Monick Junho do Amaral Evangelista

Avaliação de radiofármacos com [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ e (^{18}F)FAZA na determinação de hipóxia em células e tumores de melanoma murino B16F10

São Paulo

2013

Monick Junho do Amaral Evangelista

Avaliação de radiofármacos com [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ e (^{18}F)FAZA na determinação de hipóxia em células e tumores de melanoma murino B16F10

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa de: Oncologia

Orientador: Dr. Carlos Alberto Buchpiguel

São Paulo

2013

Aos meus avós Antônio (*in memoriam*) e Claurinda, e Álvaro (*in memoriam*) e Ádir (*in memoriam*) pois sei que estão felizes e orgulhosos junto a mim, onde quer que estejam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos tantos caminhos tortuosos e inesperados que me fizeram chegar até aqui, e me encontrar na Radiofarmácia.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel, pelo voto de confiança, apoio e orientação durante o programa de mestrado.

Ao Dr. Fabio L. N. Marques, meu supervisor, pelos ensinamentos, incentivos, e até mesmo pelos puxões de orelha, que me ensinaram muito mais do que a teoria. E por sua imensa paciência comigo.

À Carolina Portela Luz, companheira de experimentos, pela amizade e a perseverança junto à mim.

À Josy e Marluce, pelo imenso carinho que sempre tiveram comigo, pelo auxílio durante os experimentos com animais, manutenção do laboratório, e mais importante: por sua amizade.

À Maria Aparecida e André, pelo companheirismo e manutenção dos animais.

À Camila M. L. Machado, pela amizade, ensinamentos, e auxílio em diversos ensaios.

À Silvana Prando, pela amizade, auxílio na aquisição das imagens e por me ensinar a processá-las.

À Daniela de Paula Faria, pela amizade e auxílio na aquisição de imagens e discussão dos diversos resultados.

À Miriam Roseli Okamoto e Kátia dos Anjos, pela amizade e suporte administrativo.

Ao Dr. Roger Chammas e todos do LIM 24, em especial Rodrigo Aguiar e Rafael, pela amizade, prestatividade, e por me ensinar e acompanhar nos primeiros ensaios de hipóxia.

Ao Dr. Sérgio Paulo Bydlowski e todos do LIM 31, em especial à Débora Levy, Jorge Ruiz e Andrea Turbuck Celestino, pela prestatividade e amizade.

Ao Dr. José Eduardo Krieger e todos do LIM 13, em especial à Juliana pela prestatividade e amizade.

À minha mãe, e irmã por me apoiarem sempre e me ajudarem durante essa trajetória, me dando força mesmo quando tudo parecia desmoronar.

Ao meu pai, que mesmo longe me dá a força, amor e suporte que eu preciso para prosseguir, e por ter me ensinado a batalhar sempre com a cabeça erguida.

Ao meu namorado, Hermes, por sua imensa paciência e carinho em momentos críticos, seu apoio e incentivo.

Ao meu padrasto, José Francisco e seus filhos, Raul e Angela, pela acolhida num momento tão complicado e por seu carinho comigo.

A todos da minha família que se preocuparam, apoiaram e incentivaram, em especial minha prima Priscilla.

Ao pessoal do terceiro andar, pela amizade e os momentos de descontração: Marcinha, Alyne, Danilo, Júlia, Bruno, Josefina e tantas outras pessoas que passaram e/ou estão no Centro de Medicina Nuclear.

Ao pessoal da Engenharia do InRad: apesar dos contratempos, sem o trabalho de vocês eu não teria terminado esse trabalho.

Aos biomédicos da clínica, que me forneceram tecnécio-99m sempre que possível.

À Rose, Maria José e Sônia, que sempre deram seu melhor na Secretaria de Pós-Graduação para uma orientação adequada.

Aos meus amigos pessoais, pela compreensão e apoio. E, que, mesmo há mais de 1.000 km de distância, se preocupam e me apoiam. Brigada Karina, Aline, e todas as “gurias” de Campo Grande. Brigada, também, à Elizandra, que mesmo pertinho quase não a vejo, mas sua amizade e conselhos são sempre bem-vindos e muito importantes.

A todos que me ajudaram de alguma forma na realização desse trabalho.

A CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro (Projeto 2010/14342-2 e Projeto de Auxílio 2011/10565-0).

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: é também uma criança que confronta os fenômenos naturais que o impressionam como faziam os contos de fada."

Marie Slodowska-Curie

RESUMO

Evangelista, M. J. A. Avaliação de radiofármacos com [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ e (^{18}F)FAZA na determinação de hipóxia em células e tumores de melanoma murino B16F10 [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

A baixa oxigenação (hipóxia) altera drasticamente o metabolismo celular e a forma de produção de ATP, que em tumores pode estimular e permitir que as células desenvolvam mecanismos de escape, adaptação e resistência, contribuindo não só para um comportamento maligno e agressivo, mas também lhes conferindo resistência a tratamentos quimioterapêuticos e radioterapêuticos. A detecção de regiões de hipóxia em tumores pode ser realizada com diferentes radiofármacos. Neste trabalho preparamos e avaliamos o comportamento dos radiofármacos (^{18}F)FAZA e [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em células de melanoma murino B16F10, correlacionando dados bioquímicos e histopatológicos com a captação celular dos radiofármacos *in vitro* e com imagens em equipamento PET/SPECT/CT obtidas de camundongos C57Bl6 implantados com tumores. O (^{18}F)FAZA foi obtido em rendimento de 17,9 % e pureza radioquímica de 86,72 %, enquanto que o rendimento e pureza radioquímica do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ foi superior a 95 %, sendo que este complexo se liga à proteínas plasmáticas com taxa de aproximadamente 40 % e o complexo é desestabilizados pela mesmas, após 4 horas de incubação a 37 ^{o}C. O complexo também não é estável na presença de cisteína e histidina. A captação *in vitro* do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ nas células foi da ordem de 0,1 % independente da condição e do tempo, enquanto que a captação de (^{18}F)FAZA atingiu 0,9 % sob hipóxia e 0,2 % sob normóxia, nos primeiros 15 minutos de

estudo. A biodistribuição ex vivo em camundongos apresentou taxa de captação por grama de tumor e razão tumor/sangue da ordem de 0,04 % e 1,49 para o [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ e de 0,34 % e 1,39 para o (^{18}F)FAZA, em tempo de 1 hora. Imagem obtidas de camundongos, mostraram intensa captação da (^{18}F)FDG no tumor, e tanto (^{18}F)FAZA quanto [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ foram capazes de evidenciar regiões de hipóxia ou necrose, respectivamente, nos tumores, ainda que com baixa taxa de captação. Imagens autorradiográficas do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ nos tumores excisados dos animais apresentaram distribuição homogênea no tumor, com algumas áreas de captação sugeridas como necróticas; tomando a autorradiografia como referência, o [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ não se concentrou na córtex renal, região reconhecidamente hipóxica. Assim, (^{18}F)FAZA e [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ puderam ser preparados em nosso laboratório com qualidade suficiente para uso em pesquisa e demonstram potencial para utilização em novos estudos visando a detecção de regiões de hipóxia ou necrose, respectivamente.

Descritores: 1.Compostos radiofarmacêuticos 2.Neoplasias 3.Hipóxia celular 4.Melanoma B16 5.Tecnécio/uso diagnóstico 6.Ácido glucárico 7.Radioisotopos de flúor 8.Camundongos endogâmicos C57BL 9.Tomografia por emissão de pósitrons e tomografia computadorizada 10.Tomografia computadorizada de emissão de fóton único

ABSTRACT

Evangelista, M. J. A. Evaluation of radiopharmaceuticals with [[^{99m}Tc]glucarate]$^{-}$ and (^{18}F)FAZA on determination of hypoxia in B16F10 murine melanoma cells and tumors [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

The low oxygen concentration, also named hypoxia, drastically alters cellular metabolism and the production form of ATP which, in tumors, can stimulate and allow cells to develop mechanisms for escape, adaptation and resistance, contributing not only to malignant and aggressive behavior, but also their conferring resistance to chemotherapeutic and radiotherapeutic treatments. The detection of regions of hypoxia in tumors can be performed using different radiopharmaceuticals. In this work we prepared and evaluated the behavior of radiopharmaceuticals (^{18}F)FAZA and [[^{99m}Tc]glucarate]$^{-}$ in B16F10 murine melanoma cells, biochemical and histopathological data correlating it with the radiopharmaceutical cellular uptake, both in vitro or by PET/SPECT/CT imaging obtained from C57Bl6 mice implanted with tumors. The (^{18}F)FAZA was obtained in radiochemical yield of 17.8 % and radiochemical purity of 86.72 %, while the radiochemical yield and purity for [[^{99m}Tc]glucarate] - was higher to 95 %, and this complex binds to the plasma proteins at concentration of 40 %, however a the complex is unstable in presence of albumine after 4 hours, at 37 ^{o}C. The complex is unstable in the presence of cysteine and histidine, at 37 ^{o}C. The in vitro uptake of [[^{99m}Tc]glucarate]$^{-}$ in B16F10 cells was approximately 0.1% independently of experimental conditions, while (^{18}F)FAZA reached 0.9%, under hypoxia, and 0.2%, under normoxia, the first 15 minutes of the study. The ex vivo biodistribution in mice showed uptake in tumor and tumor/blood ratio of the 0.04 % and 1.49 for [[^{99m}Tc]glucarate]$^{-}$ and 0.34 % and 1.39 for (^{18}F)FAZA.

Imaging obtained from mice showed intense uptake of (^{18}F)FDG in the tumor, and both (^{18}F)FAZA and [[^{99m}Tc]glucarate]$^{-}$ were able to show hypoxia or necrotic regions in the tumor. Autoradiographic imaging showed homogeneous distribution of [[^{99m}Tc]glucarate]$^{-}$ in the slices of tumor excised from animals; taking kidney autoradiography as a reference, the [[^{99m}Tc]glucarate]$^{-}$ was not concentrated in renal cortex, a region admittedly hypoxic. In conclusion (^{18}F)FAZA and [[^{99m}Tc]glucarate]$^{-}$ could be prepared in our laboratory with sufficient quality for use in research and demonstrate potential for use in future studies aiming to detect regions of hypoxia and necrosis, respectively.

Descriptors: 1. Radiopharcaceuticals 2.Neoplasms 3.Cell hypoxia 4.B16 Melanoma 5.Technetium 99m 6.Glucaric acid 7. Fluorine radioisotopes 8.Mice, Inbred C57BL 9.Positron-Emission Tomography and Computed Tomography 10.Tomography, Emission-Computed, Single-Photon

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Três possíveis rotas de catabolismo do piruvato formado a partir da glicólise. (Nelson & Cox, 2004) 3

Figura 2: Mecanismos de regulação do HIF-1α sob condições aeróbias e hipóxicas. (Giaccia, Siim, & Johnson, 2003) 5

Figura 3: Representação esquemática do papeldo acúmulo hipóxia-induzido do HIF-1α em cânceres humanos. (Vaupel & Harrison, 2004)..... 6

Figura 4: Efeito de condições aeróbicas e de hipóxia sobre o acúmulo celular do radiotraçador em função do tempo: a) gluconato; b) glucarato; c) pertecnetato; e d) DTPA. Aerobiose ● e hipóxia □. Cada ponto é a média mais ou menos um desvio padrão de quatro determinações. (James R. Ballinger, 1993) 10

Figura 5. Câmara de hipóxia Billups-Rothenberg, e manômetro, indicando o volume dos gases utilizados – 19 L/min de N_2 e 1 L/min de CO_2..... 27

Figura 6: Esquema da distribuição das células em placa utilizada para a marcação com os anticorpos e posterior citometria (B = B16F10; M = MDA-mb-468). **Roxo –** poços somente com células; **Azul –** poços com células marcadas somente com isotipo; e **Verde –** poços com células marcadas com anti-Glut1. 30

Figura 7: A) Lote 1 – Pastilha bem hidratada; **B)** Lote 2 – Pastilha retraída. .. 38

Figura 8: Radiocromatograma do complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ analisado por CCD nos suportes: **(A)** ITLC-SG/água; **(B)** Whatman1/acetona; **(C)** ITLC-SG/colução fisiológica; **(D)** ITLC-SG/água. 40

Figura 9: Radiocromatograma do complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ analisado por CCD nos sistemas **(A)** Sistema papel Whatman 1/acetona; **(B)** Sistema ITLC-SG/água; e **(C)** Sistema papel Whatman 3MM/água. 41

Figura 10: Eletroforese em suporte de papel Whatman 3 e tampão Tris (pH = 8,6), com uma voltagem de 275 V por 1 hora. **Azul escuro –** Na[^{99m}Tc]O_4^-; **Vermelho –** complexo [[^{99m}Tc](cys)]; **Verde oliva –** complexo [[^{99m}Tc](his)]; **Roxo –** complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$.....43

Figura 11: Eletroforese em suporte de papel Whatman 3 e tampão Tris (pH = 8,6), com uma voltagem de 275 V por 1 hora. **Verde claro –** complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ incubado a 25 ºC; **Roxo –** complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ incubado a 37 ºC; **Azul claro –** complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ incubado com cisteína; **Laranja –** complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ incubado com histidina. 45

Figura 12: O índice do gráfico refere-se ao percentual de contagens por minuto (cpm); cada cor indica um dos tempos utilizado na avaliação. **Azul –** 5 minutos; **Vermelho –** 45 minutos; **Verde –** 120 minutos; **Roxo –** 240 minutos. Nos sistemas: **1)** Whatman 1/acetona; **2)** ITLC-SG/água; **3)** ITLC-SG/solução 1. .. 46

Figura 13: [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ incubado com soroalbumina humana. **Sistemas 1.** Whatman 1/acetona; **2.** ITLC-SG/água; e **3.** ITLC-SG/HSA/solução 1 (água:etanol:hidróxido de amônia - 5:2:1), nos tempos de 0, 1, 4, 6 e 24 horas. 49

Figura 14: [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ incubado sozinho a 37 ºC. **Sistemas 1.** Whatman 1/acetona; **2.** ITLC-SG/água; e **3.** ITLC-SG/HSA/solução 1(água:etanol:hidróxido de amônia - 5:2:1), nos tempos de 0, 1, 4, 6 e 24 horas. 51

Figura 15: Taxa de ligação do [[^{99m}Tc]-glucarato]$^-$ às proteínas determinado por precipitação das macromoléculas em etanol seguido de centrifugação. ● **–** precipitado da albumina; ▲ **–** precipitado do plasma. 53

Figura 16: Reação de síntese do (^{18}F)FAZA a partir de seu precursor. 53

Figura 17: Cromatogramas **(A)** (^{19}F)FAZA – Padrão não radioativo detetado por UV a 340 nm; **(B)** Produto para reação para obtenção do (^{18}F)FAZA detetado por UV a 340 nm; **(C)** Produto para reação para obtenção do (^{18}F)FAZA detetado pela emissão de radiação; **(D)** (^{18}F)fluoreto detetado pela emissão de radiação. 55

Figura 18: Cromatograma em UV a 340 nm do precursor AZA após etapa de hidrólise igual a realizada para a reação de fluoração do (^{18}F)FAZA. 56

Figura 19: Cromatogramas do produto de reação para obtenção do do (^{18}F)FAZA antes da fase de hidrólise. **(A)** Deteção por UV a 340 nm; **(B)** deteção por emissão de radiação. 58

Figura 20: Cromatograma em detetor de radiação do (^{18}F)FAZA após a purificação e evaporação da acetonitrila. 59

Figura 21: Gráfico demonstrando a linha de tendência traçada para o cálculo da atividade específica do (^{18}F)FAZA..... 60

Figura 22: Captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em B16F10. **Azul –** em hipóxia; **Vermelho –** em normóxia. 63

Figura 23: Captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em B16F10. **Azul –** em hipóxia com glicose; **Vermelho –** em normóxia; **Verde –** em hipóxia sem glicose; **Roxo –** em normóxia sem glicose..... 64

Figura 24: Captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em Tm1N3. **Azul claro –** em hipóxia com glicose; **Rosa –** em normóxia; **Verde claro –** em hipóxia sem glicose; **Lilás –** em normóxia sem glicose..... 65

Figura 25: Captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em B16F10 cultivada em meio de baixa glicose. **Azul escuro –** em hipóxia; **Laranja –** em normóxia; e em MDA-

mb-468 cultivada em meio de baixa glicose, **Verde oliva –** em hipóxia; **Amarelo –** em normóxia. 66

Figura 26: Captação do (^{18}F)FAZA em B16F10. **Azul.** em hipóxia; **Vermelho.** em normóxia..... 67

Figura 27: Dot plot com o perfil das células MDA-mb-468 (gate 2 – em azul), e histograma com o perfil do isotipo (em azul) e do anti-Glut1 (em preto), com dados de aquisição na tabela..... 68

Figura 28: Dot plot com o perfil das células B16F10, e histograma com o perfil do isotipo (em vermelho) e do anti-Glut1 (em preto), com dados de aquisição na tabela..... 69

Figura 29: Imagem γ- cintilográfica dinâmica de 2 horas do animal 1 (detetor 1 e 2) – quadro tardio. ImageJ. 71

Figura 30: Imagem γ-cilográfica dinâmica de 1 hora do animal 2. ImageJ..... 72

Figura 31: Imagem γ-cilográfica estática do animal 2, 3 horas p.i.. ImageJ. ... 72

Figura 32: SPECT/CT de animal com implante de células B16F10 e injetado com cerca de 148 MBq de [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$. Amide. 73

Figura 33: PEC/CT de animal com implante de células B16F10 e injetado com cerca de 74 MBq do (^{18}F)FAZA. Amide. 74

Figura 34: PEC/CT de animal com implante de células B16F10 e injetado com cerca de 37 MBq do (^{18}F)FDG. Amide. 75

Figura 35: SPECT/CT de animal com implante de células Tm1N3 e injetado com cerca de 148 MBq de [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$. Amide. 76

Figura 36: PEC/CT de animal com implante de células Tm1N3 e injetado com cerca de 74 MBq do (^{18}F)FAZA. Amide..... 77

Figura 37: Gráfico da biodistribuição do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. Dados fornecidos em % de dose por órgão. 79

Figura 38: Gráfico da biodistribuição do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. Dados fornecidos em % de dose injetada por grama de órgão. 80

Figura 39: Gráfico demonstrando as relações T/M e T/S ao longo do tempo de biodistribuição do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. A relação é estabelecida em % de dose por grama de órgão. 80

Figura 40: Gráfico da biodistribuição do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células Tm1N3. Dados fornecidos em % de dose por órgão. 81

Figura 41: Gráfico da biodistribuição do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células Tm1N3. Dados fornecidos em % de dose injetada por grama de órgão. 82

Figura 42: Gráfico demonstrando as relações T/M e T/S ao longo do tempo de biodistribuição do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células Tm1N3. A relação é estabelecida em % de dose por grama de órgão. 83

Figura 43: Gráfico da biodistribuição do (^{18}F)FAZA em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. Dados fornecidos em % de dose por órgão. 84

Figura 44: Gráfico da biodistribuição do (^{18}F)FAZA em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. Dados fornecidos em % de dose injetada por grama de órgão. 84

Figura 45: Gráfico demonstrando as relações T/M e T/S ao longo do tempo de biodistribuição do (^{18}F)FAZA em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. A relação é estabelecida em % de dose por grama de órgão. 85

Figura 46: Autorradiografia de tumores derivados de células B16F10 – **(A)** e **(B)**; tumor derivado de Tm1N3 – **(C)**; e rins – **(D)**, de animais injetados com o complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados bioquímicos de meio de cultura e meio de cultura contendo células de tumor murino B16F10 mantidas e condições de normóxia ou hipóxia. 62

Tabela 2: Dados bioquímicos de meio de cultura e meio de cultura contendo células de tumor murino B16F10 mantidas e condições de normóxia ou hipóxia. 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATV	Associação Tripsina/Versene
CMN	Centro de Medicina Nuclear
CT	Computed tomography – Tomografia computadorizada
Cys	Cisteína
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid – Ácido etilenodiamino tetra-acético
Gla	Glucarato
Gha	Glucoeptonato
Gnt	Gluconato
His	Histidina
HPLC	High-performance liquid chromatography – Cromatografia líquida de alta eficiência
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
ITLC-SG	Instant thin-layer chromatography-silica gel – Cromatografia em camada delgada instantânea por sílica gel
PBS	Phosphate buffered saline – Salina tamponada com fosfato
PET	Positron Emission Tomography – Tomografia por emissão de pósitrons
p.i.	*Post-injection*
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium (meio para cultura celular)

SAH	Saroalbumina humana
SFB	Soro fetal bovino
SPECT	Single-photon emission computed tomography – Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
TLC-SG	Thin-layer chromatography-silica gel – Cromatografia em camada delgada por sílica gel
$[[^{99m}Tc](OH)_2(mdp)_2]^{2-}$	$[[^{99m}Tc]$(metilenodifosfonato)]
^{18}FAZA	((^{18}F)fluoroazomicina arabinosideo)
^{18}FDG	((18F)fluordeoxiglicose)
^{18}FMISO	((^{18}F)fluoromisonidazol)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 01

1.1 – HIPÓXIA 02

1.2 – HIPÓXIA TUMORAL 04

1.3 – MÉTODOS DIAGNÓSTICOS (USO DE RADIOFÁRMACOS) 08

1.4 – MELANOMA 11

2. OBJETIVOS 08

2.1 – OBJETIVO GERAL 14

2.2. – OBJETIVOS ESPECÍFICOS 14

3. MÉTODOS 15

3.1 – OBTENÇÃO DE COMPLEXOS RADIOATIVOS DE [^{99M}TC]TECNÉCIO E CONTROLES DE QUALIDADE 16

3.1.1 – PREPARAÇÃO DE KIT LIOFILIZADO DE GLUCARATO 16

3.1.2 – PREPARAÇÃO DO COMPLEXO [[^{99M}TC]GLUCARATO]$^-$ E AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO 16

3.1.3 – DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (LOGP) 17

3.1.4 – PREPARAÇÃO DOS COMPLEXOS [[^{99M}TC](CISTEÍNA)]$^-$ E [[^{99M}TC](HISTIDINA)]$^-$ 17

3.1.5 – DETERMINAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DOS COMPLEXOS [[^{99M}TC]GLUCARATO]$^-$, [[^{99M}TC](CISTEÍNA)]$^-$, [[^{99M}TC](HISTIDINA)]$^-$ E DO [^{99M}TC]O_4^- 18

3.1.6 – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO COMPLEXO [[^{99M}TC]GLUCARATO]$^-$ FRENTE À CISTEÍNA E HISTIDINA DETERMINADA POR ELETROFORESE 19

3.1.7 – LIGAÇÃO EM PROTEÍNAS PLASMÁTICAS E EM ALBUMINA 19

3.2 – PREPARAÇÃO DO (^{18}F)FAZA 21

3.2.1 – DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MARCAÇÃO E PUREZA RADIOQUÍMICA 22

3.2.2 – PURIFICAÇÃO DO (^{18}F)FAZA 23

3.2.3 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DO (^{18}F)FAZA 24

3.3 – ESTUDOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* 24

3.3.1 – MANUTENÇÃO DE CÉLULAS B16F10 EM CULTURA 24

3.3.2 – MANUTENÇÃO DE CÉLULAS TM1N3 EM CULTURA 26

3.3.3 – VIABILIDADE POR TRIPAN BLUE 26

3.3.4 – DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM NORMÓXIA E HIPÓXIA 27

3.3.5 – CAPTAÇÃO DO [[^{99M}TC]GLUCARATO]$^{-}$ EM NORMÓXIA E HIPÓXIA 28

3.3.6 – CAPTAÇÃO DO (^{18}F)FAZA EM NORMÓXIA E HIPÓXIA 29

3.3.7 – CITOMETRIA 30

3.4 – ESTUDOS BIOLÓGICOS *IN VIVO* 32

3.4.1 – MODELO ANIMAL - IMPLANTAÇÃO DO TUMOR 32

3.4.2 – BIODISTRIBUIÇÃO POR IMAGEM 33

3.4.3 – BIODISTRIBUIÇÃO *EX VIVO* 34

3.4.4 – AUTORRADIOGRAFIA DOS TUMORES INJETADOS COM [[^{99M}TC]GLUCARATO]$^{-}$ 35

3.4.5 – ANÁLISE HISTOLÓGICA DOS CORTES 36

4 – RESULTADOS 37

4.1 – OBTENÇÃO DOS COMPLEXOS RADIOATIVOS 38

4.1.1 –PREPARAÇÃO DE KIT LIOFILIZADO DE GLUCARATO 38

4.1.2 – PREPARAÇÃO DO COMPLEXO [[^{99M}TC]GLUCARATO]$^{-}$ 39

4.1.3 – DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE PARTIÇÃO (LOGP) 41

4.1.4 – DETERMINAÇÃO DO PERFIL ELETROFORÉTICO DE COMPLEXOS DE [^{99M}TC]TECNÉCIO 41

4.1.5 – AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DO COMPLEXO [[^{99M}TC]GLUCARATO]$^{-}$ FRENTE À CISTEÍNA E HISTIDINA POR ELETROFORESE 43

4.1.6 – LIGAÇÃO A PROTEÍNAS PLASMÁTICAS E A ALBUMINA 45

4.2 – PREPARAÇÃO DO (^{18}F)FAZA 53

4.2.1 – PURIFICAÇÃO DO (^{18}F)FAZA 58

4.2.2 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DO (^{18}F)FAZA 60

4.3 – ESTUDOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* 61

4.3.1 – ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS NAS CULTURAS DE CÉLULAS EM NORMÓXIA E HIPÓXIA 61

4.3.2 – CAPTAÇÃO DO [[^{99M}TC]GLUCARATO]$^{-}$ EM NORMÓXIA E HIPÓXIA 62

4.3.3 – CAPTAÇÃO DO (^{18}F)FAZA EM NORMÓXIA E HIPÓXIA 67

4.3.4 – CITOMETRIA 68

4.4 – ESTUDOS BIOLÓGICOS *IN VIVO* 70

4.4.1 – BIODISTRIBUIÇÃO POR IMAGEM 70

4.4.2 – BIODISTRIBUIÇÃO *EX VIVO* 77

4.4.3 – AUTORRADIOGRAFIA DOS TUMORES INJETADOS COM [[^{99M}TC]GLUCARATO]$^{-}$ 85

5 – CONCLUSÕES 87

6 – ANEXO A 90

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 92

INTRODUÇÃO

1.1 – Hipóxia

A diminuição do fornecimento normal de oxigênio para um determinado tecido ou célula, chamado de hipóxia, pode ocorrer por diminuição do aporte sanguíneo (isquemia) ou por diminuição da taxa de transporte de oxigênio pelo sangue (devido a anemia ou ar rarefeito). [1] [2]

Durante uma situação de hipóxia, o piruvato formado ao final da glicólise não é oxidado para a formação da forma química acetil-CoA e dar sequência ao processo da respiração celular (ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa). Desta forma, a etapa fosforilação oxidativa, responsável pela maior parte de ATP (adenosina trifosfato) produzido, deixa de ocorrer e o processo de geração de ATP passa a depender exclusivamente da respiração anaeróbica (fermentação). Nesta segunda rota, o piruvato é reduzido a lactato através da enzima lactato dehidrogenase (figura 1), a qual fornece uma quantidade bem menor de ATP do que a fosforilação oxidativa. [3]

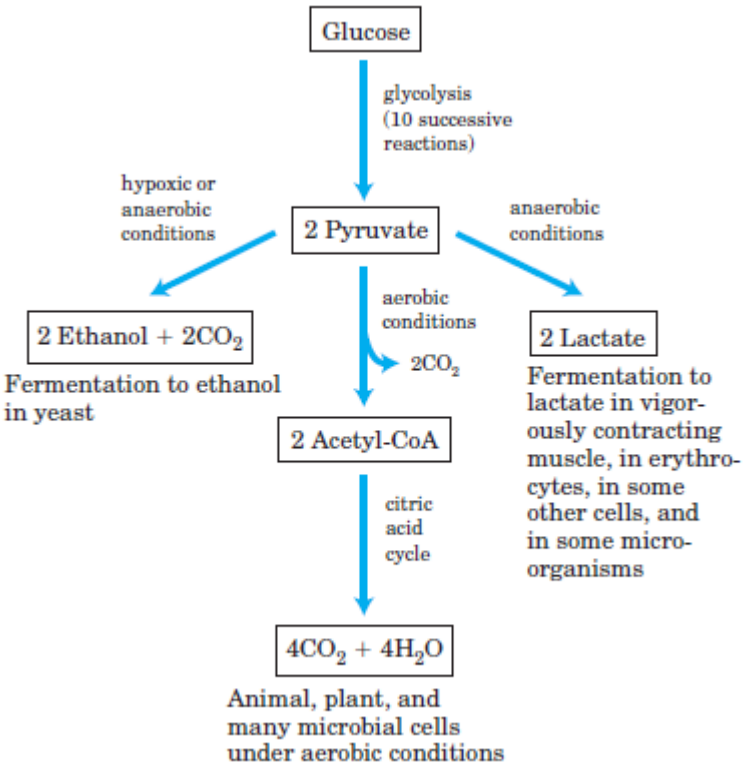


Figura 1: Três possíveis rotas de catabolismo do piruvato formado a partir da glicólise. [3]

O acúmulo de ácido láctico juntamente com a diminuição de ATP disponível, leva a diversas alterações intracelulares que podem culminar em morte celular. Essas alterações consistem em aumento dos níveis intracelulares de cálcio (Ca^{2+}), que leva à tumefação celular, depleção das reservas de glicogênio com acúmulo de ácido láctico e consequente diminuição do pH, redução da síntese de proteínas, e perda de contratilidade. Nesta fase, todos os danos são reversíveis com o restauro do aporte de oxigênio; no entanto, sua persistência pode levar à morte celular, seja por apoptose ou por necrose. [1] [3]

A necrose altera todo o sistema de membranas da célula, liberando as enzimas e radicais livres contidos nos lisossomos. O rompimento da membrana nuclear passa a expor o material genético da célula e outras proteínas ali

presentes, como as histonas. [1] [2]

1.2 – Hipóxia tumoral

No caso dos tumores, o estado de hipóxia é decorrente inicialmente de uma isquemia provocada pela quantidade insuficiente e ineficiente da rede de capilar para atender o tecido, diminuindo, assim, o fornecimento oxigênio às células. Desta forma, células mais distantes dependem exclusivamente da via anaeróbica para produção de ATP, e por isso consomem mais glicose do que células de um tecido sadio, tendo como produto final o ácido láctico. Algumas célula tumorais também aumentam a produção de enzimas glicolíticas, que podem estimular a via glicolítica. [3] [4]

Um dos responsáveis por esse estímulo é o Fator de Transcrição Induzido por Hipóxia 1 (HIF-1), ativado durante o estado de hipóxia e que contribui para o aumento dessas enzimas glicolíticas, além de outros mecanismos adaptativos. Esse fator é composto de duas unidades: uma unidade constitutivamente expressa intranuclear conhecida por HIF-1β (ou também por ARNT – aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), e uma unidade conhecida por HIF-1α localizada no citoplasma. Sob condições de normóxia a unidade HIF-1α se liga ao fator VHL (Von Hippel-Lindau) e é degradada via ubiquitina. No entanto, esta via é dependente de oxigênio, ferro II e 2-oxoglucarato. Em condições de hipóxia a degradação não ocorre, e unidade HIF-1α, agora, estável, é translocada ao núcleo, onde se liga a unidade HIF-1β (figura 2). [3] [4] [5]

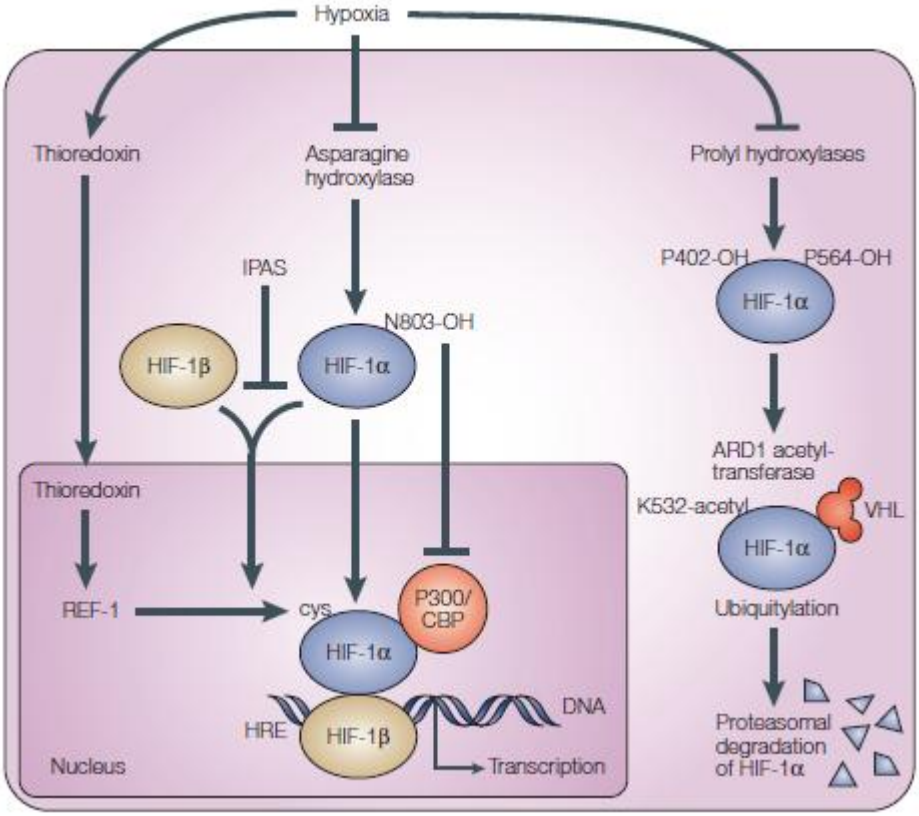


Figura 2: Mecanismos de regulação do HIF-1α sob condições aeróbias e hipóxicas. [5]

O HIF-1 ativado é responsável pela transcrição de genes como Elementos de Resposta à Hipóxia (HRE). [5] Esses HRE ativam, então, outros genes responsáveis por vias importantes à sobrevivência/adaptação tecidual (figura 3). [6]

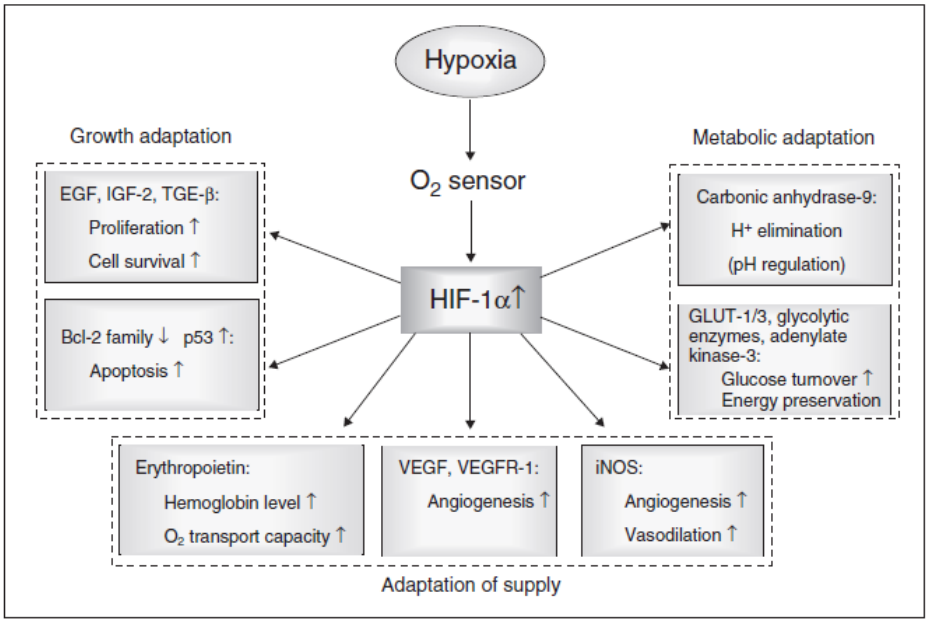


Figura 3: Representação esquemática do papeldo acúmulo hipóxia-induzido do HIF-1α em cânceres humanos. [6]

A maioria dessas vias promove o crescimento tumoral e sua resistência ao novo ambiente. No entanto, a hipóxia também é responsável pela indução a apoptose, e, o equilíbrio entre essas vias é fundamental para o efeito da hipóxia sobre o tumor. [6]

O HIF-1 estimula a expressão dos transportadores GLUT1 e GLUT3, que são responsáveis em mediar a captação da glicose. Isso se justifica com o aumento da necessidade de glicose, já que sob condições anaeróbicas a célula passa a realizar glicólise para obtenção de energia. [3] O que leva também, a outra evidência de células em hipóxia – a diminuição do pH interno, e, muitas vezes, externo, através do excesso de ácido láctico (produto final da glicólise). A diminuição do pH celular ativa anidrases carbônicas, cujas isoformas anidrase-9 e -12 estão envolvidas na regulação do fator VHL, e, portanto, do HIF-1. O baixo pH também é responsável por ativar proteases responsáveis por promover a invasão tumoral através do tecido adjacente, sendo, portanto,

também associado a um pior prognóstico. [1]

Ainda tem sido associada ao HIF-1 a formação de novos vasos sanguíneos (neoangiogênese) através da expressão do gene VEGF, que também é estimulada pela expressão de protooncogenes, como os da família RAS. Porém, os vasos sanguíneos são compostos muitas vezes apenas da camada íntima, com junção frouxa entre as células endoteliais, o que lhes confere um aspecto fraco e dilatado e uma funcionalidade deficiente. A hipóxia também induz a formação de coágulos sanguíneos, o que estimula o estado de hipóxia. [1] [5] [6]

A formação de vasos aberrantes, induz a um ciclo vicioso de hipóxia-normóxia a essas células. Esse ciclo de hipóxia-normóxia permite e estimula as células a desenvolverem esses mecanismos de escape, adaptação e resistência, o que contribui não só para um comportamento maligno e agressivo dessas células neoplásicas, mas também lhes confere resistência a tratamentos quimioterapêuticos e radioterapêuticos. [1] [4] [7] [8]

De posse do conhecimento das modificações observadas nas células, quando da existência de hipóxia, é possível buscar compostos ou procedimentos que possam utilizá-las como importantes alvos terapêuticos ou diagnósticos. Deste modo, é importante detectar em pacientes, a existência e a extensão de áreas de hipóxia nos tumores. [1] [4] [5] [8]

1.3 – Métodos diagnósticos (uso de radiofármacos)

Um grande número de radiofármacos tem sido desenvolvidos e

estudados quanto ao potencial de detecção de tumores, baseados nas diferenças metabólicas das células cancerosas. [8] [9]

Evidências mostram que 50 a 60 % dos tumores sólidos localmente avançados exibem áreas de hipóxia e/ou anóxia tecidual, heterogeneamente distribuídas na massa tumoral. [8] Por esta razão, as alterações e adaptações celulares causadas pela hipóxia têm sido objetos de desenvolvimento de novos fármacos e radiofármacos a fim de se obter melhor diagnóstico e tratamento para os tumores. Esses radiofármacos também encontram aplicação na avaliação de regiões de hipóxia no coração e cérebro – infarto agudo do miocárdio e isquemia cerebral. [9] [10] [11]

Os primeiros radiofármacos desenvolvidos para detecção de hipóxia foram baseados em derivados de nitroimidazóis, os quais possuem uma intensa afinidade por tecidos com essa característica. Isso ocorre porque em áreas de baixa pressão de oxigênio esses agentes sofrem redução à amina e, ao ser protonada, devido ao pH ácido da célula, perde sua capacidade de atravessar a membrana plasmática, ficando retidos no interior das células. A redução desses compostos ocorre de modo proporcional à deficiência de oxigênio. [9] [12]

Dois compostos marcados com (^{18}F)flúor, o (^{18}F)FMISO ((^{18}F)fluoromisonidazol) e o (^{18}F)FAZA ((^{18}F)fluoroazomicina arabinosideo) têm se mostrado importantes na avaliação clínica de pacientes com tumores, sendo que o (^{18}F)FAZA apresenta características farmacocinéticas superiores, devido a uma eliminação mais rápida do tecido normal, o que permite uma maior razão tumor/tecido não tumoral. Isso se deve a menor lipofilicidade apresentada por esse último. [12] [13] [14] [15]

O inconveniente desses dois compostos é que: por serem marcados com o (^{18}F)flúor, um radioisótopo emissor de pósitron com meia-vida de 110 minutos, é necessária a existência de uma unidade de cíclotron para a produção diária do radiofármaco e de câmaras para PET (pósitron emission tomography), o que torna a utilização em larga escala limitada.

Por outro lado, o [^{99m}Tc]tecnécio é o radioisótopo amplamente utilizado nas clínicas de medicina nuclear, devido as suas características físico-químicas e de disponibilidade, fazendo com que diversos radiofármacos desenvolvidos para detecção de tumores e hipóxia sejam baseados neste radioisótopo, como derivados de nitroimidazol conjugados a ligantes do tipo diaminodioxima [9], ou derivados de diaminooxima sem a presença do grupo nitroimidazol. [16]

Outro radiofármaco de [^{99m}Tc]tecnécio, o [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$, tem sido utilizado em estudos de captação em tumores, e sua utilização anterior para obtenção de imagem de infarto agudo do miocárdio, condiz com estudos recentes a cerca de seu acúmulo em áreas de baixa oxigenação nos tumores.

Embora o composto derive dos carboidratos, estudos mostraram comportamento discrepante entre esse radiofármaco e o radiofármaco (^{18}F)FDG, o qual é um análogo da glicose e é trapeado nas células pelo mesmo mecanismo que é observado para a glicose. Foi então que surgiu a hipótese de que o [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ se comportasse de maneira semelhante aos radiofármacos da mesma família, como o [[^{99m}Tc]glucoheptonato] e [[^{99m}Tc]gluconato], marcando áreas de injúria tecidual. [17] [18]

Estudos demonstraram a correlação entre o acúmulo do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em áreas de hipóxia (figura 4) e necrose tecidual, sendo sugerido que a concentração em áreas de necrose esteja relacionada ao fato

da molécula possui cargas negativas e se liga às histonas, proteínas de carga positiva localizadas intranuclearmente, mas expostas na lesão por necrose. [10] [19] [17] Todavia, em células hipoxiadas, mas viáveis, o mecanismo de acúmulo desse radiofármaco ainda não está totalmente estabelecido, uma vez que a membrana nuclear deveria estar integra, sem a liberação de histonas para o citoplasma. Outro mecanismo proposto está relacionado ao fato do ácido glucárico ser estruturalmente similar à frutose e penetrar nas células através do sistema de transporte da mesma. [18] [20]

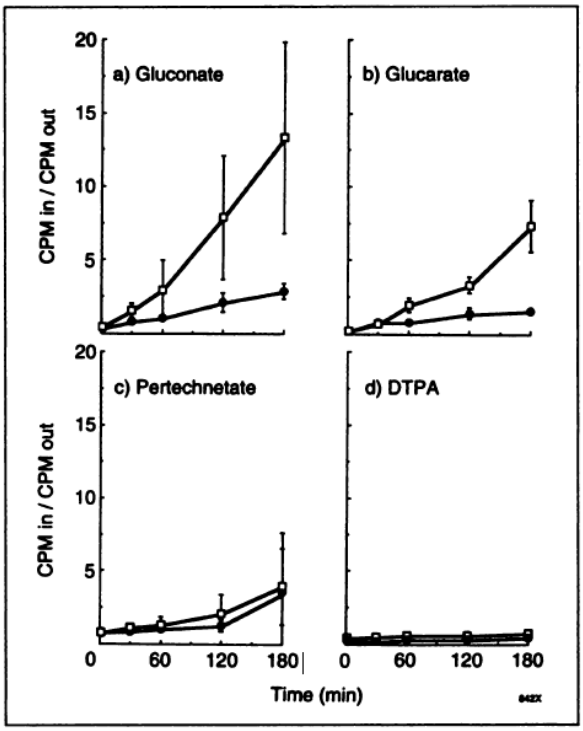


Figura 4: Efeito de condições aeróbicas e de hipóxia sobre o acúmulo celular do radiotraçador em função do tempo: a) gluconato; b) glucarato; c) pertecnetato; e d) DTPA. Aerobiose ● e hipóxia □. Cada ponto é a média mais ou menos um desvio padrão de quatro determinações. [18]

1.4 – Melanoma

Dentre a percentagem de tumores que apresentam áreas de hipóxia, estão os melanomas. [21] Um dos cânceres mais letal, e de incidência subestimada, uma vez que a maior parte dos pacientes são diagnosticados em estádios mais avançados da doença. [22] A agressividade tumoral associada à hipóxia já foi comprovada em ensaios utilizando melanomas, por confirmar o aumento de seu potencial metastático, e tendo comprovada sua contribuição desde a transformação dos melanócitos. [23] [21] Giatromanolaki, 2003 reafirma o papel do HIF-1 na progressão da doença através de sua unidade HIF-1α e sua isoforma HIF-2α. [23]

Apesar de muitos estudos afirmarem contribuição da hipóxia para a progressão do melanoma, seu papel ainda precisa ser determinado de fato, e o conhecimento da resposta célula à hipóxia nesse tipo tumoral se mostra importante para avaliação prognóstica e posterior tratamento. [24] Para estudos *in vitro* e *in vivo* temos disponíveis linhagens murinas derivadas de B16, preferencialmente a B16F10 – uma linhagem tumorigênica amplamente utilizada, e atualmente, as linhagens não tumorigênicas derivadas de melan-a (Tm1, Tm5, S1) vêm sendo exploradas. [25] [26] Todavia, tanto a B16 quanto a melan-a e suas respectivas sublinhagens são derivadas de camundongos C57Bl6, e portanto consideradas singênicas. [27]

OBJETIVOS

2.1 – Objetivo geral

Avaliar a o comportamento de diferentes radiofármacos na captação em células tumorais sob condições de hipóxia e na detecção de regiões de hipóxia em tumores implantados em animais, utilizando técnicas de imagem.

2.2 – Objetivos específicos

Preparar os radiofármacos específicos para hipóxia (^{18}F)FAZA e [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$, avaliando a eficiência de marcação e a estabilidade do complexo de [^{99m}Tc]tecnécio frente aos aminoácidos cisteína e histidina.

Avaliar a taxa de captação dos radiofármacos em modelos celulares, *in vitro*, e analisar as alterações de tensão de oxigênio, pH, concentração de ácido lático em condições de normóxia e hipóxia.

Comparar acúmulo dos radiofármacos (^{18}F)FAZA e [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ sob as mesmas condições, utilizando a captação de (^{18}F)FDG e imagem de CT como referência para localização do tumor.

Correlacionar a intensidade de captação desses radiofármacos com as alterações histológicas presentes nas células por meio de técnicas histológicas e de autorradiografias.

MÉTODOS

3.1 – Obtenção de complexos radioativos de [^{99m}Tc]tecnécio e controles de qualidade

3.1.1 – Preparação de kit liofilizado de glucarato

Em todas as etapas para a produção do kit liofilizado foi utilizada água purificada, a qual foi nitrogenada por 10 minutos. Em um béquer, foram adicionados 360,0 g de ácido glucárico e 16 mL de água purificada. O sólido foi dissolvido sob agitação, em agitador magnético, e foram, então, adicionados 1,5 mL de solução de ácido gentísico (100 mg de ácido gentísico dissolvido em 10 mL água previamente nitrogenada) e 1,5 mLde solução de cloreto estanoso (100 mg $SnCl_2.2H_2O$ em 1 mL de HCl concentrado, seguido da adição de 9 mL de água purificada) . O pH da solução foi ajustado ao valor de 5,0, com adição de solução de NaOH 1 N, e o volume foi ajustado a 30 mL com água nitrogenada. A solução resultante foi fracionada em volume de 1 mL em frascos tipo penicilina, congelada em banho de nitrogênio líquido e o produto foi liofilizado por 24 horas. Após esse período, os frascos foram vedados com lacre e mantidos em geladeira. [28]

3.1.2 – Preparação do complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ e avaliação da eficiência de marcação

A marcação é feita através da adição de 1 mL de solução de [^{99m}Tc]pertecnetato de sódio, com atividade variando entre 370 a 1480 MBq, de

acordo com a necessidade do experimento. A solução foi levemente agitada e mantida por 20 minutos em temperatura ambiente, para efeitos de marcação.

A eficiência de marcação foi avaliada através de cromatografia em camada delgada – CCD, utilizando dois sistemas: 1. Whatman 1/acetona; e 2. ITLC-SG ou Whatman 3MM/água. Após estarem secas, as fitas foram lidas em scanner para fitas impregnadas com material radioativo (Bioscan) ou em contador automático tipo poço para radiação gama.

3.1.3 – Determinação do coeficiente de partição (LogP)

O coeficiente de partição foi determinado em um tubo de ensaio onde foram adicionados 3 mL de solução fisiológica, 3 mL de n-octanol, e 100 µL do complexo $[[^{99m}Tc]glucarato]^{-}$. O tubo foi agitado por cerca de 2 minutos em agitador do tipo vórtex e, após as fases se separarem, alíquotas de 1 mL de cada fase foram repassadas a outros tubos de ensaio, em duplicatas, os quais tiveram a atividade mensurada em calibrador de dose.

O resultado foi expresso como logaritmo da razão entre a atividade na fase orgânica e a atividade encontrada na fase aquosa. [29]

3.1.4 – Preparação dos complexos $[[^{99m}Tc](cisteína)]^{-}$ e $[[^{99m}Tc](histidina)]^{-}$

Os aminoácidos foram marcados da seguinte forma: 5 mg do aminoácido (cisteína ou histidina); 0,5 mL de tampão PBS, 50 µL de solução

ácida de cloreto estanhoso 8 % (10 mg de $SnCl_2.2H_2O$, 100 µL de HCl concentrado e 100 mL de água purificada, previamente nitrogenada), e 1 mL de solução de $[^{99m}Tc]O_4^-$ (pertecnetato) com atividade entre 370 e 555 MBq. O controle de marcação foi feito através dos sistemas: 1. Whatman 3MM/acetona e 2. Whatman 3MM/solução fisiológica.

3.1.5 – Determinação do perfil eletroforético dos complexos $[[^{99m}Tc]glucarato]^-$, $[[^{99m}Tc](cisteína)]^-$, $[[^{99m}Tc](histidina)]^-$ e do $[^{99m}Tc]O_4^-$

O perfil eletroforético foi determinado como segue: em uma cuba para eletroforese horizontal, previamente lavada com água purificada e preenchida com solução tampão Tris (pH = 8,6), foram estendidas e fixadas tiras de papel Whatman 3 com 1,5 x 29 cm, previamente umedecidas no próprio tampão. Uma gota dos complexos radioativos $[[^{99m}Tc]glucarato]^-$, $[[^{99m}Tc](cisteína)]^-$, $[[^{99m}Tc](histidina)]^-$ e $[^{99m}Tc]O_4^-$ foi depositada na região central de tiras distintas e a fonte de corrente contínua foi ligada a 275 V, por 1 hora. As tiras foram secadas, cortadas em segmentos de 1,0 cm e a radioatividade foi medida em detector de radiação gama, tipo poço. Os resultados são apresentados como porcentagem da radioatividade total por centímetro. [30]

3.1.6 – Avaliação da estabilidade do complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ frente à cisteína e histidina determinada por eletroforese

A estabilidade do complexo foi realizada da seguinte forma:foram misturados 900 µL de solução 0,001 M de aminoácido e 100 µL do complexo marcado [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$. As soluções foram mantidas em banho-maria a 37 ºC por 1 hora. Em um terceiro frasco, 100 µL do complexo marcado foram diluídos em 900 µL de solução fisiológica e foi igualmente mantido em banho-maria. Uma alíquota de cada reação foi removida e uma gota foi depositada no meio da tira. Procedeu-se a eletroforese como descrito no tópico acima, na determinação do perfil eletroforético dos complexos e do pertecnetato.

3.1.7 – Ligação em proteínas plasmáticas e em albumina

Para esse ensaio, foi necessária a preparação de solução de soroalbumina humana 0,2 % a partir de kit liofilizado. Cem microlitros do radiofármaco [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ foram adicionados a 1 mL da solução de soroalbumina humana 0,2 %. A mistura foi incubada a temperatura ambiente, e para confirmar a estabilidade em albumina, foi realizada a CCD nos dois sistemas já descritos anteriormente (item 3.1.2) e em fita de ITLC-SG impregnada com soroalbumina humana utilizando solução de água:etanol:hidróxido de amônia (5:2:1) – solução 1 – como fase móvel.

As fitas para o terceiro sistema foram preparadas no laboratório, banhando fitas de ITLC-SG em solução de soroalbumina humana (ITLC-SG-

HSA) numa concentração de 5 mg/mL, preparada na hora. Após o banho de cerca de 5 minutos, as fitas foram lavadas rapidamente em água purificada, colocadas para secar de um dia para outro à temperatura ambiente, e armazenadas em geladeira (± 4 ºC) [31] [32] [33]. Esse último sistema (ITLC-SG/HSA) permite que o complexo [^{99m}Tc]albumina migre pela fita, permitindo distingui-lo do [^{99m}Tc]O_2.

Foram realizadas a CCD nos sistemas descritos nos tempos de 5, 45, 120 e 240 minutos de incubação. As fitas foram lidas em contador automático gama, tipo poço. A estabilidade do [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ a 37 ºC foi realizada da mesma forma, porém a leitura foi feita nos tempos de 1, 4, 6 e 24 horas, em scanner para fitas impregnadas com material radioativo (BioScan).

Outro ensaio foi feito na tentativa de visualizar a ligação à albumina e/ou proteínas plasmáticas e divido em duas etapas – uma para albumina e outra para plasma humano [33]. Foram adicionados 100 µL de GLA marcado a 1 mL de soroalbumina humana reconstituída (5 mg/mL), ou a cerca de 800 µL de plasma humano. Após período de incubação – 5, 45, 120 e 240 minutos – uma alíquota de 100 µL foi retirada a cada tempo (em duplicata) e misturadas a 200 µL de etanol em um microtubo e centrifugada a 5.000 rpm por 15 minutos em microcentrífuga. O sobrenadante e o precipitado foram separados e mensurados em calibrador de dose.

O plasma foi obtido através de coleta de sangue em tubo à vácuo para hemograma (com EDTA) e subseqüente centrifugação para separação dos componentes sanguíneos. Foram utilizados materiais fornecidos pelo serviço de enfermagem do Centro de Medicina Nuclear –InRad. [34]

3.2 – Preparação do (^{18}F)FAZA

Para obtenção do (^{18}F)FAZA foi necessária sua síntese a partir do precursor 1-(2,3-diacetil-5-tosil-(α-D-arabinofuranosil)-2-nitroimidazol, da ABX®, e do (^{18}F)fluoreto, produzido pelo CinRad HC-FMUSP. Para a síntese, cerca de 1,11 a 3,7 GBq do (^{18}F)fluoreto, fornecido em água e em volume variável, foram passados em cartucho QMA light, precondicionado com 10 mL de solução de bicarbonato de sódio 0,1 N, 10 mL de água purificada (Milli Q) e 5 mL de acetonitrila.

Foram pesados 15 mg de kriptofix 2.2.2® e 3,6 mg de carbonato de potássio (K_2CO_3) em um frasco de vidro tipo penicilina, e solubilizados em 100 µL de água purificada e 900 µL de acetonitrila. O (^{18}F)fluoreto trapeado foi, então, eluído com essa solução e recolhido em frasco de vidro do tipo penicilina.

O frasco tipo penicilina foi vedado com rolha de borracha e foram espetadas duas agulhas, uma de 25 x 8 mm, utilizada como respiro, e outra agulha de 13 x 4,5 mm. A segunda agulha estava conectada a um cateter e na outra ponta do cateter foi conectada uma torneira de 3 vias, por onde foram adicionados os reagentes e gás de arraste nitrogênio (N_2). O frasco foi levado ao aquecimento em banho-maria, em béquer contendo silicone líquido a cerca de 140 ºC, para a evaporação do solvente. Após o processo de evaporação, este foi repetido mais duas vezes, com adição sequencial de 1 mL de acetonitrila anidra.

Cinco miligramas do precursor 1-(2,3-diacetil-5-tosil-(α-D-arabinofuranosil)-2-nitroimidazol solubilizados em 1 mL de DMSO foram

adicionados ao frasco de reação, mantido por mais 5 minutos a 140 ºC. Após essa etapa, a reação foi resfriada a 30 ºC, e foram adicionados 0,5 mL de solução de NaOH 0,4 M. Após 2 minutos, foram adicionados 0,5 mL de tampão fosfato 0,3 M, para neutralizar a reação. A solução resultante foi passada através de um cartucho Alumina N Light, precondicionado com 10 mL de água purificada (Milli Q). [35] [36]

3.2.1 – Determinação da eficiência de marcação e pureza radioquímica

A eficiência de marcação e pureza radioquímica foram determinadas através de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC), em coluna analítica Synergi Hydro-RP A80, 4 µm x 250 mm x 4,6 mm (Phenomenex), e fase móvel isocrática com 95 % de etanol grau HPLC e 5 % de tampão fosfato (NaH_2PO_4) 5 mM, por 30 minutos, num fluxo de 1 mL/min. A radioatividade foi detectada em fluxo utilizando detetor de cintilação de cristal de iodeto de sódio dopado com tálio.. [35]

Para determinação da identidade das espécies radioquímicas foram analisadas amostras de (^{18}F)fluoreto de sódio, do composto padrão 1-(5-deoxy-5-fluoro-α-D-arabinofuranosil)-2-nitroimidazol, e do precursor, 1-(2,3-diacetil-5-tosil-(α-D-arabinofuranosil)-2-nitroimidazol, na concentração de 0,5 mg/mL, sendo os dois últimos detectados em detetor UV-Vis, em comprimento de onda de 340 nm

3.2.2 – Purificação do (^{18}F)FAZA

Para obtenção somente da fração desejada, ou seja, do (^{18}F)FAZA, cerca de 370 a 629 MBq do produto resultante da síntese foi passado por equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC), usando uma coluna semi-preparativa Synergi Hydro-RP A80, 4 µm x 250 mm x 10 mm (Phenomenex), e fase móvel isocrática 65 % de acetonitrila grau HPLC e 35 % de tampão fosfato (NaH_2PO4) 5 mM, por 30 minutos num fluxo de 3 mL/min, e comprimento de onda de 340 nm. As frações foram recolhidas de 1 em 1 minuto em tubos de ensaio posicionados em um coletor de frações. [36]

Essas frações tiveram a atividade medida em calibrador de dose, e, aquela condizente com o pico determinado para o padrão FAZA, entre os tempos de 3 e 4 minutos, foram colocadas num frasco do tipo penicilina o qual foi levado a aquecimento de 100 ºC para evaporação da acetonitrila. Após redução da amostra a cerca de 100-200 µL, esta foi analisada novamente em coluna analítica, sob as mesmas condições anteriormente citadas para determinação da pureza radioquímica, assegurando seu uso nos experimentos posteriores.

3.2.3 – Determinação da atividade específica do (^{18}F)FAZA

Diferentes concentrações ($2{,}33.10^{-3}$; $2{,}33.10^{-4}$; $2{,}33.10^{-5}$ e $2{,}33.10^{-6}$ $g.mol^{-1}$) do padrão do (^{19}F)FAZA foram injetadas em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) equipado com uma

coluna cromatográfica de fase reversa C18 Synergi-Hidro (4,6 x 250 mm x 4 µm) e fase móvel isocrática composta de uma mistura de 95 % de etanol grau HPLC e 5 % de NaH_2PO_4 5 mM, bombeado no fluxo de 1 mL/min – o mesmo sistema utilizado para a caracterização do (^{19}F)FAZA. Os compostos foram detectados simultaneamente com detector de UV ajustado para λ= 340nm.

Os picos obtidos em UV foram integrados para as diferentes concentrações e uma curva de calibração foi construída. O pico da análise de pureza radioquímica feito anteriormente também foi integrado e o resultado foi colocado no gráfico, onde pudemos calcular a atividade especifica do (^{18}F)FAZA que foi produzido, dada em MBq/µmol.

3.3 – Estudos biológicos *in vitro*

3.3.1 – Manutenção de células B16F10 em cultura

Células B16F10 foram cultivadas em garrafas plásticas de 175 cm², contendo 25 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e mantidas em estufa úmida a 37 ºC e 5 % de CO_2. As células foram mantidas obedecendo ao seu tempo de crescimento e expansão. Para os ensaios utilizando células foram utilizadas garrafas com confluência de aproximadamente 80-90 %, onde as células foram lavadas com 5 mL de solução PBS, e desprendidas com o uso de 5 mL de solução ATV (associação de tripsina versene) e levadas a estufa 37 ºC por 3 minutos; após esse período a solução ATV foi inativada utilizando 5 mL de meio RPMI suplementado.

Pode-se verificar esse desprendimento com o auxílio de um microscópio, pois as células passam a apresentar forma arredondada e “movimento”. [37] [38] [39] [40]

A suspensão de células foi aspirada com o auxílio de uma pipeta sorológica de 10 mL e foi transferida para um tubo do tipo Falcon de 50 mL. Esse tubo, devidamente fechado, foi levado para centrifugação por 3 minutos a 2000 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* resultante foi desprendido com leves batidas no tubo e ressuspendido em meio RPMI. Foram homogeneizados 10 µL da suspensão de células a 10 µL de solução de Tripan Blue 0,4 %, e a mistura transferida a um hemocitômetro para a contagem das células e determinação da viabilidade celular, com o auxílio de um microscópio óptico.

Apenas as células refringentes são consideradas viáveis, e somente amostras com viabilidade superior a 90 % foram utilizadas. O resultado da contagem foi corrigido para o volume total da suspensão, e assim, calculado para o ensaio desejado.

3.3.2 – Manutenção de células Tm1N3 em cultura

Células Tm1N3 foram cultivadas em garrafas plásticas de 175 cm², em 25 mL de meio de cultura RPMI suplementado com 5 % de soro fetal bovino (SFB) e geneticina 1mg/mL, em atmosfera úmida com 5 % de CO_2 e umidade

controlada, a 37 ºC. As células foram mantidas obedecendo ao seu tempo de crescimento e expansão. [41] A preparação para os ensaios se fez como o descrito para a linhagem B16F10.

3.3.3 – Viabilidade por Tripan blue

Para esse ensaio, foram coletados 20 µL da suspensão de células, e, adicionados 20 µL de solução de Tripan Blue. Após homogeinizada, a mistura foi transferida parcialmente a um hemancitômetro, até preencher o espaço (cerca de 10 µL). Com o total de células contadas calculamos a média (m = x ÷ 4). E com esta, utilizamos o seguinte cálculo para extrapolar o número de células em mL:

$$\mathbf{n^o \frac{cél}{mL} = m \,.\, fd \,.\, fc}$$

Onde:

- fd = fator de diluição (= 2, pois a suspensão é misturada com o Tripan em igual proporção, 1 : 1);
- fc = fator de correção (=10^4, valor convencionado).

O resultado, então, é corrigido para o volume total da suspensão, e assim, calculado para o ensaio desejado. Caso, somente a viabilidade fosse desejada, as células mortas (aquelas coradas em azul) também seriam contadas, e determinado o percentual de células viáveis.

3.3.4 – Determinação de parâmetros bioquímicos em normóxia e hipóxia

Após a contagem do número de células, o volume calculado para conter $1x10^5$ células foi adicionado ao poço, já com o volume de meio q.s.p. 1 mL por poço ao final. As placas foram homogeneizadas através de movimentos circulares, a fim de que as células se espalhem pela área do poço, e levadas à estufa 37 ºC, durante a noite, para aderência das mesmas.

As placas destinadas ao estudo em hipóxia foram colocadas em câmara de hipóxia Billups-Rothenberg (figura 5), onde foram inseridos uma proporção de 19 L/min de N_2 e 1 L/min de CO_2 (ou seja,1 % de O_2, 94 % de N_2 e 5 % de CO_2) [42], e levados novamente à estufa 37 ºC por 24 horas. As placas destinadas ao estudo em normóxia foram mantidas em estufa 37 ºC.

Figura 5. Câmara de hipóxia Billups-Rothenberg, e manômetro, indicando o volume dos gases utilizados – 19 L/min de N_2 e 1 L/min de CO_2.

Após as 24 horas de incubação, cerca de 400 µL do meio de cada poço foram transferidos a um microtubo para leitura em equipamento Radiometer

ABL800 Flex. Também, foram preparados três tubos contendo 400 µL do meio utilizado para cultivo das células, mantido em geladeira, em condições normais de atmosfera.

Nesse equipamento foram analisados os seguintes parâmetros: concentração de ácido láctico, glicose, pressão de oxigênio (pO_2), pressão de dióxido de carbono (pCO_2) e pH. [43]

3.3.5 – Captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ em normóxia e hipóxia

Ao fim das 24 horas de incubação em condições de hipóxia (como descrito item 3.3.4), o meio foi trocado, adicionando 500 µL de meio novo e foram adicionados 100 µL do radiofármaco a cada poço, numa diluição de 14,8 MBq/4 mL, e as placas retornaram à estufa – e à câmara de hipóxia, se for o caso, para serem processadas após os períodos de 15 minutos, 1, 2 ou 4 horas. Nessa etapa, houve a distinção da adição de meio com ou sem glicose em sua composição. Decorridos os tempos de análise estipulados, todas as placas foram processadas da mesma forma, a saber: o meio de cada poço foi retirado com o auxilio de uma micropipeta, e transferido para um tubo de contagem, juntamente com a ponteira.

Foram adicionados 400 µL de solução PBS, os quais foram coletados e transferidos para um novo tubo de contagem, também com a ponteira. Quatrocentos microlitros de solução NaOH 0,1 N foram adicionados ao poço para a lise das células, e após homogeneização, foram coletados e transferidos a um terceiro tubo de contagem, juntamente com a ponteira utilizada. Os

conjuntos de tubos (meio + lavado + células) foram levados para contagem em contador gama automático, e os dados obtidos, na forma de contagens por minuto foram processados em planilha eletrônica Excel. [29] [44]

3.3.6 – Captação do (^{18}F)FAZA em normóxia e hipóxia

Após o período de 24 horas, o meio de cada poço foi aspirado e reposto com 1 mL de novo meio de cultura. Cem microlitros da solução do (^{18}F)FAZA com cerca de 0,74 MBq foram adicionados em cada poço, e essas foram incubadas novamente por 15, 60 e 180 minutos. Após, o término do tempo de incubação, o meio de cada poço foi transferido para um tubo de contagem junto com a ponteira. Os poços foram lavados com 1 mL de solução PBS 0,1N e transferidas para um novo tubo de contagem, juntamente com a ponteira. Para cada poço foi adicionado 1 mL de NaOH 0,1N e a placa levada à estufa por 5 minutos, a fim de lisar as células. A suspensão foi recolhida com o auxilio da micropipeta e transferida para um novo tubo de contagem junto com a ponteira. Os conjuntos de tubos (meio + lavado + células) foram levados para contagem em contador gama, tipo poço.

3.3.7 – Citometria

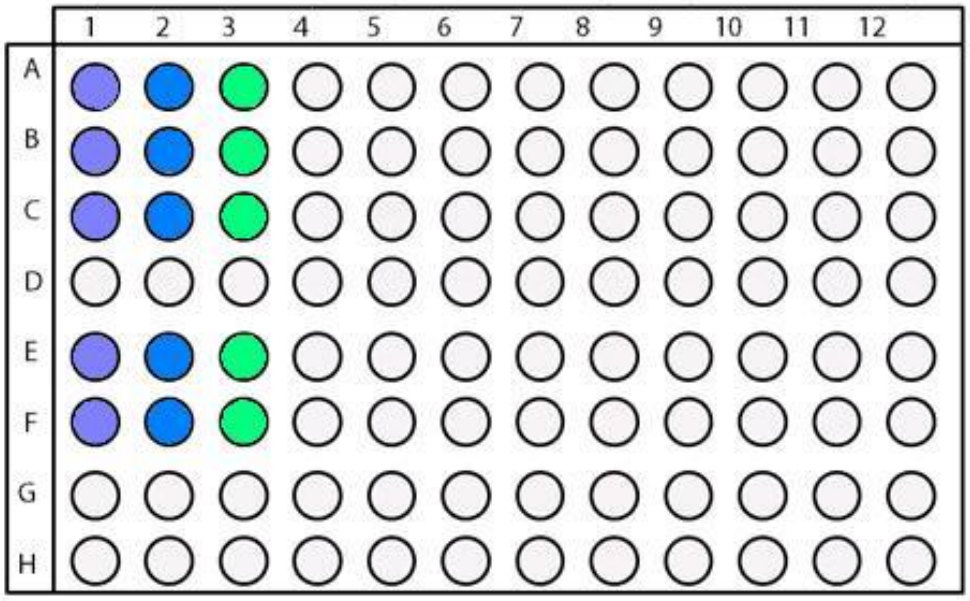
Para esse estudo, após a contagem, foi feita uma diluição para que houvesse $1x10^5$ células em 100 µL, os quais foram transferidos a cada poço de

uma placa de cultura com 96 poços, e fundo em “V”. No total, foram preenchidos nove poços com células B16F10, e seis com MDA-mb-468 – referida como padrão de expressão para o receptor Glut1. [45]

A placa foi então centrifugada (1200 rpm, 15 min, 4 ºC) e o sobrenadante desprezado, através de inversão. O *pellet* formado foi ressuspendido em 100 µL de solução PBS 1x (solução PBS preparada sem potássio) para lavagem e novamente centrifugada a placa, com os mesmos parâmetros. Esse procedimento foi repetido.

O *pellet* foi ressuspendido em 100 µL de solução de PBS-BSA 0,5 %, e foram adicionados 2 µL do anticorpo utilizado como isotipo (anticorpo de coelho) aos poços correspondentes (em azul) e 2 µL de anticorpo anti-Glut1, também aos poços correspondentes (em verde), como pode ser visto no esquema abaixo (figura 6). Os poços marcados em roxo não receberam nenhum anticorpo. A placa foi mantida em geladeira (4 ºC) durante o período noturno para incubação.

Figura 6: Esquema da distribuição das células em placa utilizada para a marcação com os anticorpos e posterior citometria (B = B16F10; M = MDA-mb-468). **Roxo –** poços somente com células; **Azul –** poços com células marcadas somente com isotipo; e **Verde –** poços com células marcadas com anti-Glut1.



Após período de incubação, a placa foi centrifugada e lavada com PBS 1x, como procedido anteriormente e, então, foram adicionados 100 µL de solução de BSA 0,5 %, para ressuspender as células, e 1 µL de anticorpo conjugado com Alexa Fluor 488. A placa foi recoberta com papel laminado, para proteger o conjugado da ação da luz, e mantida a 37 ºC, por 10 minutos, e, em seguida, por 2 horas em temperatura ambiente.

Findado o período de incubação, a placa passou por nova etapa de lavagem com PBS 1x, adicionou-se 100 µL de PBS 1x, os poços foram homogeneizados e o conteúdo transferido para tubos de citometria de 3 mL. A leitura foi realizada em equipamento FACS Calibur, onde os tubos foram inseridos dentro dos tubos de citometria de 10 mL para contagem. O conteúdo foi diluído em PBS 1x conforme o número de eventos acusado no equipamento durante os ajustes dos parâmetros para a aquisição. O SSC foi ajustado para 424 (linear) e o FL1 para 317 (log).

Os resultados foram processados em programa FSC Express V3.

3.4 – Estudos biológicos *in vivo*

3.4.1 – Modelo animal - implantação do tumor

Camundongos C57Bl/6 *Specific Pathogen Free* (SPF), provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina da USP, foram mantidos no Biotério de Experimentação do Centro de Medicina Nuclear. Os animais foram separados em grupo de até 6 por unidades micro-isoladoras, as quais foram acondicionadas em estantes com sistemas de insuflamento e exaustão de ar. A temperatura na sala foi mantida entre 20 ^{o}C e 23 ^{o}C, com ciclo de fotoperíodo de 12/12 horas. Receberam água e ração estéreis *ad libitum*, trocadas três vezes por semana para manutenção da qualidade SPF.

Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina-USP (CEP nº 272/10).

Os camundongos foram inoculados (injeção subcutânea) com cerca de $5x10^5$ células de melanoma murino B16F10 ou Tm1N3 em regiões diferentes (coxa, tórax, glúteo e dorso). Após 7 a 14 dias, para a linhagem B16F10, e de 14 e 20 dias, para a linhagem Tm1N3, os animais foram separados para estudos de imagem ou de biodistribuição *ex vivo.*

3.4.2 – Biodistribuição por imagem

Os animais foram anestesiados com uma mistura de isofluorano:O_2 (1,5:2,5 L), num fluxo médio de 2 L/min. O radiofármaco [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ foi administrado pela veia caudal ou pela veia peniana, na concentração de 37 a 185 MBq/100 µL, e imediatamente após a injeção foram adquiridas imagens dinâmicas por SPECT, ou imagens estáticas tomográficas SPECT/CT após 2 ou 4 horas.

Para o radiofármaco (^{18}F)FAZA, cerca de 74 MBq/100 µL foram administrados nos animais pela veia caudal ou peniana, e as imagens adquiridas em módulo PET/CT após 1 hora.

Alguns animais foram separados para aquisição de imagens do tipo PET/CT com o radiofármaco (^{18}F)FDG, após 1 hora de injeção de cerca de 37 MBq/100 µL do mesmo.

As imagens dinâmicas foram processadas no programa de imagens Image J, e as imagens tomográficas (SPECT, PET e CT) foram processadas no programa de imagens Amide.

3.4.3 – Biodistribuição *ex vivo*

A) [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$

Após 7 a 14 dias os animais implantados com B16F10 foram pesados em balança semi-analítica e injetados pela veia caudal com aproximadamente

0,37 MBq/100 µL de [^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$. Nos tempos de 15, 60, 120 e 240 minutos, após administração do radiofármaco, os animais, em grupos de 3, foram anestesiados com administração intraperitonial de 100 µL ketamina/xilazina (1:1) e eutanasiados por decaptação. Para os animais implantados com Tm1N3 o ensaio foi realizado após 14 a 20 dias pós-inóculo, também em grupos de 3. [46] [29]

B) (^{18}F)FAZA

Após pesados, os animais foram injetados pela veia caudal com 0,37 MBq/100 µL do (^{18}F)FAZA, os quais foram anestesiados e eutanasiados em grupos de 4 animais nos tempos 15, 60 e 180 minutos – como descrito no item 3.4.3.1.

O sangue foi colhido em frascos de vidro e os órgãos (cérebro, coração, pulmões, estômago, intestino delgado, intestino grosso, fígado, baço, rins, bexiga e amostras dos tecidos muscular e ósseo) foram excisados, pesados em balança analítica e levados ao contador de cintilação automático tipo poço para mensurar a atividade e os dados obtidos na forma de contagens por minuto foram processados em planilha eletrônica em Excel. [29] [47]

3.4.4 – Autorradiografia dos tumores injetados com [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$

Após a aquisição das imagens, os animais foram eutanaziados por anestesia profunda com isoflurano e tiveram seus tumores excisados, bem como seus rins. Os órgãos foram embebidos em meio de inclusão para criostato e congelados em nitrogênio líquido. Após o congelamento, os mesmos foram cortados em criostato, numa espessura de 100 µm e fixados em lâminas de vidro pré-preparadas para receber criocortes.

As lâminas com os cortes foram posicionadas sobre uma placa de fósforo e fechados dentro de um cassete.para filmes radiológicos por 3 horas, sem exposição à luz. Terminado o período, esse filme foi lido em aparelho Storm 840, e processado em Image Quant 5.0. [15] [48]

3.4.5 – Análise histológica dos cortes

Sequencialmente aos cortes para autorradiografia, foram realizados cortes com espessura de 10 µm, os quais foram fixados em lâminas de vidro pré-preparadas para receber criocortes e corados com hematoxilina e eosina. [15]

RESULTADOS

4.1 – Obtenção dos complexos radioativos

4.1.1 –Preparação de kit liofilizado de glucarato

Algumas das grandes vantagens do uso do [^{99m}Tc]tecnécio é sua disponibilidade a partir de um sistema gerador de radionuclídeos e que a obtenção dos complexos pode ser feita a partir da reconstituição de kits liofilizados. Deste modo, dois pequenos lotes de kit liofilizado de glucarato foram preparados, seguindo procedimentos padronizados no laboratório.

Em ambos os casos, o processo de liofilização aparentemente não foi eficiente, pois com o passar de algumas semanas foi observada a contração das pastilhas do liofilizado (figura 07), indicando presença de umidade no produto. Todavia, a umidade residual não alterou a qualidade do produto dentro dos parâmetros de reconstituição, uma vez que as marcações realizadas após 18 meses continuaram a fornecer produto com eficiência de marcação superior a 90-95 %.

Figura 7: A) Lote 1 – Pastilha bem hidratada; **B)** Lote 2 – Pastilha retraída.

4.1.2 – Preparação do complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$

A obtenção do complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ foi realizada com reconstituição do kit liofilizado utilizando atividades variando de 20 a 40 mCi (740 a 1480 MBq).

O controle da eficiência de marcação foi realizado, inicialmente, utilizando os sistemas (A) TLC-SG/água e (B) Whatman 1/acetona (figura 8). No entanto o sistema TLC-SG/água não se mostrou tão eficiente, observando-se arraste do material na fase estacionária. O problema foi solucionado substituindo o TLC-SG por ITLC-SG, uma fase estacionária de sílica gel mais fina, o que proporciona interações substrato/fase móvel/fase estacionária mais eficiente. A utilização do (C) ITLC-SG/solução fisiológica apresentou um resultado diferente do esperado e descrito por Camargo, 2007, pois o complexo não migrou para o fronte, tornando-se uma exceção para o senso comum de que compostos hidrofílicos marcados com [^{99m}Tc]tecnécio migram ao fronte quando do uso de salina como fase móvel e ITLC-SG. [49] No entanto, obtivemos bons resultados com o uso do sistema (D) ITLS-SG/água purificada. Os resultados desta análise podem ser visualizados na figura 8.

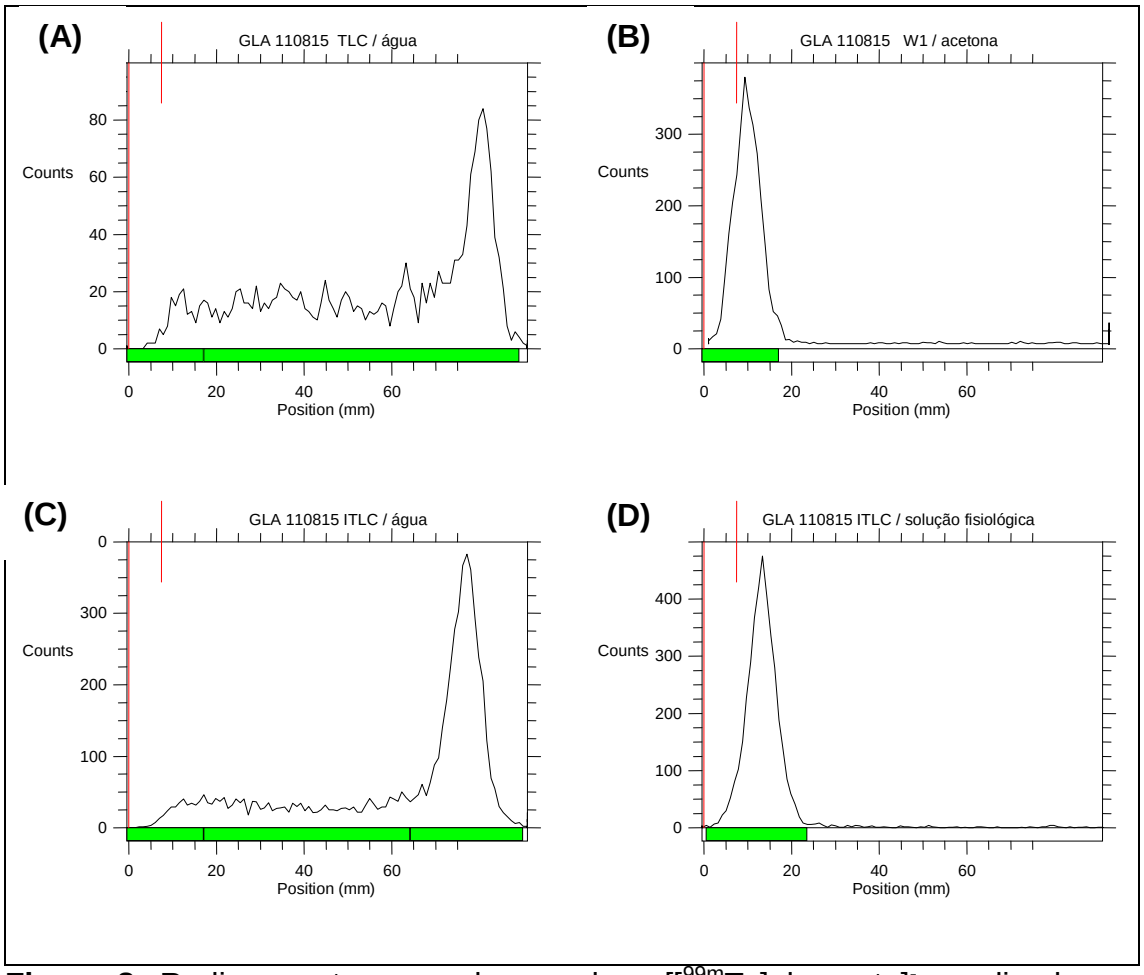


Figura 8: Radiocromatograma do complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ analisado por CCD nos suportes: **(A)** ITLC-SG/água; **(B)** Whatman1/acetona; **(C)** ITLC-SG/colução fisiológica; **(D)** ITLC-SG/água.

Todavia, dificuldades para importação do ITLC-SG nos fizeram avaliar e validar, por comparação, o uso do sistema cromatográfico Whatman 3MM/água, como substituto, conforme apresentado na figura 9. O uso do papel Whatman 3MM apresentou resultados semelhantes àqueles obtidos com o ITLC-SG , e, desta forma, decidimos utilizá-lo nos ensaios seguintes.

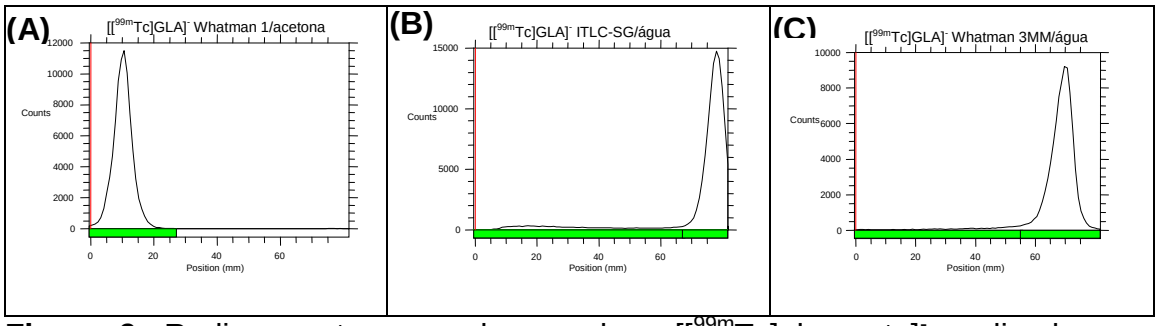


Figura 9: Radiocromatograma do complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ analisado por CCD nos sistemas **(A)** Sistema papel Whatman 1/acetona; **(B)** Sistema ITLC-SG/água; e **(C)** Sistema papel Whatman 3MM/água.

Assim, utilizando os sistemas Whatman 1/acetona e Whatman 3MM/água obtivemos rendimento de marcação médio de 95 % (n=30), mesmo para kits produzidos 18 meses antes da sua marcação.

4.1.3 – Determinação do Coeficiente de Partição (LogP)

A lipofilicidade do complexo, determinada através do cálculo do coeficiente de partição (LogP), forneceu valores de -2,7 (± 0,01), para n = 5 medidas, comprovando o caráter hidrofílico da molécula, já que faz parte do grupo dos monossacarídeos. [50]

4.1.4 – Determinação do perfil eletroforético de complexos de [^{99m}Tc]tecnécio

Um dos objetivos do projeto é obter informações das características físico-químicas do complexo preparado, como, por exemplo, sua carga elétrica.

Essa determinação foi realizada por eletroforese. Também foram analisados os perfis dos complexos [[^{99m}Tc](cisteína)]$^-$, [[^{99m}Tc](histidina)]$^-$, e do [^{99m}Tc]O_4^- (figura 10), este último considerado produto de referência, devido suas características bem conhecidas. [51]

O ensaio foi realizado em tampão Tris (pH = 8,6) a uma voltagem de 275 V, por 01 hora.

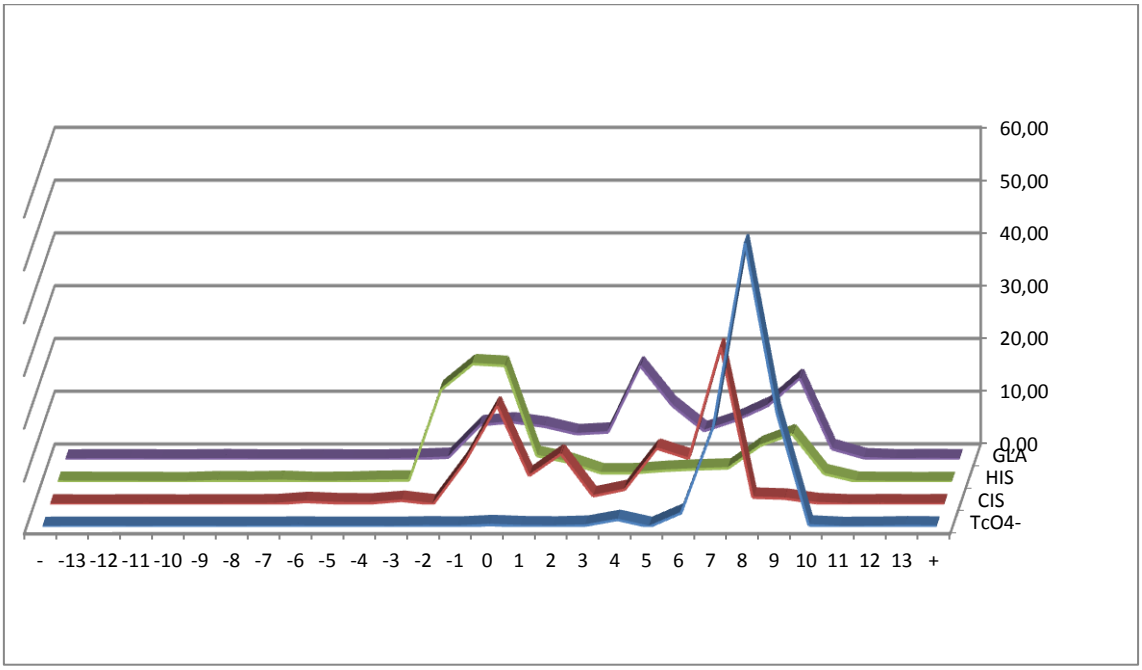


Figura 10: Eletroforese em suporte de papel Whatman 3 e tampão Tris (pH = 8,6), com uma voltagem de 275 V por 1 hora. **Azul escuro –** Na[^{99m}Tc]O_4^-; **Vermelho –** complexo [[^{99m}Tc](cys)]; **Verde oliva –** complexo [[^{99m}Tc](his)]; **Roxo –** complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$.

Podemos observar caráter negativo para todas as espécies analisadas, uma vez que são observadas migração em direção ao anôdo. Todavia, enquanto a migração do [^{99m}Tc]O_4^- é bem definida, apresentando migração a 8 cm do local de aplicação da amostra, a migração das outras espécies não é

bem definida, apresentando múltiplos picos, os quais podem estar associados a diferentes graus de ionização dos complexos.

Pelo gráfico de distribuição dos produtos no suporte de eletroforese, apresentado na figura 9, fica um pouco difícil diferenciar os três complexos, pois as distâncias de migração final são muito próximas. Todavia, os complexos de aminoácidos apresentam uma concentração bastante pronunciada dos produtos no local de aplicação da amostra, indicando carga neutra, e uma pequena migração em direção ao catôdo, indicando carga positiva. Embora também seja observado concentração do $[[^{99m}Tc]glucarato]^-$ no local da aplicação da amostra, a concentração do produto mais baixa do que aquela obseravda para os complexos de aminoácidos e também pode ser observado um pico mais intenso a 4-5 cm do local de aplicação da amostra.

Em tese, isto poderia ser explicado pela formação de diferentes estruturas dos complexos, com espécies do tipo bis-didentada-oxo-tecnécio, tri-bisdentada [52], ligação por diferentes ligantes ou troca destes em pH diferente àqueles da marcação. [53] [54]

4.1.5 – Avaliação da estabilidade do complexo $[[^{99m}Tc]glucarato]^-$ frente à cisteína e histidina por eletroforese

Um importante fator a ser determinado para um radiofármaco de $[^{99m}Tc]$tecnécio utilizado em diagnóstico é a determinação da estabilidade do complexo com relação ao ataque de outros agentes quelantes, particularmente

os resíduos de cisteína e histidina presentes em proteínas. [51] [55] Normalmente,

Normalmente, o teste é realizado colocando o radiofármaco na presença de altas concentrações de cisteína e histidina e utilizado cromatografia para acompanhar variações de Rf. Todavia, devido a dificuldade de se encontrar um sistema cromatográfico que pudesse permitir detetar a quebra da ligação [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$, com formação de [[^{99m}Tc](cisteína)]$^{-}$ e [[^{99m}Tc](histidina)]$^{-}$, decidimos utilizar a eletroforese como método analítico.

Foi utilizado o mesmo sistema descrito para a determinação da carga dos diferentes complexos, inclusive os complexos de [[^{99m}Tc](cisteína)]$^{-}$ e [[^{99m}Tc](histidina)]$^{-}$ (item 4.1.4).

Os resultados apresentados na figura 11, mostram que o complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ é estável por 1 hora, nas temperaturas de 25 ºC e 37 ºC, conforme perfil de distribuição da radioatividade (linhas verde e roxa). Em valores percentuais temos 25,11 % no primeiro pico de retenção (-2 a 2 cm), 38,62 % para o segundo (3 a 6 cm) e 35,02 % para o terceiro (7 a 10 cm), o que pouco variou quando o complexo foi incubado a 37 ºC – 22,80 %, 39,56 % e 36,37 %, respectivamente.

Todavia, após incubado na presença de 1 mmoles de cisteína ou histidina, por 1 hora e a 37 ºC, vê-se claramente a mudança do perfil, com aumento da área do produto com retenção na origem e pequena migração em direção ao catôdo (linhas azul clara e laranja), de modo similar aos complexos de aminoácidos. Retenções de 37,27 % (-2 a 2 cm), 17,56 % (3 a 6 cm) e 43,88 % (7 a 10 cm) quando com o complexo [[^{99m}Tc](cisteína)]$^{-}$ e de 40,02 % (-2 a 2

cm), 22,00 % (3 a 6 cm) e 35,88 % (7 a 10 cm) quando com [[^{99m}Tc](histidina)]$^{-}$ (item 4.1.4).

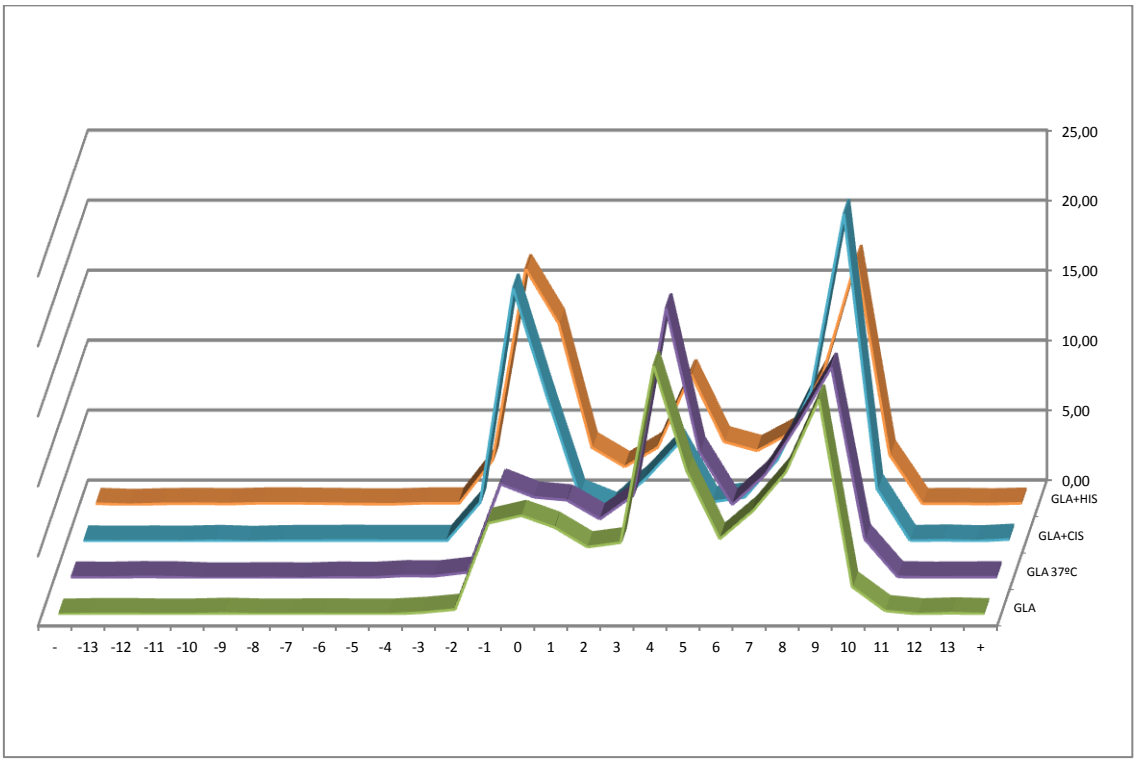


Figura 11: Eletroforese em suporte de papel Whatman 3 e tampão Tris (pH = 8,6), com uma voltagem de 275 V por 1 hora. **Verde claro –** complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ incubado a 25 ºC; **Roxo –** complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ incubado a 37 ºC; **Azul claro –** complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ incubado com cisteína; **Laranja –** complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ incubado com histidina.

4.1.6 – Ligação a Proteínas Plasmáticas e a Albumina

No teste de estabilidade frente à albumina em temperatura ambiente podemos notar uma leve diminuição da quantidade de radiação no front do sistema 2 e o aumento de contagem no front do sistema 3 , indicando que

houve alguma alteração do produto marcado. Os gráficos podem ser visualizados na figura 12.

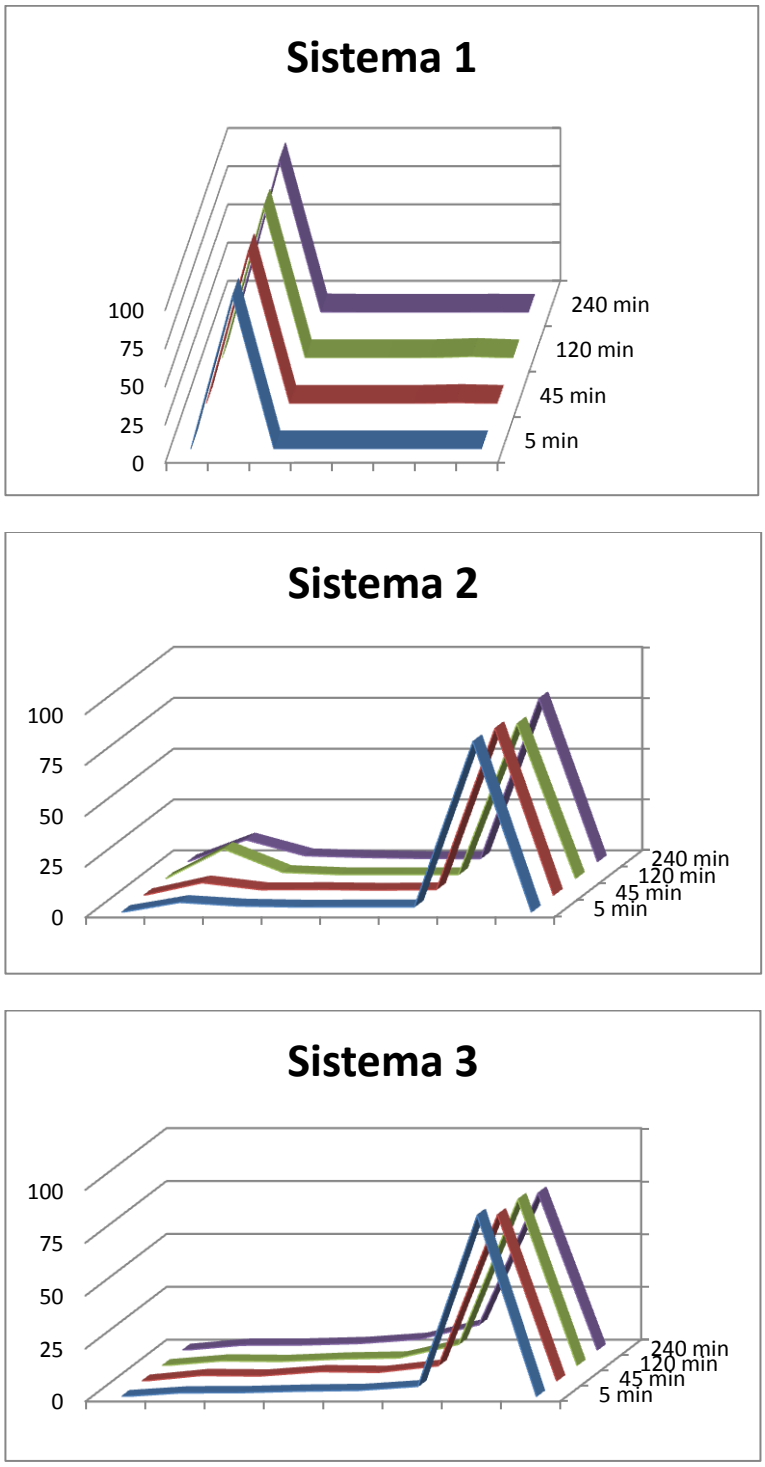


Figura 12: O índice do gráfico refere-se ao percentual de contagens por minuto (cpm); cada cor indica um dos tempos utilizado na avaliação. **Azul –** 5 minutos;

Vermelho – 45 minutos; **Verde –** 120 minutos; **Roxo –** 240 minutos. Nos sistemas: **1)** Whatman 1/acetona; **2)** ITLC-SG/água; **3)** ITLC-SG/solução 1.

Já no teste realizado a 37 ºC, em banho-maria, as fitas foram mensuradas pelo scanner de fitas. Os gráficos obtidos por tempo podem ser observados na figura 13.

No sistema 1, papel Whatman 1/acetona esperávamos que o complexo [[^{99m}Tc]-glucarato]$^{-}$ e eventualmente o complexo de albumina permanecessem na origem do sistema, enquanto uma eventual descomplexação e reoxidação do produto a [[$^{99m}TcO_4$]$^{-}$ faria com que o material migrasse até o fronte. Isto foi observado a partir de 4 horas de incubação com o surgimento de um pico correspondente a 11,30 % no fronte da fita, e passou a 46,67 % após 24 horas.

No sistema 2, ITLS-SG/água, esperávamos observar o [[^{99m}Tc]-glucarato]$^{-}$ e o [$^{99m}TcO_4$]$^{-}$ no fronte do sistema, enquanto o [$^{99m}TcO_2$] e um possível complexo com albumina permanecessem juntos na origem do sistema. Como no sistema 1, após 4 horas de incubação foi observado o aparecimento de um pico na origem do sistema, correspondente a 31,93 % da atividade total, o qual permanece inalterado após 6 horas mas após 24 h a intensidade do pico atinge o valor de 19,39 %, indicando poder se tratar do [$^{99m}TcO_2$] ou um possível complexo com albumina. A questão só é resolvida no terceiro sistema, em que o complexo com albumina migra ao fronte, mostrando que o produto que ser forma após 4 horas é um complexo com albumina.

Com estes dados, podemos sugerir que a molécula de [[^{99m}Tc]-glucarato]$^{-}$ é instável nas condições de estudo, levando possivelmente ao

surgimento de um complexo com albumina, concomitante com a degradação do complexo e reoxidação do metal à forma de $[^{99m}TcO_4]^-$.

Para comprovar os efeitos da albumina e das condições experimentais, um novo teste foi realizado a incubando a amostra a 37 ºC em banho-maria, mas sem a adição de soroalbumina, e os resultados são apresentados na figura 14. Neste caso, somente foi observada degradação do complexo $[[^{99m}Tc]$-glucarato$]^-$ após 24 horas de incubação, com a formação de 28,83 % de $[^{99m}TcO_4]^-$

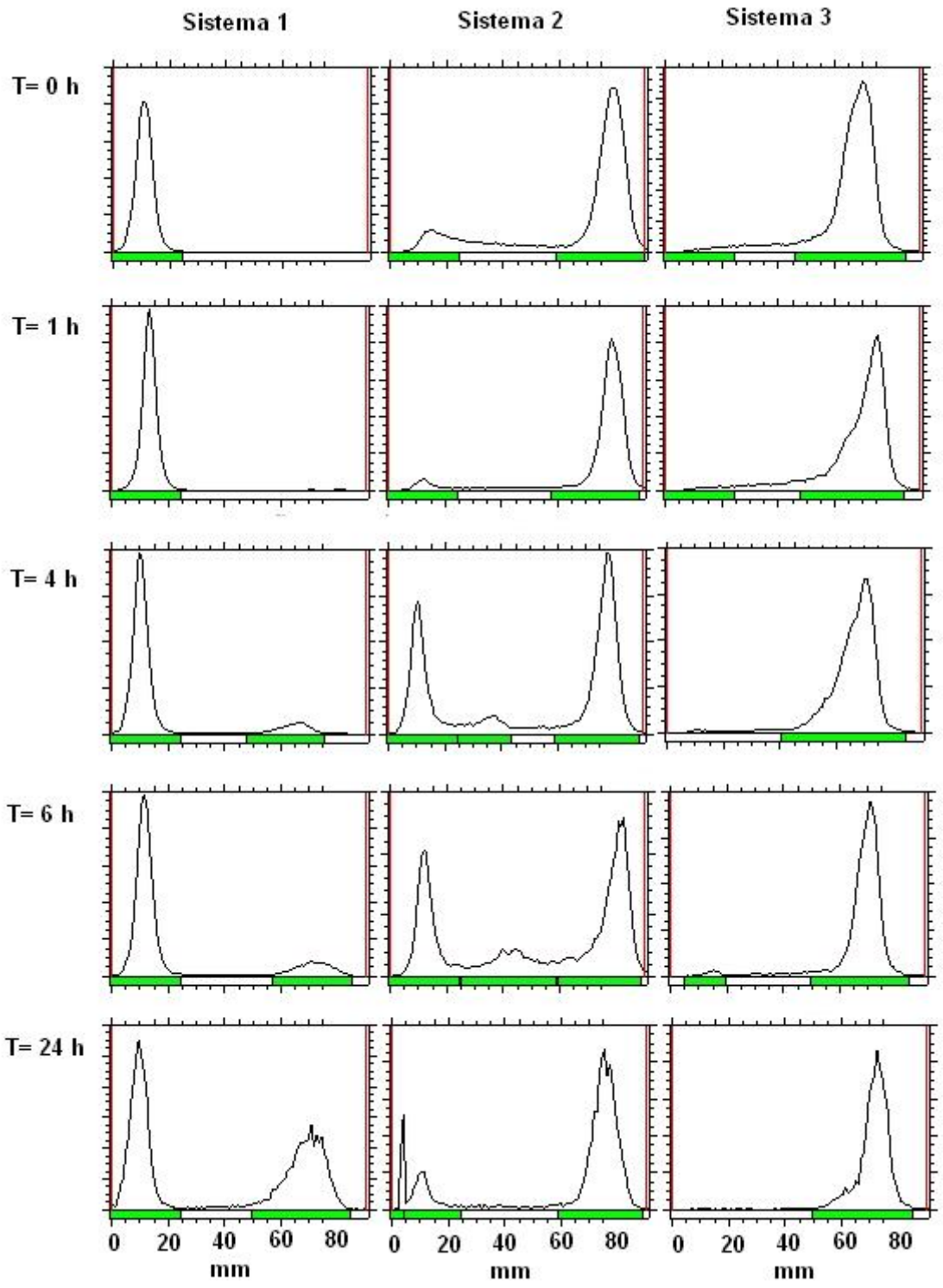


Figura 13: [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ incubado com soroalbumina humana. **Sistemas 1.** Whatman 1/acetona; **2.** ITLC-SG/água; e **3.** ITLC-SG/HSA/solução 1 (água:etanol:hidróxido de amônia - 5:2:1), nos tempos de 0, 1, 4, 6 e 24 horas.

Podemos observar a partir do tempo de 4 horas de incubação, uma mudança do perfil de migração para o sistema 2 (ITLC-SG/água), e um leve aumento do número de contagens no front do sistema 1 (Whatman 1/acetona), que no ultimo tempo – de 24 horas – é muito mais acentuado. O sistema 3 (ITLC-SG/HSA/solução 1) não demonstrou variações significativas em nenhum dos tempos.

Já para o $[[^{99m}Tc]glucarato]^{-}$ incubado em banho-maria, 37 ºC, sozinho, podemos notar mudança de comportamento somente no tempo de 24 horas, onde aparece um pico de contagem no front do sistema 1 (Whatman 1/acetona), visualizado na figura 14.

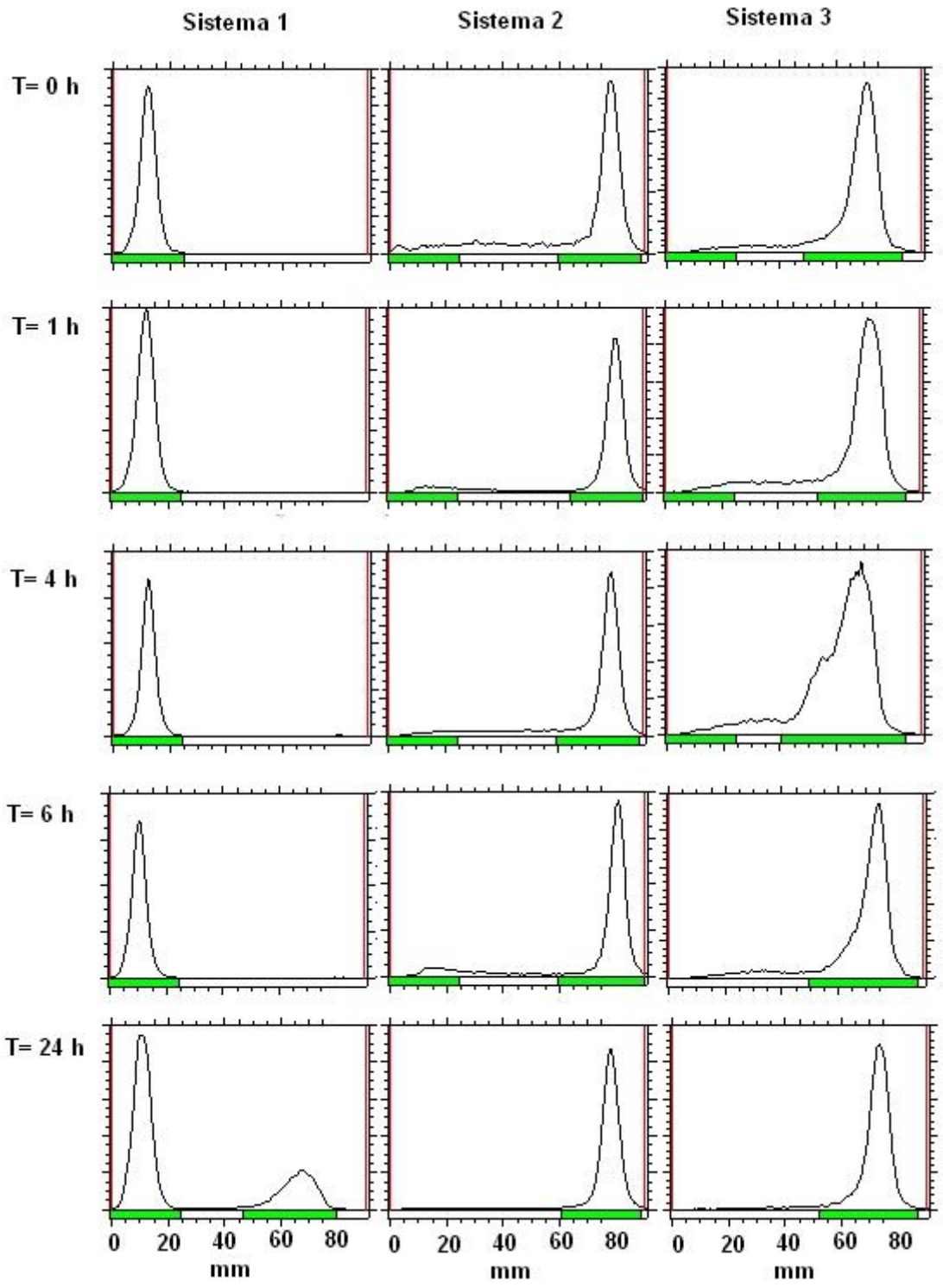


Figura 14: [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ incubado sozinho a 37 ºC. **Sistemas 1.** Whatman 1/acetona; **2.** ITLC-SG/água; e **3.** ITLC-SG/HSA/solução 1(água:etanol:hidróxido de amônia - 5:2:1), nos tempos de 0, 1, 4, 6 e 24 horas.

Uma vez que vários medicamentos são transportados no organismo durante a distribuição ligados à albumina, principalmente aqueles com carcterística ácida [56], decidimos avaliar o grau de ligação do [[^{99m}Tc]-glucarato]$^{-}$ à soroalbumina humana isolada e ao grupo de proteínas presente no plasma humano. Os resultados apresentados (figura 15) indicam taxa de ligação relativamente alta – variam de 37 a 57 % - com uma maior taxa de ligação às proteínas do plasma, nos tempos iniciais, mas que apresenta pouca diferença em relação à ligação à soroalbumina humana após 240 minutos de incubação.

Tendo em vista que a concentração de albumina no plasma representa 50 % do total de proteínas plasmáticas, os resultados obtidos sugerem que o complexo se liga preferencialmente a albumina, dado a similaridade de taxa de ligação. Experimento realizado em nosso grupo com o complexo [[^{99m}Tc]-$(O)_2$HL91] apresentou taxas de ligação muito diferentes para a albumina pura e para o conteúdo do plasma.

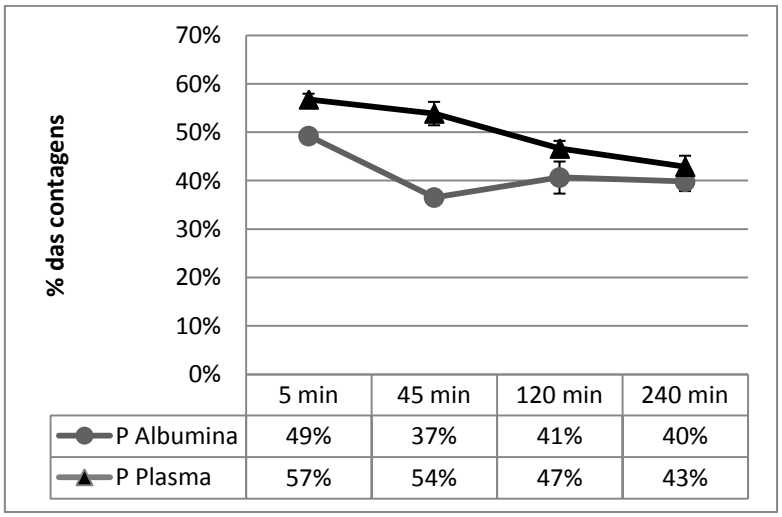


Figura 15: Taxa de ligação do [[^{99m}Tc]-glucarato]$^{-}$ às proteínas determinado por precipitação das macromoléculas em etanol seguido de centrifugação. ● **–** precipitado da albumina; ▲ **–** precipitado do plasma.

Esse percentual de ligação não pôde ser visualizado no ensaio por cromatografia em camada delgada, e isso se justifica pelo fato de as interações com as proteínas transportadores serem reversíveis, pois quanto maior a afinidade com a proteína transportadora, menor sua disponibilidade para o tecido-alvo. [56]

4.2 – Preparação do (^{18}F)FAZA

O (^{18}F)FAZA foi preparado, como representado na figura 16, segundo procedimento descrito na literatura para um processo de marcação não automatizado, ou seja, todas as etapas da reação foram realizadas manualmente. Devemos lembrar que, diferentemente do processo de produção da (^{18}F)FDG, em que o produto final pode ser obtido puro após passagem em uma série de filtro sep-pak, o produto de reação para obtenção do (^{18}F)FAZA precisa ser purificado por HPLC.

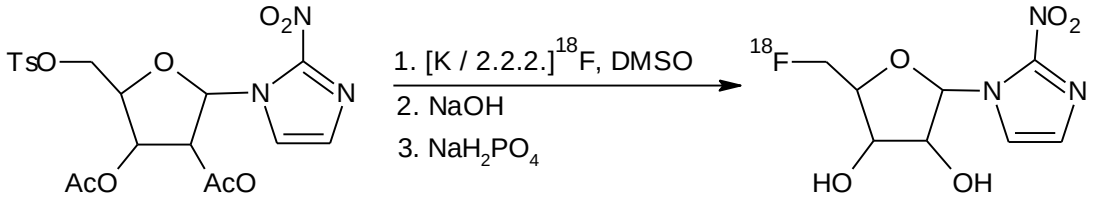


Figura 16: Reação de síntese do (^{18}F)FAZA a partir de seu precursor.

Inicialmente, após o final da reação o produto foi analisado em HPLC, com passagem das amostras simultaneamente em detetor de UV a 340 nm (picos em 6,2; 16,3 e 21,5 minutos) e de radiação (picos em 3,5; 8,0; 16,2 e 25,5 minutos). Além disto, previamente foram analisados, por UV, uma amostra do produto de referência, no qual o flúor é um isótopo estável, e uma amostra do fluoreto radioativo. Todos os cromatogramas são apresentados na figura 17, e fica evidente a obtenção do (^{18}F)FAZA (detetor de radiação) quanto comparado ao tempo de retenção de 15,5 minutos do (^{19}F)FAZA padrão.

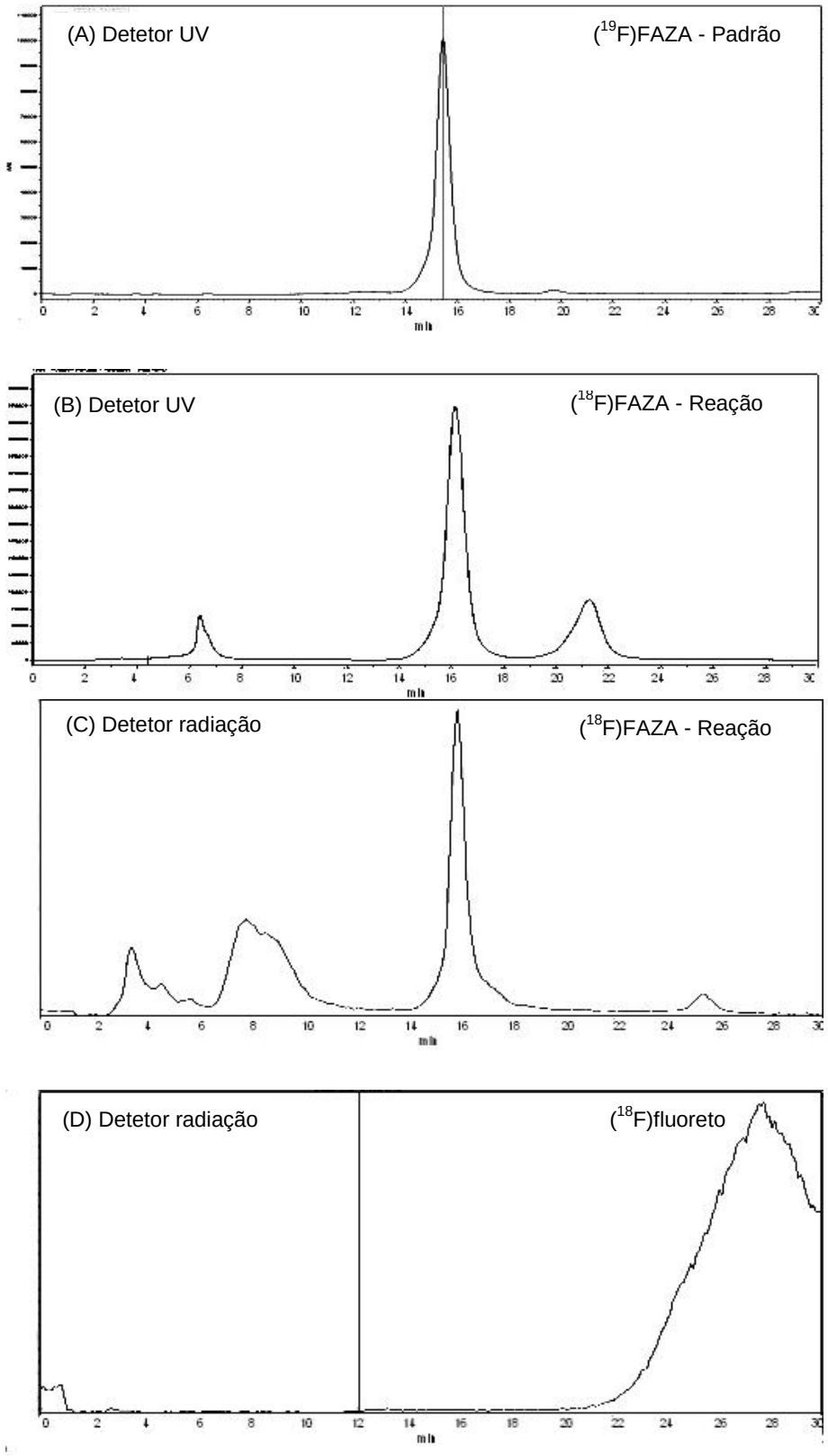


Figura 17: Cromatogramas **(A)** (^{19}F)FAZA – Padrão não radioativo detetado por UV a 340 nm; **(B)** Produto para reação para obtenção do (^{18}F)FAZA

detetado por UV a 340 nm; **(C)** Produto para reação para obtenção do (^{18}F)FAZA detetado pela emissão de radiação; **(D)** (^{18}F)fluoreto detetado pela emissão de radiação.

Nos cromatogramas do produto de reação obtidos tanto em UV quanto por radiação foram registrados outros picos além do produto de interesse. O (^{18}F)fluoreto radioativo foi identificado e tem tempo de retenção próximo aos 25 minutos.Todavia faltava identificar esses outros picos, então fizemos as análises de outros possíveis subprodutos de cada etapa da reação, a saber: precursor hidrolisado (AZAOAc) e a solução de reação antes da etapa de hidrólise – aqui denominado de (^{18}F)FAZAOAc.

No caso do AZAOAc, o precursor hidrolisado da reação foi injetado no HPLC e registrado em UV a 340 nm, conforme figura 18. O tempo de retenção obtido foi de 21,8, concordante com o pico observado no cromatograma de reação analisado em UV (figura 17).

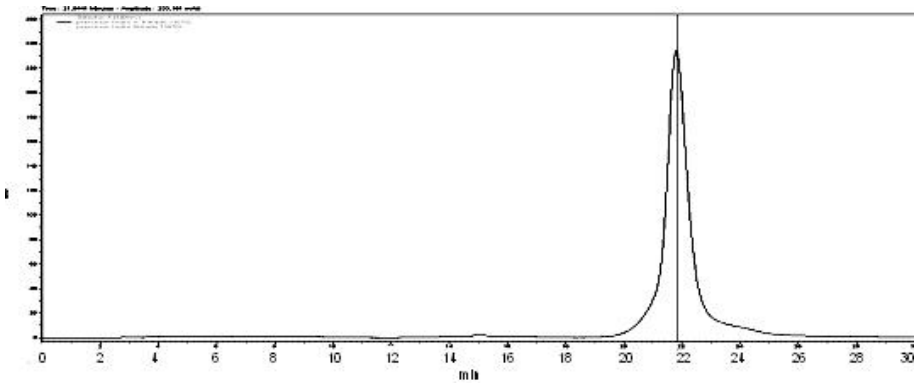


Figura 18: Cromatograma em UV a 340 nm do precursor AZA após etapa de hidrólise igual a realizada para a reação de fluoração do (^{18}F)FAZA.

Também uma alíquota da reação de fluoração do AZA foi retirada antes da etapa de hidrólise e analisada em HPLC nos detetores de UV e radiação. No caso do registro em UV foi detetado um pico com tempo de retenção de em

6,1 minutos, sugerindo tratar-se do produto objeto de substituição do grupo tosilato por nucleófilo, provavelmente a H_2O, gerando o AZAOAc. Descartamos tratar-se do precursor TsAZAOAc integro, uma vez que o mesmo não apresenta absorção a 340 nm. O registro no detetor de radiação mostrou aquilo que já parece ser o produto final (^{18}F)FAZA, com tempo de retenção em 16,3 minutos, e outros três picos com tempos de retenção em 3,5; 7,0 e 9,0 minutos.

O produto com tempo de retenção em 3,5 minutos não pode ser identificado e ele permanece como contaminante, mesmo após a etapa de purificação, como veremos mais adiante; os outros dois picos sugerem ser o (^{18}F)FAZAOAc com diferentes graus de hidrólise, o que vemos no cromatograma da reação geral como um pico entre 6 e 10 minutos, o qual é eliminado no processo de purificação.

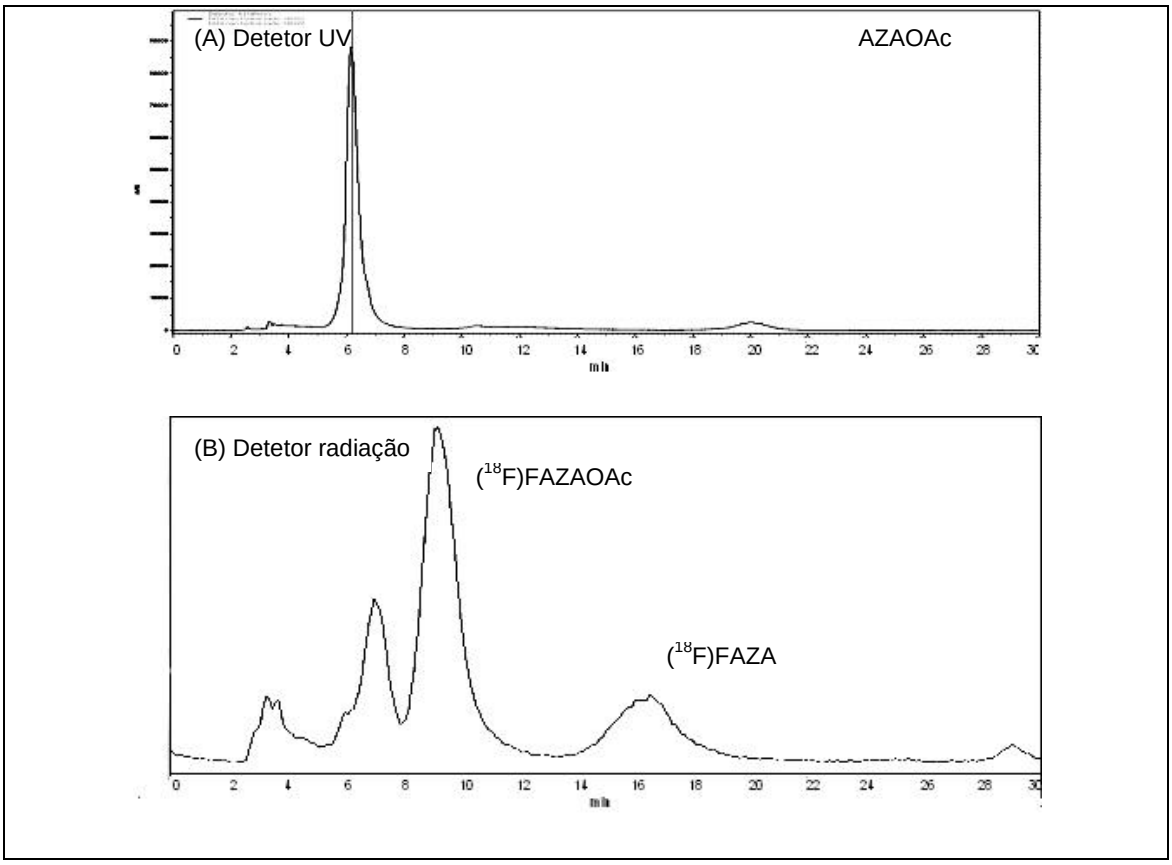


Figura 19: Cromatogramas do produto de reação para obtenção do do (^{18}F)FAZA antes da fase de hidrólise. **(A)** Deteção por UV a 340 nm; **(B)** deteção por emissão de radiação.

4.2.1 – Purificação do (^{18}F)FAZA

Para a purificação do produto desejado – (^{18}F)FAZA, utilizamos o mesmo tipo de coluna em sua versão semi-preparativa como fase móvel acetonitrila:tampão fosfato 5 mM (65:35), em mesma coluna C18, diferenciando apenas o fato de ser semi-preparativa – ao contrário do que é relatado nos artigos, onde se usa como fases móveis soluções de etanol:tampão fosfato ou metanol:tampão fosfato. [35] [57] **Fonte bibliográfica inválida especificada.** [58], uma vez que estes sistemas não estavam nos permitindo isolar o produto.

Devido a impossibilidade de acompanhar o registro da saída do material radioativo diretamente no detetor de radiação, devido a alta atividade da amostra e sensibilidade do detetor, as frações foram coletadas manualmente em frações de 4 mL/min e o produto eluído nos tempos de 5 e 6 minutos, que era a sequência que continha a maior radioatividade, foram misturados e reanalisados, utilizando o procedimento padrão (figura 20).

Para se ter certeza do produto eluído na coluna semi-preparativa, amostra do padrão (^{19}F)FAZA foi eluída nas mesmas condições.

Uma vantagem ao utilizarmos essa nova fase móvel, foi permitir a evaporação mais rápida do solvente e a reformulação do produto final em um volume adequado aos estudos biológicos a serem realizados posteriormente.

A pureza radioquímica aumentou de 44,80 % para 86,72 %. Neste ponto, o rendimento de reação foi de 17,9 % (não corrigido para o decaimento).

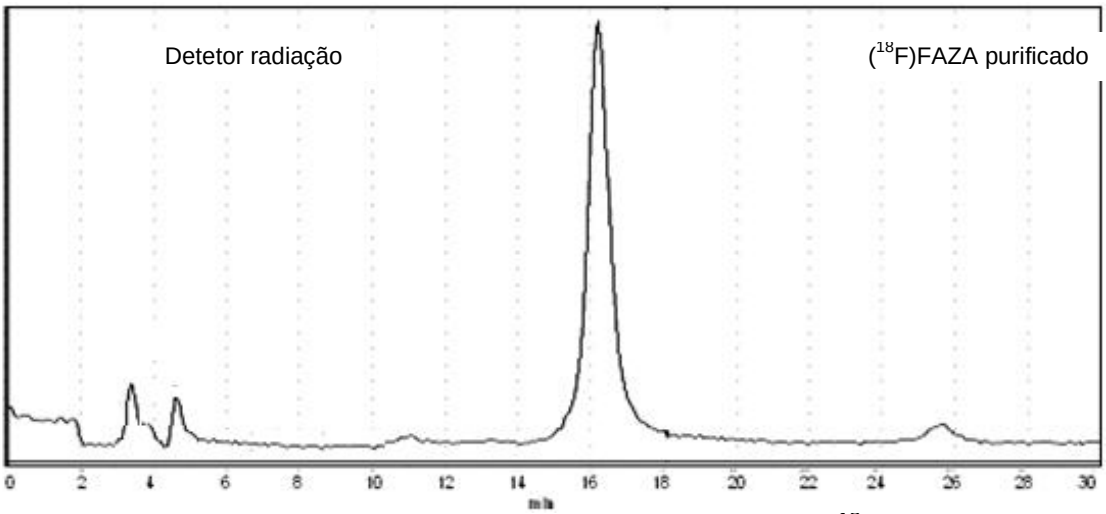


Figura 20: Cromatograma em detetor de radiação do (^{18}F)FAZA após a purificação e evaporação da acetonitrila.

4.2.2 – Determinação da atividade específica do (^{18}F)FAZA

Para o cálculo da atividade especifica foi necessária a determinação das áreas dos picos resultantes da análise detetor UV para as diferentes concentrações utilizadas no estudo. Com os valores de área e as concentrações dadas em mol, foi possível traçar uma linha de tendência, que pode ser visualizada na figura 21. Através da equação resultante, foi possível calcular a atividade específica da injeção no final da síntese, que foi de 333 MBq/mmol.

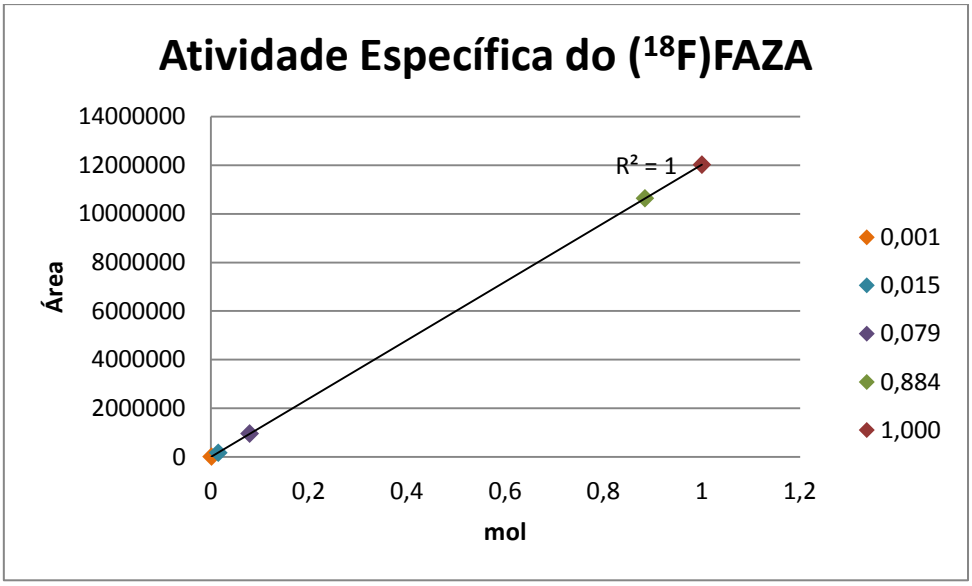


Figura 21: Gráfico demonstrando a linha de tendência traçada para o cálculo da atividade específica do (^{18}F)FAZA.

4.3 – Estudos biológicos *in vitro*

4.3.1 – Análise de parâmetros bioquímicos nas culturas de células em normóxia e hipóxia

As células tumorais B16F10 e Tm1N3 foram cultivadas em meio de cultura apropriado, em condições de normóxia e de hipóxia (1 % de O_2, 94 % de N_2 e 5 % de CO_2). Para entender como essas duas condições alteravam alguns dados bioquímicos, amostras da solução da cultura das células, em ambas as condições, e do meio de cultura original foram analisados em um equipamento para gasometria - Radiometer ABL800 Flex.

Os resultados encontrados são apresentados nas tabelas 1 e 2, e mostram claramente como a hipóxia altera o metabolismo celular, diminuindo o pH do meio, aumentando o consumo de glicose e a liberação de ácido lático, em concordância com outros trabalhos descritos na literatura. [59]

Parâmetros como a pressão de CO_2 e de O_2 foram mensuradas para possível correlação com estudos futuros.

Tabela 1: Dados bioquímicos de meio de cultura e meio de cultura contendo células de tumor murino B16F10 mantidas e condições de normóxia ou hipóxia.

Linhagem celular B16F10			
Dados bioquímicos	**Condições experimentais**		
	Hipóxia	**Normóxia**	**Meio sem células**
pH	6,62	6,94	7,30
cGlu	2,23	3,73	10,67
cLac	15,33	12,27	1,40
pCO_2	29,37	16,67	20,77
pO_2	137,33	145,33	155,67

pH = concetração hidrogenioiônica, cGlu e cLac = concentração de substratos em mmol/L, pCO_2 d PO_2 = pressão dos gases em mmHg.

Tabela 2: Dados bioquímicos de mieo de cultura e meio de cultura contendo células de tumor murino Tm1N3 mantidas e condições de normóxia ou hipóxia.

Linhagem celular Tm1N3			
Dados bioquímicos	**Condições experimentais**		
	Hipóxia	**Normóxia**	**Meio sem células**
pH	6,74	6,96	7,28
cGlu	4,37	5,50	11,03
cLac	11,97	10,00	0,67
pCO_2	31,17	18,47	22,33
pO_2	139,00	147,33	156,67

pH = concetração hidrogenioiônica, cGlu e cLac = concentração de substratos em mmol/L, pCO_2 d PO_2 = pressão dos gases em mmHg.

4.3.2 – Captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ em normóxia e hipóxia

Na avaliação da captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^-$ em células foram seguidos procedimentos padrão utilizados em nosso laboratório, com a variante

de que um grupo de células foi mantido sob atmosfera 1 % de O_2, 94 % de N_2 e 5 % de CO_2 (hipóxia). [42]. Esse grupo permaneceu sob hipóxia por 24 horas, onde após esse período o meio foi trocado, o radiofármaco adicionado ao meio e as células voltaram à essa condição por tempos pré-determinados (15, 60, 120 e 240 minutos). O mesmo foi procedido para o grupo que permaneceu em condição de normóxia.

De modo geral não observamos diferença de captação do radiofármaco nas células sob condição de hipóxia ou normóxia, exceto no tempo de 1 hora, quando a captação em hipóxia foi 1,5 vezes maior que a observada em normóxia. Todavia, em valores absolutos, as taxas de captação são tão baixas que não apresentam nenhum resultado prático (figura 22).

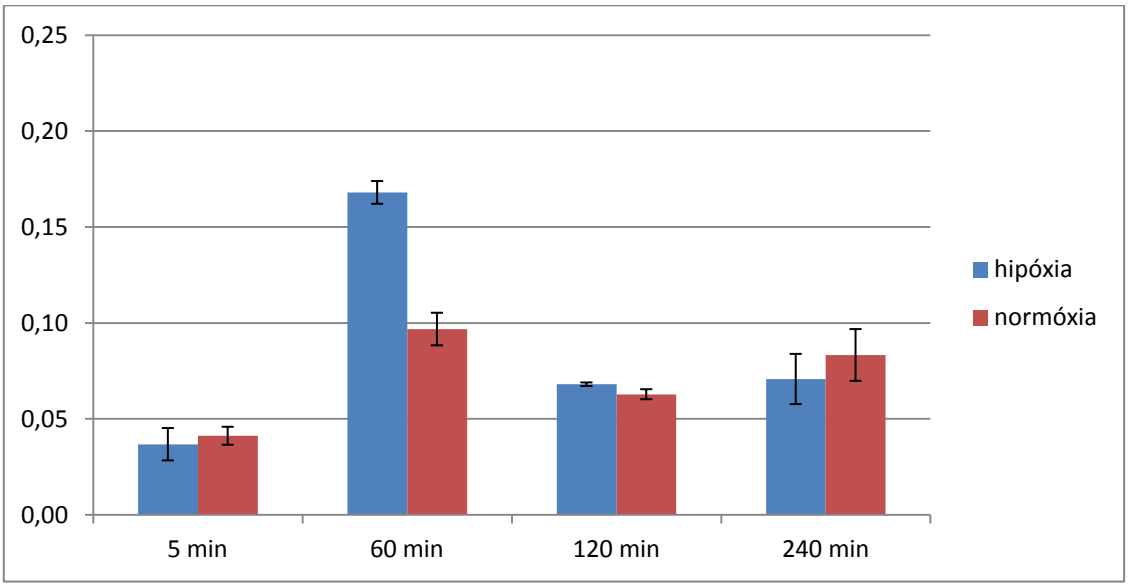


Figura 22: Captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em B16F10. **Azul –** em hipóxia; **Vermelho –** em normóxia.

A fim de avaliar a interferência da glicose contida no meio, alteramos o meio de cultura das células do RPMI para um meio de baixa concentração de glicose, comparando o uso de meio com e sem glicose. Observamos que, ao

utilizarmos o meio com glicose em sua composição, em nenhum dos tempos a condição de hipóxia favoreceu a captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ pelas células, ao contrário, diminuindo até o tempo de 120 minutos, onde a taxa de captação volta a subir, no entanto, não alcança a encontrada sob normóxia (figura 23). Utilizando o meio sem glicose, temos um leve aumento da captação em condição de hipóxia, em relação à normóxia, que, no entanto, não é significativa.

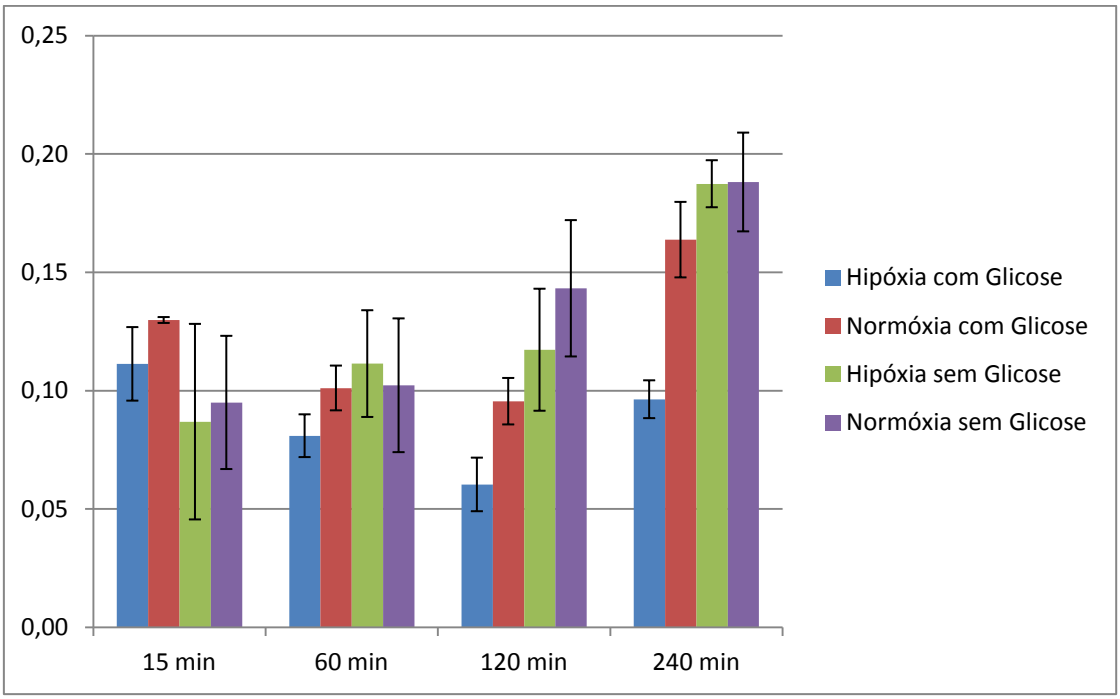


Figura 23: Captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em B16F10. **Azul –** em hipóxia com glicose; **Vermelho –** em normóxia; **Verde –** em hipóxia sem glicose; **Roxo –** em normóxia sem glicose.

O mesmo foi realizado com relação as células da linhagem Tm1N3, as quais, ao contrário da B16F10, demonstraram uma curva de captação bem definida quando do meio sem glicose, apesar de como na outra, não apresentar aumento de captação em condições de hipóxia. Para o meio com glicose me sua composição, a taxa de captação foi a mesma até o tempo de

120 minutos, sendo superada pelo grupo em condições de normóxia após 240 minutos (figura 24).

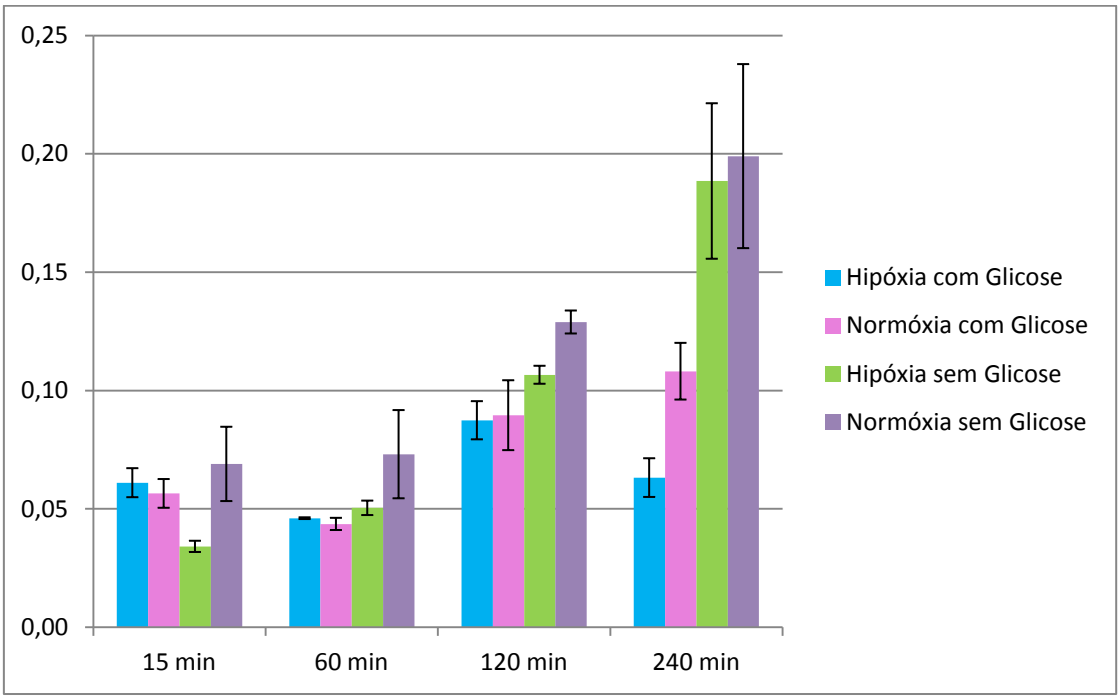


Figura 24: Captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em Tm1N3. **Azul claro –** em hipóxia com glicose; **Rosa –** em normóxia; **Verde claro –** em hipóxia sem glicose; **Lilás –** em normóxia sem glicose.

Além disto, também utilizamos células de carcinoma mamário MDA-mb-468. Estas foram escolhidas como modelo de captação, também, por ter sido inclusa nos ensaios como referência para avaliação de Glut1 por citometria de fluxo (item 4.3.3). Pudemos observar uma maior captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ nas células em condições de hipóxia, quando comparada àquelas mantidas em condições de normóxia, da ordem de 1,5 vezes, tanto para as células B16F10, quanto para a MDA-mb-468, nos tempos de 5 e 60 minutos, mas sem se observar aumento na taxa de captação entre os dois pontos medidos (figura 25).

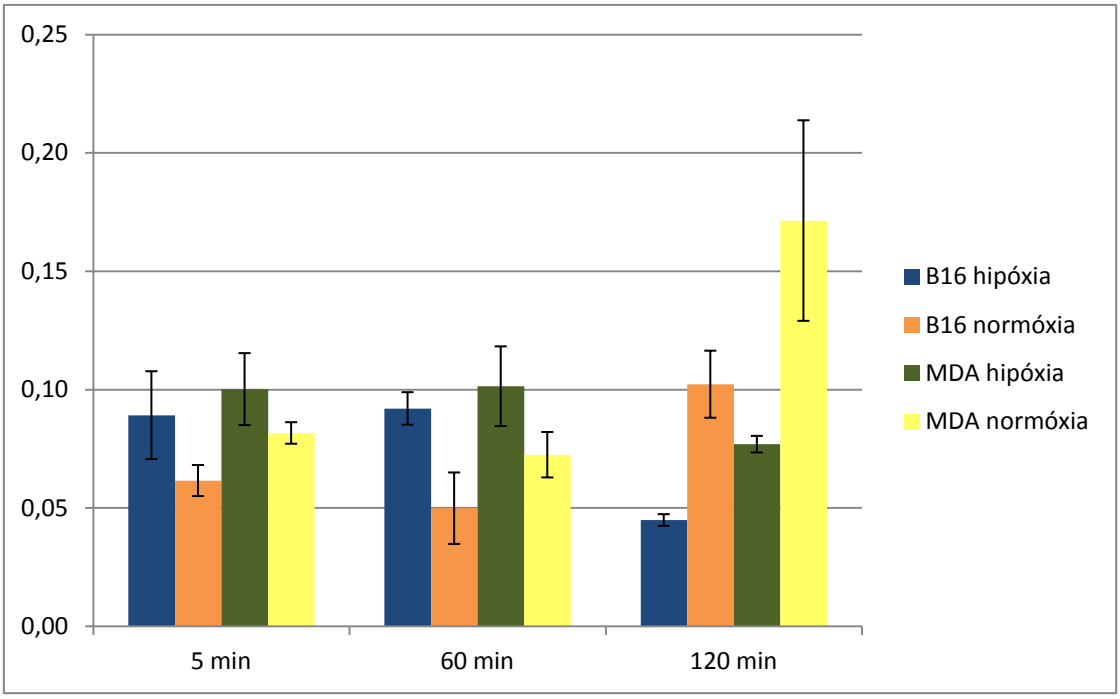


Figura 25: Captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em B16F10 cultivada em meio de baixa glicose. **Azul escuro –** em hipóxia; **Laranja –** em normóxia; e em MDA-mb-468 cultivada em meio de baixa glicose, **Verde oliva –** em hipóxia; **Amarelo –** em normóxia.

Um resultado intrigante foi a reversão, aos 120 minutos, na taxa de captação nas células em condições de hipóxia e normóxia, que caiu de 1,5 vezes para aproximadamente 0,5 vezes, ou seja, maior nas células em normóxia (figura 25). Novamente, as taxas de captação são tão baixas que não apresentam nenhuma aplicação prática.

4.3.3 – Captação do (^{18}F)FAZA em normóxia e hipóxia

Já a captação do (^{18}F)FAZA, realizada somente em células B16F10, demonstrou possuir uma taxa de captação bem elevada quando em comparação ao [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$, no entanto, a taxa máxima obtida não chega a 1 % (figura 26). A taxa de captação em hipóxia supera a encontrada quando em situação de normóxia até os 60 minutos, como o esperado. Todavia, no tempo de 180 minutos observamos um decréscimo na taxa de captação nas duas situações, sendo aquela em normóxia superando a de hipóxia.

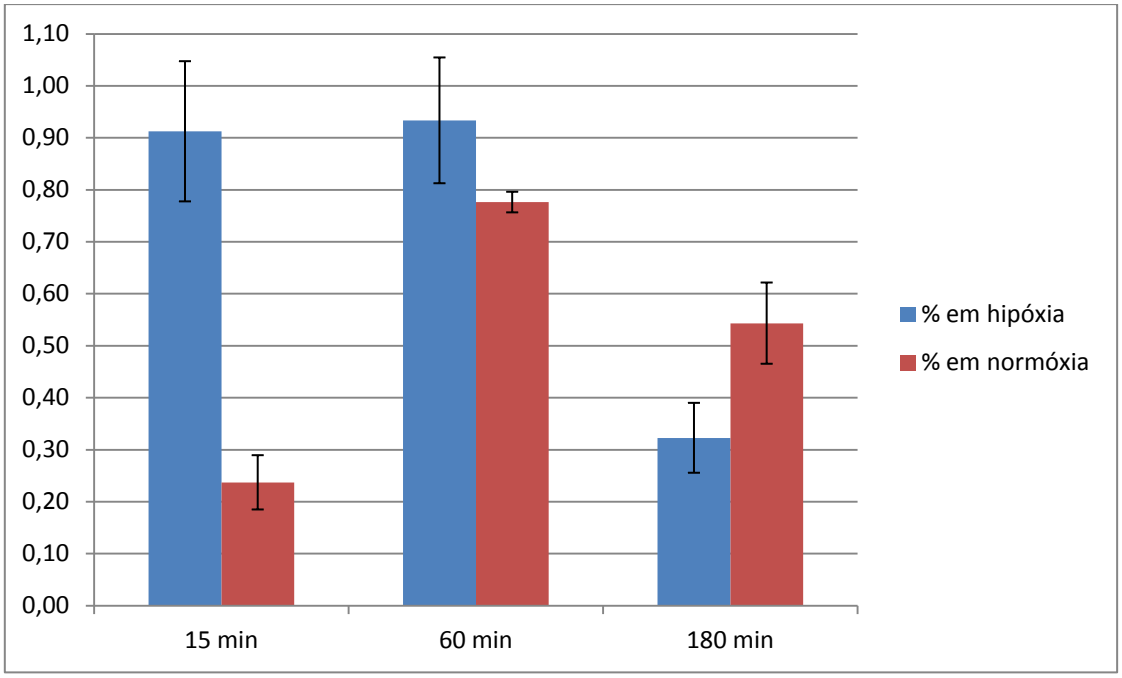
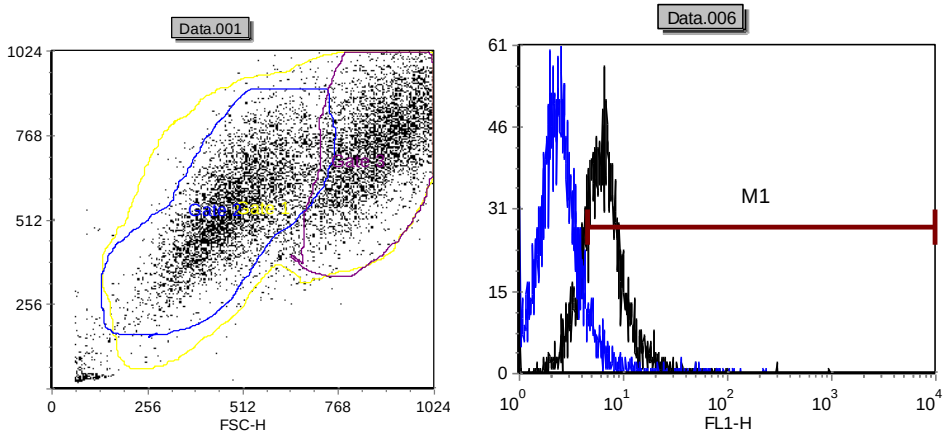


Figura 26: Captação do (^{18}F)FAZA em B16F10. **Azul.** em hipóxia; **Vermelho.** em normóxia.

4.3.4 – Citometria

Esse ensaio foi realizado com o intuito de reconhecer a expressão de Glut1 nas células de estudo, B16F10. Para isso, foram utilizadas células MDA-mb-468, referidas como padrão para a expressão desse receptor. [45]

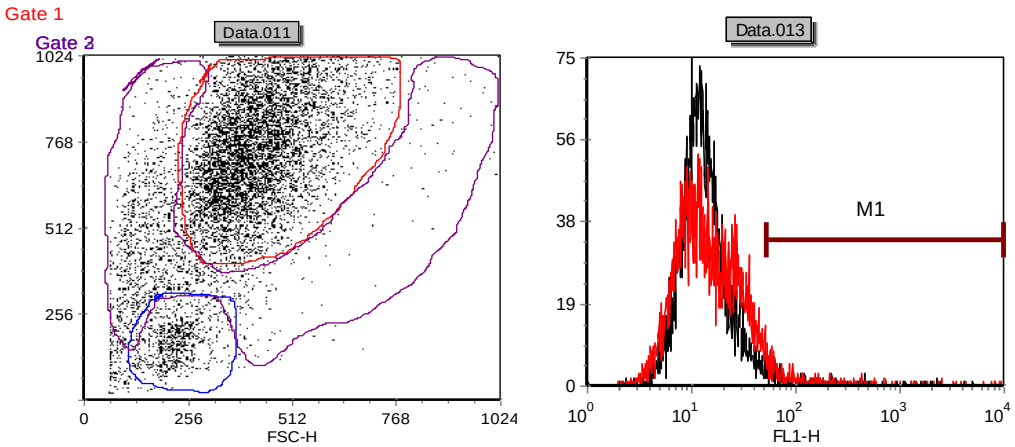
No ensaio para MDA-mb-468, podemos ver o perfil das células através do *dot plot*, o qual apresenta duas populações de células. Através da seleção dessas populações, podemos ver que aquela que apresentava a distinção entre os anticorpos era a selecionada pelo *gate 2.* Desta forma, foram juntados os dados obtidos para a aquisição das células marcadas com o isotipo e com o anti-Glut1 em um histograma, demonstrando a diferença entre os dois, como pode ser visualizada na figura 27 abaixo:



Histogram #	Filename	Parameter	# of Events	% of all cells	% of gated cells	Median	Geometric Mean	CV	Peak Value	Peak Channel
1	Data.006	FL1-H	3605	36.05	75.97	6.98	7.65	207.74	57.0	6.49
2	Data.005	FL1-H	5341	53.41	100.0	2.37	2.51	211.71	61.0	2.53

Figura 27: *Dot plot* com o perfil das células MDA-mb-468 (gate 2 – em azul), e histograma com o perfil do isotipo (em azul) e do anti-Glut1 (em preto), com dados de aquisição na tabela.

Já para as células B16F10, podemos observar apenas uma população mais forte, no *dot plot*, demonstrada na seleção pelo *gate 1* (figura 28). E no histograma, para avaliação da presença de Glut1 nessas células, vemos na verdade, uma sobreposição do anticorpo de interesse sobre o isotipo utilizado (figura 29), não sendo possível, desta forma, afirmar a presença do mesmo.



Histogram #	Filename	Parameter	# of Events	% of all cells	% of gated cells	Median	Geometric Mean	CV	Peak Value	Peak Channel
1	Data.013	FL1-H	242	2.42	3.19	87.77	128.73	210.21	7.0	56.74
2	Data.012	FL1-H	7484	74.84	100.0	13.46	15.27	870.08	53.0	11.34

Figura 28: *Dot plot* com o perfil das células B16F10, e histograma com o perfil do isotipo (em vermelho) e do anti-Glut1 (em preto), com dados de aquisição na tabela.

Todavia, ensaio realizado em nosso grupo referente ao efeito da captação de ^{18}FDG (sabidamente mediado por Glut1) em células B16F10 mostrou crescente captação do radiofármaco, atingindo a taxa de aproximadamente 30 % após 60 minutos. Esta captação intensa foi totalmente bloqueada com diferentes concentrações de D-glicose. Assim, outros experimentos precisam ser realizados para melhor entender o ocorrido.

Park, 2012 confirma que a captação do (^{18}F)FDG está correlacionada em melanomas com a expressão tanto de Glut1 como a de Glut3. No entanto,

ele discute trabalhos onde a expressão de Glut1 pode estar suprimida em algumas linhagens de melanoma, expressando, assim, somente Glut3. [60] Não foram feitas análises para a linhagem Tm1N3. A expressão de Glut3 não foi avaliada por não haver anticorpo anti-Glut3 murino disponível. Enquanto Isnardi, 2012 demonstra que o [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ é captado via Glut5, o mesmo transportador da frutose o que corrobora a baixa captação encontrada nos ensaios com o perfil de expressão. [61]

4.4 – Estudos biológicos *in vivo*

4.4.1 – Biodistribuição por imagem

Após 14 dias do inóculo das células tumorais em região inguinal, o animal foi injetado com cerca de 185 MBq e foram adquiridas imagens cintilográficas dinâmicas num total de 106 quadros (1 quadro/minuto). O animal foi anestesiado com uma mistura de isofluorano:O_2 (1,5:2,5 L), num fluxo médio de 2 L/min.

As imagens foram processadas em programa ImageJ, e através de um quadro tardio da imagem dinâmica é possível perceber um delineamento da região tumoral (figura 29). O [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ teve uma captação muito alta nos rins e bexiga – órgãos de eliminação, os quais podem ser visualizados perfeitamente na imagem, bem como a cauda – região de injeção do radiofármaco (injetoma). No entanto, há uma captação considerável no corpo todo do animal, possivelmente por se tratar de um análogo de glicose.

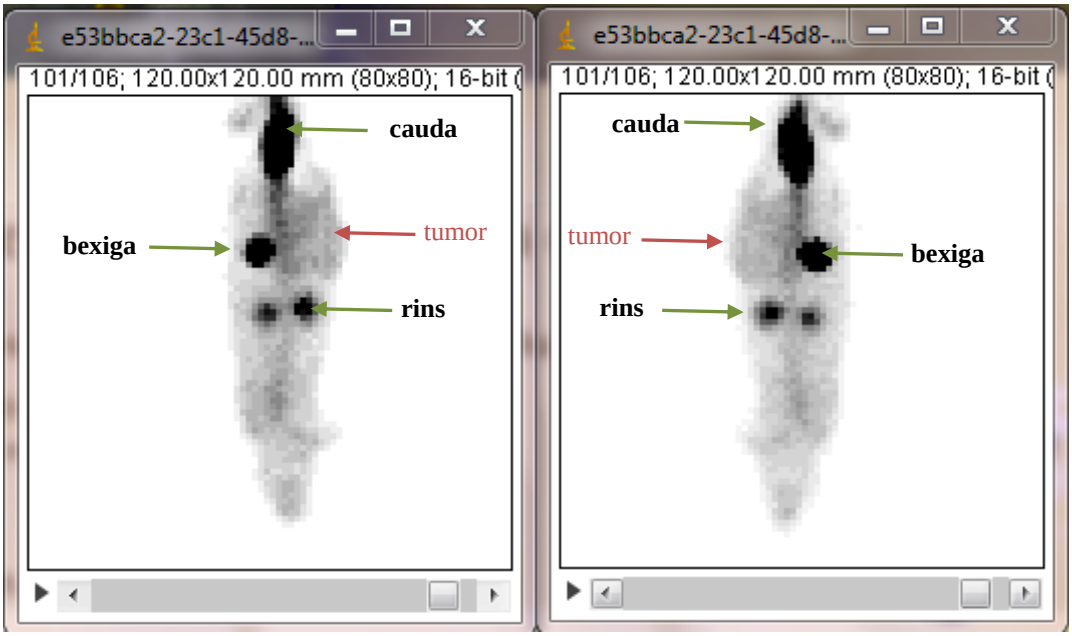


Figura 29: Imagem γ- cintilográfica dinâmica de 2 horas do animal 1 (detetor 1 e 2) – quadro tardio. ImageJ.

Como o tumor do animal foi considerado demasiado grande, utilizamos um animal com apenas 7 dias pós-inóculo, em região inguinal, o qual foi injetado com cerca de 148 MBq e foram adquiridas imagens planas e tomográficas por SPECT. Não foi possível a distinção da área tumoral através de imagem cintilográfica neste animal (figuras 30 e 31), mesmo na imagem estática tardia (figura 31). No entanto, podemos observar com clareza os rins e a bexiga, órgãos que fazem parte da via de eliminação do radiofármaco [^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$, além da cauda (local de injeção do radiofármaco). Após 3h, podemos observar o delineamento da estrutura óssea e articulações (figura 31). Dada a afinidade do glucarato pelo cálcio (Ca^{2+}), é possível que haja a dissociação do complexo, com o glucarato se ligando ao componente mineral da matriz óssea (cristais de hidroxiapatita, fosfato, cálcio) e o [^{99m}Tc]tecnécio ao componente orgânico (colágeno), como ocorre com o $[[^{99m}Tc](OH)_2(mdp)_2]^{2-}$. [62]

Figura 30: Imagem γ-cilográfica dinâmica de 1 hora do animal 2. ImageJ.

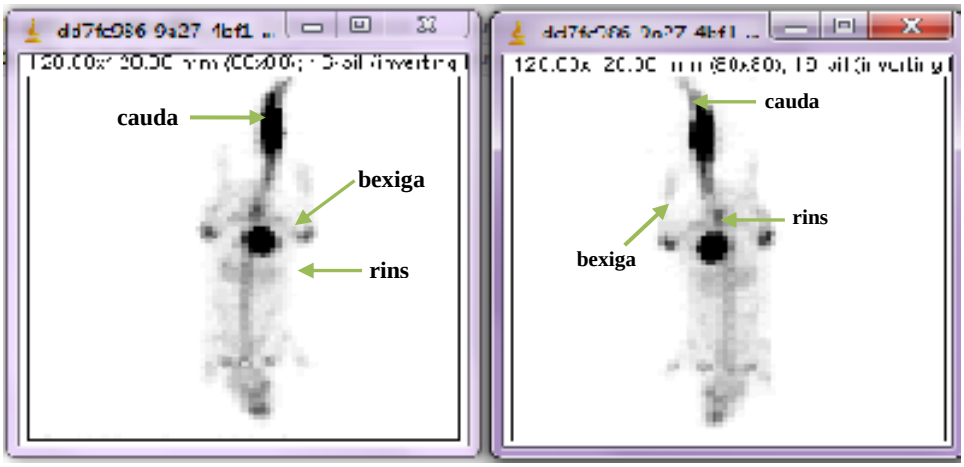


Figura 31: Imagem γ-cilográfica estática do animal 2, 3 horas p.i.. ImageJ.

No entanto, o tumor pôde ser identificado através das imagens tomográficas SPECT/CT (figura 32), onde a bexiga do animal está bem próxima ao tumor. Isto pode explicar o motivo da não visualização do mesmo através da imagem cintilográfica plana, uma vez que a captação do complexo na bexiga é muito maior do que nas áreas de interesse dentro do tumor, e, pela localização, pode haver um mascaramento, mesmo em imagem tardia, onde a captação em bexiga ainda é intensa.

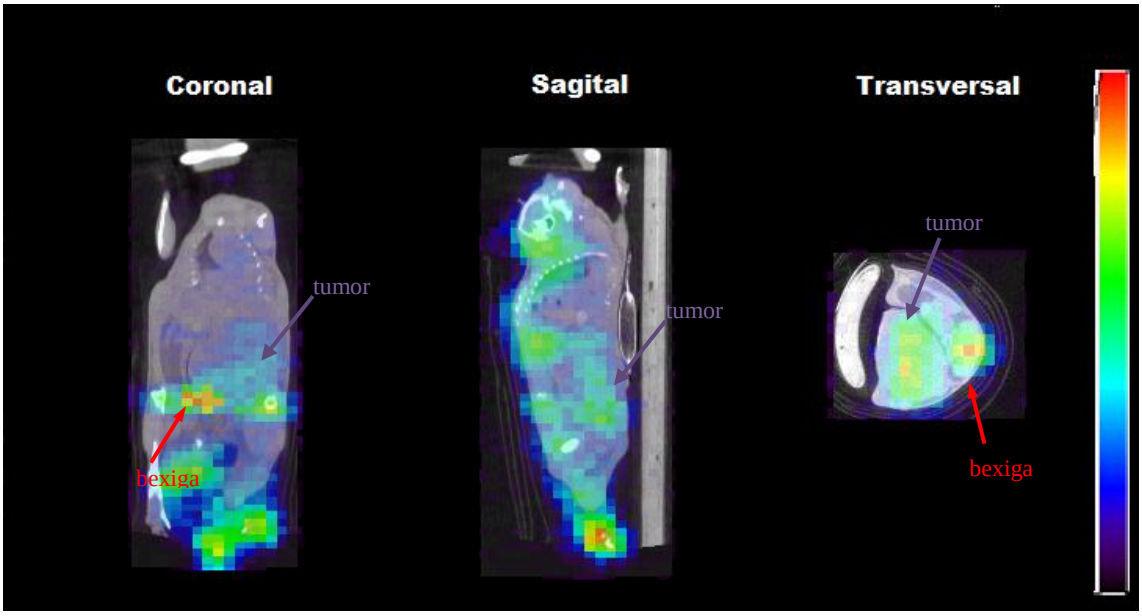


Figura 32: SPECT/CT de animal com implante de células B16F10 e injetado com cerca de 148 MBq de [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$. Amide.

Uma vez constatado que o sistema urinário é a via de eliminação do complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$, o tumor foi implantado preferencialmente em região de tórax, para menor interferência vesical.

Em animal com implante de B16F10 em região toráxica, podemos visualizar em imagem fusionada do tipo PET/CT pontos hipercaptantes dentro do tumor, provavelmente correspondentes a regiões de hipóxia (figura 33). No entanto, em partes fisiológicas, vemos além da bexiga, conhecido órgão de excreção, capação acentuada em regiões ósteo-articulares, como em joelhos e coluna. Pontos de hipercaptação no abdômen também podem ser vistos, e são esperados, uma vez que é relatada a eliminação do radiofármaco através do trato biliar, após metabolização hepática. [63]

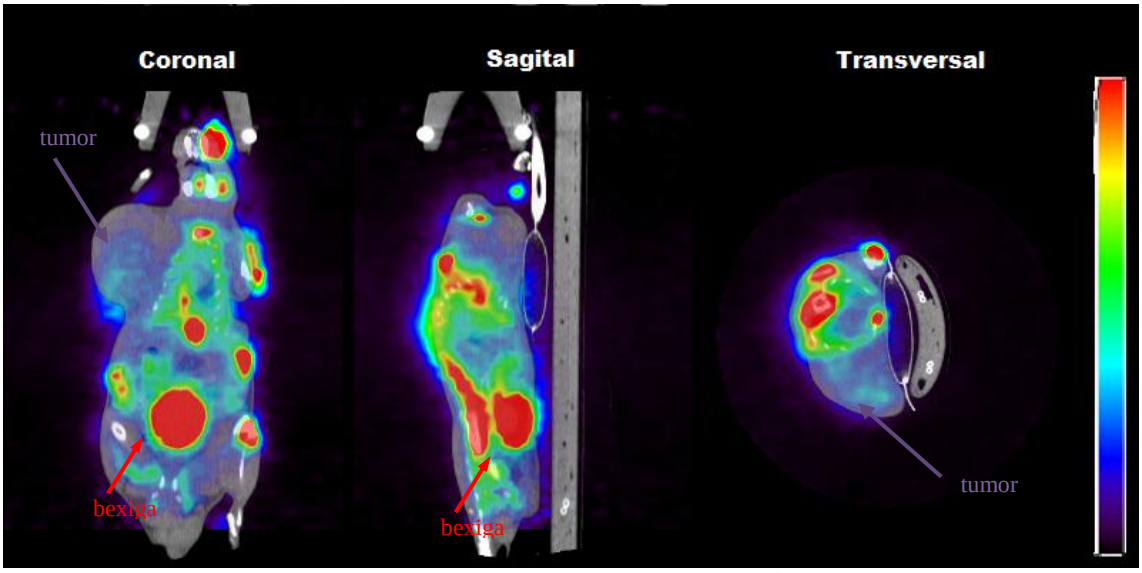


Figura 33: PEC/CT de animal com implante de células B16F10 e injetado com cerca de 74 MBq do (^{18}F)FAZA. Amide.

A fim de compararmos a captação dos dois radiofármacos do estudo com a do (^{18}F)FDG – radiofármaco usado para estadiamento e avaliação de metástases tumorais para diversos tipos de cânceres, foi adquirida imagens do tipo PET/CT de camundongo sob as mesmas condições. No entanto, ao fusionar as imagens em software Amide, tivemos que usar um Threshold máximo de 99,9 % para que fosse possível visualizar a captação do mesmo (figura 34).

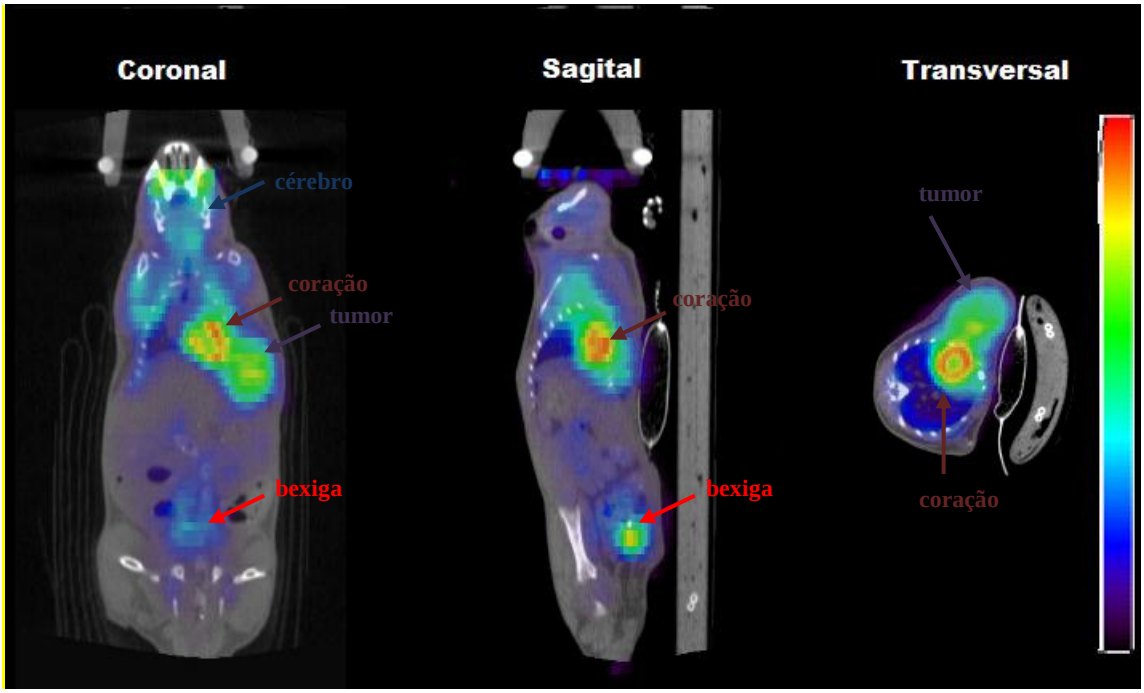


Figura 34: PEC/CT de animal com implante de células B16F10 e injetado com cerca de 37 MBq do (^{18}F)FDG. Amide.

Para o (^{18}F)FDG vemos além da captação fisiológica em coração e cérebro, uma forte captação em todo o tumor, diferentemente dos radiofármacos em estudo, os quais apresentam captação somente em pontos dentro do tumor – supostamente regiões de hipóxia.

Pensando ainda se este era o melhor modelo tumoral, realizamos imagens de camundongos C57Bl6 implantados com outro tipo de melanoma – Tm1N3 – uma linhagem não tumorigênica derivado de células melan-a. [41] Essa diferença de captação visualizadas nas figuras 35 e 36 para o [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ e para o (^{18}F)FAZA, respectivamente, pode ser justificada pelas diferenças fisiológicas de cada linhagem tumoral, uma vez que as áreas de hipóxia/necrose dentro do tumor derivado de Tm1N3 são mais bem delimitadas do que no tumor derivado de B16F10, o qual apesar de apresentar muitas áreas de hipóxia, estas são de pequena extensão e rodeadas de vasos sanguíneos. Esta característica pode facilitar um equilíbrio entre a captação e

extrusão do radiofármaco, dificultando uma visualização através de imagens. As características histológicas dos tumores pode ser vista na figura abaixo (Anexo I).

Um melanoma, já que apresenta em sua histologia maior distância entre os vasos do que a B16F10 (Anexo I), e portanto formaria áreas de hipóxia melhor definidas. O que é visualizado tanto para o [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ quanto para o (^{18}F)FAZA (figuras 35 e 36).

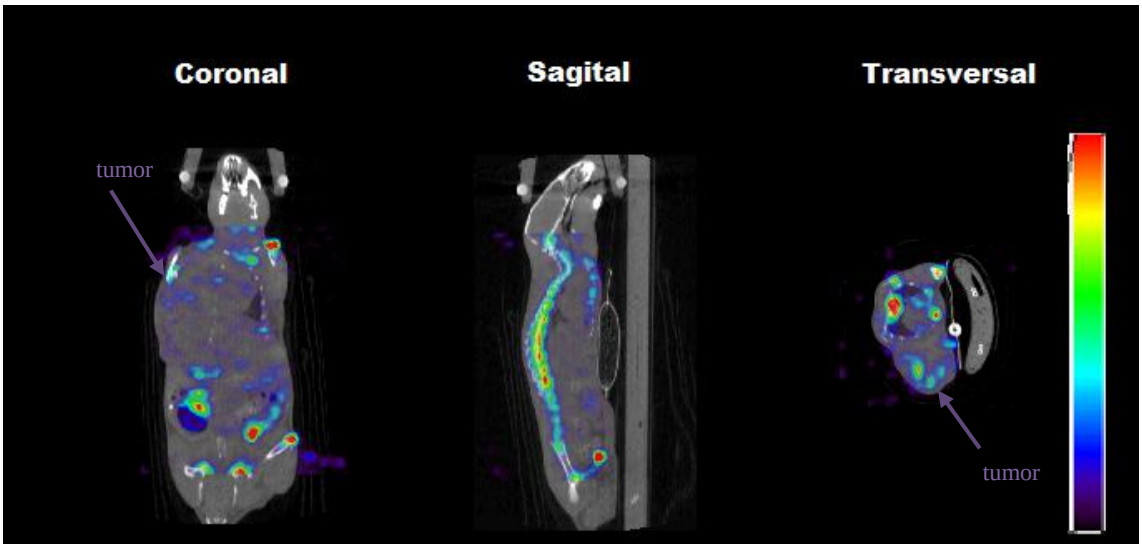


Figura 35: SPECT/CT de animal com implante de células Tm1N3 e injetado com cerca de 148 MBq de [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$. Amide.

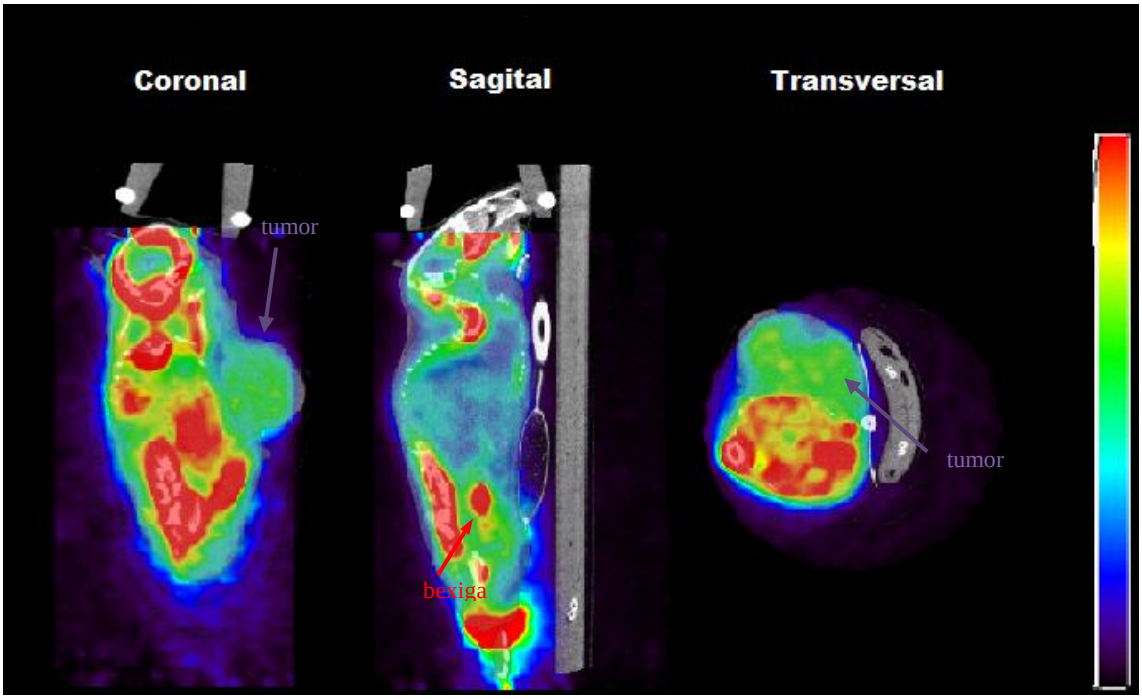


Figura 36: PEC/CT de animal com implante de células Tm1N3 e injetado com cerca de 74 MBq do (^{18}F)FAZA. Amide.

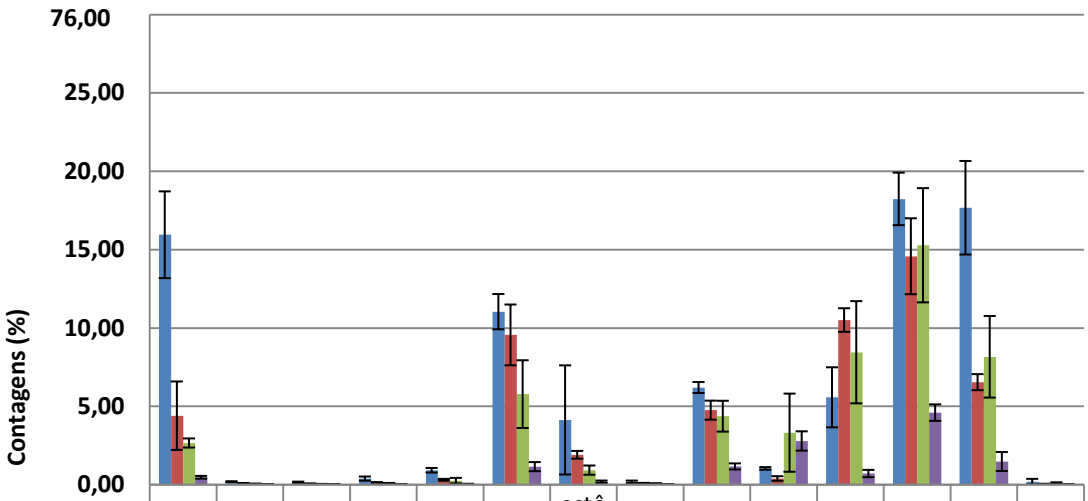
Essa diferença de captação pode ser justificada pelas diferenças fisiológicas de cada linhagem tumoral, uma vez que as áreas de hipóxia/necrose dentro do tumor derivado de Tm-1N3 são mais bem delimitadas do que no tumor derivado de B16F10, o qual apesar de apresentar muitas áreas de hipóxia, estas são de pequena extensão e rodeadas de vasos sanguíneos. Esta característica pode facilitar um equilíbrio entre a captação e extrusão do radiofármaco, dificultando uma visualização através de imagens.

4.4.2 – Biodistribuição *ex vivo*

A biodistribuição, feita com 3 animais por tempo, é apresentada nas figuras 37, como porcentagem de dose injetada por órgãos (% id/órgão) e 38

como porcentagem de dose injetada por grama de órgãos (% id/g órgão). Através delas, confirmou-se a grande captação visualizada no sistema urinário através das imagens. É possível observar uma eliminação renal intensa nos tempos de 15, 60 e 240 minutos, porém no tempo de 120 minutos ocorre uma grande concentração do produto na bexiga – que poderia advir do produto concentrado na cauda dos animais, que perfundiu para o resto do corpo, durante o tempo de repouso. Como não foi possível recolher a urina dos animais, também não é possível comprovar efetivamente o fato, mas a perfusão a partir da cauda pode ser vista nas imagens.

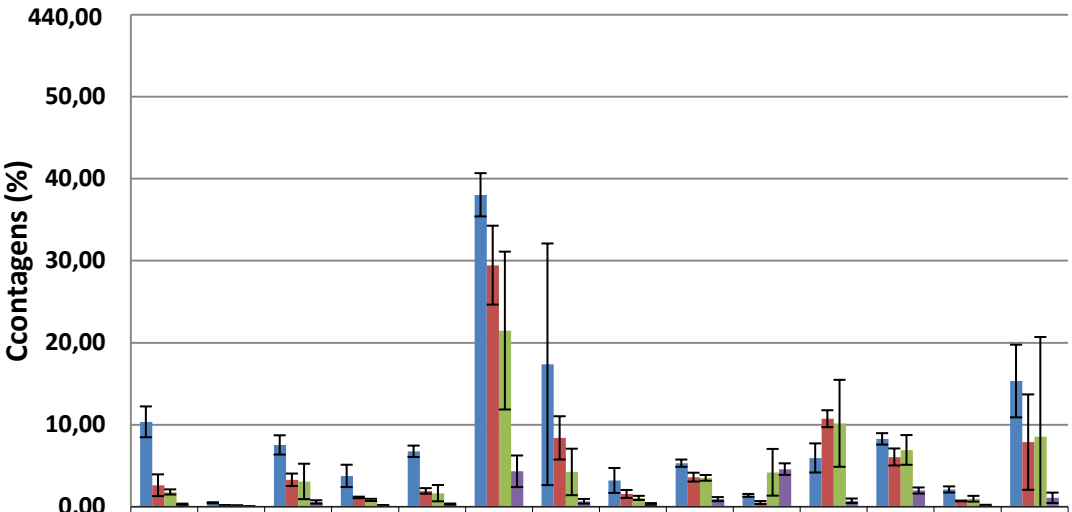
É, ainda, possível evidenciar um “clearence” da captação sanguínea ao longo do tempo, condizente com o “clearence” renal. A captação nos tecidos, ósseo, muscular e sanguíneo foram corrigidas de acordo com a massa média esperada para essa espécie. [47] Os dados de captação óssea observados na biodistribuição corroboram com os dados de imagem mostrados nas figuras 31 e 32.



	sangue	cérebro	tireóide	coração	pulmões	rins	estômago	baço	fígado	IG	ID	osso	músculo	tumor
15 min	15,9	0,19	0,15	0,38	0,92	11,0	4,13	0,18	6,20	1,03	5,57	18,2	17,6	0,19
60 min	4,40	0,07	0,06	0,13	0,31	9,55	1,90	0,09	4,75	0,39	10,5	14,5	6,54	0,04
120 min	2,66	0,05	0,04	0,09	0,25	5,78	0,92	0,07	4,37	3,31	8,45	15,2	8,16	0,09
240 min	0,47	0,01	0,01	0,02	0,05	1,15	0,19	0,02	1,16	2,78	0,71	4,59	1,48	0,01

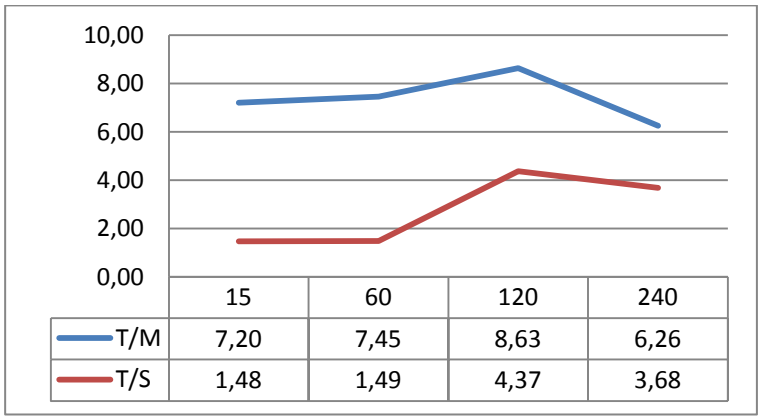
Figura 37: Gráfico da biodistribuição do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. Dados fornecidos em % de dose por órgão.

Além da captação no órgão-alvo, é importante relacionar a captação desse com órgãos vizinhos. No caso do melanoma, essa relação é importante principalmente para o músculo e sangue (T/M e T/S). Dessa forma, podemos ver através do gráfico abaixo (figura 39) que o tempo ótimo para essa relação seria o de 120 minutos, onde T/M = 8,63 e T/S = 4,37.



	sangue	cérebro	tireóide	coração	pulmões	rins	estômago	baço	fígado	IG	ID	osso	músculo	tumor
15 min	10,35	0,49	7,54	3,76	6,76	38,03	17,37	3,21	5,31	1,39	5,95	8,28	2,11	15,33
60 min	2,63	0,18	3,29	1,14	1,94	29,45	8,40	1,56	3,61	0,52	10,74	6,07	0,72	7,88
120 min	1,81	0,15	3,09	0,84	1,66	21,48	4,25	1,08	3,52	4,20	10,17	6,93	0,98	8,55
240 min	0,29	0,04	0,59	0,16	0,32	4,32	0,67	0,32	0,94	4,59	0,73	1,98	0,17	1,09

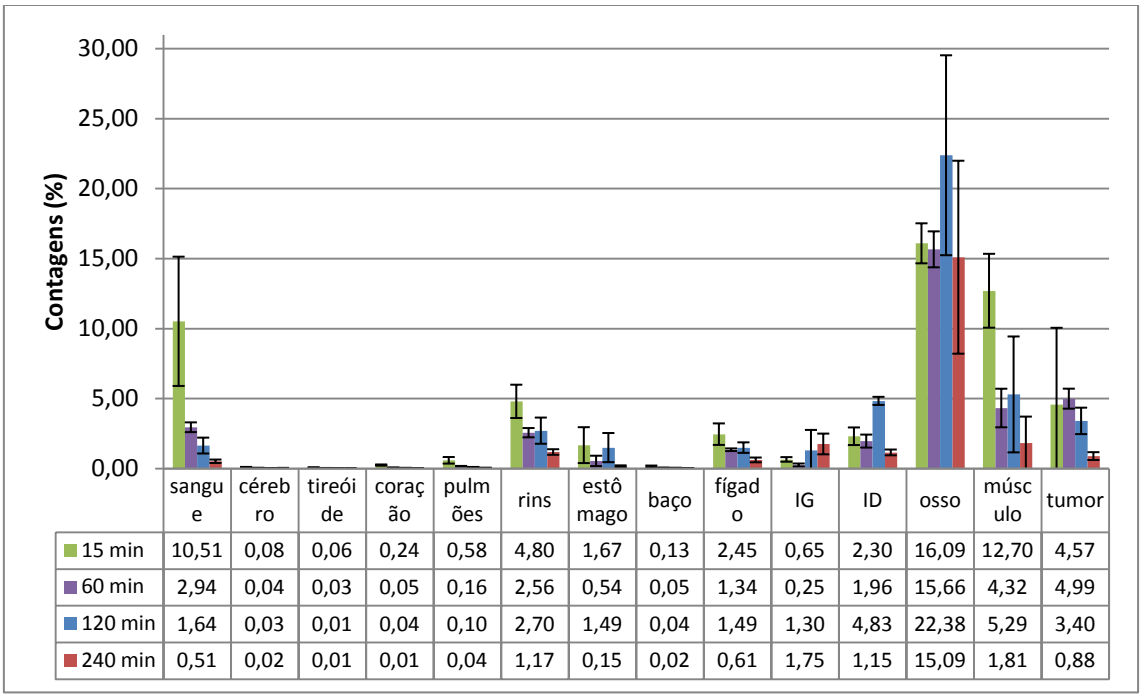
Figura 38: Gráfico da biodistribuição do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. Dados fornecidos em % de dose injetada por grama de órgão.



	15	60	120	240
T/M	7,20	7,45	8,63	6,26
T/S	1,48	1,49	4,37	3,68

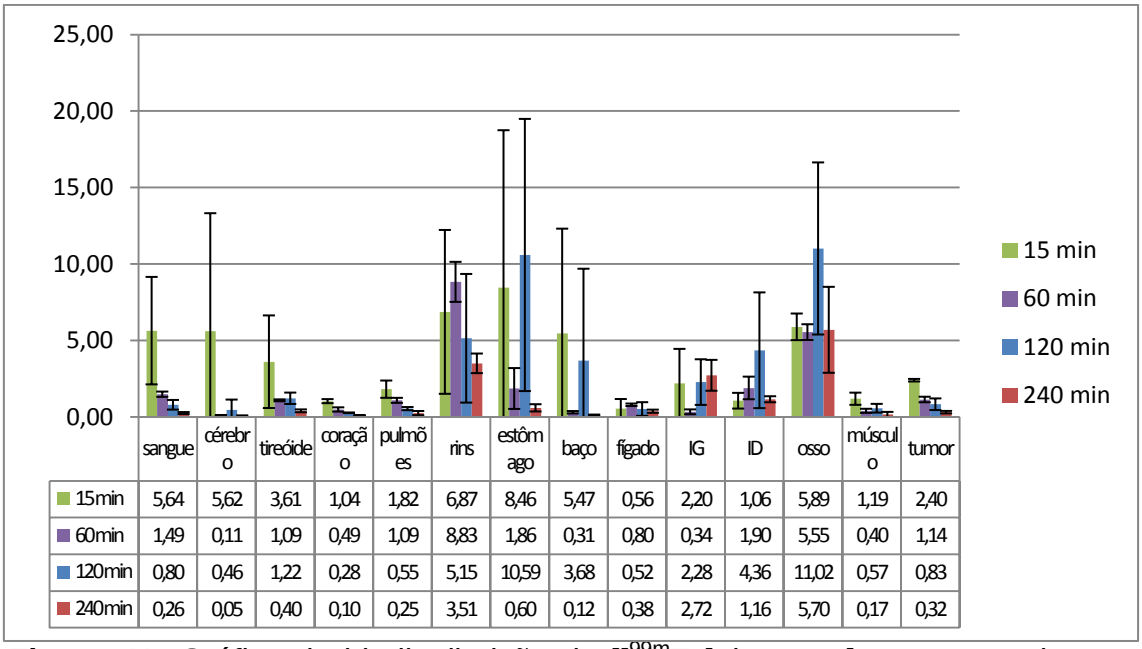
Figura 39: Gráfico demonstrando as relações T/M e T/S ao longo do tempo de biodistribuição do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. A relação é estabelecida em % de dose por grama de órgão.

Para animais implantados com Tm1N3, podemos ver o mesmo perfil de biodistribuição encontrado para animais implantados B16F10, como pode ser visualizado nas figuras 40 e 41. No entanto, a captação em tumor se mostrou maior, o que corrobora com a aquisição de imagens, demonstrada na figura 35.



	sangue	cérebro	tireóide	coração	pulmões	rins	estômago	baço	fígado	IG	ID	osso	músculo	tumor
15 min	10,51	0,08	0,06	0,24	0,58	4,80	1,67	0,13	2,45	0,65	2,30	16,09	12,70	4,57
60 min	2,94	0,04	0,03	0,05	0,16	2,56	0,54	0,05	1,34	0,25	1,96	15,66	4,32	4,99
120 min	1,64	0,03	0,01	0,04	0,10	2,70	1,49	0,04	1,49	1,30	4,83	22,38	5,29	3,40
240 min	0,51	0,02	0,01	0,01	0,04	1,17	0,15	0,02	0,61	1,75	1,15	15,09	1,81	0,88

Figura 40: Gráfico da biodistribuição do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células Tm1N3. Dados fornecidos em % de dose por órgão.



	sangue	cérebro	tireóide	coração	pulmões	rins	estômago	baço	fígado	IG	ID	osso	músculo	tumor
15min	5,64	5,62	3,61	1,04	1,82	6,87	8,46	5,47	0,56	2,20	1,06	5,89	1,19	2,40
60min	1,49	0,11	1,09	0,49	1,09	8,83	1,86	0,31	0,80	0,34	1,90	5,55	0,40	1,14
120min	0,80	0,46	1,22	0,28	0,55	5,15	10,59	3,68	0,52	2,28	4,36	11,02	0,57	0,83
240min	0,26	0,05	0,40	0,10	0,25	3,51	0,60	0,12	0,38	2,72	1,16	5,70	0,17	0,32

Figura 41: Gráfico da biodistribuição do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células Tm1N3. Dados fornecidos em % de dose injetada por grama de órgão.

Embora as relações T/M e T/S (figura 42) sejam menores do que as encontradas para tumores derivados de B16F10, indicando uma menor especificidade na captação tumoral, a relação T/S aumenta ao longo do tempo, sugerindo um maior acúmulo dentro do tecido tumoral. No entanto, a relação T/M tem uma queda ao tempo de 2 horas, mas a esse tempo pudemos observar uma intensa captação em algumas áreas dentro do tumor (figura 35), sugerindo a especificidade do radiofármaco para regiões de hipóxia.

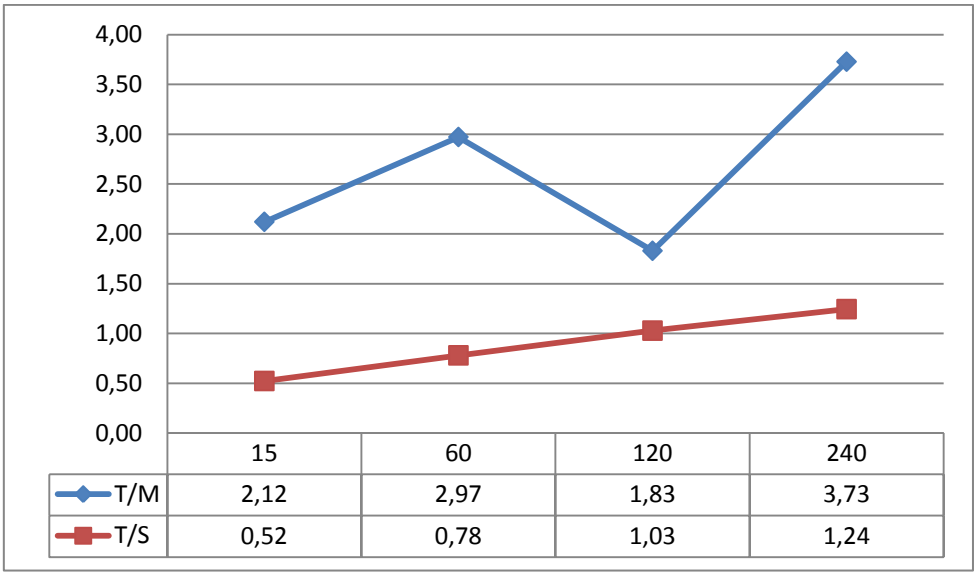
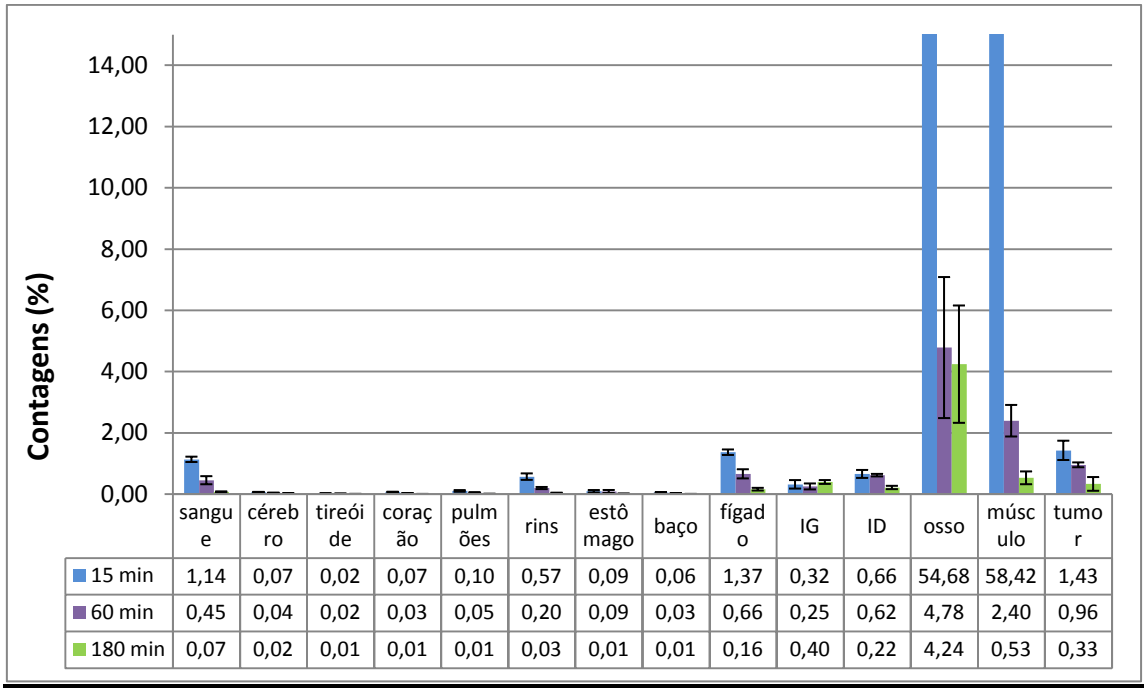


Figura 42: Gráfico demonstrando as relações T/M e T/S ao longo do tempo de biodistribuição do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células Tm1N3. A relação é estabelecida em % de dose por grama de órgão.

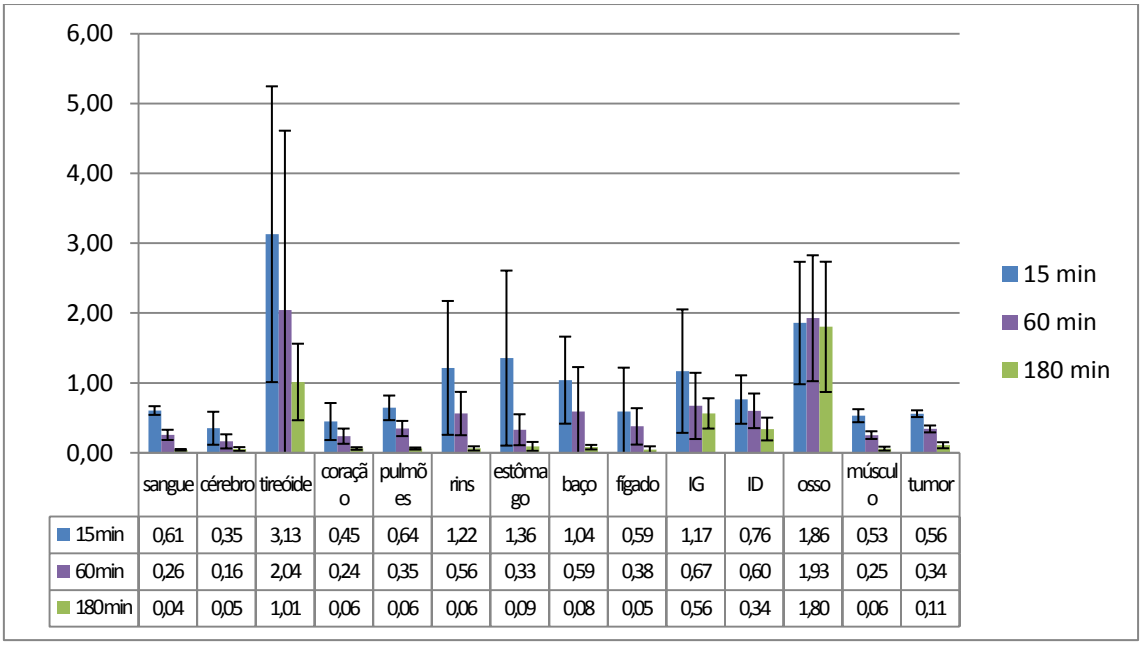
Ao utilizarmos o (^{18}F)FAZA, produto referência para detecção de regiões de hipóxia, vimos uma captação alta em osso e músculo (figuras 43 e 44), o que não era esperado, já que Souvatzoglou, 2007 relata haver uma baixa captação nesses tecidos. [64] No entanto a captação em rins, fígado e trato gastrointestinal condiz com o relatado na literatura. [63] [64]

As relações T/M e T/S para o (^{18}F)FAZA podem ser visualizadas na figura 45, e demonstram a especificidade desse radiofármaco.



	sangue	cérebro	tireóide	coração	pulmões	rins	estômago	baço	fígado	IG	ID	osso	músculo	tumor
15 min	1,14	0,07	0,02	0,07	0,10	0,57	0,09	0,06	1,37	0,32	0,66	54,68	58,42	1,43
60 min	0,45	0,04	0,02	0,03	0,05	0,20	0,09	0,03	0,66	0,25	0,62	4,78	2,40	0,96
180 min	0,07	0,02	0,01	0,01	0,01	0,03	0,01	0,01	0,16	0,40	0,22	4,24	0,53	0,33

Figura 43: Gráfico da biodistribuição do (^{18}F)FAZA em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. Dados fornecidos em % de dose por órgão.



	sangue	cérebro	tireóide	coração	pulmões	rins	estômago	baço	fígado	IG	ID	osso	músculo	tumor
15min	0,61	0,35	3,13	0,45	0,64	1,22	1,36	1,04	0,59	1,17	0,76	1,86	0,53	0,56
60min	0,26	0,16	2,04	0,24	0,35	0,56	0,33	0,59	0,38	0,67	0,60	1,93	0,25	0,34
180min	0,04	0,05	1,01	0,06	0,06	0,06	0,09	0,08	0,05	0,56	0,34	1,80	0,06	0,11

Figura 44: Gráfico da biodistribuição do (^{18}F)FAZA em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. Dados fornecidos em % de dose injetada por grama de órgão.

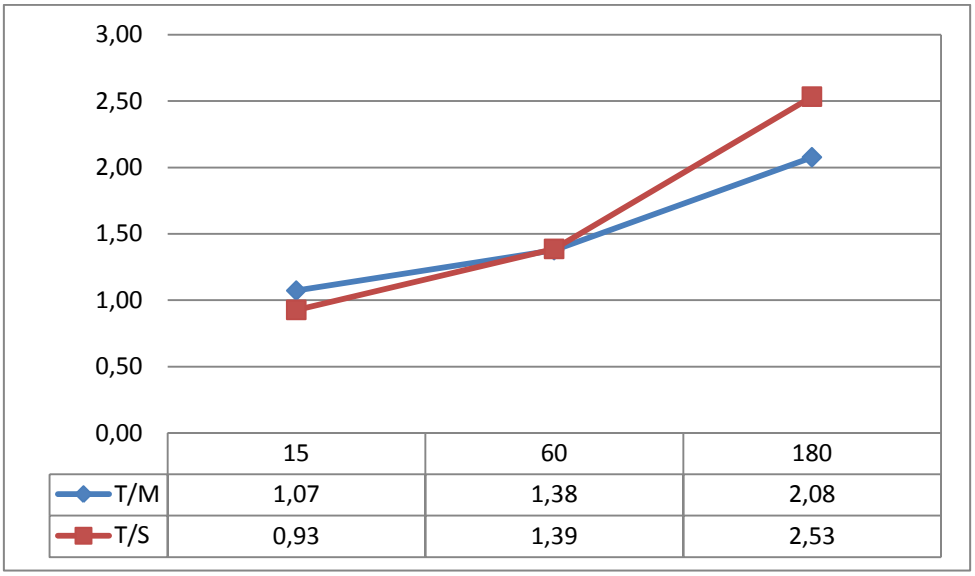


Figura 45: Gráfico demonstrando as relações T/M e T/S ao longo do tempo de biodistribuição do (^{18}F)FAZA em camundongos C57Bl/6 implantados com tumores derivados de células B16F10. A relação é estabelecida em % de dose por grama de órgão.

4.4.3 – Autorradiografia dos tumores injetados com [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$

Foi demonstrada a captação do complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em regiões intratumorais também através de autorradiografias. Onde vemos uma relação homogênea e de baixa captação em tumores de B16F10, no entanto, em tumor Tm1N3, vemos uma grande região de hipercaptação (azul) como pode ser visualizado na figura 46. Ainda podemos ver uma baixa captação em toda a córtex renal, sabidamente hipoxiada. Todavia, não foi possível sua correlação histopatológica, uma vez que os cortes não ficaram bons para essa finalidade.

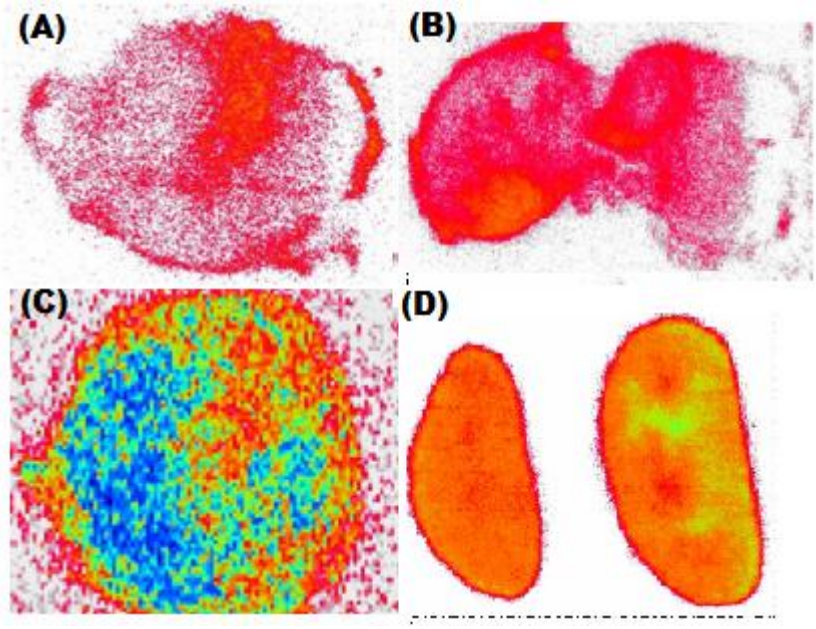


Figura 46: Autorradiografia de tumores derivados de células B16F10 – **(A)** e **(B)**; tumor derivado de Tm1N3 – **(C)**; e rins – **(D)**, de animais injetados com o complexo $[[^{99m}Tc]glucarato]^{-}$.

CONCLUSÕES

1) O kit de glucarato é de fácil preparação, bem como sua marcação com $[^{99m}Tc]O_4^-$, formando o complexo $[[^{99m}Tc]glucarato]^-$, o qual apresentou eficiência de marcação superior a 95 %, e portanto de uso adequado para pesquisa.
2) O comportamento do $[[^{99m}Tc]glucarato]^-$ em eletroforese evidencia a carga negativa do complexo, em concordância com dados da literatura.
3) A utilização da eletroforese como meio de avaliar a estabilidade do $[[^{99m}Tc]glucarato]^-$ frente a cisteína e histidina, foi eficiente, mas demonstraram que o complexo não é estável em contato com aminoácidos.
4) Os testes de ligação dos complexos de $[^{99m}Tc]$tecnécio à albumina, avaliado por CCD, também demonstrou a estabilidade do complexo por até 1 hora, mas após 4 horas já são observadas alterações no comportamento do complexo.
5) Os testes de ligação $[[^{99m}Tc]glucarato]^-$ à albumina ou ao plasma demonstraram resultados muito próximos, sugerindo que a albumina sirva como o principal transportador do complexo em sistema biológico.
6) A síntese do (^{18}F)FAZA, seguiu como o descrito na literatura, mas sua purificação precisou ser ajustada, com alteração da fase móvel em relação àquela sugerida. No entanto, demonstrou rendimento e pureza compatíveis com o descrito e, portanto, aceitos para uso em pesquisa.
7) A captação do $[[^{99m}Tc]glucarato]^-$ em células é baixa e não dependente das condições de hipóxia ou normóxia. A expressão de Glut1 nas células de B16F10 é baixa, conforme demonstrado por citometria, mas o mecanismo de captação não parece ser guiado por esta via, uma vez

que a utilização de meio de cultura com diferentes concentrações de glicose, não modificaram o comportamento.

8) A captação do (^{18}F)FAZA foi demonstrada in vitro e foi influenciado pela condição de hipóxia ou normóxia.

9) Tanto a captação do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ quanto do (^{18}F)FAZA puderam ser visualizadas por imagem em tumores implantados em camundongos, todavia, as imagens do (^{18}F)FAZA apresentaram qualidade superior a do [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$, e as áreas de hipóxia são mais evidentes de acordo com a histologia tumoral, como pôde ser visto ao compararmos tumores derivados de células B16F10 e de Tm1N3. O modo de aquisição das imagens também é importante para áreas tão pequenas, sendo mais indicada a utilização de colimador do tipo pinhole de 5 furos.

10) Tanto o [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ quanto o (^{18}F)FAZA demonstraram uma captação ósteoarticular importante, demonstrada não somente através das imagens quanto nos ensaios de biodistribuição ex vivo, e que não são descritas em literatura, sugerindo que hajam estudos futuros sobre o tema.

11) Foi demonstrada a captação do complexo [[^{99m}Tc]glucarato]$^{-}$ em regiões intratumorais também através de autorradiografias. No entanto, não foi possível sua correlação histopatológica, uma vez que os cortes não ficaram bons para essa finalidade.

ANEXO A

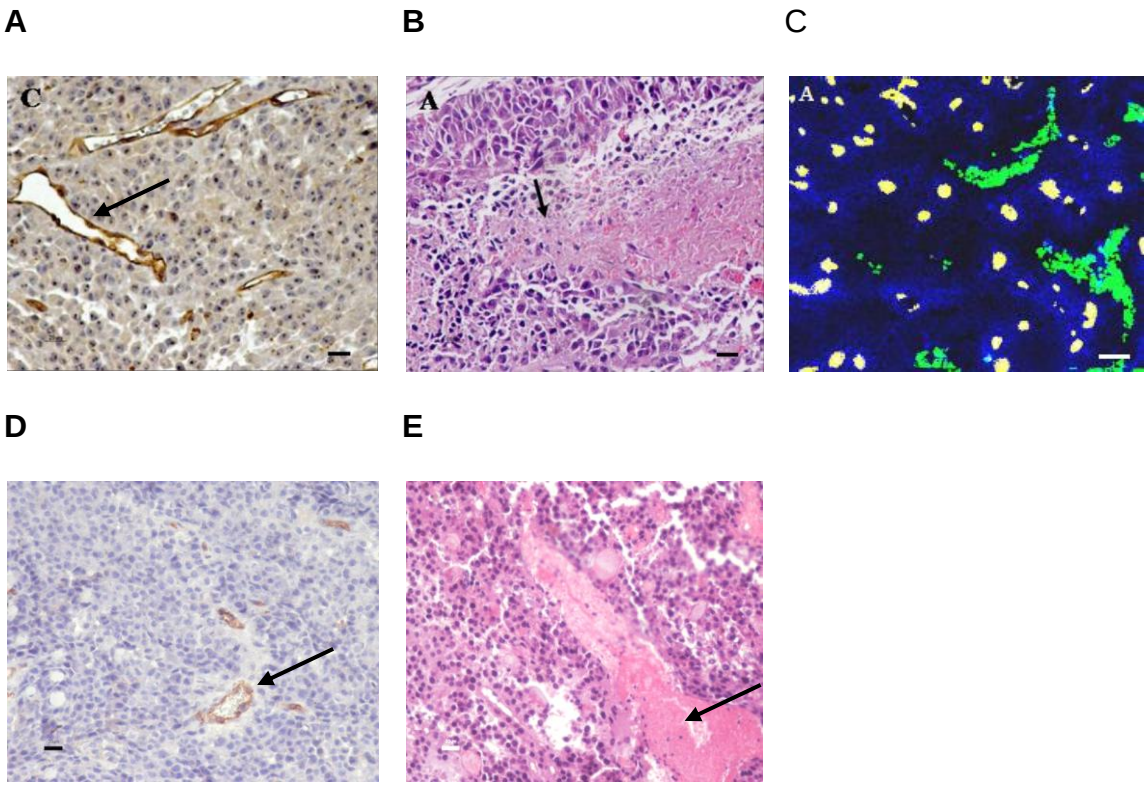


Figura 47: Dados histológicos de tumores derivados de B16F10 – **A.** Tecido marcado com CD34 (marcador de vasos sanguíneos) e contracorado com hematoxilina – seta aponta um vaso sanguíneo; **B.** Tecido corado com hematoxilina/eosina, onde a seta aponta áreas de hipóxia, e início de necrose; **C.** Imagem mostrando a distribuição de doxorrubicina (azul) em relação aos vasos sanguíneos marcados com o marcador de perfusão DIOC-7 (amarelo), vasos ditos funcionais, o verde representaregiões de hipóxia (anticorpo anti-EF5) [65]; e dados histológicos de tumores derivados de Tm-1N3 – **D.** Tecido marcado com CD34 (marcador de vasos sanguíneos) e contracorado com hematoxilina – seta aponta um vaso sanguíneo; **E.** Tecido corado com hematoxilina/eosina, onde a seta aponta áreas de hipóxia, e início de necrose (Imagens cedidas pela Dr.ª Camila M. L. Machado).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. KUMAR, V.; PERKINS, J. A. Cell Injury, cell death, and adaptations. In: _____ **Robbins e Cotran Patologia:** bases patológicas das doenças. 8ª edição. ed. Filadélfia: Saunders Elsevier, 2007. p. 1-19.
2. CORRÊA, L. Pato Arte Geral. **site da Pato Arte Geral**, São Paulo, 2000. Disponivel em: <http://143.107.23.244/lido/patoartegeral/patoartecir5A.htm>. Acesso em: 16 maio 2010. Leitura complementar 21.
3. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger:** Principles of Biochemistry. 4ª edição. ed. [S.l.]: W H Freeman & Co, 2004.
4. HARRIS, A. L. Hypoxia - A key regulatory factor in tumor growth. **Nature Reviews Cancer**, 2, 2002. 38-47.
5. GIACCIA, A.; SIIM, B. G.; JOHNSON, R. S. HIF-1 as a target for drug development. **Nature Reviwes Drug Discovery**, 2, 2003. 1-9.
6. VAUPEL, P.; HARRISON, L. Tumor hypoxia: causative factors, compensatory mechanisms, and cellular response. **The Oncologist**, 9 (suplementar 5), 2004. 4-9.
7. HALPERIN, E. C.; PEREZ, C. A.; BRADY, L. W. **Principles and Practice of Radiation Oncology**. 5ª edição. ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
8. VAUPEL, P.; MAYER, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. **Cancer Metastasis Review**, 26, 2007. 225-239.
9. BANERJEE, S.; PILLAI, M. R. A.; RAMAMOORTHY, N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiophamaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**, 31 (4), 2001. 260-277.
10. OKADA, D. R. et al. Myocardial kinetics of Tc-99m glucarate in low flow, hypoxia, and aglycemia. **Journal of Nuclear Cardiology**, 10, 2003. 168-176.
11. WIEBE, L. I.; MCEWAN, A. J. B. Scintigraphic imaging of focal hypoxic tissue: development and clinical applications of 123I-IAZA. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 45, 2002. 69-81.
12. STRAUSS, H. W.; NUNN, A.; LINDER, K. Nitroimidazoles for imaging hypoxic myocardium. **JOURNAL OF NUCLEAR CARDIOLOGY**, 2(5), 1995. 437-445.
13. PIERT, M. et al. Hypoxia-Specific Tumor Imaging with 18F-Fluoroazomycin Arabinoside. **The Journal of Nuclear Medicine**, 46(1), 2005. 106–113.
14. REISCHL, G. et al. Imaging of tumor hypoxia with [124I]IAZA in comparison with [18F]FMISO and [18F]FAZA – first small animal PET results. **Journal of Pharmacy and Pharmaceuticals Sciences**, 10(2), 2007. 203-211.
15. DENCE, C. S. et al. Autorradiographic and small-animal PET comparisons between 18F-FMISO, 18F-FDG, 18F-FLT and the hypoxic selective 64Cu-ATSM in a rodent model of cancer. **Nuclear Medicine and Biology**, 35, 2008. 713-720.
16. SUN, X.; CHU, T.; WANG, X. Preliminary studies of 99mTc-BnAO and its analogues: synthesis, radiolabeling and in vitro cell uptake. **Nuclear Medicine and Biology**, 37, 2010. 117-123.
17. BALLINGER, J. R.; HSUE, V.; RAUTH, A. M. Accumulation of technetium-99m glucarate: in vitro cell cultures and in vivo tumour models. **Nuclear Medicine Communications**, 24, 2003. 567-606.
18. JAMES R. BALLINGER, D. S. M. C. I. B. Z. M. Z. A. A. M. R. Effect of Hypoxia on the Accumulation of Technetium-99m-Glucarate and Technetium-99m-

Gluconate by Chinese Hamster Ovary Cells In Vitro. **The Journal of Nuclear Medicine**, 34(2), 1993. 242-245.

19. PEREK, N. et al. Could 99mTc-glucarate be used to evaluate tumour necrosis? **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, 35, 2008. 1290-1298.
20. JEUNE, N. P. &. O. S. &. N. L.; DUBOIS, N. P. &. J.-M. V. &. A. C. &. F. Could 99mTc-glucarate be used to evaluate tumour necrosis? **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, 35, 2008. 1290-1298.
21. BEDOGNI, B.; POWELL, M. B. Hypoxia, melanocytes and melanoma – survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. **Pigment Cell Melanoma Research**, 22, 2009. 166-174.
22. REN, G.; PAN, Y.; CHENG, Z. Molecular probes for malignant melanoma imaging. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 11, 2010. 590-602.
23. GIATROMANOLAKI, A. et al. Hypoxia-inducible factors 1alpha and 2 alpha are related to vascular endothelial growth factor expression and a poorer prognosis in nodular malignant melanomas of the skin. **Melanoma Research**, 13, 2003. 493-501.
24. MURPHY, M. et al. Hypoxia regulation of the cell cycle in malignant melanoma: putative role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. **Journaul of Cutaneous Pathology**, 31, 2004. 477-482.
25. FEDELE, T. A. et al. Prognostic relationship of metabolic profile obtained of melanoma B16F10. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 67, 2013. 146-156.
26. OBA-SHINJO, S. M. et al. Melanocyte Transformation Associated with Substrate Adhesion Impediment. **Neoplasia**, 8(3), 2006. 231-241.
27. BENNETT, D. C.; J., C. P.; R., H. I. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. **International Journal of Cancer**, 39(3), 1987. 414-418.
28. CAMARGO, A. C. **Otimização dos procedimentos de preparação, marcação e controle de qualidade do glucarato-99mTc para diagnóstico do infarto agudo do miocárdio**. São Paulo: [s.n.], 2007. dissertação.
29. RADIN, A. **Preparo e avaliação de [99mTc]tecnécio aquacarbonil contendo ligantes 1,2-diaminoetano-N-substituídos para detecção de tumores**. São Paulo. 2010.
30. SANTOS, R. L. S. R.; FAINTUCH, B. L.; TEODORO, R. Estudos in vitro e in vivo de análogo da timidina marcada com complexo organometálico de tecnécio-99m para potencial uso em dignóstico tumoral. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, jan/mar 2008. 85-95.
31. SAPIENZA, M. T. et al. Anti-CEA monoclonal antibody: technetium-99m labeling and the validation process of a scintigraphy animal model with a non-cellular antigenic implant. **Cellular and Molecular Biology**, 48(5), 2002. 511-516.
32. THRALL, J. H. et al. Clinical comparison of cardiac blood pool visualization with technetium-99m red blood cells labeled in vivo and with technetium-99m human serum albumin. **Journal of Nuclear Medicine**, 19, 1978. 796-803.
33. XAVIER, C. et al. Synthesis, characterization, and evaluation of a novel 99mTc(CO)3 pyrazolyl conjugate of a peptide nucleic acid sequence. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 13(8), 2008. 1335-1344.
34. COLTURATO, M. T. **Otimização das condições de marcação do cloridrato de**

N-isopropil-p-iodoanfetamina (IMP) com radioiodo. Estudos de distribuição biológica. São Paulo. 2000.

35. REISCHL, G. et al. Preparation of the hypoxia imaging PET tracer [18F]FAZA: reaction parameters and automation. **Journal of Applied Radiation and Isotopes**, 62, 2005. 897-901.
36. HOCKLEY, B. G.; SCOTT, P. J. H. Synthesis of [18F]-Fluoroazomycin arabinoside (18F-FAZA). [S.l.]: [s.n.].
37. ATCC®. American Type Culture Collection. **B16F10 (ATCC® CRL-6475TM)**. Disponivel em: <http://www.atcc.org/products/all/CRL-6475>. Acesso em: 15 fevereiro 2011.
38. FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells:** A Manual of Basic Technique and Specialized Applications. 5. ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2005.
39. SCIENCE, S. ®. L. **Cell Culture Manual**. [S.l.]: Sigma-Aldrich, 2011. disponível em: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/cell-culture-manual.html.
40. FIDLER, I. J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. **Cancer Research**, 35, 1975. 218-224.
41. ANDRADE, L. N. D. S. **Evidência da dualidade funcional de galectina-3 no crescimento de melanoma murino [tese]**. São Paulo. 2007.
42. OLBRYT, M. et al. Gene expression profile of B16(F10) murine melanoma cells exposed to hypoxic conditions in vitro. **Gene Expression**, 13, 2006. 191-203.
43. LOTZ, C. et al. Role of the tumor microenvironment in the activity and expression of the p-glycoprotein in human colon carcinoma cells. **Oncology Reports**, 17, 2007. 238-244.
44. EVANGELISTA, M. J. D. A. **Avaliação da captação de complexos de tecnécio-99m obtidos com ligantes benziletilenodiamina em células sensível e resistentes de tumor uterino MES-SA**. São Paulo. 2010.
45. ROBEY, I. F. et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha and the glycolytic phenotype in tumors. **Neolplasia**, 7, 2005. 324-330.
46. CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Báscia e Aplicada**, 28, n. 1, 2007. 11-23.
47. INTERNATIONAL LIFE SCIENCES INSTITUTE - RISK SCIENCE INSTITUTE. **Physiological parameter values for PBPK models**. [S.l.]: [s.n.], 1994.
48. WILLIS, K. W. et al. Renal localizationof 99mTc-stannous glucoheptonate and 99mTc-stannous dimercaptosuccinate in the rat by frozen section autorradiography: The efficiency and resolution of technetium-99m. **Radiation Research**, 69, 1977. 475-488.
49. CAMARGO, A. C. **Otimização dos procedimentos de preparação, marcação e controle de qualidade do glucarato-99mTc para diagnóstico do infarto agudo do miocárdio**. [S.l.]. 2007.
50. BALLINGER, J. R. et al. Effect of Hypoxia on the Accumulation of Technetium-99m-Glucarate and Technetium-99m-Gluconate by Chinese Hamster Ovary Cells In Vitro. **The Journal of Nuclear Medicine**, 34 (2), fevereiro 1993. 242-245.

51. JOHANNSEN, B. et al. Chemical and Biological Characterization of Different Tc Complexes of Cysteine and Cysteine Derivatives. **The Journal of Nuclear Medicine** , 19 (7), 1978. 816-824.
52. STANÍK, R.; BENKOVSKý, I. 99mTc-labeling and molecular modeling of short dipeptide glycyl-L-proline. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, 287, 2011. 949–953.
53. BENKOVSKý, I.; STANÍK, R. 99mTc-DMSA complex preparation: the effect of pH and tin(II) chloride amount on reaction. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, 284, 2010. 231–237.
54. MANG'ERA, K. O. et al. Comparative evaluation of 99mTc-ethylene bis-1-cysteine and 99mTc-ethylene bis-1-beta-homocysteine during reversed phase HPLC analysis and electrophoresis at various pH conditions. **Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals**, 44, 2001. 257-264.
55. SIMPSON, E. J. et al. Invastigation of isomer formation upon coordination of bifunctional histidine analogues with 99mTc/Re(CO)3. **Dalton Transactions**, 41, 2012. 2950-2958.
56. WILKINSON, G. R. Farmacocinética: Dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação dos fármacos. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª Edição. ed. [S.l.]: Mc Graw Hill, 2004. p. 7-8.
57. BUSK, M. et al. Imaging Hypoxia in xenografted and murine tumors with 18F-fluoroazomycin arabinoside: a comparative study involving micro-PET, autoradiography, pO2-polarography, and fluorescence microscopy. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, 70, n. 4, 2008. 1202-1212.
58. KURIHARA, H. et al. Radiolabelled agents for PET imaging of tumor hypoxia. **Current Medicinal Chemistry**, 19, 2012. 3282-3289.
59. YEUNG, C.-K. et al. To establish a pharmacological experimental platform for the study of cardiac hypoxia using the microelectrode array. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 59, 2009. 146-152.
60. PARK, S. G. et al. Biologic correlation btween glucose transporters, hexokinase-II, Ki-67 and FDG uptake in malignant melanoma. **Nuclear Medicine and Biology**, 39, 2012. 1167-1172.
61. ISNARDI, V. et al. Is [99mTc]glucarate uptake mediated by fructose transporter GLUT-5? **Nuclear Medicine and Biology**, 39, 2012. 1226-1231.
62. SCHWARTZ, Z. et al. Uptake nad biodistribution of technetium-99m-MD32P during rat tibial bone repair. **Journal of Nuclear Medicine**, 34, 1993. 104-108.
63. BECK, R. et al. Pretreatment 18F-FAZA PET predicts success of hypoxia-directed radiochemotherapy using tirapazamine. **The Journal of nuclear Medicine**, 48, 2007. 973-980.
64. SOUVATZOGLOU, M. et al. Tumour hypoxia imaging with [18F]FAZA PET in head and neck cancer patients: a pilot study. **The European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, 34, 2007. 1566-1575.
65. COSTA, P. L. N. D. **O MICROAMBIENTE TUMORAL COMO ALVO terapêutico: avaliação do efeito de antagosnistas do receptor de bradicinina tipo 1 em melanoma murino**. São Paulo. 2009. [tese].