ALINE MORAIS DE SOUZA

Estudo da metabolização do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195 em plasma e seu potencial como marcador de inflamação tumoral

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Dra. Daniele de Paula Faria Coorientadora: Dra. Caroline Cristiano Real Gregório

São Paulo 2020

ALINE MORAIS DE SOUZA

Estudo da metabolização do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195 em plasma e seu potencial como marcador de inflamação tumoral

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

Programa de Oncologia

Orientadora: Dra. Daniele de Paula Faria Coorientadora: Dra. Caroline Cristiano Real Gregório

São Paulo 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

```
Souza, Aline Morais de
Estudo da metabolização do radiofármaco [<sup>11</sup>C](R) -
PK1195 em plasma e seu potencial como marcador de
inflamação tumoral / Aline Morais de Souza. -- São
Paulo, 2020.
Dissertação (mestrado) --Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.
Orientadora: Daniele de Paula Faria.
Coorientadora: Caroline Cristiano Real Gregório.
Descritores: 1.Inflamação 2.Tomografia por
emissão de pósitrons 3.Compostos Radiofarmacêuticos
4.Biomarcadores tumorais 5. [<sup>11</sup>C](R) -PK11195
6.Macrófagos associados a tumores
USP/FM/DBD-214/20
```

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: SOUZA, Aline Morais de

Título: Estudo da metabolização do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195 em plasma e seu potencial como marcador de inflamação tumoral

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr
Instituição:
Julgamento:
Prof. Dr
Instituição:
Julgamento:
Prof. Dr
Instituição:
Julgamento:
Prof. Dr
Instituição:
Julgamento:

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, em suas manifestações, que me transmitiu energia e amor, fazendo com que tudo fosse possível.

Agradeço aos meus pais, **Joaquim e Fátima**, que antes mesmo que soubéssemos do que se tratam formações acadêmicas, me ensinaram a valorizar e respeitar as pessoas que me cercam independente de posição ou título. Agradeço pela força, compreensão e carinho que me transmitiram especialmente nesse período.

Agradeço ao meu irmão **Alan** que, junto aos meus pais, me deu suporte e inspiração em diversos momentos.

Agradeço à minha orientadora, **Dra. Daniele de Paula Faria**, pela dedicação em conduzir e direcionar o desenvolvimento desse projeto, com paciência e seriedade ao transmitir seu conhecimento e as instruções necessárias para a conclusão satisfatória, e por compreender os aspectos pessoais que permeiam a vida acadêmica.

Agradeço minha coorientadora, **Dra. Caroline Cristiano Real Gregório**, também pelo suporte e dedicação numa área tão desafiadora, tornando-se uma amizade inspiradora.

À Larissa Estessi, que além de uma pesquisadora extremamente inteligente e comprometida, é a melhor amizade que fiz nos últimos anos, agradeço pela justiça e sinceridade em todas as conversas e conselhos.

Aos meus colegas **Carlos Alberto Rossatto Junior**, **Evelyn Martins**, **Monick Evangelista Junho** e **Camila de Godoi Carneiro**, agradeço o companheirismo, e por trazerem descontração para os dias de trabalho e pela atenção e insistência em explicar temas muitas vezes difíceis para meu entendimento.

Agradeço à **Mara Junqueira** pelo treinamento e colaboração técnico-cientifica, sempre feito com generosidade.

Á **Dra. Camila Machado**, que sempre esteve pronta para contribuir pra o desenvolvimento deste trabalho, auxiliando não somente no conteúdo científico, mas no âmbito pessoal.

À **Milena Pitombeira**, pela parceria durante o projeto e pela generosidade em compartilhar seu conhecimento.

Ao **Dr. Fábio Luiz Navarro Marques**, pela contribuição ao projeto e pela transmissão do conhecimento.

À **Josy Rodrigues**, técnica química do laboratório LIM 43, pelas orientações e suporte técnico, e à **Allane dos Santos Ferreira Maranhão**, técnica de laboratório do CTO do ICESP, pela ajuda técnica nos procedimentos de ensaios de recuperação gênica e imunofluorescência.

Ao **Professor Luiz Roberto Giorgetti de Britto** por abrir as portas do Laboratório de Neurobiologia Celular do ICB-USP e ao **Adilson da Silva Alves**, técnico do laboratório, pela ajuda e suporte na realização dos ensaios de imunofluorescência sempre com generosidade e eficiência.

Agradeço também à **Mônica Golcman** e **André Santos de Orlanda** que deram suporte no tratamento e cuidado dos animais, contribuindo muito para o andamento do projeto, em funções essenciais muitas vezes julgadas como básicas.

A todos os colaboradores do CinRad HC-FMUSP, em especial ao **Cleinando Clemente da Silva Vera**, **Felipe de Freitas Meneses** e **Flávio Gomes Lage**, que estiveram à disposição para tirar dúvidas e explicar os processos de produção dos radiofármacos.

Agradeço à *GE Healthcare* pelo apoio e financiamento do projeto e pelo financiamento de minha bolsa de mestrado.

Enfim, a todos que contribuíram indireta ou indiretamente para este trabalho, com palavras de incentivo, conversas e boas energias - todos foram essenciais nos mais diversos instantes.

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina" (Coralina, C.)

SUMÁRIO

TABELAS	11
ABREVIATURAS E SIGLAS	12
	14
т	16
DUÇÃO	19
nação	19
pinflamação	19
nação Tumoral	21
Macrófagos Associados a Tumores	24
lidades de Imagem	27
<i>R</i>)-PK11195	32
ína Translocadora 18 kDa (TSPO)	34
polização plasmática do [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195	36
TVOS	42
ivo Geral	42
ivos Específicos	42
ivos Específicos RIAIS E MÉTODOS	42 43
ivos Específicos RIAIS E MÉTODOS iais	42 43 43
ivos Específicos RIAIS E MÉTODOS iais Químicos	42 43 43 43
ivos Específicos RIAIS E MÉTODOS iais Químicos Equipamentos	42 43 43 43 43
ivos Específicos RIAIS E MÉTODOS iais Químicos Equipamentos Acessórios/ Consumíveis	42 43 43 43 43 44 44
ivos Específicos RIAIS E MÉTODOS iais Químicos Equipamentos Acessórios/ Consumíveis Softwares	
ivos Específicos RIAIS E MÉTODOS iais Químicos Equipamentos Acessórios/ Consumíveis Softwares	42 43 43 43 43 44 46 46 47 48
ivos Específicos	
ivos Específicos RIAIS E MÉTODOS iais Químicos. Equipamentos Acessórios/ Consumíveis. Softwares DOS Radiosíntese de [¹¹ C](R)-PK11195. Radiosíntese de [¹⁸ F]FDG.	
ivos Específicos RIAIS E MÉTODOS iais Químicos Equipamentos Acessórios/ Consumíveis Softwares DOOS Radiosíntese de [¹¹ C](R)-PK11195 Radiosíntese de [¹⁸ F]FDG Amostra do estudo (Comitês de Ética)	
ivos Específicos RIAIS E MÉTODOS iais Químicos Equipamentos Acessórios/ Consumíveis Softwares DOS Radiosíntese de [¹¹ C](R)-PK11195 Radiosíntese de [¹⁸ F]FDG Amostra do estudo (Comitês de Ética) Análise da metabolização de [¹¹ C](R)-PK11195 em plasma	
	ABREVIATURAS E SIGLAS T DUÇÃO

	3.2.6	Aquisição de Imagem Molecular por PET com [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e o	com
	['°F]FD	G	55
	3.2.7	Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino	63
	3.2.8	Análise estatística e tratamento de dados	63
4.	RESUL	TADOS	65
4.	1 Radio	síntese de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195	65
4.	2 Radio	síntese de [¹⁸ F]FDG	65
4.	3 Amost	tra tumoral	66
4.	4 Cresc	imento tumoral	68
4.	5 Capta	ção tumoral de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG	70
4.	6 Autorr	adiografia	77
4.	7 Imuno	fluorescência	77
4.	8 Amost	tra sanguínea/ plasmática	80
4.	9 Anális	e da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em plasma	81
	4.9.1	CLAE	81
	4.9.2	Técnicas alternativas	85
4.	4.9.2 10	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino	85 86
4. 5.	4.9.2 10 DISCU	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino SSÃO	85 86 88
4. 5. 5.	4.9.2 10 DISCU 1 Capta	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino SSÃO ção tumoral de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG	85 86 88 88
4. 5. 5. 5.	4.9.2 10 DISCU 1 Capta 2 Imuno	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino SSÃO ção tumoral de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG fluorescência	85 86 88 88 91
4. 5. 5. 5. 5.	4.9.2 10 DISCU 1 Capta 2 Imuno 3 Anális	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino SSÃO ção tumoral de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG fluorescência e da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em plasma	85 86 88 91 94
4. 5. 5. 5.	4.9.2 10 DISCU 1 Capta 2 Imuno 3 Anális 5.3.1	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino SSÃO ção tumoral de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG fluorescência e da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em plasma CLAE	85 86 88 91 94 94
4. 5. 5. 5. 5.	4.9.2 10 DISCUS 1 Capta 2 Imuno 3 Anális 5.3.1 5.3.2	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino SSÃO ção tumoral de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG fluorescência de da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em plasma CLAE Técnicas alternativas	85 86 88 91 94 94 97
4. 5. 5. 5. 6.	4.9.2 10 DISCU 1 Capta 2 Imuno 3 Anális 5.3.1 5.3.2 CONCL	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino SSÃO ção tumoral de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG ofluorescência te da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em plasma CLAE Técnicas alternativas	85 86 88 91 94 94 97 97 101
4. 5. 5. 5. 6. 7.	4.9.2 10 DISCU 1 Capta 2 Imuno 3 Anális 5.3.1 5.3.2 CONCL REFER	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino SSÃO ção tumoral de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG ofluorescência de da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em plasma CLAE Técnicas alternativas LUSÃO ÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85 86 88 91 94 94 97 101 102
4. 5. 5. 5. 6. 7. 8.	4.9.2 10 DISCU 1 Capta 2 Imuno 3 Anális 5.3.1 5.3.2 CONCL REFER Anexos	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino SSÃO ção tumoral de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG fluorescência fluorescência da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em plasma CLAE Técnicas alternativas LUSÃO ÈNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85 86 88 91 94 94 97 101 102 113
4. 5. 5. 5. 6. 7. 8. 8.	4.9.2 10 DISCU 1 Capta 2 Imuno 3 Anális 5.3.1 5.3.2 CONCL REFER Anexos 1 Anexo	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino SSÃO ção tumoral de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG fluorescência da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em plasma CLAE Técnicas alternativas LUSÃO 2 1 – Especificação Técnica do [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 produzido no CInR	85 86 88 91 94 94 97 101 102 113 ad
4. 5. 5. 5. 6. 7. 8. 8.	4.9.2 10 DISCU 1 Capta 2 Imuno 3 Anális 5.3.1 5.3.2 CONCL REFER Anexos 1 Anexo	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino SSÃO ção tumoral de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG fluorescência de da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em plasma CLAE Técnicas alternativas LUSÃO ÈNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 0 1 – Especificação Técnica do [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 produzido no ClnR -FMUSP	85 86 88 91 94 94 97 101 102 113 ad 113
4. 5. 5. 5. 6. 7. 8. 8. 8.	 4.9.2 10 DISCUS 1 Capta 2 Imuno 3 Anális 5.3.1 5.3.2 CONCL REFER Anexos 1 Anexos 1 Anexos 2 Anexos 	Técnicas alternativas Análise da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor murino SSÃO ção tumoral de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG fluorescência de da metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em plasma CLAE Técnicas alternativas USÃO LUSÃO 0 1 – Especificação Técnica do [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 produzido no CInR FMUSP 2 – Resumo da Produção de [¹⁸ F]FDG realizada no CInRAD do HC	85 86 88 91 94 94 97 101 102 113 ad 113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Taxas da estimativa dos fenótipos de câncer mais incidentes para 2020
	no Brasil, excluindo câncer de pele não-melanoma22
Figura 2 -	Células do Microambiente tumoral maligno25
Figura 3 -	Maturação de fagócitos mononucleares provenientes de medula óssea
	até sua diferenciação nos tecidos e provenientes de órgãos
	hematopoiéticos até sua diferenciação nos tecidos26
Figura 4 -	Aniquilação pósitron-elétron ocorrendo no tecido, formando dois fótons
	detectáveis pela câmara PET29
Figura 5 -	Estruturas químicas moleculares de glicose e [18F]FDG31
Figura 6 -	Mecanismo de captação celular de glicose e de [18F]FDG31
Figura 7 -	Estruturas químicas de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195, [¹¹ C]-N-metilsecbutilamina e
	[¹¹ C]formaldeído37
Figura 8 -	Esquema dos componentes básicos de um equipamento CLAE39
Figura 9 -	Representação das reações químicas envolvidas na obtenção de
	carbono reativo e preparo de haleto de metila48
Figura 10 -	Representação das reações químicas envolvidas na produção de
	[¹¹ C](<i>R</i>)-PK1119549
Figura 11 -	Equipamento CLAE e módulos acoplados: Detector BGO e Coletor de
	Frações53
Figura 12 -	Contador Gama53
Figura 13 -	Equipamento PET/TC para pequenos animais56
Figura 14 -	Demonstração da tela inicial do Software PMOD™ 3.457
Figura 15 -	Tumor fixado em base metálica com O.C.T, preparado para corte
	histológico em micrótomo58
Figura 16 -	Scanner Typhoon® para leitura de fotoluminescência
Figura 17 -	Esquema dos principais passos do procedimento de imunofluorescência.
	Procedimento de inclusão do tumor em parafina e de imunofluorescência
	nos tecidos tumorais63
Figura 18 -	Dispersão dos volumes tumorais medidos aos 3 dias, 1 semana e 2
	semanas após inoculação70

Figura 19 -	Imagens PET com [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG fusionadas com
	imagem anatômica da TC71
Figura 20 -	Relação da captação tumoral (SUV) máxima e média dos radiofármacos
	[¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG com a variável volume72
Figura 21 -	Razão tumor/músculo das captações (SUV) máxima e média dos
	radiofármacos [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e [¹⁸ F]FDG nos diferentes pontos de
	avaliação tumoral (3 dias, 1 semana e 2 semanas)74
Figura 22 -	Autorradiografia de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em tumor mamário77
Figura 23 -	Imagens tumorais das reações de imunofluorescência com anticorpos
	Hoechst (Núcleo), CD86 (macrófago M1, pró-inflamatório), CD206
	(macrófago M2, anti-inflamatório) e fusão das três marcações78
Figura 24 -	Imagens das reações de imunofluorescência em tecido tumoral com
	anticorpos Hoechst (Núcleo), TSPO, CD11 (macrófagos) e fusão das
	três marcações79
Figura 25 -	Imagens das reações de imunofluorescência em tecido tumoral com
	anticorpos Hoechst (Núcleo) e OXPHOS (fosforilação oxidativa), e fusão
	das duas marcações80
Figura 26 -	Cromatogramas da média das metabolizações de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em
	plasma humano e de roedor, medidos por contador gama, e amostras
	representativas medidas por BGO aos 20, 45 e 60 minutos81
Figura 27 -	Metabolização do [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 em plasma humano e de roedor aos
	20, 45 e 60 minutos após a injeção82
Figura 28 -	Comparação da taxa de metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 entre
	amostras de mulheres e homens83
Figura 29 -	Comparação da taxa de metabolização de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 entre
	amostras de pacientes com esclerose múltipla e voluntários
	saudáveis
Figura 30 -	Porcentagem das diferenças de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 intacto em cada
	amostra de plasma de ratos, medido por EFS e ELL com diferentes
	solventes orgânicos em comparação com seu respectivo valor obtido por
	CLAE

Figura 31 -	Cromatogramas das metabolizações de [11C](R)-PK11195 de 4	
	diferentes amostras de tumores mamários murinos, medidos por BGO	
	aos 1, 20, 45 e 60 minutos87	7

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ensaios realizados com tecidos tumorais de cada camundongo utilizado
no estudo67
Tabela 2 - Crescimento tumoral em volume (mm ³) aos 3 dias, 1 semana e 2
semanas após inoculação de células tumorais
Tabela 3 - Captação média e máxima (SUV) dos radiofármacos [11C](R)-PK11195 e
[¹⁸ F]FDG em mama injetada com meio de cultura e em mama
contralateral76
Tabela 4 - Captação média e máxima (SUV) dos radiofármacos [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e
[¹⁸ F]FDG em tumor e em mama contralateral
Tabela 5 - Porcentagem de frações de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 e seus metabólitos
radioativos em plasma humano e de roedor medidos por contador gama
aos 20, 45 e 60 minutos após injeção do radiofármaco
Tabela 6 - Porcentagem de frações de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 no plasma humano,
separados por gênero, voluntários saudáveis e com pacientes com
diagnóstico de esclerose múltipla (EM) aos 20, 45 e 60 minutos após a
injeção84
Tabela 7 - Porcentagem de frações de [¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 no plasma de roedores
determinadas por EFS e ELL com acetato de etila, éter etílico e
clorofórmio em comparação (pareada) com os resultados da CLAE85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(R)-1-(2-clorofenil)-N-metill-N-1-(1-metil-propil]-3-isoquinolina
carboxamida
Carbono 11
2-deoxi-2-[¹⁸ F]fluoro-D-glucose,
Cromatografia Liquida de Alta Eficiência
Centro de Medicina Nuclear
Conselho Nacional para o Controle da Experimentação Animal
Enzima Ciclooxigenase
Dendritic Cells (pt. Células Dendríticas)
Extração em Fase Sólida
Extração Liquido-Liquido
Esclerose Múltipla
Glucose Transporters (pt. Proteínas Transportadoras de Glucose)
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo
Interleucina-4
Interleucina-6
Interleucina-10
Instituto Nacional de Câncer
Lipopolissacarídeo
Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
Mononuclear Phagocytic System (Sistema Mononuclear
Fagocitário)
Natural Killer (pt. Células Assassinas Naturais)
Peripheral Benzodiazepine Receptor (pt. Receptor Periférico
Benzodiazepínico)
Phosphate Buffering Solution (pt. Solução Tampão de Fosfato)
Positron-Emission Tomography (pt. Tomografia por Emissão de Pósitron)
Ressonância Magnética

SNC	Sistema Nervoso Central
SUV	Standardized Uptake Value (pt. Valor de Captação Padronizado)
TNF-a	Fator de Necrose Tumoral-a
ТАМ	Tumor-Associated Macrophage (pt. Macrófagos associados a
	Tumores)
ТС	Tomografia Computadorizada
ТМЕ	Tumor Microenviroment (pt. Microambiente Tumoral)
TSPO	Translocator Protein 18 kDa (pt. Proteína Translocadora 18 kDa)

RESUMO

Souza AM. Estudo da metabolização do radiofármaco [¹¹C](R)-PK11195 em plasma e seu potencial como marcador de inflamação tumoral [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

INTRODUÇÃO: Inflamação é um processo imunológico que pode ocorrer em diversas patologias, incluindo câncer. Os macrófagos associados a tumores são os principais mediadores de inflamação crônica na carcinogênese e desenvolvimento tumoral. A tomografia por emissão de pósitrons (PET) com [¹⁸F]FDG, que mede metabolismo glicolítico, é muito utilizado em estadiamento de tumores, contudo, não é específico para avaliação de infiltrado inflamatório. O radiofármaco [¹¹C](R)-PK11195 apresenta especificidade para a proteína translocadora 18 kDa (TSPO), que é super expressa em casos de neuroinflamação, podendo ser uma opção também para inflamação tumoral. [¹¹C](R)-PK11195 é metabolizado in vivo gerando dois metabólitos radioativos, e a determinação dos mesmos se faz necessária para correções na quantificação absoluta das imagens PET. **OBJETIVO**: Avaliar a metabolização do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195 em plasma arterial humano e animal, bem como avaliar a utilização do [¹¹C](*R*)-PK11195 como biomarcador inflamatório em microambiente tumoral mamário em modelo murino. MÉTODOS: Camundongos Balb/C, fêmeas, foram inoculados com células tumorais 4T1. Aos três dias, 1 e 2 semanas após a inoculação foram adquiridas imagens PET utilizando os radiofármacos [11C](R)-PK11195 e [18F]FDG. Após as aquisições das imagens os animais foram eutanasiados e os tumores isolados para análises por autorradiografia ou imuno-histoquímica para os marcadores de TSPO, CD86 (macrófago pró-inflamatório), CD206 (macrófago anti-inflamatório), CD11 (macrófago), OXPHOS (fosforilação oxidativa) e Hoechst (núcleo celular). As análises de metabólitos de [¹¹C](R)-PK11195 foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em plasma arterial de sujeitos saudáveis e pacientes com esclerose múltipla e, em ratos, nos tempos de 20, 45 e 60 minutos após injeção de $[^{11}C](R)$ -PK11195. Técnicas alternativas com Extração Líquido-Líquido e Extração em Fase Sólida também foram testadas. RESULTADOS: O pico de captação de [11C](R)-PK11195 ocorreu 1 semana após a inoculação, quando comparado aos tempos de 3 dias e 2 semanas. A captação tumoral máxima de [18F]FDG não apresentou diferença estatística entre os tempos. Os dados de autorradiografia e imuno-histoquímica corroboram com os dados das imagens de PET com [¹¹C](*R*)-PK11195. A análise da metabolização de [¹¹C](R)-PK11195 por CLAE em plasma humano revelou 68,8 ± 0,7% do traçador integro aos 20 minutos após a injeção, 55,0 ± 0,7 aos 45 minutos e 43,4 ± 0,7 aos 60 minutos. Análises que estratificaram gênero e quadro clínico - pacientes com esclerose múltipla e voluntários saudáveis - não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos tempos amostrais. A comparação da metabolização de [11C](R)-

PK11195 entre espécies também apresentou resultados similares. Os resultados de metabolização gerados com as técnicas alternativas não foram reprodutíveis quando comparados com os dados de CLAE. **CONCLUSÃO**: Os resultados sugerem maior especificidade de [¹¹C](*R*)-PK11195 por células inflamatórias no microambiente tumoral do que o [¹⁸F]FDG, principalmente em tumores de menor tamanho. A metabolização de [¹¹C](*R*)-PK11195 ocorre com similaridade entre espécies, gêneros e condição clínica e a melhor técnica de análise é a CLAE.

Descritores: Inflamação; Tomografia por Emissão de Pósitrons; Compostos Radiofarmacêuticos; Biomarcadores Tumorais; [¹¹C](*R*)-PK11195; Macrófagos Associados a Tumores.

ABSTRACT

Souza AM. Study of [¹¹C](R)-PK11195 plasma metabolization and its potential as a marker of tumor inflammation [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2020.

INTRODUCTION: Inflammation is an immunological process that can occur in several pathologies, including cancer. Tumor-associated macrophages are the main mediators of chronic inflammation in carcinogenesis and tumor development. Positron Emission Tomography (PET) with [¹⁸F]FDG, which measures glycolytic metabolism, is widely used in tumor staging, however, it's not specific for the evaluation of inflammatory infiltrate. The radiopharmaceutical [¹¹C](R)-PK11195 has specificity for the 18 kDa translocator protein (TSPO), which is overexpressed in neuroinflammation and may also be an option for tumor inflammation. [¹¹C](R)-PK11195 is metabolized in vivo generating two radioactive metabolites, and their determination is necessary for corrections in the absolute quantification of PET images. **PURPOSE**: To evaluate the [¹¹C](R)-PK11195 metabolization in human and animal arterial plasma, as well as to evaluate the use of [¹¹C](R)-PK11195 as an inflammatory biomarker in a mammary tumor microenvironment in a murine model. METHODS: Female Balb/C mice were inoculated with 4T1 tumor cells. At three days, 1 and 2 weeks after inoculation, PET images were acquired using the radiopharmaceuticals [¹¹C](R)-PK11195 and [¹⁸F]FDG. After the images were acquired, the animals were euthanized and the tumors isolated for analysis by autoradiography or immunohistochemistry with TSPO, CD86 (pro-inflammatory macrophage), CD206 (anti-inflammatory macrophage), CD11 (macrophage), OXPHOS (oxidative phosphorylation) and Hoechst (cell nucleus) markers. Analyzes of [¹¹C](R)-PK11195 metabolites were performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in arterial plasma of healthy subjects and patients with multiple sclerosis and, in rats, at 20, 45 and 60 minutes after [11C](R)-PK11195 injection. Alternative techniques with liquid-liquid extraction and solid-phase extraction were also tested. **RESULTS**: Peak of [¹¹C](R)-PK11195 uptake was 1 week after cells inoculation, compared to the 3 days and 2 weeks (time-points). The maximum tumor uptake of [¹⁸F]FDG showed no difference between the points. autoradiography statistical time The and immunohistochemistry data corroborate with the PET [¹¹C](R)-PK11195 image data. The analysis of [¹¹C](*R*)-PK11195 metabolization by HPLC in human plasma revealed 68.8 ± 0.7% of intact tracer 20 minutes after injection, 55.0 ± 0.7% at 45 minutes and 43.4 ± 0.7% at 60 minutes. Analyzes stratified by gender and clinical status - patients with multiple sclerosis and healthy volunteers - did not show significant differences in any of the sample times. The comparison of $[^{11}C](R)$ -PK11195 metabolization between species also showed no differences. The metabolization results generated with the alternative techniques were not reproducible when compared with the HPLC data.

CONCLUSION: The results suggest a better specificity of $[^{11}C](R)$ -PK11195 for inflammatory cells in the tumor microenvironment compared to $[^{18}F]$ FDG, mainly in small tumors. The $[^{11}C](R)$ -PK11195 metabolization occurs with similarity between species, genders and clinical condition and the best technique for its analysis is the HPLC.

Descriptors: Inflammation; Positron-emission tomography; Radiopharmaceuticals; Biomarkers, tumor; $[^{11}C](R)$ -PK11195; Tumor-associated macrophages.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Inflamação

A descrição de fenômenos associados às reações inflamatórias são datadas desde o século IV depois de Cristo, onde foram atribuídos 6 sinais fundamentais ao quadro clinico clássico de inflamação: vermelhidão (rubor), dor (*dolor*), calor, inchaço (tumor) e distúrbio da função (*functio laesa*) e mudança do balanço do ácido-base para pH ácido (acidose) devido à hipóxia¹. Durante esse período, não somente os sintomas foram identificados, mas também a definição molecular pôde ser atribuída. Atualmente sabe-se que a inflamação ocorre como uma defesa biológica que está fortemente ligada à imunidade inata e seus mecanismos moleculares, com diversos mediadores inflamatórios, em resposta a microrganismos invasores ou a lesões teciduais².

Há uma distinção na ocorrência de inflamação, que pode ser aguda ou crônica. A Inflamação aguda se manifesta por sinais iniciais à inflamação, geralmente autolimitados, seguidos por respostas de reparo e cicatrização dos tecidos. Quando há falha na resolução de uma inflamação aguda, há o desenvolvimento da inflamação crônica³ que pode contribuir para o surgimento de distúrbios inflamatórios relacionados as condições patológicas graves, como diabetes⁴, artrite reumatoide⁵ distúrbios neuroinflamatórios e câncer⁶. Embora geralmente a inflamação não seja uma causa primária, ela desempenha um papel importante no desenvolvimento dessas doenças, e o tratamento destinado a suprimir a inflamação em muitos casos pode melhorar o quadro clínico e influenciar o prognóstico de tratamento^{1,7}.

1.2 Neuroinflamação

Neuroinflamação é definida como uma resposta inflamatória no cérebro ou medula espinhal⁸ e trata-se de uma característica frequente em muitas doenças neurodegenerativas⁹, como doença de Parkinson¹⁰, esclerose múltipla¹¹ e doença de Alzheimer¹².

A inflamação no cérebro é um tópico amplamente estudado mundialmente, apesar de ter sido reconhecido tardiamente, comparado a inflamações periféricas, por não apresentarem os sinais clássicos como dilatação dos vasos sanguíneos (relacionado à vermelhidão, calor e inchaço) e dor¹³. Inicialmente, o sistema nervoso central (SNC) era considerado imune, pois não apresentava células natural killer residentes (NK), linfócitos T e B, e um sistema linfático, porém, houve uma mudança nesse cenário após as descrições da imunidade inata e adaptativa central, e a aceitação da interferência entre os sistemas nervoso e imunológico¹³. Fenômenos como a quebra da barreira hematoencefálica possuem importância nessa discussão, assim como o envolvimento de vários mediadores químicos e celulares. Existem consequências imunológicas, fisiológicas, bioquímicas e psicológicas dessas respostas neuroinflamatórias¹⁴, e alguns fatores, como insulto inicial, antecedentes genéticos, fatores ambientais e experiências anteriores ou da idade, se combinam para definir o grau de neuroinflamação¹⁵.

Atualmente, sabe-se que, envolvidas na resposta neuroinflamatória, estão presentes as células do SNC, incluindo as células gliais astrócitos e micróglia (responsáveis por aproximadamente 10% das células do SNC¹⁶), neurônios, células endoteliais e migração de células periféricas, quando pelo rompimento da barreira hematoencefálica^{14,15}.

As células da glia apresentam funções pró e anti-inflamatória, agindo em condições fisiológicas e patológicas, incluindo fagocitose, liberação de esteroides, redução de radicais livres e reparo celular¹⁷. As funções pró-inflamatórias, incluindo a liberação de citocinas e espécies reativas de oxigênio, quando em desequilíbrio, podem danificar neurônios saudáveis, causando disfunção sináptica, perda de sinapses e morte neuronal. Já funções anti-inflamatórias podem incluir a liberação de inibidores de ciclooxigenase e de fator de necrose tumoral α (TNF- α) a fim de encerrar a inflamação aguda local¹⁸.

Um desequilíbrio entre as funções pró-inflamatória e reparadora das células neuroimunes pode resultar em lesão do SNC. Embora os efeitos prejudiciais desse desequilíbrio sejam reconhecidos na doença neuroimunológica clássica, como a esclerose múltipla, evidências crescentes sugerem que a ativação crônica das células da glia pode contribuir para alterações patológicas encontradas em muitas doenças neurodegenerativas¹⁶. Essas funções celulares pró e anti-inflamatórias não são exclusivas de eventos neuroinflamatórios. Semelhante ao que ocorre no SNC, a modulação pró/anti inflamatória em ambientes tumorais está fortemente envolvida em processos bioquímicos que contribuem para remediar ou contribuir com a progressão tumoral.

1.3 Inflamação Tumoral

O primeiro indício da relação entre inflamação e câncer data do século XIX, com a descrição de leucócitos em tumores. Porém, só na última década foram obtidas evidências mais claras do envolvimento de células inflamatórias na tumorigênese³. Estima-se que doenças infecciosas e inflamações crônicas sejam responsáveis por 25% dos fatores causadores de câncer^{6,19}.

A inflamação envolve uma resposta que ativa células imunes, tais como mastócitos, células dendríticas (DC), NK e macrófagos, que podem iniciar a resposta inflamatória liberando citocinas, quimiocinas, proteases de remodelação da matriz e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, para eliminar patógenos e reparar danos teciduais. As falhas nessas respostas estão relacionadas à ocorrência de inflamação crônica³, que é favorável ao início e progressão tumoral¹⁹.

Em quadros de inflamação crônica, o sistema imunológico ativa diferentes mecanismos e vias de sinalização celular para o processo de cicatrização e reparo tecidual, que também estão ativos na progressão tumoral. Outras características comuns ao tecido cronicamente inflamado, tais como remodelamento tecidual, neoangiogênese e infiltração de macrófagos, são observadas em tecidos tumorais malignos².

Um microambiente favorável à carcinogênese pode ocorrer proveniente de doença autoimune, falha na resolução de uma inflamação aguda ou exposição contínua a agentes carcinogênicos²⁰. Conforme descrito por Singh *et al*³ (2019), apenas uma minoria de todos os cânceres é causada por mutações na linha germinativa, enquanto 90% das causas estão ligadas a mutações e fatores ambientais. Os autores ressaltam também que o desenvolvimento de câncer por causas ambientais e fatores de risco estão associadas a alguma forma de

inflamação crônica. Uma taxa de 20% dos cânceres está ligada a infecções crônicas, 30% ao tabagismo e poluentes inalados (como sílica e amianto) e 35% podem ser atribuídos a fatores alimentares (20% está relacionado à obesidade).

A investigação do microambiente inflamatório tumoral é uma das formas de contribuir cientificamente para que a neoplasia seja melhor compreendida, abrindo possibilidades para monitoramentos e tratamentos.

O câncer é um problema de saúde pública, tratando-se da segunda principal causa de mortalidade mundial, responsável por 9,6 milhões de mortes no ano, das quais cerca de 70% ocorrem em países de baixa e média renda²¹, segundo o último informativo publicado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) (https://www.paho.org/bra/), uma agência da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018.

No Brasil, as estatísticas de câncer podem ser consultadas no site do INCA – Instituto Nacional de Câncer (www2.inca.gov.br), que é um órgão auxiliar do Ministério da Saúde do Brasil no desenvolvimento e coordenação das ações integradas para a prevenção e o controle do câncer²². Em semelhança à taxa mundial, estima-se que o câncer de mama seja o segundo fenótipo mais incidente em território nacional (figura 1). Trata-se do câncer que mais ocorre em todas as regiões brasileiras, com estimativa de novos casos bastante heterogênea por regiões e por estados.



Fenótipos de câncer mais incidentes no Brasil

FONTE: INCA²².

Figura 1 - Taxas (porcentagem) da estimativa dos fenótipos de câncer mais incidentes para 2020 no Brasil, excluindo câncer de pele não-melanoma

A estatística divulgada pelo INCA para 2020, que está relacionada à incidência estimada conforme a localização primária de tumores, estima 66.280 novos casos de câncer de mama em mulheres no Brasil, o que significa que entre mulheres, dos novos casos de diferentes tipos de câncer, 30% da incidência corresponderá a mama - um risco estimado de 61,61 casos novos a cada 100.000 mil mulheres. O câncer de mama raramente acomete homens, representando apenas 1% do total de casos da doença.

O desenvolvimento do câncer de mama pode ocorrer por fatores de idade, endócrinos, biológicos, ambientais e genéticos. Quando possui caráter hereditário (predisposição genética) corresponde a cerca de 5-10% do total de casos²³ e, como as demais neoplasias, pode surgir por diferentes fatores de risco, com variações entre o sitio de origem, e muitas vezes, podem ter duas ou mais causas para seu início, promoção e progressão².

Uma forma de compreender a biologia tumoral é monitorar a expressão de macrófagos, células componentes do microambiente inflamatório tumoral, por conta de sua vasta contribuição em diversas formas de progressão tumoral, especialmente inflamatória²⁴. Os macrófagos são ativados/recrutados e podem contribuir tanto para fagocitar material invasivo quanto para produzirem fatores de crescimento estimulando a proliferação celular tumoral³ – dependendo do fenótipo que assumirem no tumor.

Usualmente, monitora-se a expressão de macrófagos tumorais por meio de marcadores biológicos presentes em ambientes inflamatórios, como interleucina-6 (IL-6) e interleucina-10 (IL-10) - citocinas associadas à macrófagos. Outros biomarcadores como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-8 (IL-8) e interleucina-1 β (IL-1 β) são evidenciados e, quando monitorados, contribuem para a compreensão da progressão do microambiente, porém, sempre é interessante buscar novas vias de monitoramento que possam contribuir com respostas diferenciadas e/ou complementares²⁵.

No que diz respeito à modelos tumorais, a linhagem 4T1 de câncer de mama é associada à um prognóstico ruim (aparentemente não apresenta alvos terapêuticos), porém, apresenta superexpressão de mediadores relacionados à inflamação, tais como macrófagos em modelos *in vitro* e *in vivo*. Madera *et al*²⁶

(2015) demonstraram *in vivo*, que macrófagos derivados de medula óssea de camundongos portadores de tumor 4T1 exibiram respostas aumentadas de citocinas pró-inflamatórias após estímulo inflamatório com lipopolissacarídeo (LPS). Dessa forma, a linhagem é elencada como opção de investigação do microambiente inflamatório tumoral.

1.3.1 Macrófagos Associados a Tumores

O corpo humano possui um resistente sistema imunológico capaz de monitorar células e tecidos satisfatoriamente, muitas vezes controlando e eliminando neoplasias que surgem ao longo da vida ainda nos estágios iniciais. Dessa forma, neoplasias detectáveis só ocorrem em casos que as células neoplásicas são capazes de evadir a resposta imune, "fugindo" dos eficientes mecanismos de defesa do organismo, assumindo resistência ao sistema imunológico.

Uma vez iniciado o desenvolvimento tumoral, diferentes fatores podem contribuir para a progressão, levando em conta heterogeneidade intratumoral e fatores externos do organismo²⁷. O tumor apresenta um ambiente complexo, composto por diferentes células e componentes, e que recebe o nome de Microambiente Tumoral (Tumor Microenviroment – TME). Este microambiente é composto não somente de células tumorais malignas, mas de vasos sanguíneos periféricos, matriz extracelular, células não malignas e moléculas sinalizadoras. Diversos estudos apontam a presença de matriz extracelular e diferentes células normais no microambiente tumoral, tais como células estromais, (fibroblastos, adipócitos, perícitos, células-tronco mesenquimais, células neurais е neuroendócrinas), e células imunológicas/inflamatórias, tais como linfócitos T, macrófagos, etc 27-29 (figura 2).

Dentre as células do TME, os Macrófagos Associados ao Tumor (*Tumor Associated Macrophages* – TAMs) são abundantes na maioria dos cânceres murinos e humanos, e geralmente, atuam na direção pró-tumorigênica²⁸. São um dos principais tipos celulares do sistema imune e são responsáveis pela comunicação principal entre inflamação e câncer. Devido à importância dessas

células, são comumente selecionadas como a principal via de estudos para a compreensão, monitoramento, e caracterização do microambiente tumoral.



FONTE: Neto AAM, Cardim SGB, Mothé CMA et al.³⁰ Figura 2 - Células do Microambiente tumoral maligno

Os macrófagos são células de defesa inata contra patógenos encontradas abundantemente em todos os órgãos e no tecido conjuntivo, responsáveis por impulsionar as respostas imunes adquiridas, iniciar a inflamação e promover a resolução e o reparo de danos teciduais, sendo um componente celular chave da resposta inflamatória não só fagocitária, mas na apresentação de antígenos, bem como na intensificação da inflamação, através da produção de citocinas próinflamatórias³¹. Em adultos, macrófagos evoluem de células precursoras produzidas na medula óssea, após estímulo da citocina denominada fator estimulador de colônias de monócitos (ou macrófagos) (M-CSF). Esses precursores entram na circulação sanguínea e amadurecem em monócitos³² (figura 3). Somente quando recrutados para um ambiente inflamatório, os monócitos que entram nos tecidos extravasculares, diferenciam-se e dão origem a macrófagos teciduais^{33,34}.

A expressão de TAMs contribui fundamentalmente para o desenvolvimento de neoplasias malignas, tendo papel importante na progressão do tumor e, no que diz respeito à mecanismos de sobrevivência intratumoral. Estas células estão envolvidas na resposta imunológica e nas modulações do microambiente, sendo frequentemente os principais mediadores das alterações do ambiente tumoral local²⁶. TAMs compõem um grupo de fagócitos derivados de células progenitoras hematopoiéticas, denominados por sistema mononuclear fagocitário (*Mononuclear Phagocytic System* - MPS). O MPS foi visto como uma sequência linear de progenitores pluripotentes, através de precursores e monócitos sanguíneos (figura 3). Muitos tecidos possuem expressão dos chamados macrófagos residentes, derivados do saco vitelino ou precursores do fígado fetal durante o desenvolvimento fetal, e eles assumem fenótipos especializados, dependendo do órgão (figura 4), como células de Kupffer que revestem os sinusóides no fígado, macrófagos alveolares no pulmão e células microgliais no cérebro³².



FONTE: Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S³⁵.

Figura 3 - Maturação de fagócitos mononucleares **A.** provenientes de medula óssea até sua diferenciação nos tecidos e **B.** provenientes de órgãos hematopoiéticos até sua diferenciação nos tecidos

Quando macrófagos são recrutados para o tecido tumoral eles são ativados e assumem uma atividade tumoricida. Essa ativação foi observada

experimentalmente de duas formas diferentes, pela diferenciação de macrófagos mediante a presença de estímulos. Os dados experimentais revelaram um evento de iniciação resultante de produtos de IL-4 T e um evento desencadeador gerado por ou IFN-γ. Desde então, comumente classificam-se os estados de ativação dos TAMs em dois fenótipos^{33,36-39} sendo eles:

A. Macrófago do tipo 1 (M1) ou "classicamente ativados", que estão associados com respostas de linfócitos Th-1, e podem ser ativados por estímulos como LPS e interferon- γ (IFN- γ). Tais macrófagos produzem TNF- α e espécies reativas de oxigênio que podem potencializar a inflamação (função pró-inflamatória)³⁷.

B. Macrófago do tipo 2 (M2) ou "alternativamente ativados", que estão associados com respostas de linfócitos Th-2, e podem ser ativados por interleucina-4 e interleucina-13 (IL-4/ IL- 3), glicocorticoides (como dexametasona) ou fator de crescimento tumoral- β (TGF- β). Tais macrófagos produzem citocinas como IL-10 que apresentam funções anti-inflamatórias^{37,40}.

Assim, fica evidente que os macrófagos são os principais iniciadores da inflamação crônica sutil presente no microambiente tumoral, pois são os principais produtores de mediadores inflamatórios⁴¹. Portanto, avaliar sua expressão celular pode auxiliar na compreensão do microambiente tumoral e a utilização de técnicas de imagem *in vivo* podem ajudar na determinação desta expressão através do uso de biomarcadores específicos.

1.4 Modalidades de Imagem

Uma forma de melhorar o prognóstico e predição de resposta a tratamentos de câncer de mama é associar protocolos clínicos a diferentes modalidades de imagem⁴² capazes de detectar e monitorar componentes do infiltrado tumoral mamário. Há diferentes tecnologias disponíveis, cada uma com sua especificidade e benefício.

A técnica de mamografia é conhecida com o padrão-ouro para detecção de nódulos de câncer de mama⁴², atribuída a baixo custo e alta sensibilidade e especificidade⁴³. A ressonância magnética é outra ferramenta utilizada em

diversas modalidades de detecção e monitoramento, mostrando maior sensibilidade nas triagens de pacientes com alto risco de câncer^{43,44}.

A ultrassonografia é mais uma técnica largamente utilizada, ocupando o lugar de método mais comum, principalmente em mulheres jovens e grávidas, para o diagnostico tumoral e apresentando sensibilidade satisfatória no monitoramento de resposta a tratamento⁴⁵. A ultrassonografia pode ser utilizada de forma complementar à mamografia, resultando numa poderosa ferramenta de diagnóstico para detecção de tumores de mama⁴⁶, principalmente visando diagnóstico precoce e diminuição de índices de mortalidade. No Brasil, a Sociedade Brasileira de Mastologia (SBM), o Colégio Brasileiro de Radiologia e Diagnóstico por Imagem (CBR) e a Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) recomendam que mulheres a partir dos 40 anos realizem mamografias anuais; já o Ministério da Saúde sugere exames bianuais a partir dos 50 anos⁴⁷.

As técnicas mencionadas acima são ferramentas eficazes empregadas para detectar e monitorar pacientes com câncer de mama, mas apresentam limitações, principalmente na sensibilidade variável (dependendo da técnica). A fim de superar essas limitações, técnicas mais sensíveis e abrangentes são elencadas para complementar diagnósticos e tratamentos, e, dentre as opções disponíveis, a Tomografia por Emissão de Pósitrons (*Positron Emission Tomography* - PET) é uma das modalidades de imagem molecular mais frequentemente utilizadas em rastreamento de tumores, possibilitando a visualização não invasiva e quantificação de processos biológicos⁴⁶. A PET fornece a capacidade de realizar avaliações longitudinais de todo o corpo, desempenhando função oportuna quando aliada ao uso de biomarcadores prognósticos, preditivos ou farmacodinâmicos.

A PET é uma modalidade de imagem quantitativa e não invasiva amplamente utilizada na avaliação de diferentes processos metabólicos *in vivo*. A técnica permite a compreensão de diferentes conceitos fisiopatológicos, parâmetros funcionais e caracterização de doenças, auxiliando o diagnóstico e avaliação terapêutica de distúrbios cardíacos, doenças neurodegenerativas e oncológicas⁴⁸. As imagens PET baseiam-se no registro da biodistribuição *in vivo* de uma molécula marcada com isótopo emissor de pósitrons (β +), como carbono11, flúor-18, gálio-68, etc., denominada radiofármaco ou radiotraçador. Os emissores pósitron, uma vez no organismo, interagem com elétrons do tecido promovendo uma reação de aniquilação (figura 4). Essa reação inicia-se pela interação pósitron-elétron e transforma suas massas em energia na forma de dois fótons (raios gama) de 511 keV, que se distanciam em direções opostas (180^o)⁴⁹.





A detecção em coincidência, dos fótons de aniquilação é realizada por detectores posicionados circularmente, 360°, ao redor do campo de visão (região de interesse dentro da área de detecção). A energia é absorvida por um cristal de cintilação dando origem a uma cascata de fótons com frequência na faixa da luz visível, que são convertidos pelos tubos fotomultiplicadores em sinais elétricos⁵⁰, possibilitando a obtenção de imagens PET. É válido ressaltar que, embora raios gama provenientes da aniquilação (interação do isótopo com elétrons do tecido) sejam detectados durante a imagem PET, são as moléculas orgânicas marcadas com radioisótopos que dão a especificidade por algum tecido e/ou processo celular/molecular⁵¹.

Imagens PET são avaliadas visualmente e quantitativamente. Atualmente, o parâmetro mais utilizado em estudos PET é o valor de captação padronizada SUV (*Standardized Uptake Value*), e é utilizado para medir a captação radioativa em volumes/tecidos. O SUV é uma razão numérica, semiquantitativa, que relaciona a concentração radioativa no tecido ou volume de interesse com a atividade total do radiofármaco injetada, considerando o peso do sujeito, conforme a equação abaixo:

SUV pode ser calculado de diversas formas, sendo que duas delas são SUV máximo (SUV_{max}), que é o valor máximo de concentração radioativa na região de interesse e SUV médio (SUV_{mean}) que fornece o dado da média da concentração radioativa no volume de interesse^{48,52}. Uma vez que tumores não são anatomicamente/fisiologicamente homogêneos, torna-se difícil determinar a região de captação manualmente (por meio de desenho de ROI – *Region Of Interest*) ou pelo uso de *templates* (modelo que possa ser utilizado como padrão), assim, o SUV máximo é comumente utilizado por ser menos dependente do observador e mais reprodutível que o SUV médio, pois representa a área com maior taxa de ligação do radiofármaco no volume ou região analisada⁵³. O SUV médio é mais bem utilizado em regiões mais uniformes e de limites mais bem definidos, e, portanto, aplicá-lo nas análises de captação tumoral pode gerar dados não reprodutíveis e variáveis relacionados principalmente ao desenho da ROI, gerando informações que são dependentes do observador⁵³.

A maioria dos equipamentos PET são acoplados a Tomografia Computadorizada (TC) ou a ressonância magnética (RM), sendo chamados de equipamentos híbridos PET/TC ou PET/RM, respectivamente, a fim de adquirir informações anatômicas e possibilitar correções de atenuação nas imagens metabólicas e funcionais. Estudos clínicos e pré-clínicos têm utilizado imagens PET/TC com radiofármacos para visualização e quantificação *in vivo* de processos inflamatórios cerebrais, tumorais, etc. Essa utilização têm demostrado resultados satisfatórios, como no estudo de Paydary *et al*⁵⁴ (2019), por exemplo, onde aquisições PET/TC com [¹⁸F]FDG apresentaram alto valor diagnóstico para estratificação prognóstica de risco de câncer de mama em comparação com modalidades convencionais.

O [¹⁸F]FDG ou 2-deoxi-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose é o radiofármaco emissor de pósitron mais utilizado nos estudos de PET/TC. Trata-se da molécula flúor-

desoxiglucose marcada com flúor-18. [¹⁸F]FDG possui grande similaridade com a molécula de glicose – as moléculas diferenciam-se pela substituição do grupo hidroxila (-OH) da glicose pelo grupo fluoreto (-¹⁸F), formando [¹⁸F]FDG (figura 5). Por conta da similaridade, a molécula de [¹⁸F]FDG é facilmente incorporada no interior das células por meio das proteínas transportadoras de glicose - GLUTs (*Glucose Transporters*), localizadas na membrana das células⁴⁸.





No organismo, a glicose é fosforilada pela enzima hexoquinase formando D-glicose-6-fosfato (Glicose-6-P). De forma análoga, o [¹⁸F]FDG passa pela mesma transformação gerando [¹⁸F]FDG-6-fosfato ([¹⁸F]FDG-6-P). Porém, ao contrário do que ocorre com a glicose-6-P, o [¹⁸F]FDG-6-P não é submetido ao metabolismo glicolítico, sendo impedido de entrar no ciclo de Krebs para produção energética. Isso faz com que [¹⁸F]FDG-6-P permaneça no interior da célula por tempo suficiente para serem adquiridas imagens moleculares (figura 6). O [¹⁸F]FDG-6-P é retirado da célula bioquimicamente pela remoção do fosfato da molécula por enzimas fosforilases, que possuem baixa atividade na maioria dos tecidos^{48,55}.



Figura 6 - Mecanismo de captação celular de glicose e de [18F]FDG

Por conta de seu mecanismo, o [¹⁸F]FDG é muito empregado em estudos de diagnóstico e estadiamento tumoral, uma vez que células cancerígenas possuem grande necessidade metabólica de glicose. Isso ocorre por conta do rápido crescimento e desenvolvimento celular tumoral, e, portanto, aumento da necessidade de energia que provém de glicose⁵⁶. Nesse quadro, a fosforilação celular parece ser aumentada em tumores, provavelmente por conta do aumento da atividade enzimática que trabalha para o consumo glicolítico. Além disso, podem haver regiões de hipóxia tumoral, com desvio para a via glicolítica anaeróbia, o que também promove aumento do consumo de glicose⁴⁸.

Contudo, há limitações na especificidade da PET-[¹⁸F]FDG para caracterizar o aumento da atividade proliferativa celular nos tumores, pois processos inflamatórios também propiciam aumento de glicose marcada nas células inflamatórias ativadas devido à elevada atividade metabólica⁴⁸. Dessa forma, um radiofármaco específico para células inflamatórias pode ser utilizado em associação ao [¹⁸F]FDG, gerando dados mais específicos do microambiente tumoral, com respostas separadas da atividade inflamatória e metabólica, personalizando tratamentos. Uma opção é o radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195, que atua como marcador específico de inflamação na presença de superexpressão da Proteína de Translocadora 18 kDa (TSPO).

1.5[¹¹C](*R*)-PK11195

A molécula (*R*)-1-(2-clorofenil)-N-metill-N-1-(1-metil-propil]-3-isoquinolina carboxamida ou abreviadamente (*R*)-PK11195 é uma substância sintética, inicialmente implementada para avaliar inflamação em diferentes órgãos⁵⁷ por sua afinidade por TSPO^{58,59}, até ser estabelecida como ferramenta associada à imagem molecular de ativação glial⁶⁰ e neuroinflamação^{10,61}. Essa substância possui relatos de aplicação em altas concentrações como anti-inflamatório, como descrito por Choi *et al.*⁶² (2002) que num estudo celular *in vitro* descreveram uma redução significativa nas induções pró-inflamatórias de LPS (um potente ativador da micróglia), COX-2 (enzima ciclooxigenase presente em inflamações) e TNF- α (citocina pró-inflamatória - fator de necrose tumoral α) em micróglia humana após tratamento com PK11195. Torres *et al.*⁶³ (1999) observaram inibições do processo

inflamatório de edema de pata induzido por administração local de carragenina em ratos pelo uso de PK11195 ou Ro5-4864 (outro marcador TSPO) 24 horas após as doses testadas (0,00001–10 mg/kg com inibições de (25% a 70%).

Os dados de afinidade de PK11195 por TSPO podem ser observados, de forma alternativa, pela associação do fármaco a isótopos radioativos, permitindo sua aplicação como radiotraçador em estudos de imagem. O isótopo mais utilizado para sua radiomarcação é o carbono-11 ([¹¹C]), mas sínteses utilizando Hidrogênio-3 (ou Trítio)⁶⁴ e lodo-123⁶⁵ também já foram referenciadas.

O isômero *R* da molécula PK11195 [(*R*)-PK11195] apresenta melhor afinidade ao sítio de ligação do que o isômero *S* da molécula [(*S*)-PK11195]⁶⁶ e é a escolha comum para as rotas de síntese. Há vantagens na síntese de (*R*)-PK11195 desmetilado, ou seja, na ausência de um grupo metil (-CH₃) com [¹¹C], ao invés de outros radioisótopos. A reação ocorre, resumidamente, pela alquilação do nitrogênio do grupo amida da molécula precursora em meio básico. A radioquimica do carbono-11 emprega a introdução de precursor contendo [¹¹C] radioativo, por adição de um grupo metil na forma de iodeto de metila [¹¹C] em uma ampla variedade de substratos sob condições que favorecem a formação rápida de um produto primário que pode ser facilmente purificado com alto rendimento e alta atividade específica⁶⁷.

O carbono-11 possui meia vida física de 20,4 minutos, que é considerada curta se comparada a isótopos como tecnécio-99m ([Tc^{99m}]) com 6 horas, lodo-123 ([I¹²³]) com 13,2 horas (emissores de fóton único); lodo-131 ([I¹³¹]) com 8 dias (emissores beta); ou até mesmo o Flúor-18 ([F¹⁸]) que possui meia-vida mais longa (emissor pósitron, 109 minutos). A meia-vida, ou seja, tempo em que a atividade radioativa decai pela metade, é um dos principais fatores limitantes para trabalhar com moléculas marcadas com [¹¹C]. Uma das dificuldades é a impossibilidade de transportar o material para locais distantes, assim, a síntese de radiofármacos marcados com carbono-11 necessita de um cíclotron (para produção do radioisótopo) e de um módulo de síntese (para marcação e purificação da molécula) localizados no ambiente onde o radiofármaco será utilizado (ou muito próximo). Em contrapartida, o átomo de carbono está presente em todas as moléculas orgânicas, incluindo pequenas moléculas de produtos naturais, compostos sintéticos, peptídeos e proteínas, o que facilita substituições

em moléculas precursoras sem alterações nas propriedades químicas. Além disso, a utilização de fármacos radiomarcados com [¹¹C] possibilita redução nos níveis de exposição ambiental, menor exposição dos pacientes à radiação e, se necessário, possibilita que um mesmo paciente receba múltiplas doses do radiofármaco no mesmo dia.

O radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195 foi o primeiro marcador a ser utilizado consistentemente em estudos de imagem molecular de neuroinflamação^{66,68}, sendo a primeira substância não benzodiazepínica a apresentar alta afinidade pela Proteína Translocadora 18 kDa (TSPO)^{58,69}. Dentre os diversos ligantes desenvolvidos, o [¹¹C](*R*)-PK11195 é o mais validado e utilizado em estudos do sistema nervoso humano⁷⁰, como, por exemplo, estudos *in vivo* de ativação glial em modelos de esclerose múltipla⁷¹ e doença de Parkinson⁷², além de apresentar resultados promissores em modelo tumoral de gliomas⁷³. A alta especificidade por TSPO e boa compatibilidade com diferentes grupos de pacientes, além de resultados positivos no SNC e em outros ambientes (mesmo que menos explorados), permite maior ousadia na investigação da expressão da proteína em outros tecidos, com destaque ao microambiente tumoral mamário, onde a TSPO já tem sido alvo de pesquisas⁷⁴.

1.6 Proteína Translocadora 18 kDa (TSPO)

A TSPO tem sido amplamente investigada em inflamações no SNC através de imagens *in vivo* e principalmente associada ao uso de biomarcadores.

A TSPO foi descoberta em 1977, em meio a pesquisas sobre receptores benzodiazepínicos específicos. Em questão, foi observada a presença de sítios de ligação de diazepam radiomarcados nas membranas cerebrais de ratos, além de ligações específicas em receptores no rim, fígado e pulmão. Este estudo descreveu que o local de ligação fosse provavelmente uma proteína bastante estável localizada nas membranas celulares⁷⁵. Devido à sua abundância nos tecidos periféricos e a fim de distingui-los dos receptores benzodiazepínicos centrais (GABAa), esse tipo de receptor de ligação benzodiazepínica foi denominado "receptor benzodiazepínico do tipo periférico" ou *peripheral-type benzodiazepíne receptor* (PBR)⁷⁶. Embora PBR tenha sido um nome amplamente

aceito pela comunidade científica, Papadopoulos *et al. (2006)*⁵⁹ propuseram a substituição do termo PBR por TSPO - Proteína Translocadora 18 kDa em 2006, com a justificativa de que a nova nomenclatura refletiria com maior precisão as funções celulares e fisiológicas da proteína.

Atualmente sabe-se que TSPO é uma proteína de 18 kDa de 169 aminoácidos, evolutivamente bem conservada, particularmente localizada na membrana mitocondrial ⁷⁷. Estudos têm relatado que a proteína está envolvida em diversos processos biológicos, como transporte de colesterol, esteroidogênese, homeostase do cálcio, metabolismo lipídico, oxidação mitocondrial, crescimento e diferenciação celular, indução de apoptose e regulação das funções imunológicas^{78,79}.

Pertinentemente, Narayan *et al.* (2017)³¹, reafirmaram a importância da TSPO em processos celulares, observando a expressão elevada de TSPO em macrófagos da corrente sanguínea em relação à expressão em monócitos.

A expressão de TSPO é particularmente alta em órgãos envolvidos na esteroidogênese como as glândulas suprarrenais, testículos, ovários, placenta, próstata, fígado, pulmão, coração, rim e sistema imunológico, mas é baixa na mucosa intestinal normal e no sistema nervoso central, onde a TSPO está localizada principalmente em células gliais e nos neurônios⁷⁴. Porém, em ambientes de ativação glial, como ocorre em modelos de neuroinflamação, encontra-se um quadro de superexpressão da proteína TSPO⁸⁰, possibilitando seu rastreamento nesse ambiente.

Diferentes estudos clínicos desenvolvidos para a compreensão de diferentes condições clinicas de doenças neuroinflamatórios, tais como doença de Alzheimer⁸¹, arteriosclerose⁸², doença de Parkinson⁸³ e esclerose múltipla^{71,84-86}, avaliaram a expressão de TSPO por exames de imagem molecular. Relatos mostram que a TSPO também é superexpressa em diferentes linhagens celulares tumorais como mama e próstata, participando da modulação da proliferação celular e tumorigênese^{87,88}.

Há mais de uma década, diferentes estudos têm investigado a TSPO em macrófagos de tecidos tumorais, com ênfase em tumores em tecido nervoso, mas com propostas de diferentes alvos para compreender a expressão em TAMs⁸⁹, possibilitando uma interpretação diferenciada do desenvolvimento tumoral.
Mukherjee et al. (2012)⁷⁴, em sua revisão, citou que a TSPO tornou-se um alvo para o desenvolvimento de medicamentos direcionados a abordagens terapêuticas oncológicas, e Zheng et al. (2011)⁹⁰ pontuou uma expressão dominante de TSPO em cânceres de mama, sugerindo um papel importante da proteína na progressão tumoral e resposta a tratamentos. Su et al. (2015) 73 afirmam que a utilização do radiofármaco [¹¹C](R)-PK11195 para imagens PET de gliomas humanos refletiu predominantemente a expressão de TSPO em macrófagos de células tumorais, comprovando o potencial uso do traçador no direcionamento do tratamento, focando a expressão da proteína no microambiente inflamatório. Outro estudo verificou presença de RNA mensageiro (mRNA) da proteína TSPO no citoplasma celular em tecido biopsiado, de carcinoma invasivo, sugerindo a investigação da proteína no modelo neoplásico⁹¹. Outras poucas descrições indicam que a compreensão da expressão de TSPO pode ser realizada via estudo da infiltração tumoral de macrófagos, porém há ênfase em tumores cerebrais92-94, o que estimula a investigação no tecido neoplásico mamário.

1.7 Metabolização plasmática do [¹¹C](R)-PK11195

A técnica PET utilizando [¹¹C](*R*)-PK11195 possui uma limitação intrínseca comumente relatada pelo alto nível de ligação inespecífica e baixa relação sinalruído⁶⁹, devido à presença de TSPO em todas as células do organismo, o que dificulta a utilização de métodos semiquantitativos ou visais. É esperado a superexpressão da proteína no ambiente inflamatório, mas a escolha de quantificação absoluta (estudo farmacocinético) seria o cenário ideal, onde a análise de metabólitos é um dos parâmetros necessários.

Uma vez administrado, o [¹¹C](*R*)-PK11195 é metabolizado *in vivo* gerando dois principais metabólitos radioativos: [¹¹C]formaldeído ([¹¹C]CH₂O) e [¹¹C]-*N*metilsecbutilamina⁹⁵ (figura 7). Tanto o radiofármaco quanto seus radiometabólitos emitem sinais que são detectáveis durante uma aquisição PET, resultando numa detecção radioativa total ([¹¹C](*R*)-PK11195 + radiometabólitos).



Figura 7 - Estruturas químicas de [¹¹C](*R*)-PK11195, [¹¹C]-N-metilsecbutilamina e [¹¹C]formaldeído

A formação dos metabólitos radioativos em plasma torna necessária a correção do sinal radioativo detectado durante as imagens PET, uma vez que o sinal total corresponde ao radiotraçador intacto + seus metabólitos radioativos.

Diferentes grupos propuseram diversas metodologias para a análise dos dados de imagem PET de [¹¹C](*R*)-PK11195, onde associa-se imagens de PET a estudos de análise metabólica de [¹¹C](*R*)-PK11195, definindo o perfil de metabolização do radiofármaco em plasma por meio de técnicas analíticas laboratoriais. Kropholler *et al.*⁹⁶ (2015) sugerem um modelo de compartimento reversível de dois tecidos para a análise de estudos cerebrais pelo uso de amostras de sangue arterial e Jucaite *et al.*⁹⁷ (2012) avaliaram a ligação do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195 usando uma análise completa do compartimento cinético por função de entrada arterial corrigida por metabólitos plasmáticos.

Dessa forma, para garantir que a quantificação corresponda ao radiofármaco intacto necessita-se definir o perfil de metabolização do [¹¹C](*R*)-PK11195 por meio da quantificação da molécula intacta e dos seus metabólitos, possibilitando avaliar a formação de metabólitos com o passar do tempo. A coleta de sangue arterial é um método invasivo, mas normalmente escolhido para estudos farmacocinéticos a fim de avaliar níveis totais ou plasmáticos de um radiofármaco em um tempo amostral previamente definido.⁹⁸ Os dados obtidos pela análise de metabólitos permitem determinar a taxa de metabolização do radiofármaco em função do tempo). O estudo de metabólitos também pode ser realizado em tecidos ou órgãos, como tumores por exemplo, para

compreender a metabolização do radiofármaco nesse sistema/região. Inclusive, estudos de metabolização podem ser realizados para avaliar a metabolização de um mesmo radiofármaco em diferentes regiões do organismo.

A quantificação da taxa de metabolização de $[^{11}C](R)$ -PK11195 é complexa devido ao metabolismo razoavelmente rápido do radiotraçador e à meia-vida curta do $[^{11}C]$ (20,4 minutos)⁹⁹. Nas amostras tardias (mais tempo após a injeção do radiotraçador), as medições são ainda mais difíceis, devido aos baixos níveis de radioatividade no plasma.

Informações detalhadas sobre o perfil de metabolização de [¹¹C](*R*)-PK11195 não são extensas na literatura^{95,96,100-102}, especialmente comparando a taxa de metabolização de diferentes espécies ou mesmo de diferentes gêneros. A metodologia encontrada na literatura para análise de metabólitos está concentrada no uso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, ou em inglês HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography*)^{103,104}. A CLAE é uma das técnicas de separação de compostos mais frequentemente utilizadas na detecção de [¹¹C](*R*)-PK11195 e seus radiometabólitos^{96,105}. A CLAE é uma técnica bastante eficiente na separação de componentes químicos e biológicos em estudos de metabolização, sendo considerada padrão ouro na cromatografia liquida.

A técnica CLAE necessita essencialmente de um equipamento composto por uma bomba de pressão, módulo de injeção (injetor), detector e computador acoplado e de fase móvel e estacionária (coluna cromatográfica) (figura 8). A fase móvel pode ser composta por um único solvente ou por uma mistura deles, e, por função da bomba, o solvente percorre todo o equipamento (por meio de linhas/tubos de solventes) num determinado fluxo (volume/tempo) préestabelecido. O injetor recebe manualmente ou automaticamente a amostra que será submetida à cromatografia, e dispõe a mesma ao fluxo da CLAE, até que chegue à coluna.

A coluna cromatográfica é a responsável por interagir com a amostra na fase móvel, evidenciando uma substância ou separando compostos de uma mistura. A coluna deve ser escolhida por sua composição (preenchimento), ou seja, pela afinidade com a fase móvel e principalmente pela amostra, facilitando ou atrasando a passagem da amostra durante a corrida cromatográfica, de acordo com a metodologia que está sendo desenvolvida.

As substâncias contidas numa amostra são separadas na coluna cromatográfica pela afinidade que a substância possui com a própria coluna e com a fase móvel. A principal influência na afinidade é a polaridade dos componentes, ou seja, se a afinidade entre a substância que está sendo analisada e a fase móvel for alta, a substância passará rapidamente pela coluna (tempo de retenção menor), porém, se a afinidade for baixa, essa passagem será mais lenta.

As substâncias separadas, conforme seu tempo de retenção, são identificadas pelo detector, que pode variar dependendo da amostra: ultravioleta (UV), radioativo, fluorescente, eletroquímico, etc. O detector converte as leituras em sinais elétricos que podem ser identificados e organizados em um computador contendo um software de processamento de dados.





As análises de [¹¹C](*R*)-PK11195 por CLAE normalmente utilizam uma combinação de soluções aquosas e solventes orgânicos como fases móveis. A água (100%) é o componente aquoso mais comum utilizado, mas sua combinação ou substituição com soluções de trietilamina⁹⁵, formato de amônio¹⁰² ou ácido fosfórico^{97,101} também são descritas na literatura.

Soluções aquosas geralmente são utilizadas associadas a solventes orgânicos clássicos, como acetonitrila^{105,106} e metanol¹⁰², em diferentes proporções. No entanto, esses solventes orgânicos têm uma característica tóxica e a metodologia CLAE geralmente requer grandes volumes de seus usos, o que

contribui para a geração de grandes quantidades de resíduos químicos derivados dos mesmos, sendo danoso ao meio ambiente^{107,108}.

Apesar das vantagens como robustez e alta sensibilidade, trata-se de uma técnica de alto custo, pois normalmente a CLAE necessita de longos tempos de análises, o que faz necessária a busca por técnicas alternativas que possuam a melhor combinação de sensibilidade para a quantificação correta do radiotraçador, baixo consumo de tempo e solventes e baixo custo. Além disso, há o alto custo relacionado com o equipamento, aparelhagem técnica e demais recursos – colunas, filtros, tubos, frascos, energia elétrica, etc.

Alternativas à técnica de CLAE, foram encontradas nas técnicas de Extração em Fase Sólida (EFS)¹⁰⁹⁻¹¹¹ e Extração Líquido-Líquido (ELL)^{112,113}, que têm sido alternativas úteis e mais baratas para separação de moléculas marcadas com carbono-11, provando ser conveniente na separação de radiometabólitos e traçadores intactos, incluindo técnicas de pré-concentração, radiosíntese ou purificação de [¹¹C](*R*)-PK11195.

EFS e ELL apresentam a capacidade de extrair substâncias de (ou para) fases aquosas e orgânicas por afinidade, baseadas nas interações de polaridade, ou seja, a força eletronegativa relacionada à formação de dipolos elétricos por moléculas ou grupos funcionais, e força eluotrópica (ϵ), que se refere a energia relacionada à capacidade de eluição de um solvente, baseado nas interações com o material adsorvido numa fase sólida (que será eluído). As técnicas de extração apresentam utilização assertiva em diferentes métodos, mas ainda não foram exploradas isoladamente para análises de metabolização plasmática de [¹¹C](*R*)-PK11195, o que torna estimulante essa nova proposta de aplicação.

Técnicas que possam substituir a CLAE, garantindo a obtenção dos mesmos resultados, permitiriam a prévia obtenção de dados de metabolização. Essa antecipação possibilitaria a obtenção de resultados mais sensíveis, já que as substâncias de interesse poderiam ser detectadas sem muitas passagens de meia vida, além de permitir a inclusão de mais amostras no mesmo dia de análise, viabilizando a utilização do mesmo lote de radiofármaco produzido no dia.

Uma vez que o uso de [¹¹C](*R*)-PK11195 como ferramenta de imagem está bem estabelecido na literatura, metodologias analíticas para determinar sua metabolização por CLAE podem ser otimizadas com maior ousadia, propondo técnicas alternativas à CLAE visando rapidez e sensibilidade, sem perder a confiabilidade que dados de CLAE possuem.

Enfim, nosso estudo identifica a possibilidade de avaliar a inflamação presente no microambiente tumoral, por meio da detecção do macrófago, utilizando PET com [¹¹C](R)-PK11195. O uso de [¹¹C](R)-PK11195 como marcador em tecido tumoral possibilitará obter informações sobre o componente inflamatório do microambiente, sem o viés da detecção do metabolismo glicolítico de células inflamatórias, contribuindo, assim, para tratamentos e acompanhamentos futuros mais personalizados e até mesmo para a detecção precoce de tumores.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é avaliar a metabolização do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195 em plasma humano e de ratos, bem como avaliar sua utilização como biomarcador inflamatório em microambiente tumoral mamário em modelo murino.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a captação tumoral inflamatória de [¹¹C](*R*)-PK11195 em ambiente tumoral mamário por meio da técnica de Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET);
- Comparar a captação tumoral inflamatória de [¹¹C](*R*)-PK11195 com a captação de [¹⁸F]FDG;
- Correlacionar dados de imagem de [¹¹C](*R*)-PK11195 com dados histológicos de imunofluorescência e autorradiografia;
- Avaliar a metabolização do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195 em plasma humano e de roedor pela técnica Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- 5. Avaliar as técnicas de Extração por Fase Sólida (EFS) e Extração Líquido-Líquido (ELL) como alternativas para a análise da metabolização do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195 em plasma de roedor em comparação com a técnica CLAE.
- Avaliar a metabolização de [¹¹C](*R*)-PK11195 em tecido tumoral murino pela técnica Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Químicos

3.1.1.1 Sólidos

- · (*R*)-N-Desmetil-PK11195 ABX Advanced Biochemical Compounds, Alemanha;
- · (R)-N-Metil-PK11195 ABX Advanced Biochemical Compounds, Alemanha;
- · Cloreto de Sódio PA (NaCl) Merck, Alemanha;
- · Fosfato de Sódio Dibásico Anidro (Na₂HPO₄) Vetec Química Fina, Brasil;
- Fosfato de Sódio Monobásico Anidro (NaH₂PO₄) Vetec Química Fina, Brasil;
- · Hidróxido de potássio (KOH_(s)) Sigma-Aldrich, EUA;
- · Hidróxido de Sódio PA (NaOH) Vetec Química Fina, Brasil;
- · Iodeto de sódio (NaI_{3(s)}) Sigma-Aldrich, EUA.

3.1.1.2 Solventes

- · Acetato de Etila PA (C₄H₈O₂) Merck, Alemanha;
- · Acetonitrila (C₂H₃N) Sigma-Aldrich, EUA;
- · Clorofórmio PA (CHCl₃) Nuclear, Brasil;
- · Dimetilsulfóxido (DMSO) ((CH₃)₂SO_(l)) Sigma-Aldrich, EUA;
- · Etanol Grau HPLC (C₂O₆H) Honeywell, Alemanha;
- Éter Etílico PA ($(C_2H_5)_2O$) Merck, Alemanha;
- · Xilol (C₈H₁₀) Synth, Brasil.

3.1.1.3 Soluções

· Ácido Clorídrico (HCl(I)) - Sigma-Aldrich, EUA;

- · Água Destilada (H₂O) MiliQ, Filtrada no momento do uso;
- · Bromo (Br_{2(l)}) Sigma-Aldrich, EUA;
- · Cloreto de Sódio 0,9% (NaCl) (Solução salina) Equiplex, Brasil;
- · Glicerol para preservação de fluorescência (C₃H₈O₃)- USB Chemicals, EUA;
- Triton-X (t-Octylphenoxypoly-ethoxyethanol) 100% Sigma Chemical, EUA.

3.1.1.4 Anticorpos

- Anticorpo secundário feito em cabra anti IgG de camundongo conjugado com fluoróforo Rodamina (TRITC) T-7782 – Sigma Aldrich, EUA;
- Anticorpo secundário feito em cabra anti IgG de coelho conjugado com fluoróforo fluoresceína (FITC) ab6717-1 - Abcam, EUA;
- Anticorpo primário feito em camundongo específico para Integrina alpha-M/beta-2 (CD11) - The Jackson Laboratory, EUA
- Anticorpo primário feito em camundongo específico para CD86 (marcador de macrófago M1) ab213044 - Abcam, EUA;
- Anticorpo primário feito em coelho específico para CD206 ou receptor de manose (marcador de macrófago M2) ab64693 - Abcam, EUA;
- Anticorpo primário feito em coelho específico para proteína Translocadora de 18 kDa (TSPO) LS-B14234 - LSBio, EUA.;
- Anticorpo primário feito em camundongo específico para fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS) ab110413 - Abcam, EUA;
- Corante fluorescente Hoechst marcador de DNA 33258 H3569– Invitrogen, EUA.

3.1.1.5 Soluções biológicas

Soro Normal de Cabra - The Jackson Laboratory, EUA, 005-000-121.

3.1.2 Equipamentos

3.1.2.1 Produção do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195

- · Calibrador de doses VDC-505 Venstra/Comecer, Holanda;
- · Calibrador de doses CRC-25 PET Capintec, Inc., EUA;
- · Cíclotron 16,5 MeV PeT Trace 880 GE Healthcare Life Sciences, EUA;
- · Detector de radiação Elysia Raytest, Alemanha;
- Equipamento CLAE 1220 Infinity II LC System Agilent Technologies, Alemanha;
- · Equipamento CLAE Knawer, Alemanha;
- Hot Cell MIP1-2P-1390 Comecer, Holanda;
- Módulo de síntese de carbono-11 Modular Lab Eckert & Ziegler, Alemanha.

3.1.2.2 Análises CLAE, EFS e ELL

- Agitador Vórtex Basic 2.800 RPM Kasvi, Brasil;
- · Centrífuga 5804 R Eppendorff, EUA;
- Equipamento CLAE 1260 Infinity II LC System Agilent Technologies, Alemanha;
- · Detector de radiação BGO Eckert & Ziegler, EUA;
- · Contador Gama Automático, Wallac Wizard 3" Hidex, Finlândia;
- · Dispersor e Mixer Manual Polytron PT2100 Kinematica AG, Suiça.

3.1.2.3 Indução de modelo animal de câncer de mama

- · Incubadora de CO₂ Sanyo, Japão;
- · Microscópio Eclipse TS100 Nikon, Japão;
- Câmara de Contagem Neubauer Melhorada em Vidro 9020-01 HBG, Alemanha
- Paquímetro Digital 502.150BL- Kingtools, EUA.
 - 3.1.2.4 Imagem de tomografia por emissão de pósitrons

PET/SPECT/TC para pequenos animais Triumph® II *Trimodality System* - CA, EUA.

3.1.2.5 Análise histológica

- · Câmera de Captura DXM1200 Nikon, Japão;
- · Criostato CM 3050 S Leica Biosystems, Alemanha;
- · Microscópio Eclipse E100 Nikon, Japão;
- Scanner/Leitor de fotoluminescência em placa de fósforo Typhoon FLA 9500
 GE Healthcare Life Sciences, EUA.
 - 3.1.3 Acessórios/ Consumíveis
 - 3.1.3.1 Produção do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195
- · Cartucho de separação SepPak® C18 light Waters, EUA;
- Coluna cromatográfica Luna® C18, 5 µm, 250x10 mm Phenomenex®, EUA;
- Coluna cromatográfica Novapak® C18, 5 µm, 250x10 mm Phenomenex®, EUA;
- · Filtro Millex HV 45 μ m Waters, EUA ;
 - 3.1.3.2 Análises CLAE, EFS e ELL
- · Cartucho Sep-Pak® Light C18 Waters, EUA;
- Coluna cromatográfica Luna® C18, 5 µm, 250 x 4.6 mm Phenomenex®, Brasil;
- · Filtro Millex PVDF 0,45µm Merck Millipore, Alemanha;
 - 3.1.3.3 Análise histológica

- Lâminas Snowcoat® brancas (76 x 26 mm) 3809299 Leica Biosystems, Alemanha;
- · Lamínulas (26 x 60 x 0,13-0,17 mm) Knittel Glass, Alemanha;
- Navalhas descartáveis de aço inox para micrótomo Alto Perfil 818 (80 x 14 x 0,35 mm) Leica Biosystems, Alemanha;
- · Placa de fósforo multipropósito Fujifilm Corporation, Japão;

3.1.4 Softwares

- 3.1.4.1 Desenho de figuras ilustrativas
- · Software ChemDraw Professional 19.1 PerkinElmer, EUA
- · Software Microsoft® Excel® Office Professional Plus 2016 Microsoft, EUA
- Software Microsoft® Power Point® Office Professional Plus 2016 Microsoft, EUA

3.1.4.2 Análises dos dados e estatísticas

- · Software GraphPad Prism® 6.01 GraphPad Software, EUA;
- · Software SPSS Statistics 20 IBM, USA;
- · Software PMOD[™] 3.4 PMOD Technologies Ltd., Suíça.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Radiosíntese de [¹¹C](R)-PK11195

[¹¹C](*R*)-PK11195 foi produzido no cíclotron do Centro de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) – CinRad – HC-FMUSP, conforme descrito nos itens abaixo.

3.2.1.1 Obtenção do carbono radioativo [¹¹C]

O [¹¹C] foi produzido em cíclotron na forma de dióxido de carbono ([¹¹C]CO_{2(g)}), e transferido para um módulo de síntese instalado dentro de uma *hot cell (*Em português *célula quente* - câmara de contenção de radiação nuclear blindada).

O [¹¹C]CO_{2(g)} recebido na *hot cell* foi capturado na entrada do módulo por coluna de peneira molecular. A temperatura da coluna foi aumentada com fluxo de He_(g), até atingir 400°C, para desprendimento do gás [¹¹C]CO_{2(g)}. O gás, posteriormente, seguiu para um forno de paládio aquecido a 600°C a fim de transformá-lo em metano ([¹¹C]CH_{4(g)}).

O [¹¹C]CH_{4(g)} foi transferido para uma coluna bromo (Br_{2(g)}), onde reagiu formando brometo de metila ([¹¹C]CH₃Br_(g)). O [¹¹C]CH₃Br_(g) passou por colunas de ascarite para retenção do bromo gasoso, e, na sequência, passou por uma coluna de iodeto de sódio (Nal_{3(s)}), onde reagiu gerando iodeto de metila ([¹¹C]CH₃I_(l). O [¹¹C]CH₃I_(l) radioativo foi levado ao frasco de reação.

$$[{}^{11}C]CO_2 \xrightarrow{Pd} [{}^{11}C]CH_4 \xrightarrow{Br_2} [{}^{11}C]CH_3Br$$

Figura 9 - Representação das reações químicas envolvidas na obtenção de carbono reativo e preparo de haleto de metila

Num frasco de reação contendo 1 mg de (*R*)-N-Desmetil-PK11195, 30 mg de hidróxido de potássio (KOH_(s)) e 300 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) foi borbulhado o [¹¹C]CH₃I_(l). A mistura de reação foi deixada reagir por 1 minuto a 40°C, e após, foi neutralizada com Ácido Clorídrico (HCI_(l)) 1M produzindo, assim o [¹¹C](*R*)-PK11195 (figura 10).

[¹¹ C]CH ₃ Br	Nal	[¹¹ C]CH ₃ I + (<i>R</i>)-N-Desmetil PK11195	DMSO	[11C](P)_DK11105
	400°C		40°C	

Figura 10 - Representação das reações químicas envolvidas na produção de $[^{11}C](R)$ -PK11195

3.2.1.3 Purificação do [¹¹C](*R*)-PK11195

O volume do frasco de reação foi passado através de um filtro Millex HV 1.2 μ m. O filtrado foi purificado por CLAE utilizando uma coluna Luna C18, 5 μ m, 250mm x 10 mm. Utilizou-se como fase móvel uma mistura de água / etanol (40/60) num fluxo de 5 mL/min. A formação de [¹¹C](*R*)-PK11195 foi observada pela formação do pico radioativo no tempo de retenção identificado por detector de radiação acoplado.

O [¹¹C](*R*)-PK11195 purificado foi coletado num frasco contendo 50 mL de água. Essa solução foi passada por cartucho SepPak® C18 light para retenção apenas do radiofármaco. Posteriormente, o cartucho foi eluido com 1 mL de etanol e, 10 mL de solução salina (NaCl 0,9%) – o volume de eluição contendo o radiofármaco foi coletado no frasco de produto final.

O frasco contendo o volume final de produto (11 mL) foi colocado em um calibrador de dose para medição da atividade radioativa.

Uma alíquota de 100 µL do produto foi injetada em CLAE para controle de qualidade. Para a análise, foi utilizada uma coluna Novapak C18, 5 µm, 250x10 mm e fase móvel de água:acetonitrila (47:53) num fluxo de 1 mL/min.

Uma alíquota de 0,5-1,0 mL do produto foi direcionada aos demais testes de controle de qualidade (item 3.2.1.4 e Anexo 1).

3.2.1.4 Controle de Qualidade

O [¹¹C](*R*)-PK11195 passou em todos os testes de controle de qualidade, conforme especificações do CinRad (Anexo 1).

3.2.2 Radiosíntese de [18F]FDG

[¹⁸F]FDG foi produzido no cíclotron do Centro de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do HC-FMUSP – CinRad, conforme descrito no Anexo 2. O radiofármaco passou em todos os testes de controle de qualidade, conforme especificações do CinRad (Anexo 3).

3.2.3 Amostra do estudo (Comitês de Ética)

3.2.3.1 Humanos

Participaram deste estudo 75 voluntários, sendo 24 controles saudáveis e 51 pacientes com diagnóstico de esclerose múltipla. Deste total de participantes, 27 homens (7 saudáveis) e 48 mulheres (17 saudáveis), com idades entre 19 e 62 anos. Os participantes foram recrutados no ambulatório de neurologia do hospital das clínicas da Faculdade de Medicina da USP (HC-FMUSP) durante a execução de um projeto de doutorado utilizando imagens PET com [¹¹C](*R*)-PK11195. O presente estudo foi realizado de acordo com os princípios descritos na declaração de Helsinque, e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) (CAPPesq 2.451.027)

3.2.3.2 Roedores

Foram utilizados neste estudo dois grupos de roedores, sendo eles: (1) 27 ratos Wistar, 12 machos e 15 fêmeas, 4-5 meses de idade, para otimizar e validar a análise de metabólitos de $[^{11}C](R)$ -PK11195 em plasma; (2) 48 camundongos Balb/C fêmeas, 7 semanas de idade, para avaliação da captação de $[^{11}C](R)$ -

PK11195 em modelo induzido de tumor mamário, e metabólitos de [¹¹C](*R*)-PK11195 em tecido tumoral.

Os animais foram mantidos em ambiente controlado, sob um ciclo de luz claro-escuro de 12/12h, com as luzes mantendo-se apagadas entre 19h e 7h, a uma temperatura ambiente de 22 \pm 2 °C e 50-60% de umidade. Comida e água foram fornecidas *ad libitum*.

Os experimentos com animais foram realizados de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional para o Controle da Experimentação Animal (CONCEA, Brasil), órgão constituinte do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI, Brasil). Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CEUA-FMUSP 992/2018).

3.2.4 Análise da metabolização de [¹¹C](R)-PK11195 em plasma

3.2.4.1 Coleta das amostras de sangue

A. Amostras de sangue humano

Os voluntários foram puncionados na artéria radial por profissional médico treinado. Foram administrados $385,37 \pm 17,43$ MBq ($10,42 \pm 0,47$ mCi) de [11 C](R)-PK11195 por via intravenosa e foram coletadas amostras de sangue arterial (4 mL) aos 20, 45 e 60 minutos, após a injeção do radiofármaco.

B. Amostras de sangue de roedor

Os ratos foram anestesiados (isoflurano 2-3% misturado com oxigênio a 100%) e, posteriormente, foi realizada cirurgia, por profissional treinado, para inserção de cânula na artéria femoral para coleta de sangue arterial. Na sequência, foram administrados 130,61 ± 61,79 MBq (3,53 ± 1,67 mCi) de $[^{11}C](R)$ -PK11195 na veia caudal ou peniana. Ainda sob anestesia, foi realizada uma única coleta sanguínea (2 mL) de cada animal, em diferentes tempos amostrais: grupo 1 (n = 7) aos 20 minutos, grupo 2 (n = 10) aos 45 minutos e grupo

3 (n = 10) aos 60 minutos. Após a retirada do sangue arterial, o animal foi eutanasiado por extirpação cardíaca.

3.2.4.2 Preparo das amostras de plasma

As amostras de sangue foram centrifugadas por 3 minutos a uma velocidade de 3500 G para separação do plasma.

As amostras de plasma humano foram analisadas pela técnica de CLAE e as amostras de plasma de roedor foram divididas em três alíquotas para análise pelas técnicas de CLAE (n = 15), EFS (n = 6) e ELL (n = 6).

No plasma (2 mL) separado para análise por CLAE adicionou-se 2 mL de acetonitrila para precipitação das proteínas. A mistura foi centrifugada por 1 minuto a 3500 G e o sobrenadante foi filtrado em filtro Millex PVDF.

3.2.4.3 Cromatografia Liquida de Alta Eficiência (CLAE)

O volume do plasma filtrado foi injetado no sistema CLAE, utilizando fase móvel Etanol:Água (60:40) e coluna de cromatografia C18 Luna®. As corridas tiveram duração de 22 minutos, num fluxo de 2,5 mL/min. Frações das corridas foram coletadas por coletor de frações a cada 1 minuto.A radiação contida nas amostras humanas e de roedores foi medida por contador BGO (figura 11) ou contador gama (figura 12), dependendo da sensibilidade requerida.



DETECTOR BGO

Figura 11 - Equipamento CLAE e módulos acoplados: Detector BGO e Coletor de Frações



Figura 12 - Contador Gama

3.2.4.4 Extração por Fase Sólida (EFS)

Uma mistura de 150 µL de plasma de sangue arterial de roedor e 1 mL de solução salina foi passada através de um cartucho Sep-Pak® Light C18 (previamente condicionado com 5 mL de etanol e 10 mL de água) e coletada. Posteriormente, o cartucho foi eluído com 1 mL de solvente orgânico, que também

54

foi coletado. A radioatividade contida nas duas alíquotas (aquosa e orgânica), e no cartucho, foram analisadas no contador gama. O ensaio foi realizado com três solventes orgânicos - acetato de etila PA, clorofórmio PA e éter etílico PA.

3.2.4.5 Extração Líquido-Líquido (ELL)

Um tubo contendo 150 μ L de plasma, 800 μ L de solução salina, 50 μ L de solução carreadora de (*R*)-*N*-metil-PK11195 1 mg.mL⁻¹ (solução padrão de difusão molecular facilitadora) e 1,6 mL de solução orgânica foi agitado em vórtex por 2 minutos e depois centrifugado por 1 minuto para a separação de fases¹¹⁴. Uma alíquota de cada fase foi medida em Contador Gama. O ensaio foi realizado com três solventes orgânicos - acetato de etila PA, clorofórmio PA e éter etílico PA.

3.2.5 Indução de modelo animal de câncer de mama

3.2.5.1 Cultivo de células tumorais da linhagem 4T1

Um criotubo contendo uma alíquota de 1 mL de células tumorais da linhagem murina 4T1, mantidas congeladas a -80 °C, foi descongelado rapidamente, com auxílio de banho maria (37 °C) (figura 13).

Dentro de um fluxo laminar, o volume de células foi transferido para uma garrafa de cultivo celular, onde foi adicionado meio RPMI (Instituto *Roswell Park Memorial*) 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado pelo calor isento de endotoxina (PBS), previamente aquecidos em banho maria (37°C).

A garrafa contendo as células foi mantida em incubadora umidificada a 37°C e 5% de CO_{2(g)}. A garrafa foi monitorada diariamente, com auxílio de microscópio, para acompanhamento do crescimento e viabilidade celular.

Conforme ocorreu crescimento celular, as células foram transferidas para outras garrafas até atingirem quantidade suficiente para a inoculação – a quantidade total contempla um número de alíquotas por animal que será injetado + pelo menos 3 alíquotas de segurança (cada alíquota = 1×10^5 células/100 µL). A contagem celular foi realizada com um teste colorimétrico utilizando Azul de Tripan, uma câmera de Neubauer e microscópio. Somente quando as células viáveis estavam em quantidade adequada foram injetadas nos animais (acima de 80% de viabilidade).

3.2.5.2 Inoculação de células tumorais 4T1

Para a inoculação, os camundongos foram anestesiados (isoflurano 2-3% misturado com oxigênio a 100%) e posicionados em maca para inoculação. Foram inoculadas 1x10⁵ células 4T1 num volume de 100 µL (células em meio RPMI 1640, 10% de soro) na mama superior esquerda. O crescimento tumoral foi acompanhado em dias alternados durante 15 dias após a inoculação, incluindo medições com paquímetro digital.

Os camundongos (n= 12) foram injetados na mama superior direita com um volume de 100 µL de meio RPMI 1640, para avaliar inflamação proveniente de lesão mecânica da seringa (experimento controle). Um grupo contendo oito animais foi inoculado com células 4T1 na mama direita e com meio RPMI 1640 na mama contralateral.

3.2.6 Aquisição de Imagem Molecular por PET com [¹¹C](*R*)-PK11195 e com [¹⁸F]FDG

Realizaram-se imagens PET em três pontos após a inoculação das células tumorais e/ou injeção de meio, sendo eles: 3 dias, 1 semana e 2 semanas.

Para a avaliação de captação tumoral e/ou do local de injeção de meio de cultura celular, os animais (n = 39) foram anestesiados (isoflurano 2-3% misturado com oxigênio a 100%) e posicionados com o tumor ou local da inoculação no centro do campo de visão do equipamento de imagem PET/TC para pequenos animais (figura 13).

Para imagem com $[^{11}C](R)$ -PK11195, 25 camundongos foram administrados 50,77 ± 6,09 MBq (1,37 ± 0,16 mCi) do radiofármaco na veia caudal, a aquisição de imagens com duração de 30 minutos foi iniciada 30 minutos após injeção do radiofármaco.





Figura 13 - Equipamento PET/TC para pequenos animais

Para a aquisição com [¹⁸F]FDG, administrou-se 37,38 \pm 1,51 MBq (1,01 \pm 0,05 mCi, DP = 0,18) do radiofármaco na veia caudal de 8 camundongos, e, após 45 minutos, as imagens PET foram adquiridas por 30 minutos.

Um grupo de animais (n = 6) realizou imagens com dois radiofármacos ([¹¹C](R)-PK11195 e [¹⁸F]FDG). Para estes animais, um intervalo de 24 horas foi respeitado entre a administração de cada radiofármaco.

Animais que fizeram imagens até o tempo de duas semanas de crescimento retornaram ao biotério após as imagens de 3 dias e 1 semana e lá foram mantidos até a próxima aquisição de imagens. Após finalização das imagens, os tecidos foram direcionados à análise histológica.

As imagens PET foram reconstruídas por algoritmo OSEM 3D (20 iterações e 4 subconjuntos). Foram adquiridas imagens de Tomografia Computadorizada (TC), 512 projeções, 45 kVp, 400 µA e magnificação de 1,3X.

As imagens foram reconstruídas por retroprojeção filtrada (FBP - *Filtered Back Projection*).

3.2.6.1 Quantificação das imagens PET/TC

As imagens de PET foram fusionadas com as imagens TC no software PMOD[™], utilizando a função *Fusion* disponível no programa. A fusão, além de fornecer informação anatômica, auxiliou no desenho manual das ROIs (*Region Of Interest* – Região de interesse) dos tumores. Os desenhos de ROIs foram delimitados manualmente (figura 14) nos diferentes planos anatômicos (axial, coronal ou sagital), abrangendo o volume total da região (3D). Uma ROI foi desenhada na região de músculo para cálculos da razão tumor/muscular.

As imagens PET foram quantificadas e os resultados expressos em SUV máximo e SUV médio.



Figura 14 - Demonstração da tela inicial do Software PMOD[™] 3.4, onde são realizados os ajustes iniciais de imagem PET e TC, e exemplo de uma ROI desenhada manualmente na região correspondente ao tumor de um camundongo

3.2.6.2 Autorradiografia *ex vivo*

Camundongos (n = 22) foram anestesiados profundamente (isoflurano 5% misturado com oxigênio a 100%) e eutanasiados por extirpação do coração, e os tumores foram extraídos: 10 no tempo de 1 semana e 12 no tempo de 2 semanas.

Os tumores foram congelados em composto O.C.T. (*Optimal Cutting Temperature*, em português Temperatura Ótima de Corte) diretamente na base metálica do criostato, em seguida, cortes histológicos com 40 µm foram realizados e coletados em lâminas histológicas (figura 15).



Figura 15 - Tumor fixado em base metálica com O.C.T, preparado para corte histológico em micrótomo

Em temperatura ambiente, as lâminas foram secas com nitrogênio (N₂) de forma rápida. As lâminas secas foram expostas em uma placa de fósforo por duas horas em local escuro, longe de qualquer fonte de luz. Após o tempo de exposição, ainda no escuro, a placa de fósforo foi colocada no scanner de fotoluminescência para leitura (figura 16).



Figura 16 - Scanner Typhoon® para leitura de fotoluminescência

3.2.6.3 Imunofluorescência

Os procedimentos de imunofluorescência ocorreram em duas etapas principais: inclusão dos tumores em parafina e corte/coleta dos tecidos tumorais em lâminas (Figura 17A), e reações de imuno-histoquímica com anticorpos fluorescentes (Figura 17B).

Os camundongos (n = 6) foram anestesiados profundamente (isoflurano 5% misturado com oxigênio a 100%) e eutanasiados por extirpação do coração, e os tumores foram extraídos: 3 no tempo de 1 semana e 3 no tempo de 2 semanas.

Os tumores foram incluídos em parafina para fixação do material e para possibilitar o corte em espessuras finas, conforme descrito no item I (Figura 17A).

I. Inclusão em parafina

Os tumores foram posicionados num molde adequado ao tamanho de cada um. Com auxílio de um frasco dispensador, foi colocada parafina derretida (65-70°C) sobre os tumores até cobri-los. Fecharam-se os moldes e aguardou-se até o endurecimento da parafina. Após endurecimento, desenformou-se os tumores parafinizados e levou-se os mesmo ao freezer (-5°C a -20°C) por 20 minutos. Posteriormente, encaminhou-se o material para a microtomia.

Utilizando navalha de aço inox, tecidos tumorais foram cortados na espessura de 4-5 µm para imunofluorescência. Os cortes foram coletados em lâminas previamente gelatinizadas (gelatina de pele bovina). Os cortes

selecionados foram submetidos à técnica de imunofluorescência e passaram pelos procedimentos abaixo para reidratação, recuperação antigênica, e reação com anticorpos de interesse. Segue descrição dos procedimentos realizados:

II. Desparafinização e Reidratação

Inicialmente, as lâminas foram lavadas na seguinte sequência de solventes para desparafinização e reidratação:

- · Xilol 10 minutos
- · Xilol 5 minutos
- Etanol 100% 5 minutos
- · Etanol 95% 3 minutos
- · Etanol 70% 3 minutos
- · Água destilada duas lavagens de 5 minutos cada

III. Recuperação antigênica

Para a recuperação dos antígenos as lâminas foram fervidas em tampão de citrato 10mM (pH 6,0) em uma panela de pressão elétrica. As lâminas foram mantidas entre 90 °C e 100 °C por 10 minutos. Após, as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por 10 minutos, e então, lavadas em água MiliQ por 5 minutos.

IV. Permeabilização

As lâminas foram incubadas por 10 minutos com Tampão Fosfato 0,1M (contendo 0,25% de Triton-X 100%), em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas somente com Tampão Fosfato 0,1M por 3 vezes, 5 minutos cada lavagem.

V. Bloqueio de autofluorescência

As lâminas foram incubadas com solução de glicina 0,15 M em Tampão Fosfato 0,1M, por 30 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com Tampão Fosfato 0,1M por 3 vezes, 5 minutos cada lavagem.

VI. Bloqueio de ligações não específicas

As lâminas foram incubadas com uma solução de 5% de albumina em Tampão Fosfato 0,1M + 10% de soro normal de cabra em Tampão Fosfato 0,1M, por 30 minutos em temperatura ambiente.

VII. Incubação com anticorpos primários

Os anticorpos primários foram preparados de duas formas:

- Dupla-marcação: (1) Anti-CD11 (1:50) e Anti-TSPO (1:100), (2) Anti-CD86 (1:250) e Anti-CD206 (1:250).
- 2. Simples marcação: (3) OXPHOS (1:250).

Cada lâmina foi incubada com 200µL de uma das misturas de anticorpos primários diluídos em Tampão Fosfato 0,1M. As lâminas foram incubadas em câmara umidificada e escura em temperatura ambiente por 1-2 horas.

Em seguida, a câmara, contendo as lâminas, foi armazenada por pelo menos 12 horas a 4º C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com Tampão Fosfato 0,1M por 3 vezes, 5 minutos cada lavagem.

VIII. Incubação de anticorpos secundários

Os anticorpos secundários foram preparados de duas formas:

1. Em pares (dupla-marcação): TRITC (1:100) e FITC (1:100).

2. Simples marcação: FITC (1:100).

Cada lâmina foi incubada com 200 µL da mistura de anticorpos secundários diluídos em Tampão Fosfato 0,1M. As lâminas foram incubadas em câmara umidificada e escura por 1 hora (temperatura ambiente). Posteriormente, as lâminas foram lavadas com Tampão Fosfato 0,1M por 3 vezes, 5 minutos cada lavagem.

As lâminas foram, então, incubadas por 30 minutos com corante Hoescht diluído (1:500) em Tampão Fosfato 0,1M, para marcação do núcleo celular. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com Tampão Fosfato 0,1M por 3 vezes, 5 minutos cada lavagem.

IX. Montagem

As lâminas foram cobertas com solução de Glicerol 1:1 em Tampão Fosfato 0,1M e lamínula, para preservação dos cortes. As lâminas foram seladas com esmalte nas laterais das lamínulas, evitando a secagem dos cortes e o movimento da lamínula quando manuseada no microscópio.

Após o esmalte secar, as lâminas foram levadas ao microscópio acoplado à câmera de captura para imagens digitais dos cortes histológicos e, posteriormente, foram armazenadas no escuro a 4º C.



Figura 17 - Esquema dos principais passos do procedimento de imunofluorescência. **A**. Procedimento de inclusão do tumor em parafina e de **B**. imunofluorescência nos tecidos tumorais

3.2.7 Análise da metabolização de [¹¹C](*R*)-PK11195 em tumor murino

Após a finalização das imagens PET, 14 animais foram submetidos a anestesia profunda (isoflurano 5% misturado com oxigênio a 100%) e eutanasiados por extirpação do coração. Os tumores foram extraídos: 6 animais no tempo de 1 semana e 8 animais no tempo de 2 semanas.

Os tumores foram triturados em 2 mL de acetonitrila com triturador de tecidos até obter um material homogêneo. O material em solução de acetonitrila foi centrifugada por 3 minutos a 3500 G e o sobrenadante foi separado e injetado em CLAE seguindo a mesma metodologia de análise plasmática (item 3.2.2.3).

3.2.8 Análise estatística e tratamento de dados

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média.

A quantificação de imagens PET foi realizada com auxílio do software PMOD[™] 3.4. Para avaliar os dados estatísticos de tumores (provenientes das quantificações PET), foi utilizado o software *Graph Pad Prism*® 6.01. Foi realizado o teste de normalidade *Kolmogorov-Smirnov*. As amostras não pareadas foram

analisadas por Teste de *Mann-Whitney* e amostras pareadas por teste *Wilcoxon*. As amostras pareadas foram analisados por Correlação e teste t de *Student*. Por meio da análise ROUT disponível no software foi realizada análise de identificação de outliers (Q=1%),

Os dados de CLAE, EFS e LLE, em plasma humano e de rato, foram analisados utilizado o software SPSS® *Statistics* por modelo linear geral para uma variável dependente (% da fração intacta [¹¹C](*R*)-PK11195), e fatores fixos com diferentes combinações, sendo eles: 1. tempo das amostras (20, 45 e 60 minutos); 2. Espécie; 3. sexo e; 4. condição clínica (controles saudáveis x com esclerose múltipla), sendo 3 e 4 analisados apenas em plasma humano. O teste t pareado *post-hoc* (*Bonferroni*) com correção de comparação múltipla foi realizado quando apropriado. Valores de P menores que 0,05 foram considerados significativos (P < 0,05 = significativo).

4. RESULTADOS

4.1 Radiosíntese de [¹¹C](*R*)-PK11195

A síntese de [¹¹C](*R*)-PK11195 obteve rendimento de 8,25 ± 0,5%, corrigido para decaimento radioativo, e atividade específica de 86,8 ± 7,2 GBq/µmol (n = 79). O radiofármaco passou em todos os testes de controle de qualidade, conforme especificações do CinRad – HC-FMUSP (Anexo 1):

- pH: 5,9 ± 0,02
- · Identidade Radionuclídica: 22,6 ± 2,3 minutos
- Pureza Radionuclídica: 517,3 ± 1,03 keV
- Pureza Radioquimica [¹¹C]PK11195: 99,9 ± 0,01 %
- Pureza Química PK11195: 1,24 ± 0,15 mg/L
- Precursor: 0,01 ± 0,00 mg/L
- Solventes Residuais (Etanol): $8,0 \pm 0,11 \%$
- Solventes Residuais (DMSO): 6,1.10⁻⁴ ± 1,4.10⁻⁴ %
- Integridade da Membrana Filtrante: A membrana íntegra após a filtração esterilizante.
- Endotoxinas bacterianas: 1,1 ± 0,2 UE/mL
- · Esterilidade: Aprovado em todos os testes.

4.2 Radiosíntese de [¹⁸F]FDG

A síntese de [¹⁸F]FDG obteve rendimento de 76,5 \pm 1,4% (n = 7), corrigido para decaimento radioativo. O radiofármaco não é submetido à avaliação de atividade específica. [¹⁸F]FDG passou em todos os testes de controle de qualidade, conforme orientações do CinRad – HC-FMUSP (Anexo 2).

- pH: 6,0 ± 0,0
- Identidade Radionuclídica: 110,4 ± 0,7 minutos
- · Pureza Radionuclídica: 519,8 ± 3,2 keV

- Pureza Radioquimica [¹⁸F]FDG : 99,0 ± 0,2 %
- Solventes Residuais (Etanol): 0,24 ± 0,02 %
- Solventes Residuais (Acetonitrila): $2,1.10^{-3} \pm 1,4.10^{-4}$ %
- Endotoxinas bacterianas: 5,0 ± 0,0 UE/mL
- Esterilidade: Aprovado em todos os testes.

4.3 Amostra tumoral

Do grupo inicial de 48 animais, foi identificado 1 *outlier* nos volumes tumorais – C7 (volume da 2^a semana), porém, não foi removido da análise, pois fisiologicamente tumores crescem de forma variável, e essa informação é útil para avaliar a captação de radiofármacos em diferentes volumes.

As imagens PET com $[^{11}C](R)$ -PK11195 foram adquiridas em 23 camundongos no total, sendo 4 animais aos 3 dias, 20 animais em 1 semana e 12 camundongos em 2 semanas após inoculação das células tumorais.

Imagens PET com [¹⁸F]FDG foram adquiridas em 8 camundongos no total, sendo 5 no tempo de 3 dias, 5 em 1 semana, e 4 camundongos com 2 semanas após a inoculação.

Tumores de 8 animais foram utilizados na análise de metabolização do [¹¹C](*R*)-PK11195 em tecido tumoral e tumores de 26 animais foram utilizados para análise histológica.

Na tabela 1 estão identificadas as análises realizadas nos tumores de cada um dos animais. Os camundongos (C) 28, 29, 30 e 31 receberam apenas inoculação de meio de cultura celular e estão denominados como *Sham* na tabela 1. A partir do animal 33, todos os animais que realizaram imagens PET foram inoculados na mama direita com meio de cultura e na mama esquerda com células tumorais 4T1, conforme a metodologia descrita.

Houve a perda de 5 animais, que morreram antes do crescimento tumoral, portanto, não estão citados na tabela 1 – camundongos 18, 23, 24, 32 e 36.

CAMUNDONGO	[¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195	[¹⁸ F]FDG	METABOLIZAÇÃO	HISTOLOGIA
C1	x			X
C2	x			X
C3	x			X
C4	x			X
C5	x			X
C6	x			X
C7	x			X
C8			X	X
C9	x			X
C10	x			X
C11	x			X
C12			X	
C13			X	
C14	X			X
C15	x			X
C16			X	X
C17	x			X
C19	x			X
C20	x			X
C21			X	
C22			X	
C25			X	
C26			X	
C27		X	X	
C28	X			
C29	X			
C30	X	X		
C31	X	X		
C32	X			
C33	X	X		X
C34	X	X		
C35		X	X	
C37	X	X		X
C38	X	X		X
C39			X	
C40			X	
C41			X	
C42			X	
C43				x
C44				x
C45				x
C46				X
C47				X
C48				x

Tabela 1 - Ensaios realizados com tecidos tumorais de cada camundongo utilizado no estudo

4.4 Crescimento tumoral

Crescimento tumoral foi acompanhado, para cada um dos animais, durante 2 semanas, sendo as medidas realizadas a cada dois dias. Na tabela 2 estão apresentados os volumes tumorais nos tempos que as imagens PET foram adquiridas, sendo 3 dias após a inoculação, 1 semana (8 \pm 2 dias de inoculação), e 2 semanas (15 \pm 1 dias) depois da inoculação tumoral.

CAMUNDONGO	CRESCIMENTO TUMORAL (mm ³)		
	3 dias	1 semana	2 semanas
C1	-	25,24	-
C2	-	33,33	55,44
C3	-	21,87	-
C4	-	30,34	301,97
C5	-	28,18	30,88
C6	-	19,72	89,29
C7	-	89,46	689,78
C8	-	-	115,91
C9	-	27,39	182,28
C10	-	28,35	321,03
C11	-	27,36	348,26
C12	-	-	29,55
C13	-	-	155,56
C14	-	48,41	-
C15	-	82,89	-
C16		154,2	-
C17	-	30,68	-
C19	-	36,38	-
C20	-	26,49	-
C21	-	131,75	-
C22	-	82,46	-
C25	-	5,15	-
C26	-	67,2	-
C27	-	42,06	-
C28	Sham	Sham	Sham
C29	Sham	Sham	Sham
C30	Sham	Sham	Sham

Tabela 2 - Crescimento tumoral em volume (mm³) aos 3 dias, 1 semana e 2 semanas após inoculação de células tumorais

CAMUNDONGO	CRESCIMENTO TUMORAL (mm ³)		
C31	Sham	Sham	Sham
C33	-	10,08	84,94
C34	-	20,9	81,51
C35	-	19,64	95,61
C37	-	23,39	136,19
C38	-	28,55	61,45
C39	-	11,43	241,27
C40	-	15,17	206,91
C41	-	8,03	162,5
C42	-	23,29	54,56
C43	-	24,77	-
C44	-	31,76	-
C45	-	56,53	-
C46	-	31,47	114,35
C47	-	28,51	95,29
C48	-	18,63	34,81

conclusão

Nota: Na tabela 2, dados faltantes aos 3 dias significam que não havia tumores em tamanho mensurável. Dados faltantes em 1 semana significam animais não avaliados neste crescimento. Dados faltantes em 2 semanas significam que os animais foram direcionados à estudos histológicos no ponto de avaliação anterior (1 semana). Informados que sham são animais injetados apenas com meio de cultura.

Volumes dos tumores não foram mensuráveis aos 3 dias após a inoculação, contudo apresentaram $38,6 \pm 5,5 \text{ mm}^3$ (n = 36) em 1 semana e 160,4 \pm 30,9 mm³ (n = 23) em 2 semanas (figura 18). Os valores de crescimento tumoral apresentaram diferença estatisticamente significativa entre 1 e 2 semanas 415% de aumento (P < 0,0001). Uma análise pareada (n = 20), com tumores que foram mensurados em 1 e 2 semanas após inoculação, também identificou diferença estatisticamente significativa (P = 0,0003).



Figura 18 - Dispersão dos volumes tumorais medidos aos 3 dias, 1 semana e 2 semanas após inoculação (**** = P < 0,0001)

4.5 Captação tumoral de [¹¹C](*R*)-PK11195 e [¹⁸F]FDG

As aquisições de imagem PET com $[^{11}C](R)$ -PK11195 e $[^{18}F]$ FDG para detecção tumoral foram adquiridas aos 3 dias, 1 semana e 2 semanas após inoculação de células 4T1. Na figura 19 estão representadas imagens ilustrativas de Tomografia Computadorizada (TC) e PET com $[^{11}C](R)$ -PK11195 e $[^{18}F]$ FDG, no mesmo camundongo, evidenciando a captação tumoral conforme ocorre o crescimento do tumor.



Figura 19 - Imagens PET com $[^{11}C](R)$ -PK11195 e $[^{18}F]$ FDG fusionadas com imagem anatômica da TC

A figura 20 apresenta os dados da captação tumoral (SUV máximo e médio) de $[^{11}C](R)$ -PK11195 e $[^{18}F]$ FDG aos 3 dias, 1 semana e 2 semanas após inoculação tumoral.


Figura 20 - Relação da captação tumoral (SUV) máxima (**A** e **B**) e média (**C** e **D**) dos radiofármacos $[^{11}C](R)$ -PK11195 (roxo) e $[^{18}F]$ FDG (laranja) com a variável volume

A análise da captação tumoral máxima (SUV máximo) de [¹¹C](*R*)-PK11195 foi de 0,41 ± 0,10 aos 3 dias, aumentando para 0,69 ± 0,13 em 1 semana (P = 0,44) e diminuindo para 0,38 ± 0,04 em 2 semanas após a inoculação de células 4T1 (P = 0,03). Já os dados de SUV máximo de [¹⁸F]FDG em tumor demonstraram aumento da captação de 0,79 ± 0,18 aos 3 dias, para 0,84 ± 0,13 em 1 semana (P = 0,8), e continuou aumentando para 0,99 ± 0,07 em 2 semanas após a inoculação (P = 0,19).

O SUV médio de $[^{11}C](R)$ -PK11195 foi de 0,31 ± 0,07 aos 3 dias, aumentando para 0,40 ± 0,06 em 1 semana (P = 0,8) diminuindo para 0,17 ± 0,02 em 2 semanas após a inoculação celular (< 0,0001). O SUV tumoral médio de [¹⁸F]FDG diminuiu de 0,64 \pm 0,14 aos 3 dias para 0,59 \pm 0,11 em 1 semana (P = 0,94), voltando a aumentar para 0,60 \pm 0,07 em 2 semanas após a inoculação (P = 0,71).

Foram realizados dois tipos de análise pareada: análise por pares e análise para medidas repetidas. A análise por pares propôs verificar as taxas (%) de aumento ou diminuição da captação entre 3 dias e 1 semana, e entre 1 semana e 2 semanas – para ambos radiofármacos. Já a análise pareada para medidas repetidas considerou apenas os animais que possuíam medidas em todos os tempos avaliados, ou seja, 3 dias, 1 semana e 2 semanas.

A captação de [¹¹C](*R*)-PK11195 tumoral máxima (SUV máximo) analisada de forma pareada por pares demonstrou 63% de aumento da captação de 3 dias para 1 semana (n = 3, P = 0,75), e 102% de diminuição de 1 semana para 2 semanas (n = 12, P = 0,01). Já os dados de SUV médio demonstrou 51% de aumento de 3 dias para 1 semana (n = 3, P = 0,75), e 170% de diminuição de 1 semana para 2 semanas (n = 12, P = 0,001). Já a captação máxima de [¹⁸F]FDG analisada de forma pareada por pares revelou 24% de aumento de 3 dias para 1 semana (n = 4, P = 0,38) e 27% de aumento de 1 semana para 2 semanas (n = 4, P = 0,13), por outro lado, o SUV médio demonstra 47% de diminuição de 3 dias para 1 semana (n = 4, P = 0,38) e 18% de diminuição de 1 semana para 2 semanas (n = 4, P = 0,63).

A análise pareada para medidas repetidas de alguns dados que permitiram essa verificação, permitiu observar que o SUV máximo de $[^{11}C](R)$ -PK11195 foi 0,35 ± 0,11 aos 3 dias, aumentando para 0,96 ± 0,60 em 1 semana e diminuindo para 0,23 ± 0,03 em duas semanas [F (2,4) = 0,99; p = 0,45]. Já o SUV médio tumoral de $[^{11}C](R)$ -PK11195 demonstrou 0,26 ± 0,08 aos 3 dias, 0,53 ± 0,29 em 1 semana, e 0,12 ± 0,02 em duas semanas [F (2,4) = 0,96; p = 0,46].

Na análise de SUV máximo de [¹⁸F]FDG, pareada para medidas repetidas, os resultados foram 0,89 \pm 0,20 aos 3 dias, 0,73 \pm 0,07 em 1 semana, e 0,99 \pm 0,07 [F (3,6) = 0,70; p = 0,59]. A análise quando realizada para captações tumorais médias (SUV médio) de [¹⁸F]FDG apresentou resultados de 0,71 \pm 0,15 aos 3 dias, 0,49 \pm 0,05 em 1 semana, e 0,60 \pm 0,07 em duas semanas após a inoculação celular 4T1 [F (3,6) = 0,92; p = 0,49].

Na figura 21 estão representadas as razões tumor/músculo das captações máximas e médias de [¹¹C](*R*)-PK11195 e de [¹⁸F]FDG, como dado complementar aos valores SUV. As razões de [¹¹C](*R*)-PK11195, baseado na captação máxima (figura 21A), foram 2,9 ± 0,66 após 3 dias de inoculação, aumentando para 3,1 ± 0,65 em 1 semana (P = 0,63) e diminuindo para 2,9 ± 0,34 em 2 semanas (P = 0,46). As razões tumor/músculo para [¹⁸F]FDG (captação máxima) aumentaram com o passar do tempo, com valores de 3,1 ± 0,66 em 3 dias, 3,7 ± 0,40 em 1 semana (P = 0,53) e 3,9 ± 0,65 em 2 semanas após a inoculação (P = 0,71).

Os dados das razões tumor/músculo também foram avaliadas por SUV médio, conforme figura 21B. Os resultados de [¹¹C](*R*)-PK11195 diminuíram de 2,8 ± 0,66 após 3 dias de inoculação para 2,3 ± 0,43 em 1 semana (P = 0,38) e para 1,7 ± 0,26 em 2 semanas (P = 0,51) As razões tumor/músculo para [¹⁸F]FDG aumentaram até o último ponto avaliado, sendo 2,9 ± 0,56 em 3 dias, 3,2 ± 0,30 em 1 semana (P = 0,53) e 3,9 ± 1,36 em 2 semanas após a inoculação (P > 0,9999).



Figura 21 - Razão tumor/músculo das captações (SUV) **A**. máxima e **B**. média dos radiofármacos [¹¹C](R)-PK11195 (roxo) e [¹⁸F]FDG (laranja) nos diferentes pontos de avaliação tumoral (3 dias, 1 semana e 2 semanas)

Os animais que foram injetados apenas com células tumorais ou com meio de cultura possibilitaram o desenho de uma ROI contralateral. O grupo era heterogêneo, e seus dados não permitiram comparações em todos os tempos de análise, porém, forneceram informações adicionais sobre a inflamação local (sem a interferência de injeção). As comparações foram analisadas (pareada para n > 3) por captação em meio x captação contralateral (tabela 3), ou captação tumoral x captação contralateral (tabela 4), tanto para [¹¹C](*R*)-PK11195 quanto [¹⁸F]FDG (SUV máximo e médio). Na tabela 3 estão descritos os dados de SUV máximo e médio encontrados para a captação de [¹¹C](*R*)-PK11195 e de [¹⁸F]FDG em mama injetada com meio de cultura.

As análises dos resultados das captações nas regiões citadas no parágrafo anterior apresentaram diferença significativa apenas na comparação de SUV máximo de [¹¹C](*R*)-PK11195 em tumor versus contralateral em 2 semanas (P = 0,0007).

RADIOFÁRMACO			3 DIAS			1 SEMANA			2 SEMANAS	
		Meio (n = 2)	Contralateral (n = 2)	Razão ¹	Meio (n = 2)	Contralateral (n = 2)	Razão ¹	Meio (n = 2)	Contralateral (n = 2)	Razão ¹
SUV	[¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195	$0,46 \pm 0,30$	0,50 ± 0,21	0,9	$0,34 \pm 0,04$	0,33 ± 0,01	1,0	-	-	0,9
máximo	[¹⁸ F]FDG	$0,69 \pm 0,03$	0,68 ± 0,12	0,9	$0,62 \pm 0,03$	0,52 ± 0,07	1,2	0,36 ± 0,00	0,41 ± 0,04	
SUV	[¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195	0,35 ± 0,10	$0,39 \pm 0,20$	0,9	0,26 ± 0,05	$0,25 \pm 0,03$	1,0	-	-	0,9
médio	[¹⁸ F]FDG	0,54 ± 0,03	$0,54 \pm 0,09$	1,0	0,47 ± 0,01	$0,39 \pm 0,01$	1,2	0,29 ± 0,01	0,33 ± 0,03	

Tabela 3 - Captação média e máxima (SUV) dos radiofármacos [¹¹C](*R*)-PK11195 e [¹⁸F]FDG em mama injetada com meio de cultura e em mama contralateral

¹Razão das captações meio/contralateral.

Tabela 4 - Captação média e máxima (SUV) dos radiofármacos [¹¹C](*R*)-PK11195 e [¹⁸F]FDG em tumor e em mama contralateral

RADIOFÁRMACO		3 DIAS		1 SEMANA			2 SEMANAS			
		Tumor (n = 1)	Contralateral (n = 1)	Razão ¹	Tumor (n = 14)	Contralateral (n = 14)	Razão ¹	Tumor (n = 8)	Contralateral (n = 8)	Razão ¹
SUV máximo	[¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 [¹⁸ F]FDG	- 0,68	- 1,29	- 0,6	0,53 ± 0,06 -	0,40 ± 0,12 -	1,3	0,46 ± 0,03 -	0,25 ± 0,03 -	1,8
SUV médio	[¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195 [¹⁸ F]FDG	- 0,56	- 1,9	- 0,3	0,33 ± 0,03 -	0,34 ± 0,09 -	0,9	0,20 ± 0,02 -	0,23 ± 0,03 -	0,9

¹Razão das captações meio/contralateral.

4.6 Autorradiografia

Na técnica de autorradiografia, onde cortes histológicos foram avaliados, foi possível observar (figura 22) que após uma semana de inoculação de células 4T1 a captação de [¹¹C](*R*)-PK11195 estava presente em todo o volume tumoral, com mais intensidade em região periférica (mais afastado do centro do tumor). A captação mais periférica também foi notada nos cortes teciduais de tumores de 2 semanas após inoculação, onde a captação foi predominante em região mais à extremidade do tumor, indicadas pelas setas brancas da figura, e baixa captação na região central (quase indetectável em alguns cortes).



Figura 22 - Autorradiografia de [¹¹C](R)-PK11195 em tumor mamário

4.7 Imunofluorescência

A figura 23 representa cortes teciduais de tumor mamário murino submetidos à análise histológica de imunofluorescência para macrófagos com fenótipos pró e antiinflamatórios. A linha tracejada divide o corte tecidual, onde a região superior corresponde à periferia do tumor (borda) e a região inferior corresponde ao centro tumoral. Em azul estão as marcações de núcleo celular, que aparentemente são mais expressivas em tumores maiores (2 semanas após inoculação). Já em vermelho são marcações de macrófagos anti-inflamatórios (CD206).

A imunofluorescência permite observar marcação do fenótipo anti-inflamatório mais perceptível em regiões de borda, contudo, com diminuição da expressão de 1 semana para 2 após semanas após inoculação. Em verde, a expressão do fenótipo pró-inflamatório (CD86) apresenta densidade em todo o tumor em 1 semana, com pontos similares à expressão de CD206, mas com maior concentração na região periférica, o que se mantém em tumores de 2 semanas.





A figura 24 representa cortes teciduais de tumor mamário murino submetidos à análise histológica de imunofluorescência com marcador de TSPO e marcador de macrófagos CD11. A linha tracejada divide o corte tecidual em região superior (periferia) e inferior (centro). Em azul, estão as marcações correspondentes ao núcleo celular, que está distribuído de forma homogênea em todo o tecido tumoral de 1 semana após inoculação, e de 2 semanas após inoculação.

Em vermelho, na figura 24, estão ilustradas as marcações fluorescentes de TSPO nas células tumorais, que apresentam maior expressividade em regiões de borda/periferia em ambos os tempos após inoculação de células tumorais 4T1. Aparentemente, há expressão de TSPO menos evidente na região central, em 2

semanas após inoculação, o que também é observado nas regiões de expressão do macrófago de fenótipo pró-inflamatório (marcador CD86, figura 21). As marcações em verde correspondem à localização de macrófagos em tumor, marcados por CD11, que apresentam distribuição em todas as regiões do corte tecidual tumoral com maior expressão nas regiões de preferia do tumor (bordas).



Figura 24 - Imagens das reações de imunofluorescência em tecido tumoral com anticorpos Hoechst (Núcleo), TSPO, CD11 (macrófagos) e fusão das três marcações

Na figura 25, estão representados os cortes teciduais de tumor mamário murino submetidos à imunofluorescência com anticorpo marcador de fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS) e marcador de núcleo Hoescht. A linha tracejada divide o corte tecidual em região superior (periferia) e inferior (centro). As marcações com anticorpo OXPHOS estão em verde, com expressão diminuída em 1 semana, com relação ao tecido e 2 semanas. Em ambos os tempos, as marcações celulares com OXPHOS concentram-se na região de transição borda-centro. Por outro lado, nota-se a presença de núcleo celular (Hoescht) em todo o tecido.



Figura 25 - Imagens das reações de imunofluorescência em tecido tumoral com anticorpos Hoechst (Núcleo) e OXPHOS (fosforilação oxidativa), e fusão das duas marcações

4.8 Amostra sanguínea/ plasmática

Dos 75 participantes que foram recrutados para o estudo, não foi possível coletar amostra de sangue arterial de 2 deles, devido oclusão do acesso arterial, sendo assim, a análise de metabólito em plasma humano foi realizada em 73 participantes. Com relação as amostras de sangue de roedores, foi necessária a exclusão de algumas amostras do estudo por conta de análises muito tardias, o que ocasionou em discrepâncias ou dificuldades de medição devido à demora no processo de preparo, erros de software que ocasionaram na perda de algumas injeções em CLAE, além de animais que morreram logo após a injeção. Assim, a amostra final foi de 14 ratos.

4.9 Análise da metabolização de [¹¹C](R)-PK11195 em plasma

4.9.1 CLAE

O [¹¹C](*R*)-PK11195 foi separado de seus principais metabólitos radioativos por CLAE, tanto em plasma de humano quanto de roedor. Os tempos de retenção foram determinados pelas análises CLAE e detectados por Contador Gama. Metabólito 1 foi detectado aos 11,1 ± 0,10 minutos, Metabólito 2 aos 17,1 ± 0,17 e [¹¹C](*R*)-PK11195 intacto aos 19,5 ± 0,16 minutos.

A identificação de $[^{11}C](R)$ -PK11195 e seus metabólitos radioativos pela técnica CLAE foi realizada utilizando dois detectores de radiação, o que pode ser comparado pela detecção do contador gama na amostra de plasma humano e na detecção do BGO em plasma de roedor, ambos representados na figura 26.



Figura 26 - Cromatogramas da média das metabolizações de [¹¹C](*R*)-PK11195 em plasma humano e de roedor medidos por contador gama, e amostras representativas

medidas por BGO. aos 20, 45 e 60 minutos (n = 73 e 3 aos 20 minutos; 71 e 5 aos 45 minutos; 68 e 7 – amostras de humano e rato, respectivamente)

A metabolização de [¹¹C](*R*)-PK11195 no plasma humano e de roedores foi medida por CLAE (figura 27A), e os resultados da fração intacta de [¹¹C](*R*)-PK11195 não apresentaram diferenças estatísticas entre as espécies nos tempos de 20, 45 e 60 minutos [F (2,215) = 0,33; p = 0,72].

Os metabólitos (M1 + M2) aumentaram ao longo do tempo no plasma humano e de roedores (figura 27B e 27C). Na Tabela 6 estão descritos os valores da média dos metabólitos radioativos, assim como do traçador intacto. A análise estatística não mostrou diferenças entre as espécies, em nenhum tempo de retenção para ambos os metabólitos (M1 [F (2,215) = 0,86; p = 0,429]; M2 [F (2,215) = 0,24; p = 0,79].) Os valores de [¹¹C](*R*)-PK11195 e seus metabólitos estão expressos na tabela 5.



Figura 27 - Metabolização do $[^{11}C](R)$ -PK11195 em plasma humano e de roedor aos 20, 45 e 60 minutos após a injeção. **A**. Fração intacta (fração não metabolizada) do $[^{11}C](R)$ -PK11195, **B**. Fração do Metabolito 1 e **C**. Fração do Metabolito 2

ESPÉCIES	SUBSTÂNCIAS		AMOSTRAS (%)	
		20 minutos	45 minutos	60 minutos
Humano		(n = 73)	(n = 71)	(n = 68)
	[¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195	$68,8 \pm 0,7$	$55,0 \pm 0,7$	$43,4 \pm 0,7$
	Metabólito 1	17,7 ± 0,5	25,1 ± 0,5	30,9 ± 0,5
	Metabólito 2	13,5 ± 0,5	$19.9 \pm 0,5$	25,6 ± 0,5
Roedor		(n=3)	(n=6)	(n=6)
	[¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195	70.3 ± 3,6	$53,3 \pm 2.4$	44.0 ± 2,5
	Metabólito 1	17.6 ± 2.4	26,9 ± 1.6	29.4 ± 1,7
	Metabólito 2	12.1 ± 2.6	19,8 ± 1.7	26.5 ± 1,8
Valor P	[¹¹ C](<i>R</i>)-PK11195	0,68	0,51	0,82
(humano x roedor)	Metabólito 1	0,96	0,31	0,40
	Metabólito 2	0,61	0,97	0,63

Tabela 5 - Porcentagem de frações de [¹¹C](*R*)-PK11195 e seus metabólitos radioativos em plasma humano e de roedor medidos por contador gama aos 20, 45 e 60 minutos após injeção do radiofármaco

As comparações da taxa de metabolização do radiotraçador entre mulheres e homens nas amostras humanas são mostradas na figura 28, sendo a fração intacta [¹¹C](*R*)-PK11195 em mulheres de 68,2 ± 0,9% em 20 minutos, 55,5 ± 0,9% em 45 minutos e 42,8 ± 1,0% aos 60 minutos, e nos homens 69,6 ± 1,3% aos 20 minutos, 54,9 ± 1,3% aos 45 minutos e 44,2 ± 1,4% aos 60 minutos, onde não houve diferenças estatísticas entre os gêneros, em nenhum dos tempos estudados [F (2,200) = 0,49; p = 0,61].



Figura 28 - Comparação da taxa de metabolização de $[^{11}C](R)$ -PK11195 entre amostras de mulheres (n = 46) e homens (n = 27)

A taxa de metabolização de $[{}^{11}C](R)$ -PK11195 em voluntários saudáveis e pacientes com esclerose múltipla é apresentada na figura 29. Em todos os momentos, as comparações das taxas de radiotraçador entre voluntários com ou sem esclerose múltipla não mostraram diferenças estatísticas ao longo do tempo [F (2,200) = 0,17; p = 0,84].



Figura 29 - Comparação da taxa de metabolização de $[^{11}C](R)$ -PK11195 entre amostras de pacientes com esclerose múltipla (n = 51) e voluntários saudáveis (n = 24)

As porcentagens médias de marcador intacto no plasma para voluntários saudáveis foram $69,2 \pm 1,3\%$, $55,9 \pm 1,4\%$ e $43,4 \pm 1,4\%$, e para os pacientes com esclerose múltipla foram $68,7 \pm 0,9\%$, $54,6 \pm 0,9\%$ e $43,5 \pm 0,9\%$, aos 20, 45 e 60 minutos, respectivamente. Estratificando o grupo por gênero, taxas descritas na tabela 6, também não houve diferenças significativas entre os sexos, com ou sem esclerose múltipla, aos 20, 45 e 60 minutos [F (2,200) = 0,28; p = 0,76].

Tabela 6 - Porcentagem de frações de [¹¹C](*R*)-PK11195 no plasma humano, separados por gênero, voluntários saudáveis e com pacientes com diagnóstico de esclerose múltipla (EM) aos 20, 45 e 60 minutos após a injeção do radiofármaco

GÊNERO	CONDIÇÃO CLÍNICA	AMOSTRAS (%)			
		20 minutos	45 minutos	60 minutos	
Mulher		(n = 46)	(n = 44)	(n = 42)	
	Saudável	67,3 ± 1,5	55,8 ± 1,5	42,2 ± 1,5	
	EM	69,2 ± 1,1	55,2 ± 1,1	43,4 ± 1,1	
Homem		(n=27)	(n=27)	(n=26)	
	Saudável	71,0 ± 2,3	55,9 ± 2,3	$44,6 \pm 2,4$	
	EM	68,3 ± 1,3	54,0 ± 1,3	43,7 ±1,3	
Valor P					
Value F		0.00	0.75	0.50	
	Mulher - Saudavel x EM.	0,32	0,75	0,52	
	Homem - Saudável x EM	0,30	0,48	0,73	
	Saudável - Mulher x Homem	0,18	0,99	0,39	
	EM - Mulher x Homem	0,60	0,48	0,86	

4.9.2 Técnicas alternativas

Na avaliação de técnicas alternativas para quantificação de metabólitos do [¹¹C](*R*)-PK11195, a comparação dos resultados de extração em fase sólida (EFS) e extração líquido-líquido (ELL) com CLAE no plasma de roedores (tabela 7) não mostrou diferenças significativas nas comparações de EFS *versus* CLAE e comparações ELL *versus* CLAE.

Tabela 7 - Porcentagem de frações de [¹¹C](*R*)-PK11195 no plasma de roedores determinadas por EFS e ELL com acetato de etila, éter etílico e clorofórmio em comparação (pareada) com os resultados da CLAE

SOLVENTE ORGÂNIC	0	PADRÃO	TÉCNICA ALTERNATIVA		
		CLAE	EFS	Valores P	
Acetato de Etila	(n = 14)	53.5 ± 2.7	50.9 ± 4.0	0,96	
Éter Etílico	(n = 6)	54.3 ± 4.4	54.1 ± 8.1	0,53	
Clorofórmio	(n = 13)	54.1 ± 2.8	44.4 ± 4.7	0,07	
		CLAE	ELL		
Acetato de Etila	(n = 5)	51.3 ± 4.7	67.1 ± 8.8	0,13	
Éter Etílico	(n = 6)	54.3 ± 4.4	62.1 ± 3.9	0,17	
Clorofórmio	(n = 6)	53.6 ± 4.5	71.8 ± 4.6	0,06	

Na figura 30 está ilustrada a porcentagem de diferença entre EFS e ELL em relação à CLAE (linha tracejada) em que foi observado menor desvio nas médias medidas pela técnica EFS.



Figura 30 - Porcentagem das diferenças de [¹¹C](*R*)-PK11195 intacto em cada amostra de plasma de ratos, medido por **A**. EFS e **B**. ELL com diferentes solventes orgânicos (acetato de etila, éter etílico e clorofórmio) em comparação com seu respectivo valor obtido por CLAE (linha tracejada)

4.10 Análise da metabolização de [¹¹C](*R*)-PK11195 em tumor murino

Os resultados obtidos pelas análises de metabolização tumoral de $[^{11}C](R)$ -PK11195 por CLAE geraram tempos de retenção muito heterogêneos aos 20, 45 e 60 minutos. Apesar de ser possível verificar uma alteração na metabolização de $[^{11}C](R)$ -PK11195 no tecido tumoral, na figura 32 nota-se um perfil diferente do avaliado em plasma de humano e de rato. Os cromatogramas das amostras de 1, 20 e 45 minutos apresentam estabilidade do radiofármaco em tumor, ou seja, não foi observada a formação de metabólitos. Aos 60 minutos, os picos formados compõem uma taxa de 12,5% do metabólito 1, 12,1% de metabólito 2 e 75,5% de $[^{11}C](R)$ -PK11195 não metabolizado. As demais leituras de cromatogramas foram inconclusivas e impossibilitaram a determinação de uma taxa média de metabolização.



Figura 31 - Cromatogramas das metabolizações de [¹¹C](*R*)-PK11195 de 4 diferentes amostras de tumores mamários murinos, medidos por BGO aos 1, 20, 45 e 60 minutos

5. DISCUSSÃO

5.1 Captação tumoral de [¹¹C](R)-PK11195 e [¹⁸F]FDG

Os experimentos realizados neste projeto permitiram avaliar a captação do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195 em tumor. Mesmo sem apresentar crescimento tumoral, incluímos imagens PET de [¹¹C](*R*)-PK11195 aos 3 dias após inoculação para verificar se já haveria infiltrado inflamatório no local da inoculação, uma vez que a linhagem 4T1 é considerada altamente tumorigênica e invasiva¹¹⁵, ou se poderia haver inflamação devido lesão gerada pela injeção. Para auxiliar na avaliação incluímos imagens PET de [¹⁸F]FDG, devido ao seu vasto uso como marcador de metabolismo glicolítico, além de radiotraçador inflamatório¹¹⁶, o [¹⁸F]FDG nos permitiu avaliar se a captação adquirida nas imagens de [¹¹C](*R*)-PK11195 eram realmente referentes à inflamação.

Os tumores não apresentaram crescimento após 3 dias de inoculação das células tumorais, o que provavelmente aconteceu por que o recrutamento celular de resposta imune adaptativa, ou seja, resposta especifica de inflamação requer aproximadamente 4-7 dias para ocorrer¹¹⁷. No tempo de 1 semana após a inoculação foi possível mensurar, por paquímetro, o volume tumoral. Neste último cenário, células inflamatórias ativamente envolvidas, como macrófagos, são recrutadas com maior intensidade e passam a compor grande parte da massa tumoral.

Há aumento da captação de ambos os radiofármacos de 3 dias para 1 semana após inoculação - exceto [¹⁸F]FDG analisado por SUV médio, o que pode ser resultado de um efeito da heterogeneidade tumoral, uma vez que o tecido que possui pontos de captação diferentes numa mesma região do mesmo tecido que está sendo analisado (ROI), ocasionando num resultado final mais "diluído". Na 1ª semana após inoculação, com relação ao [¹¹C](*R*)-PK11195, pode estar havendo maior expressão de sua captação devido à migração inicial de células inflamatórias para o microambiente tumoral¹¹⁷. É necessário lembrar que [¹⁸F]FDG também capta inflamação, e, portanto, a captação do mesmo pode estar expressando o dado somatório do recrutamento celular inicial das células do sistema imunológico e aumento do metabolismo de glicose das células tumorais. Esses achados correspondem à literatura que cita a utilização de [¹⁸F]FDG para medir o metabolismo da glicose, onde foi observado aumento da captação do radiofármaco em quadros de estadiamento e tumores mais agressivos, provavelmente por conta do crescimento tumoral e, portanto, maior necessidade metabólica celular, além de sua qualidade em também marcar tumores iniciais^{118,119}.

A captação de ambos os fármacos foi expressiva em periferia/borda do tumor, comportamento este que é mais evidente nas imagens adquiridas por [¹⁸F]FDG. O aumento da captação dos radiofármacos afirma a ideia, suportada por achados anteriores, de que células inflamatórias estão fortemente ligadas ao início, desenvolvimento e crescimento tumoral¹²⁰ e, por outro lado, o metabolismo glicolítico que é cada vez mais ativo.

Literatura que descreva o uso de [¹¹C](*R*)-PK11195 em tumores mamários é ainda inexistente, porém, Sun *et a*l. (2015) ao realizarem uma investigação da infiltração de macrófagos M2 em tumor mamário, linhagem 4T1, utilizaram o anticorpo CD206 ligado à uma molécula fluorescente como biomarcador e afirmaram a presença de macrófagos pró-inflamatórios em tumores com 150mm³ (biodistribuição *in vivo por* fluorescência), reforçando a presença de inflamação tumoral no modelo de câncer de mama aqui estudado.

Há, contudo, diminuição da captação de [¹¹C](*R*)-PK11195 na 2º semana após inoculação, com marcação principalmente de borda. Em contrapartida, a marcação de [¹⁸F]FDG é aumentada, demonstrando a necessidade de glicose celular cada vez mais necessária, conforme os tumores aumentam de volume. Esse quadro, suportado pela imunofluorescência, permite avaliar uma menor interação de macrófagos infamatórios no microambiente de tumores maiores.

As razões tumor/músculo afirmam as detecções de ambos radiofármacos em alvos celulares do microambiente tumoral, uma vez que não se espera captação muscular significativa de ambos. Razões tumor/ lado contralateral e meio/ lado contralateral também foram calculadas a fim de compreender particularidades dos radiofármacos nessas diferentes regiões.

O desenho de ROI contralateral foi realizado nos camundongos que receberam injeção de meio ou de células tumorais, tento, portanto, a mama contralateral sem nenhum injeção. A amostra disponível foi variável e pequena, comparada às amostras das análises anteriores, pois houve uma quantidade de animais que receberam injeções tanto de células tumorais (em uma mama) quanto meio (na mama oposta) e, portanto, o desenho contralateral foi impossibilitado.

Com auxílio dos dados de razão, foi possível observar a captação dos radiofármacos em mama injetada com meio de cultura em comparação com os dados de captação contralateral (análise de pontos pareados), onde SUV (médio e máximo) apresentou razão similar para [¹¹C](*R*)-PK11195 nos três tempos amostrais, sugerindo que ainda não há recrutamento celular inflamatório quantificável nesse tempo de imagem. Essa observação é notada também nos resultados de captação de [¹⁸F]FDG.

Os dados de captação de [¹⁸F]FDG, que foi o único com amostra disponível para desenho de contralateral aos 3 dias, infelizmente não permitiram comparações com captação tumoral. Contudo, em 1 e 2 semanas, os dados de captação de [¹¹C](*R*)-PK11195 (a amostra disponível só permitiu análise desse radiofármaco) demonstram que a capacidade de o radiofármaco detectar TSPO nessa região é comprovada, não somente pela visualização das captações pelas diferentes técnicas, mas por uma observação importante da razão tumor/ lado contralateral, onde tanto no tempo de 1 quanto 2 semanas, valores de tumor são superiores à captação contralateral, (sendo quase duas vezes maior em 2 semanas), enquanto a comparação da captação meio/ lado contralateral fica muito próxima da igualdade (0,9-1,0). Isso quer dizer que, se subtrairmos a captação de meio da captação tumoral, há valor positivo de captação do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195 em tumor. O SUV médio apresentou razões de 0,9 nos tempos de 1 e 2 semanas, o que também pode ser explicado pela heterogeneidade tumoral (citada parágrafos acima).

Enfim, a utilização de [¹¹C](*R*)-PK11195 como marcador de inflamação tumoral é uma sugestão que pode ser aplicada paralelamente ao uso de [¹⁸F]FDG em estudos de câncer, exatamente por conta do aumento de captação do marcador de glicose, devido ao aumento de células tumorais e necessidade metabólica, mas também pela presença de células inflamatórias envolvidas na carcinogênese e desenvolvimento tumoral, portanto, a somatória de dados dos dois traçadores pode personalizar e orientar diagnósticos e tratamentos de câncer¹¹⁶.

5.2 Imunofluorescência

Macrófagos estão presentes tipicamente em tecidos ao longo do ducto mamário, e apresentam-se antes do desenvolvimento de malignidades. São algumas das primeiras células a detectarem as células tumorais no início do desenvolvimento da neoplasia, posteriormente integrando a composição do microambiente tumoral e auxiliando seus processos de progressão¹¹⁷.

É possível observar a presença das células de macrófagos com bastante expressividade no tempo de 1 semana após inoculação, com distribuição aparentemente homogênea independente do fenótipo. A homogeneidade dos macrófagos pode se tratar de um momento em que ocorre uma adaptação no fenótipo celular de macrófagos pró-inflamatórios, pois, ao observarmos as imagens da segunda semana há predominante marcação de CD86, caracterizando um microambiente com presença majoritária de células pró-inflamatórias, ao contrário das marcações com CD206, que estão visualmente diminuídas em relação ao observado com uma semana após inoculação das células 4T1.

Madera et al. (2015)²⁶ demonstraram em seu estudo in vitro que a exposição a fatores secretados por células da linhagem 4T1, leva a respostas aumentadas de macrófagos após exposição ao LPS (promotor de resposta inflamatória), resultando em aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, fagocitose e liberação de óxido nítrico. Esses dados podem corroborar com nossa observação da expressão de células inflamatórias nos diferentes tamanhos tumorais, sugerindo que macrófagos com fenótipo pro-inflamatório possuam afinidade com fatores bioquímicos da linhagem tumoral. A mudança de fenótipo, ou polarização dos mesmos para anti ou próinflamatórios, pode ser explicada pelos diversos processos imunes que ocorrem no microambiente. Mosser D. e Edwards JP (2008)¹²¹ descrevem que macrófagos associados a tumores possuem aspectos muito controversos, podendo contribuir potencialmente em estágios iniciais predispondo células a transformações mediadas por alterações bioquímicas, e ao mesmo tempo erradicando estas células transformadas (decorrente do desenvolvimento tumoral). Contudo, ao mesmo tempo em que relatam que macrófagos classicamente ativados podem ter participado da formação do tumor podem, também, se diferenciar progressivamente de um fenótipo regulador e eventualmente se tornar células que compartilham as características dos macrófagos reguladores e de cicatrização de lesões. Os autores deixam claro que o microambiente é responsável pela caracterização fenotípica – que dependendo do estímulo possui diferentes resultados. Assim, compreende-se que macrófagos são expostos a diferentes ambientes e que definem a polarização no microambiente onde o macrófago atua. Portanto, a função pró ou anti-inflamatória é melhor reconhecida e definida por conta de estímulos e respostas celulares, notados principalmente pela expressão de citocinas^{117,121,122}.

Hao *et al.* (2012)¹²³ corroboram nossos dados, sugerindo modificações na polarização de macrófagos durante o crescimento tumoral, ocasionando a mudança de fenótipos. Os autores endossam que o fenômeno ocorre como resposta à estímulos do microambiente, promovendo ajustes da diferenciação original entre macrófagos ou pela migração de novas populações de macrófagos para substituir células originais.

Scodeller *et al.* (2017)¹²⁴ validaram o uso de um peptídeo especifico de CD206 como biomarcador para avaliar a expressão de macrófagos anti-inflamatórios em tumor mamário da linhagem 4T1 em tumores com média de volume de 150mm³, tamanho semelhante aos tumores avaliados na 2ª semana. Apesar dos autores não terem explicitado a região tumoral avaliada nos tecidos apresentados, é possível visualizar predomínio de expressão de CD206 na borda do tecido tumoral, assim como observado em nossas imagens de imunofluorescência.

Nossos resultados também estão em concordância com Mantovani *et al.* (2004)¹²², que relatam que macrófagos classicamente ativados (denominados M1) são células envolvidas nas respostas Th1, responsáveis por fagocitar microrganismos invasores e células tumorais, com capacidade de produção de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, o que pode justificar a expressão de CD86 em ambos os tamanhos tumorais avaliados.

As imagens de imunofluorescência reforçam a presença de TAMs no modelo de câncer de mama utilizado em nosso estudo, especialmente pró-inflamatórios, corroborando os dados obtidos pelas imagens PET adquiridas com [¹¹C](*R*)-PK11195 aos 3 dias, 1 semana e 2 semanas pós inoculação. Pode-se relacionar essa observação com um estudo publicado por Viana *et al.* (2015)¹²⁵, onde camundongos inoculados com células 4T1 submetidos à procedimentos invasivos de forma a criar ambientes

inflamatórios agudos e crônicos, apresentaram progressão tumoral maior na presença de inflamação crônica do que na inflamação aguda, ou seja, desenvolvimento e crescimento tumoral associado a inflamação mais severa. Além disso, no mesmo estudo, os autores sugerem que a infiltração celular crônica é importante para a progressão do tumor, uma vez que observaram que populações de macrófagos, células dendríticas e linfócitos significativamente maiores em camundongos com inflamação crônica.

A expressão de TSPO apresenta expressão diminuída com relação à expressão celular de macrófagos em tumor, principalmente em 2 semanas, contudo, aparentemente há maior expressão da proteína em células inflamatórias. Um estudo realizado por Pannell *et al.* (2020)¹²⁶ corrobora com nossas observações, pois demonstra regulação positiva de TSPO em micróglia/macrófagos induzidos por estímulos pró-inflamatórios, com aumento da expressão de TSPO, ao contrário de Narayan *et al.* (2017)¹²⁷, que observou uma regulação negativa de TSPO mRNA e proteína em macrófagos M1 (pró-inflamatórios) (estudo foi realizado em colônias de macrófagos mediante a estímulos pró e anti-inflamatórios).

Quanto às marcações com OXPHOS, infelizmente não foi encontrada literatura que utilizasse esse marcador em ensaios de imunofluorescência. Contudo, sabe-se que a marcação do anticorpo é relativa ao sistema de fosforilação oxidativa que ocorre na mitocôndria celular¹²⁸, que é também a localização da TSPO. Os aglomerados representados pela marcação fluorescente não são visualmente semelhantes à marcação do anticorpo TSPO, o que nos permite sugerir que não ocorre marcação falso-negativa de mitocôndria pelo anticorpo TSPO, que poderia estar expressando, em parte, marcação da estrutura celular, portanto, a expressão do anticorpo corresponde à presença da proteína translocadora 18 kDa nos macrófagos associados a tumores.

Enfim, as informações discutidas neste item possibilitam relacionar os dados de imunofluorescência com as imagens PET e os resultados de autorradiografia utilizando $[^{11}C](R)$ -PK11195. As marcações com imunofluorescência permitiram observar a presença de macrófagos pró-inflamatórios em borda, principalmente, e as imagens PET e de autorradiografia, permitem observar a maior captação de $[^{11}C](R)$ -PK11195 em regiões de borda/periferia e diminuição dessa captação em tumores com volume maior,

como também ocorre nas marcações com CD86, o que sugere o potencial uso de [¹¹C](*R*)-PK11195 como marcador de inflamação tumoral, ou seja, marcador de TSPO em macrófagos principalmente de fenótipo pró-inflamatório.

5.3 Análise da metabolização de [¹¹C](*R*)-PK11195 em plasma

5.3.1 CLAE

Nosso estudo propôs realizar a validação da metabolização do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195 em plasma, onde dispusemos de amostras de sangue de roedor, utilizados para validação inicial. Os animais foram submetidos à método invasivo de canulação arterial e eutanasiados logo em seguida à finalização do procedimento de coleta das amostras. Como a mesma amostra sanguínea de cada roedor foi analisada para as diferentes técnicas propostas neste trabalho, os animais foram utilizados em apenas um tempo amostral, permitindo coletar um volume maior de sangue para a análise. Utilizamos também amostras de sangue de humanos saudáveis e com doença neurodegenerativa – Esclerose Múltipla. Realizamos essa etapa do estudo em parceria com um projeto de doutorado do programa de neurologia também sob orientação da Dra. Daniele de Paula Faria.

Os tempos de retenção em contador gama são determinados pela coleta das frações radioativas durante as análises, frações que foram contadas gerando dados para os cromatogramas; Já em detecções por BGO, o software do CLAE determina a área correspondente aos picos radioativos, contudo, as detecções radioativas são bastantes ruidosas, dificultando a determinação da área correta de cada pico, principalmente na amostra de 60 minutos, onde já passaram 3 meias vidas do carbono-11. Assim, determinamos utilizar os dados gerados a partir do contador gama, que possui maior sensibilidade até em amostras mais tardias – cromatogramas criados pelas contagens radioativas das amostras coletadas.

Quantidades de amostras foram analisadas por CLAE, possibilitando que o mesmo procedimento fosse executado diversas vezes (3 amostras para cada um dos 73 humanos e 1 amostra para cada um dos ratos), salientando que o mesmo operador foi sempre o responsável por selecionar e quantificar os picos de ambos os detectores.

Apesar de não haver ampla disponibilidade de estudos de metabolização do radiofármaco [¹¹C](*R*)-PK11195, o que limita as comparações com outros autores, observamos na literatura disponível que comumente são citados dois metabólitos radioativos como substâncias principais ou abundantes, e nosso estudo também detectou dois picos de metabólitos radioativos, sendo eles: [¹¹C]-*N*-metilsecbutilamina e [¹¹C]formaldeído.

Alguns estudos descrevem resultados diferentes dos nossos achados. Jucaite *et al.* (2012)⁹⁷ e Roivainen *et al.* (2008)¹⁰¹ relataram um terceiro radiometabólito de [¹¹C](*R*)-PK11195, sem destaque de qual seria a terceira substância, mas, aparentemente, com tempo de retenção muito próximo do pico do radiotraçador, podendo tanto ser uma metodologia de análise diferenciada (com maior refinamento ou tecnologia mais sensível) capaz de detectar este terceiro radiometabólito, quanto um pico que se confunde à fração correspondente ao radiofármaco intacto. Já Greuter *et al.* (2005)¹⁰² descreveram 5 radiometabólitos em suas análises, apesar de relatarem as detecções como um pico de metabólito e duas áreas correspondentes aos outros metabólitos. Por outro lado, De Vos *et al.* (1999)⁹⁵, relataram apenas um pico de metabólito radioativo em plasma de roedor.

Nosso resultado para a taxa média da metabolização de [¹¹C](*R*)-PK11195, possui resultados semelhantes com Luoto *et al.* (2010)¹²⁹, apesar do número amostral pequeno desse trabalho. Os autores observaram uma taxa de 65 ± 11% (n = 12) e 43 ± 13% (n = 9) de [¹¹C](*R*)-PK11195 intacta no plasma após 20 e 40 minutos de injeção, respectivamente. Comparativamente a Greuter *et al.* (2005)¹⁰², que descreveram o metabolismo de [¹¹C](*R*)-PK11195 no plasma de 10 voluntários humanos saudáveis, a taxa observada é semelhante aos resultados encontrados em nosso estudo. Aos 20 minutos p.i., observaram 57,5 ± 6,4% do radiotraçador intacto no plasma e 45,2 ± 9,4% aos 59 minutos¹⁰². Roivainen *et al.* (2008)¹⁰¹ descreveram resultados diferentes dos nossos, analisando amostras de 10 pacientes com doença neurodegenerativa (doença de Alzheimer), descrevendo 72,6 ± 6,1% de [¹¹C](*R*)-PK11195 aos 20 minutos após a injeção do radiofármaco. A alta percentagem de radiofármaco intacto aos 20 minutos é justificada pelos autores como consequência da idade mais aumentada dos sujeitos analisados – pacientes participantes entre 61 e 82 anos¹³⁰. Comparando a metabolização de [¹¹C](*R*)-PK11195 entre roedores e humanos, não encontramos diferenças estatísticas, apesar de De Vos *et al.* (1999)⁹⁵ descreverem uma metabolização mais rápida em ratos quando comparado aos dados de humanos, com 58% ± 17% de [¹¹C](*R*)-PK11195 aos 10 minutos pós injeção (p.i.) e 78 ± 3,3% aos 20 minutos p.i, respectivamente. A explicação para essas diferenças pode ser a metodologia analítica empregada, o pequeno tamanho da amostra para as duas espécies no estudo anterior (humano = 5; animal = 3), o alto desvio padrão nos resultados dos animais, ou a questão de idade dos participantes (50 – 75 anos). Adicionalmente, as diferenças encontradas por De Vos et al. (1999)⁹⁵, Jucaite *et al.* (2012)⁹⁷ e Roivainen *et al.* (2008)¹⁰¹ podem ser explicadas por diferenças na metodologia analítica (os autores descreveram, respectivamente, a utilização de fase móvel composta de acetonitrila:água:trietilamina (65:35:5) acetonitrila:ácido fosfórico, (35:65/ 80:20/ 35:65) e acetonitrila:ácido fosfórico, (45:55/ 80:20/ 45:55).

Dessa forma, observamos uma grande variabilidade na caracterização dos radiometabólitos gerados da degradação do [¹¹C](R)-PK11195, sendo bastante difícil padronizar uma quantidade de radiometabólitos existentes para esta substância. Dessa forma, preferimos reportar os 2 metabólitos radioativos por nós identificados, como 'principais' radiometabólitos de [¹¹C](R)-PK11195 assim como a bibliografia atual.

Propusemos, neste trabalho, avaliar as possíveis similaridades também entre mulheres x homens, por conta da amostra maior em relação aos ratos. Não observamos diferença significativa na taxa de metabolização entre de gêneros. É importante observar que o metabolismo do marcador também não muda na presença da doença esclerose múltipla, o que permitiria o uso de dados de metabolização de indivíduos saudáveis para análises de imagem PET [¹¹C](*R*)-PK11195 de EM, ou seja, a possibilidade de usar a taxa da metabolização como um banco de dados, o que excluiria a necessidade de análises metabólicas em cada aquisição de PET [¹¹C](*R*)-PK11195. Nossos resultados com o plasma humano podem ser utilizados como um banco de dados de metabolização plasmática de [¹¹C](*R*)-PK11195 em humanos saudáveis, possibilitando utilizar os dados de metabolitos para uma determinada população, diminuindo a necessidade de alíquotas sanguíneas em cada exame PET com [¹¹C](*R*)-PK11195¹³¹. Esse banco de dados se

aplicado deve, no entanto, ser validado para cada população, de maneira a observar se a metabolização de [¹¹C](*R*)-PK11195 depende do continente ou do país.

No preparo de fases móveis para análises CLAE, diversos estudos utilizaram acetonitrila combinada com água, formato de amônio¹⁰² e/ou trietilamina^{65,95} em diferentes proporções. Já visando os hábitos de 'Química Verde', optamos por usar o etanol como alternativa, pois o solvente apresenta força de eluição semelhante à acetonitrila e é mais barato que a maioria dos solventes orgânicos. O sistema com etanol já é utilizado em nossa instituição no sistema de purificação de [¹¹C](R)-PK11195, ainda na radiosíntese, e foi validado para a análise de metabolização de [¹¹C](*R*)-PK11195.

Nossos resultados usando etanol para análise de metabólitos são semelhantes ao estudo de Parente *et al*¹⁰⁶ (2016), que utilizou fase móvel composta por acetonitrila e água (1:1) e descreveu 40% do traçador intacto no plasma de roedores aproximadamente 60 minutos após a injeção do radiofármaco.

Além disso, testes iniciais utilizando um sistema CLAE alternativo foram propostos para validar o uso da fase móvel alcoólica. Utilizamos os sistemas acetonitrila:água (60:40) e etanol:água (60:40) para analisar precursor desmetil(R)-PK11195 1mg.mL⁻¹ e padrão metil(R)-PK11195 1mg.mL⁻¹ e, nas duas fases móveis, os tempos de retenção foram definidos com proximidade (8 e 9 minutos em acetonitrila e 13 e 14 em etanol, respectivamente).

Por outro lado, a literatura disponível, independente da variação metodológica, descreve sempre a detecção dos metabólitos em tempo de retenção prévio ao radiotraçador, como nós também identificamos. Além disso, a definição do radiotraçador intacto é o fator de maior importância nas análises, pois é este o valor utilizado para a correção das curvas plasmáticas utilizadas em estudos farmacocinéticos de imagens PET.

5.3.2 Técnicas alternativas

Mesmo com a substituição de acetonitrila por etanol, o gasto total com análises cromatográficas por CLAE ainda se mantém alto. Por isso, um dos objetivos do trabalho foi avaliar o desempenho de duas técnicas alternativas na separação de $[^{11}C](R)$ -

PK11195 e seus metabólitos, em comparação aos dados obtidos por CLAE para o plasma de roedores, uma vez que optamos por testar as técnicas apenas em plasma de roedor. O plasma humano não foi utilizado para as análises EFS e ELL, porque em nossa metodologia a quantidade de radioatividade por mL de plasma foi menor do que a contida nas amostras de roedores, o que comprometeria a sensibilidade da detecção e não permitiria que cada amostra fosse testada pelos três técnicas propostas (limitação devido a apenas um contador gama disponível para medir todas as amostras). Portanto, apenas o plasma animal foi analisado pelas três técnicas analíticas e utilizamos os resultados de CLAE de roedor como referência para as técnicas de extração.

Uma vez que a CLAE é uma técnica bem estabelecida, novas técnicas de análises podem ser sugeridas com maior liberdade, e o desenvolvimento dessa nova metodologia ocorre em nosso estudo pelo uso de solventes mais clássicos (já usados em CLAE) permitindo a avaliação do desempenho das técnicas de extração sugeridas. Referências específicas usando ELL e EFS para análise de [¹¹C](*R*)-PK11195 não foram encontradas, portanto, buscamos a literatura sobre forças eluotrópicas (ϵ^{o}) como referência para as opções de solvente. Em nosso estudo, optamos por solventes mais clássicos com forças eluotrópicas mais baixas (ϵ^{o} acetato de etila = 0,52; clorofórmio = 0,40; éter etílico = 0,38), para não forçar a extração total dos componentes, uma vez que estávamos testando uma metodologia ainda não referenciada. Outros solventes com uma força eluotrópica maior como metanol (ϵ^{o} = 0,95) e etanol (ϵ^{o} = 0,88), podem ser testados em estudos futuros, a fim de observar suas vantagens e/ou desvantagens.

Por serem técnicas de análise mais rápida, baixo custo e eficiência nos processos de extração/separação de compostos, escolhemos as técnicas EFS e ELL como alternativas para a análise de metabolização de [¹¹C](*R*)-PK11195 em CLAE. Em nossos achados, as técnicas EFS e ELL apresentaram-se 4 vezes mais rápidas e consumiram 16 e 33 vezes menos solventes, respectivamente (estimativas), porém, é comum encontrar relatos do uso das técnicas em metodologias de pré-concentração ou purificação de amostras.

Chitneni *et al.* (2008)¹³² obtiveram extração eficiente dos radiotraçadores [¹¹C]PIB, [¹¹C]-6, entre outros, usando o EFS online (acoplado ao sistema HPLC) para purificação adicional de matrizes biológicas por CLAE e Lindner *et al.* (1996)¹⁰⁹,

determinaram a metabolização da L- [metil-¹¹C]metionina em plasma humano pelo isolamento do radiotraçador, utilizando a técnica EFS com NaOH/HCI como eluente, antes da análise por CLAE. O isolamento separou o radiotraçador e seus metabólitos com eficiência. Em outro metodologia, Price *et al.* (2005)¹¹² escolheram a técnica ELL usando éter isopropílico como solvente orgânico, como método mais sensível que o CLAE para amostras tardias de [¹¹C]PIB não metabolizado (60-90 minutos) no plasma humano. Um estudo realizado por de Paula Faria *et al.* (2014)¹¹⁴ menciona o uso de técnicas de extração como métodos oficiais de análise de metabólitos, obtendo sucesso na separação de três radiotraçadores de seus radiometabólitos, realizando EFS para análise [¹¹C]MeDAS usando acetonitrila como solvente orgânico e realização de ELL com éter isopropílico como solvente orgânico para análises de [¹¹C]PIB e [¹¹C]CIC.

Em nossos dados, os solventes utilizados no ELL não geraram resultados reprodutíveis entre amostras. Em relação à fase aquosa, a solução de cloreto de sódio a 10% possui característica hidrofílica¹³³, ou seja, espera-se maior afinidade com compostos de baixa polaridade, como os metabólitos (em comparação com o traçador intacto). O sal de cloreto de sódio tem uma característica polar¹³⁴, mas, uma vez dissociado na água, fornece cargas elétricas que auxiliam nas interações com os metabólitos, extraindo eficientemente dessa fase. No entanto, os resultados variáveis sugerem que a força iônica fornecida pelo sal cloreto à solução pode não ter sido suficiente para eluir os metabólitos. Uma solução de cloreto de sódio a 10% foi utilizada em nosso estudo, mas também realizamos um teste com solução a 0,9% e 20%, sendo a menor concentração pouco promissora e a maior concentração não mostrou grandes diferenças. É válido sugerir que outras concentrações possam ser testadas em estudos futuros.

Quanto aos solventes orgânicos utilizados, a técnica ELL passa por muitos processos mecânicos de preparo, como agitação vigorosa, centrifugação e pipetagem, e além do viés do operador, existe a forte característica volátil desses solventes. Todos esses fatores podem ter ocasionado variabilidade nos resultados obtidos, com atenção aos erros padrão.

As duas técnicas alternativas precisam de melhorias metodológicas. O procedimento SPE utiliza um cartucho C18, que é o mesmo material utilizado no preenchimento da coluna de cromatografia CLAE, o que explica resultados com desvio

menor com relação ao próprio resultado obtido em CLAE. No entanto, avaliando o grupo amostral, os resultados apresentados são visivelmente dispersos. O mesmo é observado nos resultados de ELL, com valores mais dispersos e médias distantes dos resultados obtidos por CLAE em todos os solventes. Assim, as técnicas de extração de EFS e ELL apresentaram baixa reprodutibilidade e alta variabilidade de resultados quando comparados ao CLAE, necessitando de ajustes futuros, confirmando que a CLAE continua sendo a melhor opção para separação e detecção de [¹¹C](*R*)-PK11195 e seus metabólitos.

Identificamos limitações que não permitiram complementar os resultados obtidos. A caracterização dos metabólitos não foi possível por não haver disponibilidade dos padrões dos 2 metabólitos majoritários, contudo, não foi limitante para identificar suas taxas de formação por CLAE. Infelizmente, não foi possível separar ratos em gêneros, uma vez que a amostra final de roedores se mostrou pequena entre os tempos amostrais, ou seja, não havia amostras suficientes de ambos gêneros aos 20, 45 e 60 minutos para análise estatística. Mas uma análise geral foi possível, que gerou dados robustos de metabolização em CLAE e perspectivas de melhorias nas técnicas alternativas. Testes de técnicas alternativas não puderam ser realizadas com plasma humano, pois mesmo nas amostras animais não foram obtidos resultados reprodutíveis. Devido à perda de punção arterial em alguns pacientes, as amostras de humanos não puderam ser coletadas totalmente. Porém, o grupo amostral permaneceu suficiente para avaliarmos uma metabolização geral robusta, além de incluir dados entre gêneros e conforme condição clínica (saudáveis e com esclerose múltipla),

6. CONCLUSÃO

A captação de [¹¹C](*R*)-PK11195 e [¹⁸F]FDG foram similares à captação em região sem injeção de células tumorais aos 3 dias após inoculação (tumores não mensuráveis), e houve aumento na captação de ambos os radiofármacos no tempo de 1 semana, sugerindo acréscimo devido à migração de células inflamatórias e aumento da necessidade glicolítica do microambiente tumoral. No entanto, a captação de [¹¹C](*R*)-PK11195 diminuiu de 1 para 2 semanas, sendo a captação do traçador correlacionada negativamente com o tamanho do tumor, sugerindo uma maior especificidade do traçador com células inflamatórias no ambiente tumoral do que [¹⁸F]FDG. A captação dos radiofármacos se concentrou (mais expressivamente) nas regiões de borda/periferia tumoral, sendo o [¹¹C](*R*)-PK11195 menos expressivo em regiões centrais, principalmente 2 semanas após inoculação de células tumorais, o que corroborou com a imunofluorescência, onde a expressão de macrófagos pró-inflamatórios apresentou comportamento semelhante.

Nas análises de metabolização pela técnica CLAE em sangue arterial humano, a metabolização do [¹¹C](R)-PK11195 mostrou-se similar entre gêneros e independente de condição clínica (saudável x com esclerose múltipla). Observou-se também que a metabolização plasmática de [¹¹C](R)-PK11195 em ratos ocorre de forma semelhante à metabolização humana. Quanto à investigação da metabolização de [¹¹C](R)-PK11195 em tumor mamário murino, constatou-se a necessidade de estudos adicionais, assim como nos ensaios propostos para as técnicas alternativas ELL e EFS, que necessitam de ajustes e adaptações metodológicas para diminuição dos desvios encontrados em seus resultados.

Conclui-se, portanto, que [¹¹C](R)-PK11195 demonstrou afinidade com TSPO de células tumorais mamárias em camundongos, mostrando-se um potencial biomarcador neste microambiente. Além disso, a técnica de separação e detecção de [¹¹C](R)-PK11195 e seus metabólitos foi realizada com maior reprodutibilidade pela técnica CLAE, mantendo-se como técnica padrão para análise de metabolização em plasma arterial humano e de roedor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DV K, SA N. Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammation. *Biochemistry Biokhimiia* 2016; 81(11).

2. Oishi Y, Manabe I. Macrophages in inflammation, repair and regeneration. *Int Immunol* 2018; 30(11): 511-28.

3. Singh N, Baby D, Rajguru JP, Patil PB, Thakkannavar SS, Pujari VB. Inflammation and Cancer. Ann Afr Med; 2019: 121-6.

4. N E, S L-P, J P, AJ S, N P. Inflammation as a Link Between Obesity, Metabolic Syndrome and Type 2 Diabetes. *Diabetes research and clinical practice* 2014; 105(2).

5. BY H, MP I, CA R, et al. Chronic Inflammation in Rheumatoid Arthritis and Mediators of Skeletal Muscle Pathology and Physical Impairment: A Review. *Arthritis care & research* 2019; 71(2).

6. Murata M. Inflammation and cancer. Environ Health Prev Med; 2018.

7. MF N. Resolution of Inflammation: From Basic Concepts to Clinical Application. *Seminars in immunopathology* 2019; 41(6).

8. DJ D, N Q, JP G. Neuroinflammation: The Devil Is in the Details. *Journal of neurochemistry* 2016; 139 Suppl 2(Suppl 2).

9. Schain M, Kreisl WC. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2017; 17(3): 25.

10. Bartels AL, Leenders KL. Neuroinflammation in the pathophysiology of Parkinson's disease: evidence from animal models to human in vivo studies with [11C]-PK11195 PET. *Mov Disord* 2007; 22(13): 1852-6.

11. H L. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2018; 8(3).

12. FL H, RM R, B B. Immune Attack: The Role of Inflammation in Alzheimer Disease. *Nature reviews Neuroscience* 2015; 16(6).

13. Stewart A, Beart P. Inflammation: maladies, models, mechanisms and molecules. Br J Pharmacol; 2016: 631-4.

14. DiSabato D, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: The Devil is in the Details. *J Neurochem* 2016; 139(Suppl 2): 136-53.

15. Shabab T, Khanabdali R, Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Mohan G. Neuroinflammation pathways: a general review. *Int J Neurosci* 2017; 127(7): 624-33.

16. M C, O B. Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration. *Annual review of immunology* 2017; 35.

17. M S, WC K. Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review. *Current neurology and neuroscience reports* 2017; 17(3).

18. Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N. Novel Anti-Inflammatory-Pro-Resolving Mediators and Their Receptors. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2011; 11(6): 629-47.

19. SP H, CC H. Inflammation and Cancer: An Ancient Link With Novel Potentials. *International journal of cancer* 2007; 121(11).

20. Onuchic AC, Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral. Rev Med (São Paulo); 2010. p. 21-31.

21. OPAS - Brasil. 2018. https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folh a-informativa-cancer&Itemid=1094 (accessed April 21 2020).

22. de I-IN, Câncer. Brasil - Estimativa dos Casos Novos. https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer (accessed 22 abr. 2020).

23. Ohl IC, Ohl RI, Chavaglia SR, Goldman RE. Public actions for control of breast cancer in Brazil: integrative review. *Rev Bras Enferm* 2016; 69(4): 793-803.

24. Onuchic A, Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral. Rev Med (São Paulo); 2010. p. 21-31.

25. Volp ACP, Alfenas RCG, Costa NMB, Minim VPR, Stringueta PC, Bressan J. Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. São Paulo: Arq Bras Endocrinol Metab; 2008.

26. Madera L, Greenshields A, Coombs MR, Hoskin DW. 4T1 Murine Mammary Carcinoma Cells Enhance Macrophage-Mediated Innate Inflammatory Responses. *PLoS One* 2015; 10(7): e0133385.

27. Neto AAM, Cardim SGB, Mothé CMA, Andrade LNdS. Introdução ao Microambiente Tumoral In: Saito RdF, Lana MVG, Medrano RV, Chammas R, eds. Fundamentos de Oncologia Molecular. São Paulo: Editora Atheneu; 2016: 187-93.

28. Hui L, Chen Y. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. *Cancer Lett* 2015; 368(1): 7-13.

29. Alsibai KD, Meseur D. Significance of Tumor Microenvironment Scoring and Immune Biomarkers in Patient Stratification and Cancer Outcomes, Histopathology - An Update. IntechOpen; 2018.

30. Neto AAM, Cardim SGB, Mothé CMA, Andrade LNS. Introdução ao Microambiente Tumoral. In: Saito RF, Lana MVG, Medrano RV, Chammas R, eds. Fundamentos de Oncologia Molecular. São Paulo: Editora Atheneu; 2016: 187-93.

31. N N, H M, E S, et al. The Macrophage Marker Translocator Protein (TSPO) Is Down-Regulated on Pro-Inflammatory 'M1' Human Macrophages. *PloS one* 2017; 12(10).

32. Abbas AK, Linchtman AA, Pillai S. Cells and Tissues of the Immune System. In: Abbas AK, Linchtman AA, Pillai S, eds. Celular and Molecular Immunology. 9 ed. Philadelphia: Elsevier; 2018: 25-9.

33. Hume DA. The Many Alternative Faces of Macrophage Activation. *Front Immunol* 2015; 6: 370.

34. AK A, Lichtman, AH. Imunologia Básica. 2ª Edição ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier; 2006.

35. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Imunidade Inata: A Defesa Inicial Contra as Infeções. Imunologia Básica. 2 ed. Rio de Janeiro: Ed. Elsevier; 2006.

36. Larionova I, Kazakova E, Patysheva M, Kzhyshkowska J. Transcriptional, Epigenetic and Metabolic Programming of Tumor-Associated Macrophages. *Cancers* 2020; 12(6).

37. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, et al. Macrophage Activation and Polarization: Nomenclature and Experimental Guidelines. *Immunity* 2014; 41(1): 14-20.

38. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 2014; 6: 13.

39. Najafi M, Goradel NH, Farhood B, et al. Macrophage polarity in cancer: A review. *Journal of Cellular Biochemistry* 2019; 120(3): 2756-65.

40. Roszer T. Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation* 2015; 2015.

41. Allavena P, Mantovani A. Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clin Exp Immunol* 2012; 167(2): 195-205.

42. H. JS, Z. S, A. S, et al. Breast Cancer Diagnosis: Imaging Techniques and Biochemical Markers. *Journal of cellular physiology* 2018; 233(7).

43. Wellings E, Vassiliades L, Abdalla R. Breast Cancer Screening for High-Risk Patients of Different Ages and Risk - Which Modality Is Most Effective? *Cureus*; 8(12).

44. F S, F P, G DA, et al. Multicenter Comparative Multimodality Surveillance of Women at Genetic-Familial High Risk for Breast Cancer (HIBCRIT Study): Interim Results. *Radiology* 2007; 242(3).

45. Guo R, Lu G, Fei B. Ultrasound Imaging Technologies for Breast Cancer Detection And Management - A Review. *Ultrasound Med Biol* 2018; 44(1): 37-70.

46. D. A, P. LM, I. G-B, L. G-MM. Molecular Imaging of Breast Cancer: Present and Future Directions. *Frontiers in chemistry* 2014; 2.

47. Mastologia S-SBd. Sociedades Brasileiras Recomendam Mamografia a Partir dos 40 Anos. 2017. https://www.sbmastologia.com.br/noticias/sociedades-medicas-brasileiras-recomendam-mamografia-anual-a-partir-dos-40-anos/ (accessed August, 28 2020).

48. Sapienza MT, Buchpiguel CA. Oncologia PET com FDG. In: Hironaka FH, Ono CR, Buchpiguel CA, Sapienza MT, Lima MS, eds. Medicina Nuclear: Princípios e Aplicações. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Atheneu; 2017: 372-7.

49. Narciso LDL. Evaluation of [11C]-(R)-PK11195 PET images quantification methods in the study of multiple sclerosis. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações; 2016.

50. Pozzo L. Tomografia por Emissão de Pósitrons com Sistemas PET/SPECT: Um Estudo da Viabilidade de Quantificação. São Paulo: Instituto de Física da Universidade de São Paulo; 2005.

51. Macias MT. Use of radionuclides in cancer research and treatment. *Clinical & Translational Oncology* 2009; 11(3): 143-53.

52. Sarikaya I, Sarikaya A. Assessing PET parameters in oncologic (18)F-FDG studies. *J Nucl Med Technol* 2019.

53. Kinahan PE, Fletcher JW. Positron Emission Tomography-Computed Tomography Standardized Uptake Values in Clinical Practice and Assessing Response to Therapy. *Seminars in Ultrasound Ct and Mri* 2010; 31(6): 496-505.

54. K. P, M. SS, Z. ZM, et al. The Evolving Role of FDG-PET/CT in the Diagnosis, Staging, and Treatment of Breast Cancer. *Molecular imaging and biology* 2019; 21(1). 55. Nelson DL, Cox MM. A Glicólise e a Catálise das Hexases. Lehninger Princípios da Bioquímica. 3 ed. São Paulo; 2002: 409-10.

56. Endo K, Oriuchi N, Higuchi T, et al. PET and PET/CT using 18F-FDG in the diagnosis and management of cancer patients. *Int J Clin Oncol* 2006; 11(4): 286-96.

57. JD W, EG M, PL M. The Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligand PK 11195 Inhibits Arthritis in the MRL-Ipr Mouse Model. *Rheumatology (Oxford, England)* 1999; 38(11). 58. Le Fur G, Perrier ML, Vaucher N, et al. Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. I. In vitro studies. *Life Sci* 1983; 32(16): 1839-47.

59. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, et al. Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends Pharmacol Sci* 2006; 27(8): 402-9.

60. Imamoto N, Momosaki S, Fujita M, et al. [11C]PK11195 PET imaging of spinal glial activation after nerve injury in rats. *Neuroimage* 2013; 79: 121-8.

61. Gee KW, inventor University of Southern California, Los Angeles, California, assignee. Use of Peripheral-Type Benzodiazepine Sites for Treatment of CNS Trauma or D isease. U.S.A. 1996.

62. HB C, C K, JK R, E vB, SU K, JG M. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced cyclooxygenase-2, Tumor Necrosis Factor-Alpha and [Ca2+]i Responses in Human Microglia by the Peripheral Benzodiazepine Receptor Ligand PK11195. *Journal of neurochemistry* 2002; 83(3).

63. SR T, GM N, P F, RM R-d-V, RC F. Potential role of peripheral benzodiazepine receptors in inflammatory responses. *European journal of pharmacology* 1999; 385(2-3).

64. Venneti S, Lopresti BJ, Wang G, et al. PK11195 labels activated microglia in Alzheimer's disease and in vivo in a mouse model using PET. *Neurobiol Aging* 2009; 30(8): 1217-26.

65. F. D, F. DV, J. V, et al. In Vivo Evaluation in Mice and Metabolism in Blood of Human Volunteers of [123I]iodo-PK11195: A Possible Single-Photon Emission Tomography Tracer for Visualization of Inflammation. *European journal of nuclear medicine* 1999; 26(3).

66. Shah F, Hume SP, Pike VW, Ashworth S, McDermott J. Synthesis of the enantiomers of [N-methyl-11C]PK 11195 and comparison of their behaviours as radioligands for PK binding sites in rats. *Nucl Med Biol* 1994; 21(4): 573-81.

67. Alves VH, Abrunhosa AJ, Castelo-Branco M. Optimisation of synthesis, purification and reformulation of (R)-[N-Methyl-[11 C]PK11195 for in vivo PET imaging studies. *IEEE* 2013.

68. Banati RB, Goerres GW, Myers R, et al. [11C](R)-PK11195 positron emission tomography imaging of activated microglia in vivo in Rasmussen's encephalitis. *Neurology* 1999; 53(9): 2199-203.

69. Chauveau F, Boutin H, Van Camp N, Dolle F, Tavitian B. Nuclear imaging of neuroinflammation: a comprehensive review of [11C]PK11195 challengers. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2008; 35(12): 2304-19.

70. Cerami C, laccarino L, Perani D. Molecular Imaging of Neuroinflammation in Neurodegenerative Dementias: The Role of In Vivo PET Imaging. Int J Mol Sci; 2017.

71. JC D, J V, KJ VL, et al. PET Visualization of Microglia in Multiple Sclerosis Patients Using [11C]PK11195. *European journal of neurology* 2003; 10(3).

72. Real CC, Doorduin J, Kopschina Feltes P, et al. Evaluation of exercise-induced modulation of glial activation and dopaminergic damage in a rat model of Parkinson's disease using [*J Cereb Blood Flow Metab* 2017: 271678X17750351.

73. Su Z, Roncaroli F, Durrenberger PF, et al. The 18-kDa mitochondrial translocator protein in human gliomas: an 11C-(R)PK11195 PET imaging and neuropathology study. *J Nucl Med* 2015; 56(4): 512-7.

74. Mukherjee S, Das SK. Translocator protein (TSPO) in breast cancer. *Curr Mol Med* 2012; 12(4): 443-57.

75. C B, RF S. Specific Benzodiazepine Receptors in Rat Brain Characterized by High-Affinity (3H)diazepam Binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977; 74(9).

76. JJ L, V P. Peripheral-type Benzodiazepine Receptor: Structure and Function of a Cholesterol-Binding Protein in Steroid and Bile Acid Biosynthesis. *Steroids* 2003; 68(7-8).

77. Casellas P, Galiegue S, Basile AS. Peripheral benzodiazepine receptors and mitochondrial function. *Neurochem Int* 2002; 40(6): 475-86.

78. Gavish M, Bachman I, Shoukrun R, et al. Enigma of the peripheral benzodiazepine receptor. *Pharmacol Rev* 1999; 51(4): 629-50.

79. Shoshan-Barmatz V, De Pinto V, Zweckstetter M, Raviv Z, Keinan N, Arbel N. VDAC, a multi-functional mitochondrial protein regulating cell life and death. *Mol Aspects Med* 2010; 31(3): 227-85.

80. RM B, S S, C M, et al. (R)-[11C]PK11195 Brain Uptake as a Biomarker of Inflammation and Antiepileptic Drug Resistance: Evaluation in a Rat Epilepsy Model. *Neuropharmacology* 2014; 85.

81. L P, PV R, YT H, et al. [11 C]PK11195 Binding in Alzheimer Disease and Progressive Supranuclear Palsy. *Neurology* 2018; 90(22).

82. O G, J S, DR O, et al. Imaging Intraplaque Inflammation in Carotid Atherosclerosis With 11C-PK11195 Positron Emission Tomography/Computed Tomography. *European heart journal* 2012; 33(15).

83. Kang Y, Mozley PD, Verma A, et al. Noninvasive PK11195-PET Image Analysis Techniques Can Detect Abnormal Cerebral Microglial Activation in Parkinson's
Disease. Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging 2018; 28(5).

84. Kang Y, Schlyer D, Kaunzner UW, Kuceyeski A, Kothari PJ, Gauthier SA. Comparison of two different methods of image analysis for the assessment of microglial activation in patients with multiple sclerosis using (R)-[N-methyl-carbon-11]PK11195. *PLoS One* 2018; 13(8): e0201289.

85. M S, E R, J T, et al. Evaluation of the Effect of Fingolimod Treatment on Microglial Activation Using Serial PET Imaging in Multiple Sclerosis. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2017; 58(10).

86. Faria Dde P, Copray S, Buchpiguel C, Dierckx R, de Vries E. PET imaging in multiple sclerosis. *J Neuroimmune Pharmacol* 2014; 9(4): 468-82.

87. S M, S M, SK D. Increased Expression of Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR) in Dimethylbenz[a]anthracene-Induced Mammary Tumors in Rats. *Glycoconjugate journal* 2006; 23(3-4).

88. Tantawy MN, Charles MH, Peterson TE, et al. Translocator Protein PET Imaging in a Preclinical Prostate Cancer Model. *Molecular imaging and biology* 2018; 20(2).

89. Zinnhardt B, Muther M, Roll W, et al. TSPO imaging-guided characterization of the immunosuppressive myeloid tumor microenvironment in patients with malignant glioma. *Neuro Oncol* 2020.

90. Zheng J, Boisgard R, Siquier-Pernet K, Decaudin D, Dollé F, Tavitian B. Differential expression of the 18 kDa translocator protein (TSPO) by neoplastic and inflammatory cells in mouse tumors of breast cancer. *Mol Pharm* 2011; 8(3): 823-32.

91. Bhoola NH, Mbita Z, Hull R, Dlamini Z. Translocator Protein (TSPO) as a Potential Biomarker in Human Cancers. *International journal of molecular sciences* 2018; 19(8).

92. Alves VH, Abrunhosa AJ, Castelo-Branco M. Optimisation of synthesis, purification and reformulation of (R)-[N-Methyl-11C]PK11195 for in vivo PET imaging studies<h1 _ngcontent-c7="" class="document-title" style="font-size: 1.6em; margin: 0px; line-height: 1.3; color: rgb(51, 51, 51); font-family: sans-serif; background-color: rgb(255, 255, 255);">. 2013. https://ieeexplore.ieee.org/abstract/document/6518428.

93. F R, Z S, K H, A G, FE T. TSPO Expression in Brain Tumours: Is TSPO a Target for Brain Tumour Imaging? *Clinical and translational imaging* 2016; 4.

94. A W, R B, AR A, et al. The Translocator Protein Ligand [¹⁸F]DPA-714 Images Glioma and Activated Microglia in Vivo. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging* 2012; 39(5).

95. De Vos F, Dumont F, Santens P, Slegers G, Dierckx R, De Reuck J. Highperformance liquid chromatographic determination of [11C]1-(2-chlorophenyl)-Nmethyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide in mouse plasma and tissue and in human plasma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; 736(1-2): 61-6.

96. Kropholler MA, Boellaard R, Schuitemaker A, et al. Development of a tracer kinetic plasma input model for (R)-[11C]PK11195 brain studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25(7): 842-51.

97. Jučaite A, Cselényi Z, Arvidsson A, et al. Kinetic analysis and test-retest variability of the radioligand [11C](R)-PK11195 binding to TSPO in the human brain - a PET study in control subjects. EJNMMI Res; 2012: 15.

98. Koeppe RA. Receptor Kinetics - Simplifications and Limitations. In: Maguire RP, Leeders KL, eds. PET Pharmacokinetic Course Manual. Kobe, Japan: International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism - Summerschool 2007; 2007: 109.

99. Gillings N. A restricted access material for rapid analysis of [(11)C]-labeled radiopharmaceuticals and their metabolites in plasma. *Nucl Med Biol* 2009; 36(8): 961-5.

100. F L, R H, O G, et al. Detection and Quantification of Large-Vessel Inflammation With 11C-(R)-PK11195 PET/CT. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine* 2011; 52(1).

101. Roivainen A, Nagren K, Hirvonen J, et al. Whole-body distribution and metabolism of [N-methyl-11C](R)-1-(2-chlorophenyl)-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide in humans; an imaging agent for in vivo assessment of peripheral benzodiazepine receptor activity with positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2009; 36(4): 671-82.

102. Greuter HN, van Ophemert PL, Luurtsema G, et al. Optimizing an online SPE-HPLC method for analysis of (R)-[11C]1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide [(R)-[11C]PK11195] and its metabolites in humans. *Nucl Med Biol* 2005; 32(3): 307-12.

103. Denoroy L, Zimmer L, Renaud B, Parrot S. Ultra High Performance Liquid Chromatography as a Tool for the Discovery and the Analysis of Biomarkers of Diseases: A Review. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 2013; 927.

104. Ishiwata K, Yanai K, Iwata R, et al. Analysis of Plasma Metabolites During Human PET-studies With Three Receptor Ligands, [11C]YM-09151-2, [11C]doxepin and [11C]pyrilamine. *The Tohoku journal of experimental medicine* 1996; 178(2).

105. Veronese M, Gunn RN, Zamuner S, Bertoldo A. A non-linear mixed effect modelling approach for metabolite correction of the arterial input function in PET studies. *Neuroimage* 2013; 66: 611-22.

106. Parente A, Feltes PK, Vallez Garcia D, et al. Pharmacokinetic Analysis of 11C-PBR28 in the Rat Model of Herpes Encephalitis: Comparison with (R)-11C-PK11195. *J Nucl Med* 2016; 57(5): 785-91.

107. Ashurst JV, Nappe TM. Methanol Toxicity. 2020.

108. Hashimoto K. Toxicology of Acetonitrile. Sangyo igaku Japanese journal of industrial health 1991; 33(6).

109. Lindner KJ, Hartvig P, Akesson C, Tyrefors N, Sundin A, Langstrom B. Analysis of L-[methyl-11C]methionine and metabolites in human plasma by an automated solid-phase extraction and a high-performance liquid chromatographic procedure. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 679(1-2): 13-9.

110. Mock BH, Brown-Proctor C, Green MA, Steele B, Glick-Wilson BE, Zheng QH. An Automated SPE-based High-Yield Synthesis of [11C]acetate and [11C]palmitate: No Liquid-Liquid Extraction, Solvent Evaporation or Distillation Required. *Nuclear medicine and biology* 2011; 38(8).

111. Boudjemeline M, Hopewell R, Rochon PL, et al. Highly Efficient Solid Phase Supported Radiosynthesis of [11 C]PiB Using tC18 Cartridge as a "3-in-1" Production Entity. *Journal of labelled compounds & radiopharmaceuticals* 2017; 60(14).

112. Price JC, Klunk WE, Lopresti BJ, et al. Kinetic modeling of amyloid binding in humans using PET imaging and Pittsburgh Compound-B. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25(11): 1528-47.

113. Iwata R, Ido T, Tada M. Column Extraction Method for Rapid Preparation of [11C]acetic and [11C]palmitic Acids. *Applied Radiation and Isotopes* 1995; 46(2): 117-21.

114. Faria DP, Copray S, Sijbesma JW, et al. PET imaging of focal demyelination and remyelination in a rat model of multiple sclerosis: comparison of [11C]MeDAS, [11C]CIC and [11C]PIB. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2014; 41(5): 995-1003.

115. Pulaski BAO-R, S. Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr Protoc Immunol* 2001.

116. MJ K, CH L, Y L, et al. Glucose-6-phosphatase Expression-Mediated [18 F]FDG Efflux in Murine Inflammation and Cancer Models. *Molecular imaging and biology* 2019; 21(5).

117. Tower H, Ruppert M, Britt K. The Immune Microenvironment of Breast Cancer Progression. *Cancers (Basel)* 2019; 11(9).

118. Chudgar AV, Mankoff DA. Molecular Imaging and Precision Medicine in Breast Cancer. *PET Clin* 2017; 12(1): 39-51.

119. Wyatt SK, Manning HC, Bai M, et al. Molecular imaging of the translocator protein (TSPO) in a pre-clinical model of breast cancer. *Mol Imaging Biol* 2010; 12(3): 349-58.

120. Greten FR, Grivennikov SI. Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences. *Immunity* 2019; 51(1): 27-41.

121. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8(12): 958-69.

122. A M, A S, S S, P A, A V, M L. The Chemokine System in Diverse Forms of Macrophage Activation and Polarization. *Trends in immunology* 2004; 25(12).

123. Hao N-B, Lu M-H, Fan Y-H, Cao Y-L, Zhang Z-R, Yang S-M. Macrophages in Tumor Microenvironments and the Progression of Tumors. *Clinical & Developmental Immunology* 2012.

124. Scodeller P, Simón-Gracia L, Kopanchuk S, et al. Precision Targeting of Tumor Macrophages with a CD206 Binding Peptide. Sci Rep; 2017.

125. Rodrigues Viana CT, Ribeiro Castro P, Motta Marques S, et al. Differential Contribution of Acute and Chronic Inflammation to the Development of Murine Mammary 4T1 Tumors. PLoS One; 2015.

126. M P, V E, TC W, et al. Imaging of translocator protein upregulation is selective for pro-inflammatory polarized astrocytes and microglia. *Glia* 2020; 68(2).

127. Narayan N, Mandhair H, Smyth E, et al. The Macrophage Marker Translocator Protein (TSPO) Is Down-Regulated on Pro-Inflammatory 'M1' Human Macrophages. *PloS one* 2017; 12(10).

128. Yadava N, Schneider SS, Jerry DJ, Kim C. Impaired Mitochondrial Metabolism and Mammary Carcinogenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2013; 18(1): 75-87.

129. Luoto P, Laitinen I, Suilamo S, Nagren K, Roivainen A. Human dosimetry of carbon-11 labeled N-butan-2-yl-1-(2-chlorophenyl)-N-methylisoquinoline-3-carboxamide extrapolated from whole-body distribution kinetics and radiometabolism in rats. *Mol Imaging Biol* 2010; 12(4): 435-42.

130. Jura M, Kozak LP. Obesity and related consequences to ageing. *Age* 2016; 38(1).

131. Ezan E. Pharmacokinetic Studies of Protein Drugs: Past, Present and Future. *Advanced drug delivery reviews* 2013; 65(8).

132. Chitneni SK, Serdons K, Evens N, et al. Efficient purification and metabolite analysis of radiotracers using high-performance liquid chromatography and on-line solid-phase extraction. *J Chromatogr A* 2008; 1189(1-2): 323-31.

133. Koltsakidou A, Zacharis CK, Fytianos K. A validated liquid chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey after homogeneous liquid-liquid extraction using hydrophilic acetonitrile and sodium chloride as mass separating agent. *J Chromatogr A* 2015; 1377: 46-54.

134. Jordan KD, Wendoloski JJ. Studies of the negative ions of polar molecules LiH - , NaH - , NaCl -. *Molecular Physics* 2006; 35: 223-40.

8. Anexos

8.1 Anexo 1 – Especificação Técnica do [¹¹C](*R*)-PK11195 produzido no CInRad do HC-FMUSP

1. DESCRIÇÃO DO PRODUTO

Nome Comum: [¹¹ C]PK11195			
Nome Químico: 3-Isoquinolinacarboxamida, 1-(2-clorofenil)-N-metil-N-(1-metilpropil)-, (R)			
N° CAS: 205934-46-9			
Fórmula Estrutural: $ \begin{array}{c} $			
Forma Farmacêutica: Solução Injetável Apresentação: Frasco-ampola 15 mL, multidose			

2. COMPOSIÇÃO

Cada frasco-ampola com solução inje	etáve	el c	ontém:
[¹¹ C]PK11195	0,1	a 2	200 mCi
Etanol	1 a	10	%
Excipientes q.s.p	0,1	a	l5 mL
(Água para injetáveis, soro fisiológic	o ir	njet	ável)

3. EMBALAGEM

3.1 Embalagem Primária: Frasco-ampola transparente, estéril com capacidade de 15 mL, cada frasco-ampola multidose contém um rótulo conforme modelo abaixo:

ProdutoIsotopo:
Data// Horário: AtixmCi VolmL
Responsável:

3.2 Embalagem Secundária: Cada frasco-ampola é embalado em um castelo (blindagem) de tungstênio e rotulado conforme modelo abaixo:

A , A	Produto	lsotor	20:
Data		Horário	:
Atix	mC	i Vol	mL
Respor	nsável:		

4. CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO E PRAZO DE VALIDADE

As embalagens de [¹¹C]PK11195 devem ser manipuladas somente por pessoas autorizadas e treinadas para trabalhar com materiais radioativos.

O [¹¹C]PK11195 deve ser mantido em temperatura ambiente ($10 - 30^{\circ}$ C).

O frasco-ampola só deve ser manipulado atrás de proteções de chumbo devidamente preparadas para esse fim.

O prazo de validade do [¹¹C]PK11195é de 6 horas após o final da síntese.

5. REFERÊNCIAS UTILIZADAS NO CONTROLE DE QUALIDADE

Não existe monografia descrita para o [¹¹C]PK11195. Para definir os testes de controle de qualidade pertinentes, a monografia geral de drogas para Tomografia por Emissão de Pósitron (*Positron Emission Tomography Drugs for Compounding, Investigational, and Research Uses*) foi considerada (*United States Pharmacopea – USP 36*).

6. ESPECIFICAÇÕES E TESTES REALIZADOS NO CONTROLE DE QUALIDADE

Parâmetro	Especificação
рН	4,0 a 8,0
Identificação Radionuclídica	18,3 a 22,4 minutos
Pureza Radionuclídica	Principal pico de energia entre 490 e 530 keV
Pureza Radioquímica	[¹¹ C]PK11195 > 95%
Pureza Química	PK11195 < 1mg/L
	Precursor < 1mg/L
Solventes Desidueis	Etanol $\leq 20\%$
Solvenies Residuais	DMSO < 0,04%
Integridade da Membrana Filtrante	A membrana deve estar íntegra após a filtração esterilizante
Endotoxinas Bacterianas	< 17,5 UE/mL
Esterilidade	Estéril

8.2 Anexo 2 – Resumo da Produção de [¹⁸F]FDG realizada no ClnRAD do HC-FMUSP

Descrição das etapas de produção desde o planejamento até a organização da Ordem de Produção para liberação do produto.

Na tabela abaixo temos o detalhamento das etapas de produção do Fludesoxiglicose (18F), constando sua descrição e responsáveis.

Etapa	Descrição	Responsável
Planejamento da produção	O planejamento da produção tem início com o recebimento dos pedidos dos clientes <i>online</i> (na página do CinRad) no dia anterior à produção. Em seguida, a Ordem de Produção é emitida, impressa e distribuída a cada setor envolvido no processo. São realizados os cálculos relativos à quantidade	Garantia da Qualidade
	total de ¹⁸ F e [¹⁸ F]-FDG a serem produzidos. Toda a equipe é informada e prepara-se para a execução de suas atividades.	
Separação de materiais no depósito de materiais	Os acessórios e matérias-primas necessários à produção de Fludesoxiglicose (18 F) são separados em bandeja apropriada com nome do radiofármaco, conforme a Lista de Insumos que consta na Ordem de Produção. Na sequência, as matérias- primas e acessórios são armazenados em carrinho de inox próximo ao guichê para a sala de Preparo de Materiais; enquanto os materiais de embalagem secundária, etiquetas de radiação e bulas são enviados à Sala de Expedição pelo guichê específico.	Almoxarifado Supervisor Noturno
Organização dos materiais na sala de preparo de materiais	Os materiais recebidos na sala de Preparo de Materiais passam por processo de limpeza e sanitização e são conferidos antes de serem enviados à sala de Produção através do passador. A Ordem de Produção do Fludesoxiglicose (18 F) onde consta o lote é encaminhada junto com as matérias- primas e acessórios à sala de Produção.	Produção - Síntese
Preparo da área de produção	A área de produção deve ser limpa e organizada antes de ser liberada para a produção do próximo lote. Esse procedimento é registrado e conforme ordem de produção realiza-se um <i>check-list</i> antes do início das atividades produtivas.	Produção - Síntese
Preparo dos materiais e equipamentos na sala de produção	Os materiais recebidos da sala de Preparo de Materiais são conferidos e transferidos para as bancadas da sala de produção. Instala-se o cassete FDG <i>Fastlab</i> contendo as matérias-primas necessárias à síntese, o Kit A <i>Theodorico e</i> Kit <i>Perforate Theodorico</i> assim como o <i>bulk</i> e os filtros esterilizantes necessários ao fracionamento. Cada uma dessas atividades (consideradas críticas no processo produtivo) é acompanhada de um <i>Check list</i> para assegurar que foi adequadamente executada.	Produção - Síntese
Solicitação de 18F	A solicitação do radioisótopo 18F (íon fluoreto [18F]) é realizada conforme a Ordem de Produção de Fludesoxiglicose (18 F) emitida pela Garantia da Qualidade e ocorre paralelamente ao preparo dos materiais e dos equipamentos na sala de Produção. A checagem de todos os parâmetros dos equipamentos e utilidades utilizados para o envio do 18F deve	Produção - Cíclotron

Etapa	Descrição	Responsável
	ser realizada antes do início da irradiação. É responsabilidade do operador do cíclotron o ajuste do equipamento, a irradiação do alvo contendo água enriquecida (H2O[18O]), a transferência do 18F para o módulo de síntese, após autorização da produção de [18F]-FDG, e a impressão do relatório de operação do cíclotron.	
Produção de Fludesoxiglicose (18 F)	Após o recebimento do 18F, inicia-se a síntese do radiofármaco [18F]-FDG no módulo de síntese (FastLab), presente na hotcell (Célula quente), por um processo automatizado. O acompanhamento dos controles em processo é feito por software e ao final dessa etapa é emitido um relatório da síntese.	Funcionário da Produção
Facionamento Envase	Ao término da síntese de Fludesoxiglicose (18 F) é realizada transferência para o Theodorico, equipamento no qual ocorre o fracionamento automático do radiofármaco nas doses previamente calculadas, levando em consideração o pedido dos clientes, o horário de fabricação e de calibração para o hospital. Neste momento é adicionado o soro fisiológico 0,9% para avolumar o produto final. O produto é envasado na embalagem primária (frasco-ampola), realizada a inspeção visual do frasco e embalado na embalagem secundária (blindagem de tungstênio) devidamente rotulada. Duas amostras são enviadas para o Controle de Qualidade para análises físico-químicas e microbiológicas do produto, enquanto as demais blindagens contendo o Fludesoxiglicose (18 F) passam pelo teste de esfregaço e são encaminhadas para a Sala de Expedição.	Funcionário da Produção
Rotulagem e embalagem final	As blindagens com o produto acabado são acondicionadas nas caixas de embarque (cofres), que recebem os rótulos de informação do produto e são fechadas com uma senha para que o hospital/clínica possa abrir após a liberação. São feitas todas as medições relativas à radiação do cofre, para garantir os níveis especificados pela CNEN.	Encarregado da expedição e responsável pelo monitoramento radiológico
Expedição do Produto Acabado	O Fludesoxiglicose (18 F) é expedido e transportado ao cliente antes do final do controle de qualidade e da liberação do lote, apenas com a liberação do teste do esfregaço, que garante a não contaminação da blindagem. A expedição deve ser feita rapidamente devido a curta meia vida física do radioisótopo 18F.	Encarregado da expedição
Ċ		

Etapa	Descrição	Responsável
Medição e análise do produto acabado	A amostra de [18F]-FDG é submetida aos seguintes testes: Determinação do pH Identificação Radionuclídica Determinação da Pureza Radionuclídica Identificação Radioquímica Determinação da Pureza Radioquímica Determinação da Pureza Química Determinação de Solventes Residuais Teste de Bolha da Membrana Filtrante Teste de Endotoxinas bacterianas É realizado, também, o Teste de Esterilidade em todos os lotes produzidos, que leva 14 dias para se obter o resultado e devido ao produto final ter alta atividade radioativa, o teste é realizado no próximo dia produtivo. Os resultados são anotados nos Registros de Análise de esterilidade de produto acabado e anexados à Ordem de Produção. O Certificado de Análise de Fludesoxiglicose (18 F) é emitido, isento do resultado de esterilidade, onde consta a aprovação/reprovação pelo controle de qualidade do produto.	Analistas e Supervisor do Controle de Qualidade
Organização de documentos e check-list final	A conferência dos documentos conforme descrito na Ordem de Produção é fundamental antes da liberação de um lote de Fludesoxiglicose (18 F). Antes do produto acabado ser liberado para injeção pela clínica/hospital solicitante do material a Garantia da qualidade deve realizar avaliação do produto através da conciliação final das ordens para avaliação de produção, embalagem, controle de qualidade e condições de transporte do produto. Após a liberação, a senha do cofre é fornecida para os hospitais/clínicas através do site do CinRad.	Coordenador da Garantia da Qualidade