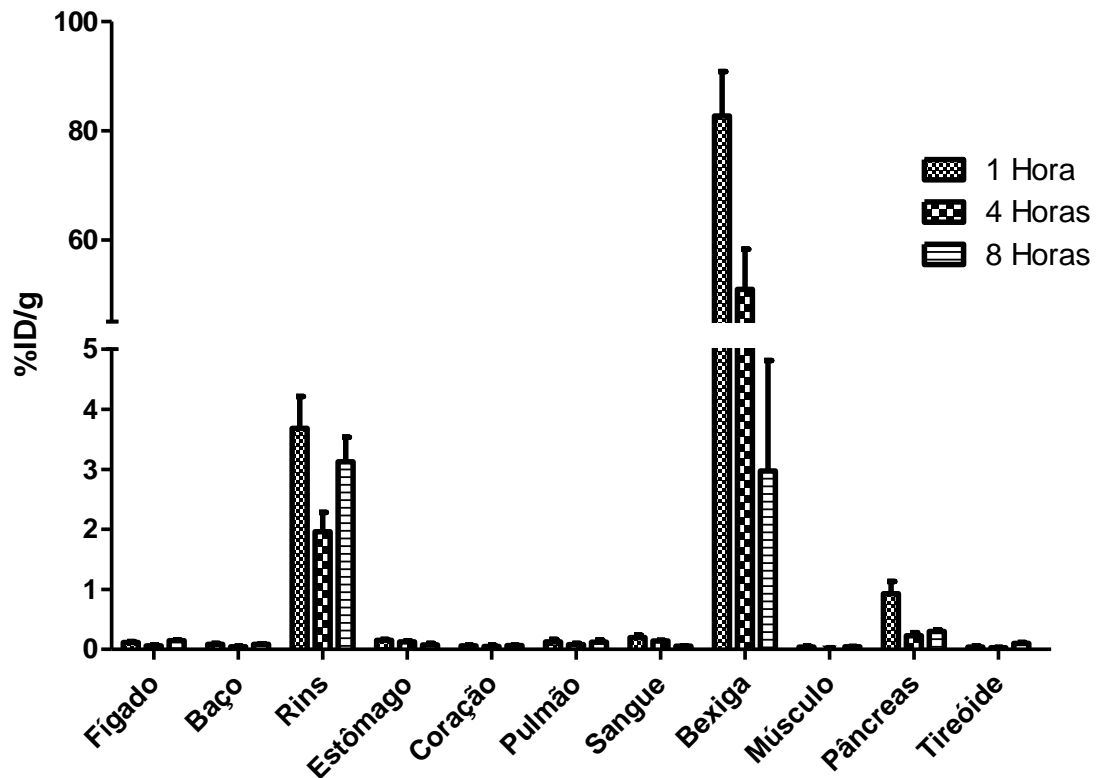


Figura 17. Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ em animais Swiss sadios.

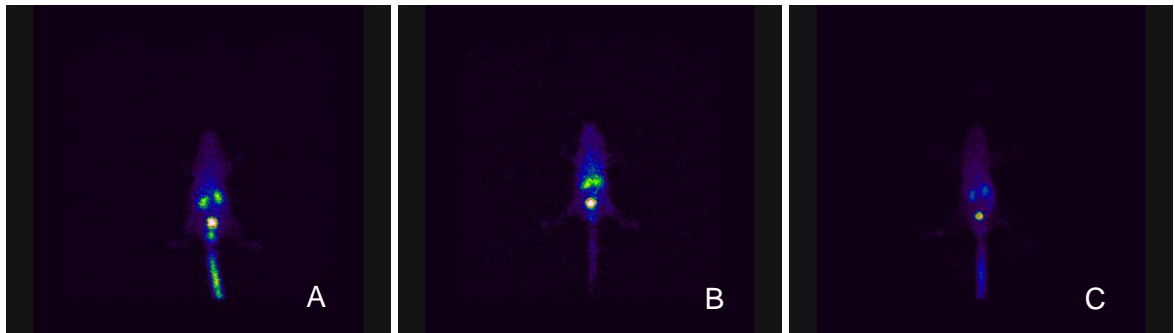


Figura 18. Imagens cintilográficas após administração intravenosa do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ em camundongos Swiss sadios. A - 1 hora; B - 4 horas; C - 8 horas.

3.6 Depuração sanguínea em animais sadios

O peptídeo radiomarcado quando administrado em animais C57/Bl6 apresentou rápida depuração sanguínea. O maior percentual da dose injetada (17,5%) foi encontrado com um minuto após a administração do radiofármaco. O tempo de meia-vida na circulação ($T_{1/2}$) determinado foi 6,52 minutos e a área sob a curva (ASC) foi igual a 240,1. A curva de depuração é demonstrada na Figura 19.

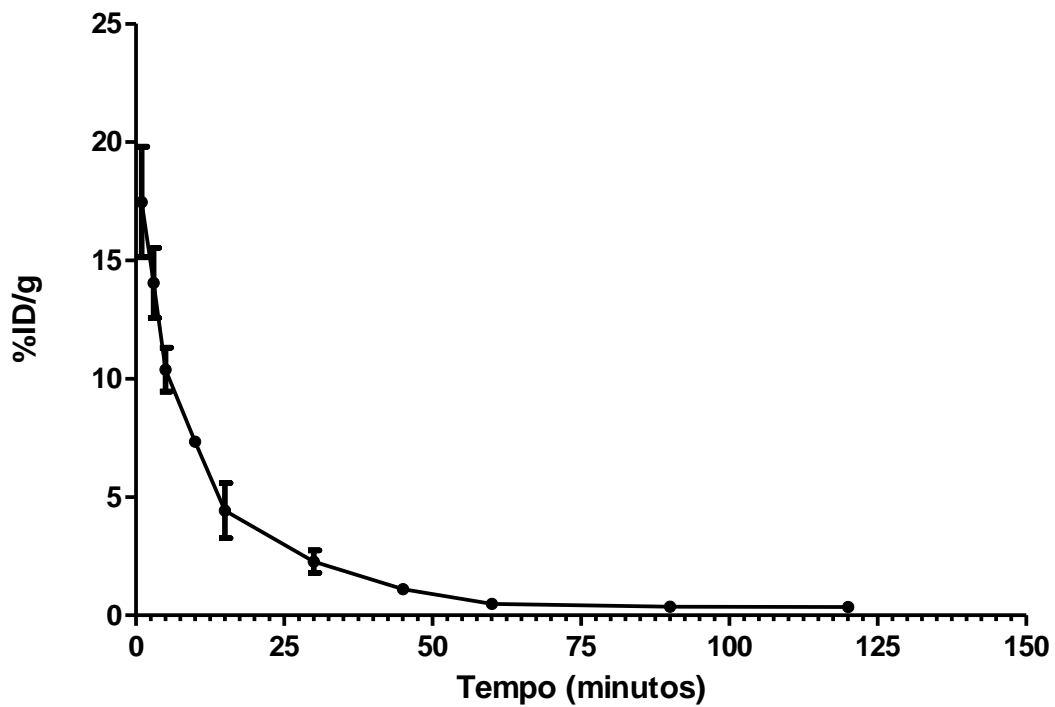


Figura 19. Depuração sanguínea para o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em animais C57/Bl6 (n=3).

Quando o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ foi administrado em animais Swiss o perfil de depuração sanguínea observado foi bastante semelhante aquele obtido para os animais C57/Bl6 (Figura 20). O maior percentual da dose injetada (17,0%) foi encontrado com um minuto após a administração do radiofármaco. O tempo de meia-vida sanguínea ($T_{1/2}$) determinado foi 6,11 minutos e a área sob a curva (ASC) foi igual a 228,1.

Os dados obtidos para os dois modelos experimentais utilizados demonstraram rápida depuração sanguínea, o que permite a realização de estudos *in vivo* e a obtenção de imagens de qualidade, uma vez que a radiação de fundo será rapidamente eliminada (ZHANG *et al.*, 2008).

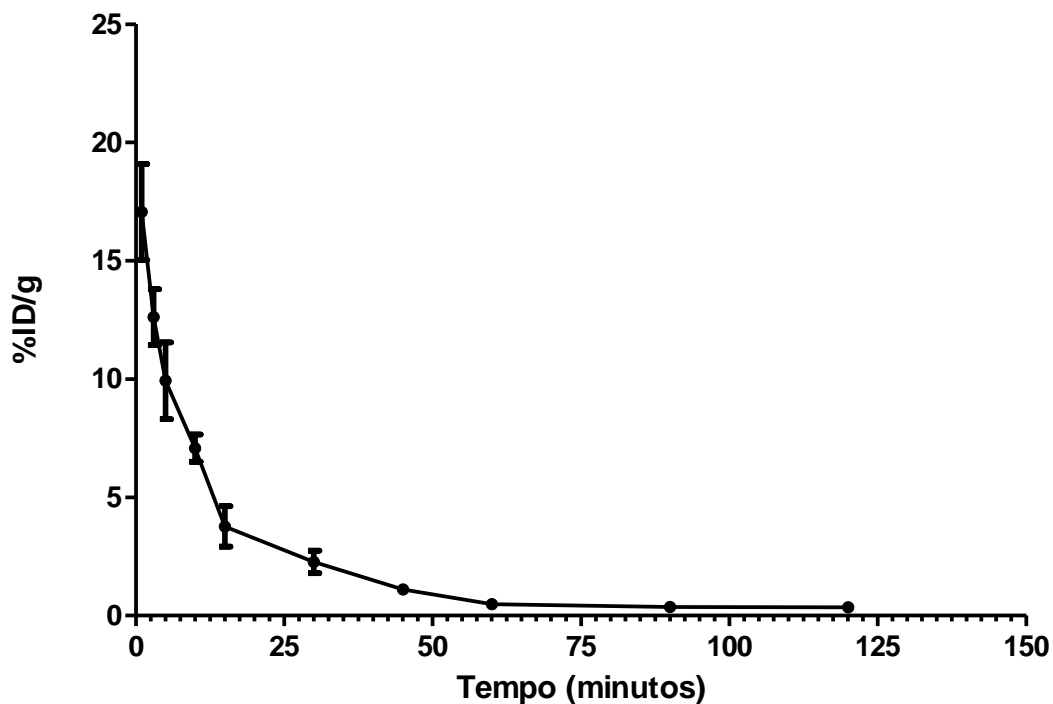


Figura 20. Depuração sanguínea para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ em animais Swiss (n=3).

3.7 Preparação e estabilidade do kit liofilizado para marcação do peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$

A otimização dos processos de marcação são essenciais para o uso clínico de radiofármacos. Desta maneira, formulações na forma de kit de marcação constituem uma alternativa para a otimização destes processos, visto que simplifica os procedimentos para a radiomarcação, além de reduzir a exposição à radiação durante o preparo dos radiofármacos. Adicionalmente, um kit adequado para a preparação na rotina clínica deve ser estável (apresentar longo tempo de prateleira) e ter altos níveis de pureza radioquímica (Smyth *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009).

Após a liofilização dos frascos contendo o peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ foi determinada a eficiência de marcação através de cromatografia em camada delgada. A pureza radioquímica encontrada foi igual a 95,6%, comprovando a qualidade do kit produzido.

A estabilidade deste kit foi determinada nos tempos de 30, 60, 90, 120 e 180 dias após a liofilização e os resultados obtidos demonstraram elevada estabilidade, como observada na Tabela 7. Estes dados sugerem que o kit pode ser produzido em larga escala e armazenado em freezer por um período de, pelo menos, 6 meses.

Tabela 7. Estudo de estabilidade dos kits liofilizados e armazenados em freezer (n=3)

Tempo (dias)	% de marcação
30	96,5 ± 0,5
60	95,5 ± 0,8
90	93,3 ± 1,9
120	95,9 ± 1,8
180	95,5 ± 1,3

4 Conclusões

Foi possível obter o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em alta pureza radioquímica.

Os estudos de estabilidade apresentaram resultados satisfatórios para todos os tempos avaliados.

Os estudos em animais mostraram rápida eliminação renal e acentuada depuração sanguínea. Estes dados, aliados a baixa captação em órgão como tireóide, estômago, fígado e baço credenciam o complexo para estudos posteriores visando à identificação de tumores.

Além disso, estudos para a preparação de um kit para a marcação do peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ apresentaram resultados satisfatórios, demonstrando a possibilidade de armazenamento e distribuição destes kits liofilizados.

CAPÍTULO 2

Preparação e caracterização de lipossomas contendo o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$

Preparação e caracterização de lipossomas contendo o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$

1 Introdução

Lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos frequentemente por fosfolípidos, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas (LASIC, 1998). Estas estruturas podem ser utilizadas para carrear compostos, com finalidade de diagnóstico ou tratamento, a sítios alvos como, por exemplo, tumores. Neste contexto, destacam-se os lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada por serem capazes de extravasar em regiões de maior permeabilidade vascular, além de apresentar a característica de liberar seu conteúdo em presença de um meio ácido. Desta forma, os tumores se tornam um alvo viável para a utilização destes sistemas, pois apresentam ambas as características citadas acima (TACHIBANA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2000)

A utilização destes lipossomas é muitas vezes dificultada pela baixa estabilidade em meio aquoso, fato que impede seu armazenamento por longos períodos. Como alternativa para a referida instabilidade pode-se utilizar lipossomas, em presença de agentes crioprotetores, no estado liofilizado e desta maneira, aumentar o tempo de estocagem destas formulações (CHOW *et al.*, 1995; VEMURI *et al.*, 1995; MOHAMMED *et al.*, 2006).

Neste capítulo estão relatados a preparação e caracterização de lipossomas de circulação prolongada, pH-sensíveis e não pH-sensíveis, e os testes para a escolha do crioprotetor, além de estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas em animais sadios.

2 Material e Método

2.1 Material

Os lípides dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-mPEG₂₀₀₀), hemisuccinato de colesterila (CHEMS), dioleilfosfatidil colina (DOPC) foram adquiridos da Lipoid (Alemanha).

O peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foi adquirido da GL BioChem (Shanghai/China).

O tecnécio-99m foi obtido de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (IPEN/Brasil).

Os demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (EUA).

Os camundongos C57/Bl6 foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP) e mantidos sem restrição de água e ração, no biotério do laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Os camundongos Swiss foram adquiridos do centro de bioterismo da Faculdade de Farmácia da UFMG e mantidos, sem restrição de água e ração, no biotério do laboratório de farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Todos os experimentos realizados em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), nº protocolo: 34/2010 (ANEXO 1).

2.2 Lipossomas pH-sensíveis de circulação prolongada (SpHL)

2.2.1 Preparo dos SpHL

Foram preparados lipossomas em diferentes concentrações lipídicas (10, 20, 40, 60 e 80 mM). Para o preparo dos lipossomas utilizou-se a metodologia descrita por Bangham (1965).

Inicialmente, alíquotas das soluções de DOPE, CHEMS e DSPE-mPEG₂₀₀₀ em clorofórmio (razão molar 5,8/3,7/0,5, respectivamente) foram transferidas para um balão de fundo redondo para a formação do filme lipídico pela evaporação do clorofórmio em evaporador rotatório sob pressão reduzida. O filme lipídico foi hidratado com solução aquosa de NaOH (15 mM). As vesículas multilamelares resultantes foram submetidas à filtração através de

membranas de policarbonato de 0,4, 0,2 e 0,1 μm utilizando um extrusor de média pressão. A formulação foi submetida a 5 ciclos de filtração por membrana.

2.2.2 Caracterização da formulação

2.2.2.1 Diâmetro das vesículas e índice de polidispersão

O diâmetro médio e a distribuição do tamanho das partículas foram determinados por espectroscopia de autocorrelação de fótons, utilizando um contador de partículas equipado com raio laser monocromático (Zetasizer 3000 HSA – Malvern, Inglaterra).

Para a determinação do diâmetro das vesículas foi utilizado aproximadamente 70 μL de lipossomas diluídos em 3 mL de água deionizada. As medidas foram efetuadas a temperatura de 25°C e a um ângulo de 90°. Os resultados são expressos como média de dez medidas.

2.2.2.2 Potencial Zeta

O potencial zeta foi determinado por espalhamento dinâmico da luz e análise da mobilidade eletroforética das vesículas. As medidas foram feitas em triplicata em alíquotas diluídas 250 vezes em solução de NaCl 10 mM, empregando-se o equipamento Zetasizer 3000 HSA (Malvern, Inglaterra), a temperatura de 25°C e a um ângulo de 90°.

2.2.2.3 Teor de fosfolípides (PL)

Para a determinação do teor de fosfolípides foi utilizado método de dosagem de fósforo mineral sugerido por Bartlett (1959), com algumas alterações.

Foram adicionados, separadamente, em tubos de ensaio (Pyrex), 250 μL da solução contendo o padrão de fósforo em diferentes dosagens (1, 2, 3, 4 e 5 μg) e as amostras a serem analisadas. Adicionaram-se 400 μL de uma solução de ácido sulfúrico 5 mol/L e os tubos foram aquecidos à temperatura de 180-195°C, em dry-block, durante 30 minutos. Após resfriamento adicionaram-se 500 μL de uma solução aquosa, recentemente preparada, de água oxigenada 10% (v/v). Aqueceram-se, novamente, os tubos a 180-195°C por 30 minutos. Após resfriamento, adicionaram-se 4,6 mL da solução de molibdato de amônio (2,2 g de molibdato de amônio; 7 mL de H_2SO_4 ; água q.s.p. 1L) e 0,5 mL de solução aquosa, recém preparada, de ácido ascórbico 10% (p/v). Os frascos foram agitados vigorosamente em vortex e aquecidos à temperatura de 90°C por 20 minutos. Em seguida,

as soluções foram lidas em espectrofotômetro utilizando 800 nm como comprimento de onda.

O limite de doseamento do método proposto está compreendido entre 1 e 5 µg de fósforo, desta forma as amostras analisadas foram diluídas em água destilada para que a quantidade de fósforo estivesse dentro dos limites da curva de calibração.

As medidas das amostras e dos padrões foram realizadas em duplicata e uma nova curva de calibração foi traçada a cada dosagem. As curvas de calibração com coeficiente de correlação (r) inferior a 0,99 foram rejeitadas.

2.2.3 Teste com crioprotetores

Para a seleção do melhor crioprotetor para a formulação de SpHL realizaram-se, inicialmente, testes com diferentes carboidratos (glicose, sacarose, manitol, trealose e lactose). Os lipossomas utilizados para estes testes apresentavam concentração molar igual a 10 mM.

2.2.3.1 Testes preliminares (congelamento/descongelamento)

Em alíquotas de 1 mL de lipossomas, recém preparados, foram adicionadas diferentes quantidades dos carboidratos citados acima. As concentrações escolhidas para os testes basearam-se na relação m/m entre os crioprotetores e fosfolípides, utilizaram-se as relações 1:1 e 2:1, respectivamente. Após a adição do crioprotetor os tubos foram agitados em vortex por 1 minuto e imergido em nitrogênio líquido por 5 minutos. Em seguida, os SpHL foram descongelados em banho-maria a 30°C. O diâmetro médio das vesículas e o índice de polidispersão foram determinados conforme descrito no item 2.2.2.1.

2.2.3.2 Testes com lipossomas liofilizados

No processo de liofilização foram avaliados os crioprotetores glicose, manitol e trealose nas proporções crioprotetor:fosfolípide (m/m) de 1:1 e 2:1, respectivamente. Os carboidratos foram adicionados a 1 mL dos lipossomas recém formados e após agitação em vortex, por 1 minuto, foram congelados em nitrogênio líquido por 5 minutos. Em seguida, os frascos contendo os lipossomas congelados foram liofilizados por 24 horas. Após este período, os SpHL foram ressuspensos com solução de NaCl 0,9% (p/v), contendo o complexo ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎, em quantidade suficiente para obter o volume inicial e submetida a agitação em vortex por 3 minutos. Em seguida, determinaram-se o diâmetro médio e o índice de polidispersão das vesículas conforme descrito no item 2.2.2.1.

2.2.4 Teor e eficiência de encapsulação

Para a determinação do teor e da eficiência de encapsulação foram testados lipossomas com diferentes concentrações lipídicas, variando entre 10 e 80 mM. A metodologia utilizada foi a mesma para todas as concentrações lipídicas avaliadas.

Os SpHL liofilizados, contendo os crioprotetores glicose (2:1) ou trealose (2:1) foram reconstituídos com a solução de NaCl 0,9% (p/v), contendo o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, em quantidade suficiente para a recuperação do volume inicial. Em seguida, a dispersão lipossomal foi submetida à agitação em vortex por 3 minutos. Imediatamente após a ressuspensão, os lipossomas foram submetidos à ultracentrifugação (150000 x g, 90 minutos, 4°C). A porcentagem de encapsulação total (adsorvido + interno) foi determinada pela quantificação da radiação presente no sobrenadante e no *pellet* de lipossomas formado após a ultracentrifugação segunda a fórmula abaixo:

$$\% \text{ encapsulação total} = (\text{cpm } \textit{pellet} / \text{cpm } \textit{pellet} + \text{cpm sobrenadante}) \times 100$$

Com preparação de SpHL na concentração lipídica de 40 mM foi avaliada a quantidade do radiofármaco adsorvido a membrana das vesículas. Os lipossomas liofilizados foram reconstituídos com 0,8 mL de solução de NaCl 0,9 % (p/v) e a dispersão foi agitada em vortex por 3 minutos. Em seguida, adicionou-se a solução contendo o complexo radiomarcado em quantidade suficiente para a recuperação do volume inicial, os lipossomas foram submetidos à ultracentrifugação (150.000 x g, 90 minutos, 4°C). A radioatividade presente no *pellet* formado após a centrifugação foi considerada como o percentual de fármaco adsorvido a superfície da membrana.

O valor real de encapsulação foi determinado pela diferença entre o percentual obtido na encapsulação total menos o valor obtido quando o radiofármaco estava absorvido a membrana.

2.2.5 Perfil de liberação

Alíquotas de 92 μL de SpHL purificados em ultracentrífuga, contendo o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, foram diluídas em 1000 μL plasma de camundongo e incubadas a 37°C sob agitação constante. Após os tempos de 10, 30, 60, 120, 240 e 480 minutos alíquotas foram retiradas e adicionadas em filtros AMICON[®] (10 kDa). Os filtros foram acoplados a eppendorfs e centrifugados (14.000 x g) por 30 minutos. Determinou-se a

quantidade de radiação presente no líquido filtrado e no filtro. A quantidade de radioatividade retida no filtro foi considerada como sendo o complexo radiomarcado encapsulado e o percentual do complexo liberado foi determinado segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ liberado} = (\text{cpm filtrado} / \text{cpm filtro} + \text{cpm filtrado}) \times 100$$

2.2.6 Biodistribuição em animais C57/Bl6 sadios

Foram utilizados 10 camundongos fêmeas C57/Bl6, pesando 17-23 g. Estes animais foram divididos em dois grupos onde cada animal recebeu, pela veia caudal, 3,7 MBq da suspensão de SpHL contendo o complexo ^{99m}Tc - HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. Após os tempos de 1 e 4 horas os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg) e, em seguida, submetidos à eutanásia. Órgãos e tecidos como: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, bexiga, músculo, osso, tireóide, pâncreas, pele, cérebro, intestino delgado e intestino grosso foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade, e os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de tecido (%ID/g).

2.2.7 Imagens cintilográficas em animais C57/Bl6 sadios

Em três animais C57/Bl6 fêmeas foram administrados, por via intravenosa, 37 MBq do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ encapsulado em SpHL. As imagens foram adquiridas nos tempos de 1 e 4 horas após a administração do complexo radiomarcado, os camundongos foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob a gama câmara (Nuclide™ TH 22, Mediso, Hungria). Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256.

2.2.8 Biodistribuição em animais Swiss sadios

Foram utilizados 15 camundongos fêmeas Swiss, pesando 20-25 g. Estes animais foram divididos em três grupos onde cada animal recebeu, pela veia caudal, 3,7 MBq da suspensão contendo o complexo ^{99m}Tc - HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ encapsulado em SpHL. Após os tempos de 1, 4 e 8 horas os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg) e, em seguida, submetidos à eutanásia. Órgãos e tecidos como: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, bexiga, músculo, tireóide, pâncreas foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade, e os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de tecido (%ID/g).

2.2.9 Imagens cintilográficas em animais Swiss sadios

Em três animais Swiss fêmeas foram administrados, por via intravenosa, 37 MBq da suspensão de SpHL contendo o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$. As imagens foram adquiridas nos tempos de 1, 4 e 8 horas após a administração do complexo radiomarcado, os camundongos foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob a gama câmara (NuclideTM TH 22, Mediso, Hungria). Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256.

2.2.10 Depuração sanguínea em animais sadios

Uma alíquota de 0,1 mL dos SpHL contendo o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ foi administrada pela veia caudal de camundongos Swiss machos ou C57/Bl6 fêmeas. Foi realizada uma incisão na cauda dos animais e o sangue foi coletado (50 μL), em tubos previamente pesados, nos tempos de 1, 3, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos após a administração do radiofármaco. Os tubos foram pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade. Os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de sangue (%ID/g).

2.2.11 Produção do kit liofilizado

Amostras de 1 mL de SpHL, juntamente com glicose na proporção crioprotetor:fosfolípide de 2:1 (m/m), foram adicionadas em frascos de vidro, congeladas em nitrogênio líquido por 5 minutos e colocadas na câmara do liofilizador. O ciclo de liofilização teve duração de 24 horas. Após este período, os frascos foram vedados a vácuo e os SpHL liofilizados foram armazenados em geladeira (4°C).

2.2.12 Estudo de estabilidade

Dezoito frascos lacrados do kit de SpHL liofilizado foram produzidos e armazenados em geladeira a 4°C. Após os tempos de 1, 30, 60, 90, 120, 180 dias o produto liofilizado foi ressuspenso com uma solução contendo o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$. Os SpHL foram ultracentrifugados e o percentual de encapsulação, diâmetro médio e índice de polidispersão das vesícula foram determinados como descrito nos itens 2.2.4 e 2.2.2.1, respectivamente.

2.2.13 Análise estatística

s resultados obtidos nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas foram comparados quantitativamente pelo teste t e/ou pelo teste de Tukey-Kramer utilizando o programa GraphPad Prism 5. Um nível de $p < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo.

2.3 Lipossomas não pH-sensíveis de longa circulação (nSpHL)

2.3.1 Preparo dos nSpHL

Inicialmente, alíquotas das soluções de DOPC, CHEMS e DSPE-mPEG₂₀₀₀ em clorofórmio (concentração lipídica de 40 mM, razão molar 5,8/3,7/0,5) foram transferidas para um balão de fundo redondo para a formação do filme lipídico pela evaporação do clorofórmio em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Foram utilizados os mesmos procedimentos descritos no item 2.2.1.

2.3.2 Caracterização da formulação

2.3.2.1 Diâmetro das vesículas e índice de polidispersão

A determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão dos nSpHL foi realizada segundo descrito no item 2.2.2.1

2.3.2.2 Potencial zeta

A determinação do potencial de membrana dos nSpHL foi realizada segundo descrito no item 2.2.2.2

2.3.3 Teor de encapsulação

O teor de encapsulação do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ em nSpHL foi realizado conforme descrito no item 2.2.4.

2.3.4 Depuração sanguínea em animais sadios

A depuração dos nSpHL no sangue foi determinada conforme descrito no item 2.2.10, porém este estudo foi realizado somente em camundongos Swiss machos.

3 Resultados e discussão

3.1 SpHL

3.1.1 Preparo e caracterização dos SpHL

Após a preparação e extrusão dos lipossomas foram determinados o diâmetro e o índice de polidispersão (IP) das vesículas. Os resultados demonstraram boa homogeneidade na distribuição de tamanho para os SpHL, desta forma a formulação pode ser considerada monodispersa (Tabela 8). O valor do potencial zeta dos lipossomas SpHL após extrusão em membrana de 0,1 μm foi $2,13 \pm 0,85$ mV. O valor de potencial zeta próximo a neutralidade para os SpHL pode ser justificado pela baixa mobilidade eletroforética apresentada pelo grupo mPEG-DSPE, devido a grande resistência hidrodinâmica conferida pelo polímero mPEG (WOODLE *et al.*, 1992). Em relação à concentração de fosfolípides, os SpHL, de concentração lipídica igual a 40 mM, apresentaram valor igual a $24,6 \pm 0,4$ mM. Diante deste resultado, pode-se sugerir que praticamente não houve perda da concentração lipídica ao longo do processo de preparo dos SpHL.

Tabela 8. Diâmetro médio e índice de polidispersão (IP) de SpHL após extrusão em membranas de policarbonato (n=4).

Membrana (μm)	Tamanho (nm)	IP
0,4	$191,5 \pm 4,9$	$0,137 \pm 0,032$
0,2	$163,8 \pm 3,9$	$0,098 \pm 0,035$
0,1	$124,1 \pm 4,7$	$0,079 \pm 0,014$

3.1.2 Teste com crioprotetores

3.1.2.1 Testes preliminares (congelamento/descongelamento)

Na Tabela 9 estão apresentados o diâmetro médio e o índice de polidispersão das vesículas de SpHL, em presença de diferentes crioprotetores, após processo de congelamento/descongelamento. Com os dados obtidos neste estudo foi possível selecionar os carboidratos glicose, trealose e manitol para os estudos com lipossomas liofilizados, pois estes crioprotetores foram mais eficientes na manutenção do diâmetro e homogeneidade das vesículas. E, portanto, estão aptos para ser testados em processos mais drásticos como a liofilização.

Tabela 9. Influência da presença de crioprotetores no diâmetro e índice de polidispersão de lipossomas após processo de congelamento/descongelamento (n=3).

Crioprotetor	Razão	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (IP)	Distribuição do diâmetro das vesículas (%)		
				≤ 200	200-500	≥ 500
Ausente	-	611,1 ± 112,6	1,000	14,1 ± 4,5	27,3 ± 4,5	57,7 ± 0,0
Glicose	1:1	131,1 ± 6,7	0,118 ± 0,021	90,7 ± 3,1	9,2 ± 3,2	0,0 ± 0,0
	2:1	131,0 ± 1,3	0,045 ± 0,021	98,3 ± 1,5	1,8 ± 1,5	0,0 ± 0,0
Sacarose	1:1	136,9 ± 8,8	0,159 ± 0,026	83,3 ± 4,9	14,5 ± 4,3	0,1 ± 0,1
	2:1	140,1 ± 0,5	0,111 ± 0,025	90,7 ± 3,1	9,2 ± 3,2	0,0 ± 0,0
Manitol	1:1	128,8 ± 7,9	0,130 ± 0,011	88,9 ± 0,1	10,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0
	2:1	126,9 ± 0,70	0,089 ± 0,013	98,4 ± 1,1	1,4 ± 0,9	0,0 ± 0,0
Trealose	1:1	145,7 ± 3,0	0,159 ± 0,026	80,5 ± 0,2	19,2 ± 0,3	0,2 ± 0,1
	2:1	127,4 ± 5,5	0,097 ± 0,009	92,5 ± 3,4	7,4 ± 3,2	0,0 ± 0,0
Lactose	1:1	157,7 ± 11,5	0,156 ± 0,024	72,3 ± 4,9	14,5 ± 4,3	0,1 ± 0,1
	2:1	140,2 ± 13,4	0,121 ± 0,044	86,7 ± 3,7	13,1 ± 0,7	0,0 ± 0,0

3.1.2.2 Testes com lipossomas liofilizados

Após os testes preliminares de congelamento/descongelamento os crioprotetores glicose, manitol e trealose foram selecionados para os ensaios para determinação de sua eficiência frente ao processo de liofilização. Os dados obtidos estão representados na Tabela 10, e sugerem que glicose e trealose, na proporção 2:1 (m/m), apresentam melhores características de crioproteção para serem utilizados na preparação de kits contendo os SpHL, visto que foram capazes de manter diâmetro das vesículas em níveis aceitáveis.

Tabela 10. Influência da presença de crioprotetores no diâmetro e índice de polidispersão de lipossomas após processo de liofilização (n=3).

Crioprotetor	Razão	Diâmetro médio (nm)	Índice de polidispersão (IP)	Distribuição do diâmetro das vesículas (%)		
				≤ 200	200-500	≥ 500
Ausente	-	389,8 ± 58,7	0,861 ± 0,068	24,0 ± 6,4	36,9 ± 7,4	39,1 ± 8,1
Glicose	1:1	253,8 ± 15,1	0,513 ± 0,009	40,8 ± 0,0	40,6 ± 0,0	18,5 ± 0,0
	2:1	164,5 ± 6,5	0,246 ± 0,030	69,2 ± 0,2	32,5 ± 0,7	1,7 ± 0,9
Manitol	1:1	328,7 ± 13,3	0,861 ± 0,179	27,6 ± 0,2	42,6 ± 0,1	29,8 ± 0,2
	2:1	293,2 ± 3,6	0,561 ± 0,042	27,2 ± 0,0	46,5 ± 6,6	26,2 ± 6,6
Trealose	1:1	579,5 ± 38,9	0,965 ± 0,061	14,1 ± 4,5	27,3 ± 4,5	58,6 ± 0,0
	2:1	196,9 ± 16,6	0,356 ± 0,061	48,0 ± 9,3	44,8 ± 6,0	7,8 ± 3,5

Como esperado, os lipossomas liofilizados sem a presença de agentes crioprotetores apresentaram um acentuado aumento no diâmetro médio das vesículas (3,14 vezes maior que o diâmetro apresentado pelos lipossomas antes do processo de liofilização) e, além disso, a formulação se mostrou totalmente heterodispersa (IP = 0,861). Na presença de crioprotetores na proporção 1:1 (m/m), não foi possível observar controle sobre o diâmetro das vesículas. Os três crioprotetores avaliados não foram capazes de conter o aumento das vesículas após a liofilização, como resultado, alta porcentagem das vesículas encontravam-se com diâmetro superior a 500 nm. Em contraste, quando maior quantidade de crioprotetor foi utilizada, observou-se eficiente controle do diâmetro das vesículas, especialmente para o crioprotetor glicose. Os lipossomas liofilizados em presença de glicose na proporção 2:1 (m/m), demonstraram um pequeno aumento no tamanho das vesículas quando comparados com os lipossomas antes do processo de liofilização (1,3 vezes). Adicionalmente, comparando os lipossomas liofilizados em presença de glicose com aqueles liofilizados sem a adição de um agente crioprotetor, observa-se que a presença de glicose (proporção 2:1) na formulação resultou no aumento da população de vesículas com diâmetro menor que 200 nm e também, na drástica redução da população de vesículas maiores que 500 nm. Estes dados indicam que a glicose na proporção 2:1 foi capaz de atuar, de maneira efetiva, na preservação do tamanho das vesículas. Isto pode ser explicado pelo fato de que durante o processo de liofilização as moléculas de água são gradualmente substituídas pelos crioprotetores, como a glicose, que se inserem entre as porções polares do fosfolípide no estado seco, levando à formação de ligações de hidrogênio. São formadas múltiplas ligações de hidrogênio entre os açúcares e a porção polar dos fosfolípides na superfície da bicamada podendo os açúcares interagir com

até 3 tipos diferentes de lipídeos, simultaneamente. (CHEN *et al.*, 2010). Essas interações entre os açúcares e os fosfolípidos permitem a manutenção do estado físico das membranas no estado seco de forma similar à existente no estado hidratado (VAN WINDEN *et al.*, 1997). Para o diagnóstico de tumores a administração de vesículas de pequeno diâmetro é de extrema importância, visto que os lipossomas se utilizam das fenestrações existentes na neovasculatura dos tumores para extravasar na região e, conseqüentemente, gerar uma maior acumulação no sitio tumoral (Cho *et al.*, 2008; Ferrari, 2005).

Além disso, sabe-se que o diâmetro médio das vesículas pode influenciar nos estudos de biodistribuição, pois partículas maiores que 300 nm são rapidamente retiradas da circulação acumulando em órgãos como fígado e baço. Em contrapartida, partículas menores que 200 nm apresentam um tempo de circulação mais prolongado (LITZINGER *et al.*, 1994; OWENA; PEPPAS, 2006; PEREIRA *et al.*, 2008)

3.1.3 Teor e eficiência de encapsulação

Os testes realizados para avaliar o teor de encapsulação mostraram que as quantidades do complexo radiomarcado encapsulado aumentaram com o aumento da concentração lipídica dos lipossomas. Porém, este incremento não foi diretamente proporcional ao aumento da concentração, mostrando que o teor de encapsulação para este radiofármaco, provavelmente, tenderá a atingir um limite máximo, em aproximadamente 40%, como observado na Figura 21.

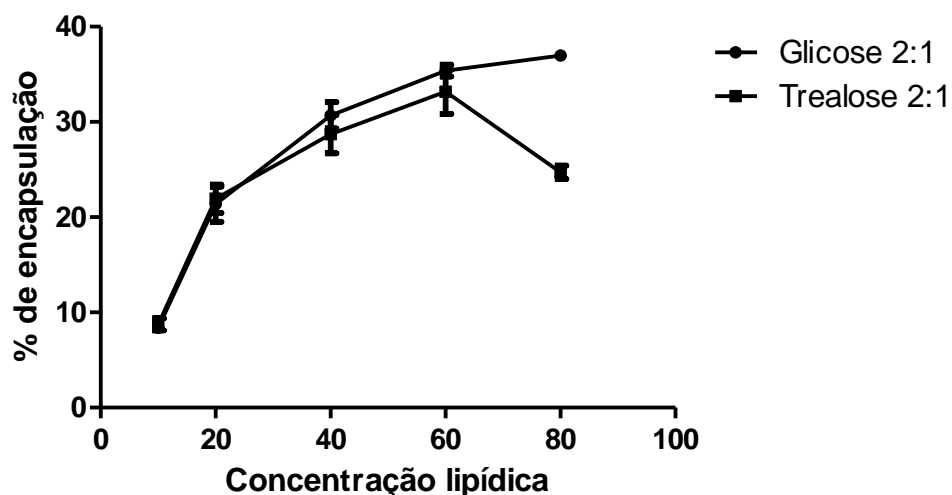


Figura 21. Teor de encapsulação, em presença de glicose e trealose (razão crioprotetor/fosfolípido igual a 2:1), do complexo em lipossomas SpHL com diferentes concentrações lipídicas (n=3).

O cálculo da eficiência de encapsulação mostrou que os SpHL na concentração lipídica de 20 mM apresentaram maior eficiência quando comparado com as demais concentrações testadas em presença dos crioprotetores glicose e trealose (Tabelas 11 e 12,

respectivamente). No entanto, a concentração lipídica de 40 mM foi a de escolha para os testes *in vivo*, devido ao ganho significativo na encapsulação do radiofármaco, o que favorecerá a obtenção de imagens cintilográficas de qualidade.

Tabela 11. Influência da concentração lipídica no teor e eficiência de encapsulação do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em SpHL em presença de glicose (razão crioprotetor/fosfolípide igual a 2:1)^a.

Concentração lipídica	Teor de encapsulação (%)	Eficiência de encapsulação (%/mmol de PL)
10 mM	8,4 ± 0,1	1,35 ± 0,01
20 mM	21,4 ± 1,9	1,72 ± 0,09
40 mM	30,7 ± 1,4	1,23 ± 0,03
60 mM	35,4 ± 0,6	0,95 ± 0,01
80 mM	37,0 ± 0,5	0,75 ± 0,01

^anúmero de experimentos igual a 3.

Tabela 12. Influência da concentração lipídica no teor e eficiência de encapsulação do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em SpHL em presença de trealose (razão crioprotetor/fosfolípide igual a 2:1)^a.

Concentração lipídica	Teor de encapsulação (%)	Eficiência de encapsulação (%/mmol de PL)
10 mM	8,8 ± 0,6	1,42 ± 0,06
20 mM	21,9 ± 1,5	1,76 ± 0,07
40 mM	28,7 ± 2,0	1,15 ± 0,05
60 mM	33,2 ± 2,3	0,89 ± 0,04
80 mM	24,7 ± 0,7	0,50 ± 0,01

^anúmero de experimentos igual a 3.

Para os SpHL apresentando uma concentração lipídica igual a 40 mM foi realizada a quantificação do complexo adsorvido a membrana das vesículas. Os resultados mostraram baixo teor de adsorção (3,0 ± 0,5%). Desta forma, foi possível determinar que o valor real de encapsulação do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ nos SpHL foi igual a 25,7%.

3.1.4 Perfil de liberação

A Figura 22 apresenta o perfil de liberação do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ a partir dos SpHL. Pôde ser observada uma liberação do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ igual a 7,2 % no tempo de 10 minutos. Durante todo o intervalo de tempo investigado, não foi observada uma liberação adicional estatisticamente significativa do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ a partir dos SpHL. Pode-se supor que uma fração do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ liberada se deve à presença do radiotraçador adsorvido na superfície das vesículas, conforme relatado no item 3.1.3. Diante destes resultados, pôde ser demonstrada a boa estabilidade dos SpHL contendo o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ frente sua exposição ao plasma sanguíneo.

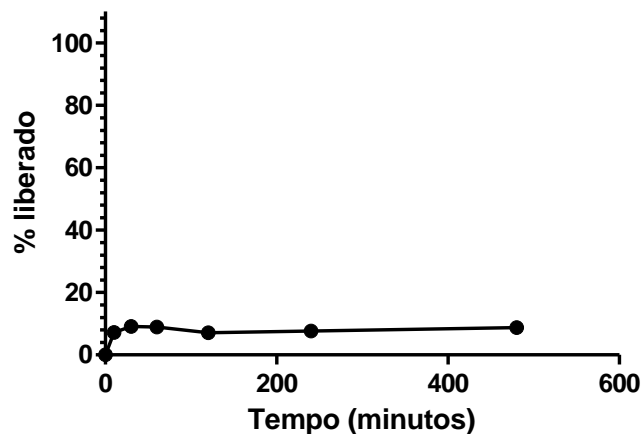


Figura 22. Perfil de liberação do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ encapsulado em SpHL. O número de experimentos foi igual a três.

3.1.5 Biodistribuição e imagens cintilográficas em animais C57/BI6 sadios

Os estudos de biodistribuição mostraram que o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ encapsulado em SpHL apresentou maior captação em órgãos do sistema fagocitário mononuclear, como fígado e baço (Figura 23), quando comparado com os dados obtidos nos estudos com o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ livre (Figura 15). No tempo de 1 hora, a captação no fígado e baço foi de 8,1 %ID/g e 31,4 %ID/g, respectivamente. No tempo de 4 horas, a quantidade de captação no fígado do radiotraçador encapsulado nos SpHL manteve-se inalterada, enquanto que no baço foi verificada uma redução da mesma. Esta redução pode ser devida à metabolização dos SpHL contendo o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelos macrófagos presentes no baço. Dados da literatura mostram que mesmo lipossomas de circulação prolongada, como os SpHL, apresentam captação relevante, na ordem de 20 a 30%, pelo fígado e baço (PHILLIPS, 1999; AWASTHI *et al.*, 2003; CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007).

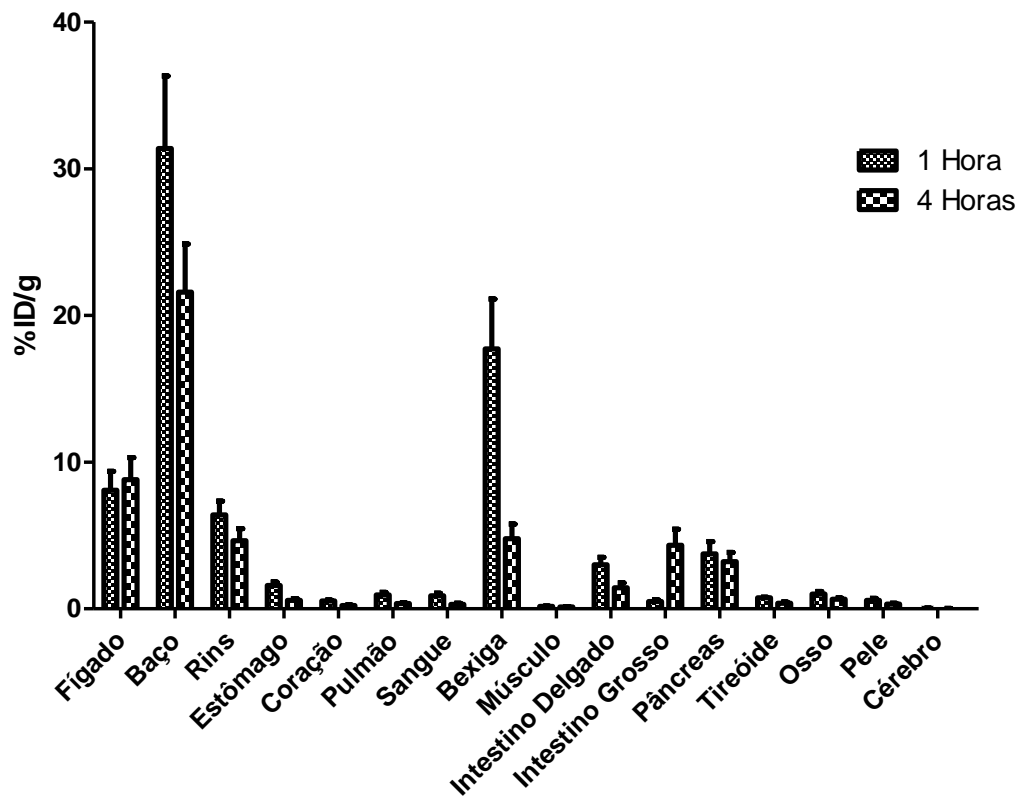


Figura 23. Estudo de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL, e administrado em animais C57/Bl6 sadios.

As imagens cintilográficas foram congruentes com o perfil apresentado nos estudos de biodistribuição mostrando acentuada captação em fígado e baço, como pode ser observado na Figura 24.

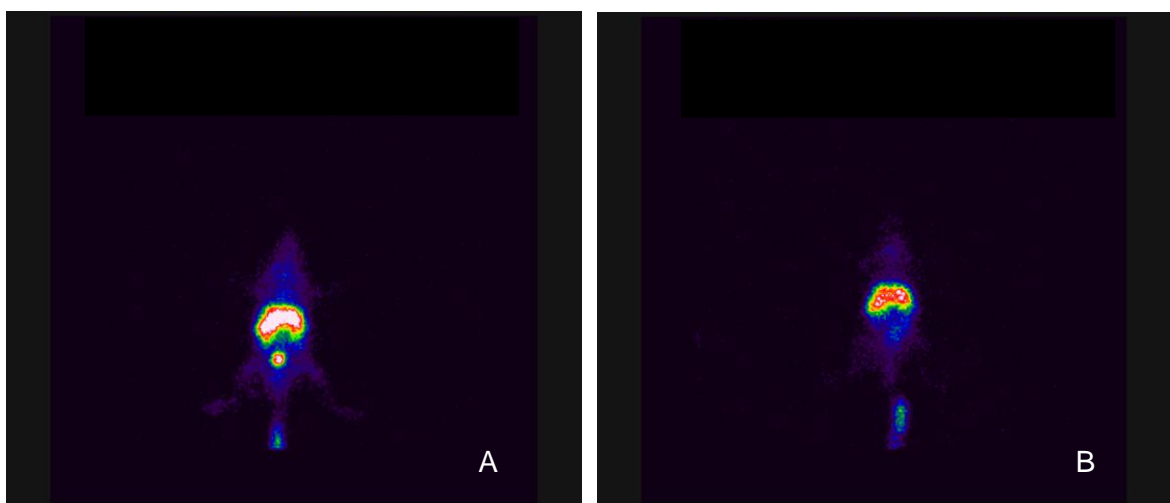


Figura 24. Imagens cintilográficas após a administração intravenosa em animais C57/Bl6 sadios do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL. Os painéis A e B representam os tempos de 1 e 4 horas, respectivamente, após a administração.

3.1.6 Biodistribuição e imagens cintilográficas em animais Swiss sadios

Os estudos de biodistribuição (Figura 25) e as imagens cintilográficas (Figura 26) em animais Swiss sadios apresentaram padrões de biodistribuição similares aos observados nos experimentos em animais C57Bl6, mostrando que a distribuição dos lipossomas não foi alterada nos dois modelos animais analisados neste trabalho.

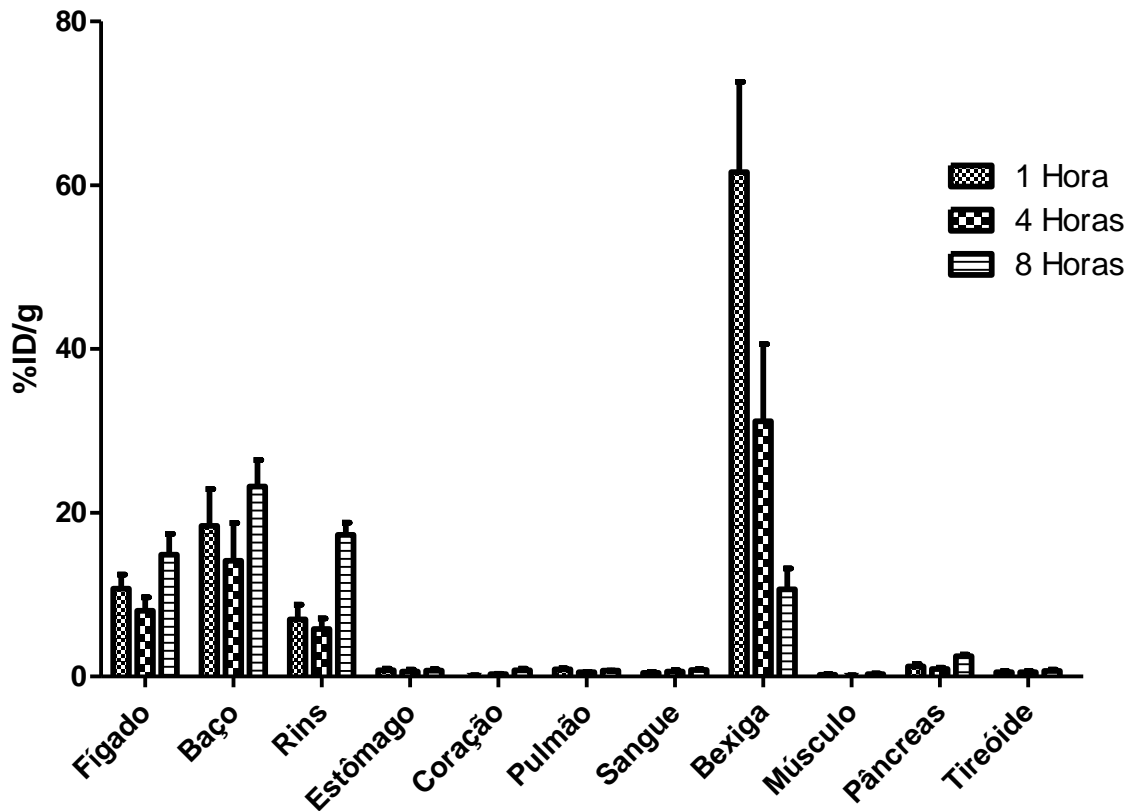


Figura 25. Estudo de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL, em animais Swiss sadios.

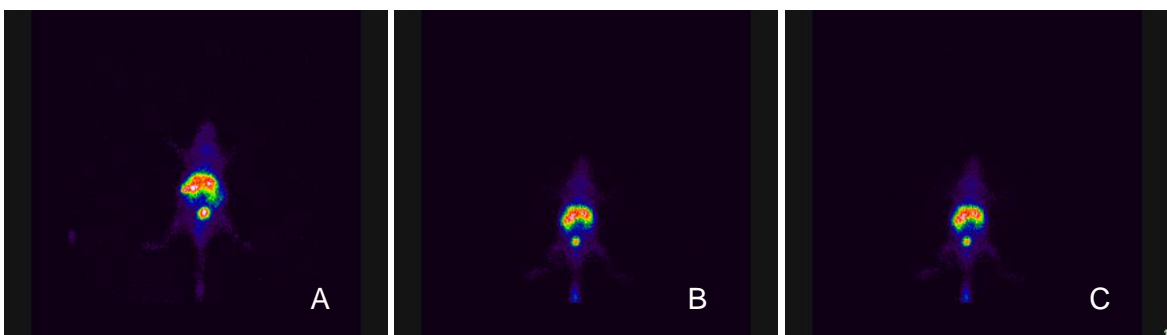


Figura 26. Imagens cintilográficas após a administração intravenosa em animais Swiss sadios do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL,. Os painéis A, B e C representam os tempos de 1, 4 e 8 horas, respectivamente, após a administração.

3.1.7 Depuração sanguínea em animais sadios

Quando o perfil de depuração sanguínea foi avaliado em animais da linhagem C57/Bl6 observou-se acentuada depuração sanguínea. O maior percentual da dose injetada (17,4%) foi encontrado com um minuto após a administração do radiofármaco. O tempo de meia-vida ($T_{1/2}$) determinado foi 12,83 minutos e a área sob a curva (ASC) foi igual a 448,1. A curva de depuração é demonstrada na Figura 27.

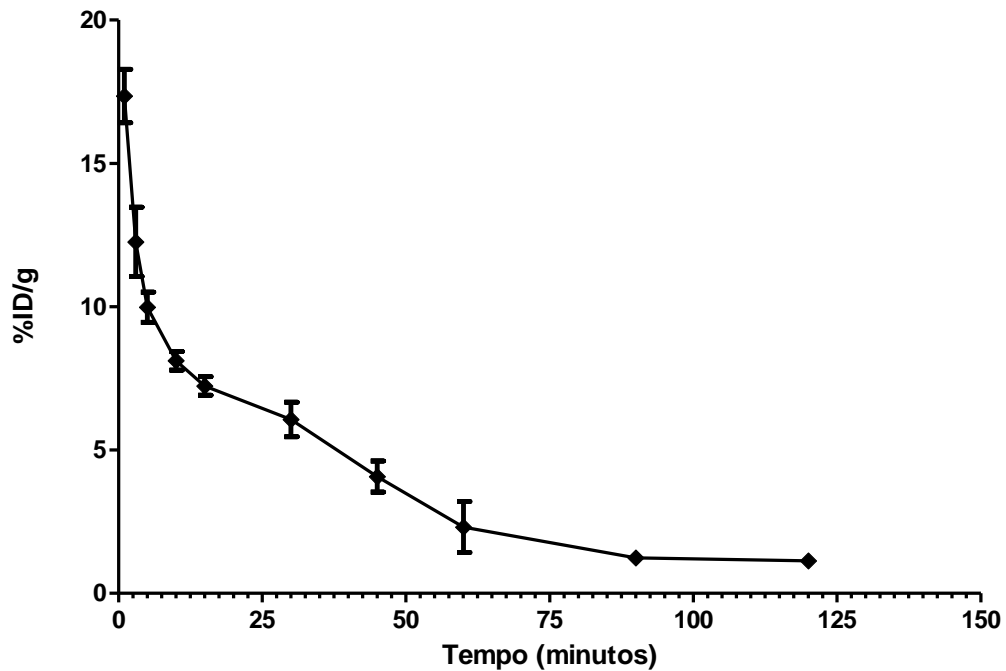


Figura 27. Depuração sanguínea para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL, em animais C57/Bl6 sadios.

Os SpHL contendo o peptídeo radiomarcado quando administrados em camundongos Swiss demonstraram perfil semelhante, com rápida depuração sanguínea. O maior percentual da dose injetada (18,7%) foi encontrado com um minuto após a administração do radiofármaco. O tempo de meia-vida ($T_{1/2}$) determinado foi 13,03 minutos e a área sob a curva (ASC) foi igual a 371,5. A curva de depuração é demonstrada na Figura 28.

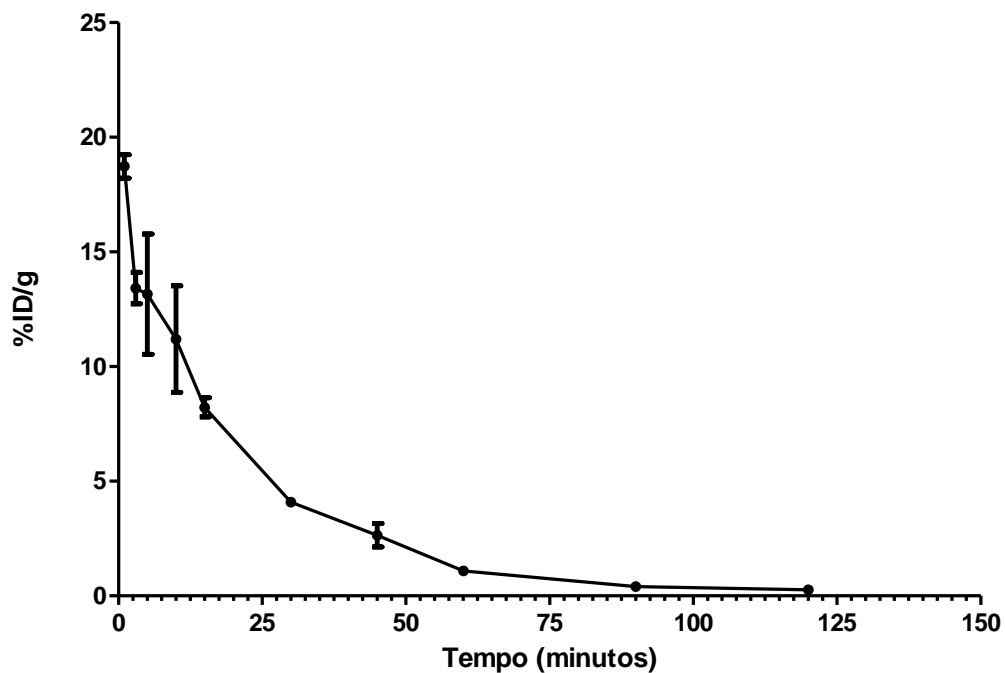


Figura 28. Depuração sanguínea para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL, em animais Swiss sadios.

A análise da área sob a curva (ASC) para os dados relatados nas Figuras 27 e 28 mostraram valores maiores (87% e 63%, respectivamente) aqueles obtidos para o complexo livre (Figuras 19 e 20). Sugerindo que a formulação foi capaz de aumentar o tempo de circulação do radiotraçador e desta forma, poderá contribuir para a obtenção de imagens cintilográficas de qualidade. Sabe-se que este tipo lipossoma pode ser passivamente direcionado para vários tipos de tumores, pelo fato destes tecidos apresentarem capilares com permeabilidade aumentada, facilitando o extravasamento das vesículas (BATISTA *et al.*, 2007).

3.1.8 Produção e estudo de estabilidade do kit liofilizado

Nos estudos de estabilidade dos kits armazenados em geladeira (4°C) observou-se um aumento gradativo no diâmetro das vesículas, porém na análise estatística dos dados obtidos somente observou-se diferença significativa ($p < 0,05$) para os tempos de 1 dia e 180 dias (Figura 29). Em todos os tempos avaliados o diâmetro médio das vesículas foi inferior a 500 nm, o que é relevante para garantir a segurança na administração endovenosa e para o extravasamento na região tumoral (TING *et al.*, 2010).

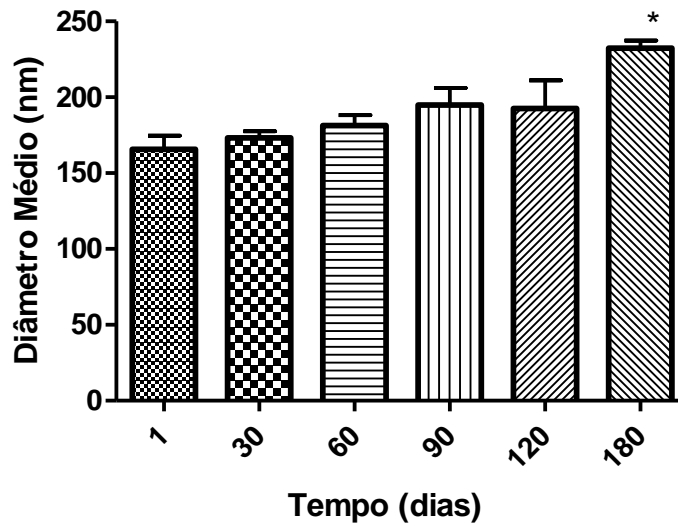


Figura 29. Diâmetro médio das vesículas para os SpHL liofilizados armazenados em geladeira (4°C). O asterisco (*) significa que o valor em 180 dias é estatisticamente diferente ($p < 0,05$) daquele obtido em 1 dia de armazenamento ($n=3$).

O teor de encapsulação foi similar em todos os tempos estudados, não apresentando diferenças estatisticamente significativas entre os tempos avaliados, como pode ser observado na Figura 30.

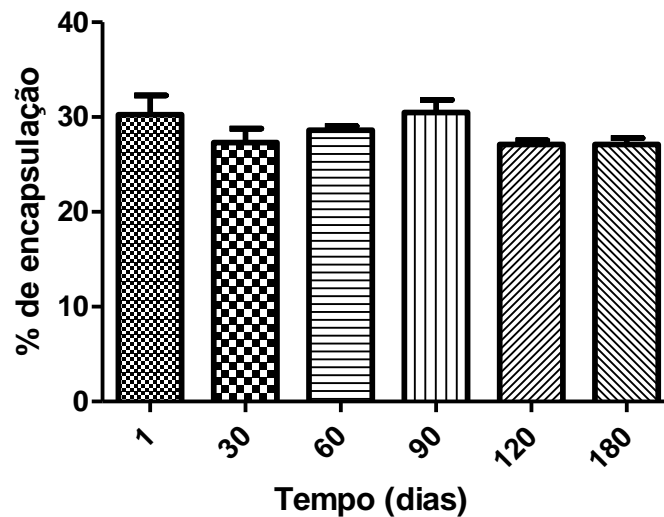


Figura 30. Teor de encapsulação do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em SpHL liofilizados armazenados em geladeira (4°C). ($n=3$)

3.2 nSpHL

3.2.1 Preparo e caracterização dos nSpHL

Após a preparação e extrusão dos nSpHL foram determinados o diâmetro médio e o índice de polidispersão (IP) das vesículas. Os resultados obtidos foram similares aqueles apresentados pelos SpHL demonstrando boa homogeneidade na distribuição de tamanho das vesículas dos nSpHL (Tabela 13). O valor do potencial zeta dos lipossomas nSpHL após extrusão em membrana de 0,1 μm foi $3,10 \pm 1,30$ mV, mostrando também valores próximos a neutralidade devido a presença das cadeias de PEG, como discutido no item 3.1.1.

Tabela 13. Diâmetro médio e índice de polidispersão (IP) de nSpHL após extrusão em membranas de policarbonato (n=3).

Membrana (μm)	Tamanho (nm)	IP
0,4	$197,8 \pm 3,7$	$0,132 \pm 0,073$
0,2	$144,4 \pm 5,1$	$0,061 \pm 0,055$
0,1	$120,9 \pm 2,5$	$0,046 \pm 0,011$

3.2.2 Teor e eficiência de encapsulação

O teor de encapsulação do complexo $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em nSpHL (40 mM) foi igual a $26,2 \pm 3,7\%$.

3.2.3 Perfil de liberação

O perfil de liberação do complexo $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ a partir dos nSpHL está representado na Figura 31. A liberação do radiofármaco a partir dos nSpHL apresentou valores semelhantes aqueles obtidos para o complexo $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ encapsulado em SpHL (Figura 22). Pôde ser observada uma liberação do complexo $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ igual a 10,0 % no tempo de 10 minutos, apresentando ligeiro aumento durante os tempos analisados, porém este aumento não se mostrou estatisticamente significativo. Os dados comprovam que a formulação apresenta boa estabilidade em presença de plasma.

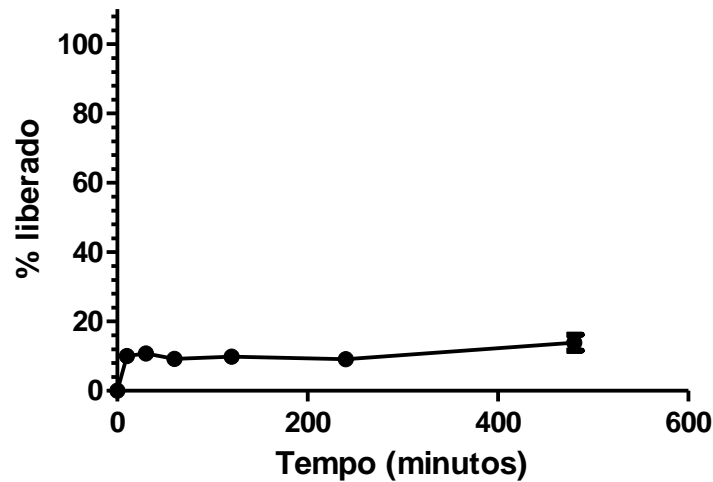


Figura 31. Perfil de liberação do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ encapsulado em nSpHL. O número de experimentos foi igual a três.

3.2.4 Depuração sanguínea em animais sadios

Os nSpHL contendo o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ quando administrado em animais Swiss apresentaram depuração sanguínea similar aquela apresentada pelos SpHL. O maior percentual da dose injetada (14,5%) foi encontrado com um minuto após a administração do radiofármaco. O tempo de meia-vida ($T_{1/2}$) determinado foi 11,92 minutos e a área sob a curva (ASC) foi igual a 375,3. Assim como demonstrado para os SpHL, a ASC apresentada pelos nSpHL (Figura 32) foi 64,5% maior que a ASC obtida para o radiofármaco livre.

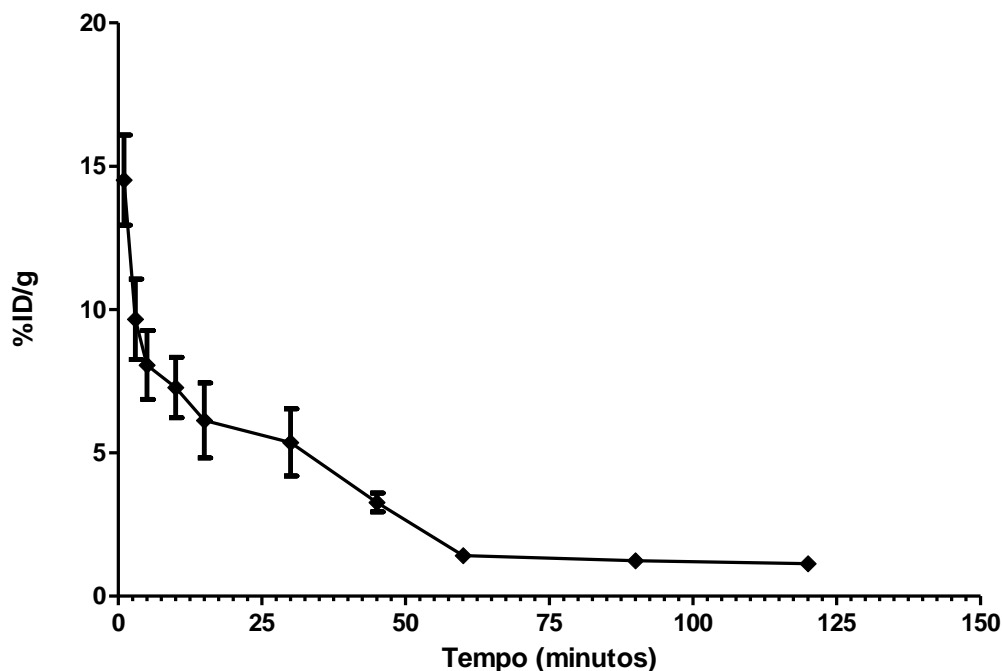


Figura 32. Depuração sanguínea para o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, encapsulado em nSpHL, em animais Swiss sadios ($n=3$).

4 Conclusões

Os lipossomas pH-sensíveis (SpHL) e não pH-sensíveis (nSpHL) preparados apresentaram diâmetro médio adequado para os estudos subseqüentes em animais.

A glicose na razão crioprotetor:fosfolípide (m/m) igual a 2:1 foi o crioprotetor de escolha para o processo de liofilização, pois foi capaz de manter o diâmetro das vesículas dentro de limites aceitáveis para os estudos *in vivo*.

O complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ foi encapsulado em SpHL e nSpHL em quantidades satisfatórias para credenciar as duas formulações para estudos de identificação de tumores.

A encapsulação do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em lipossomas contribuiu para aumentar o tempo de circulação do radiotraçador.

As imagens cintilográficas mostraram relevante captação das vesículas pelo sistema fagocitário mononuclear (Fígado e Baço), atestando a presença do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ no interior dos lipossomas.

Os SpHL liofilizados apresentaram estabilidade quando armazenados em geladeira (4°C), indicando que estes compostos podem ser estocado em condições adequadas, por até 180 dias.

CAPÍTULO 3

Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado, em lipossomas, em modelo experimental de tumor de Ehrlich

Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo livre e encapsulado, em lipossomas, em modelo experimental de tumor de Ehrlich

1 Introdução

Células tumorais apresentam, em sua superfície, receptores para diversos tipos de peptídeos. A bombesina é um peptídeo de origem anfíbia que se liga de maneira específica a receptores para o peptídeo liberador de gastrina (GRPr). Os GRPr estão supraexpressos em tumores de mama, próstata e pulmão. Desta forma, derivados de bombesina radiomarcados poderiam ser utilizados para a identificação destes tipos de cânceres (PATEL *et al.*, 2006).

Lipossomas são sistemas lipídicos dispersos constituídos freqüentemente por fosfolípides, os quais em meio aquoso se organizam espontaneamente em bicamadas formando vesículas esféricas. Estes sistemas são utilizados para direcionar substâncias a alvos específicos aumentando a concentração dos agentes de diagnóstico e/ou terapêutico no sítio alvo (LASIC, 1998).

Os tumores, normalmente, apresentam pH inferior ao fisiológico, este fato proporciona uma estratégia viável de direcionamento de agentes de diagnóstico utilizando lipossomas pH-sensíveis. Estas vesículas ao entrarem em contato com um meio ácido liberam seu conteúdo e, desta maneira, auxiliam para aumentar os níveis de radiotraçador no tumor (STUBB *et al.*, 1999).

Neste capítulo estão relatados os estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado, em lipossomas de circulação prolongada, visando a identificação de tumores de Ehrlich.

2 Material e Método

2.1 Material

Os lípides dioleilfosfatidiletanolamina (DOPE), diestearoilfosfatidiletanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-mPEG₂₀₀₀), hemisuccinato de colesterila (CHEMS), dioleilfosfatidilcolina (DOPC) foram adquiridos da Lipoid (Alemanha).

O peptídeo HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foi adquirido da GL BioChem (Shangai/China).

O tecnécio-99m foi obtido de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (IPEN/Brasil).

Os demais reagentes serão adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical Company (EUA).

Os camundongos Swiss foram adquiridos do centro de bioterismo da Faculdade de Farmácia da UFMG e mantidos, sem restrição de água e ração, no biotério do laboratório de Farmacotécnica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Todos os experimentos realizados em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), nº protocolo: 34/2010 (ANEXO 1).

2.2 Implante do tumor líquido (ascite) de Ehrlich

As células, armazenadas em nitrogênio líquido, foram descongeladas a temperatura ambiente. Em seguida, transferiram-se as células de Ehrlich com o auxílio de uma pipeta automática para um tubo falcon estéril. Adicionou-se solução de NaCl 0,9% (p/v) e o tubo foi levado à centrífuga (3000 x g, 5 minutos), retirou-se o sobrenadante e o *pellet* foi novamente lavado com solução de NaCl 0,9% (p/v). Ao final da segunda lavagem, o *pellet* foi ressuspensionado com a mesma solução e o volume de 0,1 mL foi injetado, por via intraperitoneal, em camundongos Swiss.

Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Farmacotécnica por oito dias sem restrição de água e ração. Após este período, os camundongos foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg) e o líquido ascítico foi retirado e colocado em um tubo falcon estéril.

Centrifugou-se o líquido ascítico a 3000 x g por 5 minutos, retirou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado com solução de NaCl 0,9% (p/v). Esse processo foi repetido e, em seguida, uma alíquota das células foi corada com solução de Tripán 0,4% e contada em

microscópio, com aumento de 400x, com o auxílio de uma câmara de Neubauer e a concentração foi calculada de acordo com a fórmula demonstrada abaixo:

$$\text{Nº células/mL} = X \times \text{FD} \times 10^4$$

Onde, X é a média do número de células contadas nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer e FD é o fator de diluição utilizado.

Após a contagem as células foram diluídas para uma concentração de 1×10^7 células/mL e estas foram aliqüotadas em criotubos e armazenadas em nitrogênio líquido.

2.3 Implante de tumor sólido de Ehrlich em camundongos Swiss

Para o implante do tumor sólido de Ehrlich foram utilizadas células obtidas após coleta e lavagem do líquido ascítico, conforme descrito no item anterior. As células foram contadas, com auxílio de uma câmara de Neubauer, e o volume de 0,1 mL, contendo 10^6 de células foi implantado, por via subcutânea, na coxa direita de camundongos Swiss. Os animais foram mantidos no biotério do laboratório de Farmacotécnica com ciclo de claro-escuro e sem restrição de água e alimento. Foi permitido o crescimento do tumor a um diâmetro não superior a 10 mm.

2.4 Estudo histopatológico do tumor

Ao final do experimento os animais foram sacrificados e necropsiados, fragmentos do tecido tumoral foram coletados para análise histopatológica. O material foi fixado em formalina* tamponada, durante 24 horas e, posteriormente, processado para inclusão em parafina e emblocado. Secções histológicas de 4 μm foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação morfológica.

Para avaliar o grau de neovascularização, os vasos sanguíneos foram definidos como estruturas com luz, com presença de hemácias em 5 campos (aumento 400X, ou seja: objetiva 40X e ocular 10X) da lâmina escolhidos ao acaso em cada grupo como descrito por Maeda *et. al.*, 1995.

* Formalina tamponada: aldeído fórmico (37- 40%) 100 mL; fosfato monossódico 4 g; fosfato bisódico 4,5 g; água destilada 900 mL.

2.5 Estudo de afinidade do complexo $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ pelas células de Ehrlich

Para o estudo de afinidade foi utilizada metodologia descrita por Santos-Cuevas *et al.* (2009), com algumas modificações. Uma alíquota (1 mL) de meio de cultura DMEM contendo 1×10^6 células de Ehrlich foram incubadas, em eppendorf, com aproximadamente 200.000 cpm de ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ (0,3 nmol de peptídeo total), em triplicata, a 37°C por 1, 4 e 8 horas. Os eppendorfs foram centrifugados (10 minutos, 3000 x g) e o sobrenadante foi recolhido. A atividade do *pellet* foi determinada em um contador gama. A radioatividade encontrada no *pellet* representa os peptídeos adsorvidos a superfície das células e os peptídeos internalizados. Uma alíquota com a atividade inicial foi retirada e considerada como 100%, sendo assim, a captação do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células de Ehrlich foi calculado através da fórmula representada abaixo:

$$\% \text{ radioatividade captada} = (\text{cpm } \textit{pellet} / \text{cpm padrão}) \times 100$$

O *pellet* foi ressuspendido com 1 mL de tampão ácido (0,2 M de ácido acético e 0,5 M de NaCl – pH 2,8) para a remoção do peptídeo adsorvido a superfície. Os eppendorfs foram novamente centrifugados. A radioatividade encontrada no *pellet* representa os peptídeos internalizados. Os resultados foram expressos como porcentagem da radioatividade total, considerando o nível de radioatividade apresentado pelos peptídeos adsorvidos mais o valor de radioatividade obtido para os peptídeos internalizados, como mostra a fórmula abaixo:

$$\% \text{ internalização} = \text{cpm internalizado} / \text{cpm adsorvido} + \text{cpm internalizado}$$

A ligação não específica do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células de Ehrlich também foi determinada para cada um dos tempos de incubação (1, 4 e 8 horas). Para tanto, a única alteração no protocolo do teste de afinidade foi a adição de 10 μmol do HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, 15 minutos antes da adição de 0,3 nmol do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. Ou seja, foi utilizado excesso do peptídeo frio (não radiomarcado) para bloquear a ligação e a internalização do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células Ehrlich. O restante do procedimento foi conduzido de forma idêntica à descrita anteriormente.

2.6 Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ em animais com tumor de Ehrlich

Foram utilizados 25 camundongos Swiss, pesando 20-25 g, com tumor de Ehrlich implantado na coxa posterior direita. Estes animais foram divididos em três grupos onde cada animal recebeu, pela veia caudal, 3,7 MBq da solução contendo o complexo ^{99m}Tc -

HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. Após os tempos de 1, 4 e 8 horas os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg) e, em seguida, submetidos à eutanásia. Órgãos e tecidos como: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, bexiga, tumor, músculo, tireóide, pâncreas foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade, e os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de tecido (%ID/g). Os estudos com bloqueio de receptor foram realizados com a coadministração de 40 μ g de peptídeo frio (de BARROS *et al.*, 2010).

2.7 Imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ em animais com tumor de Ehrlich

Em três animais Swiss foram administrados, por via intravenosa, 37 MBq da solução de ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. As imagens foram adquiridas nos tempos de 1, 4 e 8 horas após a administração do complexo radiomarcado, os camundongos foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob a gama câmara (NuclideTM TH 22, Mediso, Hungria). Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256. As análises quantitativas das imagens foram realizadas conforme descrito por Diniz *et al.* (2008). As imagens foram analisadas determinando-se a radioatividade nas regiões de interesse (ROIs) pelo delineamento ao redor da área alvo (tumor) e da área não-alvo (músculo contralateral).

2.8 Biodistribuição, em animais com tumor de Ehrlich, do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, encapsulado em SpHL

Foram utilizados 25 camundongos Swiss, pesando 20-25 g, com tumor de Ehrlich implantado na coxa posterior direita. Estes animais foram divididos em cinco grupos onde cada animal recebeu, pela veia caudal, 3,7 MBq da suspensão de SpHL contendo o complexo ^{99m}Tc - HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. Após os tempos de 1, 2, 4, 6 e 8 horas os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg) e, em seguida, submetidos à eutanásia. Órgãos e tecidos como: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, bexiga, tumor, músculo, tireóide, pâncreas foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade, e os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) (de BARROS *et al.*, 2011).

2.9 Imagens cintilográficas, em animais com tumor de Ehrlich, do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, encapsulado em SpHL

Em três animais Swiss foram administrados, por via intravenosa, 37 MBq da suspensão de SpHL contendo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$. As imagens foram adquiridas nos tempos de 1, 4 e 8 horas após a administração do complexo radiomarcado, os camundongos foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob a gama câmara (NuclideTM TH 22, Mediso, Hungria). Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256. As análises quantitativas das imagens foram realizadas conforme descrito por Diniz *et al.* (2008). As imagens foram analisadas determinando-se a radioatividade nas regiões de interesse (ROIs) pelo delineamento ao redor da área alvo (tumor) e da área não-alvo (músculo contralateral).

2.10 Biodistribuição, em animais com tumor de Ehrlich, do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, encapsulado em nSpHL

Foram realizados os mesmos procedimentos descritos no item 2.8, porém a formulação utilizada não apresentava característica de pH sensibilidade.

2.11 Coeficiente de partição tecido/sangue

O coeficiente de partição tecido/sangue para complexo encapsulado em SpHL ou nSpHL foi determinado dividindo-se a área sob a curva (ASC) do percentual de $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ no tecido pela área sob a curva do percentual do radiofármaco no sangue. Os valores de área sob a curva foram calculados no programa GraphPad Prism 5.

2.12 Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-DTPA}$ em animais com tumor de Ehrlich

Foram utilizados 9 camundongos Swiss, pesando 20-25 g, com tumor implantado na coxa posterior direita. Estes animais foram divididos em três grupos onde cada animal recebeu, pela veia caudal, 3,7 MBq do complexo $^{99m}\text{Tc-DTPA}$. Após os tempos de 1, 4 e 8 horas os animais foram anestesiados e submetidos à eutanásia. Órgãos e tecidos como: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, bexiga, tumor, músculo, tireóide, pâncreas foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade, e os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de tecido (%ID/g).

2.13 Análise estatística

Os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas foram comparados quantitativamente pelo teste t e/ou pelo teste de Tukey-Kramer utilizando o programa GraphPad Prism 5. Um nível de $p < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo.

3 Resultados e discussão

3.1 Implante do tumor de Ehrlich sólido e estudos histopatológicos

Os animais submetidos ao implante das células de Ehrlich desenvolveram o tumor, em tamanho adequado, em 8 a 10 dias após a inoculação. A contagem dos vasos pelo método de coloração com hematoxilina/eosina demonstrou a presença de vasos na periferia do tumor indicando neovascularização (Figura 33). O número médio de vasos por campo foi igual a 8,3. A presença de vasos neoformados no tecido tumoral é extremamente importante para a progressão do câncer e, conseqüentemente, para proporcionar a disseminação das células pelo organismo (metástase). No entanto, sabe-se que esta nova rede endotelial é formada de maneira desordenada e, portanto, a permeabilidade entre as células está aumentada. Estas características podem ser úteis no direcionamento de substâncias para fins de diagnóstico e terapia de tumores (YUAN *et al.*, 1995; MUNN, 2003).

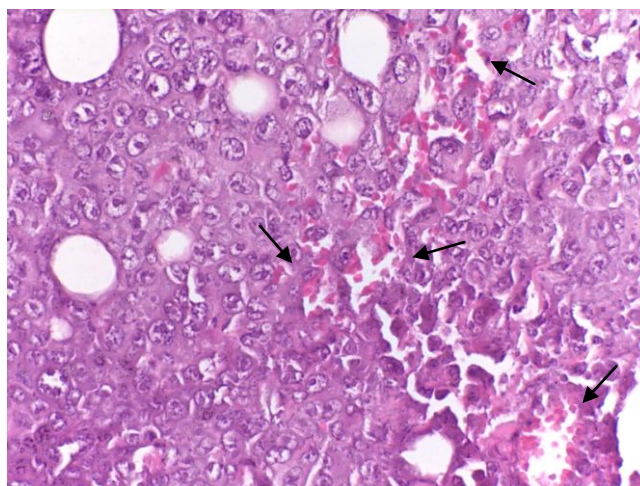


Figura 33. Imagem do tumor de Ehrlich corados pelo método HE. As setas indicam a presença de vasos no tecido.

3.2 Estudo de afinidade do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células de Ehrlich

Os resultados *in vitro* mostraram moderada captação do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células de Ehrlich nos tempos estudados. Quando foi utilizado excesso do ligante frio (HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎) observou-se acentuada redução da captação pelas células de Ehrlich sugerindo que a ligação do radiofármaco com a célula ocorre de maneira específica, provavelmente devido a presença de receptores no tecido tumoral (Figura 34). O percentual de ligação do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nas células Ehrlich foi próximo aos valores descritos na literatura. Nestes estudos, os autores relataram percentuais de ligação entre 4 e 7% para o peptídeo bombesina, complexado a

diferentes espaçadores e agentes quelantes e radiomarcado com Índio-111, nas células PC-3 (tumor de próstata humano) e AR4-2J (tumor pancreático acinar de rato) (ZHANG *et al.*, 2004; MANSI *et al.*, 2009).

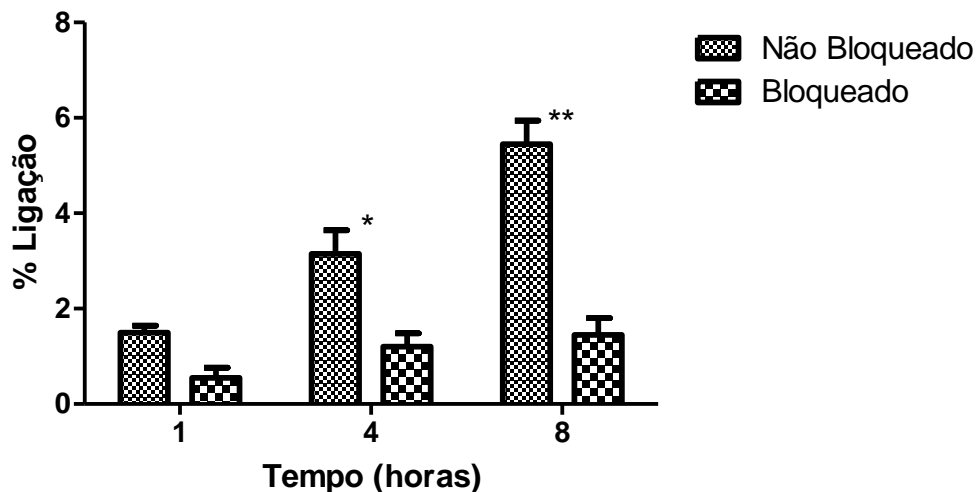


Figura 34. Captação do complexo pelas células de tumor de Ehrlich com e sem bloqueio do receptor. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$

Para otimizar o diagnóstico é importante que o radiofármaco seja inserido dentro na célula tumoral após a sua chegada no sítio alvo (LISTER-JAMES *et al.*, 1997; HOFFMAN *et al.*, 2003). Desta forma, a internalização é um fator importante para a geração de imagens cintilográficas, uma vez que o radiofármaco permanece mais tempo no sítio tumoral. A internalização do complexo foi avaliada e os resultados mostraram valores moderados entre 12 e 19% durante os tempos analisados. Vale ressaltar que quando foi utilizado excesso do peptídeo frio observou-se uma redução estatisticamente significativa nos valores de internalização (Figura 35) devido ao bloqueio dos receptores para o peptídeo liberador de gastrina. Estes dados sugerem que o complexo pode ser utilizado para estudo *in vivo* de identificação deste tipo de tumor.

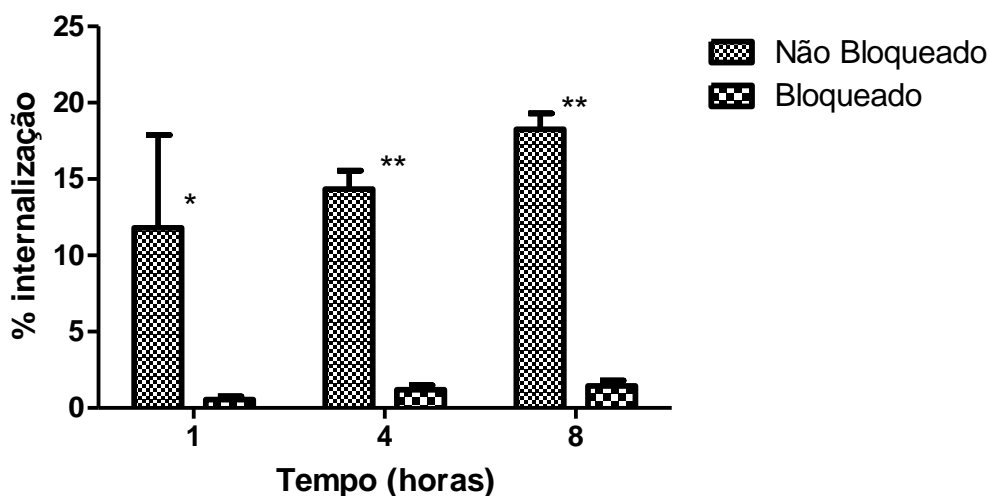


Figura 35. Internalização do complexo pelas células de tumor de Ehrlich, com e sem bloqueio do receptor. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$

Os valores de internalização obtidos para as células de tumor de Ehrlich foram similares àqueles relatados por outros autores utilizando derivados de bombesina radiomarcados com tecnécio-99m ou Índio-111. Por exemplo, trabalhos descritos na literatura mostram valores da ordem de 20 a 33% em células PC-3, de 22 a 35% em células AR4-2J, de 13 a 17% em células MCF7 e de 14 a 19% em células MDA-MB231 (ZHANG *et al.*, 2004; FRAGOGEORGI *et al.*, 2009; MANSI *et al.*, 2009; SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009). No entanto, tais estudos foram conduzidos em linhagens de células diferentes da linhagem utilizada neste trabalho. Não foram encontrados dados do percentual de ligação e/ou internalização de derivados de bombesina em células de tumor de Ehrlich.

3.3 Biodistribuição e Imagens cintilográficas do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em animais com tumor de Ehrlich

Os estudos de biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ não mostraram diferenças significativas no perfil de excreção quando comparados com aqueles obtidos em animais saudáveis (Figura 17), ou seja, observou-se elevada eliminação renal, além de baixa captação no coração e no sangue (Figura 36). O pâncreas apresentou maior captação do que fígado e baço sugerindo que o complexo radiomarcado foi capaz de se ligar a receptores para o peptídeo liberador de gastrina presentes no pâncreas. O pâncreas é normalmente utilizado como indicador de especificidade para os receptores para o peptídeo liberador de gastrina, visto que tais receptores estão presentes neste órgão. (NOCK *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2003; SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009).

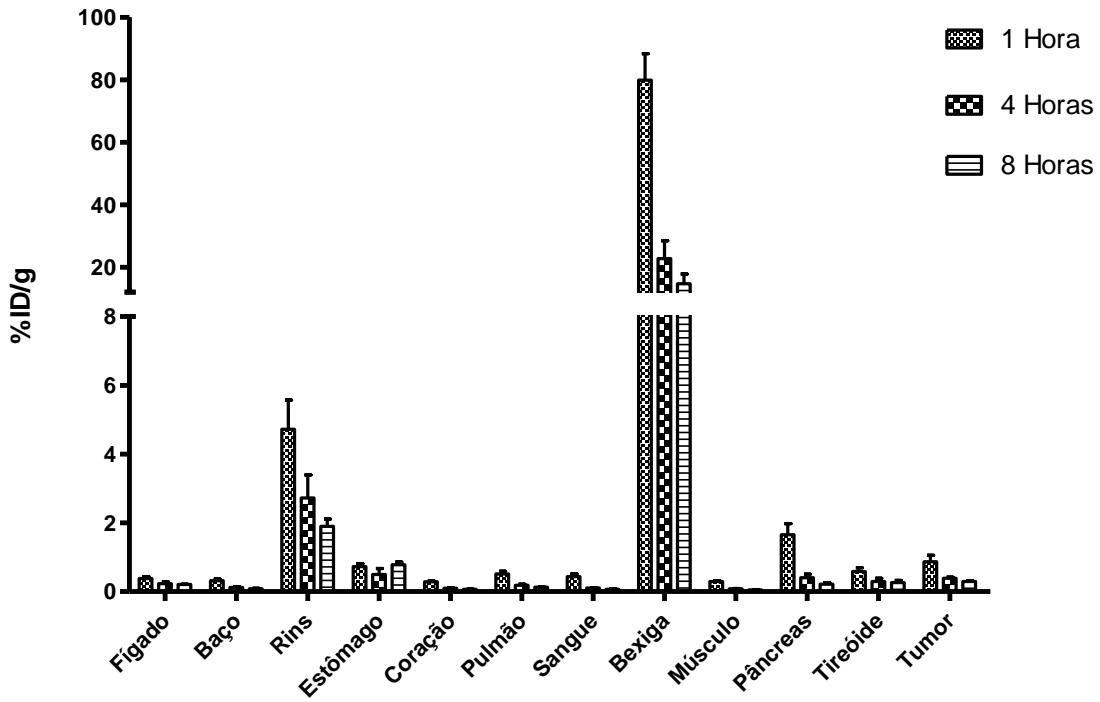


Figura 36. Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5)

O cálculo das relações alvo/não alvo demonstraram alta afinidade do complexo radiomarcado para pâncreas e tumor, tecidos onde os GRPr estão presentes, quando comparados a tecidos controles como coração, sangue e músculo contralateral. As relações estão apresentadas nas Figuras 37 e 38, respectivamente.

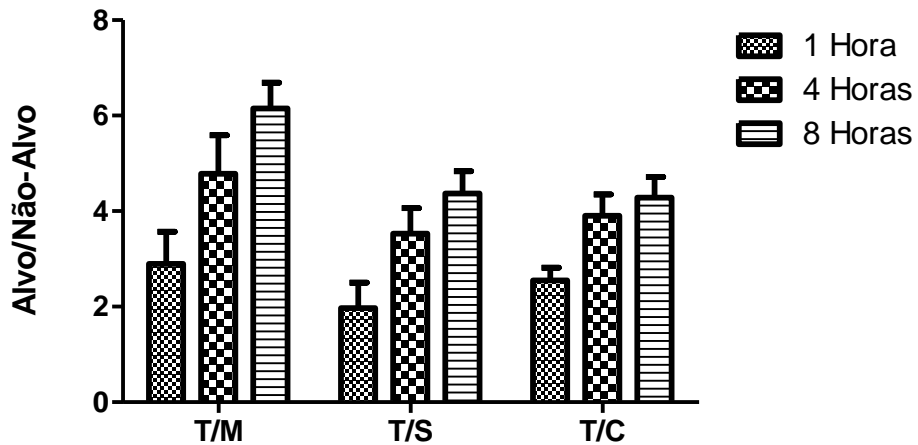


Figura 37. Relações tumor/não alvo para os estudos de biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5) T/M – Tumor/Músculo; T/S – Tumor/Sangue; T/C – Tumor/Coração.

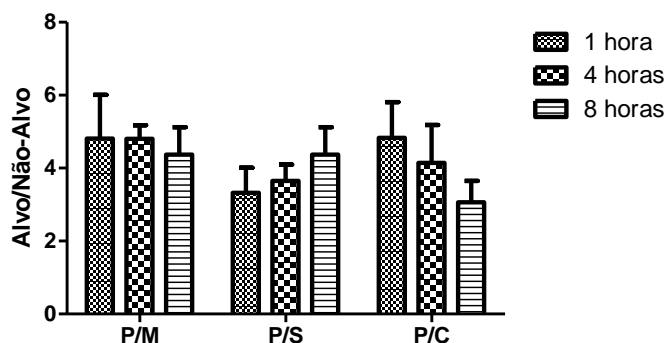


Figura 38. Relações pâncreas/não alvo para os estudos de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5) P/M – Pâncreas/Músculo; P/S – Pâncreas/Sangue; P/C – Pâncreas/Coração.

Os dados da Figura 37 mostraram relações tumor/músculo superiores a 2,0 para todos os tempos investigados. O maior valor (6,15) foi atingido 8 horas após a administração do radiofármaco. Isto sugere que este radiotraçador foi, no mínimo, 100% mais captado pelo tumor do que pelas regiões não alvo. Segundo PHILLIPS, 1999, substâncias que apresentarem relação alvo/não alvo maior que 1,5 (captação 50% maior no tecido alvo) podem ser consideradas como potenciais agentes de diagnóstico. Portanto, os dados obtidos sugerem que o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ pode ser empregado para a identificação de tumor de Ehrlich e, provavelmente, para outros tipos de tumores.

As imagens cintilográficas obtidas (Figura 39) também revelaram maior captação pelo tumor quando comparado ao músculo controle (pata contra lateral). A análise quantitativa das imagens possibilitou a obtenção da relação tumor/músculo e os valores obtidos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados com aqueles apresentados para os estudos de biodistribuição (Figura 40).

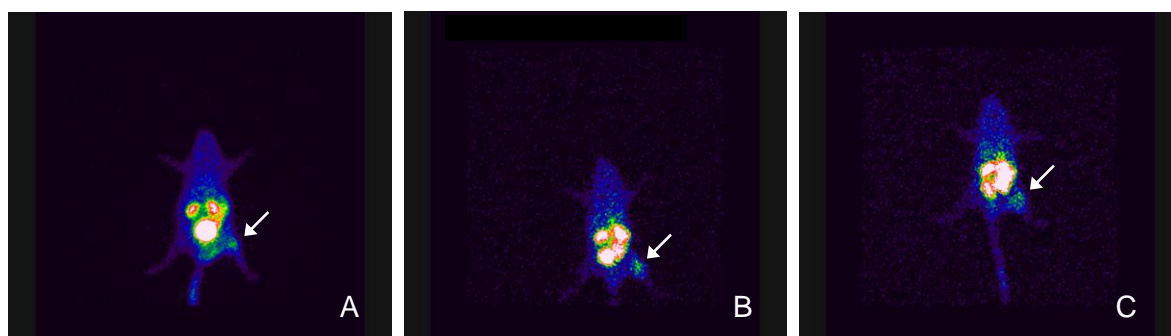


Figura 39. Imagens cintilográficas obtidas 1, 4 e 8 horas após a administração do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ em animais com tumor de Ehrlich implantado na pata posterior direita (seta). A – 1 hora; B – 4 horas; C – 8 horas.

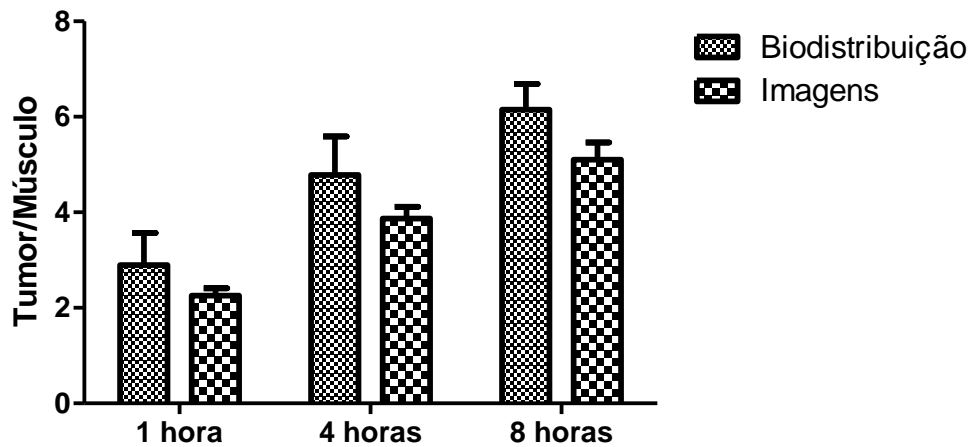


Figura 40. Relações tumor/músculo obtidas nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$. (n=5)

Nos ensaios em que os receptores foram bloqueados pela administração concomitante de excesso do peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ frio foi possível observar, nos estudos de biodistribuição (Figura 41), menor captação pelo tecido tumoral quando comparado com os dados obtidos sem o bloqueio dos receptores GRPr.

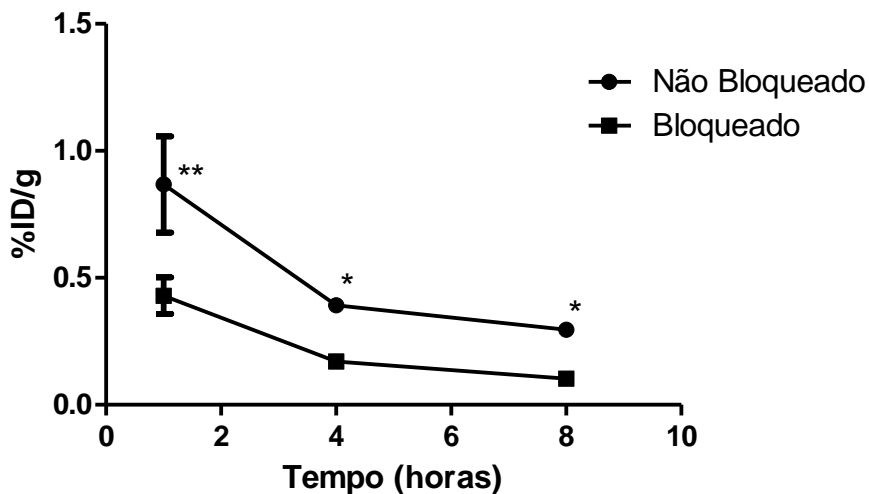


Figura 41. Valores de captação no tecido tumoral nos estudos com e sem bloqueio de receptor. (n=3)
* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

A análise da área sob a curva no tumor apresentou valores 2,25 vezes maior para os estudos sem bloqueio de receptor quando comparados aqueles em que o bloqueio foi realizado. Estes dados sugerem que o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ interage com as células tumorais via ligação com o receptor, uma vez que quando estes receptores foram saturados pela presença de excesso de ligante a captação no órgão alvo reduziu significativamente. OKARVI e JAMMAZ, 2012 utilizando diversos análogos de peptídeo

bombesina radiomarcado com tecnécio-99m relatou uma redução na ordem de 50-60%, na captação pelo tumor MDA-MB-231 quando o bloqueio dos receptores foi utilizado com excesso do peptídeo frio. Estes achados corroboram aqueles relatados neste trabalho, sugerindo especificidade do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ para as células MDA-MB-231.

3.4 Biodistribuição e imagens cintilográficas, em animais com tumor de Ehrlich, do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL

Os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição para o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL estão apresentados na Figura 42. Como discutido no capítulo 2, os SpHL apresentam importante captação por órgãos do sistema fagocitário mononuclear como fígado e baço, conforme observado na figura 42.

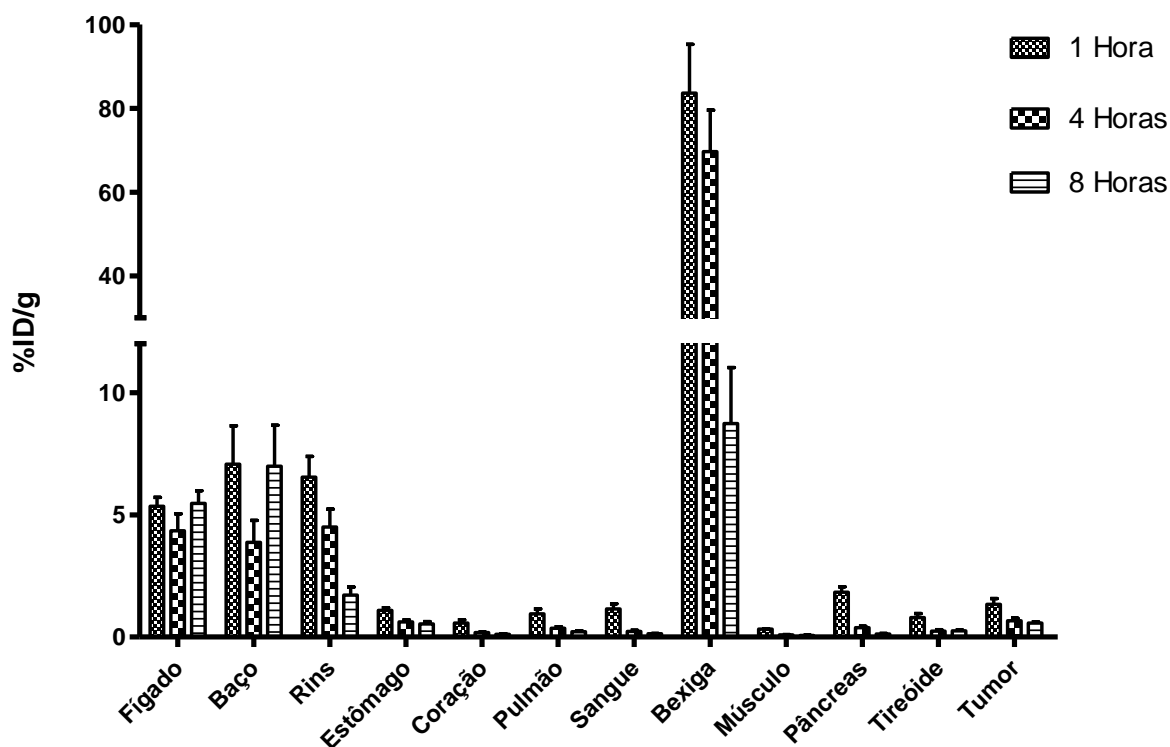


Figura 42. Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL, em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5)

A captação pelo tecido tumoral foi maior que aquela apresentada pelo complexo não encapsulado o que sugere o direcionamento para região do tumor proporcionado pelos SpHL (Figura 43). Conforme discutido anteriormente, tumores precisam da formação de novos vasos sanguíneos para a manutenção do suprimento energético para seu crescimento. Estes vasos, no entanto, apresentam poros suficientemente grandes que permitem o extravasamento das vesículas (MUNN, 2003). Os SpHL utilizados neste estudo

apresentaram tamanho inferior a 200 nm, indicando que os SpHL seriam capazes de extravasar para o tecido adjacente e acumular na região tumoral (de BARROS *et al.*, 2011).

Outro fator importante que provavelmente favoreceu a maior captação pelo tecido tumoral é o fato deste tecido apresentar pH inferior ao fisiológico (STUBBS *et al.*, 1999; PATRICK, 2005). Assim, os SpHL são desestabilizados em contato com este meio ligeiramente ácido e liberam o peptídeo radiomarcado retido em seu interior (TACHIBANA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2000). O complexo liberado na região alvo poderá interagir com os receptores ali presentes. Desta maneira, os SpHL são capazes de disponibilizar maior número de moléculas do radiotraçador na região tumoral, aumentando o nível de captação e, conseqüentemente, gerando relações tumor/não alvo maiores.

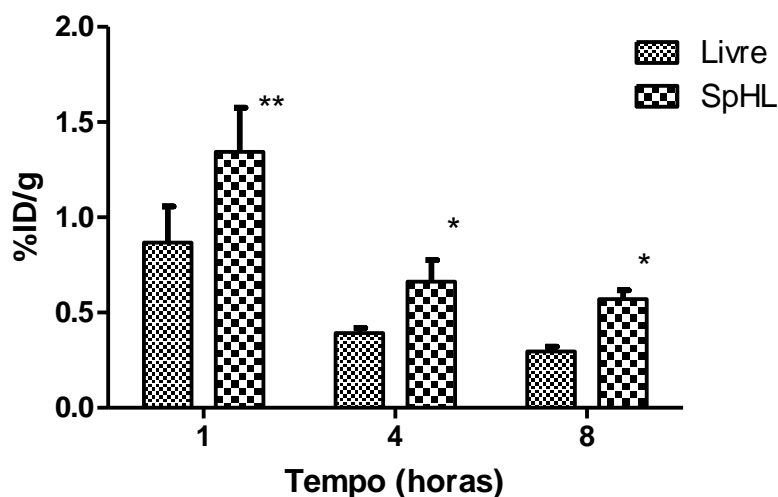


Figura 43. Captação pelo tumor do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ livre e encapsulado em SpHL, em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5) * p<0,05; ** p<0,001

O cálculo das relações alvo/não alvo para o tecido tumoral mostrou elevada relação tumor/músculo (T/M) e moderada relação tumor/sangue (T/S) e tumor/coração (T/C), como mostrado na Figura 44. Quando comparado com as relações T/M obtidas para o complexo livre, os valores obtidos com a preparação de lipossomas pH-sensíveis foram significativamente maiores nos tempos de 4 e 8 horas após a administração (Figura 45).

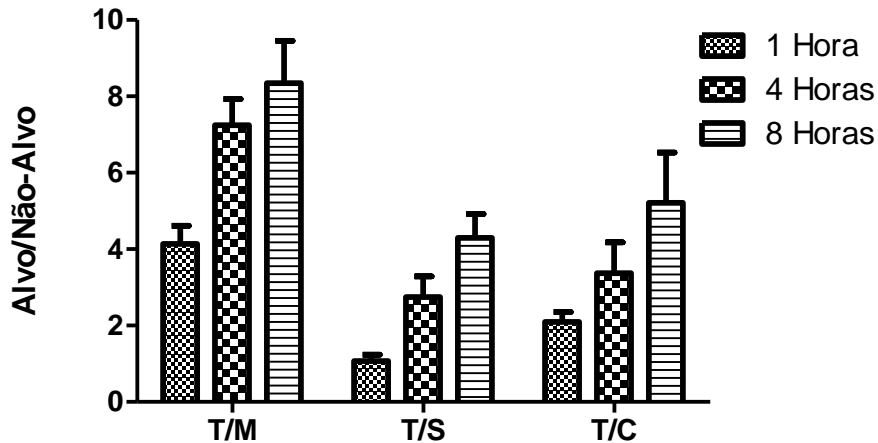


Figura 44. Relações tumor/não alvo para os estudos de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, em SpHL, em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5) T/M – Tumor/Músculo; T/S – Tumor/Sangue; T/C – Tumor/Coração.

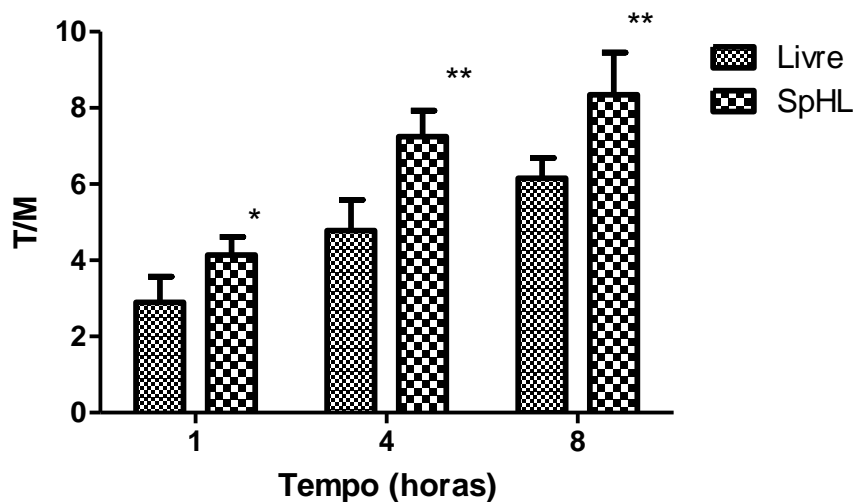


Figura 45. Relações tumor/músculo para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ livre e encapsulado em SpHL após administração endovenosa em animais com tumor de Ehrlich. (n=5) * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

Na Figura 46 estão relatados os valores de captação pelo pâncreas nos tempos de 1, 4 e 8 horas após a administração dos SpHL contendo o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$. Sabe-se que o pâncreas apresenta receptores para o peptídeo liberador de gastrina, sendo considerado como um indicador de especificidade para derivados de bombesina radiomarcados (Nock *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003). No entanto, os dados de captação por este órgão nos tempos de 4 e 8 horas mostraram valores estatisticamente menores àqueles observados para o complexo livre. Isto pode ser justificado pelo fato do complexo radiomarcado ser preferencialmente liberado dos SpHL em regiões de menor pH, como os tumores. Desta forma, o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ não estaria

disponível para interagir com os receptores presentes no pâncreas. Portanto, este achado é um indicativo de que os SpHL podem ser úteis para o direcionamento do radiotraçador para a região tumoral.

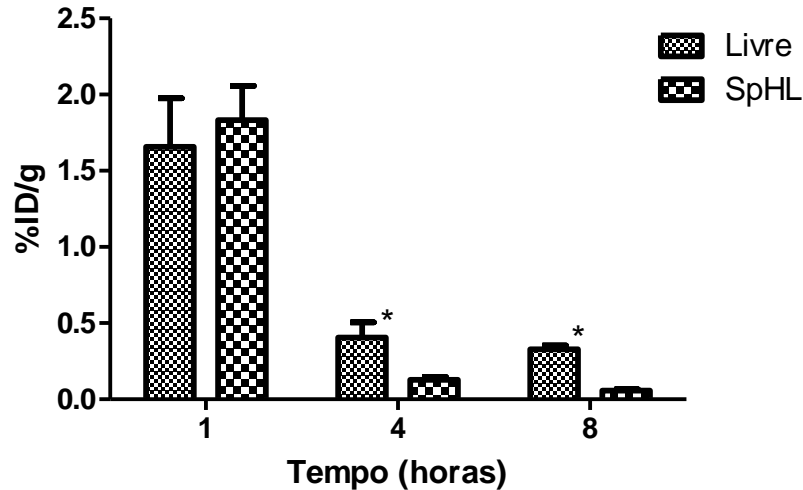


Figura 46. Valores de captura no pâncreas o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado em SpHL. (n=5) * p<0,05.

As imagens cintilográficas obtidas (Figura 47) também revelaram maior captura pelo tumor quando comparado ao músculo controle (pata contra lateral). A análise quantitativa das imagens possibilitou a obtenção da relação tumor/músculo e os valores obtidos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados com aqueles apresentados para os estudos de biodistribuição (Figura 48).

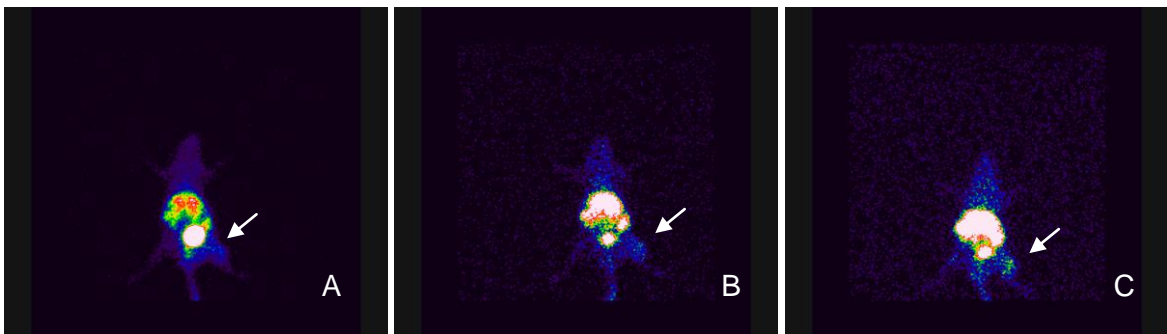


Figura 47. Imagens cintilográficas obtidas 1, 4 e 8 horas após a administração do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, encapsulado em SpHL, em animais com tumor de Ehrlich implantado na pata posterior direita (seta). A – 1 hora; B – 4 horas; C – 8 horas.

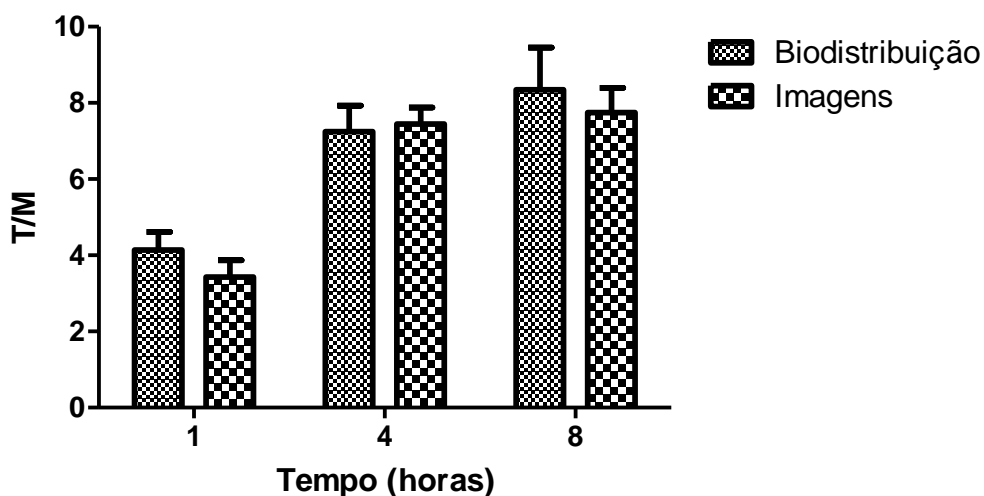


Figura 48. Relações tumor/músculo obtidas nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ encapsulado em SpHL quando administrado em animais com tumor de Ehrlich (n=5).

3.5 Biodistribuição, em animais com tumor de Ehrlich, do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, encapsulado em nSpHL

Na Figura 49 observa-se que quando foram utilizados lipossomas não pH-sensíveis o perfil de biodistribuição foi semelhante aos SpHL, ou seja, captação significativa pelo fígado e baço, porém estes estudos demonstraram também que houve menor captação pelo tecido tumoral, e conseqüentemente, menor relação tumor/músculo (Figura 50). Este fato pode ser explicado pela perda da característica de pH-sensibilidade. Estes lipossomas não se desestabilizam em meio ácido, e conseqüentemente, não liberam o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ encapsulado para interagir com os receptores presentes nas células de Ehrlich.

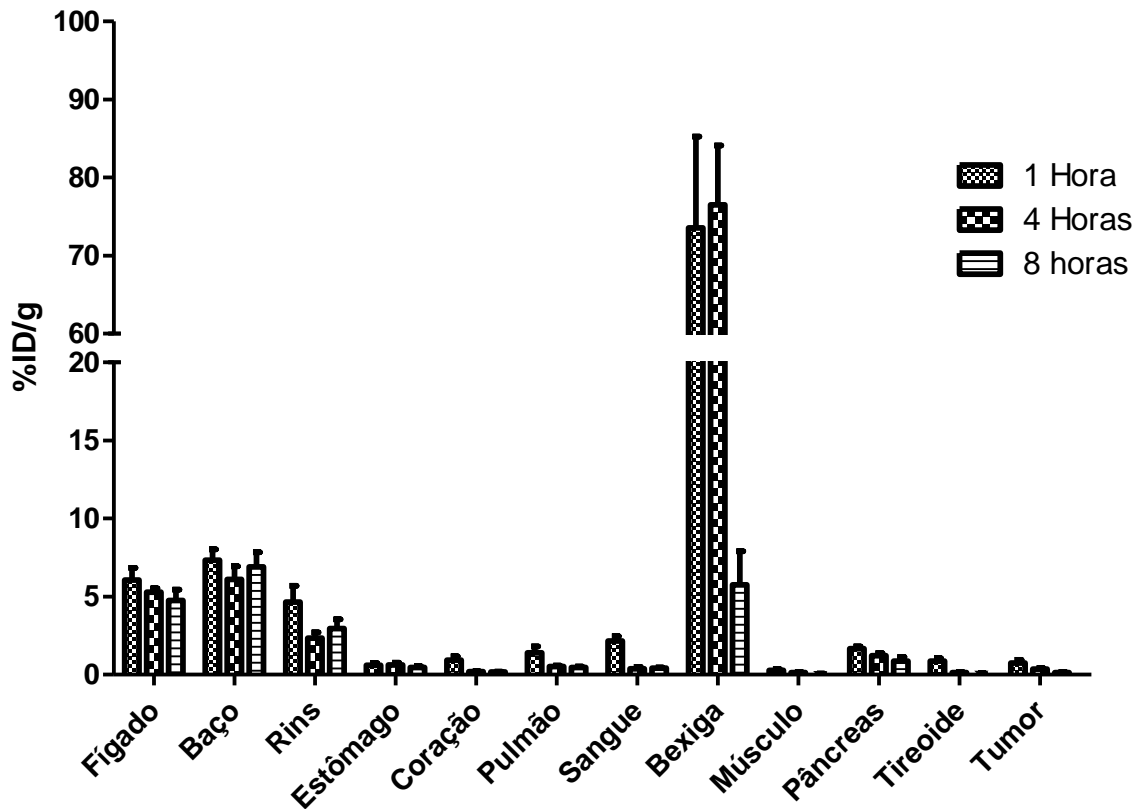


Figura 49. Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, encapsulado em nSpHL, em camundongos Swiss com tumor de Ehrlich implantado. (n=5)

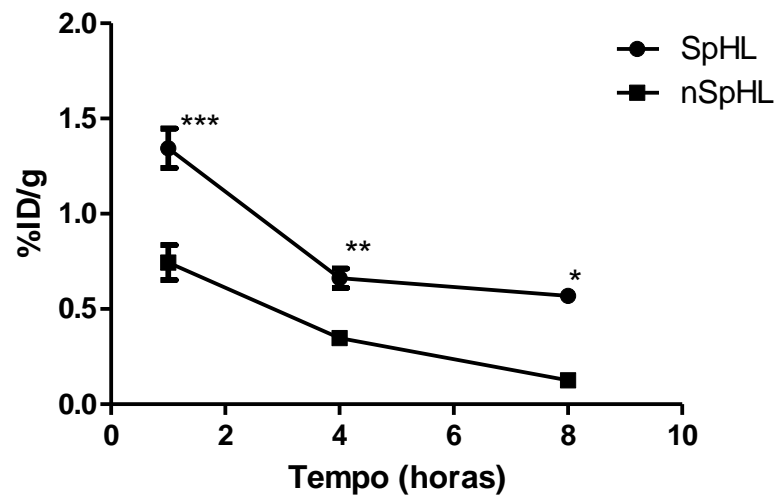


Figura 50. Captação pelo tumor 1, 4 e 8 horas após a administração do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ encapsulado em lipossomas pH-sensíveis (SpHL) e não pH-sensíveis (nSpHL) em animais com tumor de Ehrlich implantado (n=5). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

3.6 Coeficiente de partição tecido/sangue

Os coeficiente de partição tecido-sangue (K_p) para os estudos com o complexo encapsulado em SpHL e em nSpHL está mostrado na Tabela 14. A razão entre os valores de K_p (K_p

SpHL/Kp nSpHL) foi igual a 3,856, demonstrando maior captação pelo tumor para os experimentos realizados com SpHL. Desta forma, estes resultados, juntamente com os dados relatados no item anterior, reforçam a idéia da utilização dos lipossomas SpHL como veículos para carrear agentes de diagnóstico e/ou terapia para tumores. CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007 relataram um estudo farmacocinético comparativo entre SpHL encapsulando cisplatina e o fármaco livre. Os autores mostraram maior acumulação da cisplatina no tecido tumoral quando a formulação de SpHL foi utilizada, resultando em maior Kp para a formulação lipossomal (1,51) quando comparado com a cisplatina livre (1,23). O valor de Kp encontrado para os SpHL foi bastante similar ao relatado neste trabalho, mostrando congruência entre os dados apresentados neste estudo e aqueles descritos por outros autores.

Tabela 14. Coeficiente de partição tecido/sangue (Kp) para diferentes órgãos de camundongos com tumor de Ehrlich implantado após administração do complexo encapsulado em SpHL (A) ou nSpHL (B).

Órgão	Kp(A)	Kp(B)	Kp(A)/Kp(B)
Tumor	1,500	0,389	3,856

*Kp calculado a partir da razão ASC_{0-8} tecido/ ASC_{0-8} sangue.

3.7 Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -DTPA em animais com tumor de Ehrlich

O estudo com um radiofármaco inespecífico, como o ^{99m}Tc -DTPA, foi realizado com o intuito de comprovar a especificidade do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelo tumor. Os resultados dos estudos de biodistribuição mostraram que o ^{99m}Tc -DTPA teve captação significativamente menor no tumor, quando comparado ao complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ (Figura 51). Estes dados corroboram a idéia de que a ligação entre as células tumorais de Ehrlich e as moléculas do peptídeo bombesina radiomarcado ocorrem de maneira específica.

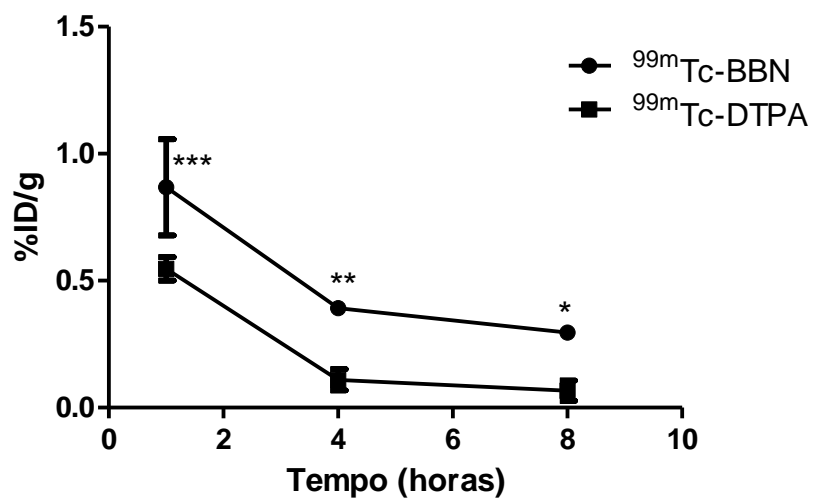


Figura 51. Captação dos complexos ^{99m}Tc -DTPA e ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ (^{99m}Tc -BBN) no tecido tumoral. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

4 Conclusões

O complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, na forma livre, foi capaz de identificar o tumor de Ehrlich implantado em camundongos Swiss.

O complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ encapsulado em SpHL apresentou captação significativamente maior pelo tecido tumoral e elevada relação alvo/não alvo, em relação ao peptídeo livre.

Os nSpHL foram menos captados pelas células do tumor de Ehrlich, quando comparados com SpHL., mostrando a importância da pH-sensibilidade no direcionamento do radiotraçador para a região alvo (tumor).

O complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, livre ou encapsulado em SpHL, foi capaz de identificar o tumor de Ehrlich, sugerindo que este complexo pode ser utilizado para a identificação, por meio de imagens cintilográficas, deste tipo de tumor.

CAPÍTULO 4

Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado, em SpHL, utilizando modelo experimental de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231

Estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ livre e encapsulado, em SpHL, utilizando modelo experimental de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231

1 Introdução

O câncer é uma das maiores causas de morte na atualidade, portanto, têm-se buscado meios de diagnóstico precoce que irão favorecer a terapêutica aumentando a sobrevivência dos pacientes e, até, possibilitando a cura dos mesmos.

Sendo assim, muito se tem buscado para produção de novos agentes de diagnóstico em diversas áreas. Dentre elas, a medicina nuclear vem se tornando uma ferramenta poderosa para a detecção de diversas doenças, inclusive o câncer, pois enquanto as demais técnicas avaliam alterações anatômicas, a cintilografia é capaz de detectar alterações bioquímicas e fisiológicas no órgão estudado, e assim, identificar a doença em seu estágio inicial (CONTI *et al.*, 1996; THRALL; ZIESSMAN, 2003).

Tumores de mama apresentam maior expressão de receptores para o peptídeo bombesina. Gugger e Reubi (1999) demonstraram que 62% dos carcinomas de mama e 100% das metástases destes cânceres apresentaram maior expressão dos receptores para bombesina, confirmando a possibilidade da utilização de análogos destes peptídeos para fins de diagnóstico e terapia. Além disso, estes peptídeos podem ser encapsulados em lipossomas pH-sensíveis que irão favorecer seu direcionamento ao sítio alvo (tumor).

Neste contexto, este capítulo teve por finalidade estudar a capacidade do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, livre e encapsulado em lipossomas pH-sensíveis, em identificar células de tumor de mama humano da linhagem MDA-MB-231 implantados em camundongos NUDE.

2 Material e Métodos

2.1 Material

Os lípides dioleilfosfatidil etanolamina (DOPE), diestearoilfosfatidil etanolamina-polietilenoglicol 2000 (DSPE-mPEG₂₀₀₀), Hemisuccinato de colesterila (CHEMS) foram adquiridos da Lipoid (Alemanha).

O peptídeo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foi adquirido da GL BioChem (Shanghai/China).

O tecnécio-99m foi obtido de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (IPEN/Brasil).

DMEM, tripsina, solução antibiótica, soro fetal bovino foram adquiridas da Invitrogen (São Paulo/Brasil).

Demais reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo/Brasil).

Os camundongos C57Bl/6.Cg-Foxn1^{nu}/NTacUnib foram adquiridos do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB/UNICAMP) e foram mantidos em estantes com ar filtrado e controle de temperatura, sem restrição de água e ração.

Todos os experimentos realizados em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), nº protocolo: 34/2010 (ANEXO 1).

2.2 Cultivo das células de mama (MDA-MB-231)

As células MDA-MB-231 foram mantidas em meio de cultura DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e os antibióticos gentamicina (50 g/L), penicilina (500 U/mL) e estreptomicina (500 mg/mL) em frascos de cultura T-25 (25 cm²) em estufa úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. O meio de cultura foi substituído a cada 2 ou 3 dias. Os estoques celulares foram mantidos sob congelamento, em nitrogênio líquido, no meio de congelamento DMEM suplementado com 20% de SFB, 10% de DMSO e os antibióticos gentamicina (50 g/L), penicilina (500 U/mL) e estreptomicina (500 mg/mL) (ATCC, 2004).

2.3 Implante das células MDA-MB-231 em animais C57Bl/6.Cg-Foxn1^{nu}/NTacUnib (NUDE)

Para o implante do tumor utilizou-se metodologia descrita por Faintuch *et al.*, 2008, com algumas modificações. Inicialmente, retirou-se o meio de cultura da garrafa contendo as células MDA-MB-231 e adicionaram-se 2 mL de tripsina (tripsina 0,25%/ EDTA 1 mM), e a

garrafa foi mantida em estufa (37°C e atmosfera de 5% de CO₂) por 5 minutos, para promover o desligamento das células. Em seguida, acrescentaram-se 4 mL do meio de cultura suplementado na garrafa de cultivo para promover a inativação da tripsina. Todo o conteúdo da garrafa foi transferido para um tubo falcon de 15 mL, e centrifugado por 5 minutos a 1200 rpm. Logo após, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* de células em 500 µL de PBS. Por fim, foi determinada a concentração celular em câmara de Neubauer. Alíquotas de 1x10⁷ células em um volume de 50 µL foram inoculadas, subcutaneamente, na coxa direita dos animais NUDE. Os animais foram mantidos em ambiente asséptico, com controle de temperatura e ciclo de claro-escuro. Foi permitido o crescimento do tumor a um diâmetro não superior a 10 mm.

2.4 Estudo histopatológico do tumor

Ao final do experimento os animais foram sacrificados e necropsiados, fragmentos do tecido tumoral foram retirados para análise histopatológica. O material foi fixado em formalina* tamponada durante 24 horas e, posteriormente, processado para inclusão em parafina e embocado. Secções histológicas de 4 µm foram coradas com Hematoxilina-Eosina (HE) para avaliação morfológica.

Para avaliar o grau de neovascularização, os vasos sanguíneos foram definidos como estruturas com luz, com presença de hemácias em 5 campos (aumento 400X, ou seja: objetiva 40X e ocular 10X) da lâmina escolhidos ao acaso em cada grupo como descrito por Maeda *et. al.*, 1995.

* Formalina tamponada: aldeído fórmico (37- 40%) 100 mL; fosfato monossódico 4 g; fosfato bisódico 4,5 g; água destilada 900 mL.

2.5 Estudo de afinidade do complexo ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células MDA-MB-231

Para o estudo de afinidade foi utilizada metodologia descrita por Santos-Cuevas *et al.* (2009), com algumas modificações. Uma alíquota (1 mL) de meio de cultura D-MEM contendo 1x10⁶ células MDA-MB-231 foi incubada, em eppendorf, com aproximadamente 200.000 cpm de ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ (0,3 nmol de peptídeo total), em triplicata, a 37°C por 1 e 4 horas. Os eppendorfs foram centrifugados (10 minutos, 3000 x g), o sobrenadante foi recolhido. A atividade do *pellet* foi determinada em um contador gama. A radioatividade encontrada no *pellet* representa os peptídeos adsorvidos a superfície das células e os peptídeos internalizados. Uma alíquota com a atividade inicial foi retirada e

considerada com 100%, sendo assim, a captação do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ pelas células MDA-MB-231 foi calculado através da fórmula representada abaixo:

$$\% \text{ radioatividade captada} = (\text{cpm } \textit{pellet} / \text{cpm padrão}) \times 100$$

O *pellet* foi ressuspensionado com 1 mL de tampão ácido (0,2M de ácido acético e 0,5M de NaCl – pH 2,8) para a remoção do peptídeo adsorvido a superfície. Os eppendorfs foram novamente centrifugados. A radioatividade encontrada no *pellet* representa os peptídeos internalizados. Os resultados foram expressos como porcentagem da radioatividade total, considerando o nível de radioatividade apresentado pelos peptídeos adsorvidos mais o valor de radioatividade obtido para os peptídeos internalizados, como mostra a fórmula abaixo:

$$\% \text{ internalização} = \text{cpm internalizado} / \text{cpm adsorvido} + \text{cpm internalizado}$$

A ligação não específica do complexo peptídico $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ pelas células MDA-MB-231 também foi determinada para cada um dos tempos de incubação. Para tanto, a única alteração no protocolo do teste de afinidade foi a adição de 10 μmol do HYNIC- $\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, 15 minutos antes da adição de 0,3 nmol do $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$. Ou seja, foi utilizado excesso do peptídeo frio (não radiomarcado) para bloquear a ligação e a internalização do complexo peptídico $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ pelas células de tumor de mama. O restante do procedimento foi conduzido de forma idêntica à descrita anteriormente.

2.6 Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em animais NUDE com tumor de mama

Foram utilizados 10 camundongos fêmeas C57BL/6.Cg-Foxn1^{nu}/NTacUnib, pesando 15-20 g, com tumor implantado na coxa direita. Estes animais foram divididos em dois grupos onde cada animal recebeu, pela veia caudal, 3,7 MBq da solução contendo o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$. Após os tempos de 1 e 4 horas os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg) e, em seguida, submetidos à eutanásia. Órgãos e tecidos como: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, bexiga, tumor, músculo, osso, tireóide, pâncreas, pele, cérebro, intestino delgado e intestino grosso foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade, e os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) (de BARROS *et al.*, 2010).

Para os estudos com bloqueio do receptor para bombesina foram utilizados 6 camundongos fêmeas C57BL/6.Cg-Foxn1^{nu}/NTacUnib, pesando 15-20 g, com tumor implantado na coxa direita. Estes animais foram divididos em dois grupos de três animais cada grupo, e cada animal recebeu, pela veia caudal, a mesma dose do peptídeo radiomarcado citada acima e, de forma concomitante, foi administrado excesso do peptídeo frio (40 µg) para garantir o bloqueio dos receptores.

2.7 Imagens cintilográficas do complexo ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ em animais NUDE com tumor de mama

Em três animais C57BL/6.Cg-Foxn1^{nu}/NTacUnib fêmeas foram administrados, por via intravenosa, 37 MBq da solução de ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎. As imagens foram adquiridas nos tempos de 1 e 4 horas após a administração do complexo radiomarcado, os camundongos foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob a gama câmara (Nuclide™ TH 22, Mediso, Hungria). Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256. As análises quantitativas das imagens foram realizadas conforme descrito por Diniz *et al.* (2008). As imagens foram analisadas determinando-se a radioatividade nas regiões de interesse (ROIs) pelo delineamento ao redor da área alvo (tumor) e da área não-alvo (músculo contralateral).

2.8 Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎, encapsulado em SpHL, em animais NUDE com tumor de mama

Foram utilizados 10 camundongos fêmeas C57BL/6.Cg-Foxn1^{nu}/NTacUnib, pesando 15-20 g, com tumor implantado na coxa posterior direita. Estes animais foram divididos em dois grupos onde cada animal recebeu, pela veia caudal, 3,7 MBq da suspensão SpHL contendo o complexo ^{99m}Tc- HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎. Após os tempos de 1 e 4 horas os animais foram anestesiados com solução de Ketamina (80 mg/Kg) e Xylazina (15 mg/Kg) e, em seguida, submetidos à eutanásia. Órgãos e tecidos como: fígado, baço, rins, estômago, coração, pulmão, sangue, bexiga, tumor, músculo, osso, tireóide, pâncreas, pele, cérebro, intestino delgado e intestino grosso foram retirados, pesados e levados ao contador gama para determinação da radioatividade, e os resultados foram expressos em percentual da dose injetada por grama de tecido (%ID/g) (de BARROS *et al.*, 2011).

2.9 Imagens cintilográficas do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL, em animais NUDE com tumor de mama

Em três animais C57BL/6.Cg-Foxn1^{nu}/NTacUnib fêmeas foram administrados, por via intravenosa, 37 MBq da suspensão de SpHL contendo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$. As imagens foram adquiridas nos tempos de 1 e 4 horas após a administração do complexo radiomarcado, os camundongos foram anestesiados e mantidos em posição de decúbito ventral sob a gama câmara (Nuclide™ TH 22, Mediso, Hungria). Uma janela de 20% simétrica foi utilizada para um pico de energia de 140 KeV. As imagens (300.000 contagens) foram obtidas e armazenadas em uma matriz 256 x 256. As análises quantitativas das imagens foram realizadas conforme descrito por Diniz *et al.* (2008). As imagens foram analisadas determinando-se a radioatividade nas regiões de interesse (ROIs) pelo delineamento ao redor da área alvo (tumor) e da área não-alvo (músculo contralateral).

2.10 Análise estatística

Os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas foram comparados quantitativamente pelo teste t e/ou pelo teste de Tukey-Kramer utilizando o programa GraphPad Prism 5. Um nível de $p < 0,05$ foi aceito como estatisticamente significativo.

3 Resultados e discussão

3.1 Implante das células MDA-MB-231 em animais C57BL/6.Cg-Foxn1^{nu}/NTacUnib (NUDE) e estudo histopatológico do tumor

Os animais submetidos ao implante das células de MDA-MB-231 desenvolveram o tumor, em tamanho adequado, em 25 a 40 dias após a inoculação. Os estudos histológicos demonstraram características de tecido tumoral como presença de pleomorfismo nuclear e áreas de necrose, com pode ser observado na Figura 52.

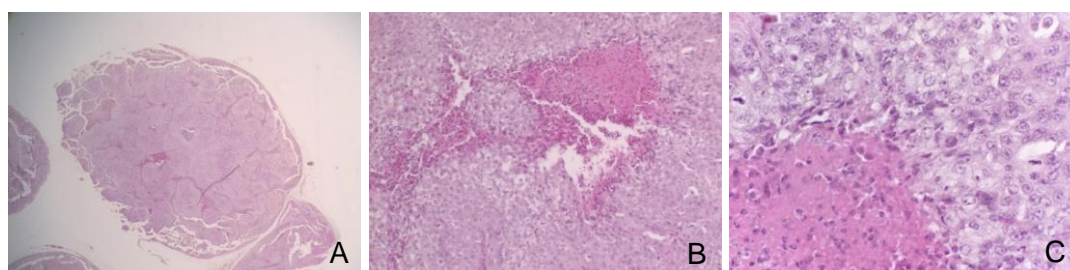


Figura 52. Cortes histológicos de tumor de mama (MDA-MB-231) corados pelo método HE. A – Visão geral do tumor (2x); B – Vacúolos aparentes e áreas de necrose (20x); C – Figuras de mitose, pleomorfismo evidente e áreas de necrose (60x).

A contagem dos vasos pelo método de coloração HE indicou a presença de vasos na periferia do tumor sugerindo neovascularização (Figura 53). O número médio de vasos por campo foi igual a 3,2. Conforme discutido no capítulo 3, a presença de vasos é essencial para a manutenção do tumor e pode ser uma via útil para direcionar substâncias com fins de diagnóstico ou terapia para este tecido (MUNN, 2003).

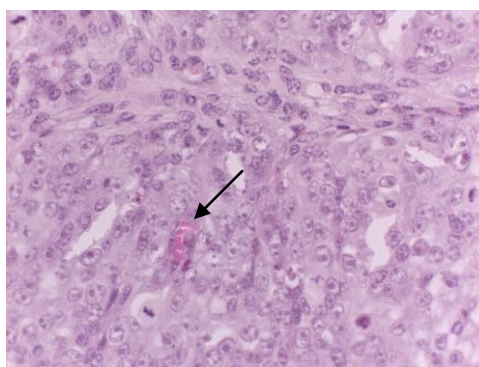


Figura 53. Imagem do tumor de mama (MDA-MB-231) corados pelo método HE. A seta representa o vaso presente no tecido tumoral.

3.2 Estudo de afinidade do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células de MDA-MB-231

Os resultados *in vitro* mostraram moderada captação do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células MDA-MB-231 nos tempos estudados, porém a captação foi

superior àquela observada para as células de tumor de Ehrlich (Figura 34). Quando foi utilizado excesso do ligante frio (HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎) observou-se acentuada redução da captação sugerindo que a ligação do radiofármaco com a célula MDA-MB-231 ocorre de maneira específica devido a presença de receptores no tecido tumoral (Figura 54). Como discutido no capítulo 3, os valores de percentual de ligação para diversos derivados do peptídeo bombesina encontram-se entre 4 e 7% (ZHANG *et al.*, 2004; MANSI *et al.*, 2009). Desta forma, o valor de percentual de ligação encontrado neste trabalho foi superior (9,8%) àqueles valores relatados pelos autores citados acima. Adicionalmente, Santos-Cuevas *et al.* (2009) utilizando um derivado de bombesina com características semelhantes ao análogo estudado neste trabalho, apresentaram valores de captação inferiores, especialmente para o tempo de incubação de 4 horas (4,2%), aos observados para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. Vale ressaltar que a ligação do complexo radiomarcado aos receptores presentes nas células MDA-MB-231 parece ser um processo tempo-dependente, visto que os valores de captação aumentaram significativamente com o aumento do tempo de incubação.

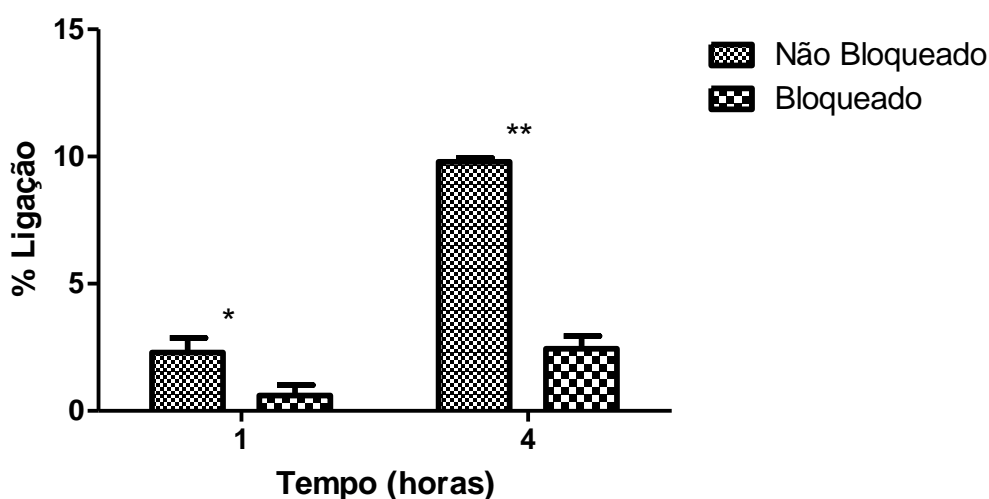


Figura 54. Captação do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células MDA-MB-231 com e sem bloqueio do receptor. * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$

A internalização do complexo foi avaliada e os resultados mostraram valores moderados entre 17 e 20% durante os tempos analisados. De maneira similar aos dados relatados para o percentual de ligação, os valores de internalização encontrados para as células MDA-MB-231 foram superiores àqueles obtidos para as células de tumor de Ehrlich. Ressalta-se ainda que, quando foi utilizado excesso do peptídeo frio observou-se uma redução estatisticamente significativa na internalização do radiotraçador (Figura 55) devido ao bloqueio dos receptores para o peptídeo liberador de gastrina. Os resultados obtidos são

superiores aos relatados por Santos-Cuevas *et al.* (2009), que utilizando um derivado de bombesina radiomarcado com tecnécio-99m obteve valores de internalização, pelas células MDA-MB-231, inferiores a 6%, inclusive em tempos de incubação maiores (24 horas) que os analisados neste estudo. A diferença observada para o percentual de internalização pode ser explicada pelos grupos espaçadores distintos utilizados na estrutura do peptídeo bombesina. É sabido que espaçadores apresentam papel relevante nas propriedades físico-químicas dos radiopeptídeos, podendo alterar seu comportamento em estudos *in vitro* e/ou *in vivo* (KARRA *et al.*, 1999; SMITH *et al.*, 2005; GARAYO *et al.*, 2007). Os dados obtidos neste trabalho sugerem que o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ pode ser utilizado para estudo *in vivo* de identificação deste tipo de tumor.

Faintuch *et al.* (2008) apresentaram resultados superiores aos encontrados neste trabalho, porém em células PC-3 (carcinoma de próstata). Este fato pode ser explicado, pois as células da linhagem PC-3 apresentam maior número de receptores para bombesina expressos na superfície de suas membranas quando comparado com as células MDA-MB-231 (HALMOS *et al.*, 1995; SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009).

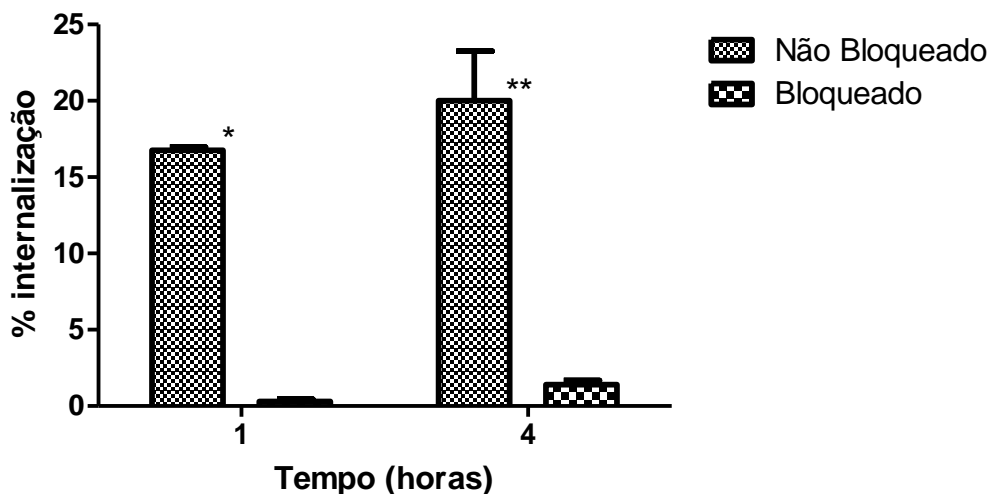


Figura 55. Internalização do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ pelas células MDA-MB-231, com e sem bloqueio do receptor. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$

3.3 Biodistribuição e imagens cintilográficas do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em animais NUDE com tumor de mama

Na Figura 56 estão apresentados os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição para o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$. O complexo radiomarcado mostrou perfil de biodistribuição semelhante àquele apresentado nos estudos utilizando animais com tumor de Ehrlich (Figura 36), ou seja, elevada eliminação renal e baixa captação no coração e no

sangue. O pâncreas e intestinos apresentaram maior captação que fígado e baço devido à presença de receptores para o peptídeo liberador de gastrina nestes órgãos (NOCK *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2003; SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009), sugerindo, mais uma vez, que o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ liga-se de maneira específica a estes tecidos.

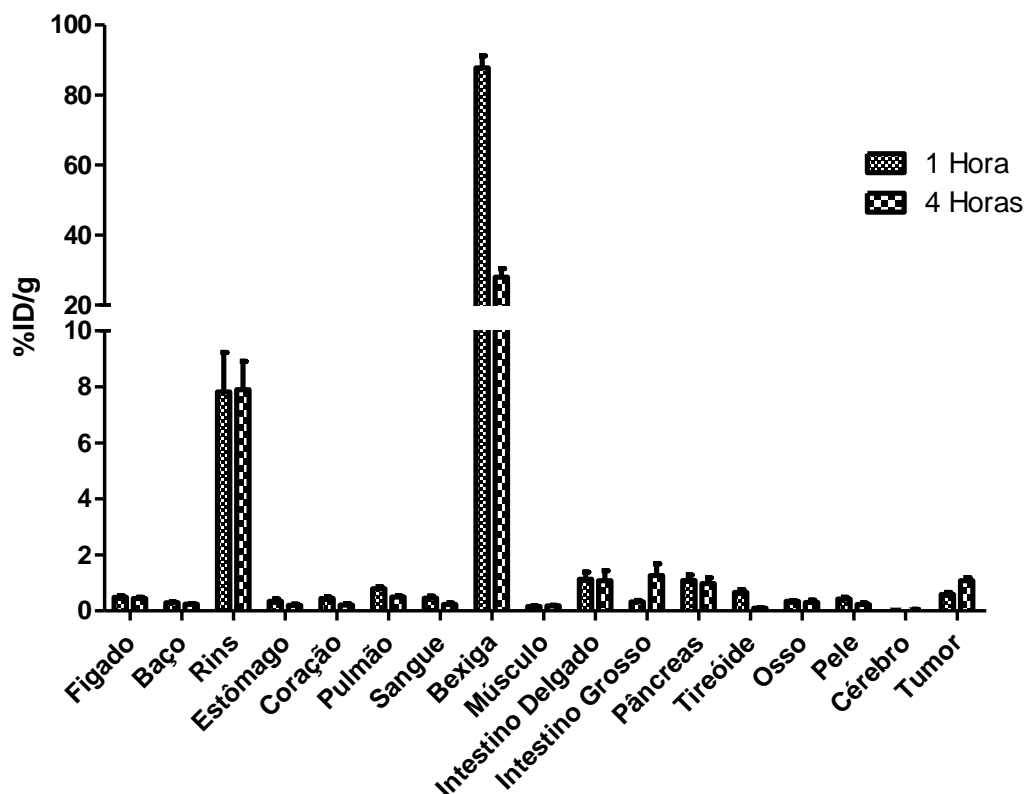


Figura 56. Biodistribuição do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ em camundongos NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado. (n=5)

No tempo de 1 hora após a administração do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, o percentual de captação do radiotraçador pelo tumor foi da ordem de 0,6%. Faintuch *et al.* (2008) encontraram um percentual de captação, utilizando o mesmo derivado de bombesina, igual a 3,0% pelo tumor de próstata (células PC-3), decorridos 90 minutos após a administração do radiofármaco. Conforme discutido anteriormente, este maior valor de captação tumoral pode ser justificado pela maior concentração de receptores para o peptídeo liberador de gastrina na linhagem de célula PC-3, quando comparada com a linhagem MDA-MB-231 (HALMOS *et al.*, 1995; SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009). Já Shi *et al.* (2008) descreveram um valor de aproximadamente 1,0% de captação do $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ pelo tumor de cólon (células HT-29), 1 hora após a injeção do radiopeptídeo. Portanto, os dados obtidos nesse trabalho estão em consonância com aqueles descritos na literatura. No tempo de 4 horas, a captação do $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ pelo tumor foi superior a 1,0%, sugerindo ligação do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$

as células MDA-MB-231 e, conseqüentemente, retenção do radiotraçador na região tumoral. Shi *et al.* (2008) encontraram um valor de aproximadamente 0,5% para a captação desse mesmo radiotraçador pelo tumor de cólon (HT-29). Cabe ressaltar que a captação do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ pelo tumor de mama, obtida nesse trabalho no tempo de 4 horas, foi da mesma ordem de grandeza que os valores de captação obtidos para pâncreas e intestino delgado, indicando, mais uma vez, ligação específica do complexo com os receptores presentes neste tecidos.

O cálculo das relações alvo/não alvo demonstrou alta afinidade do complexo radiomarcado para tumor, os valores das relações estão apresentados na Figura 57. Nos tempos de 4 horas as relações foram significativamente maiores, sugerindo que o complexo marcado ficou retido no tecido alvo, provavelmente pela ligação ao GRPr. Conforme observado nos estudos de biodistribuição, os valores de captação no tecido tumoral e no pâncreas foram bastante similares devida a presença de GRPr neste dois tecidos. Desta forma, os valores da relação tumor/pâncreas se mantiveram próximos a 1. Além disso, quando se realizou os estudos de bloqueio de receptor pela administração concomitante de excesso do peptídeo frio, observou-se uma redução significativa dos valores de captação tumoral. Estes dados foram confirmados pela drástica redução dos valores da relação tumor/músculo (Figura 58), sugerindo que a ligação entre o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ ocorre de maneira específica via receptor para bombesina. No tempo de 1 hora após administração do radiotraçador observou-se uma redução de 50,2% no valor da relação tumor/músculo quando comparado ao resultado obtido sem bloqueio do GRPr. Já no tempo de 4 horas esta redução foi acentuada atingindo o valor de 65,2%. Faintuch *et al.* (2008), também observou redução significativa na captação pelo tumor do complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, os dados apresentados mostraram que a atividade no tumor foi suprimida em 49% quando o bloqueio dos GRPr foi realizado.

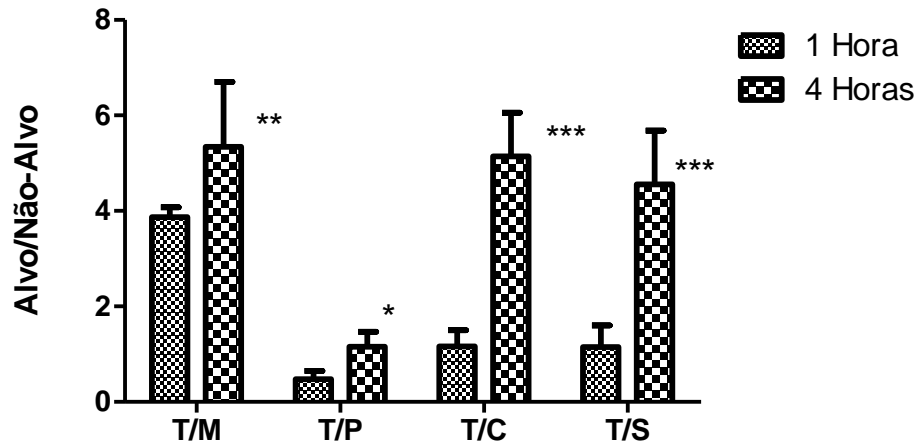


Figura 57. Relações tumor/não alvo para os estudos de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ em camundongos NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado. ($n=5$) T/M – Tumor/Músculo; T/P – Tumor/Pâncreas; T/S – Tumor/Sangue; T/C – Tumor/Coração. * $p<0,01$; ** $p<0,001$; *** $p<0,0001$.

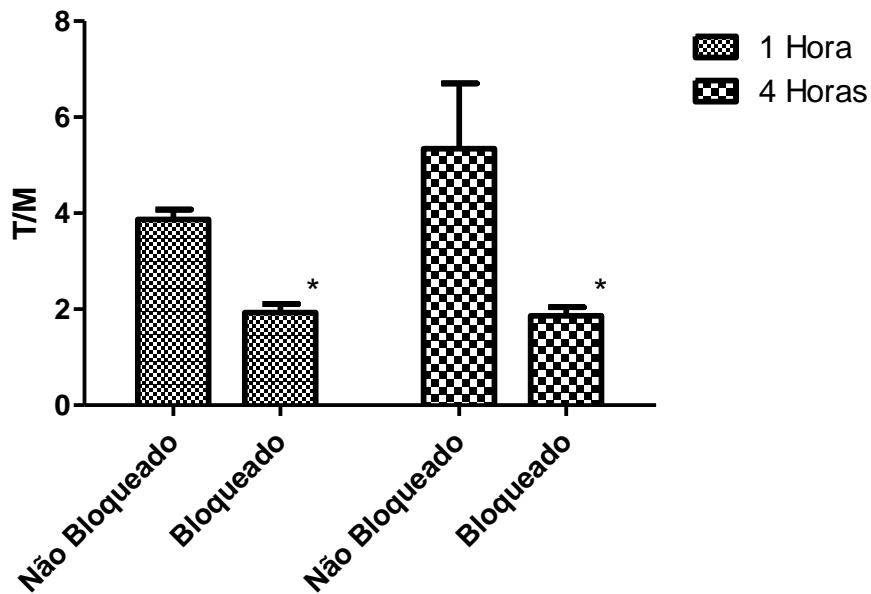


Figura 58. Relações Tumor/Músculo obtidas com e sem bloqueio do receptor para bombesina. ($n=3$). * $p<0,05$.

As imagens cintiligráficas obtidas (Figura 59) também apresentaram maior captação pelo tumor quando comparado ao músculo controle (pata contra lateral). Conforme discutido no capítulo 3, radiofármacos que apresentarem relação alvo/não alvo maior que 1,5 podem ser consideradas como potenciais agentes de diagnóstico (Phillips, 1999). Portanto, os resultados apresentados sugerem que o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ pode ser empregado para a identificação de tumor de mama da linhagem MDA-MB-231 e, provavelmente, para outras linhagens que também expressam receptores para este peptídeo.

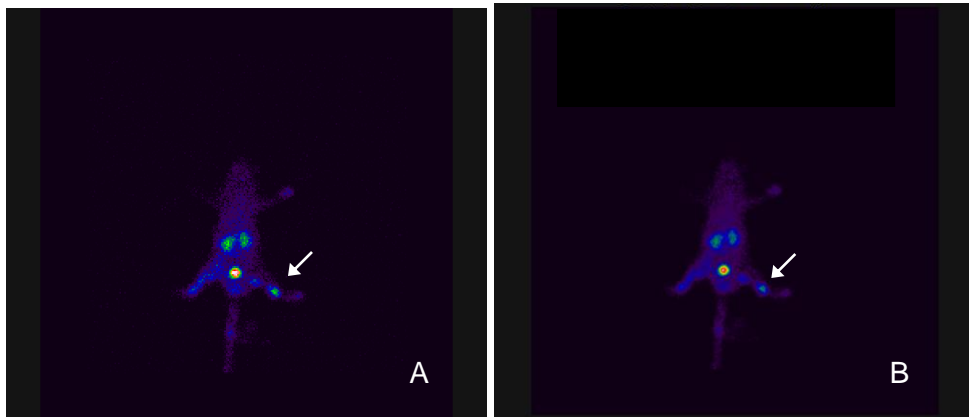


Figura 59. Imagens cintilográficas obtidas 1 e 4 horas após a administração do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ em animais com tumor mama (MDA-MB-231) implantado na pata posterior direita (seta). A – 1 hora; B – 4 horas.

3.4 Biodistribuição e imagens cintilográficas, em animais NUDE com tumor de mama, do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL

A Figura 60 apresenta os dados obtidos nos estudos de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ encapsulado em SpHL. Observa-se captação mais acentuada em órgãos com fígado e baço, quando comparado com os estudos utilizado o complexo livre. Estes dados são congruentes com os dados da literatura, pois lipossomas são normalmente, captados por células do sistema fagocitário mononuclear presente nestes órgãos (PHILLIPS, 1999; AWASTHI *et al.*, 2003; CARVALHO-JÚNIOR *et al.*, 2007).

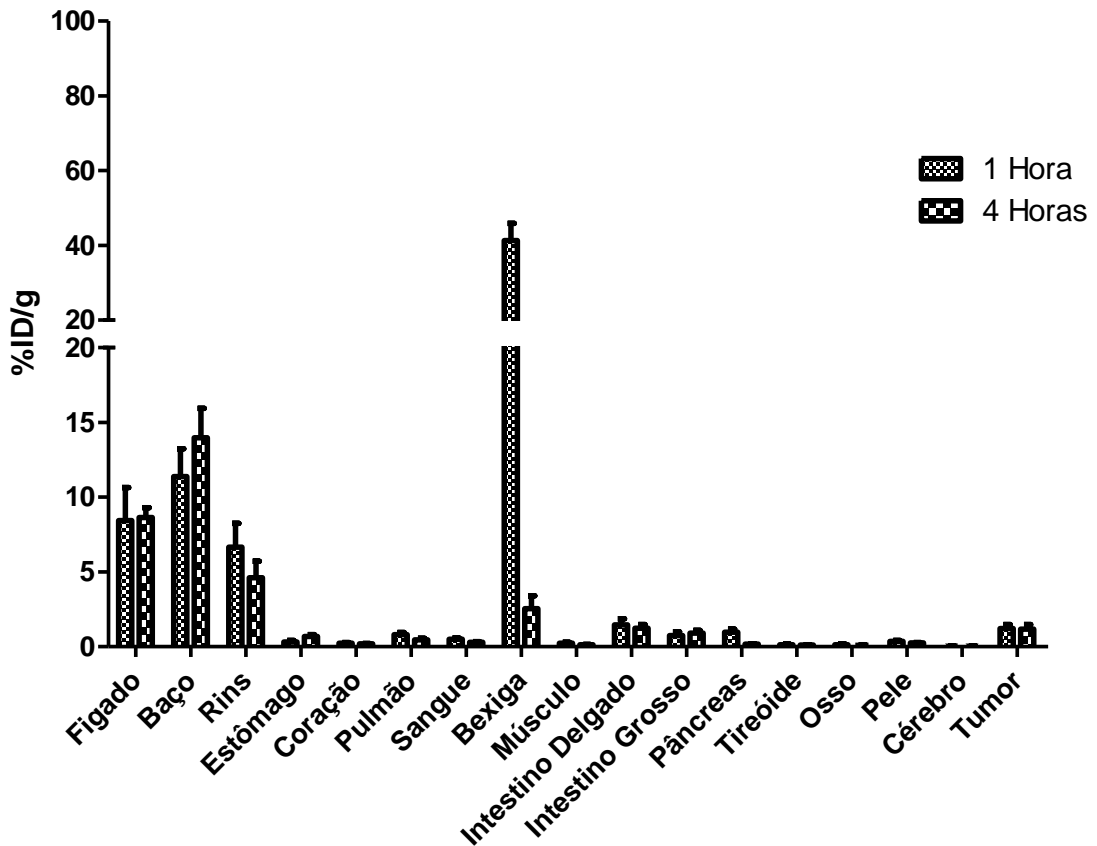


Figura 60. Biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL, em camundongos NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado. (n=5)

A figura 61 mostra os valores das relações alvo/não alvo obtidas após a administração do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ encapsulado em SpHL. Quando comparado com as relações tumor/músculo obtidas para o complexo livre, os valores obtidos com a preparação de lipossomas pH-sensíveis foi significativamente maior 4 horas após a administração do radiofármaco (Figura 62). Estes dados mostram a capacidade dos SpHL em direcionar o radiotraçador ao alvo em análise, possibilitando a obtenção de imagens de qualidade e, portanto, auxiliando no diagnóstico deste tipo de doença.

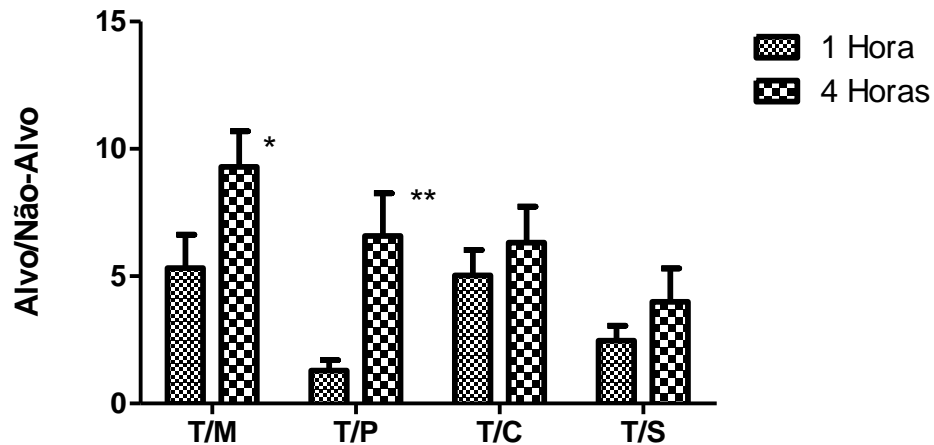


Figura 61. Relações tumor/não alvo para os estudos de biodistribuição do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, em SpHL, em camundongos NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado. (n=5) T/M – Tumor/Músculo; T/P – Tumor/Pâncreas; T/S – Tumor/Sangue; T/C – Tumor/Coração. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$

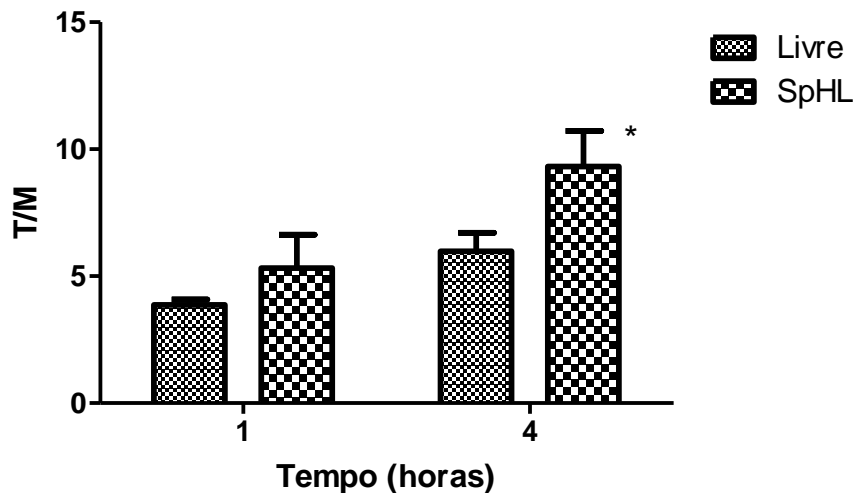


Figura 62. Relações tumor/músculo para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ livre e encapsulado em SpHL para estudos em animais NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado (n=5) * $p < 0,001$

Na Figura 63 é possível notar que a captação pelo pâncreas do complexo encapsulado em SpHL foi menor que a observada para o complexo livre no tempo de 4 horas, sugerindo, mais uma vez, que os SpHL foram capazes de direcionar o complexo radiomarcado para o tecido alvo (tumor).

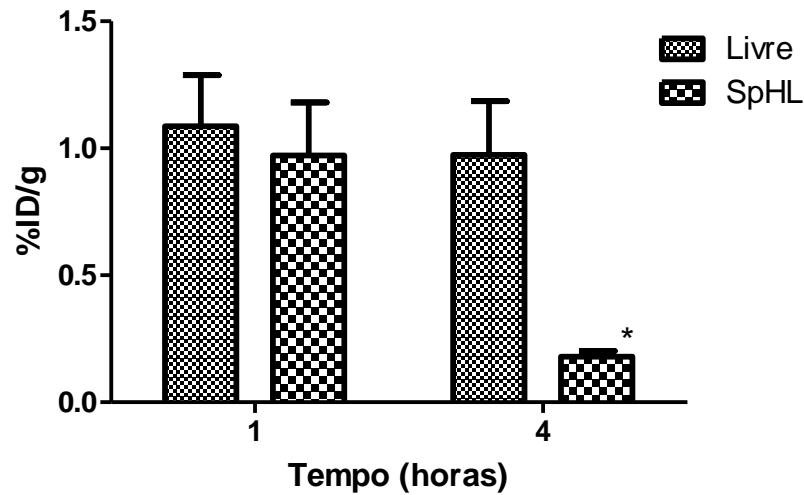


Figura 63. Valores de captação no pâncreas o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ livre e encapsulado em SpHL em animais NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado (n=5) * p<0,001.

As imagens cintilográficas obtidas (Figura 64) também apresentaram maior captação pelo tumor quando comparado ao músculo controle (pata contra lateral). A análise quantitativa das imagens possibilitou a obtenção da relação tumor/músculo e os valores obtidos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados com aqueles apresentados para os estudos de biodistribuição (Figura 65). As relações alvo/ não alvo obtidas foram próximas a 10, o que credencia o sistema nano-estruturado contendo o complexo radioativo como possível agente para a identificação tumores. Observa-se também pela imagem alta concentração de radioatividade na região abdominal, sugerindo a presença do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ encapsulado em SpHL no fígado e baço.

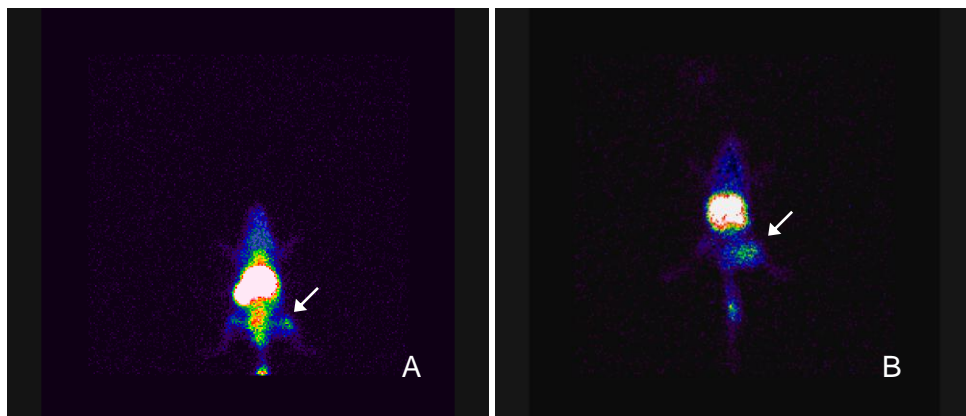


Figura 64. Imagens cintilográficas obtidas 1 e 4 horas após a administração do complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$, encapsulado em SpHL, em animais NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) implantado na pata posterior direita (seta). A – 1 hora; B – 4 horas.

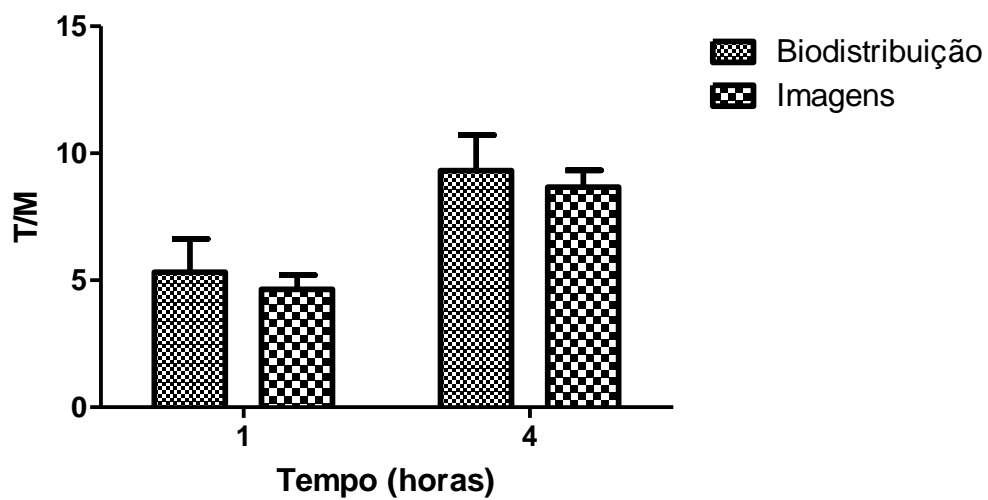


Figura 65. Relações tumor/músculo obtidas nos estudos de biodistribuição e nas imagens cintilográficas para o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ encapsulado em SpHL quando administrado em animais NUDE com tumor de mama (MDA-MB-231) (n=5).

4 Conclusões

O complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, na forma livre, foi capaz de identificar o tumor de mama (MDA-MB-231) implantado nos animais NUDE.

O complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ encapsulado em SpHL apresentou captação significativamente maior pelo tecido tumoral e elevada relação alvo/não alvo, quando comparado com o complexo livre.

As relações alvo/ não alvo obtidas nos experimentos realizados foram sempre superiores a 1,5, sugerindo que o complexo, livre ou encapsulado, em SpHL pode ser utilizado para a identificação do tumor MDA-MB-231

Conclusões integradas

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ apresenta características compatíveis para um agente de diagnóstico por imagem. As relações alvo/não alvo apresentadas pelo complexo livre ou encapsulado em SpHL foram sempre superiores a 1,5, mostrando a especificidade do radiotraçador tanto para as células de tumor de Ehrlich quanto para as células humanas de tumor de mama (MDA-MB-231). Assim, podemos concluir que o complexo poderia ser utilizado para auxiliar na identificação de tumores de mama da linhagem MDA-MB-231 e, provavelmente, para outros tipos de tumores que expressam os receptores para o peptídeo liberador de gastrina em sua superfície.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDLER, D. D.; WHAL, R. L. New methods for imaging the breast: techniques, findings and potential. **American Journal of Roentgenology**, v. 164, p.19-30, 1995.

AKTOLUN, C.; BAYHAN, H.; KIR, M. Clinical experience with Tc-99m MIBI imaging in patients with malignant tumors: preliminary results and comparison with T 1-201. **Clinical Nuclear Medicine**, v. 17, p. 171-176, 1992.

AMIR, E.; FREEDMAN, O. C.; SERUGA, B.; EVANS, D. G. Assessing Women at High Risk of Breast Cancer: A Review of Risk Assessment Models. **Journal of National Cancer Institute**, v. 102, p. 680-691, 2010.

ATCC – American Type Culture Collection: Product Information Sheet for CRL-1740. Manassas: ATCC, 2004.

AUTON, M. E. Secagem. In: **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005, cap. 26, p. 384-401.

AWASTHI, V.D.; GARCIA, D.; GOINS, B.A.; PHILLIPS, V. Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 253, p.121–132, 2003.

BAIDOO, K. E.; LIN, K. S.; ZHAN, Y.; FINLEY, P.; SCHEFFEL, U.; WAGNER, H. N. **Bioconjugate Chemistry**, v. 9, p. 218, 1998.

BAJO, A. M.; SCHALLY, A. V.; KRUPA, M.; HEBERT, F.; GROOT, K.; SZEPEHAZI, K. Bombesin antagonists inhibit growth of MDA-MB-435 estrogen-independent breast cancers and decrease the expression of the ErbB-2/HER-2 oncoprotein and c-jun and c-fos oncogenes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 6, p. 3836-3841, 2002.

BANERJEE, J. R.; MARESCA, K. P.; FRANCESCONI, L.; VALLIANT, J.; BABICH, J. W.; ZUBIETA, J. New directions in the coordination chemistry of ^{99m}Tc: a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 32, p. 1-20, 2005.

BANGHAM, A. D.; STANDISH, M. M.; WATKINS, J. C. Diffusion of univalent ions the lamellae os swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, p. 238-252, 1965.

BARTLETT, G.R. Phosphorus assay in column chromatography. **Journal of Biological Chemistry**, p. 466-468, 1959.

BATISTA, C. M.; CARVALHO, C. M. B.; MAGALHÃES, N. S. S. Lipossomas e suas aplicações terapêuticas: Estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 2, p. 167-179, 2007.

BELKACÉMI, Y.; TSOUTSOU, P.; MAGNÉ, N.; CASTADOT, P.; AZRIA, D. Metabolic functional imaging for tumor radiosensitivity monitoring. **Clinical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 62, p. 227-239, 2007.

BERGER, N.; SACHSE, A.; BENDER, J.; SCHUBERT, R.; BRANDL, M.; Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. **International Journal of Pharmaceutics**, n. 223, p. 175-186, 2001.

BISHOP, J. M. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, v. 64, p. 235-248, 1991.

BLOK, D.; FEITSMA, H. I. J.; KOOY, Y. M. C.; WELLING, M. M.; OSSENDORP, F.; VERMEIJ, P.; DRIJFHOUT, J. W. New chelation strategy allows for quick and clean ^{99m}Tc-labeling of synthetic peptides. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 31, p. 815-820, 2004.

BOUCLIER, C.; MARSAUD, V.; BAWA, O.; NICOLAS, V.; MOINE, L.; OPOLON, P.; RENOIR, J. M. Coadministration of nanosystems of short silencing RNAs targeting oestrogen receptor α and anti-oestrogen synergistically induces tumour growth inhibition in human breast cancer xenografts. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 122, p. 145-158, 2010.

BOS, J. L. Ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Research**, v. 49, p. 4682-4689, 1989.

BREEMAN, W. A.; JONG, M.; BERNARD, B.F.; KWEKKBOOM, D. F.; SRINIVASAN, A.; van der PLUIJIM, M. E.; HOFLAND, L. J.; VISSER, T. J.; KRENNING, E. P. **International Journal of Cancer**, v. 83, p. 657, 1999.

BREEMAN, W. A. P.; JONG, M.; ERION, J. L.; BUGAJ, J. E.; SRINIVASAN, A.; BERNARD, B. F.; KWEKKBOOM, D. J.; VISSER, T. J.; KRENNING, E. P. Preclinical comparison of ¹¹¹In-labeled DTPA- or DOTA-bombesin analogs for receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 43, n. 12, p. 1650-1656, 2002.

BROMBERG, N.; DREYFUSS, J. L., REGATIERI, G. B.; PALLADINO, M. V.; DURAN, N.; NADER, H. B.; HAUN, M.; JUSTO, G. Z. Growth inhibition and pro-apoptotic activity of violacein in Ehrlich ascites tumor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 186, p. 43-52, 2010.

CACELA, C.; HINCHA, D. K. Low amounts of sucrose are sufficient to depress the phase transition temperature of dry phosphatidylcholine, but not for lyoprotection of liposomes. **Biophysical Journal**, v. 90, p. 2831-2842, 2006.

CARVALHO-JÚNIOR, A. D.; MOTA, L. G.; NUMAN, E. A.; WAINSTEIN, A. J. A.; WAINSTEIN, A. P. D. L.; LEAL, A. S.; CARDOSO, V. N.; OLIVEIRA, M. C. Tissue distribution evaluation of stealth pH-sensitive liposomal cisplatin versus free cisplatin in ehrlich tumor-bearing mice. **Life Science**, v. 80, p. 659-664, 2007.

CASALS, E.; GALÁN, A. M.; ESCOLAR, G.; GALLARDO, M.; ESTELRICH, J. Physical stability of liposomes bearing hemostatic activity. **Chemistry and Physics of Lipids**, n. 125, p. 139-146, 2003.

CHEN, C.; HAN, D.; CAI, C.; TANG, X. An overview of liposome lyophilization and its future potential. **Journal of Controlled Release**, v. 142, p. 299-311, 2010.

CHO, K.; WANG, X.; NIE, S.; CHEN, Z.; SIN, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 1310–1316, 2008.

CHOW, C.; HEATH, T. D. Rapid diffusion of the lipid phosphorus of phosphatidylglycerol liposomes through polycarbonate membranes is caused by the oxidation of the unsaturated fatty acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1239, p. 168-176, 1995.

CHUA, T. C., YAO, P.; AKTHER, J.; MORRIS, D. L. Impact of Tumor Angiogenesis in Peritoneal Mesothelioma after Radical Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy **Pathology & Oncology Research**, v. 16, p. 217-222, 2010.

CONTI, P. S.; LILIEN, D. L.; HAWLEY, K.; KEPPLER, J.; GRAFTON, S. T.; BADING, J. R. PET and [¹⁸F]-FDG in oncology: A clinical uptake. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 23, p. 717-735, 1996.

de BARROS, A. L. B., MOTA, L. G.; FERREIRA, C. A.; OLIVERIA, M. C.; GÓES, A. M.; CARDOSO, V. N. Bombesin derivative radiolabeled with technetium-99m as agent for tumor identification. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, p. 6182-6184, 2010.

de BARROS, A. L. B.; MOTA, L. G.; SOARES, D. C. F.; COELHO, M. M. A.; OLIVEIRA, M. C.; CARDOSO, V. N. Tumor bombesin analog loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes as tool for tumor identification. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 7373-7375, 2011.

DESHPANDE, N.; PYSZ, M. A.; WILLMANN, J. K. Molecular ultrasound assessment of tumor angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 13, p. 175-188, 2010.

DEWANJEE, M. K. The chemistry of ^{99m}Tc-labeled radiopharmaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 20, n. 1, p. 5-27, 1990.

DINIZ, S. O. F.; REZENDE, C. M.; SERAKIDEDS, R.; FERREIRA, R. L.; RIBEIRO, T. G.; MARTIN-COMIN, J.; CARDOSO, V. N. Scintigraphic imaging using technetium-99m-labeled ceftizoxime in a experimental model of acute osteomyelitis in rats. **Nuclear Medicine Communications**, v. 29, p. 830-836, 2008.

DURKAN, K.; LAMBRECHT, F. Y.; UNAK, P. Radiolabeling of bombesin-like peptide with ^{99m}Tc: ^{99m}Tc-litorin and biodistribution in rats. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, p. 1516-1520, 2007.

ECKLEMAN, W. C.; REBA, R. C.; KELLOFF, G. J. Target imaging: an important biomarker for understanding diseases progression in the era of personalized medicine. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 748-759, 2008.

FAINTUCH, B. L.; TEODORO, R.; DUATTI, A.; MURAMOTO, E.; FAINTUCH, S.; SMITH, C. J. Radiolabeled bombesin analogs for prostate cancer diagnosis: preclinical studies. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 35, p. 401-411, 2008.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso: 20/03/2012.

FERRARI, M. Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature Reviews Cancer*. v. 5, p. 161–171, 2005.

FERREIRA, E.; SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; GOMES, M. G.; CASSALI, G. D. Ehrlich tumor as model to study artificial hyperthyroidism influence on breast cancer. **Pathology: Research and practice**, v. 203, p. 39-44, 2007.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. Emulsões, suspensões e dispersões. In: **Princípios físico-químicos em farmácia**. 3. ed. São Paulo: Editora Universidade de São Paulo, 2003, cap. 7, p. 345-411.

FONTES, A. P. S.; CESAR, E. T.; BERALDO, H. A química Inorgânica na terapia do câncer. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n. 6, p. 13-18, 2005.

FREZARD, F. Liposomes: from biophysics to the design of peptides vaccines. **Brazilian Journal of Biological Research**, n. 32, p. 181-189, 1999.

FREZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEDMICHELI, C. Lipossomas: Propriedade físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia “a base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.

GANDOMKAR, M.; NAJAFI, R.; SHAFIEI, M.; EBRAHIMI, S. E. S. Confirmation of hidrazone formation in HYNIC-peptide conjugate preparation, and its hydrolysis during labeling with ^{99m}Tc . **Applied Radiation and Isotopes**, v. 65, p. 805-808, 2007

GARAYOA, E. G.; RUEGG, D.; BLAUENSTEIN, P.; ZWIMPFER, M.; KAHN, I. U.; MAES, V.; BLANC, A.; BECK-SICKINGER, A. G.; TOUWÉ, SCHUBIGER, P. A. Chemical and biological characterization of new $\text{Re}(\text{CO})_3/^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ bombesin analogues. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 34, p. 17-28, 2007.

GHOSH, K.; THODETI, C. K.; DUDLEY, A. C.; MAMMOTO, A.; KLAGSBRUN, M.; INGBER, D. E. Tumor-derived endothelial cells exhibit aberrant Rho-mediated mechanosensing and abnormal angiogenesis in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 32, p. 11305-11310, 2008.

GOMES, N. M.; REZENDE, C. M.; FONTES, S. P.; HOVELL, A. M. C.; LANDGRAF, R. G.; MATHEUS, M. E.; PINTO, A. C.; FERNANDES, P. D. Antineoplastic activity of *Copaifera multijuga* oil and fractions against ascitic and solid Ehrlich tumor. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 179–184, 2008.

GRUNDKER, C.; FOST, C.; FISTER, S.; NOLTE, N.; GUNTHER, A. R.; EMONS, G. Gonadotropin-releasing hormone type II antagonist induces apoptosis in MCF-7 and triple-negative MDA-MB-231 human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Breast Cancer Research**, v. 12, p. 1-9, 2010.

GU, Y.; ZHANG, J.; MI, W.; YANG, J.; HAN, F.; LU, X.; YU, W. Silencing of GM3 synthesis suppresses lung metastasis of murine breast cancer cells. **Breast Cancer Research**, v. 10, p. 1-12, 2008.

GUGGER, M.; REUBI, J. C. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. **American Journal of Pathology**, v. 155, p. 2067-2076, 1999.

GULINO, P. M.; GRANTHAM, F. H.; SMITH, S. H.; HAGGERTY, A. C. Modification of the acid-basic status of the internal milieu of tumors. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 34, p. 857-869, 1967.

HALMOS, G.; WITTLIFF, J. L.; SCHALL, A. V. Characterization of Bombesin/Gastrin-releasing Peptide Receptors in Human Breast Cancer and Their Relationship to Steroid Receptor Expression. **Cancer Research**, v. 55, p. 280-287, 1995.

HASKELL, R. J.; SHIFFLETT, J. R.; ELZINGA, P. A. Particle size technologies for submicron emulsion. In: Benita, S. **Submicron Emulsions in Drug Targeting and Delivery**. [s. 1.]: Harwood academic publishers, p. 8-19, 1998.

HIRONAKA, F.; BUCHPIGUEL, C. A.; SAPIENZA, M. T. **Medicina Nuclear em Oncologia**. São Paulo: Atheneu, 2008, p. 188.

HISADA, K.; TONAMIN, N.; MIYAMAE, T. Clinical evaluation of tumor imaging with thallium-201 chloride. **Radiology**, v. 129, p. 497-500, 1978.

HOFFMAN, T. J.; GALI, H.; SMITH, J.; SIECKMAN, G. J.; HAYES, D. L.; OWEN, N. K.; VOLKERT, W. A. Novel series of ¹¹¹In-labeled bombesin analogs as potential radiopharmaceutical for specific targeting of gastrin-releasing peptide receptors expressed on human prostate cancer cells. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 44, n. 5, p. 823-831, 2003.

HOLLESTELLE, A.; ELSTRODT, F.; TIMMERMANS, M.; SIEUWERTS, A. M.; KLIJN, J. G. M.; FOEKENS, J. A.; BAKKER, M. A. D.; SCHUTTE, M. Four human breast cancer cell lines with biallelic inactivating a-catenin gene mutations. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 122, p. 125-133, 2010.

HONG, T. B.; RAHUMATULLAH, A.; YOGARAJAH, T.; AHMAD, M.; YIN, K. B. Potential Effects of Chrysin on MDA-MB-231 Cells. **International Journal Molecular Science**, v. 11, p. 1057-1069, 2010.

HONRADO, E.; BENÍTEZ, J.; PALACIOS, J. Histopathology of *BRCA1*- and *BRCA2*-associated breast cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 59, p. 27 -39, 2006.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em 20/03/2012

- JACKSON, A. B.; NANDA, P. K.; ROLD, T. L.; SIECKMAN, G. L.; SZLZODROSKI, A. F.; HOFFMAN, T. L.; CHEN, X.; SMITH, C. J. ^{64}Cu -NO₂A-RGD-Glu-6-Ahx-BBN(7-14)NH₂: a heterodimeric targeting vector for positron emission tomography imaging of prostate cancer. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 39, p. 377-387, 2012.
- JONES, A. G. Technetium in nuclear medicine. **Radiochimica Acta**, v. 70/71, p. 289-297, 1995.
- JUN, H. Y.; YIN, H. H.; KIM, S. H.; PARK, S. H.; KIM, H. S.; YOON, K. H. Visualization of Tumor Angiogenesis Using MR Imaging Contrast Agent Gd- DTPA-anti-VEGF Receptor 2 Antibody Conjugate in a Mouse Tumor Model. **Korean Journal of Radiology**, v. 11, n. 4, p. 449-456, 2010.
- JURISSON, S.; BERNING, D.; JIA, W.; DANGSHE, M. Coordination compounds in nuclear medicine. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 3, p. 1137-1156, 1993.
- KAO, C. H.; WANG, S. J.; LIU, T. J. The use of technetium-99m methoxyisobutylisonitrile breast scintigraphy to evaluate palpable breast masses. **European Journal of Nuclear Medicine**, v. 21, n. 5, p. 432-436, 1994.
- KARRA, S. R.; SCHIBLI, R.; GALI, H.; KATTI, K. V.; HOFFMAN, T. J.; HIGGINBOTHAM, C.; SIECKMAN, G. L.; VOLKERT, W. A. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ labeling and in vivo studies of a bombesin analogue with a novel water-soluble dithiophosphine-based bifunctional chelating agent. **Bioconjugate Chemistry**, v. v. 10, p. 254-260, 1999.
- KENNY, L. M.; ABOAGYE, E. O.; PRICE, P. M. Positron emission tomography imaging of cell proliferation in oncology. **Clinical Oncology**, v. 16, p. 176-185, 2004.
- KHAITAN, D.; SANKPAL, U. T.; WEKSLER, B.; MEISTER, E. A.; ROMERO, I. A.; COURAUD, P. O.; NINGARAJ, N. S. Role of *KCNMA1* gene in breast cancer invasion and metastasis to brain. **BMC Cancer**, v. 258, n. 9, p. 1-11, 2009.
- KING, R. C.; SURFRAZ, M. B.; BIAGINI, S. C. G.; BLOWER, P. J.; MATHER, S. J. How do HYNIC-conjugated peptides bind technetium? Insights from LC-MS and stability studies. **Dalton Transactions**, v. 1, p. 4998-5007, 2007.
- LANDHEER, M. L.; STEFFENS, M. G.; KLINKENBIJL, J. H.; WESTENBERG, A. H. Value of fluorodeoxyglucose positron emission tomography in women with breast cancer. **British Journal of Surgery**, v. 92, n. 11, p. 1363-1367, 2005.
- LANGER, M.; BECK-SICKINGER, A. G. Peptides as carrier for tumor diagnosis and treatment. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 1, p. 71-93, 2001.
- LAVERMAN, P. DAMS, E. T. M.; OYEN, W. J. G.; STORM, G.; KOENDERS, E. B.; PREVOST, R.; van der MEER, J. W. M.; CORSTENS, F. H. M.; BOERMAN, O. C. A novel method to label liposomes with $^{99\text{m}}\text{Tc}$ by the hydrazine nicotiny derivative. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 40, n. 1, p. 192-197, 1999.

LASIC, D. D. Novel application of liposomes. **Trends en Biotechnology**, v. 16, p. 307-321, 1998.

LEE, J. A.; KIM, K.; BAE, J. W.; JUNG, J. H.; AN, H.; LEE, U. S. Triple negative breast cancer in Korea-distinct biology with different impact of prognostic factors on survival. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 123, p.177–187, 2010.

LEE, Y. S., JEONG, J. M., KIM, Y. J., CHANG, Y. S., LEE, H. J., SON, M., LEE, J. W., YOON, H. S., KANG, W. J., LEE, D. S., CHUNG, J. K., LEE, M. C., SUH, Y.G. Development of acetylated HDD kit for preparation of ¹⁸⁸Re-HDD/lipiodol. **Applied Radiation Isotopes**. v. 65, p. 64-69, 2007.

LISTER-JAMES, J.; MOYER, B. R.; DEAN, R. T. Pharmacokinetic consideration in the development of peptide-based imaging agents. **Quarterly Journal of Nuclear Medicine**, v. 41, p. 111-118, 1997.

LITZINGER, D. C.; BUITING, A. M. J.; VAN ROOIJEN, N.; HUANG, L. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta Biomembranes**, v. 1190, p. 99–107, 1994.

LIU, S. Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin avb3-targeted radiotracers: Maximizing binding affinity via bivalency. **Bioconjugate Chemistry**. v. 20, p. 2199-2213, 2009.

LOW-BEER, B. V. A.; BELL, H. G.; MCCORKLE, H. J. Measurement of radioactive phosphorus in breast tumors in situ: a possible diagnostic procedure. **Radiology**, v. 47, p. 492-493, 1946.

MADARNAS, Y.; TRUDEAU, M.; FRANEK, J. A.; MCCREADY, D.; PRITCHARD, K. I.; MESSERSMITH, H. Adjuvant/neoadjuvant trastuzumab therapy in women with HER-2/neu-overexpressing breast cancer: A systematic review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, p. 539– 557, 2008.

MAEDA, K.; CHUNG, Y. S.; TAKATSUKA, S.; OGAWA, Y.; ONODA, N.; SAWADA, T.; KATO, Y.; NITTA, A.; ARIMOTO, Y.; KONDO, Y. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *British Journal of Cancer*. v. 72, p. 319-323, 1995.

MALVERN INSTRUMENTS. PCS theory. In: **Zetasizer theory manual**. Inglaterra, 1996a, p. 1.1-1.10.

MALVERN INSTRUMENTS. Zeta potential: Theory of operation. In: **Zetasizer theory manual**. Inglaterra, 1996b, p. 2.1-2.6.

MANKOFF, D. A. A definition of molecular imaging. **The Journal of Nuclear Medicine**. v. 48, p. 18N-21N, 2007.

MARKWALDER R.; REUBI, J. C. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. **Cancer Research**, v. 59, p. 1152-1159, 1999.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. **Radiologia Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 233-239, 2001.

MI, Z.; GUO, H.; WAI, P. Y.; GAO, C.; WEI, J.; KUO, P. C. Differential Osteopontin Expression in Phenotypically Distinct Subclones of Murine Breast Cancer Cells Mediates Metastatic Behavior. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46659–46667, 2004.

MI, Z.; OLIVER, T.; GUO, H.; GAO, C.; KUO, P. C. Thrombin-Cleaved COOH-Terminal Osteopontin Peptide Binds with Cyclophilin C to CD147 in Murine Breast Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 9, p. 4088-4097, 2007.

MIRANDA-OLVERA, A. D.; FERRO-FLORES, G.; PEDRAZA-LÓPEZ, M.; MURPHY, C. A.; LÉON-RODRÍGUEZ, L. M. Synthesis of oxytocin HYNIC derivatives as potential diagnosis agents for breast cancer. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, p. 1560-1567, 2007.

MIYAZAKI, M.; LAMHARZI, N.; SCHALLY, A. V.; HALMOS, G.; SZEPESHAZI, K.; GROOT, K.; CAI, R. Z. Inhibition of growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts in nude mice by bombesin /gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3940-II and RC-3095. **European Journal of Cancer**, v. 34, n. 5, p. 710-717, 1998.

MOHAMMED, A. R.; BRAMWELL, V. W.; COOBES, A. G. A.; PERRIE, Y. Lyophilisation and sterilization of liposomal vaccines to produce stable and sterile products. **Methods**, n. 40, p. 30-38, 2006.

MOHAMMED, A. R.; COOMBES, A. G. A.; PERRIE, Y. Amino acids as cryoprotectants for liposomal delivery systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 30, p. 406-413, 2007.

MOURIDSEN, H. T.; ROSE, C.; BRODIE, A. H.; SMITH, I. E. Challenges in the endocrine management of breast cancer. **The Breast**. S2-S19, 2003.

MUNN, I. I. Aberrant vascular architecture in tumors and its importance in drug-based therapies. **Drug Discovery today**. v. 8, n. 9, p. 396-403, 2003.

MUNNINK, T. H. O.; NAGENGAST, W. B.; BROUWERS, A. H.; SCHRODER, C. P.; HOSPERS, G. A.; LUB-DE HOOGE, M. N.; VAN DER WALL, E.; VAN DIEST, P. J.; DE VRIES, E. G. E. Molecular imaging of breast cancer. **The Breast**, S3, S66-S73, 2009.

NADERI, T.; BAHRAMPOOR, A. Determination of sensitivity and specificity of breast tumor diagnosis by primary health care providers (Behvarz) using clinical examination by obstetrician as a gold standard. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 29, n. 2, p. 59-62, 2003.

NEW, R. R. C. (Ed.) **Liposomes: a practical approach**. New York: IRL Press, 1990. 301 p.

NI, Y.; WANG, H.; CHEN, F.; LI, J.; DEKEYZER, F.; FENG, Y.; YU, J.; BOSMANS, H.; MARCHAL, G. Tumor models and specific contrast agents for small animal imaging in oncology. **Methods**, v. 48, p. 125–138, 2009.

NGUYEN, B. D.; ROARKE, M. C.; KARSTAEDT, P. J.; INGUI, C. J.; RAM, P. C. Practical Applications of Nuclear Medicine in Imaging Breast Cancer. **Current Problems in Diagnostic Radiology**, March/April, p. 68-83, 2009.

NOCK, B.; NIKOLOPOUPOU, A.; CHIOTELLIS, E.; LOUDOS, G.; MAINTAS, D.; REUBI, J. C.; MAINA, T. [^{99m}Tc]Domobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumour imaging. *European Journal of Nuclear Medicine*, v. 30, p. 247-258, 2003..

NOWOTNIK, D. P. Physico-chemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals. In: SAMPSON, C. B. **Textbook of radiopharmacy theory and practice**. v.3. Gordon and Breach Science Publishers S.A., 1990. Cap. 3, p. 53-72.

OKARVI, S. M.; AL-JAMMAZ, I. Synthesis, radiolabelling and biological characteristics of a bombesin peptidated analog as a tumor imaging agent. **Anticancer Research**, v. 23, p. 2745-2750, 2003.

OKARVI, S. M.; JAMMAZ, I. A. Preparation and evaluation of bombesin peptide derivatives as potential tumor imaging agents: effects of structure and composition of amino acid sequence on in vitro and in vivo characteristics. **Nuclear Medicine and Biology**, *in press*. 2012.

OLIVEIRA, M. C.; BOUTET, V.; FATTAL, E.; BOQUET, D.; GROGNET, J. M.; COUVREUR, P.; DEVERRE, C. Improvement of in vivo stability of phosphodiester oligonucleotide using anionic liposomes in mice. **Life Science**, v. 67, p. 1625-1637, 2000.

OLIVEIRA, M. C.; BOUTET, V.; FATTAL, E.; BOQUET, D.; KATO, Y.; SUGIYAMA, Y.; NISHIO, K.; MATSUMURA, Y.; KATAOKA, K. Novel cisplatin incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumor in mice. **Cancer Research**, v. 63, p. 8977-8983, 2003.

OLORIS, S. C. S.; DAGLI, M. L. Z.; GUERRA, J. L. Effect of β -carotene on the development of the solid Ehrlich tumor in mice. **Life Science**, v. 71, p. 717-724, 2002.

OWENS III, D. E.; PEPPAS, N. A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 93–102, 2006.

PAN, L.; HAN, Y.; SUN, X.; LIU, J.; GANG, H. FDG-PET and other imaging modalities for the evaluation of breast cancer recurrence and metastases: a meta-analysis. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 136, p.1007–1022, 2010.

PAPOUTSIS, A. J.; LAMORE, S. D.; WONDRAK, G. T.; SELMIN, O. I.; ROMAGNOLO, D. F. Resveratrol Prevents Epigenetic Silencing of BRCA-1 by the Aromatic Hydrocarbon Receptor in Human Breast Cancer Cells. **The Journal of Nutrition**. p. 1607-1614, 2010.

PATEL, O.; SHULKES, A.; BALDWIN, G. S. Gastrin-releasing peptide and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1766, p. 23-41, 2006.

PATRICK, G. L. AntiCancer Agents. In: **An introduction to medicinal chemistry**. 5. ed. New York: Oxford University Press, 2005. Cap. 18, p. 489-557.

PAUWELS, E. K. J.; RIBEIRO, M. J.; STOOT, J. H.; MCCREADY, V. R.; BOURGUIGNON, M.; MAZIERE, B. FDG accumulation and tumor biology. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 25, p. 317-322, 1998.

PAYNE, N. I.; TIMMINS, P.; AMBROSE, C. V.; WARD, M. D.; RIDGWAY, F. Proliposomes: a novel solution to an old problem. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 75, n. 4, p. 325-329, 1986.

PEREIRA, M. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; RAMALDES, G. A.; CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with ^{99m}Tc-Technetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 33, p. 42-51, 2008.

PETERSON, J. K.; HOUGHTON, P. J. Integrating pharmacology and in vivo cancer models in preclinical and clinical drug development. **European Journal of Cancer**. v. 40, p. 837-844, 2004.

PETERSON, S. M.; ISKENDERIAN, A.; COOK, L.; ROMASHKO, A.; TOBIN, K.; JONES, M.; NORTON, A.; GOMEZ-YAFAL, A.; HEARTLEIN, M. W.; CONCINO, M. F.; LIAW, L.; MARTINI, P. G. V. Human Sulfatase 2 inhibits in vivo tumor growth of MDA-MB-231 human breast cancer xenografts. **BMC Cancer**, v. 427, n. 10, p. 1-11., 2010.

PHILLIPS, W.T. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. **Advanced drug delivery reviews**, v. 37, p. 13-32, 1999.

RAMACHANDRAN, S.; QIST, A. P.; KUMAR, S.; LAL, R. Cisplatin nanoliposomes for cancer therapy: AFM and fluorescence imaging of cisplatin encapsulation, stability, cellular uptake and toxicity. **Langmuir**, n. 22, p. 8156-8162, 2006.

RAMBALDI, P. F.; MANSI, L.; PROCACCINI, E. Breast cancer detection with Tc-99m Tetrofosmin. **Clinical Nuclear Medicine**, v. 20, p. 703-705, 1995.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Mecanismos celulares: proliferação celular e apoptose. In: **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap. 5, p. 77-89.

REXHEPAJ, E.; BRENNAN, D.J.; HOLLOWAY, P.; KAY, E. W.; MCCANN, A. H.; LANDBERG, G.; DUFFY, M. J.; JIRSTROM, K.; GALLAGHER, W. M. Novel image analysis approach for quantifying expression of nuclear proteins assessed by immunohistochemistry: application to measurement of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 10, n. 5, p. 1 – 10, 2008.

RIAZ, M.; ELSTRODT, F.; HOLLESTELLE, A.; DEHGHAN, A.; KLIJN, J. G. M.; SCHUTTE, M. Low-risk susceptibility alleles in 40 human breast cancer cell lines. **BMC Cancer**, v. 236, n. 9, p. 1-10, 2009.

RICKER, J. V.; TSVETKOVA, N. M.; WOLKERS, W. F.; LEIDY, C.; TABLIN, F.; LONGO, M.; CROWE, J. H. Trehalose maintains phase separation in an air-dried binary lipid mixture. **Biophysical Journal**, v. 84, p. 3045-3051, 2003.

ROBBINS; COTRAN. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7. ed. Editora Elsevier, 2006. 848 p.

ROSS, J. S.; SLODKOWSKA, E. A.; SYMMANS, W. F. PUSZTAI, L.; RAVDIN, P. M.; HORTOBAGYI, G. N. The HER-2 Receptor and Breast Cancer: Ten Years of Targeted Anti-HER-2 Therapy and Personalized Medicine. **The Oncologist**. v. 14, p. 320–368, 2009.

RUOZI, B.; TOSI, G.; FORNI, F.; FRESTA, M.; VANDELLI, M. A. Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 25, p. 81-89, 2005.

RYAN, Q.; IBRAHIM, Q.; COHEN, M. H.; JOHNSON, J.; KO, C. W.; SRIDHARA, R.; JUSTICE, R.; PAZDUR, R. FDA Drug Approval Summary: Lapatinib in Combination with Capecitabine for Previously Treated Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER-2. **The Oncologist**. v. 13, p. 1114–1119, 2008.

SAHA, G. B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. 4.ed. New York: Springer-Verlag, 1998. 358 p.

SAHOO, S. K.; LABHASETWAR, V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 24, p. 1112-1120, 2003.

SANTOS-CUEVAS, C. L.; FERRO-FLORES, G.; MERPHY, C. A.; RAMÍREZ, F. M.; LUNA-GUTIÉRREZ, M. A.; PEDRAZA-LOPEZ, M.; GÁRCIA-BECERA, R.; ORDAZ-ROSADO, D. Design, preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation of ^{99m}Tc-N₂S₂-Tat(49-57)-bombesin: A target-specific hybrid radiopharmaceutical. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 375, p. 75-83, 2009.

SCHOTTELIUS, M.; WESTER, H. Molecular imaging targeting peptide receptors. **Methods**, v. 48, p. 161–177, 2009.

SCHMIDT, G. P.; BAUR-MELNYK, A.; HAUG, A.; HEINEMANN, V. Comprehensive imaging of tumor recurrence in breast cancer patients using whole-body MRI at 1.5 and 3 T compared to FDG-PET–CT. **European Journal of Radiology**, v. 65, n. 1, p. 47–58, 2008.

SCOPINARO, F.; VARVARIGOU, A. D.; USSOF, W.; VINCENTIS, G.; SOURLINGAS, T. G.; EVANGELATOS, G. P.; DATSTERIS, J.; ARCHIMANDRITIS, S. C. Technetium labeled bombesin-like peptide: Preliminary report on breast cancer uptake in patients. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v. 17, n. 3, p. 327-335, 2002.

SCOPINARO, F.; VINCENTIS, G.; VARVARIGOU, A. D.; LAURENTI, C.; LORI, F.; REMEDIANI, S.; CHIARINI, S.; STELLA, S. ^{99m}Tc -bombesin detects prostate cancer and invasion of pelvic lymph nodes. **European Journal of Nuclear Medicine Imaging**, v. 30, n. 10, p. 1378-1382, 2003.

SEGURA, J. A.; BARBERO, L.; G.; MARQUEZ, J. Ehrlich ascites tumor imbalances splenic cell populations and reduces responsiveness of T cells to Staphylococcus aureus enterotoxin B stimulation. **Immunology Letters**, v. 74, p. 111-115, 2000.

SHI, H.; GU, Y.; YANG, J.; XU, L.; MI, W.; YU, W. Lipocalin 2 promotes lung metastasis of murine breast cancer cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 27, n. 83, p. 1-9, 2008.

SIEGEL, D. P. Inverted micellar intermediates and the transitions between lamellar, cubic and inverted hexagonal lipid phases-II. Implications for membrane-membrane interactions and membrane fusion. **Biophysical Journal**, v. 49, p. 1171-1183, 1986.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; FERREIRA, E.; MORAES, J. R. C.; OCARINO, N. M.; CASSALI, G. D. Efeito do hipertireoidismo no tumor de Ehrlich sólido em camundongos fêmeas castradas e não castradas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 48, n. 6, p. 867-874, 2004.

SIMÕES, S.; MOREIRA, J. N.; FONSECA, C.; DÜZGÜNES, N.; LIMA, M. C. P. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 947-965, 2004.

SMITH, C. J.; GALI, H.; SIECKMAN, G. L.; HIGGINBOTHAM, C.; VOLKERT, W. A.; HOFFMAN, T. J. Radiochemical investigation of ^{99m}Tc -N3S-X-BBN[7-14]NH₂: An in vitro/in vivo structure-activity relationship study where X = 0-, 3-, 5-, 8- and 11-carbon tethering moieties. **Bioconjugate Chemistry**, v. 14, p. 93-102, 2003.

SMITH, C. J.; WOLKERT, W. A.; HOFFMAN, T. J. Radiolabeled peptide conjugates for targeting of the bombesin receptor superfamily subtypes. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 32, p. 733-740, 2005.

SMYTH, D. R.; TSORPELAS, C. An improved ^{99m}Tc -aprotinin kit formulation: quality control analysis of radiotracer stability and cold kit shelf life. **Nuclear Medicine Biology**, v. 32, p. 885-889, 2005.

STALTERI, M. A.; BANSAL, S.; HIDER, R.; MATHER, S. J. Comparison of the Stability of Technetium-Labeled Peptides to Challenge with Cysteine. **Bioconjugate Chemistry**, v. 10, p. 130-136, 1999.

STUBBS, M.; Mc SHEEHY, P. M. J.; GRIFFITHS, R. Causes and consequences of acidic pH in tumors: a magnetic resonance study. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 39, n. 1, p. 13-30, 1999.

SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C. Liposome as pharmaceutical dosage forms. In: DEKKER, M. **Encyclopedia of pharmaceutical Technology**. v. 9. New York, 1994, cap. 1, p. 1-39.

TACHIBANA, R.; HARASHIMA, H.; AZUMANO, M.; NIWA, M.; FUTAKI, S.; KIWADA, H. Intracellular regulation of macromolecules using pH-sensitive liposomes and nuclear localization signal: qualitative and quantitative evaluation of intracellular trafficking. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 251, p. 538-544, 1998.

TAILLEFER, R. The Role of ^{99m}Tc-Sestamibi and Other Conventional Radiopharmaceuticals in Breast Cancer Diagnosis. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. XXIX, n. 1, p. 16-40, 2009.

TALMADGE, J. E.; SINGH, R. K.; FIDLER, I. J.; RAZ, A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793-804, 2007.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. **Medicina Nuclear**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p. 408.

THAKUR, M.; LENTLE, B. C. Report of a summit on molecular imaging. **Radiology**, v. 236, p. 753-755, 2005.

ULRICH, A. S. Biophysical aspects of using liposomes as delivery vehicles. **Bioscience Reports**, v. 22, n. 2, p. 129-150, 2002.

VALACHIS, A.; MAURI, D.; POLYZOS, N. P.; MAVROUDIS, D.; GEORGOULIAS, V.; CASAZZA, G. Fulvestrant in the treatment of advanced breast cancer: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. v. 73, p. 220–227, 2010.

VAN WINDEN, E. C. A.; ZHANG, W.; CROMMELIN, D. J. A. Effect of freezing rate on the stability of liposomes during freeze-drying and rehydration. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 9, p. 1151-1160, 1997.

VARGARIGOU, A.; BOUZUIOTIS, P.; ZIKOS, C.; SCOPINARO, F.; VINCENTIS, G. Gastrin-releasing peptid (GRP) analogues for cancer imaging. **Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals**, v. 19, n. 2, p. 219-229, 2004.

VEMURI, S.; RHODES, C. T. Development and characterization of liposomes as therapeutic delivery system: a review. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, n. 70, p. 95-111, 1995.

VENKITARAMAN, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**. v. 108, p. 171-182, 2002.

VERBRIDGE, S. S.; CHOI, N. W.; ZHENG, Y.; BROOKS, D.J.; STROOCK, A.D.; FISCHBACH, C. Oxygen-Controlled Three-Dimensional Cultures to Analyze Tumor Angiogenesis. **Tissue Engineering**. v. 16, n. 7, p. 2133- 2141, 2010.

VIRREY, J. J.; DONG, D.; STILES, C.; PATTERSON, J. B.; PEN, L.; NI, M.; SCHONTHAL, A. H.; CHEN, T. C.;HOFMAN, F. M.; LEE, A. S. Stress Chaperone GRP78/BiP Confers

Chemoresistance to Tumor-Associated Endothelial Cells. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 8, p. 1268- 1275, 2008.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008, p. 864.

WEINER, R. E.; THAKUR, M. L. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 57, p. 749-763, 2002.

WELLING, M. M.; VISENTINI, R.; FEITSMA, H. J. J.; LUPETTI, A.; PAUWELS, E. K. J.; NIBBERING, P. H. Infection detection in mice using ^{99m}Tc -labeled HYNIC and N_2S_2 chelate conjugated to the antimicrobial peptide UBI 29-41. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 31, n. 4, p. 503-509, 2004.

WIEBER, A.; SELZER, T.; KREUTER, J. Physico-chemical characterisation of cationic DOTAP liposomes as drug delivery system for a hydrophilic decapeptide before and after freeze-drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 80, p. 358-367, 2012.

WILSON, J.H.; ELLEDGE, S. J. BRCA2 Enters the Fray. **Science**. v. 297, p. 1822-1823, 2002.

WOODKE, M. C. et al. Sterically stabilized liposomes: reduction in electrophoretic mobility but not electrostatic surface potential. **Biophysycal Journal**, v. 61, p. 902-910, 1992.

WHO - World Health Organization, **Wolrd Cancer Report**, International Agency of Research on Cancer. Lyon, 2009

YANG, D. J.; KIM, C.; SCHECHTER, N. R.; AZHDARINIA, A.; YU, D.; OH, C., BRYANT, J. L.; WON, J.; KIM, E. E.; PODOLOFF, D. A. Imaging with ^{99m}Tc -ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents. **Radiology**, p. 465-473, 2003.

YANG, D.; ZHU, J.; ZHENG, Y.; GE, L. Preparation, characterization, pharmacokinetics of sterically stabilized nimodipine-containing liposomes. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 32, p. 219-227, 2006.

YUAN, F.; DELLIAN, M.; FUKUMURA, D.; LEUNIG, M.; BERK, D.A.; TORCHILIN, V. P.; JAIN, R. Vascular Permeability in a Human Tumor Xenograft: Molecular Size Dependence and Cutoff Size. **Cancer Research**. v. 55, p. 3752-3756, 1995.

ZHANG, H.; SCHUHMACHER, J.; WASER, B.; WILD, D.; EISENHUT, M.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. DOTA-PESIN, a DOTA-conjugated bombesin derivative designed for the imaging and targeted radionuclide treatment of bombesin receptor-positive tumors. **European Journal of Nuclear Medicine Imaging**, v. 34, p. 1198-1208, 2007.

ZHANG, K.; ARUVA, M. R.; SHANTHLY, N.; CARDI, C. A.; RATTAN, S.; PATEL, C.; KIM, C.; McCUE, P. A.; WICKSTROM, E.; THAKUR, M. L. PET imaging of VPAC1 expression in experimental and spontaneous prostate cancer. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, n. 1, p. 112-121, 2008.

ZHANG, X.; CAI, W.; CAO, F.; SCHREIBMANN, E.; WU, Y.; WU, J. C.; XING, L.; CHEN, X.
¹⁸F-labeled bombesin analogs for targeting GRP receptor-expressing prostate cancer.
Journal of Nuclear Medicine, v. 47, n. 3, p. 492-501, 2006.

ANEXOS E APÊNDICES

Anexo A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 34/2010**, relativo ao projeto intitulado "*Emprego do complexo 99MTC-HYNIC-BOMBESINA livre e encapsulado em lipossomas PH-sensíveis para identificação de tumores em modelo experimental*", que tem como responsável(is) **Valbert Nascimento Cardoso**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/ 04/2010**.

Este certificado expira-se em **28/ 04/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 34/2010**, related to the project entitled "*Utilization of 99MTC-HYNIC-BOMBESIN free and trapped in stealth liposomes to identify tumours in experimental model*", under the supervisors of **Valbert Nascimento Cardoso**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 28, 2010**.

This certificate expires in **April 28, 2015**.

Belo Horizonte, 3 de Maio de 2010.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br