

EVELYN BERNARDES MARTINS

Avaliação da influência da losartana na normalização vascular de tumor de mama murinho 4T1, utilizando os radiotraçadores [^{99m}Tc]Tc-HL91 e [¹⁸F]FAZA em estudo pré-clínico

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

Programa de pós-graduação em Radiologia, Oncologia e Medicina Nuclear - HCFMUSP.

Orientador: Dr. Fabio Luiz Navarro Marques

São Paulo

2020

EVELYN BERNARDES MARTINS

Avaliação da influência da losartana na normalização vascular de tumor de mama murinho 4T1, utilizando os radiotraçadores [^{99m}Tc]Tc-HL91 e [¹⁸F]FAZA em estudo pré-clínico

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

Programa de pós-graduação em Radiologia, Oncologia e Medicina Nuclear - HCFMUSP.

Orientador: Dr. Fabio Luiz Navarro Marques

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

Martins, Evelyn Bernardes

Avaliação da influência da losartana na normalização vascular de tumor de mama murinho 4 T1, utilizando os radiotraçadores [^{99m}Tc] Tc-HL91 e [^{18}F]FAZA em estudo pré-clínico / Evelyn Bernardes Martins. -- São Paulo, 2020.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Oncologia.

Orientador: Fábio Luiz Navarro Marques.

Descritores: 1. Hipóxia tumoral 2. Remodelação vascular 3. Imagem molecular
4. Tomografia por emissão de pósitrons 5. Tomografia computadorizada com
tomografia computadorizada de emissão de fóton único 6. Compostos
radiofarmacêuticos 7. Autorradiografia 8. Imuno-histoquímica

USP/FM/DEB-304/20

Responsável: Eriçalva da Conceição Batista, CRE-86755

DEDICATÓRIA	I
RESUMO	V
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 ANGIOGÊNESE NORMAL E PATOLÓGICA	12
1.2 TERAPIA ANTIANGIOGÊNICA E JANELA DE NORMALIZAÇÃO DA FUNÇÃO VASCULAR.....	14
1.3 MECANÍSTICA DAS ESTRATÉGIAS DE NORMALIZAÇÃO	16
1.4 ANGIOTENSINA NA MODIFICAÇÃO DA VASCULATURA TUMORAL.....	18
1.5 HIPÓXIA TUMORAL COMO FATOR DE RADIORESISTÊNCIA	21
1.6 ALTERAÇÕES MOLECULARES MEDIADAS POR HIPÓXIA E SEUS MARCADORES	24
1.7 RADIOTRAÇADORES DE HIPÓXIA TUMORAL.....	25
1.8 IMAGEM PRÉ-CLÍNICA E PESQUISA TRANSLACIONAL	34
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. GERAL.....	41
2.2. ESPECÍFICOS	41
3. MATERIAL.....	41
3.1. EQUIPAMENTOS:.....	41
3.2. SOLVENTES E REAGENTES:.....	42
4. MÉTODOS.....	44
4.2. PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS TRAÇADORES	44
4.2.1. [^{99m} Tc]TC-HL91.....	44
4.2.2. [¹⁸ F]FAZA.....	45
5. ESTUDOS BIOLÓGICOS <i>IN VIVO</i>	46
5.1. CULTIVO DA LINHAGEM DE CÉLULAS TUMORAIS	46
5.2. ALOENXERTO ORTOTÓPICO DE TUMOR DE MAMA E PROTOCOLO DE TRATAMENTO	47
5.3. ADMINISTRAÇÃO DO MARCADOR DE HIPÓXIA PARA ANÁLISE <i>EX VIVO</i>	48
5.4. IMAGENS PET, SPECT E CT	49
5.4.1. ADMINISTRAÇÃO DO RADIOTRAÇADORES.....	49

5.4.2.	PROTÓCOLOS DE AQUISIÇÃO	49
5.4.3.	RECONSTRUÇÃO E PROCESSAMENTO DE IMAGEM	50
5.4.4.	SEGMENTAÇÃO DOS VOLUMES DE INTERESSE	50
5.4.5.	SEGMENTAÇÃO POR INTENSIDADE DE CAPTAÇÃO	51
5.5.	ENSAIOS <i>EX VIVO</i>	52
5.6.	BIODISTRIBUIÇÃO <i>EX VIVO</i>	53
5.7.	ANÁLISE HISTOLÓGICA	53
5.7.1.	AVALIAÇÃO DAS ZONAS DE HIPÓXIA TUMORAL POR AUTORADIOGRAFIA	53
5.7.2.	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	54
5.7.2.1.	COLORAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS REGIÕES DE HIPÓXIA	54
5.7.3.	COLORAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS	55
5.8.	COLORAÇÃO HEMATOXILINA-EOSINA	56
6.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
7.1.	OBTENÇÃO DO TRAÇADOR [^{99m} Tc]TC-HL91	56
7.2.	OBTENÇÃO DO TRAÇADOR [¹⁸ F]FAZA	56
7.3.	ACOMPANHAMENTO DA PROGRESSÃO TUMORAL	59
7.4.	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	61
7.5.	IMAGENS PRÉ-CLÍNICAS	67
7.5.1.	ESTUDO DA CAPTAÇÃO DA [¹⁸ F]FDG	67
7.5.2.	AVALIAÇÃO DO TRAÇADOR [^{99m} Tc]TC-HL91	69
7.5.2.1.	PROVA DE CONCEITO: [^{99m} Tc]TC-HL91 COMO TRAÇADOR DE HIPÓXIA	69
7.5.2.2.	CAPTAÇÃO TUMORAL DO [^{99m} Tc]TC-HL91: IMAGENS SPECT/CT	71

NA FIGURA 27, A IMAGEM A, COM FOV DE 60 MM, PERMITIU A VISUALIZAÇÃO DE TODA A EXTENSÃO DO FÍGADO, COM DESTAQUE PARA O ACÚMULO NA VESÍCULA BILIAR, MAIS ABAIXO SÃO VISUALIZADAS AS PARTES SUPERIORES DOS CÓRTEX RENAIIS. ENTRETANTO A BAIXA INTENSIDADE DE CAPTAÇÃO NA PEQUENA MASSA TUMORAL TORNOU NECESSÁRIA A MANIPULAÇÃO DA ESCALA DE TAL MANEIRA QUE PERMITIU A VISUALIZAÇÃO DO POOL SANGUÍNEO NO VENTRÍCULO ESQUERDO. NA IMAGEM B ESTÁ REPRESENTADO UM TUMOR DE 195 MM³, E, EMBORA SEJA POSSÍVEL NOTAR A HETEROGENEIDADE DA CAPTAÇÃO TUMORAL, ÁREAS DE HIPOCAPTAÇÃO OU HIPERCAPTAÇÃO SÃO DIFÍCEIS DE DISTINGUIR. MESMO QUANDO O FOV É LIMITADO À REGIÃO DO..... 72

ASSIM PARA VISUALIZAR ADEQUADAMENTE A CAPTAÇÃO TUMORAL, FORAM CRIADAS MÁSCARAS 72

7.6.	AVALIAÇÃO DO EFEITO DA FARMACOTERAPIA POR ANÁLISE DE IMAGENS SPECT/CT.....	73
7.6.1.1.	ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA: CAPTAÇÃO RELATIVA.....	73
7.6.2.1.	CAPTAÇÃO RELATIVA MÉDIA <i>VERSUS</i> VOLUME TUMORAL	75
7.6.2.2.	ESTRATIFICAÇÃO POR VOLUME TUMORAL	76
7.6.2.3.	EXTENSÃO DA REGIÃO HIPERCAPTANTE EM FUNÇÃO DO VOLUME TUMORAL CATEGÓRICO	79
7.6.2.4.	BIODISTRIBUIÇÃO <i>EX VIVO</i> DO [^{99m} Tc]TC-HL91	79
7.6.2.5.	VERIFICAÇÃO DO EFEITO DA LOSARTANA POR IMUNO-HISTOQUÍMICA	82
7.7.	AVALIAÇÃO DO TRAÇADOR [¹⁸ F]FAZA	83
7.7.1.	ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA: QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO TRAÇADOR [¹⁸ F]FAZA	86
7.7.1.1.	AUTORADIOGRAFIA	92
7.7.2.	[¹⁸ F]FAZA X [^{99m} Tc]TC-HL91	95
8.	CONCLUSÃO	98
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

Dedicatória

À minha avó, Anita, líder do meu clã, que, com sua fibra, coragem e envergadura moral ousou desafiar seu tempo e transformar sua realidade. E fez minha mãe, Angela, modelo de força e determinação, e ela me fez, e lutou, e me moldou a sua imagem e delas eu vim, e aqui eu cheguei. Nesta aventura do fazimento de mim mesma no tempo e espaço são elas que me guiam. Minha vida é o fruto da sua Verdade.

*Out of the night that covers me,
Black as the pit from pole to pole,
I thank whatever gods may be
For my unconquerable soul.*

*In the fell clutch of circumstance
I have not winced nor cried aloud.
Under the bludgeonings of chance
My head is bloody, but unbowed.*

*Beyond this place of wrath and tears
Looms but the horror of the shade,
And yet the menace of the years
Finds and shall find me unafraid.*

*It matters not how strait the gate,
How charged with punishments the scroll,
I am the master of my fate:
I am the captain of my soul.*

William Ernest Henley

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, José Martins Filho e Angela Maria Bernardes Martins, 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 orientador, Dr. Fabio Luiz Navarro Marques, 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 para compreender os aspectos pessoais que permeiam a vida acadêmica.

Agradeço aos Prof. Dr. Carlos Alberto Buchpiguel e Prof. Dr. Roger Chammas, para oportunidade do desenvolvimento deste trabalho, pelo suporte e discussões numa área tão desafiadora.

Agradeço às Dra. Daniele de Paula Faria e Dra. Caroline Cristiano Real Gregório pelo suporte no processo de obtenção de imagens dos animais e ensaios ex vivo.

Aos meus colegas Carlos Alberto Rossato Junior, Larissa Estessi e Monick Evangelista Junho, 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-científica, sempre feito com generosidade.

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.

Agradeço também à Mônica e André 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, pelo fornecimento das doses de [^{18}F]F⁻.

Agradeço à *CAPES* pela bolsa concedida.

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.

Resumo

Martins EB. *Avaliação da influência da losartana na normalização vascular de tumor de mama murinho 4T1, utilizando os radiotraçadores [^{99m}Tc]Tc-HL91 e [¹⁸F]FAZA em estudo pré-clínico* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A hipóxia tumoral é um fator de resistência bem estabelecido para radioterapia e quimioterapia sistêmica. É um fator prognóstico importante, preditivo de recidiva, metástase e sobrevida reduzida. Vários estudos relatam evidências de normalização vascular decorrentes de agentes vasoativos empregados como terapia antiangiogênica direta ou indireta, tendo como um dos principais desfechos a redução transiente de regiões de hipóxia. A avaliação do efeito dos compostos vasoativos sobre o efeito de oxigenação dos tecidos, que somente era possível por técnicas invasivas, passou a ser realizada por método não invasivo e longitudinal, utilizando métodos de imagem como a tomografia por emissão de fóton único (SPECT) ou a tomografia por emissão de pósitron (PET), com o uso de radiofármacos sensíveis às condições de hipóxia/normóxia. Neste trabalho preparamos dois radiofármacos para serem utilizados como marcadores da presença de hipóxia em tecidos tumorais, o [^{99m}Tc]Tc-HL91, foi obtido através de reconstituição de conjunto de reativo liofilizado (kit) produzido na instituição, contendo o ligante 4,9-diaza-3,3,10,10-tetrametildodecano-2,11-diona-dioxima (HL91), e o [¹⁸F]FAZA foi obtido através da reação do íon [¹⁸F]fluoreto com o precursor 1-(2,3-diacetil-5-tosil- α -D-Arabinofuranosil)-2-nitroimidazol, seguido de hidrólise. O processo de normalização vascular foi avaliado em um grupo de camundongos Balb/c com implante ortotópico de células de tumor de mama da linhagem murina 4T1, tratados com doses diárias de losartana potássica (40 mg/Kg), administrada por gavagem, por período de até 12 dias, e um grupo de animais tratado com solução hidroalcoólica a 5 % (veículo) nas mesmas condições, para ser utilizado como controle. Após 9 e 12 dias do início do tratamento, foram realizadas imagens por SPECT/CT, utilizando o [^{99m}Tc]Tc-HL91, ou por PET/CT, utilizando o [¹⁸F]FAZA, em equipamento Trifoil Triumph Trimodality® dedicado à imagem de pequenos animais. Após reconstrução, as imagens foram processadas utilizando os programas de computador 3D Slicer e AMIDE. Alguns animais foram eutanasiados após a realização das imagens, para determinação da

concentração da radioatividade nos diferentes órgãos e realização de imagem autorradiográfica do tumor, bem como para a realização de ensaios histoquímico, com eosina/hematoxilina, e imuno-histoquímico, com anti-pimonidazol e anti-CD31. Os dados numéricos foram tratados estatisticamente utilizando testes como o Kolmogorov-Smirnov, Levene, T de Student e ANOVA. O radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-HL91 foi obtido com eficiência de marcação e pureza radioquímica superior a 95 %; o [¹⁸F]FAZA apresentando eficiência de marcação de 27 % (não corrigido para o decaimento) e pureza radioquímica maior que 94 %. A captação tumoral média do [^{99m}Tc]Tc-HL91 normalizada pelo músculo (relação T/M) dos animais tratados com losartana, não demonstrando significância estatística (p= 0,233) avaliada pelo teste T de Student; por outro lado, a captação do [¹⁸F]FAZA foi menor nos animais tratados com losartana (p= 0,022). A associação da análise de dados obtidos da autorradiografia, histoquímica e imuno-histoquímica, permitiu demonstrar a correspondência entre as regiões de hipóxia determinada pelos radiofármacos e a determinada por imuno-histoquímica com anti-pimonidazol, bem como demonstrar que a alta concentração dos radiofármacos não estava relacionada às regiões de vasos sanguíneos, determinada por anti-CD31. Assim, podemos concluir que a preparação e utilização de dois diferentes radiofármacos foram importantes para os estudos, com observação de diferença no volume tumoral, quando avaliada por diferentes métodos de imagem, mas dada a heterogeneidade do processo de normalização e limitações quanto aos protocolos de manejo dos animais e das técnicas de imagem, não foi possível alcançar um dos objetivos do trabalho, qual seja, a determinar a janela temporal entre o tratamento e a normalização vascular dos tumores.

Descritores: Hipóxia tumoral; Normalização vascular; Imagem molecular; Tomografia por emissão de pósitron; Tomografia por emissão de fóton único; Compostos radiofarmacêuticos; Autorradiografia; Imuno-histoquímica

ABSTRACT

Martins EB. *Evaluation of the influence of losartan in the vasculature normalization of 4T1 murine mammary tumors, using [^{99m}Tc]Tc-HL91 and [¹⁸F] radiotracers in a pre-clinical study* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2020.

Tumor hypoxia is a well-established resistance factor for radiotherapy and also as a resistance factor to systemic chemotherapy. It is an important prognostic factor as a predictor of recurrence, metastasis and reduced survival. Several studies report evidence of vascular remodeling resulting from vasoactive agents used as direct or indirect antiangiogenic therapy, with one of the main outcomes being a transient reduction of hypoxia regions. The evaluation of the effect of vasoactive compounds on the oxygenation effect of tissues, which was only possible by invasive techniques, started to be performed by a non-invasive and longitudinal method, using imaging processes such as single photon emission tomography (SPECT) or positron emission tomography (PET), with the use of radiopharmaceuticals sensitive to hypoxia / normoxia conditions. In this work, we prepared two radiopharmaceuticals to be used as markers of the presence of hypoxia in tumor tissues; the [^{99m}Tc]Tc-HL91, was obtained through reconstitution of a set of lyophilized reactive (kit) produced at the institution, containing the ligand 4,9-diaza-3,3,10,10-tetramethyldodecane-2,11-dione-dioxima (HL91), and [¹⁸F]FAZA was obtained by reacting the [¹⁸F]fluoride ion with the precursor 1-(2,3-diacetyl-5-tosyl- α -D-Arabinofuranosyl)-2-nitroimidazole, followed by hydrolysis. The vascular remodeling process was evaluated in a group of Balb/c mice implanted with breast tumor cells of the murine lineage 4T1, treated with daily doses of losartan potassium (40 mg / kg), administered by gavage, for a period of up to 12 days, and a group of animals treated with 5% hydroalcoholic solution (vehicle) under the same conditions, to be used as a control. Nine and 12 days after the beginning of the treatment, images were taken by SPECT/CT, using [^{99m}Tc]Tc-HL91, or by PET/CT, using [¹⁸F]FAZA, in Triumph Trimodality® equipment dedicated to the image of small animals. After reconstruction, the images were processed using the 3D Slicer and AMIDE computer programs. Some animals were euthanized after the images, and organs were taken to determine the concentration of radioactivity of them, and to perform the autoradiographic image of the tumor, as well as to perform histochemical

tests, with eozine/hematoxylin, and immunohistochemistry, with anti-pimonidazole and anti-CD31. The numerical data were treated statistically using tests such as Kolmogorov-Smirnov, Levenne, Student's T and ANOVA. The radiopharmaceutical [^{99m}Tc]Tc-HL91 was obtained with labeling efficiency and radiochemical purity greater than 95%; and [¹⁸F]FAZA was obtained in 27% radiolabeling yield (uncorrected for decay) and radiochemical purity greater than 95%. The mean tumor uptake for [^{99m}Tc]Tc-HL91, normalized by the muscle (T/M ratio) of the animals treated or not with losartan, showing no statistical significance ($p = 0.233$), assessed by the Student T test; on the other hand, uptake of [¹⁸F]FAZA was lower in animals treated with losartan ($p = 0.022$). The association of the analysis of data obtained from autoradiography, histochemistry and immunohistochemistry, allowed to demonstrate the concomitance between the regions of hypoxia determined by radiopharmaceuticals and that determined by immunohistochemistry with anti-pimonidazole, as well as demonstrating that the high concentration of radiopharmaceuticals was not related to blood vessel regions, determined by anti-CD31. Thus, we can conclude that the preparation and use of two different radiopharmaceuticals were important for the studies, with observation of difference in tumor volume, when evaluated by different imaging methods, but given the heterogeneity of the remodeling process and limitations regarding management protocols of animals and imaging techniques, it was not possible to achieve one of the objectives of the study, namely, to determine the time window between treatment and vascular remodeling of tumors.

Descriptors: Tumor hypoxia; Vascular remodeling; Molecular imaging; Positron emission tomography; Single photon emission computer tomography; Radiopharmaceuticals; Autoradiography; Immunohistochemistry

Lista de abreviaturas

Ang-I, II,	Angiotensina-I, II
AT1,2	Receptor de angiotensina-II tipo-1,2
bFGF,	Fator básico de crescimento de fibroblastos
cGMP	GMP cíclico - Monofosfato cíclico de guanosina
CAF	Fibroblastos câncer associados
CAM	Macrófagos câncer associados
CE	Células endoteliais
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CTGF	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
ECA,	Enzima conversora de angiotensina
EG-VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular derivado de glândula endócrina
FBP	<i>Filtered back projection</i> - retroprojeção filtrada
FOLFOX4	5-fluorouracil, ácido folínico e oxaliplatina
FOV	<i>Field of View</i> – Campo de visão
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
IECA	Inibidores de ECA
IFN	Interferon
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IL	Interleucina
IMRT	Radioterapia de intensidade modulada
IP	Proteína induzível por interferon
MCP-1	Proteína quimiotática-1 de monócitos
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metaloproteinase de matriz
NOS	Óxido nítrico sintase
NRP-1	Neuropilina-1
PAI-1	Inibidor de ativador do plasminogênio-1
PDGF-BB	Fator de crescimento derivado de plaquetas-BB
PECAM	Molécula de adesão de CE plaquetárias
PEX	Fragmento hemopexina da MMP-2
PGE2	Prostaglandina E2

PLGF	Fator de crescimento placentário
SPARC	Proteína secretada ácida e rica em cisteína
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
TGF	Fator transformador de crescimento
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TSP	Trombospondina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
VEGI	Inibidor do crescimento endotelial vascular.
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α

1. Introdução

O microambiente tumoral é um sistema complexo, sustentado pela interação entre diferentes populações de células tumorais, geneticamente transformadas, e uma variedade de células normais cooptadas em sua função, que contribuem na formação de estruturas, como a matriz extracelular (MEC) e os vasos sanguíneos, ou na liberação de enzimas, proteínas e inúmeras citocinas que vão mediar a proliferação das células mutadas. A estrutura vascular é um fator crítico que influencia diferentes aspectos da fisiopatologia de tumores sólidos, impacta na progressão tumoral, evasão do sistema imune, migração e disseminação celular e responsividade às terapias.¹

O primeiro papel do sistema vascular é prover as células do aporte adequado de nutrientes e oxigênio, os quais são entregues às células tumorais por difusão a partir dos vasos e, à medida que são consumidos, estabelece-se um gradiente de concentração, em geral, inversamente proporcional à distância.² Em 1995, Gray et al.³ estabelecem um perímetro de difusão efetiva de O₂, a partir de 150 µm de distância do vaso é possível observar o surgimento de regiões de hipóxia. Como resposta adaptativa, as células sofrem um desvio metabólico, passando a atuar por um mecanismo glicolítico que gera menos energia e produz mais lactato, o que torna o ambiente ácido. Além disso, o processo de proliferação tumoral atinge um estado crítico onde a demanda de oxigênio e nutrientes supera a oferta e o tumor passa a desenvolver sua própria rede de vasos apoiada nos vasos normais pela indução de angiogênese, que apesar de imprescindível, para o crescimento e metástase, é caracteristicamente disfuncional, comprometida pelo ambiente altamente desmoplásico e por sua própria estrutura intrinsecamente corrompida.⁴

A compreensão da significância da neo-vasculatura tumoral ao afetar o desenvolvimento dos tumores, a torna um interessante alvo para novas estratégias terapêuticas que, ao afetá-la direta ou indiretamente, contribuam para modificações positivas do microambiente tumoral em favor de melhores desfechos clínicos.

1.1 Angiogênese normal e patológica

Durante o desenvolvimento embrionário, a vasculatura nascente é formada pelo processo de vasculogênese (formação de vasos *de novo* a partir de angioblastos ou células-tronco), bem como por angiogênese (crescimento intussusceptivo, por brotamento ou ponte a partir de vasos já existentes). Em tecidos saudáveis, a ação de fatores pró-angiogênicos está em equilíbrio com a de fatores antiangiogênicos e estabilizadores vasculares (**Tabela 1**).⁵ Na angiogênese patológica o desequilíbrio persistente destes fatores e a gama de moléculas pró-angiogênicas expressas, que aumenta com a progressão maligna, levam ao desenvolvimento dos vasos tipicamente aberrantes.⁶

Tabela 1 – Fatores ativadores e inibidores de angiogênese. *

Pró-angiogênicos	Função	Antiangiogênicos	Função
Membros da família VEGF	Estimular angiogênese e vasculogênese, permeabilidade, adesão de leucócitos	VEGFR1; VEGFR1 solúvel; neuropilina-1 solúvel (NRP-1)	Antagonizar VEGF, VEGF-B, PlGF
VEGFR, NRP-1, NRP-2	Integre sinais angiogênicos e de sobrevivência	Ang 2b, c	Antagonista de Ang 1
EG-VEGF	Estimular o crescimento de células endoteliais derivadas de glândulas endócrinas	TSP-1 e 2	Inibir a migração endotelial, crescimento, adesão e sobrevivência
Ang 1 e Tie-2	Estabilizar embarcações	Angiostatina e kringles de plasminogênio relacionados	Inibir a migração endotelial e a sobrevivência
PDGF-BB e receptores	Recrutar células musculares lisas	Endostatina (fragmento de colágeno XVIII)	Inibir a sobrevivência e migração endoteliais
TGF- β 1, endoglin, receptores de TGF- β	Estimular a produção de matriz extracelular	Tumstatina (fragmento de colágeno IV)	Inibir a síntese proteica endotelial
FGF, HGF, MCP-1	Estimular angio/arteriogênese	Vasostatina; calreticulina	Inibir o crescimento endotelial
Integrinas $\alpha\beta$ 3, $\alpha\beta$ 5, α 5 β 1	Receptores para macromoléculas e proteinases da matriz	Fator plaquetário 4	Inibir a ligação de bFGF e VEGF
VE-Caderina; PECAM-1 (CD31)	Moléculas juncionais endoteliais	Inibidores teciduais de MMP (TIMPs); Inibidores de MMP; PEX	Suprimir a angiogênese patológica
Efrinas	Regular a especificação arterial e venosa	Met-1; Meth-2	Inibidores que contêm domínios MMP, TSP e desintegrina
Ativadores de plasminogênio, MMPs	Remodelar matriz, liberar fator de crescimento	IFN- α , IFN- β , IFN- γ ; IP-10, IL-4, IL-12, IL-18	Inibir a migração endotelial; regula-se bFGF
PAI-1	Estabilizar vasos nascentes	Domínio kringle da protrombina-2; fragmento de antitrombina III	Suprimir o crescimento endotelial
NOS; COX-2	Estimular angiogênese e vasodilatação	16 kD-prolactina	Inibir bFGF / VEGF
AC133	Regular a diferenciação de angioblastos	VEGI	Modular o crescimento celular
Quimiocinas	Pleiotropismo na angiogênese	Fragmento de SPARC	Inibir a ligação endotelial e a atividade do VEGF
Id1 / Id3	Inibir diferenciação	Fragmentos de osteopontina, maspina, canstatina, proteína relacionada à proliferina, restina	Inibidores de protease de mecanismo desconhecido

* Adaptada de Jain et al., 2020. ⁷

A neoangiogênese é presumidamente facilitada pela hipóxia, que, através dos HIF (*Hypoxia Induced factors* - Fatores de transcrição induzidos por hipóxia), regula a expressão de genes envolvidos na formação, remodelamento e maturação de vasos.⁸ A sinalização de VEGF é um aspecto importante deste processo por seu papel iniciador da formação de vasos e pela promoção ou interferência em eventos envolvidos na maturação da rede vascular.⁹ A efetividade da barreira do endotélio vascular é regulada pela abertura e fechamento coordenados das junções aderentes através de complexas interações entre componentes de adesão celular (PECAM-1, VE-caderinas ou integrinas), rearranjos de citoesqueleto e forças de contração e adesão.¹⁰ As células endoteliais (CE), fortemente conectadas por estas junções, nos tumores se apresentam frouxas, devido à intensa sinalização VEGF/Flk-1. Seu revestimento pericítico é falho e irregular e as células perivasculares (PVC) se desagregam devido à supressão de PDGF- β mediada por VEGF,¹¹ o que torna os vasos anormalmente permeáveis. Mesmo livres, PVCs são ativadas e liberam ainda mais VEGF e fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF), deslocando ainda mais o equilíbrio na direção de fatores pró-angiogênicos.¹²

O afrouxamento entre as células do endotélio, permite que migrem para o lúmen ou região perivascular e iniciem brotamentos que proliferam em resposta a VEGF e outros mitógenos endoteliais.¹³ A membrana basal e matriz extracelular pré-existent se dissolvem em resposta à ativação de metaloproteinases de matriz (MMPs) e supressão de seus inibidores teciduais (TIMP), ambos atribuídos às células do estroma, em especial a fibroblastos câncer-associados (CAF), abrindo caminho para o brotamento em formação. O material resultante desta dissolução passa a servir como matriz provisória que promove sustentação além de armazenar fatores de crescimento e pró-enzimas, envolvidos na angiogênese. Com a maturação da MEC, a complexidade de sua composição aumenta progressivamente, pela deposição de fluidos e proteínas extravasados a partir dos vasos, e pela ação de fibroblastos câncer associados que a torna caracteristicamente desmoplásica. Ali passam a se propagar forças físicas de compressão e contração que, agravadas pela crescente celularidade tumoral, conduzem ao fenômeno de estresse sólido, que uma vez projetado sobre os vasos linfáticos e sanguíneos acaba justamente por retroalimentar o

processo e intensificar a hipóxia tumoral.⁸ O comprometimento da função vascular poderia representar uma desvantagem se não se mostrasse tão estratégico na medida em que colabora com a evasão do sistema imune e alimenta o ciclo vicioso que exerce uma pressão seletiva desfavorável para a permanência de células normais ou células tumorais menos transformadas, conferindo assim uma vantagem adaptativa à células de perfil mais agressivo que se estabelecem e disseminam metastaticamente.¹⁴

1.2 Terapia antiangiogênica e janela de normalização da função vascular

A terapia antiangiogênica surgiu da hipótese de que a inibição da formação de novos vasos causaria intensa regressão vascular, inanição e morte tumoral.¹⁵ Ensaio pré-clínicos com anticorpos anti-VEGF suportaram a hipótese,^{16, 17} mas a monoterapia com bevacizumab gerou respostas modestas e sem incremento à sobrevida global em ensaios de fase III.¹⁸ A monoterapia com o anticorpo em câncer colorretal metastático apresentou uma taxa de resposta modesta, de apenas 3,3 %, enquanto no tratamento quimioterápico com FOLFOX4, a resposta foi positiva em 8,6 % dos pacientes. Por outro lado, a associação dos tratamentos levou a uma taxa de resposta de 22,7 %; demonstrando um efeito sinérgico entre o anticorpo e o quimioterápico,¹⁹ o que foi confirmado posteriormente em outros trabalhos.^{20,21-24} O observado se contrapunha ao postulado inicial, uma vez que a eficácia da quimioterapia dependeria de uma rede de vasos eficiente para entrega do fármaco.¹²

Assim, no início dos anos 2000 foi apresentada a hipótese da "normalização vascular", sugerindo que: mais do que obliterar vasos, o uso criterioso da terapia antiangiogênica seria capaz de recuperar a estrutura anormal e função da vasculatura do tumor normalizando o microambiente tumoral.^{1, 25} Neste estudo Jain et al.²⁵ sugerem que a estrutura vascular funcional é regulada por um delicado equilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos, que está deslocado na vasculatura tumoral disfuncional, e, que de algum modo é recuperado durante a intervenção com antiangiogênicos.

Os efeitos observados eram transitentes o que motivou o termo “janela de

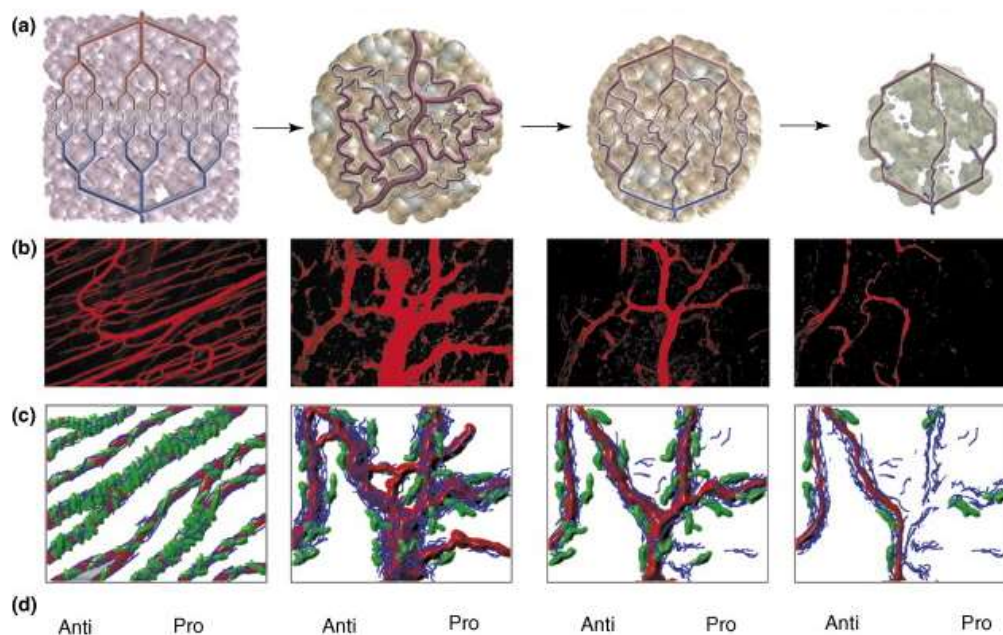


Figura 1. Dinâmica da normalização vascular relatada por Jain et al., 2005. ¹ COLUNAS: I) Vasculatura normal, com vasos maduros, mantida pelo equilíbrio entre fatores pró e anti-angiogênicos. II) Vasculatura tumoral, anormal, com vasos imaturos e disfuncionais; III) Terapias antiangiogênicas suprimem vasos imaturos normalizando a vasculatura tumoral, agora mais eficiente para a entrega de terapias e nutrientes. IV) supressão aguda da vasculatura tumoral reduzindo-a ao ponto de minguar o tumor, o objetivo final da terapia antiangiogênica, no, entanto pode haver aumento da resistência a tratamentos, por não entregar substâncias ou oxigênio. LINHAS: (a) Representação do fluxo sanguíneo e perfusão tecidual nas quatro condições. (b) Microscopia de fluorescência por absorção de dois fótons mostrando a normalização vascular induzida pelo bloqueio do VEGFR2. À esquerda, vasos sanguíneos normais do músculo esquelético; imagens subsequentes mostram vasculatura do carcinoma do cólon humano em camundongos no dia 0, dia 3 e dia 5 após a administração do anticorpo anti-VEGR2 (c) Diagrama que descreve as alterações concomitantes no pericito (vermelho) e na membrana basal (azul) (d) Oscilações no equilíbrio de fatores pró e antiangiogênicos nos diferentes estados.

normalização”, que corresponde ao intervalo de tempo durante o qual os vasos demonstram um fenótipo mais próximo do normal. Neste período é observado uma melhor perfusão e conseqüente entrega de nutrientes, oxigênio e substâncias, constituindo uma “janela de oportunidade” na qual o tumor se torna mais vulnerável à radio e quimioterapia. Entretanto, após esse período estas características se perdem e se verifica algo mais próximo do objetivo inicial, onde são acentuados os efeitos antiangiogênicos, havendo atipia da estrutura vascular, comprometimento a entrega de substâncias e agravo da hipóxia tecidual.²⁶

1.3 Mecânica das estratégias de normalização

A correspondência entre a janela de normalização e a melhora na resposta à terapia foi demonstrada em diferentes trabalhos científicos, como observado na tabela extraída da revisão da literatura elaborada por Goel et al.¹² Foram selecionados aqui os principais tratamentos com efeito evidente sobre a reoxigenação tumoral, apresentados na **Tabela 2** com o intuito de enfatizar a enorme variabilidade apresentada pelas diferentes estratégias, nos diferentes modelos tumorais trabalhados, o que faz da determinação adequada desta relação tempo/efeito uma questão fundamental.

Tabela 2 – Estratégias de terapia antiangiogênica e seu efeito sobre a pO₂.

ANTI-ANGIOGÊNICO	MODELO TUMORAL	PERÍODO DE REOXIGENAÇÃO
Anticorpos		
Bevacizumab	Melanoma, Mama, carcinoma de ovário	2–4 Dias
Bevacizumab	GBM	Mais de 5 Dias
DC101	GBM	2–8 Dias
Inibidores de tirosinacina		
Sunitinib	Carcinoma de células escamosas	O ₂ aferido no 4º dia
Semaxanib	Melanoma	O ₂ aferido no 3º dia
PI-103 (inibidor PI3K)	Fibrosarcoma, Carcinoma de células escamosas	O ₂ aferido no 10º dia
Gefitinib (inibidor EGFR)	Fibrosarcoma, Carcinoma de células escamosas	O ₂ aferido no 10º dia
Erlotinib (inibidor EGFR)	Carcinoma de células escamosas, NSCLC	O ₂ aferido no 5º dia de terapia
Terapia Endócrina		
Castração (depleção androgênica)	Carcinoma de Shionogi	O ₂ aferido no 21º de terapia
Terapia Metronômica		
Gemcitabina (Baixa-dosagem)	Carcinoma Pancreático	O ₂ aferido no 28º dia de terapia
Outras terapias		
FTI (inibidor H-Ras)	CA Próstata, CA de bexiga, glioma, fibrosarcoma, CA de células escamosas	O ₂ elevado ≤7–10 dia
Nelfinavir (inibidor AKT)	Fibrosarcoma, CA de células escamosas	O ₂ aferido 10º dia de terapia
TNP-470	CA Mama	O ₂ aferido no 9º dia de terapia
Suramina	GBM	O ₂ aferido de 5-6 semanas após início da terapia
Talidomida	CA fígado, Fibrosarcoma	O ₂ elevado do 2-4º dia após início da terapia

Fonte: Adaptada de Goel et al.,2011.¹²

A normalização foi testada por meio de múltiplos mecanismos, diretos ou indiretos. A estratégia mais explorada, consiste no uso de agentes anti-VEGF, como A4.6.1 (precursor do bevacizumab)²⁷⁻²⁹, bevacizumab³⁰⁻³³, anti-VEGFA murino^{34, 35}, aflibercept (proteína capaz de sequestrar todas as isoformas de VEGF)³⁶. Como visto na **Figura 1** (Cap 1.2), o bloqueio de VEGF induz a normalização por supressão dos vasos imaturos e recrutamento ativo de pericitos fortalecendo os vasos restantes. Ocorre a maturação do vaso medial remanescente, mas a supressão das ramificações disformes, o que mais tarde acaba por tornar a área vascular insuficiente para suprir o tumor, elevando a hipóxia e fechando então a janela de normalização. Adicionalmente, o bloqueio de VEGF tem sido extensamente relacionado ao aumento da deposição de MEC e aumento da hipóxia.^{2,7,9,37,10, 38}

O metabolismo celular foi outro alvo abordado. A fosfofrutocinase PFKFB3 regula a glicólise nas células endoteliais. Seu bloqueio as torna quiescentes e, portanto, não responsivas à sinalização pró-angiogênica gerada pelo microambiente tumoral. Entretanto, há o risco de uma inibição extensiva da glicólise resultando em toxicidade sistêmica. O uso de baixas doses da piridina 3PO permitiu o bloqueio da angiogênese patológica sem supressão dos vasos ou redução da área vascular, mas por ativação do pericito e potencialização da estabilidade do endotélio evitando a internalização de VE-caderinas, aumento da área do lúmen e consequente da perfusão.^{4, 39} A manipulação do metabolismo glicolítico através da regulação positiva da via mTOR de macrófagos M2, torna-os competitivos pela glicose, a escassez de nutrientes forçou um desvio metabólico das CE, resultando em vasos fortalecidos e mais bem organizados.⁴⁰

R-Ras é uma enzima GTPase altamente expressa em células do músculo liso vascular e CE da vasculatura normal adulta. A ativação ou superexpressão de R-Ras no endotélio vascular tumoral foi capaz de promover normalização por maturação dos vasos sem letalidade das CE como outras abordagens.⁴¹ A ativação de mediadores lipídicos como o receptor LPA4 por administração de ácido lisofosfatídico promoveu uma reestruturação intensa dos vasos que se tornaram mais longos, calibrosos e alinhados em paralelo. O efeito foi associado a estabilização de VE-caderinas endoteliais e potencialização das junções aderentes.⁴² A superexpressão gênica ou a ativação farmacológica do

mecanorreceptor TRPV4 restaurou a sensibilidade normal em CE tumorais, normalizando a vasculatura e aumentando a distribuição de terapias em um modelo pré-clínico de carcinoma.⁴³ A eribulina modula a expressão de moléculas de interações CE-pericito. Semelhante à ativação de Tie-2 por meio da inibição de VE-PTP, o resultado é uma densidade mais alta de vasos de pequeno calibre fortalecidos, maturados.⁴⁴ Nas últimas décadas houve um interesse crescente sobre os efeitos do exercício físico sobre o microambiente tumoral. De fato, exercício aeróbio induz à normalização vascular, sem supressão dos vasos, mas por uma maturação vascular importante. Uma das hipóteses possíveis é a ativação de TSP-1 e calcineurina mediada pelo estresse.⁴⁵⁻⁴⁷

Estas estratégias têm se mostrado bem sucedidas, exceto em regiões onde o stress sólido seja um fator limitante.⁷ Nestas situações a atuação sobre a ação dos fibroblastos ou densidade da matriz extracelular pode ser mais eficaz na reperfusão por redução da desmoplasia e descompressão. O bloqueio da via *Sonic hedgehog* (Shh) foi relacionado à redução da frequência de CAF e redução da desmoplasia, entretanto sem significância clínica.^{48, 49} A inibição de TGF- β também demonstrou reprogramação de CAF. Alterações na composição da matriz foram testadas pela degradação de colágeno tipo I por relaxina, ou inibição da LOX2 e da hialurona pela enzima hialuronidase, potencializando a ação da quimioterapia em estudos pré-clínicos.^{50, 51} Os estudos referem também em seus resultados a reoxigenação do tumor,^{27, 31, 32} re-sensibilização à radioterapia,^{32, 34} melhora na entrega de nanopartículas e vetores virais.⁵²

1.4 Angiotensina na modificação da vasculatura tumoral

O sistema Renina-Angiotensina (SRA) é um sistema endócrino cujo papel central é a regulação da homeostasia e pressão arterial. Sua ação se dá pela atuação do efator angiotensina-II (Ang-II), um octapeptídeo gerado a partir de um precursor, a angiotensina-I (Ang-I), decapeptídeo que sofre clivagem proteolítica por ação de uma metalodipeptidilcarboxipeptidase, a enzima conversora de angiotensina (ECA), presente em todo o endotélio vascular. A angiotensina-I por sua vez, é produto da clivagem do angiotensinogênio, proteína hepática, substrato da renina, enzima produzida pelos rins.⁵³

Ang-II vai exercer suas funções através do acoplamento a seus receptores: AT₁ e AT₂, glicoproteínas transmembrana com 30% de similaridade em suas sequências.⁵⁴ Os receptores AT₁ participam da maioria das ações efetoras da Ang-II, já receptores AT₂ estão presentes em abundância durante o desenvolvimento fetal e pouco presentes na fase adulta, sendo que sua expressão é aumentada em condições patológicas. O receptor AT₂ antagoniza várias das respostas iniciadas pela interação com AT₁ e receptores do fator de crescimento, e sua ativação contribui para a regulação da pressão arterial e função renal.⁵⁵

Embora os efeitos da Ang II sejam considerados pleiotrópicos, nas últimas décadas o conceito clássico de um SRA circulante por todo o corpo tem sido revisto e diversos trabalhos vêm sugerindo a existência de pequenos sistemas teciduais atuando de modo parácrino. Em tecidos como o cérebro,⁵⁶ medula óssea,⁵⁷ adiposo,⁵⁸ folículo ovariano,⁵⁹ epidídimo,⁶⁰ corpo carotídeo,⁶¹ fígado,⁶² pulmão⁶¹ e pâncreas,⁶² verificou-se uma produção local de Ang-II cujo efeito permanece circunscrito ao próprio órgão, sendo descritos inclusive subtipos específicos de receptores de Ang-II. Diferentes ações foram relatadas, incluindo crescimento celular, antiproliferação, apoptose, geração de espécies reativas de oxigênio, secreção hormonal, ações pró-inflamatórias e pró-fibrinogênicas, pleiotropismo, formação óssea, indução de liberação de prostaglandina E₂, estímulo da neovascularização além de vasoconstrição e vasodilatação. Outros estudos demonstraram que o bloqueio de AT₁ de fibroblastos da gengiva de coelhos inibiu sua proliferação⁶³ e reduziu a secreção de prostaglandina PGE₂ em fibroblastos gengivais humanos.³⁸

No microambiente tumoral, a ação da Ang-II foi altamente relacionada a desmoplasia. Efeito que tem sido atribuída a ativação do receptor AT₁, estímulo de TGF- β e da expressão de CTGF, ambos relacionados à ativação de fibroblastos, sendo os CAF, a principal fonte de proteínas da matriz em tecidos normais e malignos.⁶⁴ Foi relatado que a presença de CTGF induz a formação de fibroblastos através da transdiferenciação de outras células, como células epiteliais (via EMT, transição epitelial-mesenquimal),⁶⁵ células estreladas,⁶⁶ fibroblastos residentes⁶⁷ ou fibrócitos (derivados da medula óssea, mesenquimal circulante células-tronco) que foram recrutadas por quimiocinas. O fator também

atua na apresentação de citocinas a seus receptores catalisando a resposta, como por exemplo, $TGF\beta$, sobre o qual tem ação de estímulo recíproco da secreção, criando um feedback positivo.⁶⁸

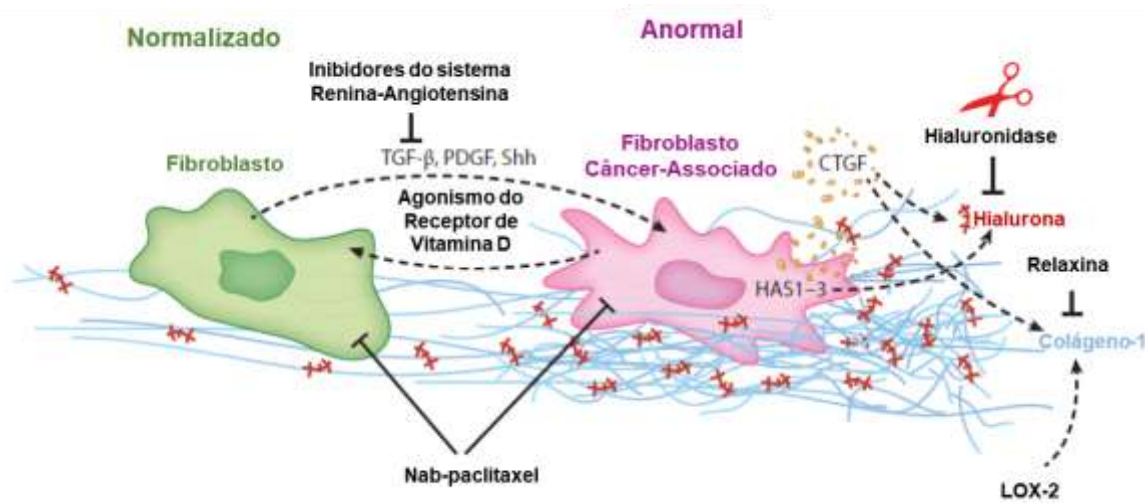


Figura 2. Vias relacionadas a normalização da função vascular por atuação sobre CAF e matriz extracelular. (Adaptado de Martin et al., 2019)²

Estudos anteriores utilizaram inibidores de ECA (IECA) na supressão das funções da Ang-II. No entanto, os IECA não só suprimem a síntese de Ang-II mas também a atividade de cininase-II com consequente aumento na concentração de bradicinina e estímulo positivo da angiogênese.^{69, 70} Além disso, Ang-II é sintetizada por outra enzima: a quimase.⁷¹ Portanto, IECA acabaram descartados na elucidação da angiogênese mediada por Ang-II *in vivo*.⁷²

Losartana é um bloqueador do receptor AT1 utilizado como anti-hipertensivo em mais de 100 países. Não demonstra efeitos secundários graves e a segurança na administração a pacientes com hipertensão já foi comprovada. Além de suas propriedades anti-hipertensivas, também há relatos de um efeito antifibrótico, por redução da incidência de fibrose hepática, pulmonar, cardíaca e renal.⁷³⁻⁷⁶ O bloqueio de AT1 com losartana reduziu os níveis de $TGF\beta$ 1 ativo, mas não o total em fibroblastos de carcinoma mamário *in vitro*, implicando em uma redução da síntese de colágeno tipo I em 27%.⁷⁷

Inúmeros estudos têm demonstrado uma potencial atividade antiangiogênica e capacidade de inibir o crescimento de vários tipos de

tumores.^{22, 55, 78, 79} Em linhagens celulares benignas de epitélio glandular mamário, a superexpressão de AT1 levou a um fenótipo tumorigênico marcadamente invasivo, que foi revertido especificamente pelo tratamento com losartana.⁶⁴

Em 2009, Otake et al.⁵⁵ descreveram um efeito inibitório do crescimento de tumores e metástases quando do tratamento de tumores tipo melanoma com altas doses de losartana, e, pronunciada redução na densidade de microvasos, evidenciada pela reduzida expressão de receptores flt-1/4, ti1-1/2, CD31 e receptor de trombina, sugerindo mecanismos indiretos de inibição de VEGF.⁵⁵ Em 2013, Jain et al.⁸⁰ observaram intensa descompressão vascular relacionada à redução na produção colágeno por fibroblastos câncer associados, favorecendo não só a reoxigenação como a entrega de quimioterápicos ao tecido tumoral em animais tratados com doses inferiores do vasoativo.⁸¹ Os achados suportam a hipótese de que, em dose e tempo adequados, o composto possa contribuir para reperfusão tumoral não apenas através do controle do tônus vascular, mas pela própria descompressão e reorganização dos vasos. Estudos mais recentes realizados pelo mesmo grupo reportam que pacientes que receberam inibidores do sistema de angiotensina simultaneamente com o tratamento padrão para câncer de ovário exibiram sobrevida global de 30 meses a mais em comparação com os pacientes de outros anti-hipertensivos.⁸²

1.5 Hipóxia tumoral como fator de radioresistência

A hipóxia também é um fator prognóstico importante e fator de resistência já bem estabelecido para radioterapia de tumores,⁸³ sendo que nessa condição são exigidas doses efetivas três vezes mais altas pra promover o mesmo efeito da irradiação com raios X e γ em tumores normóxicos.⁸⁴ Isso se deve ao fato de que radiações eletromagnéticas apresentam baixo LET (do inglês: *Linear Energy Transference*) e, portanto, baixo potencial de ionização e lesão de dupla fita nas moléculas de DNA, dependendo primordialmente dos efeitos secundários da radiação, gerados pelas espécies reativas de oxigênio, as quais estão relacionadas à radiólise da água e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS = *reactive oxygen species*). São estas espécies, radicalares e não

radicais, altamente reativas, que irão atacar as moléculas de DNA levando a dano em ambas as fitas.

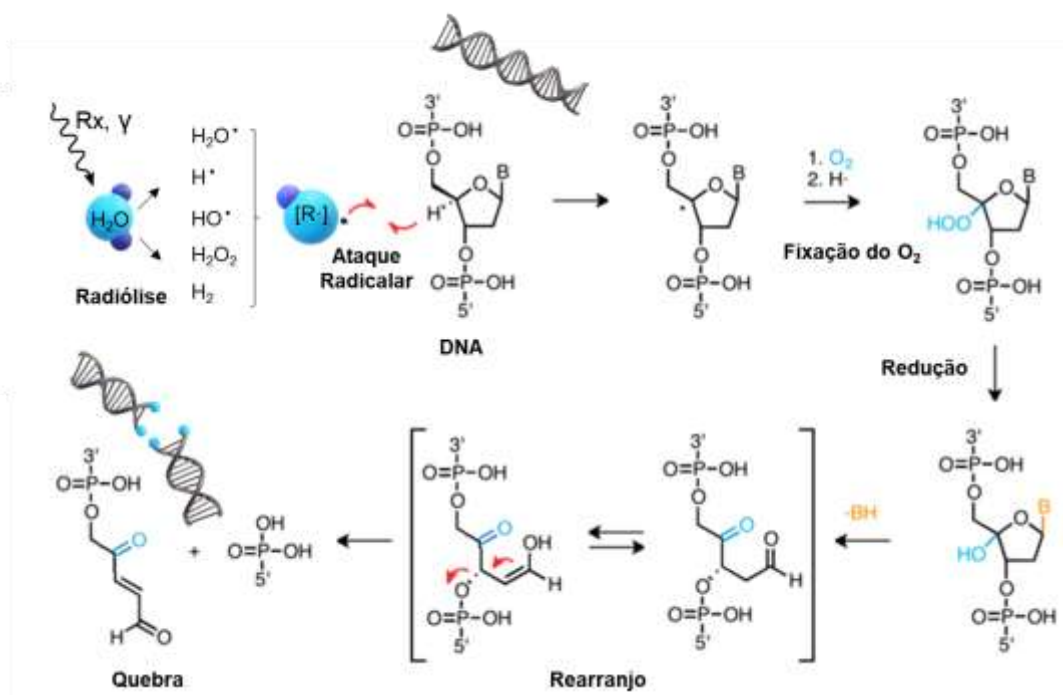


Figura 2 – Mecânica da hipótese de fixação do oxigênio⁸⁵ demonstrando o papel do oxigênio molecular na estabilização da molécula clivada por espécies radiculares, permitindo a ruptura da dupla fita da molécula de DNA.

A hipótese mais amplamente aceita atualmente sugere que a hipóxia impede a estabilização dos danos de dupla fita no DNA induzidos pela radiação ionizante. Na presença de O_2 ocorre a estabilização dos fragmentos por oxidação das cadeias de DNA, o que resulta na quebra irreversível da dupla fita (Figura 2) e por conseguinte, morte celular. Na ausência de oxigênio, a estabilização das quebras de fita dupla deixa de ocorrer, e o dano pode ser reparado.^{85, 86} Uma vez que a presença de oxigênio é importante para letalidade da radiação, a razão entre a dose letal em anóxia ($p\text{O}_2 = 0$) e uma $p\text{O}_2$ positiva é referida como razão de aumento da radiosensibilização (OER, do inglês: *oxygen enhancement ratio*).⁸⁷

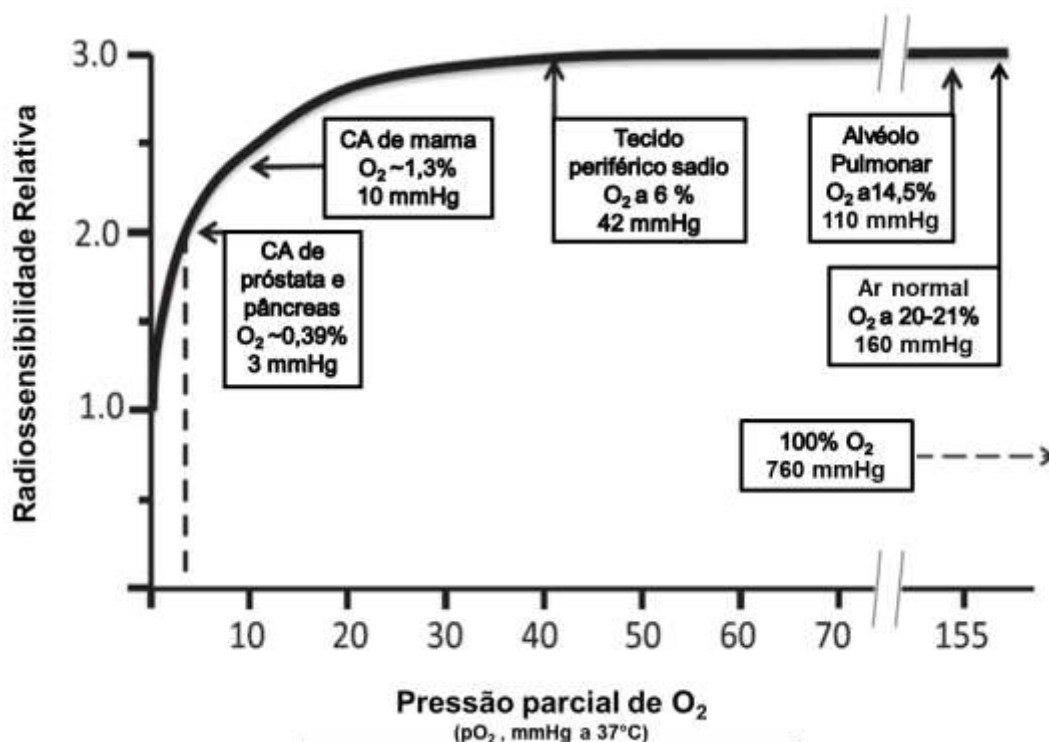


Figura 3. Relação entre a pressão parcial de oxigênio e radiosensibilidade. (Adaptada a partir dos achados de Gray et al., 1953,⁸⁴ Vaupel et al., 2007,⁸⁸ e McKewon et al., 2014.⁸⁹)

As definições dos níveis normais de oxigênio *in vivo* e *in vitro* diferem de modo relevante. Estabeleceu-se a normóxia tecidual em 6% O₂ ou 30 mmHg, e a normóxia *in vitro* em torno de 21% de O₂ ou 160 mmHg.⁸⁶ Em 1953, Gray et al.⁸⁴ publicaram o trabalho seminal onde demonstram empiricamente que a radiosensibilidade de um alvo biológico aumenta sensivelmente quando a pO₂ é incrementada de 0-10 mmHg. Uma vez que a pO₂ alcança concentrações superiores a 30 mmHg a sensibilização atinge um platô e parece não aumentar com o aumento da pO₂ (Figura 3).⁸⁷ Décadas depois, McKewon et al.⁸⁹ se debruçaram sobre o tema realizando uma extensa revisão sistemática que reuniu informações sobre a pressão parcial de oxigênio em diferentes tecidos saudáveis e seus respectivos tumores, e elaborando melhor os conceitos e valores médios de normóxia e hipóxia tecidual para cada órgão/tecido. De modo geral, células que resistem à terapia se encarregam de repopular o microambiente tumoral após o tratamento, levando a uma recidiva ainda mais resistente do que a lesão inicial.⁹⁰

1.6 Alterações moleculares mediadas por hipóxia e seus marcadores

Regiões de hipóxia estão distribuídas heterogeneamente no interior de tumores. Há regiões de transiência e intermitência (hipóxia aguda), coexistindo com regiões de hipóxia persistente (hipóxia crônica).⁹¹ A natureza complexa do fenômeno por suas constantes oscilações, é um dos fatores limitantes da precisão de sua quantificação. Assim, para que o grau de hipóxia possa ser usado como preditor de resistência ao tratamento, deve ser avaliado individualmente para cada tumor.⁹²

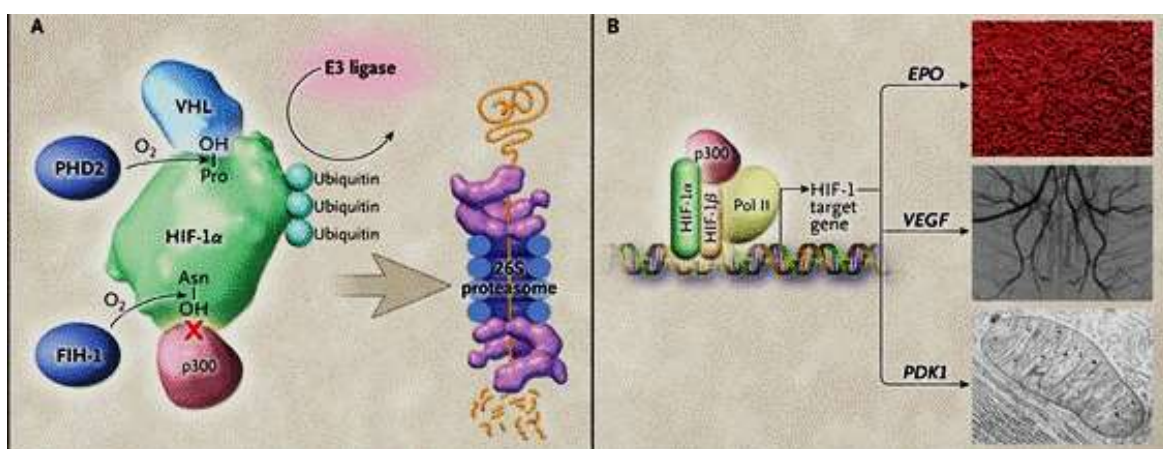


Figura 2: Mecanismos de regulação do HIF-1 α sob condições normóxicas e hipóxicas. Adaptado de The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2019

Fatores Induzidos por Hipóxia atuam como mediadores fisiológicos da resposta celular à hipóxia em tecidos normais e malignos. Como efeito direto da escassez de oxigênio, HIFs, complexos heterodiméricos formado por subunidades α e β , passam a conduzir grande parte das modificações observadas no microambiente tumoral. O oxigênio molecular é substrato de prolil-hidroxilases (PHD1-3), enzimas que catalisam a hidroxilação das subunidades α , tornando-as vulneráveis à ubiquitina ligase von Hippel-Lindau (VHL), um marcador de degradação proteossomal. Assim, devido à ausência de O_2 a subunidade α se mantém estável e dimeriza com a subunidade β , tornando-se capaz de regular o programa transcricional de resposta a hipóxia.⁹⁰

Um segundo mecanismo dependente de oxigênio, foi descoberto em 2001. Semenza e seu grupo ⁹³, ganhadores do Nobel de Medicina de 2019 foram

os primeiros a identificar um fator envolvido a inibição de HIF como fator de transcrição, denominado FIH-1 (fator inibidor de HIF) ⁹³. FIH é outra hidroxilase dependente de oxigênio que hidroxila um resíduo de asparagina na porção N-terminal de HIF-1, afetando recrutamento do co-ativador transcricional p300 (Lando et al., 2002a; Lando et al., 2002b). Assim, O₂ não só promove a degradação de HIF-1 α via prolil-hidroxilação, mas também tem um papel inibitório da função transcricional de eventuais subunidades α que tenham escapado da degradação proteossomal. ⁹⁴

Três diferentes HIFs foram identificados. HIF-1, ligado à expressão de fatores envolvidos na angiogênese (NOS, VEGF e ANGPT-2)⁸, metabolismo glicolítico (GLUTs)⁹⁵, sobrevivência (LOX) e invasão (MMPs);⁹⁶ HIF-2 α , relacionado à promoção de genes ligados à multipotência de células tronco tumorais (Oct-4)⁹⁷, invasão e angiogênese.⁹⁸; e HIF-3, cujo papel ainda é discutido, durante anos referiu-se a um efeito inibitório sobre HIF-1/2 α , por competição pela subunidade β comum, ⁹⁹ sugere-se uma atuação por feedback negativo, pois o próprio HIF-3 é expresso por um dos genes de alvo HIF-1. ¹⁰⁰ Por se tratar de um biomarcador direto e imediato da resposta à escassez de O₂, HIF-1 α é usualmente determinado por ELISA, imuno-histoquímica, ou western-blot para a composição do perfil tumoral, sendo frequentemente correlacionado a mau prognóstico, má responsividade a rádio e quimioterapia, potencialização do perfil metastático, recidiva precoce e menores taxas de sobrevida em inúmeras neoplasias.

1.7 Radiotraçadores de hipóxia tumoral

São descritos métodos diretos e indiretos para detecção de hipóxia, porém, alguns são invasivos ou mesmo inadequados para uso clínico de rotina. Por exemplo, microeletrodos oxigênio-sensíveis, considerados por muito tempo "padrão ouro" na determinação direta da pO₂ tecidual, só é aplicável quando o tecido alvo é facilmente acessível e é associado com significativa morbidade.

Assim, nas últimas décadas, muita atenção tem sido dada às técnicas de imagem que utilizam traçadores marcados radioativamente para uma detecção não invasiva de células hipóxicas em tumores sólidos. Até o momento não existe

um agente aprovado pela FDA para avaliação de hipóxia nos tecidos tumorais, ou uma metodologia padrão aceita para a quantificação de hipóxia em pacientes, nem mesmo existem protocolos aprovados pela FDA para o tratamento e reversão da hipóxia tumoral.¹⁰¹

O radiotraçador de hipóxia ideal deve apresentar algumas condições: 1) ter alta afinidade e especificidade por células hipóxicas assim como baixa captação inespecífica; 2) as moléculas devem ser estáveis e resistentes a degradação e metabolização, ou oferecer metabólitos radiomarcados que permaneçam retidos ao sítio alvo evitando marcações inespecíficas; 3) a lipofilicidade da molécula deve estar dentro de um valor ideal para permear membranas, e favorecer uma via de excreção que não comprometa a qualidade das imagens. Por exemplo, compostos mais hidrofóbicos tendem a ser eliminados pela via hepatobiliar, com tempo de excreção mais longo quando comparado a compostos hidrofílicos, que tendem a ser eliminados pelo sistema urinário; 4) o radioisótopo deve apresentar meia-vida física suficiente para permitir a imagem do processo; 5) A depuração do traçador não ligado deve ser rápida para permitir discriminar entre captação específica e inespecífica. Para este último, é desejável uma maior hidrofilicidade, porque isto aumenta a depuração do sangue por processos de excreção renal. Na prática, todos esses critérios raramente são preenchidos.⁹²

Em meados da década de 1970, foi descoberto que derivados de nitroimidazol se ligavam a células hipóxicas em cultura de tecidos.¹⁰²

Seu mecanismo de ação foi amplamente estudado chegando-se à conclusão de que no espaço intracelular, esta classe de moléculas sofre uma redução de elétron único, formando espécies altamente reativas, que, em níveis normais de O₂, são prontamente reoxidadas. As reações permanecem em equilíbrio por algum tempo, até que a molécula reoxidada se difunde para fora da célula, no chamado “ciclo fútil”. Em hipóxia a reoxidação não é eficaz e o equilíbrio se desloca para a formação das espécies reativas. O radical nitro aromático aniônico (Ar-NO₂^{•-}) e a hidroxilamina aromática (Ar-NHOH) são os principais metabólitos deste processo.^{103, 104} Reagem indiscriminadamente formando adutos com macromoléculas nucleofílicas, proteínas, DNA, e sofrem inativação agindo como aceptores de grupos tióis de enzimas redutases como a

glutaciona.¹⁰⁵ Áreas tumorais necróticas, que tem baixa atividade de redutases, não apresentam captação dos compostos.⁹²

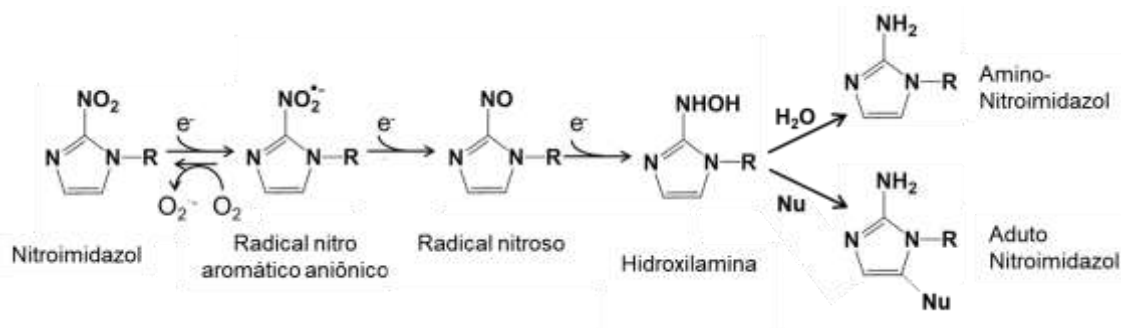


Figura 4 - Mecanismo de captação de nitroimidazóis em células hipóxicas. (Adaptado de Kizaka-Kondoh e Konse-Nagasawa, 2009).¹⁰⁶

Assim, diferentes compostos foram preparados para utilização como agentes para detecção de hipóxia em tecidos baseados em imuno-histoquímica^{107, 108}, moléculas marcadas com trítio (³H) ou [¹⁴C]carbono para detecção por autorradiografia¹⁰⁹ ou compostos contendo flúor, tanto o natural para imagens por ressonância magnética¹⁰⁷, quanto utilizando o isótopo radioativos [¹⁸F]flúor, para imagem por tomografia por emissão de pósitron.¹¹⁰ O uso de compostos detectáveis por imagem *in vivo*, seria vantajoso ao evitar procedimentos invasivos para retirada de amostras de tecidos para biopsia.

Porém, mesmo com as limitações da técnica, por não representar um panorama completo do perfil hipóxico compreendendo uma amostra de dimensão reduzida, temporalmente estática e meramente bidimensional, e, mesmo apresentando utilidade clínica limitada, a análise do perfil de hipóxia tumoral por imuno-histoquímica tem sido frequentemente empregada em tumores biopsiados, sendo que para a coloração são utilizados anticorpos direcionados à adutos intracelulares de traçadores nitroimidazólicos “frios”, sendo o pimonidazol, ainda hoje, considerado padrão ouro para a técnica.¹¹¹

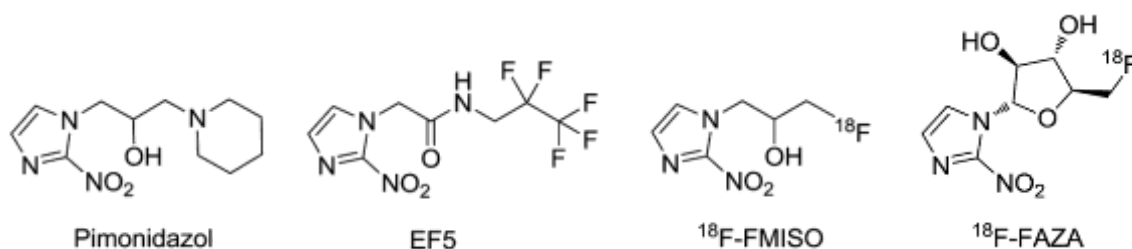
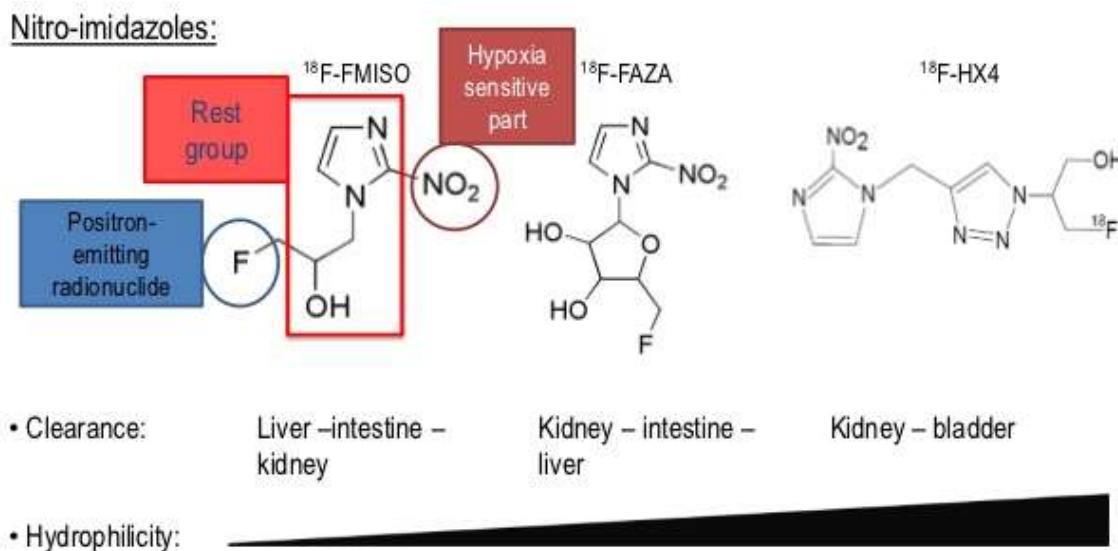


Figura 5. Estrutura química de compostos nitroimidazólicos utilizados em imunohistoquímica e PET/CT.

A maioria dos traçadores nitroimidazólicos entra nas células por difusão passiva. A lipofilicidade e propriedades metabólicas periféricas variam entre esses compostos e levam a diferenças nas propriedades farmacocinética das moléculas, que apresentam uma meia-vida biológica média de 6 horas.⁷² A presença do radionuclídeo emissor de pósitron [^{18}F]flúor, com sua meia-vida de 109,7 min oferece a possibilidade de obter imagens com a resolução e precisão espacial, fornecida pela imagem PET, além de permitir uma abordagem quantitativa do composto no sítio alvo.



Dos vários radiotraçadores derivados de nitroimidazol e marcados com [^{18}F]flúor, dentro os quais o [^{18}F]fluormisonidazol ([^{18}F]FMISO) foi o primeiro

derivado radiomarcado proposto para a imagem PET¹¹⁰ validado e avaliado extensivamente para a detecção de hipóxia tumoral em diferentes modelos pré-clínicos¹¹²⁻¹¹⁶ e clínicos em diferentes tipos de câncer¹¹⁷⁻¹²⁰, o traçador responde bem a pO₂ entre 2 e 10 mmHg¹¹⁰. Entretanto, o composto apresenta limitações, uma vez que sua alta lipofilicidade afeta a cinética de depuração do traçador livre, um contraste ideal entre alvo e background só é obtido de 4 a 6 h após a injeção, no entanto, passado tanto tempo, a estatística de contagem é comprometida devido ao rápido decaimento do [¹⁸F]Flúor e ainda assim há uma atividade de fundo substancial que afeta a qualidade da imagem. Em geral se aplica um protocolo de aquisição de imagem 2 h após a injeção, embora o baixo contraste entre tecido hipóxico e estruturas normais dificulte a delimitação de bordas das regiões de interesse (ROI) para quantificação da lesão ou planejamento de radioterapia. Ainda assim, a contribuição da imagem PET com [¹⁸F] FMISO para IMRT foi encorajadora o suficiente para motivar um experimento inicial de aumento de dose em 17% na cabeça e câncer de pescoço.¹²¹

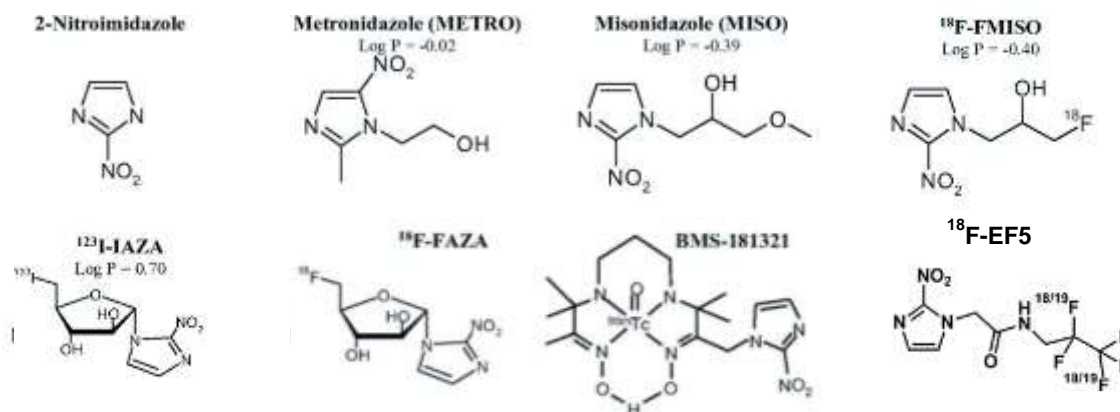


Figura 7- Traçadores de hipóxia nitroimidazólicos. (Adaptado de Takasawa, et al. 2008)

O análogo [¹⁸F]fluoroazomicinarabinosídeo, [¹⁸F]FAZA, foi desenvolvido no *Cross Cancer Institute group* (Aberta, Canada) baseado na estrutura do precursor [¹²³I]IAZA, para imagens SPECT. Assim como os polifluorados [¹⁸F]EF3 e [¹⁸F]EF5, é um nitroimidazol de segunda geração e apresenta características farmacocinéticas melhoradas. A presença do radical arabinose confere uma menor lipofilicidade permitindo um *clearance* mais rápido das

moléculas não captadas da circulação, o que favorece a razão de captação entre tecido hipóxico/tecido normal e, por conseguinte, em menor intervalo após a injeção.⁹² Ainda assim sua lipofilicidade é suficiente para preservar a capacidade de penetração da barreira hematoencefálica.¹⁰⁵ Sua especificidade para células hipóxicas foi demonstrada em um estudo *in vitro* excelentes características de captação em hipóxia, com modesta variabilidade célula-a-célula ausência de captação em células normóxicas.¹²² Essas características o tornam uma opção mais atrativa para o imageamento de hipóxia tecidual.

Outra possibilidade para obter imagem de regiões de hipóxia é a utilização do [^{99m}Tc]tecnécio, que apresenta algumas vantagens em relação aos radionuclídeos emissores de pósitron [¹⁸F]flúor e [⁶⁴Cu]cobre. Elencando: 1) sua disponibilidade através da eluição do gerador de radioisótopos, baseado no decaimento de [⁹⁹Mo]molibdênio para [^{99m}Tc]tecnécio; geradores amplamente disponíveis, entregues semanalmente nos locais de uso, permitindo a obtenção do radioisótopo diariamente ou mais de uma vez ao dia; 2) o radioisótopo é obtido na forma química de pertecnetato (TcO_4^-), com estado de oxidação 7+, pode ser reduzido a outros estados de oxidação e formar até nove pontos de coordenação; 3) possui meia-vida física de 6,01 h, o que permite maior tranquilidade nos processos de preparação e utilização, bem como possibilidade de obtenção de imagens tardias ou com mais de 6 horas; 4) o elemento emite radiação gama com energia de 140 keV (> 99 %), ideal para os sistema de detecção baseado em detectores de iodeto de sódio, comum nas câmaras SPECT; 5) possui o par teranóstico [¹⁸⁸Re]rênio, emissor de partículas β^- de alta energia ($E_{\beta\text{max}} = 2,1 \text{ MeV}$, $t_{1/2} = 16,9 \text{ h}$) que também pode ser convenientemente obtido com alta atividade específica por sistema de gerador ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re permitindo o uso do mesmo ligante no diagnóstico, e na terapia.^{123, 124}

A desvantagem reside no fato de que a química dos radiometais depende de volumosos quelantes bifuncionais e às vezes grupos espaçadores para a incorporação do radionuclídeo à molécula com função biológica, o que frequentemente impacta significativamente na farmacocinética e biodistribuição do traçador. Além do fato de que imagens SPECT são inerentemente mais ruidosas e com menor resolução espacial, o que pode ser um fator limitante a depender do tamanho da lesão estudada.

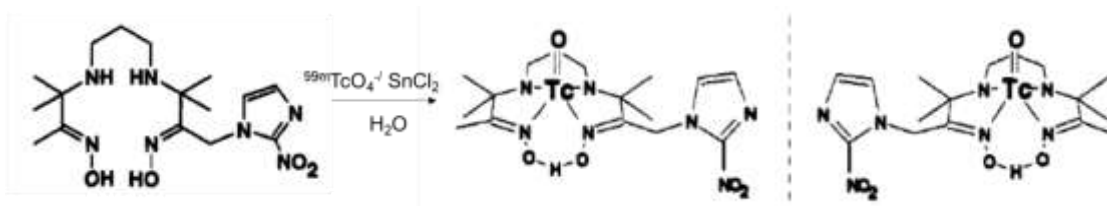


Figura 8. Estrutura do ligante PnAO-1-(2-nitroimidazol) e os dois enantiômeros do complexo $\text{TcO}(\text{PnAO-1-(2-nitroimidazol)})$ BMS-181321 (Fonte: Linder et al., 1994118).

Em 1994, Ramalingam et al.¹²⁵ sintetizaram uma série de derivados do ligante propranoaminoxima (PAO) funcionalizados com compostos nitroimidazólicos. Linder et al.¹²⁶ publicaram os resultados da avaliação de um desses compostos, que passou a ser chamado de BMS181321, e comprovaram, *in vitro*, que o mesmo apresentava potencial para ser utilizado como um marcador de hipóxia, demonstrando que o complexo metálico não interferia na redução biológica do grupo nitro.

Em busca de outros ligantes para o ^{99m}Tc tecnécio, Archer et al.^{127, 128} reportaram a preparação do análogo butanoaminoxima (BnAO) funcionalizado com nitroimidazol (HL91M). No estudo para mostrar a eficácia do composto em coração infartado de camundongo, e utilizando o ligante HL91, sem a presença do grupo nitroimidazol como um possível controle negativo, foram surpreendidos com a alta captação deste último quando comparados aos funcionalizados com nitroimidazol. Outros estudos foram conduzidos para comprovar a dispensabilidade do grupo nitroimidazol na molécula, enquanto se buscava entender o mecanismo de captação.

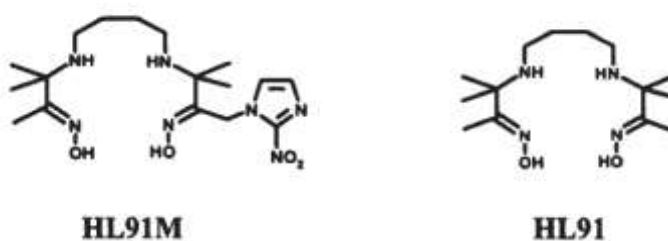


Figura 9. Estrutura dos ligantes de ^{99m}Tc tecnécio avaliados por Archer e col.¹²⁸

Zhang et al.¹²⁹ avaliaram a captação do complexo [^{99m}Tc]Tc-HL91 em cultura de células de tumor de ovário de hamster Chinês (CHO) e ficou demonstrada uma captação cerca de nove vezes maior em células em condições de hipóxia, quando comparada a normóxia. Outro estudo envolvendo o uso de vasoconstritores DMXAA e CA-4-P demonstrou um aumento da captação do [^{99m}Tc]Tc-HL91, expresso em porcentagem de atividade injetada por grama de tecido (%DI/g), de $0,41 \pm 0,04$ % para $1,44 \pm 0,04$ % e $1,25 \pm 0,06$ %, respectivamente para cada composto, enquanto o fluxo sanguíneo diminuiu de $1,58 \pm 0,07$ % para $0,25 \pm 0,04$ % e $0,21 \pm 0,04$ %, respectivamente, medido através do uso de ⁸⁶RbCl como agente de perfusão.¹³⁰

A comparação da captação do [^{99m}Tc]Tc-HL91 com o composto β -D-[¹²⁵I]azomicina galactopiranosídeo, um derivado nitroimidazólico, em tumores de carcinoma de próstata R3327-A inoculados em camundongos, apresentou correlação com $r = 0,78$. Todavia, os resultados obtidos com a utilização de eletrodos para mensurar a pressão de oxigênio, considerado método de referência, não foram concordantes com a taxa de captação dos compostos radiomarcados.¹³¹ Bi-Fan et al.¹³² estudaram a captação do complexo [^{99m}Tc]Tc-HL91 *in vitro* e *in vivo* em linhagens de células humanas (A549) e murina (LL2) de tumor de pulmão. Os resultados comprovaram a seletividade do complexo para as áreas de hipóxia, demonstrada por imagem de autorradiografia e imuno-histoquímica, e não se observou diferença significativa na captação entre as linhagens.

Com a ausência da função nitroimidazol, o mecanismo de captação do [^{99m}Tc]Tc-HL91 em regiões de hipóxia passou a ser investigado. Estudos utilizando ferramentas computacionais, propuseram que o complexo pode adotar tanto uma forma lipofílica mono-oxo (TcO^{3+}), quanto uma forma hidrofílica di-oxo (TcO_2^+), conforme apresentado na Figura 10, passando por outras formas intermediárias, processo mediado por moléculas de H₂O.¹³³

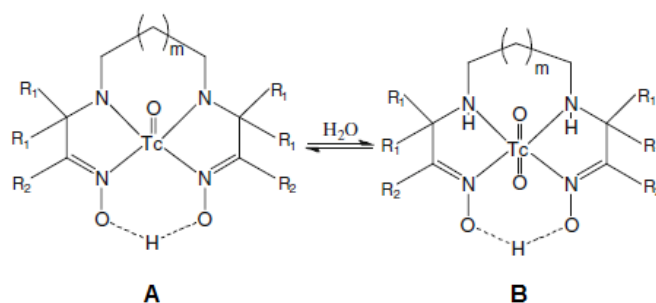


Figura 10. Mecanismo de interconversão mono-oxo/di-oxo do núcleo de tecnécio dos complexos aminoxima.¹³³

A hipótese sugere que a estrutura lipofílica permita a permeação da bicamada lipídica, e, uma vez no interior da célula, o processo de redução e conversão mediada pela diminuição da concentração de oxigênio, leve a estabilização da forma hidrofílica ou intermediários, que ficam retidos no interior das células.¹³³ A hipótese presume viabilidade da célula para ocorrer efetivamente, o que corrobora com a captação diferencial em tecidos hipóxicos (quiescentes), e tecidos necróticos.^{134; 135}

Quando comparado à [¹⁸F]fluorodeoxiglicose ([¹⁸F]FDG), traçador “padrão ouro” para detecção de tumores, o [^{99m}Tc]Tc-HL91 demonstrou *in vivo* a localização específica da maioria dos tumores malignos com razão tumoral/normal (T/N) satisfatória para visualização em imagens SPECT^{136, 137, 138}. Por se tratar de uma molécula de carga neutra e de pequeno tamanho, também penetra a BHE permitindo a localização de tumores do SNC. Comparado aos nitroimidazólicos [¹²³I]IAZA e [¹⁸F]FMISO, a relação de atividade tumoral/tecido normal (T/N) para o complexo de [^{99m}Tc]tecnécio foi superior aos compostos de [¹⁸F]flúor.¹²⁷

Embora a tecnologia SPECT apresente limitações de resolução espacial e quantificação maiores do que a PET, em equipamentos para uso clínico (Fig 8), o desenvolvimento do complexo organometálico ainda é de grande valia devido ao potencial de desenvolvimento do par teranóstico hipóxia-direcionado, pela marcação do ligante com os emissores β^- [¹⁸⁶Re]rênio (β^-_{Max} de 1.07 MeV e γ 0,155 MeV) ou [¹⁸⁸Re]rênio (β^-_{Max} de 2.12 MeV, 0,137 MeV e 155 keV) isótopos

do metal atualmente disponíveis no mercado ¹³⁹, o que forneceria uma elegante estratégia na superação da radioresistência devida à hipóxia.

8–12 mm	4–6 mm	1–2 mm	≤1 mm
Clinical SPECT	Clinical PET	Preclinical PET	Preclinical SPECT

Figura 11. Resolução espacial de equipamentos PET e SPECT para uso clínico e pré-clínico.¹⁴⁰

1.8 Imagem pré-clínica e pesquisa translacional

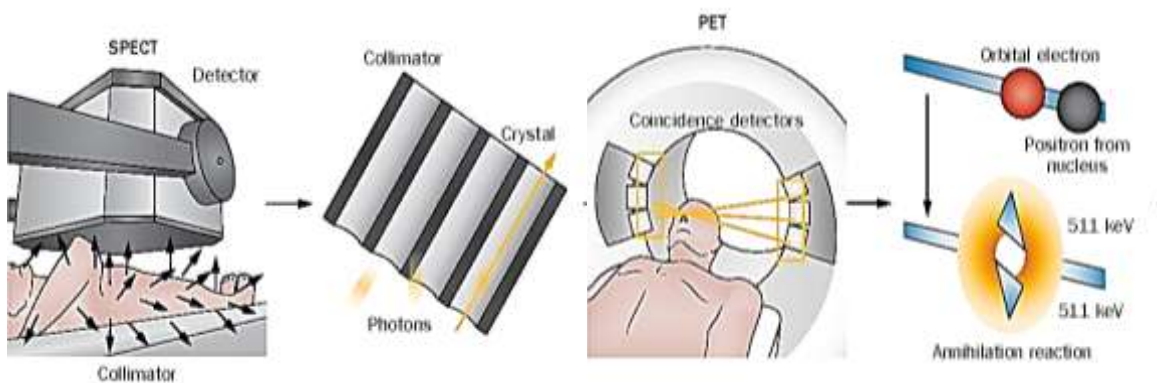
O registro de novos medicamentos passa por uma série de ensaios *in vitro* e *in vivo* na fase pré-clínica, e depois em ensaios clínicos divididos em 3 fases principais, que permitem obter dados de qualidade, eficácia e segurança dos novos medicamentos em estudo. ^{141, 142} Além disso, os próprios radiofármacos, que por muito tempo foram considerados produtos correlatos ao diagnóstico médico, atualmente estão incluídos na categoria de medicamentos, o que tornou obrigatória a realização de todos os testes exigidos para medicamentos, além de um estudo específico para radiofármacos, a dosimetria. ^{143, 144}

Nas últimas três décadas, os ensaios pré-clínicos ganharam uma importante ferramenta. Os equipamentos dedicados à imagem de pequenos animais, com resolução sub-milimétrica permitiram avaliar uma molécula, seja ela um candidato a fármaco, um biomarcador ou um novo radiofármaco utilizando seu similar radiomarcado para acompanhar seu comportamento *in vivo*. Houve também um aumento na disponibilidade de radionuclídeos, radioisótopos dos bioelementos, [¹¹C]carbono, [¹⁸F]flúor, [¹³N]nitrogênio e [¹⁵O]oxigênio, cujo decaimento por emissão de pósitron permite a radiosíntese e visualização clara e quase inalterada de moléculas análogas às endógenas. ^{145,146}

A imagem pré-clínica faz uma ponte entre as pesquisas básica e clínica, se tornando um importante aliado da indústria farmacêutica e uma ferramenta

fundamental para o progresso da medicina nuclear. Seu valor agregado é substancial pois permite monitorar a progressão de uma doença ou resposta a um tratamento de forma não invasiva, transversal ou longitudinal, qualitativa e quantitativa, gerando dados de alto nível de confiança com um menor número de indivíduos, o que também impacta na redução de tempo e custo, e corrobora com os princípios éticos de substituição, redução e de refinamento na experimentação animal (3R's).^{147, 148}

As principais técnicas em medicina nuclear são PET e SPECT. Embora ambas gerem imagens por detecção da radiação eletromagnética, apresentam grandes diferenças com relação à tecnologia, disponibilidade de radioisótopos, aplicabilidade da técnica, obtenção de dados quantitativos e qualitativos. Uma limitação das tomografias por emissão é a baixa resolução e perda dos detalhes anatômicos devido ao pequeno fluxo de fótons emitidos, limitação esta que foi superada pela criação de equipamentos multimodais, que permitem o corregristo e posterior fusão das tecnologias de imagem nuclear à imagens radiológicas de alta resolução como a tomografia ou ressonância magnética.¹⁴⁹ A imagem híbrida é uma ferramenta poderosa que fornece informações que não intangíveis por quaisquer modalidades isoladamente.¹⁵⁰



Com relação a natureza dos radioisótopos, são divididos em emissores de fóton (radiação gama, γ) e emissores de pósitron (β^+). Os emissores de pósitron conhecidos possuem meias vidas que vão de alguns minutos como o [^{15}O]oxigênio ($T_{1/2} = 2,07$ min), o [^{11}C]carbono ($T_{1/2} = 20,4$ min) até cerca de 2

horas como o [^{18}F]flúor ($T_{1/2} = 109,8$ min), emissor de pósitron mais amplamente utilizado no mundo devido ao advento do [^{18}F]FDG, cujo papel foi fundamental na difusão da tecnologia PET. ⁹² Outros emissores de pósitron com o [^{64}Cu]cobre, [^{89}Zr]zircônio e [^{52}Mn]manganês também tem sido utilizados em pesquisa e em diagnóstico, mas apresentam meia-vida física de 12,7 h, 3,3 e 5,59 dias, respectivamente e são utilizados para marcar anticorpos e nanopartículas. ¹⁵¹

Os emissores de fóton utilizados costumam ser metais de transição ou halogênios, com decaimentos por captura eletrônica, transição isomérica ou conversão interna, fótons de energias variadas e meia vida mais longa. Os mais comuns são [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]tecnécio ($\gamma = 140$ keV e $T_{1/2} 6,01\text{h}$), [^{111}In]Índio ($\gamma = 172$ e 245 keV e $T_{1/2} 2,8$ d), [^{123}I]Iodo ($\gamma = 159$ Kev e $T_{1/2} = 13,3\text{h}$), [^{201}Tl] ($\gamma = 35$ e 167 keV e $T_{1/2} = 73\text{h}$) [^{67}Ga]Gálio ($\gamma = 296$ e 388 keV e $T_{1/2} 78,3$ h). ¹⁵²

Estas modalidades de imagem molecular permitem observar o comportamento de um dado composto na fisiologia, metabolismo ou perfusão de um órgão ou sistema. Independentemente de sua natureza, fótons que atravessam o tecido biológico podem ser absorvidos e espalhados pela matéria. O coeficiente de atenuação é uma medida deste efeito onde há conversão de energia em calor e energia química; assim, quanto maior for o coeficiente de atenuação, maior será a probabilidade de fótons a serem absorvidos ou espalhados pelo meio. ¹⁵²

O tipo de decaimento do radionuclídeo empregado implica diretamente na técnica de aquisição de imagem utilizada e justificam a estrutura dos equipamentos. Equipamentos SPECT apresentam tipicamente 2 detectores em ângulo 180° , sobre os quais são utilizados colimadores de chumbo ou tungstênio. Os detectores são móveis e performam uma trajetória de 360° em torno de um paciente (eixo de rotação), adquirindo uma série de imagens planares em múltiplas projeções. Nesta técnica todo e qualquer evento captado pelo colimador será computado, e vai gerar uma linha de resposta ou LOR (do inglês, *line-of-response*), definida aqui como a extensão do orifício do colimador até a linha radial do FOV. ¹⁴⁸

Em equipamentos PET, os detectores estão dispostos em anel ao redor do FOV, para detecção das coincidências de aniquilação. Os critérios de

aceitação dos eventos presumem a detecção dos dois fótons de aniquilação em detectores opostos dentro de uma janela temporal e espacial de coincidência estabelecida entre 6 e 12 ns,¹⁵³ e uma linha de resposta que conecta um par de detectores em 180° com desvio máximo de $\pm 0,5^\circ$ e a energia depositada no cristal por ambos os fótons deve estar dentro da janela de energia selecionada (425 a 650 KeV). Ao satisfazer a estes critérios os eventos são aceitos e registrados como eventos imediatos (*prompt events*).¹⁵⁴ Nem todos os eventos aceitos são coincidências verdadeiras. Ocorrem coincidências aleatórias, onde fótons de aniquilações distintas e distantes alcançam o detector num período dentro da janela de coincidência; os eventos de espalhamento, quando um ou ambos os fótons detectados são provenientes de espalhamento Compton de um fóton de aniquilação detectados dentro da janela de coincidência.^{155, 156} Em ambos os casos há aumento no ruído da imagem por originam falsas LOR. Há também as coincidências mistas, onde um terceiro fóton é detectado dentro da janela de coincidência, como o sistema não é capaz de resolver a ambiguidade, o evento é descartado, levando a perdas na quantificação.¹⁵⁷ Ainda assim, imagens PET tem sensibilidade duas a três vezes maior do que imagens SPECT. Enquanto PET é amplamente aceito como um método de imagem quantitativa, este não é o caso do SPECT, mais afetado por efeitos de atenuação e dispersão.

Em ambas as modalidades, a reconstrução da imagem se baseia na retroprojeção, que corresponde ao processo de refazer o caminho dos fótons como se se voltasse no tempo, começando nos pontos de detecção e desenhando as linhas que unem os dois cristais que detectaram cada par de fóton. Como a origem da emissão é desconhecida, desenham-se todas as linhas e a partir da sua soma forma-se uma imagem, a retroprojeção simples, a qual não teria grande qualidade, mas permitiria de uma forma simples obter uma imagem da distribuição de radiotraçador. Os algoritmos de reconstrução analítica ainda hoje utilizam o mesmo processo para obtenção das imagens, apenas previamente aplicando uma filtração nas projeções, o que melhora a qualidade da imagem final.¹⁵⁸

A análise visual ou qualitativa da imagem permite identificar regiões de interesse onde houve hipocaptação ou hipercaptação do traçador tendo em mente o perfil farmacocinético do radiofármaco, sua captação normal e

disfuncional, premissas fisiopatológicas, pontos cegos e artefatos contribuem para a inferência do diagnóstico preciso.¹⁵⁹

A quantificação absoluta em termos de unidades de imagem em Bq / mL ou SUV (Standardized Uptake Value) é um parâmetro que representa a concentração do radiofármaco no respectivo tecido, é bastante usual em imagens PET, que, como mencionado, é considerada inerentemente quantitativa. Embora frequentemente seja sugerido que o SPECT não é uma modalidade quantitativa^{160, 161}, mais recentemente, a quantificação de imagens SPECT tornou-se mais comum devido as necessidades de terapia com radionuclídeos. A análise quantitativa de SPECT com [^{99m}Tc]MAA foi usada para determinar a razão Tumor/Normal em tumores hepáticos para o cálculo de dose por partição na Radioterapia Interna Seletiva com microesferas marcadas com [⁹⁰Y]Ítrio.¹⁶² Mais recente, o estudo semiquantitativo de imagens planares de traçadores bifosfonatos marcados com [^{99m}Tc]tecnécio para avaliação de amiloidose cardíaca baseado na captação cardíaca normalizada pela captação no pulmão contralateral, razão C/CL, com razões $\geq 1,5$ em 1 h classificadas como positivas.¹⁶³ A avaliação de métodos quantitativos comerciais para confirmação de síndromes neurodegenerativas com o traçador [¹²³I]-ioflupano.¹⁶⁴

Para a uma abordagem quantitativa da captação de um dado traçador no tecido, uma região de interesse (ROI) pode ser delineada manualmente nos limites da massa, e o número médio ou máximo de contagens na região pode ser medido. Neste caso a ROI é visualmente definida pelo observador seguindo o contorno anatômico fornecido pela imagem de CT.¹⁵⁷ Entretanto, como a abordagem é dependente do observador, o método é propenso a uma enorme variabilidade durante a delimitação da ROI por diferentes indivíduos.¹⁶⁵ Para eliminar a subjetividade é possível utilizar uma ROI de tamanho fixo compreendida completamente dentro dos limites do tumor, entretanto a proporção entre o tumor e a ROI impactam diretamente na quantificação.¹⁶⁶

SUV, mais frequentemente usado em PET, é o parâmetro semiquantitativo mais comumente usado na análise de imagens PET/CT com [¹⁸F]FDG na prática clínica. Surgiu como uma ferramenta para complementar a interpretação visual e refere a concentração radioativa em um volume de interesse baseada na normalização da dose injetada e massa corpórea do

paciente, entre outros fatores.¹⁶⁷ O parâmetro pode ser determinado em função dos valores máximo e médio de captação encontrados dentro do VOI ($SUV_{\text{máximo}}$ ou $SUV_{\text{médio}}$). No entanto, há uma clara preferência pelo $SUV_{\text{Máximo}}$, devido a uma menor interferência do efeito de volume parcial, mesmo com sua alta sensibilidade ao ruído. Todavia, deve ser observado que, mesmo na ausência de ruído, um único pixel não deve ser representativo para a captação em toda a extensão de um tumor não-homogêneo.^{166, 168, 169} Uma desvantagem desta abordagem é que a região pode depender do nível de ruído na imagem, visto que o valor medido de captação máxima é fortemente dependente do ruído. Este problema pode ser resolvido pelo refinamento da imagem (aplicação de filtros para redução de ruído) antes de se determinar o valor de captação máxima.¹⁷⁰

O efeito do volume parcial (EVP) é influenciado pela resolução espacial, amostragem da imagem, tamanho e forma do tumor, método da medida da concentração do radiofármaco no tumor¹⁶⁶. O EVP mistura o sinal vindo de pontos adjacentes o chamado *spill-over* e representa a contaminação cruzada total entre estruturas adjacentes com diferentes níveis de captação. Técnicas de compensação do EVP assumem que o registro tenha perfeitamente estático, o que pode ocorrer em estudos neurológicos, mas é improvável em imagens cardíacas ou oncológicas, uma vez que o processo de respiração do paciente (humano ou animal) causa movimentação principalmente na região torácica e, em alguma extensão, na região abdominal.^{170, 171}

O segundo fenômeno associado ao EPV se deve ao contorno da imagem, feita através de grades de vóxeis no contorno do volume de interesse. As dimensões e formato do vóxel, no entanto, não permitem um contorno perfeito do tecido, e quanto maior o tamanho do vóxel maior a probabilidade de que ele inclua dois ou mais tipos de tecido que, por fim, irão contribuir igualmente para ponderação do sinal atribuído ao vóxel. Para minimizar este efeito, deve se limitar o tamanho do vóxel, utilizando as menores dimensões, o que, de outro lado, contribui para um aumento do ruído estatístico. É importante notar que mesmo que o sistema tivesse a resolução espacial perfeita ainda haveria algum efeito de volume parcial devido à amostragem, o que vale para as imagens CT e RM.¹²² Vários métodos para correção do EVP foram propostos, como por exemplo, os métodos regionalmente aplicados, e métodos aplicados no nível dos

pixels da imagem, mas até o momento nenhum foi largamente aceito e utilizado.

166, 168, 170-172

2. Objetivos

2.1. Geral

Preparar os radiofármacos [^{99m}Tc]Tc-HL91 e [^{18}F]FAZA, e utilizá-los na detecção de hipóxia em modelo de tumor de mama da linhagem murina 4T1, sob condições normais ou com a utilização de losartana, como agente de normalização vascular, estabelecendo o período em que a normalização ocorre.

2.2. Específicos

- Preparar kits liofilizados contendo o ligante HL91 e excipientes, para permitir a rápida obtenção do radiofármaco [^{99m}Tc]Tc-HL91.
- Preparar o radiofármaco [^{18}F]FAZA, e avaliar métodos de purificação e controle de qualidade.
- Avaliar o efeito do uso do fármaco losartana na normalização vascular de tumores, com redução de áreas de hipóxia, determinado a partir de alteração de distribuição dos radiofármacos [^{99m}Tc]Tc-HL91 e [^{18}F]FAZA, e definição do período em que isso ocorre.
- Utilizar software de processamento de imagem para obtenção de dados qualitativos e quantitativos da biodistribuição dos radiofármacos nos animais e nos tumores.
- Utilizar as técnicas de autorradiografia, histoquímica e imuno-histoquímica para obter informação a nível tecidual do efeito da losartana sobre a estrutura tecidual e vascular dos tumores.

3. Material

3.1. Equipamentos:

Ativímetro (Capintec – EUA)

Balança analítica ATY-224 (Shimadzu, JPN)

Banho Maria

Centrífuga refrigerada 5804-R (Eppendorf, Merck KGaA, Darmstadt, GER)

Criostato CM 1850 (Leica Biosystems AG, GER)

Contador Gama automático (Hidex – LKB, GER)

Detector de radiação Radiomatic 610TR (Perkin-Elmer, EUA)

Estufa

Freezer - 80°C

HPLC Shimadzu 10VP (Shimadzu Corporatio, JPN)

Inalador de anestesia

Liofilizador de bancada Supermodulyo (Boc-Edwards, GBR)

Micro PET/SPECT/CT Triumph II (Gamma Medica, EUA)

Microscópio (Leica Camera, GER)

Microisoladores

Microscópio eletrônico EVOS M5000 (Thermo Fisher Scientific, EUA)

Placa fotoestimulável BAS-IP MS Storage Phosphor Screens (GE Healthcare, Nova York, EUA)

Software de análise estatística (GraphPad Prism)

Software de análise estatística (Minitab)

Software de pós processamento de imagem (Amide)

Software de pós processamento de imagem (Slicer)

Typhoon FLA 9500 (GE Life Sciences - Nova York, EUA)

3.2. Solventes e Reagentes:

Acetona PA (Sigma-Aldrich, Alemanha)

Acetonitrila anidra (Sigma-Aldrich, Alemanha)

Ácido clorídrico 37 %

Água ultrapuro grau 1 (ISO 3696:1987)

Anticorpo Anti-CD31 (Cell-Signaling, EUA)

Anticorpo Anti-HIF 1 α (Sigma-Aldrich, Alemanha)

Anticorpo Anti-pimonidazol (Hypoxiprobe™ -EUA)

Azul de Tripán

Bicarbonato de sódio

Cartucho Sep-Pak C18 (Watters, EUA)
Cartucho Sep-Pak QMA (Watters, EUA)
Carbonato de Potássio
Cloreto estanoso
Citrato de sódio
Lâminas para criostato (Thermo-Fisher)
Diaminobenzidina (DAB – Dako)
Dimetilsulfóxido (Sigma- Aldrich, Alemanha)
EDTA Dissódico
Eosina
Etanol absoluto
[¹⁸F]Fluoreto de sódio (CinRad – Instituto de Radiologia-HCFMUSP, Brasil)
[¹⁸F]Fluorodeoxiglicose (CinRad – Instituto de Radiologia-HCFMUSP, Brasil)
Fosfato de sódio dihidratado
Fosfato de sódio monohidratado
Hematoxilina
Hidróxido de Potássio (Synth)
Hidróxido de sódio (Synth)
Isoflurano
Kit de detecção IHC HRP / DAB (ABC) específico para coelho (ab64261 – Abcam, Reino Unido)
Kryptofix 2.2.2 (ABX,
Losartana potássica (Prati Donaduzzi, Brasil)
Leite em pó (Molico - Brasil)
Meio de cultura RPMI
Meio de montagem (Permount, Fisher)
Monitor de glicemia Accu-Chek (Roche Diabetes Care, Suíça)
Paraformaldeído
Placa de armazenamento fotoestimulável BAS-IP MS (GE Healthcare, Alemanha)
Pimonidazol (Sigma- Aldrich, Alemanha)
Peroxido de hidrogênio (Sigma- Aldrich, Alemanha)
Pimonidazol (Sigma- Aldrich, Alemanha)

Tartarato duplo de sódio e potássio

Tissuetek (Sakura)

Triton-X

Tripsina

Tris-HCl (Sigma- Aldrich, Alemanha)

Xilol

1-(2,3-diacetil-5-tosil- α -D-Arabinofuranosil) -2-nitroimidazol (β -Ac2- α -Ts-AZA
- Future Chem, ROK)

4. Métodos

4.1. Manutenção e bem estar dos animais

Camundongos fêmea Balb/c foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina – USP e mantidos no biotério de manutenção do Serviço de Medicina Nuclear – InRad, observando todas as condições de bem estar animal. Trata-se de uma instalação classificada como livre de patógenos específicos (SPF – *Specific Pathogen Free*) e, portanto, protegido por barreiras sanitárias rigorosas. Os microisoladores mantidos com uma densidade populacional máxima de 5 animais, eram acoplados a um sistema de troca de ar de 20 ciclos por hora. O regime de controle de luz seguiu o ciclo circadiano dos animais, com períodos de 12 horas de claro e escuro. Foi mantido fornecimento de ração estéril e água *ad libitum*. Resguardou-se período de aclimação de uma semana ao biotério experimental, e então, no dia do experimento, o fornecimento de alimento foi suspenso 3 horas, antes do seu início.

4.2. Preparação e caracterização dos traçadores

4.2.1. [^{99m}Tc]Tc-HL91

Conjunto de reativos liofilizados (kits) foram preparados dissolvendo 10 mg do ligante em 500 μ L de DMSO, seguido da adição de 2 mL de solução de

tartarato duplo de sódio e potássio (10 mg/L) e da solução de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,04 mg dissolvido em 25 μL de HCl concentrado e 10 mL de água purificada previamente nitrogenada por 30 minutos. O pH da solução foi medido o produto foi filtrado em filtro Millex-GV de 0,22 μm e fracionado em frascos tipos penicilina em volume de 1 mL, para uma formulação final contendo 1 mg do ligante, 0,4 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 2 μg de tartarato. A solução foi congelada em nitrogênio líquido, os frascos foram transferidos para o liofilizador permanecendo à pressão de 10-1 mmHg por 24 horas. Por fim os frascos foram selados a vácuo e mantidos sob refrigeração de 2 a 8° C até o momento da marcação.

O complexo $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HL91}$ foi obtido pela reconstituição do kit liofilizado através da adição de solução estéril de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ obtida por eluição de gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ produzido pelo IPEN, com atividade de 555-740 MBq e avolumada com 1,5 mL de tampão carbonato (pH 8,5).¹⁷³

Após período de incubação de 15 minutos, o produto foi submetido a controle de qualidade radioquímico por cromatografia ascendente com papel Whatman 1Chr e água ($([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ e $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HL9}$ $R_f = 0,9-1$) e ITLC-SG e solução salina ($[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_2$ e $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HL9}$ $R_f = 0-1$)¹³⁰. O sistema permitiu a determinação do percentual de impurezas e a pureza radioquímica do traçador foi determinada pela equação $PRQ(\%) = 100\% - ([^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^- \% + [^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_2 \%)$. Preconizou-se um limiar de 95% de PRQ para a administração do radiofármaco nos animais em consonância aos parâmetros estabelecidos nas monografias de diferentes radiofármacos na farmacopeia europeia.¹⁷⁴

4.2.2. $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$

A radiossíntese do traçador $[^{18}\text{F}]\text{fluoro-azomicina-arabinosídeo}$ ($[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$) se deu pela reação do precursor 1-(2,3-diacetil-5-tosil- α -D-Arabinofuranosil)-2-nitroimidazol (β -Ac₂- α -Ts-AZA - Future Chem, ROK) e íon $[^{18}\text{F}]\text{fluoreto}$, produzido na Unidade de Cíclotron do complexo HCFMUSP (CinRad). O protocolo de síntese foi adaptado às condições do laboratório a partir do método descrito por Reischel et al.¹⁷⁵

Aproximadamente 370 MBq de ácido [¹⁸F]fluorídrico em 2 mL de H₂O foram percolados por cartucho de troca iônica Sep-Pak QMA light previamente condicionado com 10 mL de bicarbonato de sódio 0,1 M, 10 mL de água Mili-Q e 5 mL de acetonitrila. O íon [¹⁸F]fluoreto retido no cartucho foi então eluído com a solução de acetonitrila: água (9:1), contendo 3,5 mg de K₂CO₃ e 15 mg de Kryptofix 2.2.2., recolhido em frasco de fundo cônico, e submetido a aquecimento a 60° C sob fluxo de gás nitrogênio para evaporação do solvente. Uma vez seco, o sólido foi dissolvido em 1 mL de acetonitrila anidra e o solvente foi evaporado, a 120° C (o processo foi repetido mais duas vezes). O sólido formado foi dissolvido em 1 mL de acetonitrila anidra contendo 5 mg do precursor β-Ac₂-α-Ts-AZA. A mistura reacional foi aquecida a 100° C por 5 min. A solução foi resfriada a temperatura ambiente e então foi adicionado 1 mL de hidróxido de potássio 0,4 M e após 2 minutos foi adicionado 0,5 mL de tampão fosfato 0,5 M. Finalmente a solução foi filtrada em cartucho Sep-Pak Alumina light preconditionado com 10 mL de água purificada. O rendimento radioquímico foi determinado pelo percentual de atividade radioativa no filtrado e cartucho.

O produto foi purificado por HPLC em coluna semi-preparativa C18 tipo fase reversa Synergi Hydro-RP 80A de 250 x 10 mm, eluída com fase móvel 5:95 v/v etanol: NaH₂PO₄ 10 mM, em fluxo de 4 mL/min. As frações de 0,5 mL foram coletadas em calibrador de dose. Aquelas que apresentaram maior atividade foram analisadas por HPLC em coluna analítica C18 tipo fase reversa Synergi Hydro-RP 80A de 250 x 4,6 mm, segundo o mesmo protocolo, a exceção do fluxo de 1 mL/min.¹⁷⁵

4.3. Estudos biológicos *in vivo*

4.3.1. Cultivo da linhagem de células tumorais

Células da linhagem de carcinoma mamário murino 4T1 foram cedidas pelo Centro de Pesquisa Translacional em Oncologia (LIM-24). Os criotubos foram descongelados em banho maria a 37°C. Para remoção do meio de

congelamento, o conteúdo do frasco foi transferido para um tubo tipo falcon com meio aquecido a mesma temperatura e então centrifugados a 1200 G por 5 min. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e vertidas em garrafas de cultura de 75 mm³ que foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% CO₂ até adequada amplificação da cultura.

Após a terceira passagem, as células foram submetidas a avaliação de viabilidade celular por exclusão por coloração com azul de Tripán e contagem das células refringentes em câmara de Neubauer. Constatada a viabilidade celular, as células foram então centrifugadas e ressuspensas para uma concentração de 5x10⁴ células em 100 µL de meio suplementado.

4.4. Aloenxerto ortotópico de tumor de mama e protocolo de tratamento

Foram utilizados 48 camundongos BALB/c SPF, fêmeas, jovens, com aproximadamente 8 semanas de vida, pesando entre 15 e 21 g. Para a realização do procedimento, os animais foram sedados em câmara de anestesia inalatória, preenchida com atmosfera composta por isoflurano a 3% por volume de oxigênio. Cem microlitros de uma solução contendo 5x10⁴ células em meio de cultura foram inoculados diretamente no *fat pad* mamário da primeira mama cervical direita de camundongos BALB /c. ¹⁷⁶



Figura 12. Inoculação ortotópica da linhagem de células de tumor de mama 4T1.

Os animais foram divididos aleatoriamente em 2 grupos, controle e tratado, com 24 animais por grupo. Três dias após a inoculação de células tumorais, foi iniciado o protocolo de tratamento, com administração por gavagem oral de solução hidro alcóolica (5 %) de losartana potássica (40 mg/Kg) por um período de 9 dias, enquanto o grupo controle recebeu volume equivalente do veículo pela mesma via de administração. A progressão tumoral foi acompanhada e quando os tumores se tornaram mensuráveis, passaram a ser medidos, com auxílio de um paquímetro, até a eutanásia dos animais.

4.5. Administração do marcador de hipóxia para análise *ex vivo*

Como padrão interno, utilizou-se o marcador pimonidazol, referido como “padrão ouro” na coloração imuno-histoquímica de regiões hipóxica de tumores biopsiados. O marcador foi adquirido do kit comercial fornecido pela empresa Hypoxiprobe™ (*Natural Pharmacia International, Inc. (NPI), Massachusetts, EUA*) e administrado segundo o protocolo recomendado. O ativo foi dissolvido em solução de DMSO em salina a 10% e administrado por injeção intraperitoneal para uma dose de 60 mg/ kg uma hora antes da eutanásia dos animais.

4.6. Imagens PET, SPECT e CT

4.6.1. Administração do radiotraçadores

Após 9 dias de tratamento com losartana, um subgrupo de animais controle e tratado foi submetido a aquisição de imagens PET/CT com o traçador de metabolismo glicolítico [^{18}F]FDG (n=12). No 10^o dia de tratamento os animais foram anestesiados com isoflurano a 3 % por volume de ar sintético e aquecidos a 37°C por manta térmica. Os radiotraçadores foram administrados por via endovenosa (veia caudal) com atividade de cerca de 37 MBq (1 mCi) em volume de 100 μL . Foi respeitado um período de biodistribuição de 2 horas para os traçadores [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-HL91 e [^{18}F]FAZA e 45 minutos para a [^{18}F]FDG, e as imagens de SPECT/CT (item **Erro! Fonte de referência não encontrada.**, n=18) ou PET/CT (item 4.2.2, n=15). Durante todo o procedimento os animais foram mantidos sob anestesia com isoflurano a 3 % por volume de ar sintético.

4.6.2. Protocolos de aquisição

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre a maca aquecida no equipamento *TriFoil Triumph Trimodality* (PET/SPECT/CT) dedicado a pequenos animais, sendo a anestesia mantida até a finalização do exame com o auxílio de uma máscara inalatória acoplada ao equipamento.

Para aquisição das imagens SPECT utilizou-se colimador de alta resolução *multipinhole* N5F75A10 com abertura de 5 furos de 1 mm cada. O protocolo de aquisição compreendeu 32 projeções de 90 segundos por imagem em rotação de 180° por detector e tempo médio de aquisição de 50 minutos. A seguir realizou-se um protocolo de 1,07 min de aquisição de 256 projeções de imagens CT com magnificação de 1,3x e FOV (*Field of View*) de 91,08 mm para corregristo das informações anatômicas dos animais.

O protocolo de aquisição das imagens PET compreendeu uma única posição de *bed* de 30 minutos com FOV de 46 mm. Antecedendo as imagens PET foi procedido protocolo de 1,07 min de aquisição de 256 projeções de

imagens CT com magnificação de 1,3x para correção das informações anatômicas dos animais.

4.6.3. Reconstrução e processamento de imagem

As imagens foram reconstruídas em software próprio do equipamento (Unified Console- UC, TriFoil Imaging – EUA), empregando o método OSEM-3D (*ordered subsets expectation maximization*) com 20 iterações e 5 subconjuntos para as imagens PET e 5 iterações e 8 subconjuntos para as imagens SPECT, e, as tomografias computadorizadas, reconstruídas por retroprojeção filtrada (FBP – *filtered back projection*).

As imagens PET e SPECT foram fusionadas com suas respectivas imagens de CT. O processamento utilizou as ferramentas de desenho do software de domínio público 3D Slicer (*Brigham and Women's Hospital/ Harvard Medical School*) para contorno manual dos volumes de interesse (VOI – do inglês: *volume of interest*) do tumor total e suas zonas de hiper e hipocaptação. Uma vez determinados, os VOI foram convertidos no formato DICOM e exportados para o software de imagem pré-clínica AMIDE (*Free Software – UCLA/ Stanford University*) para obtenção de dados estatísticos.

4.6.4. Segmentação dos volumes de interesse

Sobre as imagens fusionadas foram desenhadas manualmente regiões de interesse (ROI – do inglês: *region of interest*) em cada corte da imagem tomográfica dando origem aos volumes de interesse sobre a massa tumoral e diferentes tecidos ou órgãos selecionados como parâmetro normal ou sadio: TUMOR (T): volume total do tumor; MÚSCULO (M): cuja padronização se deu pela média da captação de três VOI elipsoides independentes de mesma medida – I) região dorsal esquerda, II) região proximal da pata dianteira ipsilateral, III) região proximal da pata dianteira contralateral ao tumor; PULMÃO (P): VOI compreendendo o órgão inteiro; CÉREBRO (C): VOI compreendendo o órgão inteiro; MAMA CONTRALATERAL (CL): VOI elipsoide de 2,5 mm³ compreendendo a região da mama sadia; POOL SANGUÍNEO (S): *pool* cardíaco

caracterizado por VOI elipsoide de 5 mm³ na região do coração e processo aórtico; FÍGADO (F): VOI compreendendo o órgão inteiro.

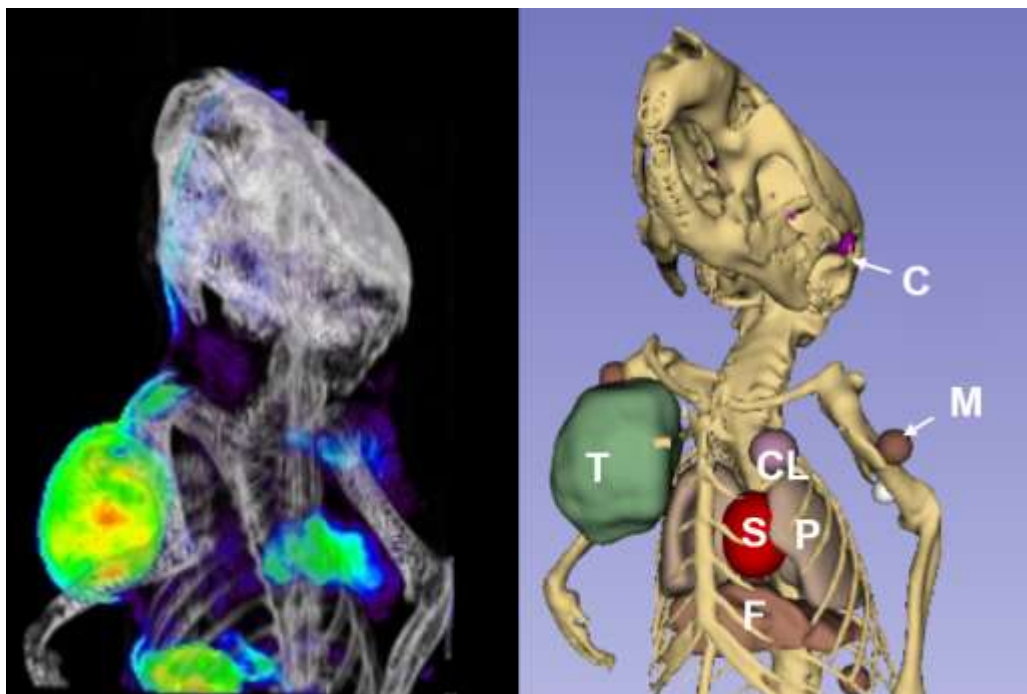


Figura 13. Esquerda: renderização da imagem fusionada PET/CT. Direita: Reconstrução tridimensional dos volumes de interesse: C- Cérebro (Em rosa forte delimitado pelo espaço intracraniano); M - Músculo (três VOI elipsoides de mesma cor), CL - Mama Contra Lateral, T – tumor propriamente dito, S – Pool Sanguíneo, P – Pulmão, F – Fígado.

4.6.5. Segmentação por intensidade de captação

A delimitação de regiões tumorais por intensidade de captação seguiu em duas etapas: o VOI definido para cada tumor foi empregado como *template* para normalização das imagens funcionais, substituindo por zero os valores de captação na vizinhança e preservando a matriz contida na região delimitada pela máscara, de modo a facilitar a visualização de mínimos e máximos dentro da massa tumoral (Figura 2 - C).

Para minimizar o viés observacional foi mantida a escala de cor gerada automaticamente pelo software para as imagens funcionais (Figura 2 - E) e estratificada para a obtenção dos seguimentos: HIPERCAPTANTE (H): regiões compreendidas do vermelho ao amarelo; NORMOCAPTANTE (N): regiões compreendidas do verde ao azul claro. HIPOCAPTANTE (H): regiões delimitadas do marinho ao negro.

A partir destes VOI foram extraídos dados numéricos do volume descrito em milímetros cúbicos (mm^3), CAPTAÇÃO MÉDIA - definida pela média das contagens no conjunto de vóxeis componentes do VOI e CAPTAÇÃO MÁXIMA - definida pela contagem do vóxel de maior valor dentre o conjunto de vóxeis componentes do VOI. A seguir estes valores foram utilizados para quantificação relativa, sendo a relação Tumor/Músculo o principal parâmetro observado.

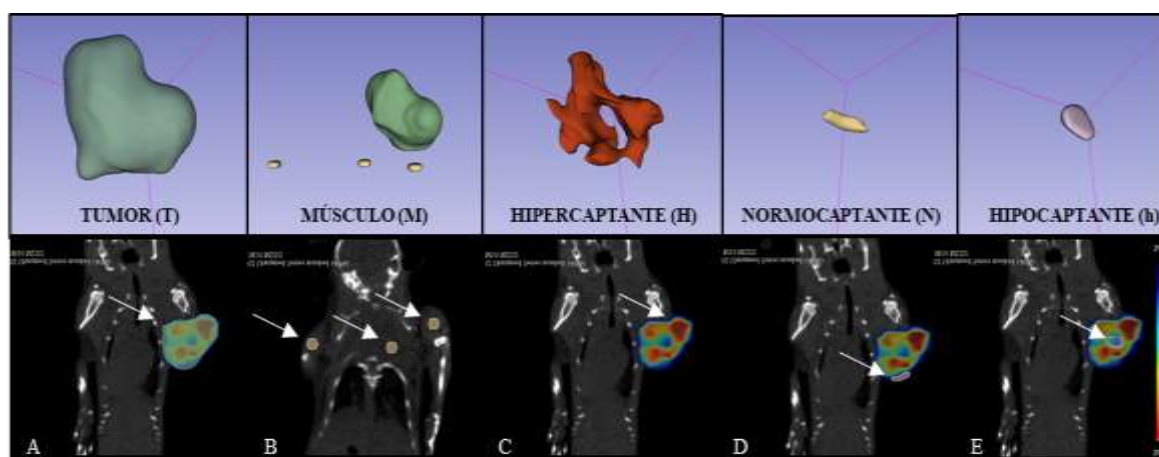


Figura 14 - Na linha superior representações tridimensionais dos VOI gerados pela soma das ROI manuais. Na inferior, corte coronal da imagem multimodais localizando as ROI adquiridas; A - volume tumoral total em verde, B - disposição das 3 ROI musculares independentes em amarelo, C - região de hipercaptação do radiofármaco em vermelho D - região de captação intermediária em amarelo, E - região de hipocaptação.

4.7. Ensaios *ex vivo*

Os tumores excisados dos animais imageados foram pesados e divididos em três partes. A primeira foi pesada e imediatamente submetida a contagem para o ensaio de biodistribuição *ex vivo* (item 4.7.1). A segunda, incorporada em meio O.C.T. (Tissue-tek, Sakura Finetek, JPN), congelada e cortada em criostato para análise por autorradiografia e imuno-histoquímica. A terceira, fixada em

solução de paraformaldeído a 4 %, por 24 horas, seguida de etanol absoluto, por 24 horas, para posterior inclusão em parafina, processamento e coloração com hematoxilina e eosina (realizado no laboratório de patologia do CTO/ICESP).

4.7.1. Biodistribuição *ex vivo*

Após a aquisição das imagens os animais, ainda anestesiados, foram eutanasiados por excisão cardíaca, para análise da biodistribuição *ex vivo*. Foram coletados integralmente o cérebro, tireoide, coração, pulmões, estômago, baço, fígado, vesícula biliar, rins, bexiga, tumor e amostras do intestino grosso, intestino delgado, músculo, osso, sangue e urina. Após a coleta e pesagem em balança analítica, a atividade em cada órgão foi aferida em contador de cintilação *Hidex Automatic Gamma Counter* (Hidex Oy, FIN) para posterior análise proporcional. Os pesos e contagens da atividade radioativa para cada órgão foram correlacionados para fornecer uma estimativa da biodistribuição do radiofármaco no organismo do modelo. Para tanto foi utilizada Taxa de Captação expressa pelo coeficiente percentual de dose injetada por grama de órgão (%DI/g).

4.7.2. Análise histológica

4.7.2.1. Avaliação das zonas de hipóxia tumoral por autorradiografia

Após a eutanásia dos animais, os tumores foram retirados e processados em criostato em cortes com espessura de 40 µm dispostos sobre lâminas de microscopia. As lâminas foram expostas *overnight* a uma placa de armazenamento fotoestimulável (*BAS-IP MS Storage Phosphor Screens*, GE Healthcare, GER). Após a exposição, a placa foi escaneada em equipamento dedicado (*Typhoon FLA 9500* - GE Healthcare, GER). O sinal gerado foi processado em autorradiografias com pixels de 25 µm submetidas a análise

qualitativa e semi-quantitativa com auxílio do software de processamento de imagem domínio público ImageJ (NIH, EUA).

4.7.2.2. Análise Imuno-histoquímica

4.7.2.2.1. Coloração imuno-histoquímica das regiões de hipóxia

Todos os animais receberam injeção intraperitoneal do marcador exógeno de hipóxia, pimonidazol (Hypoxyprobe™ Omnikit, EUA), na dose de 60 mg/kg, uma hora antes da eutanásia para adequada biodistribuição do traçador. Cortes em espessura de 5 µm provenientes das seções dos tumores emblocadas em parafina foram submetidos a coloração imuno-histoquímica com anticorpo anti-pimonidazol e auxílio do Kit de detecção IHC HRP/DAB (ABC) específico para coelho (Abcam, Reino Unido) segundo protocolo do fabricante.

As lâminas foram mantidas em estufa a 60° C por uma hora para iniciar a desparafinação, a seguir lavadas em xilol e imersas em soluções hidroalcoólicas com concentrações crescentes de água para reidratação dos cortes. Em seguida foi procedida a inibição da peroxidase endógena por incubação dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol durante 10 minutos.

A recuperação antigênica se deu por imersão dos cortes em tampão citrato 1M (pH 6,0) e aquecimento em banho maria a 95° C pelo período de 20 minutos. Os cortes foram cobertos com solução de leite em pó Molico® (5% em PBS contendo triton-X à 1%) durante 1 hora para bloqueio de ligações inespecíficas. Então as lâminas foram finalmente cobertas com anticorpo primário de coelho (Rabbit antisera- Hypoxyprobe™ Omnikit, EUA) em diluição de 1:50, e incubados *overnight* em câmara fria (2-8° C).

Após a lavagem dos cortes com PBS para remoção do excesso de anticorpo primário, os cortes foram expostos ao anticorpo secundário biotilado anti-coelho, produzido em cabra (Biotinilated Goat polivalent – Abcam), durante 10 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados e incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase (Abcam) por 10 min em temperatura

ambiente e finalmente corados com diaminobenzidina (DAB) pelo tempo médio de 1 minuto e 50 segundos. Os cortes foram contra corados com hematoxilina por 45 segundos.

4.7.2.3. Coloração imuno-histoquímica de células endoteliais

Cortes tumorais parafinizados de 5 µm foram submetidos a coloração imuno-histoquímica com anticorpo primário de coelho anti-CD31 e coloração com o Kit de detecção IHC HRP / DAB (ABC) específico para coelho (ab64261 – Abcam, Reino Unido) segundo o protocolo do fabricante.

As lâminas foram mantidas em estufa a 60° C por uma hora para iniciar a desparafinação, a seguir lavadas em xilol e imersas em soluções hidroalcoólicas com concentrações crescentes de água para reidratação dos cortes. Em seguida foi procedida a inibição da peroxidase endógena por cobertura dos cortes com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol durante 10 minutos. A recuperação antigênica se deu por imersão dos cortes em tampão tris-EDTA 1M (pH 9,0) e aquecimento em banho maria a 100° C pelo período de 20 minutos. Os cortes foram cobertos com solução de leite em pó Molico® (5% em PBS contendo triton-X à 1%) durante 1 hora para bloqueio de ligações inespecíficas. Então as lâminas foram finalmente cobertas com anticorpo primário de coelho (CD31 (PECAM-1) (D8V9E) XP® Rabbit mAb – Cell Signaling Technology, EUA) em diluição de 1:20, e incubados *overnight* em câmara fria (2-8° C). Após a lavagem dos cortes com PBS para remoção do excesso de anticorpo primário, os cortes foram expostos ao anticorpo secundário biotilado anti-coelho, produzido em cabra (Biotinilated Goat polivalent – Abcam), durante 10 minutos em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados e incubados com o complexo estreptoavidina peroxidase (Abcam) por 10 minutos em temperatura ambiente e finalmente corados com diaminobenzidina (DAB) pelo tempo médio de 1 minuto e 50 segundos. Os cortes foram contra corados com hematoxilina por 45 segundos.

4.7.5. Coloração hematoxilina-eosina

A coloração hematoxilina-eosina foi realizada no laboratório de patologia do CTO-ICESP segundo protocolo padrão do serviço. A saber: após a desparafinação em xilol, as lâminas foram reidratadas por imersão em soluções de etanol com concentrações sucessivas de água por 5 minutos e então submersas em água corrente por 4 minutos. A coloração com hematoxilina de Harris se deu por imersão na solução por 10 minutos seguida de lavagem em água corrente por 10 minutos e água amoniacal 0,5% por 30 segundos seguida de nova lavagem em água corrente por mais 10 minutos. A cuba foi preenchida com eosina pelo período de 45 segundos e lavada abundantemente em água corrente por mais 10 minutos. Então as lâminas foram submetidas a desidratação em solução alcóolica de 70-100% em concentrações progressivas, xilol e montagem. As imagens dos cortes foram obtidas com auxílio do microscópio eletrônico EVOS® FL5000 Auto Imaging System.

4.8. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do software Minitab™ (Minitab Inc, EUA). Para avaliar a aderência à curva normal utilizou o teste Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade de variâncias foi testada pelo teste de Levenne. As diferenças entre as médias foram testadas pelo teste T de Student ou Teste U de Mann-Whitney enquanto comparações múltiplas foram feitas por ANOVA ou Kruskal-Wallis, a depender da distribuição. Para confirmação da inferência estatística foi utilizada a abordagem do intervalo de confiança da diferença, ou teste exato de Tukey.

5. Resultados e discussão

5.1. Obtenção do traçador [^{99m}Tc]Tc-HL91

O [^{99m}Tc]Tc-HL91 foi obtido através de kits liofilizados desenvolvidos no laboratório. Em trabalho prévio (sua monografia), foi desenvolvido as condições

para a preparação do kit liofilizado. Marcações foram realizadas utilizando solução de $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ não eluída a mais que 2 h, de gerador eluído previamente a no máximo 24 horas. Essa condição foi primordial para obtenção de eficiência de marcação superior a 95 %. Nessa condição foi possível a marcação com atividade de até 20 mCi. O perfil cromatográfico de uma das análises está demonstrado na figura 15.

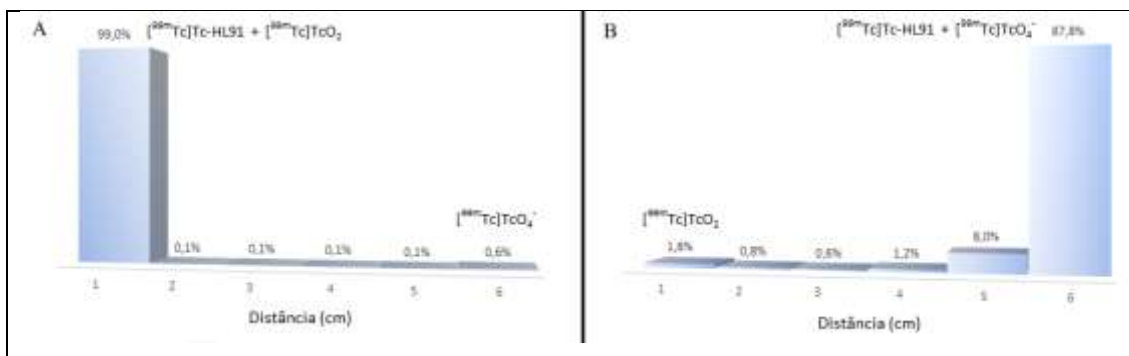


Figura 15. Representação do perfil cromatográfico das espécies $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HL91}$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$, $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$, nos sistemas cromatográficos: A) TLC-SG/NaCl 0,9 % e B) W4/H₂O

5.2. Obtenção do traçador $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$

O radiotraçador $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ apresentou rendimento de marcação de 27 % (não corrigido para o decaimento) e pureza radioquímica maior que 94 %, após purificação em coluna preparativa.

Na Figura 16 B é apresentado um radiocromatograma da análise da pureza após a purificação, com o $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ apresentando tempo de retenção de 15,5 min, condizente com o tempo de retenção observado para uma amostra de padrão não radioativo (Figura 16 A). Devido a problemas no detector de UV, foi recuperado uma cromatograma realizado em outra oportunidade.

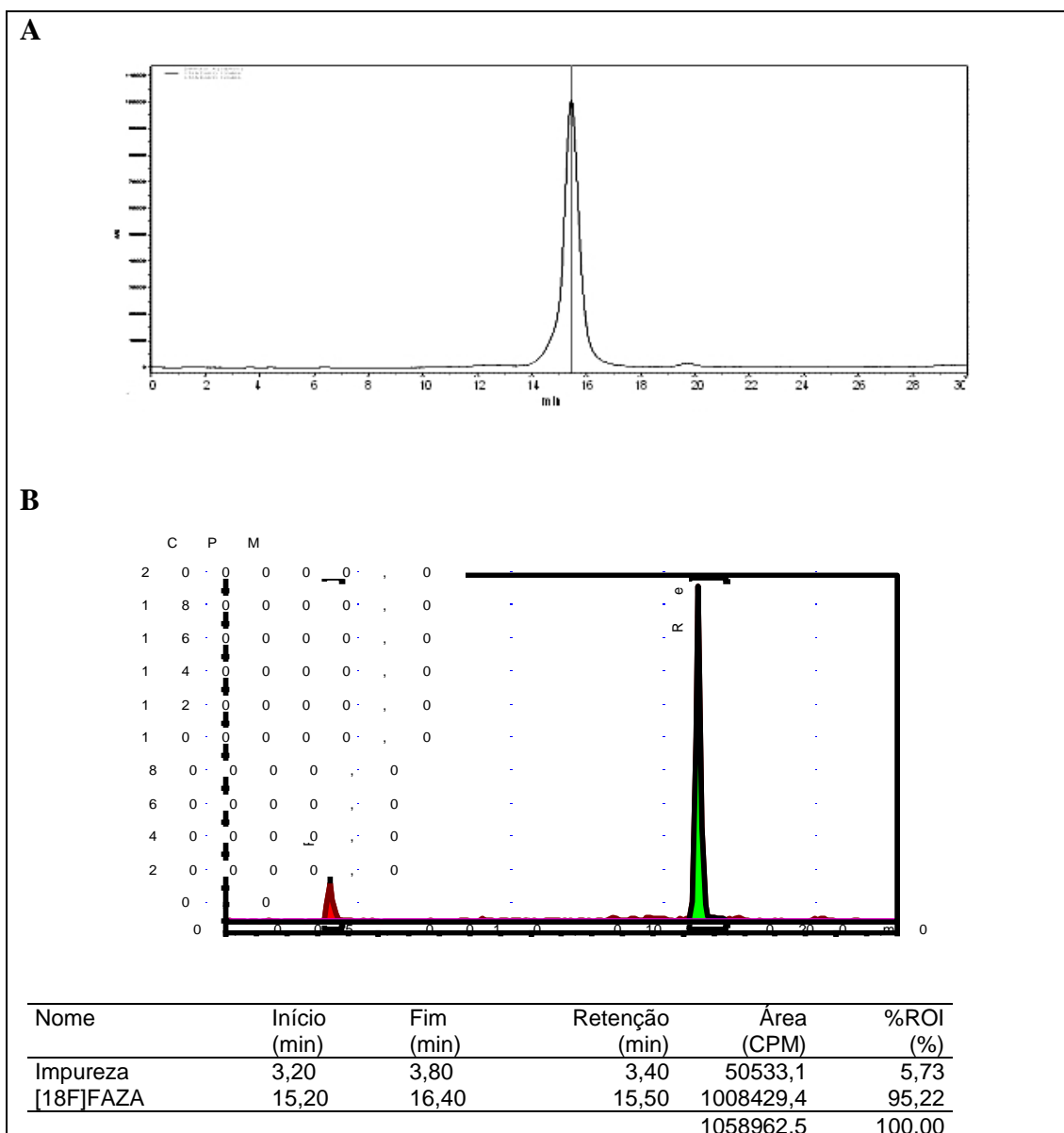


Figura 16. Representação do perfil cromatográfico do; (A) padrão de [^{19}F]FAZA determinado em detector de UV a 220 nm, (B) do composto radiomarcado [^{18}F]FAZA.

5.3. Acompanhamento da progressão tumoral

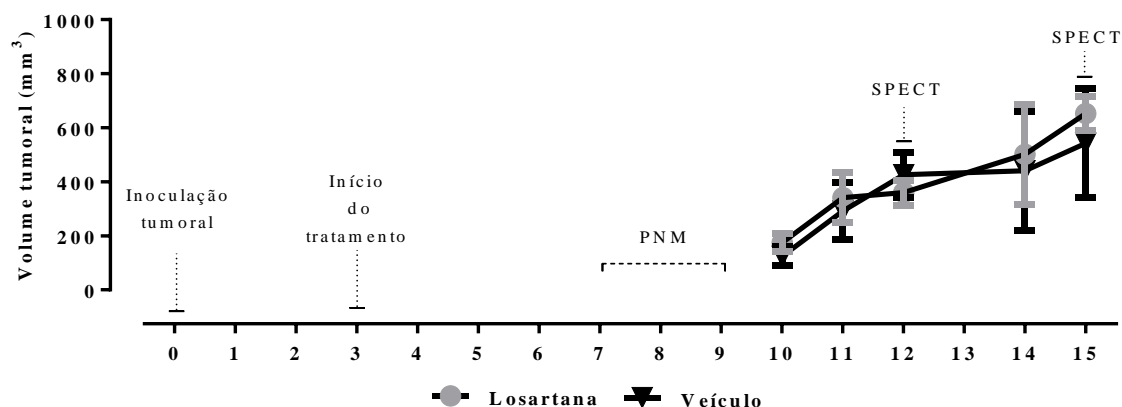


Figura 15. Linha temporal e curva de crescimento de tumores de mama 4T1 de fêmeas tratadas e não tratadas com losartana pelo período de 15 dias. (n = 5 animais por grupo).

A progressão tumoral foi acompanhada ao longo do tratamento e medidas foram tomadas com um paquímetro a partir do momento que as massas tumorais se tornaram mensuráveis, a partir do 10º dia após a inoculação. A curva de crescimento do tumor não foi afetada pela farmacoterapia (Figura 15). Houve grande variação nos volumes tumorais dentro dos grupos controle e tratado (Figura 13 – A e C) e apenas 3 dos animais não apresentaram qualquer desenvolvimento tumoral, sendo que em 2 deles foram encontrados abscessos no local da inoculação.

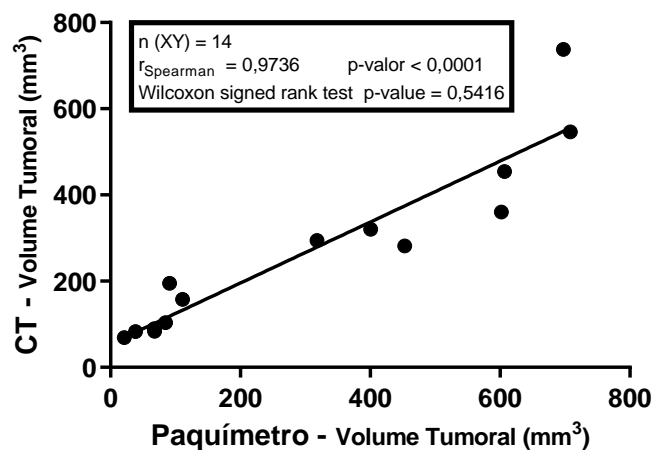


Figura 16. Gráfico da estimativa de correlação entre os dados dos volumes tumorais obtidos por aferição com paquímetro e contorno da massa tumoral sobre a imagem de CT.

Não foram demonstradas diferenças significativas entre as médias dos valores de massa tumoral coletados para cada grupo após a eutanásia (Figura 17- B) ou de volume tumoral determinado por tomografia computadorizada (Figura 17. Efeito do losartana sobre tumores de mama 4T1 de animais Balb/c fêmeas. Os animais foram tratados por gavagem a partir do 3º dia após a inoculação de células durante 7 dias. Losartana: 10mg/kg em 100 µL de solução hidroalcoólica (5%). Veículo: 100 µL de solução hidroalcoólica (5%). A- Volume tumoral (mm³) obtido por tomografia computadorizada. B – Massa tumoral aferida em balança analítica imediatamente após a dissecação. Comparação entre as médias por teste T de Student. Dados apresentados como média e desvio padrão. C – Painel com registro fotográfico dos tumores logo após a dissecação.

- C), o que está em consonância com os dados apresentados na literatura para o modelo e protocolo de tratamento adotados ⁸¹.

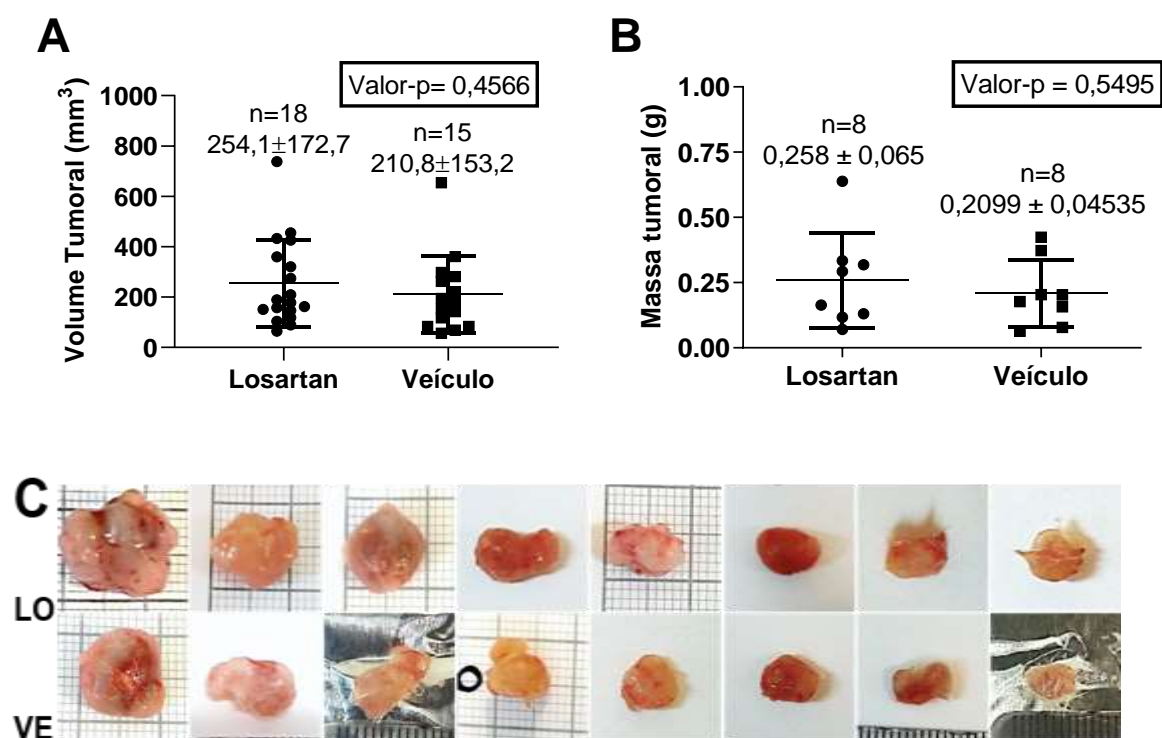


Figura 17. Efeito do losartana sobre tumores de mama 4T1 de animais Balb/c fêmeas. Os animais foram tratados por gavagem a partir do 3º dia após a inoculação de células durante 7 dias. Losartana: 10mg/kg em 100 µL de solução hidroalcoólica (5%). Veículo: 100 µL de solução hidroalcoólica (5%). A- Volume tumoral (mm³) obtido por tomografia computadorizada. B – Massa tumoral aferida em balança analítica imediatamente após a dissecação. Comparação entre as médias por teste T de Student. Dados apresentados como média e desvio padrão. C – Painel com registro fotográfico dos tumores logo após a dissecação.

Foram encontrados relatos na literatura atestando a influência do bloqueio AT1 sobre o crescimento tumoral e metástase, entretanto, os trabalhos referem a administração de doses muito superiores de losartana em modelos tumorais diferentes do empregado neste estudo ^{55, 64}.

5.4. Análise histopatológica

A análise histológica por coloração com hematoxilina e eosina evidenciou em ambos os grupos tumores anaplásicos e sem a arquitetura característica do parênquima saudável. Na maior extensão dos tumores é encontrado um padrão de celularidade elevada em arranjo sólido e homogêneo. Em sua maioria, as células se assemelham a células do epitélio ductal, são pequenas com núcleos grandes e hipercondensados, mas vesiculosos, o citoplasma é escasso e de limites imprecisos, porém, estão arranjadas em arquitetura difusa.

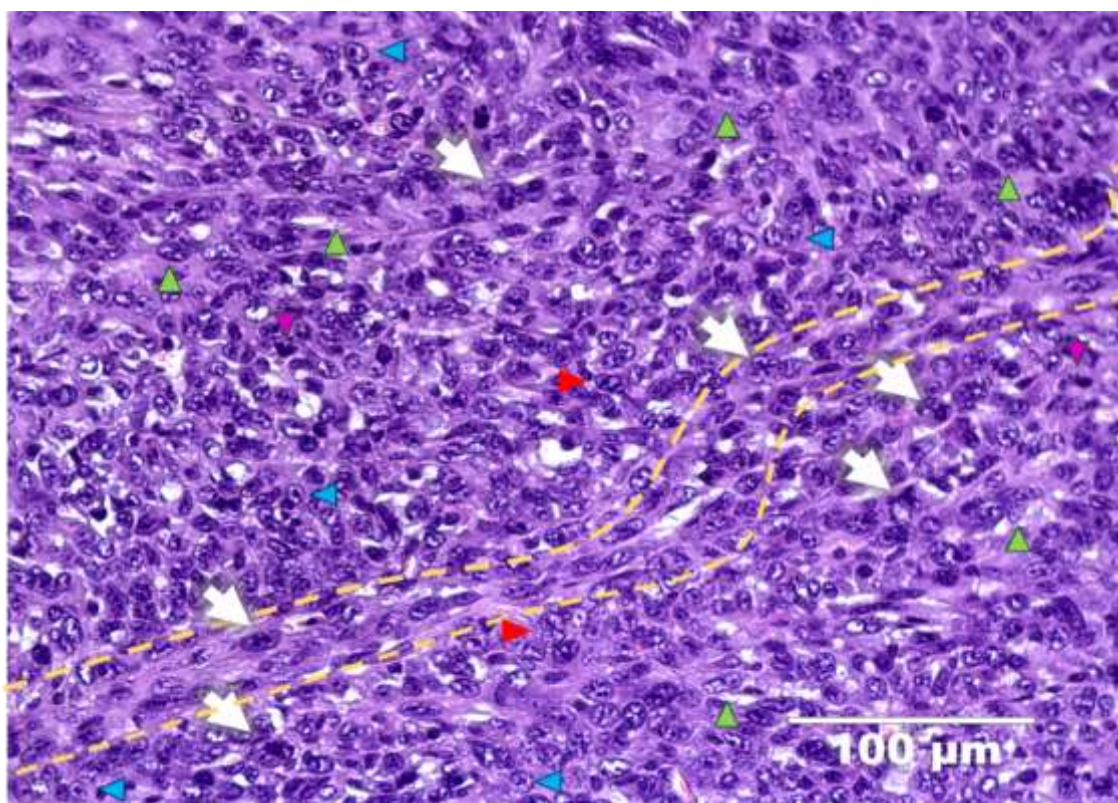


Figura 18. Imagem representativa do tecido neoplásico viável caracterizada por células em diferentes estágios do ciclo celular (prófase, seta verde; anáfase, seta rosa; telófase, seta vermelha), atipias celulares (setas brancas) e mitóticas. A linha amarela destaca região desmoplásica.

Nesta região são vistas células em diferentes estágios do ciclo celular (prófase, seta verde; anáfase, seta rosa; telófase, seta vermelha). Há células de cromatina frouxa e nucléolo evidente, responsável pela síntese do RNA ribossomal, o que sugere células em franca síntese proteica (setas azuis). Estas características denotam tecido viável em proliferação. Também é frequente o achado de mitoses atípicas (setas brancas). A linha amarela destaca região desmoplásica onde são visíveis as fibras colágenas destacadas e a ocorrência de fibroblastos.

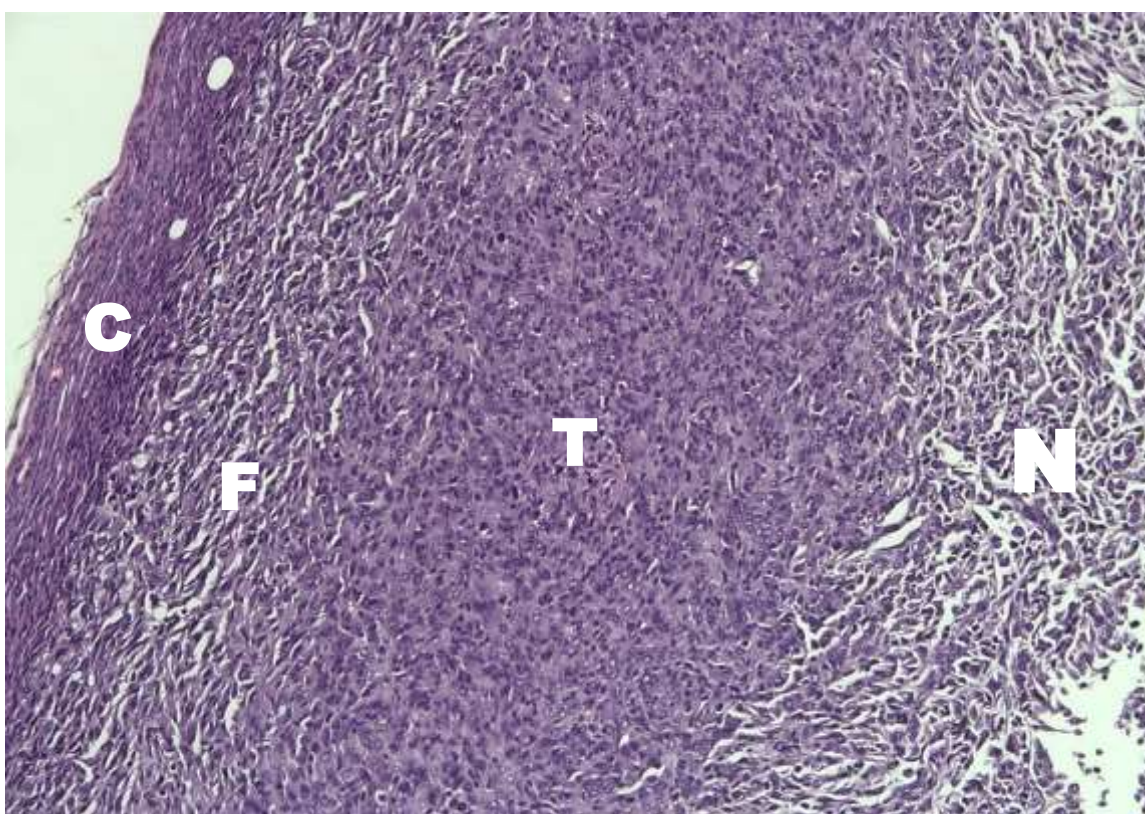


Figura 19. Corte representativo da arquitetura tumoral. C - Capsula fibrosa, F- tecido conjuntivo frouxo, T - estroma tumoral, N - necrose.

Foram encontradas quatro diferentes arquiteturas teciduais ao longo da massa tumoral. Externamente, tecido conjuntivo denso modelado compondo uma cápsula fibrosa com abundância de fibras colágenas (rosa) e alguns corpos celulares esparsos. Margeado por esta cápsula surge uma camada de estroma com aspecto conjuntivo frouxo. Há grande frequência de fibroblastos conferindo aparência fusiforme que transiciona para a região de maior celularidade, e por tanto mais corada no tumor. Por fim, na região mais interna se encontra a

estrutura de menor celularidade, com núcleos esparsos, presença infiltrado inflamatório crônico, núcleos picnóticos, cariorrexe e resquícios do produto final da cariólise formando um agregado eosinófilo e anucleado, por vezes retraído ou fragmentado, dando origem aos espaços vazios encontrados nos cortes. A proporção entre as formações teciduais, assim como a celularidade em cada arquitetura variou consideravelmente entre os tumores.

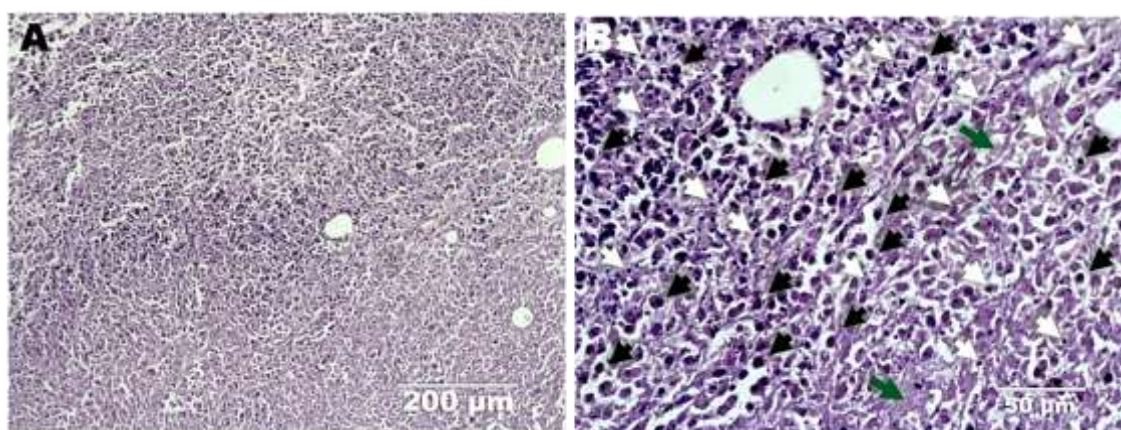


Figura 20. A) Necrose coagulativa 200µm; B) Necrose coagulativa 50µm (ampliação da zona de transição): as setas brancas apontam os abundantes núcleos picnóticos distribuídos por todo o quadro. As setas pretas, linfócitos infiltrados identificados por seus núcleos pequenos e arredondados e podem ser vistos em todo o corte. As setas em verde apontam o material necrótico composto de restos celulares derivados de cariólise, com maior eosinofilia e ausência de núcleo.

Foram encontrados diferentes padrões de necrose coagulativa abundância de infiltração de linfócitos aglomerados em padrão cordonal, circundando regiões de maior ou menor acúmulo de linfa, material hemorrágico e produto de cariólise, nestas regiões se tornam mais raras as células neoplásicas. De modo geral as regiões de necrose estavam compreendidas em regiões centrais do tumor e apresentavam menor densidade de células do que regiões corticais.

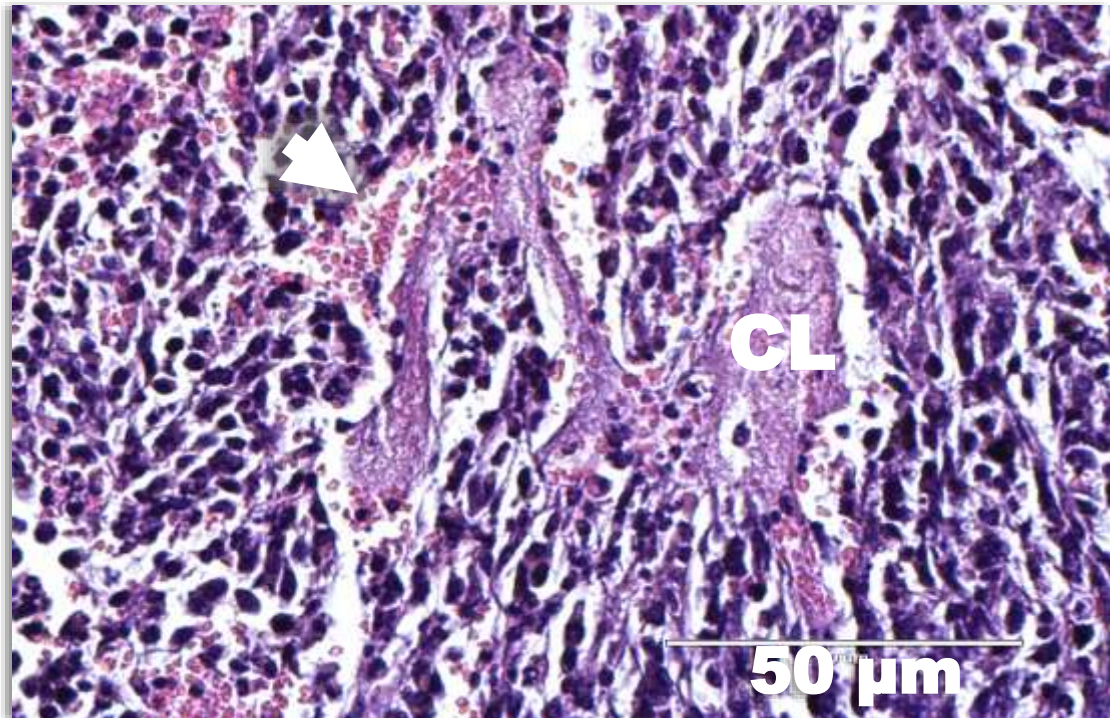


Figura 21. Mancha formada por produto de cariólise (CL). A seta aponta presença de hemácias decorrentes de hemorragia típica em centros necróticos. Barra de escala: 50μm.

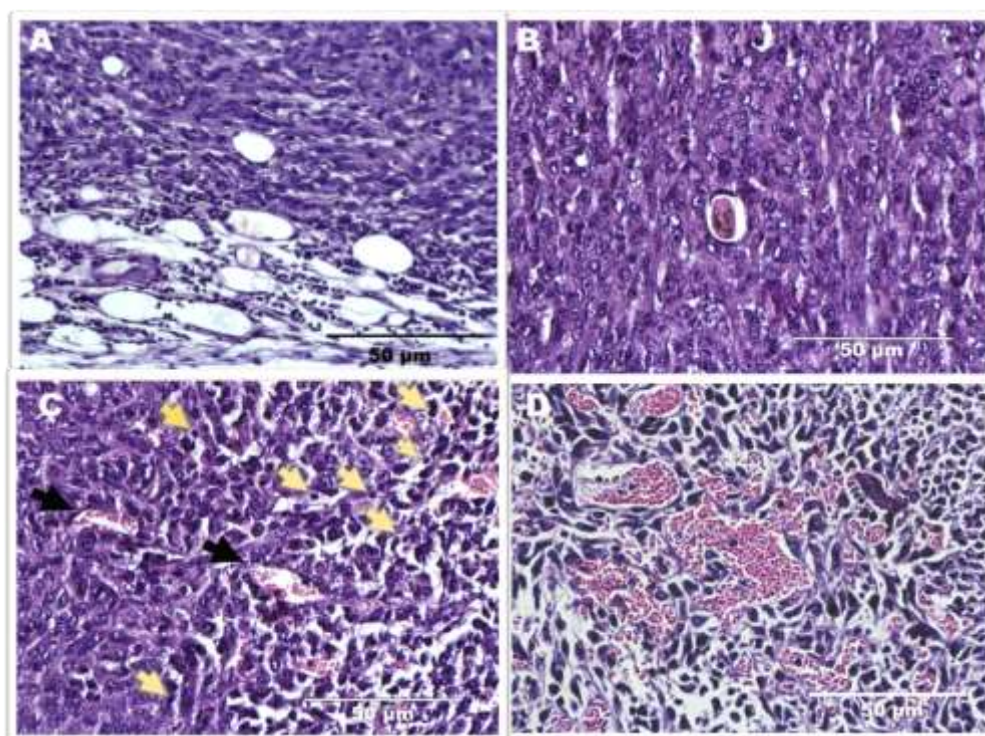


Figura 22. Diferentes estruturas microvasculares contendo evidências de células hematológicas. As setas amarelas apontam linfócitos infiltrados. As setas pretas apontam vasos irregulares, de lumem aberto e preenchidos por hemácias.

Foram observadas evidências de micro vasculatura tumoral em diferentes regiões do tumor. Vasos mais externos ou corticais tendiam a apresentar formas mais harmoniosas e eventualmente mais de uma cama de células, embora evidentemente não passassem de pequenas vênulas e arteríolas. Nas regiões medulares dos tumores foram vistos vasos mais alongados e disformes, formados por apenas uma camada de células endoteliais frequentemente descontínua e extravasada por hemácias.

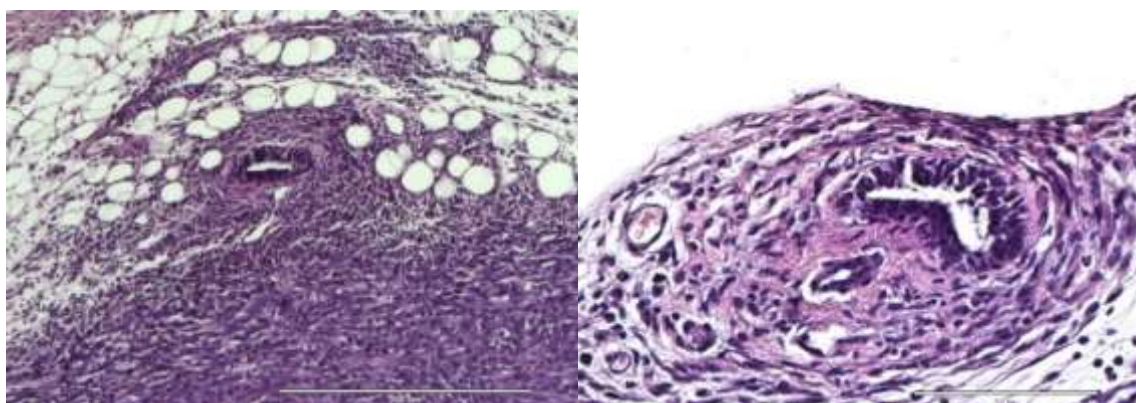


Figura 23. Fotografias representativas das seções de coloração H&E registrando ácinos íntegros característicos da arquitetura ductal. Esquerda (escala de 200 µm): região

marginal do tumor evidenciando ácino organizado envolto por tecido adiposo seguida de região de alta celularidade em padrão fusiforme. Direita (escala de 50 μm): ácino envolto por tecido mioepitelial abundante delimitado por discreta capsula fibrosa (Não se trata da mesma lâmina).

Nas regiões limítrofes ao tumor, foram encontradas estruturas glandulares perfeitas: ácinos caracterizados por grande número de células epiteliais colunares organizadas em estruturas circulares rodeadas por células mioepiteliais e abundante tecido conectivo. O achado é indício de sucesso na injeção ortotópica, uma vez que estruturas organizadas não são típicas de aloenxertos ortotópicos ou heterotópicos de linhagens morfológicamente indiferenciadas como é o caso da linhagem 4T1. ¹⁷⁷⁻¹⁷⁹

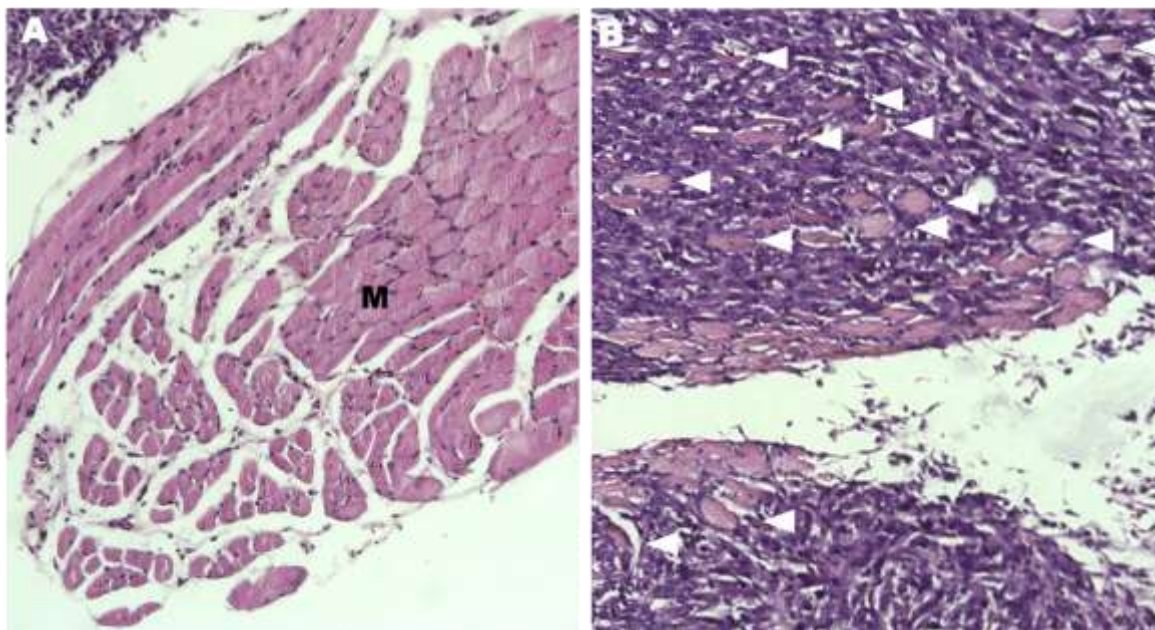


Figura 24. A) Músculo adjacente a massa tumoral. B) Fibras musculares invadidas e envoltas pela massa tumoral (setas brancas).

Embora a presença de cápsula fibrosa na delimitação do tumor ateste a ausência de infiltração do tecido limítrofe, também foi observada em um dos cortes a presença de fibras musculares completamente imersas no estroma tumoral, demonstrando o potencial invasivo deste tipo tumoral relatado pela literatura.

5.5. Imagens pré-clínicas

5.5.1. Estudo da captação da $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$

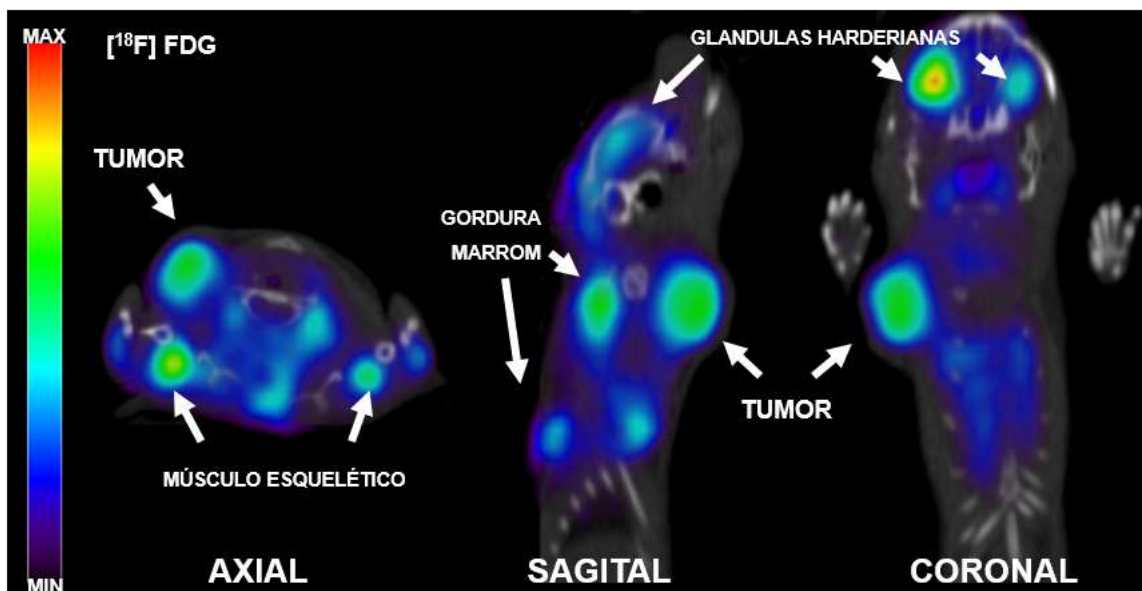


Figura 25. Imagem representativa dos estudos de captação de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ nos cortes axial, sagital e coronal com setas indicando regiões de hipercaptação do radiofármaco.

O traçador $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ é um dos principais radiotraçadores utilizado na determinação da presença e viabilidade de massas tumorais, primárias ou metastáticas. A análise qualitativa das imagens PET com $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ permitiu clara visualização de formações hipercaptantes altamente contrastantes do fundo, em padrão nodular e em posição anatômica compatível com o local de inoculação das células tumorais. Em todos os animais estas regiões estavam em coincidência com a massa opaca observada na CT. Além da massa tumoral, as imagens mostraram regiões de captação proeminente no cérebro, glândulas Harderianas, algumas regiões de músculo esquelético, coração e gordura marrom indicados pelas setas.

Em apenas 2 dos 12 tumores foram encontradas regiões com captação reduzida, sugestivas de centros necróticos, embora não se possa descartar a presença de células ainda viáveis, mas quiescentes, e por conseguinte hipocaptantes. Condições de hiperglicemia ($> 200 \text{ mg / dL}$) reduzem significativamente a captação tumoral de $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$, alegadamente por competição entre a glicose e o traçador pelos receptores. Por outro lado, tecidos saudáveis, fígado, coração, músculo e gordura mantêm seu perfil de captação

independente da glicemia ¹⁸⁰. Assim, o índice glicêmico dos animais foi avaliado antes da injeção de [¹⁸F]FDG, com o auxílio do monitor de glicemia Accu-Chek (Roche Diabetes Care, Suíça) sendo observado um valor médio de 129,5 ± 34,4 mg/dL (96 - 207 mg/dL). Não foi demonstrada diferença significativa entre os índices glicêmicos dos grupos tratado e controle (Valor-p = 0,166). As médias de volume tumoral dos dois grupos analisados foram comparadas para assegurar que as amostras tenham sido selecionadas de maneira homogênea (p-valor = 0,7636).

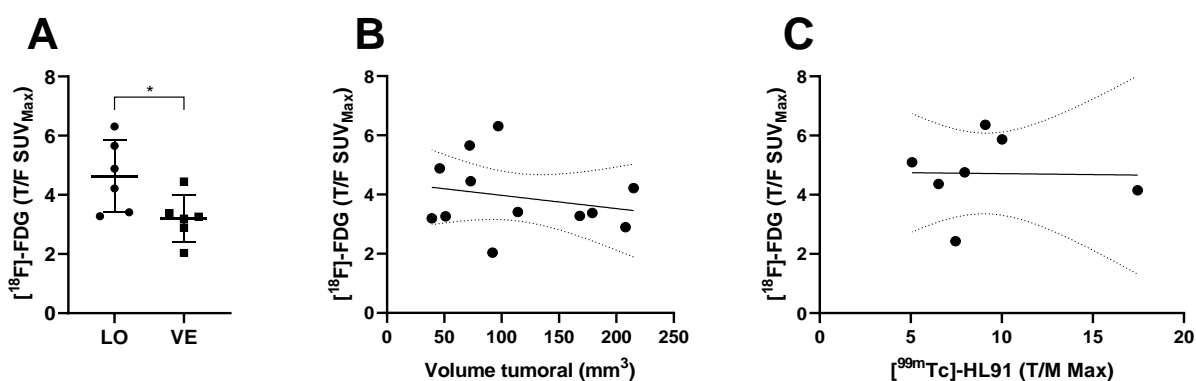


Figura 26. A) Tumores de animais tratados com losartana tem maior avides por glicose em comparação aos de animais controle (p-valor = 0,0369 e IC95% = -2,739; -0,1057, n = 7). B) Curva de regressão linear e ensaio de correlação de Spearman demonstrando a ausência de correlação entre a captação de [¹⁸F]FDG e o respectivo volume tumoral ($r_{\text{Spearman}} = -0,2321$, p-valor = 0,2340, n = 12). C) Curva de regressão linear e ensaio de correlação de Spearman demonstrando a ausência de correlação entre a captação de [¹⁸F]FDG e a correspondente captação do traçador de hipóxia [^{99m}Tc]Tc-HL91.

Devido à grande variabilidade nos valores encontrados em imagens pré-clínicas com modelos de pequeno porte, a avaliação do metabolismo de glicose dos tumores se deu pela normalização da captação tumoral em função da hepática (Razão Tumor/Fígado).^{167, 181, 182} A quantificação relativa da captação demonstrou que tumores de animais tratados com losartana tem maior avides por glicose em comparação aos de animais controle com uma diferença entre as médias de 1,423±0,591 (p-valor = 0,0369 e IC95% = -2,739; -0,1057, n = 7). A correlação entre a captação padrão de [¹⁸F]FDG (SUV_{Max}) e o volume tumoral foi testada pelo ensaio de correlação de Spearman mostrando um coeficiente de correlação negativo e extremamente fraco ($r_{\text{Spearman}} = -0,0979$; p-valor = 0,3832, n = 12), o que sugere ausência de relação causal entre o metabolismo e o volume do tumor, ou seja, aumento da massa tumoral não influencia na captação do

traçador que no caso é parâmetro do metabolismo de glicose. A correlação entre hipóxia tumoral e o metabolismo glicolítico também foi avaliada com resultados não significativos ($r_{\text{Spearman}} = 0,1071$; p-valor = 0,4198, n = 7). A ausência de correlação entre as intensidades de captação dos traçadores (Figura 26 -C) e as distribuições locorregionais incongruentes (reforçam a noção de heterogeneidade do microambiente tumoral. A partir dos resultados obtidos é possível levantar duas hipóteses distintas, I) losartana teve um efeito potencializador sobre o metabolismo tumoral, II) a melhor perfusão sanguínea promovida pelo anti-hipertensivo levou a uma maior entrega de [^{18}F]FDG ao tecido.

5.5.2. Avaliação do traçador [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-HL91

5.5.2.1. Prova de conceito: [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-HL91 como traçador de hipóxia

Uma etapa importante no desenvolvimento de um radiotraçador é sua validação para a finalidade a que se destina. Para tanto diferentes técnicas podem ser empregadas. A prova de conceito da adequabilidade do [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Tc-HL91 como traçador de hipóxia se deu pela comparação de imagens autorradiográficas de cortes histológicos dos tumores excisados dos animais após aquisição das imagens SPECT/CT e análise imuno-histoquímica de cortes adjacentes com anticorpo anti-pimonidazol (n=3). Adicionalmente as imagens foram comparadas a cortes histológicos submetidos a coloração clássica com hematoxilina-eosina e análises imuno-histoquímicas com anticorpo anti-CD31 para verificar a distribuição endotélio vascular.

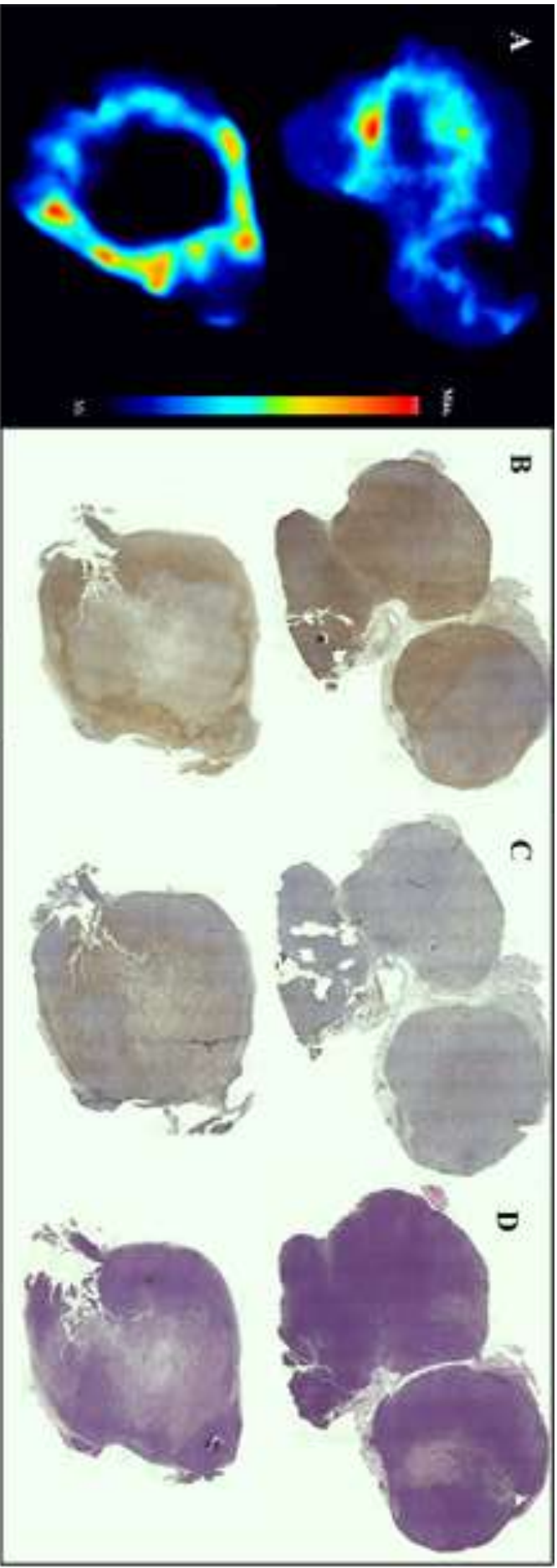


Figura 27 - Painel de imagens representativas dos ensaios histológicos realizados demonstrando a correspondência e complementaridade dos marcadores avaliados. Colunas: A) Autorradiografia do radiofármaco [^{99m}Tc]c-HL91, a direita escala de cor indicando captação mínima em preto e máxima em vermelho; B) Marcação imuno-histoquímica de regiões de hipóxia com anticorpo anti-pimonidazol; C) Marcação imuno-histoquímica do endotélio vascular com anticorpo anti-CD31; D) Coloração histológica clássica com Hematoxilina & Eosina.

Na figura 26 é apresentada a evidente similaridade morfológica entre regiões imunorreativas para o anticorpo anti-pimonidazol e regiões hipercaptantes do radiofármaco confirmando qualitativamente a adequabilidade do traçador para a observação da presença de tecido hipóxico no tumor. As diferenças na intensidade do sinal observado em cada caso (a saturação do DAB na imuno-histoquímica – Coluna B - e os tons vermelhos na escala de cores para a autorradiografia – Coluna A) podem se dever a fatores intrínsecos a cada técnica. Se bem procedido, o protocolo de coloração com pimonidazol o composto não ligado é lavado com relativa eficiência e a coloração final mostra apenas adutos de pimonidazol, enquanto a autorradiografia apresenta também o sinal do traçador não ligado (sinal inespecífico).

A distribuição dos vasos CD31⁺ visualizados na imuno-histoquímica com anticorpo anti-CD31 (Coluna C) não coincide com estas regiões, ao contrário, os padrões de deposição do cromógeno parecem complementares, em acordo com a natureza do tecido hipóxico e indicativo de que o acúmulo se deve a captação diferencial e não a perfusão. Quando comparamos a autorradiografia às correspondentes lâminas de H&E notamos que as regiões hipercaptantes coincidem com regiões de alta celularidade, geralmente aproximadas ou circundantes de regiões hipocaptantes coincidentes com regiões de menor densidade celular e maior eosinofilia observadas no H&E. O achado é também indício da capacidade do traçador em discriminar entre tecido hipóxico e necrótico.

5.5.2.2. Captação tumoral do [^{99m}Tc]Tc-HL91: Imagens SPECT/CT

As imagens SPECT/CT representaram um desafio para análise e semiquantificação. Embora tenha sido previsto que a via de excreção do traçador impactaria na visualização da lesão, uma vez que a primeira mama cervical direita foi selecionada para a inoculação das células tumorais, o impacto da hipercaptação sobre a qualidade das imagens foi expressivo e a visualização da

captação tumoral só era possível com a manipulação da escala de cor. E quanto menor o tumor (Figura 27 A- Volume de 56 mm³), mais difícil a visualização.

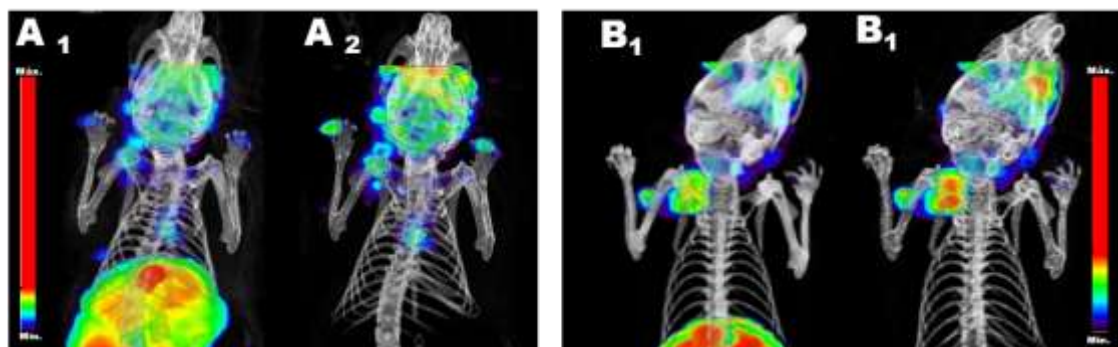


Figura 28. Renderizações 3D das imagens fusionadas SPECT/CT com [^{99m}Tc]Tc-HL91 representando os diferentes perfis de captação em tumores com diferentes dimensões.

Na Figura 27, a imagem A, com FOV de 60 mm, permitiu a visualização de toda a extensão do fígado, com destaque para o acúmulo na vesícula biliar, mais abaixo são visualizadas as partes superiores dos córtex renais. Entretanto a baixa intensidade de captação na pequena massa tumoral tornou necessária a manipulação da escala de tal maneira que permitiu a visualização do pool sanguíneo no ventrículo esquerdo. Na imagem B está representado um tumor de 195 mm³, e, embora seja possível notar a heterogeneidade da captação tumoral, áreas de hipocaptação ou hipercaptação são difíceis de distinguir. Mesmo quando o FOV é limitado à região do, ainda é possível visualizar a captação nas glândulas parótidas e submandibulares e alguma captação na tireóide na mesma intensidade do tumor.

Assim para visualizar adequadamente a captação tumoral, foram criadas máscaras a partir do o VOI definido para cada tumor, empregadas como *template* para normalização das tomografias por emissão, substituindo os valores de captação na vizinhança por zero e preservando a matriz contida na região delimitada pela máscara de modo a facilitar a visualização de mínimos e máximos dentro da massa tumoral.

5.5.3. Avaliação do efeito da farmacoterapia por análise de imagens SPECT/CT

5.5.3.1. Análise semiquantitativa: Captação relativa

Na análise de tumores com traçadores SPECT o dado fundamental é a quantificação relativa da captação tumoral em relação ao tecido sadio adjacente ao tumor ou em região contralateral. O tecido sadio mais empregado em estudos de hipóxia é o músculo, mas outros tecidos podem ser empregados dependendo da topografia do tumor. Neste estudo, músculo e pulmão foram utilizados como referência.

A captação tumoral média de [^{99m}Tc]Tc-HL91 normalizada pelo músculo, (ou relação T/M) dos animais tratados com losartana foi de $8,19 \pm 2,36$ (n=7) e de animais controle $11,97 \pm 7,59$ (n=7). A diferença entre as médias foi de $3,78 \pm 3,01$. O teste T de Student não demonstrou significância estatística ($p=0,233$) para esta diferença (Figura 29-C), confirmado pelo intervalo de confiança de 95% ($\text{IC}_{95\%}$) = (-2,75; 10,34). As médias das captações relativas máximas T/M também foram comparadas e a diferença entre as médias também não demonstrou significância estatística ($p=0,3611$) (Figura 29-D). Frente a ausência de efeito observado frente a relação tumor músculo, foram levantados questionamentos com relação adequabilidade do tecido como padrão, uma vez que o stress e fadiga muscular poderiam criar um viés afetando tanto a perfusão quanto o status de hipóxia, o que poderia variar drasticamente de indivíduo para indivíduo. ¹⁸³

Assim outros órgãos e tecidos foram avaliados na tentativa de encontrar diferenças mensuráveis entre os modelos. Aqui são apresentados os dados obtidos da relação da captação tumoral e pulmonar. Assim como os outros estudos, empregando valores médios de captação dentro do volume de interesse, a comparação do parâmetro entre os dois grupos não demonstrou significância estatística. Entretanto quando observada a relação entre os valores de pixel máximo dentro do VOI (Figura 29- F), a diferença entre as populações ($6,196 \pm 2,758$) passa a ser substancial ($p=0,0442$ e $\text{IC}_{95\%} = (0,1882; 12,20)$).

Extensa pesquisa foi realizada no intuito de encontrar ensaios similares, entretanto, o emprego da razão tumor/pulmão na avaliação de traçadores de hipóxia apenas foi descrita para tumores pulmonares primários ou metastáticos¹⁸⁴, enquanto estudos empregando a captação muscular como fator de normalização são abundantes na literatura tanto para traçadores SPECT quanto PET na análise de imagens pré-clínicas e clínicas.^{72, 102, 173, 184, 185} Outros tecidos de referência frequentemente vistos são o sangue, fígado ou simplesmente a região circundante ao tumor^{167, 181, 182}

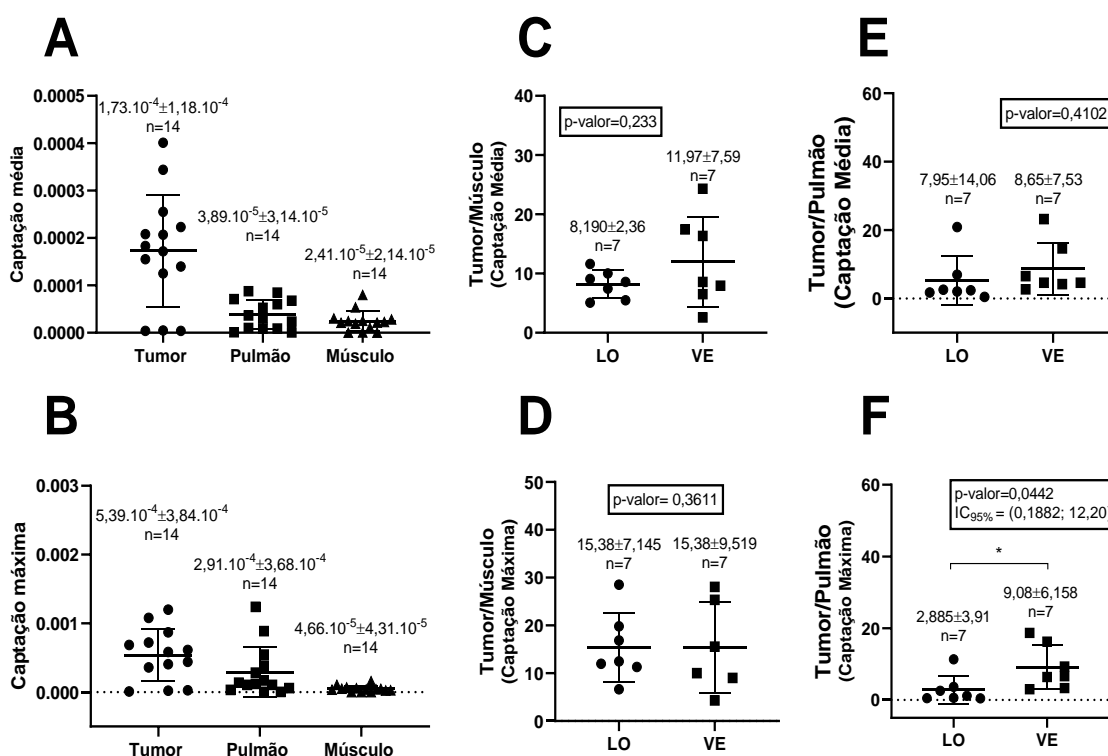


Figura 29. A e B - Gráficos de dispersão (média \pm DP) das contagens média e máxima nos VOI. C, D, E e F - Gráficos de dispersão (média \pm DP) e Valor-p obtido na comparação entre médias pelo teste T de Student. - C) Captação tumoral média de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HL91}$ normalizada pelo músculo, (ou relação T/M) dos animais tratados e controle. D) Captação tumoral máxima de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HL91}$ normalizada pelo músculo, dos animais tratados e controle. E) Captação tumoral média de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HL91}$ normalizada pelo pulmão, (ou relação T/P) dos animais tratados e controle. D) Captação tumoral máxima de $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HL91}$ normalizada pelo pulmão, dos animais tratados e controle.

5.5.4. Efeito da terapia sobre o volume tumoral

Os volumes tumorais foram comparados entre os grupos tratado ($235,5 \pm 201,5$, $n=11$) e controle ($213,7 \pm 141,5$, $n=12$). O teste T de Student não demonstrou significância estatística ($p > 0,999$). A diferença entre as médias foi de $21,88 \pm 72,08$ e IC 95% = $(-171,8; 128,0)$ demonstrando ausência de efeito do tratamento sobre volume tumoral.

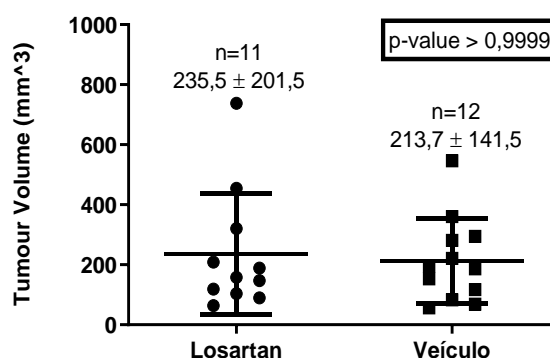


Figura 30 - Gráfico de dispersão (média \pm DP) de volumes tumorais dos animais (VOI, SPECT/CT). p-valor obtido no teste T de Student.

5.5.4.1. Captação relativa média versus volume tumoral

Para avaliação do comportamento do radiofármaco foi observada a correlação entre a captação relativa avaliada pela razão TUMOR/MÚSCULO (T/M) e o volume tumoral, independente de tratamento.

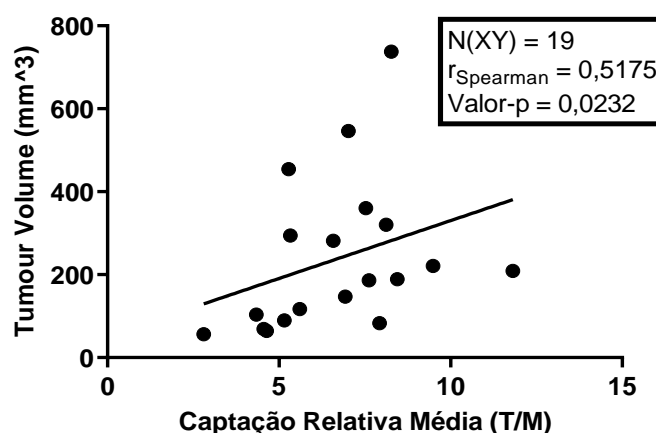


Figura 31 - Regressão linear do teste de correlação de Spearman. Razão T/M da captação média versus volume tumoral independente de protocolo de tratamento.

O ensaio de correlação de Spearman apontou uma relação linear positiva e moderada entre as variáveis ($\rho_{\text{Spearman}} = 0,518$, $p = 0,023$, $n = 19$). Quando os dados são estratificados em função do tratamento, o comportamento da reta passa ser diferente para os dois grupos:

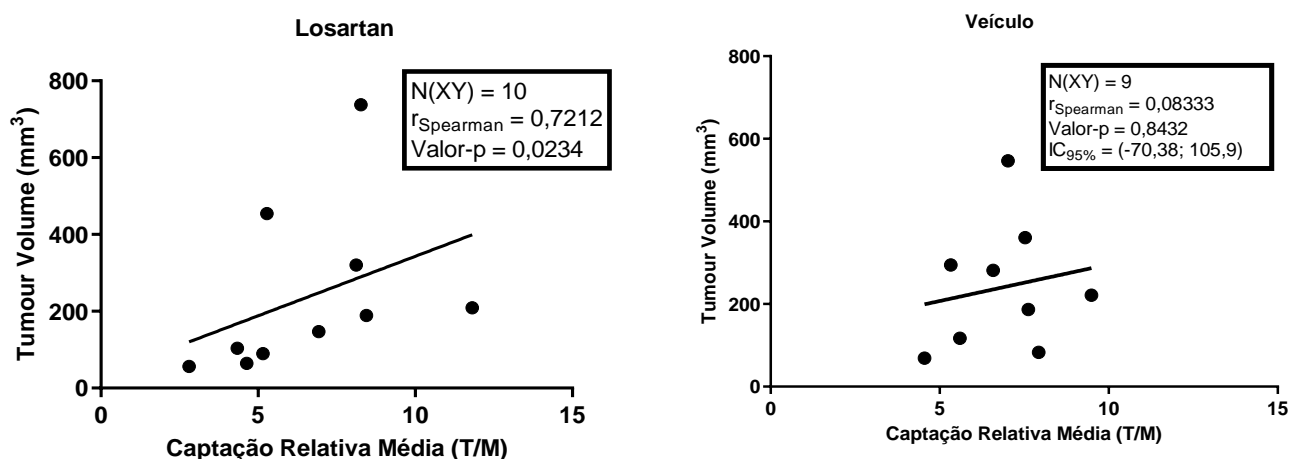


Figura 32- Regressão linear do teste de correlação de Spearman. Razão T/M da captação média versus volume tumoral para cada protocolo de tratamento.

O coeficiente de correlação obtido apontou uma relação linear positiva forte entre as variáveis para o grupo tratado com losartana ($\rho_{\text{Spearman}} = 0,721$, $p = 0,023$, $n = 10$), enquanto os dados do grupo controle demonstram ausência de correlação ($\rho_{\text{Spearman}} = 0,083$, $p = 0,843$, $n = 9$). A ausência de correlação foi confirmada por IC_{95%} = -70,38; 105,9.

5.5.4.2. Estratificação por volume tumoral

Uma vez observada a influência do volume tumoral sobre a captação do radiofármaco em ao menos um dos grupos, o parâmetro foi fixado e o comportamento do traçador frente à farmacoterapia novamente observado. Para isso os dados foram estratificados em faixas categóricas quanto ao volume tumoral de acordo com a frequência dos dados estabelecendo três grupos homogêneos: Grupo A: 0-140 mm³, Grupo B: 140-280 mm³, Grupo C: >280 mm³.

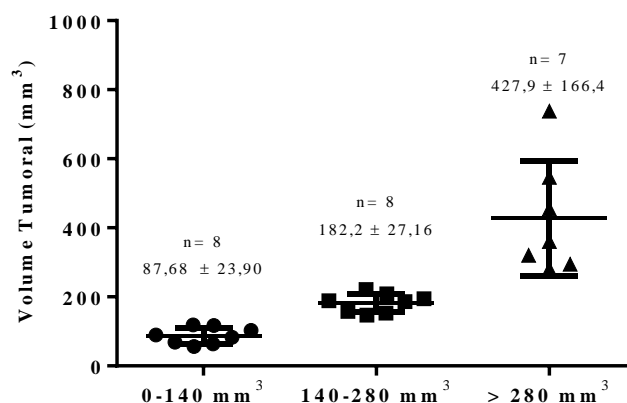


Figura 33 - Gráfico de dispersão (média \pm DP) de volume tumoral médio para os grupos: Grupo A: 0-140 mm³; Grupo B: 140-280 mm³; Grupo C: > 280 mm³.

O teste exato de Tukey demonstrou diferenças significativas entre a captação tumoral média dos três grupos com captação significativamente maior para tumores de tamanho intermediário. O dado pode ser justificado pela alta frequência de regiões de necrose observada nos tumores acima de 280 mm³, enquanto tumores de até 140 mm³ raramente apresentaram tecido necrótico, assim como menor marcação dos traçadores de hipóxia, como demonstrado na Figura 32, onde vemos a progressão da fração hipóxica com o aumento do volume tumoral.

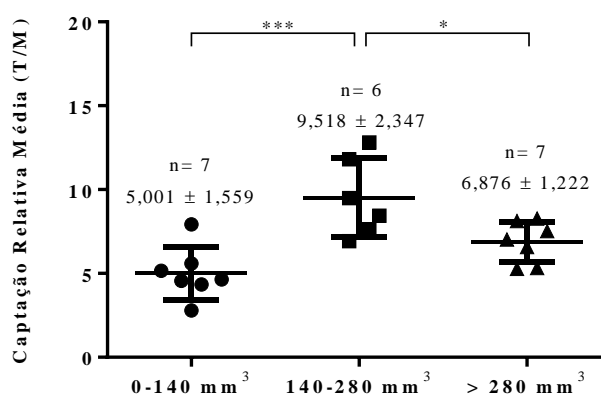


Figura 34 – Gráfico de dispersão (média \pm DP) de volume tumoral médio por faixa categórica de volume. As médias foram comparadas pelo teste de múltiplas comparações de Tukey: * p-Value < 0,05; *** p-Value < 0,0005.

Em tumores pequenos, (até 140 mm³) a diferença entre as médias de captação relativa foi de $0,5100 \pm 1,284$. O teste T de Student não demonstrou significância estatística ($p= 0,3538$). O IC_{95%} = (-2,79; 3,81) confirmou ausência de efeito do tratamento sobre a captação relativa. Em tumores entre 140 e 280 mm³ a diferença entre as médias foi de $0,91 \pm 2,093$. O teste T não demonstrou significância estatística ($p= 0,3431$) e o IC_{95%} = (-4,902; 6,722) confirmou ausência de efeito. Em tumores maiores de 280 mm³ a diferença entre as médias foi de $-0,6083 \pm 0,9858$. O teste T de Student não demonstrou significância estatística ($p= 0,3431$). O IC_{95%} = (-3,142; 1,926) confirmou ausência de efeito.

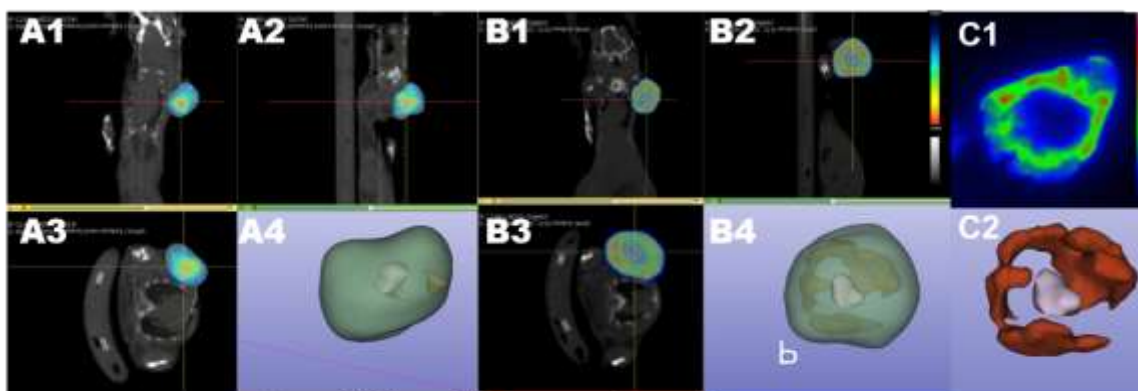


Figura 35 - A) M07 Grupo Veículo Dia 1: 13º dia após a inoculação de células tumorais Volume tumoral = 221 mm³ - Fração em Hipóxia = 34 mm³ - Fração Necrótica = 2,09 mm³. B) M07 Grupo Veículo Dia 2: 15º dia após a inoculação de células tumorais Volume = 546 mm³ - Fração em Hipóxia = 249 mm³ - Fração Necrótica = 6,64. C2) visualização do VOI delineado sobre a região de hipóxia em vermelho e necrose em rosa claro. C1) Imagem de autorradiografia do mesmo tumor após a eutanásia evidenciando a concordância entre as técnicas.

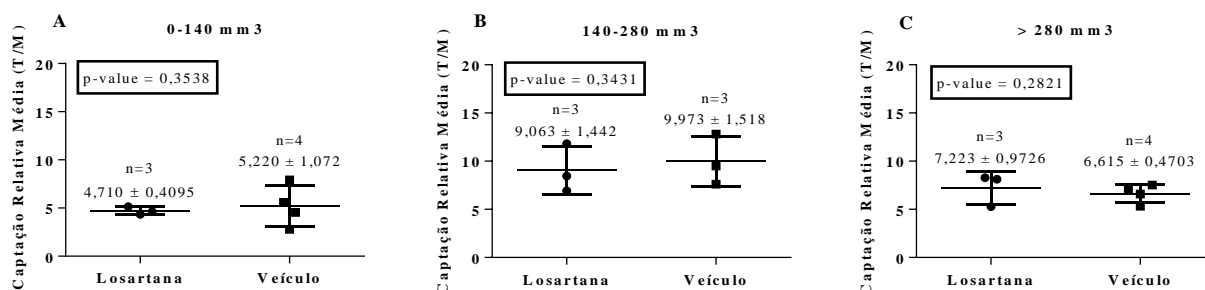


Figura 36 - Gráfico de dispersão (média ± DP) de captação relativa média por grupo de tratamento para as três faixas categóricas de volume.

5.5.4.3. Extensão da região hipercaptante em função do volume tumoral categórico

O teste de múltiplas comparações de Tukey demonstrou diferenças significativas entre os volumes hipercaptantes (mm^3) nos três grupos com evidente proporcionalidade ao volume tumoral.

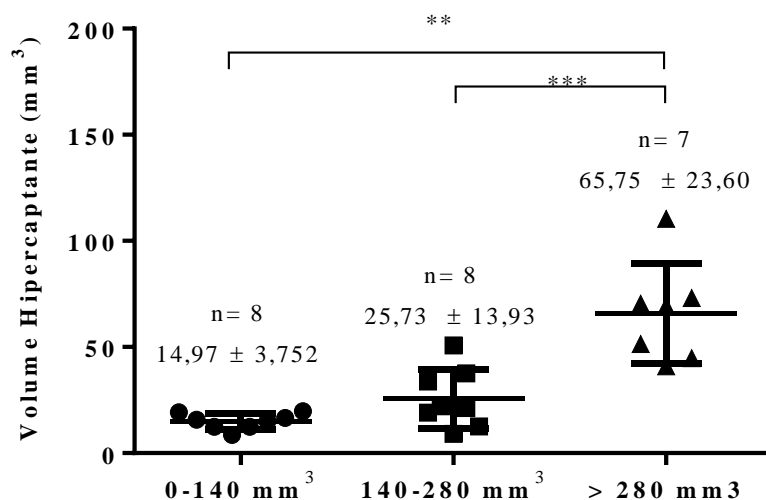


Figura 37 – Gráfico de dispersão (média \pm DP) de volume hipercaptante médio por faixa categórica de volume. As médias foram comparadas pelo teste de múltiplas comparações de Tukey: ** p-Value < 0,01; *** p-Value < 0,0005.

5.5.4.4. Biodistribuição *ex vivo* do [^{99m}Tc]Tc-HL91

Após a aquisição de imagem, 3 animais de cada grupo foram separados para amostragem tecidual, pesagem e contagem da aditividade radioativa. Neste ensaio foi estabelecida a taxa de captação, expressa em porcentual de dose injetada/ g de órgão (% DI / g). As taxas foram comparadas órgão a órgão por teste T (Tabela 3. Biodistribuição do traçador [^{99m}Tc]Tc-HL91 em animais balb/c fêmeas portadoras de tumor de mama 4T1 tratadas e não tratadas com losartana. (%DI/g \pm Desvio Padrão; n =3 animais por grupo) - * valor-p obtido pelo teste T de Student.).

Tabela 3. Biodistribuição do traçador [^{99m}Tc]Tc-HL91 em animais balb/c fêmeas portadoras de tumor de mama 4T1 tratadas e não tratadas com losartana. (%DI/g ± Desvio Padrão; n =3 animais por grupo) - * valor-p obtido pelo teste T de Student.

	Losartana	Veículo	L vs V
Órgãos	Média ± D. Padrão	Média ± D. Padrão	Valor-p*
Tumor	0,971 ± 0,518	0,538 ± 0,346	0,298
Músculo	0,307 ± 0,129	0,177 ± 0,016	0,169
Osso	0,431 ± 0,171	0,316 ± 0,142	0,432
Sangue	2,841 ± 2,852	1,069 ± 0,158	0,343
Cérebro	0,117 ± 0,0616	0,058 ± 0,011	0,191
Tireoide	0,799 ± 0,592	0,511 ± 0,037	0,446
Coração	0,607 ± 0,318	0,481 ± 0,041	0,531
Pulmões	1,236 ± 0,356	0,714 ± 0,076	0,067
Estômago	1,346 ± 1,023	0,783 ± 0,204	0,4
Baço	1,959 ± 0,784	1,058 ± 0,323	0,139
Fígado	7,955 ± 5,862	4,365 ± 0,767	0,352
Vesícula Biliar	5,172 ± 7,939	7,262 ± 4,266	0,709
Intestino Grosso	2,720 ± 3,114	3,998 ± 7,999	0,809
Intestino Delgado	1,652 ± 0,7051	1,8523 ± 1,466	0,844
Rins	3,782 ± 0,524	3,233 ± 0,731	0,347
Urina + Bexiga	4,773 ± 9,741	22,973 ± 33,404	0,037

De modo geral o ensaio descreveu um perfil de biodistribuição consonante com o padrão para radiofármacos de [^{99m}Tc]tecnécio cuja excreção ocorre por via urinária e hepatobiliar em proporções semelhantes uma vez que o radiofármaco, por sua natureza lipofílica, precisa ser metabolizado no fígado gerando metabólitos mais hidrossolúveis para excreção renal e, o próprio pertecnetato livre, impureza do produto demarcação, por sua natureza hidrofílica é depurado pelos rins. A pequena captação cerebral denota o atravessamento da barreira hematoencefálica, sugerindo a possibilidade de detecção de hipóxia em lesões isquêmicas e tumores do sistema nervoso central. Os dados obtidos no estudo estão alinhados ao observado nas imagens.

Não houve diferenças significativas na biodistribuição do radiofármacos entre os grupos, o que sugere que, do ponto de vista sistêmico, o fármaco anti-hipertensivo não interfere na farmacocinética do traçador. A única diferença demonstrada no teste foi quanto ao percentual de dose no compartimento urinária (bexiga + urina), mas uma vez que os ensaios não foram realizados em gaiolas metabólicas, não se pode assegurar que não tenha havido perda de

atividade por micção dos animais desde o momento da injeção. Os valores- p obtidos para cada órgão bem como suas captações médias e desvios padrão são apresentados na tabela acima.

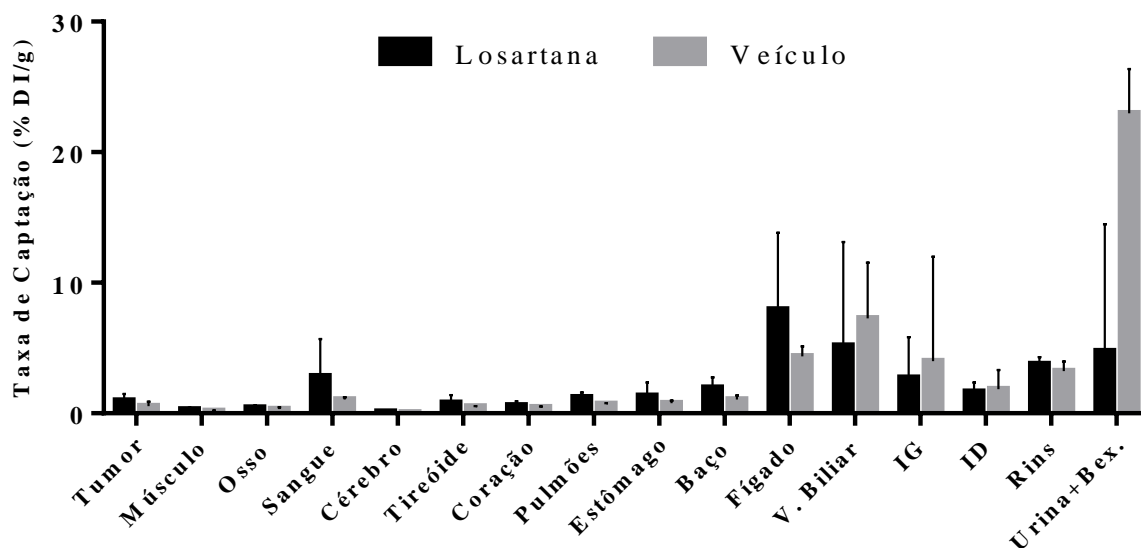


Figura 38- Figura 7. Biodistribuição *ex vivo* do $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-HL91}$ em animais Balb/c fêmeas portadoras de tumor de mama 4T1 tratadas (negro) em não tratadas (cinza) com losartana. (%DI/g \pm Desvio Padrão; n =3 animais por grupo).

A captação tumoral foi inferior a 1 % DI/g em ambos os casos, cerca de 3 vezes maior que a captação muscular. Como era de se esperar, a absorção foi proporcional ao tamanho dos tumores. Vale enfatizar que se trata de um traçador destinado a detecção de uma alteração metabólica dinâmica e heterogênea e não de um receptor constitutivamente expresso e específico da massa tumoral, assim a razão TUMOR/ TECIDO SADIO (músculo) se torna um parâmetro mais relevante do que o percentual de dose para julgar a adequação do radiofármaco para a finalidade a que se destina.

Foram encontradas poucas publicações contendo estudos de biodistribuição do radiofármaco, todas com modelos animais diferentes: camundongos CBA fêmeas portadoras de adenocarcinoma de mama NT (CaNT), ¹⁸⁶, Balb/c nude xenografados com adenocarcinoma colorretal humano, WiDr {Abrantes 2012, machos SCID portadores de adenocarcinoma de pulmão LL2 e machos C57BL/6NCrj (B6) portadores de adenocarcinoma de pulmão A549 ¹³², macho CH3 portando sarcoma KHT¹⁸⁷. Salvo as diferentes taxas de

captação observadas para cada modelo tumoral, o que era de se esperar, o mesmo padrão foi observado, sendo o fígado o órgão mais captante (neste ensaio separado da vesícula biliar) e o cérebro o menos captante.

5.5.4.5. Verificação do efeito da losartana por imunohistoquímica

Para verificar o efeito da losartana sobre a reperusão tumoral foram contados o número de vasos CD31⁺ para cada grupo e vasos presumidamente ativos (com lúmen visível). Na contagem dos vasos CD31⁺ foram consideradas as células coradas com DAB (tons de marrom), tanto isoladas quanto agrupadas. As estruturas deveriam estar claramente separadas dos microvasos adjacentes, das células tumorais e de outros elementos do tecido conectivo. Estruturas ramificadas contínuas foram contadas como vasos únicos; e um único vaso, submetido a mais de um corte transversal foi contado de forma distinta em cada um dos cortes. Inicialmente a visualização do lúmen não foi utilizada para identificação do total de vasos; em uma segunda contagem foi levando em conta apenas os vasos de lúmen aberto.

A diferença entre a média de vasos imunorreativos para CD31 nos dois grupos foi de $4,55 \pm 10,84$. O teste T de Student não demonstrou significância estatística ($p = 0,3481$) e o IC_{95%} de -25,53 a 34,63 confirmou ausência de efeito do tratamento sobre a expressão de vasos.

Para confirmar o dado, o número total de vasos foi verificado por técnica de densidade ótica. A diferença entre dos grupos foi de $0,1585 \pm 0,08029$ e embora o nível descritivo do teste tenha se aproximado do crítico ($p = 0,0715$) o IC_{95%} confirmou a ausência de efeito (-0,09705; 0,414).

A diferença no número médio de vasos CD31⁺ com lúmen visível foi de $4,167 \pm 4,868$. O teste T não demonstrou significância estatística ($p = 0,2275$) e o IC_{95%} de -11,33 a 19,6656 confirmou ausência de efeito do tratamento sobre a descompressão dos vasos. Os dados obtidos neste estudo diferem dos relatados por Chauhan et al.⁸¹

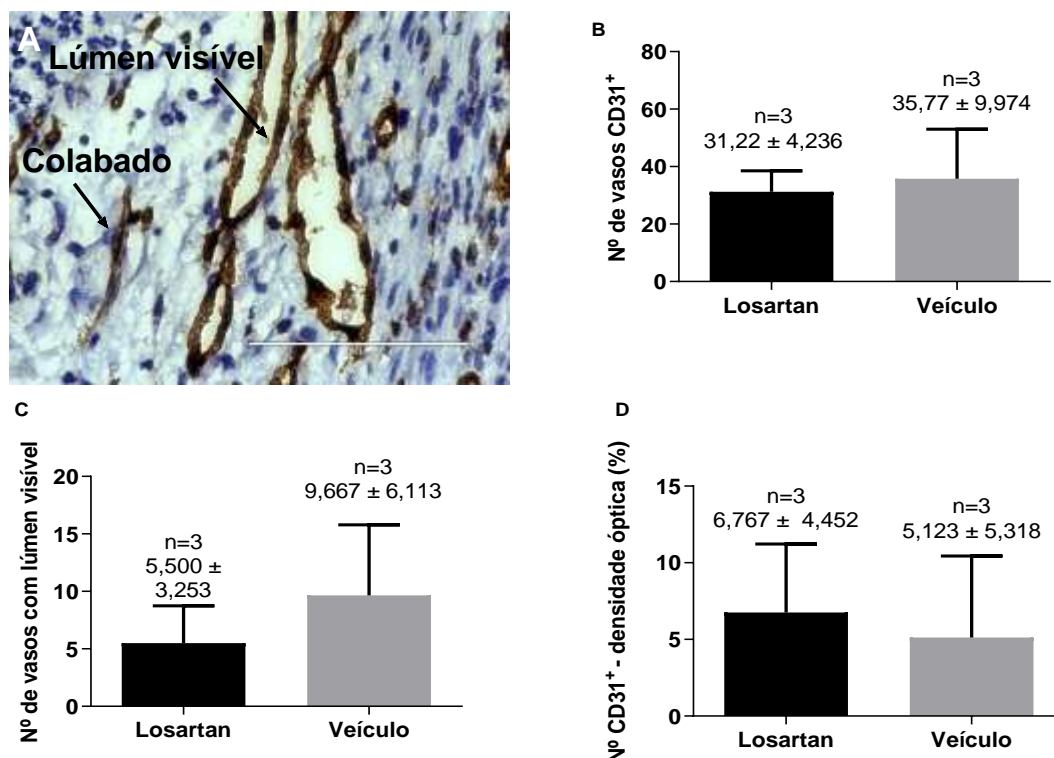


Figura 39 - Gráfico de barras (média \pm DP). A) Fotomicrografia de lâmina imunohistoquímica mostrando vasos CD31+ colabados e com lúmen visível; B) Número total de vasos CD31+ por contagem visual; C) Número de vasos CD31+ com lúmen visível por contagem visual; D) Fração de vasos CD31+ por densidade óptica.

5.6. Avaliação do traçador [^{18}F]FAZA

Na análise qualitativa das imagens PET com [^{18}F]FAZA, os tumores foram facilmente identificados, mesmo antes da fusão das imagens, caracterizando uma excelente captação diferencial. Em todos os animais estas regiões se sobrepuseram a massa opaca observada na CT após a fusão.

A morfologia das regiões hipercaptantes, no entanto se apresentou bastante diferente do observado nas imagens de [^{18}F]FDG, havendo alternância de regiões de alta e baixa captação ao longo de toda a massa tumoral.

Na comparação entre a biodistribuição em animal saudável e animal portando o tumor mamário, observar um maior destaque para o pool sanguíneo na cavidade ventricular. O FOV de 60 mm no animal sadio, permite visualizar claramente a via de excreção hepatobiliar, com atividade visível no fígado e intestino,

marcadamente a via de excreção preponderante para esta classe de moléculas {referência}. Nesta imagem também fica mais evidente a reduzida captação nas glândulas mamárias saudáveis. Embora a penetração de barreira hematoencefálica seja característica da molécula, havendo inclusive estudos em modelos de glioblastoma ¹⁸⁸ a captação cerebral vista aqui é meramente discreta, mesmo quando limitamos o FOV ao crânio isoladamente, isto porque em condições fisiológicas normais, o tecido cerebral possui uma pO₂ de cerca de 40 mmHg, característica de estado normóxico. ⁵⁸. Foi bastante evidente a acumulação do traçador nos ossos e articulações (articulação glenoumeral), talvez mais relacionada a [¹⁸F]fluoreto, produto da metabolização do traçador do que ao radiofármaco em si.

A análise semiquantitativa é frequentemente realizada por estimativa da captação média ou máxima dentro de uma determinada região de interesse (ROI). Nas tomografias por emissão o número de contagens nos voxels associados a um órgão pode ser relacionado a medidas de atividade por meio do fator de calibração do equipamento.

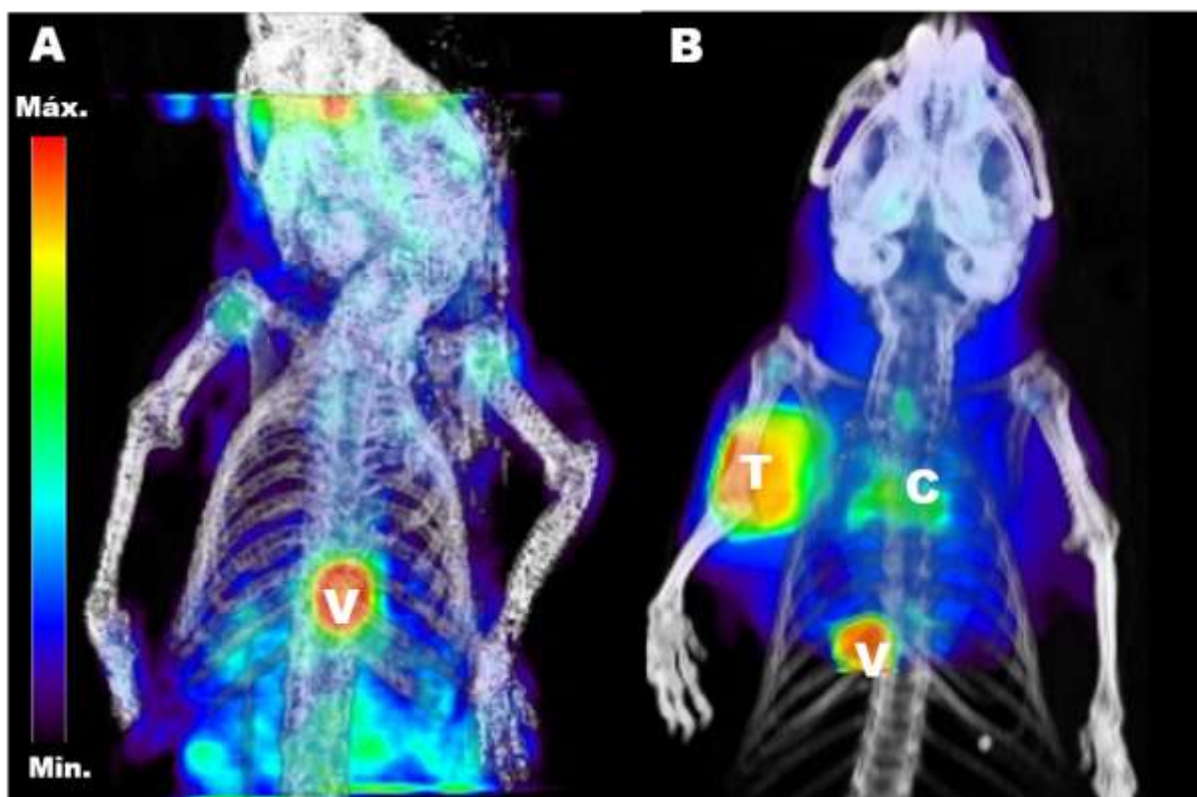


Figura 40 - Imagem renderizada demonstrando a biodistribuição do radiotraçador [¹⁸F]FAZA em animal saudável (A) e portador de tumor mamário 4T1 (B).

O parâmetro semiquantitativo mais utilizado em imagens PET é sem dúvida o SUV – Valor de captação padrão - parâmetro adimensional determinado pela razão entre concentração radioativa tecidual no volume de interesse medida pelo equipamento e a dose administrada distribuída pela massa corpórea. O SUV dos tumores foi calculado pela equação que a seguir:

$$SUV = \frac{\text{Concentração radioativa tecidual (MBq/mL)}}{\text{Dose injetada (MBq) / Massa corporal (g)}} \quad (1)$$

As medidas fornecidas pelo software foram normalizadas individualmente. As doses injetadas foram corrigidas pela subtração da atividade residual na seringa após a injeção e pelo decaimento radioativo entre o momento da calibração e o momento do exame, e, o peso de cada animal foi aplicado para correção de volume (nesse caso $1\text{g} = 1\text{mm}^3 = 1\text{mL}$). Os dados foram analisados em termos de contagem média e máxima e as médias entre os grupos foi comparada pelo teste T de Student para ambos os parâmetros, entretanto as diferenças observadas não foram significativas. Para os valores de $SUV_{\text{Médio}}$ a diferença entre as médias foi de $0,5897 \pm 0,7793$ (média \pm desvio padrão) e o $IC_{95\%} = (-1,147; 2,326)$, enquanto para o $SUV_{\text{Máximo}}$ a diferença entre as médias foi de $0,9886 \pm 1,373$ e o $IC_{95\%} = (-2,071 \text{ to } 4,048)$.

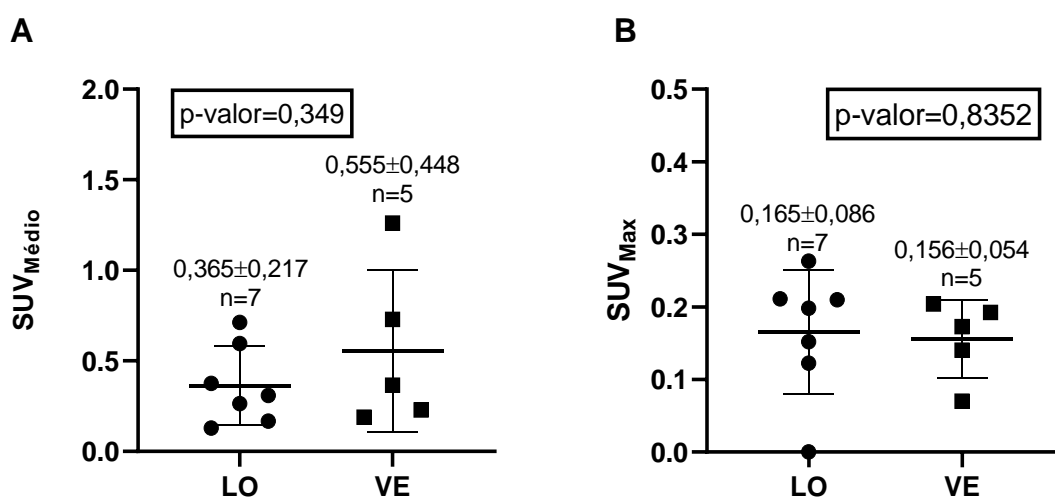


Figura 41- Gráficos de dispersão das comparações entre as médias dos SUV (A= $SUV_{\text{Médio}}$ e B = $SUV_{\text{Máximo}}$) obtidos para os tumores de animais tratados e não tratados com losartana.

Em medidas absolutas, como o SUV, existe uma maior probabilidade de erro do que em medidas relativas e uma série de fatores pode contribuir para o aumento desta probabilidade. Como exemplo, no extravasamento parcial da dose injetada de um radiofármaco diminuindo sua biodisponibilidade no órgão ou lesão alvo e resultando na estimativa imprecisa da captação. Na medida relativa, o efeito do extravasamento é proporcional em todos os ROI envolvidos e o erro é cancelado. Uma etapa importante na interpretação de todos os estudos é avaliar artefatos de imagem e no caso de estudos quantitativos, estar atento a eventos que possam invalidar a quantificação. Em ensaios pré clínicos com animais de pequeno porte como camundongos, a frequência de extravasamento da dose é elevada devido ao pequeno calibre da veia caudal, via de administração de primeira escolha em camundongos fêmea. Para contornar este tipo de erro de procedimento e evitar a exclusão dos indivíduos da amostra, a quantificação relativa dos dados de captação se fez necessária para normalização dos dados amostrados.

5.6.1. Análise semiquantitativa: quantificação relativa do traçador [¹⁸F]FAZA

O primeiro ponto crítico levantado foi a subjetividade do observador, uma vez que o componente visual na geração do dado quantitativo é a delimitação da ROI que está sujeita a desvios provocados pela posição, tamanho, e a formato de cada ROI além da capacidade de discriminar os limites da lesão. Estes fatores são relevantes pois a amostragem inadequada dos vóxels leva à amplificação do erro estatístico. Por este motivo, alguns autores defendem a utilização dos valores máximos uma vez que a determinação do vóxel de maior valor dentro do ROI é mais simples e objetiva do que delimitar precisamente a lesão. Embora equipamentos dedicados a pequenos animais sejam projetados com uma resolução consideravelmente maior do que equipamentos clínicos (Figura 42), a definição da imagem ainda não é suficiente para o detalhamento que as reduzidas dimensões dos órgãos ou tumores exigem, assim as imagens tomográficas e de emissão são visualmente bastante inferiores às clínicas em

termos de definição. Embora as imagens PET apresentassem uma boa relação tumor/fundo, nas imagens fusionadas as margens observadas para a lesão não se mostraram exatamente coincidentes e a heterogeneidade da captação se mostrou relevante no contorno do tecido. Assim os dados foram avaliados considerando médios e máximos.

8–12 mm	4–6 mm	1–2 mm	≤1 mm
SPECT Clínico	PET Clínico	PET Pré-Clinico	SPECT Pré-Clinico

Figura 42 - Resolução espacial de equipamentos clínicos e dedicados a pequenos animais. Adaptado de International Journal of Molecular Imaging ¹⁸⁹

O segundo ponto crítico foi a escolha do tecido de referência. Diferentes métodos foram encontrados na literatura, tanto para o [¹⁸F]FAZA, para o traçador [^{99m}Tc]Tc-HL91, como outros traçadores de hipóxia tumoral. Mais frequente, a relação tumor músculo, talvez justificada pela maior frequência de modelos tumorais decorrentes de inoculação subcutânea no flanco dos animais. Muitos estudos também empregaram os chamados *Image-derived blood surrogates* (substitutos do tecido sanguíneo derivados da imagem), correspondendo contagem em regiões altamente irrigadas e cuja captação se correlacionaria a atividade no pool sanguíneo (concentração plasmática do traçador), ou seja, um dado de captação inespecífica, como o arco aórtico, o coração ou até mesmo o fígado no caso da [¹⁸F]FDG.^{169, 190} Outros empregaram a região saudável do tecido do qual o tumor se originou.¹⁹¹ ou o oposto fisiológico, no caso da hipóxia, um tecido com características normóxicas, como o cérebro, por exemplo.¹⁹¹ {van den Hoff; azmi} Neste estudo, assim como para o traçador [^{99m}Tc]Tc-HL91 foram selecionados os tecidos muscular, devido ao extenso referencial teórico e o pulmão, por se tratar do background posicional ou anatômico, uma vez que os tumores foram induzidos na primeira mama direita dos animais, além de ser uma área alegadamente normóxica (pO₂ > 80 mmHg).¹⁹²

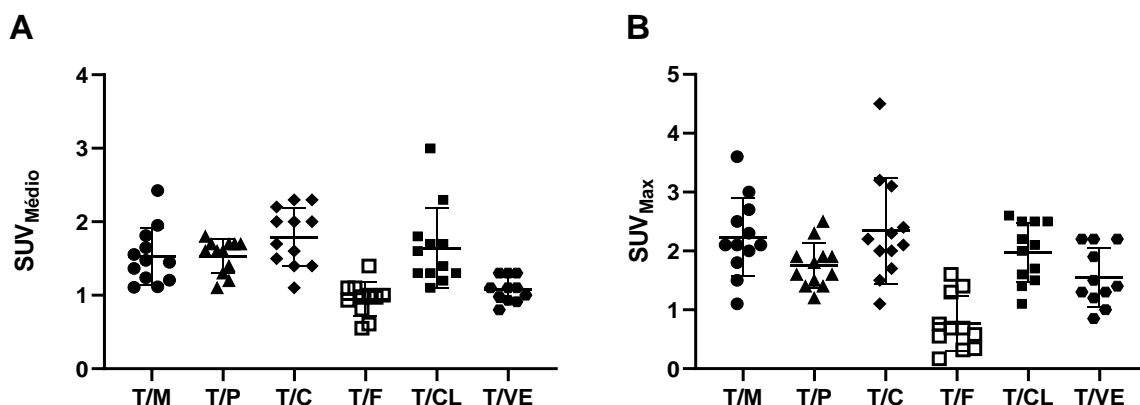


Figura 43 – Gráficos de dispersão das relações Tumor/Tecido de Referência ou Tumor/Normal para os tecidos selecionados a partir dos valores de $SUV_{Médio}$ (A) e $SUV_{Máximo}$ (B) independente de tratamento.

Dada a incerteza da escolha do tecido de referência, também foram estudados a mama contralateral, para um referencial do tecido sadio, considerados “*blood surrogates*”, o ventrículo esquerdo e o fígado. A medida semiquantitativa da razão do valor de captação padrão (SUV) tumoral em relação ao SUV do background hepático foi considerada útil na avaliação de lesões hepáticas suspeitas¹⁹³ e vários outros tipos tumorais, pois o fígado pode ser considerado um substituto da atividade arterial da [^{18}F]FDG na normalização do SUV¹⁶⁹. e finalmente o cérebro, que como mencionado anteriormente apresentou uma baixa captação possivelmente por sua fisiologia normóxica (pO₂ de cerca de 40 mmHg).

Os valores de captação no músculo apresentaram uma variabilidade razoável tanto em termos de valor médio (CV%=25,33%) como em máximos (CV%=29,78%) e em alguns animais foi difícil encontrar áreas de musculatura realmente hipocaptante, possivelmente pela tendência do músculo em se tornar hipóxico, quer pelo esforço dos animais em situação de stress ou mesmo por ser comprimido pelo posicionamento constante do animal sedado durante o período de geração de imagens. Assim foram selecionadas áreas visivelmente menos captantes na região lombar e região proximal da pata dianteira contra e ipsilateral e trabalhou-se com a média destas 3 amostras. Em todos os indivíduos esta média foi inferior ao valor de captação tumoral, o que é demonstrado pela razão $T/M > 1$.

Tabela 4 - Estatística descritiva das relações Tumor/Tecido de Referência (Normal) para os parâmetros de SUV Médio e Máximo independente de tratamento.

Estatística descritiva		T/M	T/P	T/C	T/F	T/CL	T/VE
n		12	12	12	11	12	11
SUV Médio	Normalidade (p-valor)	>0,1000	0,0912	>0,1000	>0,1000	>0,1000	>0,1000
	Média	1,529	1,533	1,792	0,95	1,642	1,075
	Desvio Padrão	0,3874	0,227	0,3965	0,2344	0,5401	0,171
	Coeficiente de Variação (%)	25,33%	14,80%	22,13%	24,67%	32,90%	15,91%
SUV Máximo	Normalidade (p-valor)	>0,1000	>0,1000	0,0974	>0,1000	>0,1000	>0,1000
	Média	2,233	1,75	2,342	0,7636	1,975	1,55
	Desvio Padrão	0,6651	0,3802	0,902	0,4702	0,5065	0,4955
	Coeficiente de Variação (%)	29,78%	21,73%	38,52%	61,58%	25,65%	31,97%

A captação tumoral relativa do traçador foi menor para o grupo tratado com losartana. A diferença entre as médias foi de 0,640 e desvios padrão 0,140 para as captações relativas dos SUV_{Médio} (T/M_{Médio}), IC_{95%} de (0,3280; 0,9520) e nível de significância de 0,0468. Para a razão entre os SUV_{Máximo} (T/M_{Máximo}) a diferença entre os valores médios de captação entre os grupos tratado e não tratado com losartana foi de $0,8429 \pm 0,3119$, IC_{95%} de (0,1479; 1,538) e nível de significância de 0,0222. Essas métricas são apresentadas nas **Erro! Fonte de referência não encontrada.**-A e E.

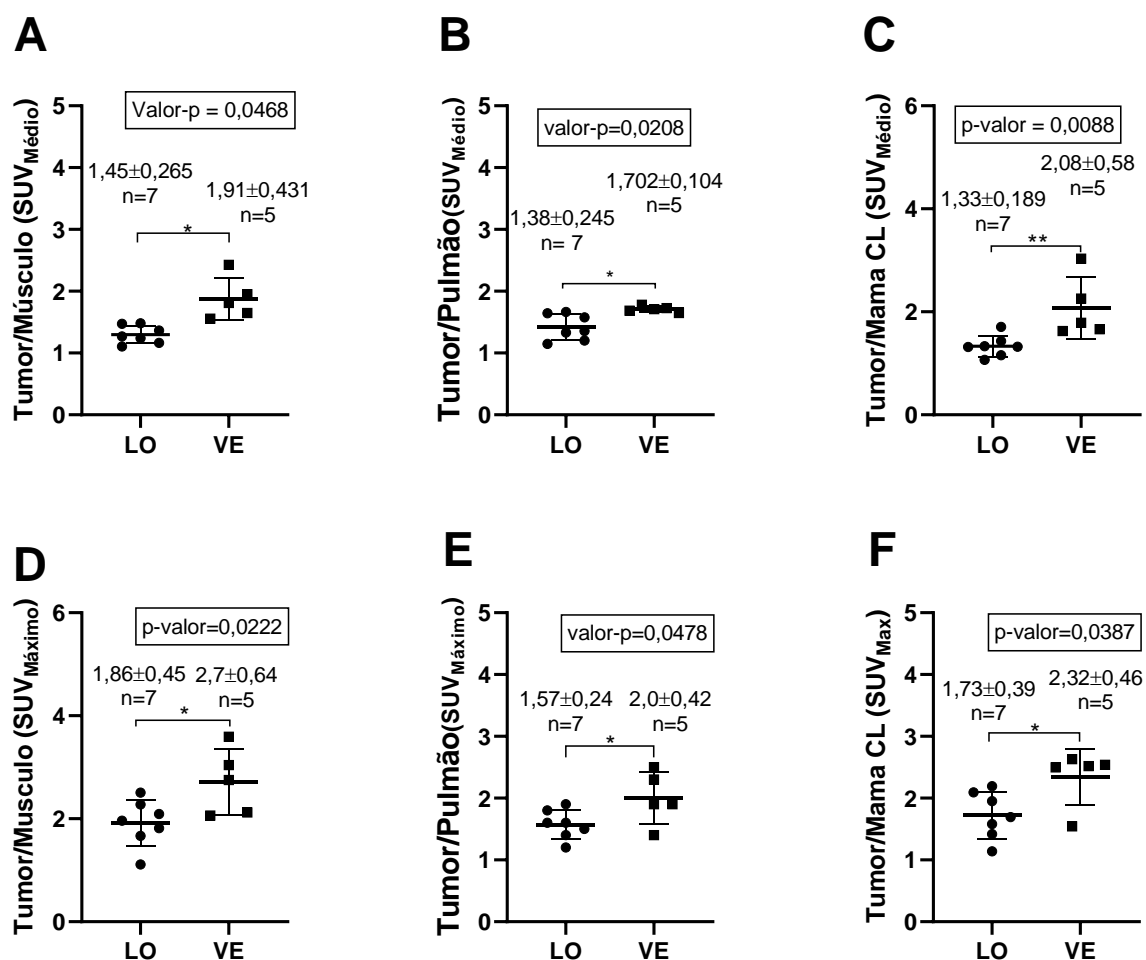


Figura 44. Análise estatística da razão tumor músculo.

Ao avaliar os dados da normalização da captação tumoral pela captação pulmonar, observou-se uma menor variabilidade nos dados (CV%= 14,80% e 21,73% para captação média e máxima respectivamente (Figura 43). E, embora a diferença entre as médias de $T/P_{\text{Médio}}$ e $T/P_{\text{Máximo}}$ tenham sido menor ($0,2939 \pm 0,09771$ e $0,4286 \pm 0,1901$) para os grupos tratado e não tratado, o nível de significância atingido ainda foi satisfatório ($p < 0,05$), corroborando com os dados anteriores de que a captação relativa do traçador é maior em indivíduos não tratados. Resultados semelhantes são verificados na normalização a partir da captação na mama contralateral onde a diferença entre as médias das razões entre $SUV_{\text{Médio}}$ foi de $0,7401 \pm 0,2387$ com $IC_{95\%}$ (0,2083; 1,272). $SUV_{\text{Máximo}}$ foi de $0,6216 \pm 0,2399$ com $IC_{95\%}$ (0,08700; 1,156) e $p < 0,05$.

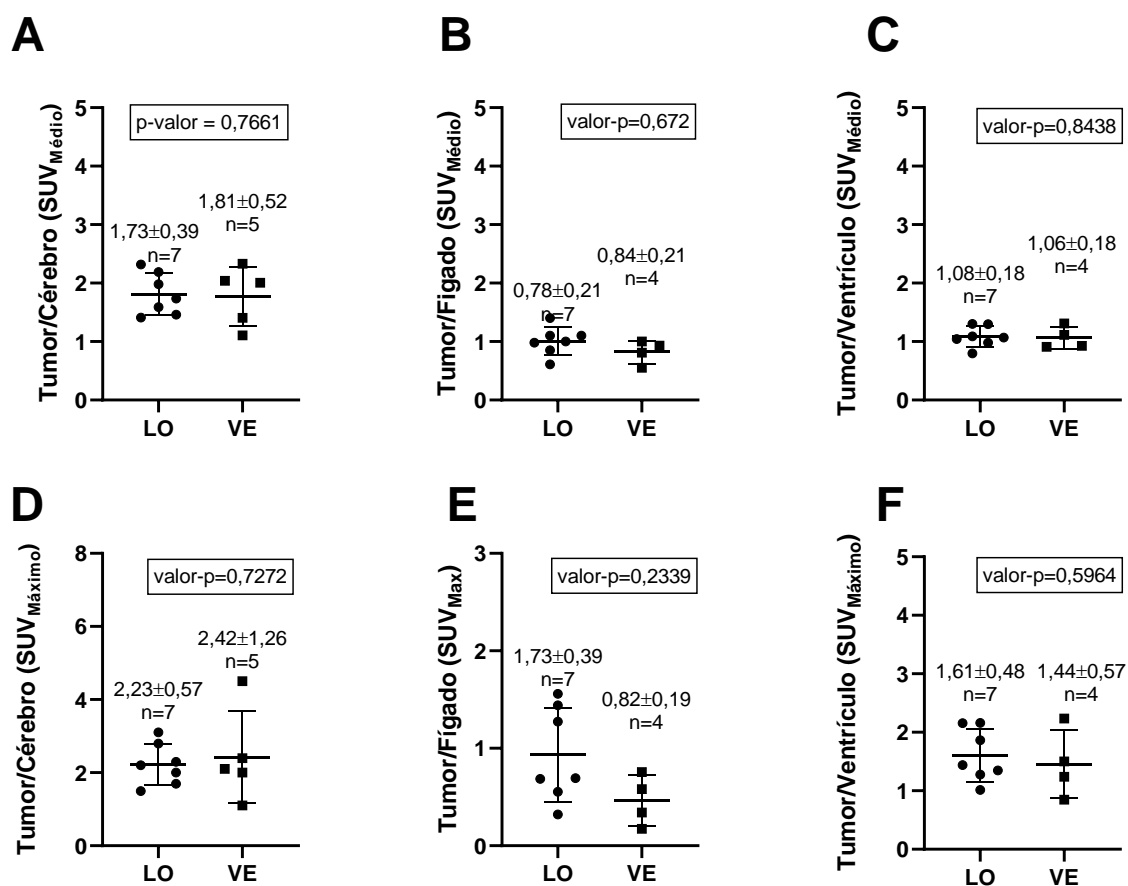


Figura 45. Análise estatística da relação tumor/cérebro.

As análises empregando a captação cerebral e “*blood surrogates*” como tecido de referência, não foram satisfatórias, embora a relação Tumor/Cérebro tenha apresentado um comportamento aproximado ao dos outros tecidos, os baixos níveis de captação no tecido levaram a uma razão com coeficiente de variação muito elevado, prejudicando a reprodutibilidade da medida e por conseguinte a determinação da diferença entre os grupos. O mesmo foi observado para a captação hepática, entretanto em ordem inversa uma vez que por se tratar de uma via de excreção do traçador, apresentou níveis de captação superiores à do tecido tumoral. O coeficiente de variação para estes dados foi o mais elevado entre os tecidos e a comparação entre os grupos tratado e controle não apresentou significância estatística. Por fim a relação tumor/Ventrículo esquerdo que também não se mostrou adequada para mensuração de diferenças entre os grupos. A similaridade observada entre os dois últimos

tecidos de referência, foi a ausência de padrão na captação, representada pela razão T/N maior do que 1 em alguns indivíduos e inferior a 1 em outros, o que os diferencia dos demais tecidos avaliados.

Invariavelmente as análises das razões entre $SUV_{Máximo}$ e $SUV_{Médio}$ para cada tecido foram concordantes, embora seja possível notar que a diferença entre as médias é quase sempre maior para as razões entre os $SUV_{Máximo}$, sugerindo uma maior sensibilidade na avaliação. O tecido pulmonar e a mama sadia se mostraram tão adequados quanto o músculo na avaliação da captação do traçador. Entretanto, devido à sua pequena dimensão e resolução relativamente baixa do equipamento, a delimitação da ROI sobre a mama sadia foi quase tão desafiadora quanto a determinação de região normocaptante no tecido muscular. O pulmão por sua vez, devido a sua enorme diferença de densidade com relação aos demais tecidos, foi o mais fácil de contornar a partir da escala de cinzas da imagem tomográfica, sendo necessário apenas algum cuidado com o efeito de espalhamento nas regiões limítrofes ao coração e fígado.

5.6.1.1. Autorradiografia

Como discutido anteriormente, a resolução das imagens tomográficas pode ser um fator limitante na interpretação dos dados. O tecido hipóxico frequente aparece margeando regiões de necrose onde a atividade do traçador deve ser muito pouca, o que o torna suscetível à diluição das contagens por efeito de volume parcial, levando a uma estimativa equivocada da extensão da hipóxia tecidual.

De modo complementar às imagens *in vivo*, a autorradiografia *ex vivo* proporciona uma visualização da distribuição do traçador em maior resolução, permitindo a discriminação da captação em nível de subtecidual, embora limitada a uma avaliação bidimensional dos parâmetros, sua resolução é da ordem de $0,1 \mu\text{m}$.

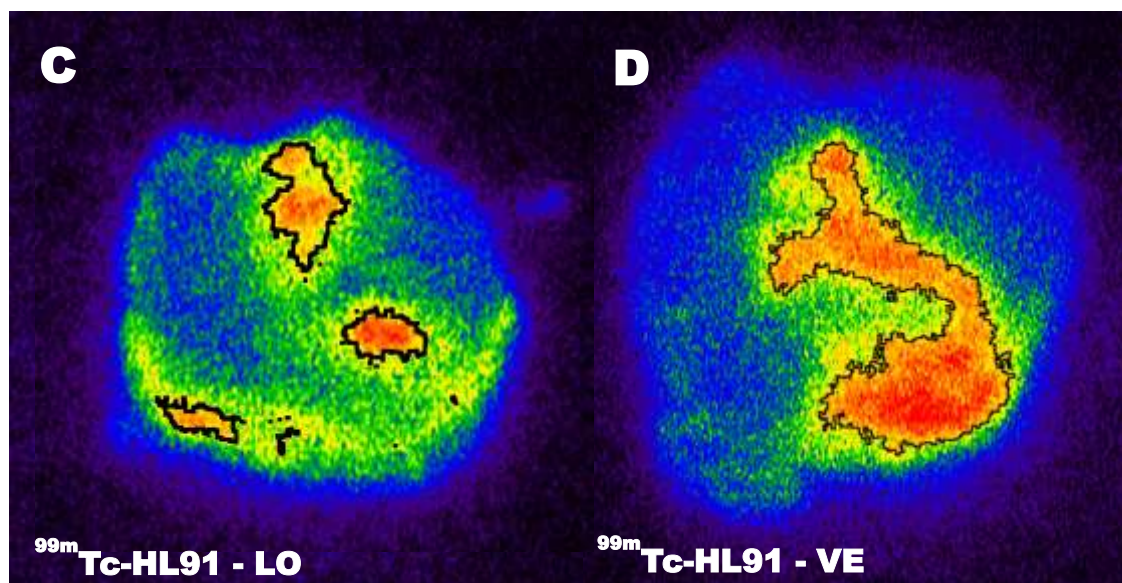


Figura 46 - Curvas padrão para determinação da concentração radioativa tecidual de [^{99m}Tc]tecnécio (A) e [^{18}F]fluor (B) nas autorradiografias.

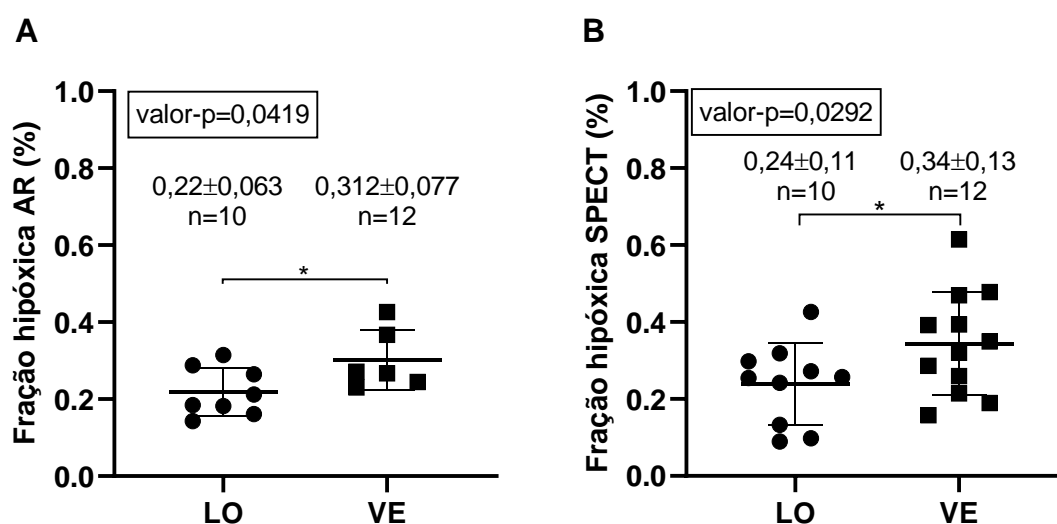


Figura 47 - Gráficos de dispersão comparando as médias entre frações hipóxicas presentes nos tumores de animais tratados (LO) e não tratados (VE) com losartana: A) Fração hipóxica avaliada por autorradiografia. B) Fração hipóxica determinada por delimitação de regiões hipercaptantes nas imagens SPECT/CT. Imagem de autorradiografia de tumores de mama 4T1 de animais tratados (D) e não tratados (C) com losartana após aquisição de imagens SPECT com [^{99m}Tc]Tc-HL91.

As imagens foram mapeadas quanto a extensão de regiões de maior intensidade de captação e os grupos tratados e controle foram comparados quanto ao percentual em hipóxia. Em ambos os casos houve uma menor fração hipóxica nas imagens autorradiográficas do grupo tratado. As médias das frações hipóxicas avaliadas por imagem tomográfica por emissão apresentam uma tendência a estar superestimadas, o que pode ser produto do efeito de volume parcial devido a menor resolução de ambas as técnicas em comparação a autorradiografia, entretanto a diferença não apresentou significância estatística.

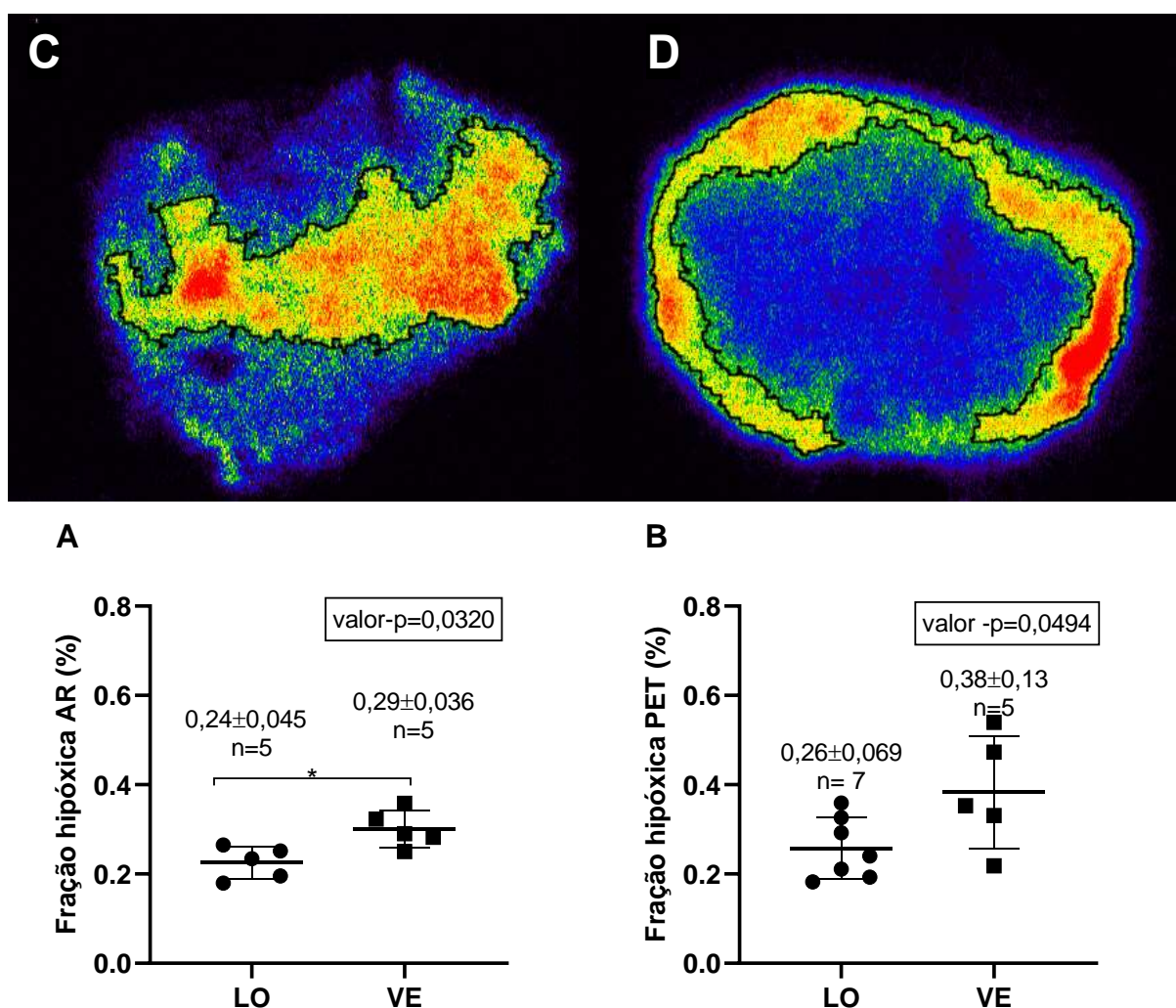


Figura 48 – Gráficos de dispersão comparando as médias entre frações hipóxicas presentes nos tumores de animais tratados (LO) e não tratados (VE) com losartana: A) Fração hipóxica avaliada por autorradiografia. B) Fração hipóxica determinada por

delimitação de regiões hipercaptantes nas imagens PET/CT. Imagem de autorradiografia de tumores de mama 4T1 de animais tratados (D) e não tratados (C) com losartana após aquisição de imagens PET com [¹⁸F]FAZA.

5.6.2. [¹⁸F]FAZA x [^{99m}Tc]Tc-HL91

A tecnologia PET possui a mais alta sensibilidade de todas as modalidades de imagem não invasivas. No entanto, a distinção entre duas fontes só pode ser realizada até o limite da resolução espacial do detector (1-2 mm) cujo fator limitante é a energia do pósitron emitido. A sensibilidade do método se baseia na detecção de fótons em coincidência de 511 keV cada um, resultantes da aniquilação do pósitron emitido. A energia constante dos fótons coincidentes permite a correção da atenuação de sinal e uma estimativa mais fiel da localização da fonte dentro desta linha de resposta, entretanto, o local onde ocorreu a aniquilação não corresponde ao local exato de onde o pósitron foi emitido, daí a natureza de sua limitação.

A sensibilidade do SPECT é uma ordem de magnitude menor do que a do PET, sendo necessárias mais contagens e por isso, mais tempo de aquisição. Uma vez que os raios γ emitidos são o evento nuclear fundamental no decaimento dos isótopos SPECT, sua resolução passa a ser sub-milimétrica, permitindo gerar imagens de pequenos objetos, como camundongos e ratos, {Jansen e Vanderheyden, 2007; Franc et al. 2008}. No entanto, pela mesma razão, a quantificação de imagens torna-se mais difícil uma vez que não há correção do sinal detectado, gerando imagens mais ruidosas, além de uma enorme perda de sinal uma vez que seu detector é composto por duas cabeças e não um anel como é o caso do PET.

Embora as imagens SPECT tenham sido adquiridas em equipamento dedicado para pequenos animais com uma excelente resolução, sua baixa sensibilidade dificultou a avaliação semi-quantitativa do estudo, gerando dados menos confiáveis em comparação as imagens PET. A qualidade das imagens SPECT também se mostrou inferior para a visualização de lesões tão reduzidas quanto os tumores analisados (<500 mm³), sobretudo quando o objeto de estudo

ocorre de maneira tão variada em nível tecidual. Entretanto, embora tenha sido necessária alguma engenharia no pós-processamento de imagem, o traçador permitiu a adequada visualização do tecido hipóxico dentro da lesão, havendo boa correlação com o observado nas imagens de autorradiografia. Quanto a mensuração do efeito da losartana sobre a hipóxia, a quantificação relativa empregando o músculo como referência, pareceu não oferecer bons resultados.

Historicamente, a quantificação em medicina nuclear progrediu dos simples estudos da captação da tireoide até a atual análise farmacocinética e do valor padrão de captação (SUV) usando PET.

As imagens PET são inerentemente quantitativas e sua análise é capaz de mensurar níveis absolutos de atividade nos tecidos, entretanto, devido às dificuldades inerentes ao trabalho com modelo animal, a avaliação de efeito do tratamento no tumor só foi possível quando empregada a quantificação relativa, assim como empregado nas imagens SPECT. Qualitativamente, as imagens são menos ruidosas e naturalmente apresentam um excelente contraste entre tumor e o fundo, sem que seja necessária a alteração da escala de cor. Quando comparamos as imagens de ambos os traçadores à imagem PET com [^{18}F]FDG, fica evidente a diferença na natureza dos processos observados e a complexidade do microambiente tumoral.

Comparativamente às imagens de hipóxia, a [^{18}F]FDG mostrou um padrão de captação bastante homogêneo ao longo da massa tumoral, enquanto [^{18}F]FAZA e [$^{99\text{mTc}}$]Tc-HL91 se distribuíram de modo heterogêneo e menos contrastante do fundo (Imagem FDG x SPECT x FAZA).

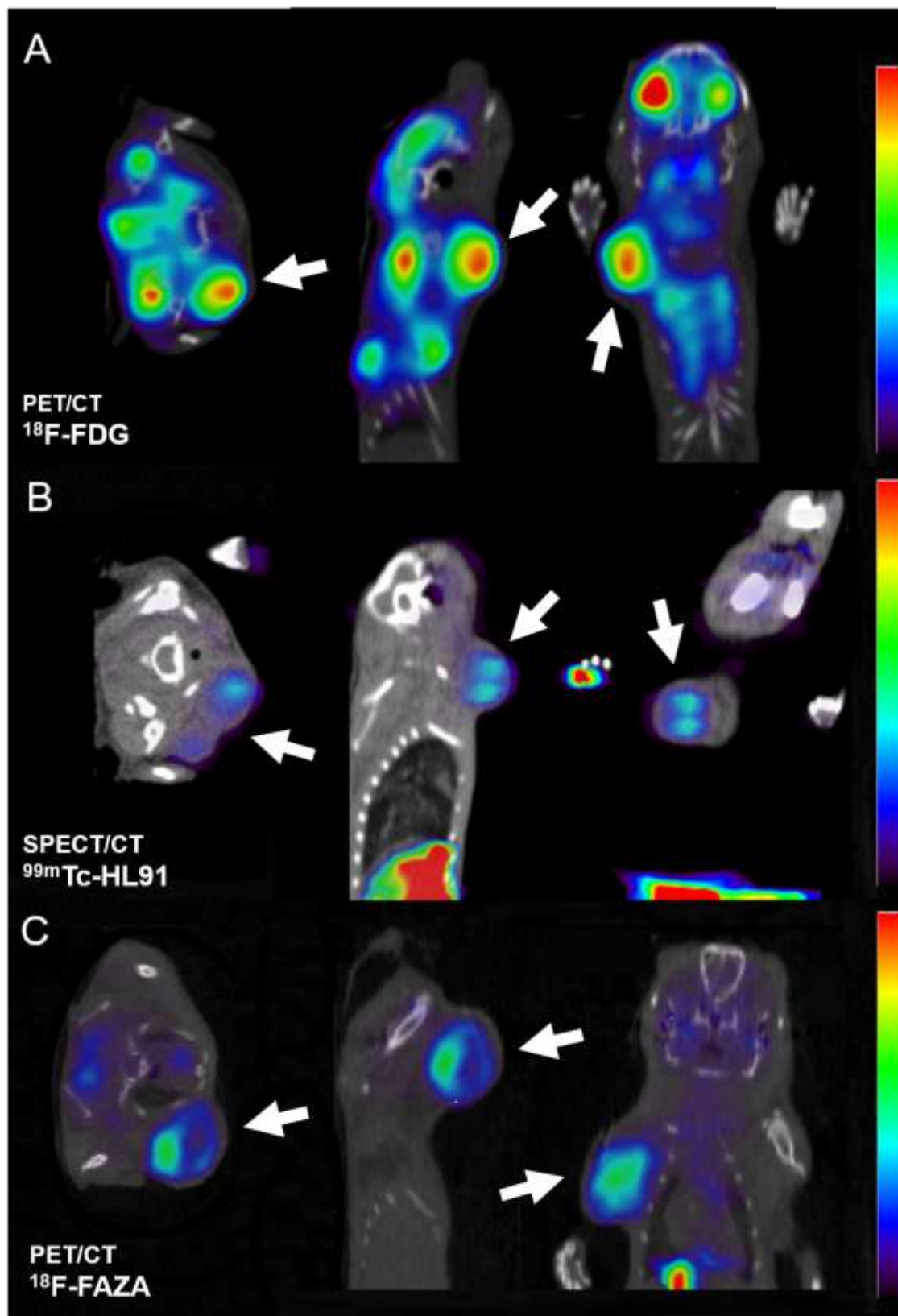


Figura 49. Imagens fusionadas: A) PET/CT com ^{18}F FDG; B) SPECT/CT com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ HL91; C) PET/CT com ^{18}F FAZA;

6. Conclusão

No tocante a obtenção dos radiofármacos, os processos foram relativamente simples e as taxas de rendimento radioquímico foram compatíveis com os valores encontrados na literatura, ambos os produtos foram obtidos com pureza radioquímica, atividade específica e concentração radioativa adequadas para o uso.

A análise dos dados obtidos demonstra que as regiões de hipóxia tumoral são caracteristicamente heterogêneas e raramente localizadas no centro do tumor (uma concepção equivocada, mas frequentemente citada no meio acadêmico). Pelo contrário, a comparação das imagens pré-clínicas com traçadores de hipóxia à imagem clássica com $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ reforça a ideia de que a hipóxia tumoral é um processo complexo, dinâmico e afetado por inúmeras variáveis temporais e espaciais e que conseqüentemente afetam a reprodutibilidade dos resultados. Embora sujeito às limitações da técnica de imagem, o traçador $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-HL91}$ demonstrou uma excelente correlação com os compostos nitroimidazólicos, comprovando sua especificidade e seletividade, uma vez que não é captado em regiões necróticas. Sua tecnologia de obtenção conta com a praticidade propiciada pelos kits liofilizados, reconstituídos com eluato do gerador nuclear mais barato e mais amplamente difundido no país e no mundo. Em contraste ao $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$ que tem sua estrutura limitada à radiohalogenação com $^{18}\text{Flúor}$, o quelante de metais HL91 tem a versatilidade de complexar o par teranóstico $^{99\text{m}}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$, o que justifica a investida em seu desenvolvimento, mesmo que a técnica de imagem não permita um estudo quantitativo de sua captação de modo tão direto quanto o primeiro. Embora pareça simples, a abordagem semi-quantitativa das imagens não é trivial, e possivelmente o estudo se beneficiaria do olhar de matemáticos e estatísticos. Outros modelos de análise foram propostos e podem vir a ser avaliados mais profundamente. O SPECT semiquantitativo, representa uma tecnologia financeiramente mais acessível e por isso mais difundida, explorar essa tecnologia seria de grande valia.

Quanto a mensuração do efeito da losartana sobre a hipóxia, ficou clara a superioridade do traçador PET $[^{18}\text{F}]\text{FAZA}$, a qualidade das imagens obtidas foi visualmente superior permitindo a clara identificação da lesão, bem como a

discriminação entre regiões hipóxicas ou não. Os radionuclídeos empregados no trabalho têm a vantagem de ser os mais amplamente empregados em suas vertentes tecnológicas, por conseguinte, estão largamente difundidos no mercado nacional, o que facilitaria a implementação e uso dos radiofármacos em todo o país. Uma grande vantagem das modalidades de imagem desenvolvidas para pequenos animais é que a tecnologia pode ser facilmente translacionada para aplicação na prática clínica, entretanto as dimensões reduzidas do modelo, a necessidade de sedação na contenção e a baixa definição das imagens certamente foram fatores limitantes na execução do estudo.

Com o advento da modalidade PET/RM, que apresenta resolução espacial e temporal e contraste superiores, estudos de correção de efeito de volume parcial podem ser elaborados permitindo uma avaliação mais sensível da hipóxia tumoral e resposta terapêutica à este tipo de intervenção. A continuidade do trabalho é fundamental para determinar a significância clínica dos parâmetros estudados e a aplicabilidade deste tipo de ensaio no apoio a elaboração de terapias individualizadas mais seguras e eficazes.

7. Referências Bibliográficas

Uncategorized References

1. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005;307(5706):58-62.
2. Martin JD, Seano G, Jain RK. Normalizing function of tumor vessels: progress, opportunities, and challenges. *Annual review of physiology*. 2019;81:505-34.
3. Thomlinson R, Gray L. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *British journal of cancer*. 1955;9(4):539.
4. Siemann DW, Horsman MR. Modulation of the tumor vasculature and oxygenation to improve therapy. *Pharmacology & therapeutics*. 2015;153:107-24.
5. Jain RK, Martin JD, Chauhan VP, Duda DG. Tumor Microenvironment. In: Niederhuber JE, Armitage JO, Kastan MB, Doroshow JH, Tepper JE, editors. *Abeloff's Clinical Oncology*. Philadelphia: Content Repository Only!; 2020. p. 108-26.e7.
6. Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor β -1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Research*. 1997;57(5):963-9.
7. Jain RK, Martin JD, Chauhan VP, Duda DG. 8 - Tumor Microenvironment: Vascular and Extravascular Compartment. In: Niederhuber JE, Armitage JO, Kastan MB, Doroshow JH, Tepper JE, editors. *Abeloff's Clinical Oncology (Sixth Edition)*. Philadelphia: Content Repository Only!; 2020. p. 108-26.e7.
8. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9(6):685-93.
9. . !!! INVALID CITATION !!! 4, 6.
10. Mehta D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev*. 2006;86(1):279-367.
11. Greenberg JI, Shields DJ, Barillas SG, Acevedo LM, Murphy E, Huang J, et al. A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation. *Nature*. 2008;456(7223):809-13.
12. Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, et al. NORMALIZATION OF THE VASCULATURE FOR TREATMENT OF CANCER AND OTHER DISEASES. *Physiological Reviews*. 2011;91(3):1071-121.
13. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *The American journal of pathology*. 2000;156(4):1363-80.
14. Jain RK. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer cell*. 2014;26(5):605-22.
15. Sherwood LM, Parris EE, Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*. 1971;285(21):1182-6.
16. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. 1993.
17. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(4):1789.
18. Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nature clinical practice Oncology*. 2006;3(1):24-40.
19. Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, O'Dwyer PJ, Mitchell EP, Alberts SR, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4)

for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *Journal of Clinical Oncology*. 2007;25(12):1539-44.

20. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(23):2335-42.

21. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(12):2013-9.

22. Tebbutt NC, Wilson K, GebSKI VJ, Cummins MM, Zannino D, Van Hazel GA, et al. Capecitabine, bevacizumab, and mitomycin in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the Australasian Gastrointestinal Trials Group Randomized Phase III MAX Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(19):3191-8.

23. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V, et al. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. *Journal of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1227-34.

24. Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(24):2542-50.

25. Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature medicine*. 2001;7(9):987-9.

26. Leone JP, Duda DG, Hu J, Barry WT, Trippa L, Gerstner ER, et al. A phase II study of cabozantinib alone or in combination with trastuzumab in breast cancer patients with brain metastases. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2020;179(1):113-23.

27. Lee C-G, Heijn M, di Tomaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, et al. Anti-vascular endothelial growth factor treatment augments tumor radiation response under normoxic or hypoxic conditions. *Cancer Research*. 2000;60(19):5565-70.

28. Yuan F, Chen Y, Dellian M, Safabakhsh N, Ferrara N, Jain RK. Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(25):14765-70.

29. Wildiers H, Guetens G, De Boeck G, Verbeken E, Landuyt B, Landuyt W, et al. Effect of antivascular endothelial growth factor treatment on the intratumoral uptake of CPT-11. *British journal of cancer*. 2003;88(12):1979-86.

30. Dickson PV, Hamner JB, Sims TL, Fraga CH, Ng CY, Rajasekeran S, et al. Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. *Clinical cancer research*. 2007;13(13):3942-50.

31. Dings RPM, Loren M, Heun H, McNeil E, Griffioen AW, Mayo KH, et al. Scheduling of Radiation with Angiogenesis Inhibitors Anginex and Avastin Improves Therapeutic Outcome via Vessel Normalization. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(11):3395-402.

32. McGee MC, Hamner JB, Williams RF, Rosati SF, Sims TL, Ng CY, et al. Improved intratumoral oxygenation through vascular normalization increases glioma sensitivity to ionizing radiation. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2010;76(5):1537-45.

33. Osada T, Chong G, Tansik R, Hong T, Spector N, Kumar R, et al. The Effect of Anti-VEGF therapy on Immature Myeloid Cell and Dendritic Cells in Cancer Patients. *Cancer immunology, immunotherapy : CII*. 2008;57(8):1115-24.

34. Gorski DH, Beckett MA, Jaskowiak NT, Calvin DP, Mauceri HJ, Salloum RM, et al. Blockade of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Research*. 1999;59(14):3374-8.

35. Ohta M, Kawabata T, Yamamoto M, Tanaka T, Kikuchi H, Hiramatsu Y, et al. TSU68, an antiangiogenic receptor tyrosine kinase inhibitor, induces tumor vascular normalization in a human cancer xenograft nude mouse model. *Surgery today*. 2009;39(12):1046-53.
36. Inai T, Mancuso M, Hashizume H, Baffert F, Haskell A, Baluk P, et al. Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Cancer Causes Loss of Endothelial Fenestrations, Regression of Tumor Vessels, and Appearance of Basement Membrane Ghosts. *The American journal of pathology*. 2004;165(1):35-52.
37. Huang Y, Yuan J, Righi E, Kamoun WS, Ancukiewicz M, Nezivar J, et al. Vascular normalizing doses of antiangiogenic treatment reprogram the immunosuppressive tumor microenvironment and enhance immunotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(43):17561-6.
38. Segawa M, Nakao S, Ogata Y, Sugiya H, Furuyama S. Angiotensin II induces prostaglandin E2 release in human gingival fibroblasts. *Life sciences*. 2003;72(7):795-803.
39. Cantelmo AR, Conradi L-C, Brajic A, Goveia J, Kalucka J, Pircher A, et al. Inhibition of the glycolytic activator PFKFB3 in endothelium induces tumor vessel normalization, impairs metastasis, and improves chemotherapy. *Cancer cell*. 2016;30(6):968-85.
40. Wenes M, Shang M, Di Matteo M, Goveia J, Martín-Pérez R, Serneels J, et al. Macrophage metabolism controls tumor blood vessel morphogenesis and metastasis. *Cell metabolism*. 2016;24(5):701-15.
41. Sawada J, Urakami T, Li F, Urakami A, Zhu W, Fukuda M, et al. Small GTPase R-Ras regulates integrity and functionality of tumor blood vessels. *Cancer cell*. 2012;22(2):235-49.
42. Takara K, Eino D, Ando K, Yasuda D, Naito H, Tsukada Y, et al. Lysophosphatidic acid receptor 4 activation augments drug delivery in tumors by tightening endothelial cell-cell contact. *Cell reports*. 2017;20(9):2072-86.
43. Adapala RK, Thoppil RJ, Ghosh K, Cappelli H, Dudley AC, Paruchuri S, et al. Activation of mechanosensitive ion channel TRPV4 normalizes tumor vasculature and improves cancer therapy. *Oncogene*. 2016;35(3):314-22.
44. Funahashi Y, Okamoto K, Adachi Y, Semba T, Uesugi M, Ozawa Y, et al. Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models. *Cancer science*. 2014;105(10):1334-42.
45. Ruiz-Casado A, Martín-Ruiz A, Pérez LM, Provencio M, Fiuza-Luces C, Lucia A. Exercise and the hallmarks of cancer. *Trends in cancer*. 2017;3(6):423-41.
46. Schadler KL, Thomas NJ, Galie PA, Bhang DH, Roby KC, Addai P, et al. Tumor vessel normalization after aerobic exercise enhances chemotherapeutic efficacy. *Oncotarget*. 2016;7(40):65429.
47. McCullough DJ, Stabley JN, Siemann DW, Behnke BJ. Modulation of blood flow, hypoxia, and vascular function in orthotopic prostate tumors during exercise. *Journal of the National Cancer Institute*. 2014;106(4):dju036.
48. Stylianopoulos T, Martin JD, Chauhan VP, Jain SR, Diop-Frimpong B, Bardeesy N, et al. Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(38):15101-8.
49. Mpekris F, Papageorgis P, Polydorou C, Voutouri C, Kalli M, Pirentis AP, et al. Sonic-hedgehog pathway inhibition normalizes desmoplastic tumor microenvironment to improve chemo-and nanotherapy. *Journal of Controlled Release*. 2017;261:105-12.
50. Jacobetz MA, Chan DS, Neesse A, Bapiro TE, Cook N, Frese KK, et al. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut*. 2013;62(1):112-20.

51. Chauhan VP, Boucher Y, Ferrone CR, Roberge S, Martin JD, Stylianopoulos T, et al. Compression of pancreatic tumor blood vessels by hyaluronan is caused by solid stress and not interstitial fluid pressure. *Cancer cell*. 2014;26(1):14-5.
52. Matuszewska K, Santry LA, Van Vloten JP, AuYeung AW, Major PP, Lawler J, et al. Combining vascular normalization with an oncolytic virus enhances immunotherapy in a preclinical model of advanced-stage ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*. 2019;25(5):1624-38.
53. Castellano M, Muiesan ML, Rizzoni D, Beschi M, Pasini G, Cinelli A, et al. Angiotensin-converting enzyme I/D polymorphism and arterial wall thickness in a general population: the Vobarno Study. *Circulation*. 1995;91(11):2721-4.
54. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini D, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacological Reviews*. 1993;45(2):205-51.
55. Otake AH, Mattar AL, Freitas HC, Machado CML, Nonogaki S, Fujihara CK, et al. Inhibition of angiotensin II receptor 1 limits tumor-associated angiogenesis and attenuates growth of murine melanoma. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2010;66(1):79-87.
56. Ciobica A, Bild W, Hritcu L, Haulica I. Brain renin-angiotensin system in cognitive function: pre-clinical findings and implications for prevention and treatment of dementia. *Acta neurologica belgica*. 2009;109(3):171.
57. Strawn WB, Richmond RS, Ann Tallant E, Gallagher PE, Ferrario CM. Renin-angiotensin system expression in rat bone marrow haematopoietic and stromal cells. *British journal of haematology*. 2004;126(1):120-6.
58. Engeli S, Schling P, Gorzelniak K, Boschmann M, Janke J, Ailhaud G, et al. The adipose-tissue renin-angiotensin-aldosterone system: role in the metabolic syndrome? *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2003;35(6):807-25.
59. Obermüller N, Gentili M, Gauer S, Gretz N, Weigel M, Geiger H, et al. Immunohistochemical and mRNA Localization of the Angiotensin II Receptor Subtype 2 (AT2) in Follicular Granulosa Cells of the Rat Ovary. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2004;52(4):545-8.
60. Grove KL, Speth RC, Zamora CS, Pullman W. Renin-Angiotensin System in Male Reproductive Organs. *Brain-gut Peptides and Reproductive Function*. 2020:43-59.
61. Melo MR, Gasparini S, Silva EF, Karlen-Amarante M, Speretta GF, Lauar MR, et al. Renovascular hypertension elevates pulmonary ventilation in rats by carotid body-dependent mechanisms. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2020;318(4):R730-R42.
62. Bataller R, Sancho-Bru P, Ginès P, Brenner DA. Liver fibrogenesis: a new role for the renin-angiotensin system. *Antioxidants & redox signaling*. 2005;7(9-10):1346-55.
63. Ohuchi N, Koike K, Sano M, Kusama T, Kizawa Y, Hayashi K, et al. Proliferative effects of angiotensin II and endothelin-1 on guinea pig gingival fibroblast cells in culture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2002;132(4):451-60.
64. Rhodes DR, Ateeq B, Cao Q, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, et al. AGTR1 overexpression defines a subset of breast cancer and confers sensitivity to losartan, an AGTR1 antagonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(25):10284-9.
65. Gore-Hyer E, Shegogue D, Markiewicz M, Lo S, Hazen-Martin D, Greene EL, et al. TGF- β and CTGF have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2002;283(4):F707-F16.
66. Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, Vidaud M, Segarini P, Bedossa P. Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Laboratory investigation*. 2002;82(6):767-74.

67. Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *The FASEB Journal*. 2004;18(3):469-79.
68. Yang H, Huang Y, Chen X, Liu J, Lu Y, Bu L, et al. The role of CTGF in the diabetic rat retina and its relationship with VEGF and TGF- β 2, elucidated by treatment with CTGFsiRNA. *Acta Ophthalmologica*. 2010;88(6):652-9.
69. Warren JB, Loi R. Captopril increases skin microvascular blood flow secondary to bradykinin, nitric oxide, and prostaglandins. *The FASEB journal*. 1995;9(5):411-8.
70. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(11):2567.
71. Muramatsu M, Katada J, Hayashi I, Majima M. Chymase as a Proangiogenic Factor A POSSIBLE INVOLVEMENT OF CHYMASE-ANGIOTENSIN-DEPENDENT PATHWAY IN THE HAMSTER SPONGE ANGIOGENESIS MODEL. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(8):5545-52.
72. Piert M, Machulla H-J, Picchio M, Reischl G, Ziegler S, Kumar P, et al. Hypoxia-specific tumor imaging with ¹⁸F-fluoroazomycin arabinoside. *Journal of Nuclear Medicine*. 2005;46(1):106-13.
73. Croquet V, Moal F, Veal N, Wang J, Oberti F, Roux J, et al. Hemodynamic and antifibrotic effects of losartan in rats with liver fibrosis and/or portal hypertension. *Journal of hepatology*. 2002;37(6):773-80.
74. Spurney CF, Sali A, Gueron AD, Iantorno M, Yu Q, Gordish-Dressman H, et al. Losartan decreases cardiac muscle fibrosis and improves cardiac function in dystrophin-deficient mdx mice. *Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics*. 2011;16(1):87-95.
75. Yao Y, Li Y, Zeng X, Ye Z, Li X, Zhang L. Losartan alleviates renal fibrosis and inhibits endothelial-to-mesenchymal transition (EMT) under high-fat diet-induced hyperglycemia. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1213.
76. Yao HW, Zhu JP, Zhao MH, Lu Y. Losartan attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respiration*. 2006;73(2):236-42.
77. Diop-Frimpong B, Chauhan VP, Krane S, Boucher Y, Jain RK. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(7):2909-14.
78. Yoshiji H, Kuriyama S, Kawata M, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, et al. The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor perindopril suppresses tumor growth and angiogenesis: possible role of the vascular endothelial growth factor. *Clinical cancer research*. 2001;7(4):1073-8.
79. Noguchi R, Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Yanase K, et al. Combination of interferon- β and the angiotensin-converting enzyme inhibitor, perindopril, attenuates murine hepatocellular carcinoma development and angiogenesis. *Clinical cancer research*. 2003;9(16):6038-45.
80. Chauhan VP, Martin JD, Liu H, Lacorre DA, Jain SR, Kozin SV, et al. Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nature communications*. 2013;4:2516.
81. Chauhan VP, Martin JD, Liu H, Lacorre DA, Jain SR, Kozin SV, et al. Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nature communications*. 2013;4.
82. Zhao Y, Cao J, Melamed A, Worley M, Gockley A, Jones D, et al. Losartan treatment enhances chemotherapy efficacy and reduces ascites in ovarian cancer models by normalizing the tumor stroma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2019;116(6):2210-9.
83. Ziessman HA, O'Malley JP, Thrall JH. *Medicina nuclear: Elsevier Brasil*; 2014.

84. Gray LH, Conger AD, Ebert M, Hornsey S, Scott O. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy. *The British journal of radiology*. 1953;26(312):638-48.
85. Rey S, Schito L, Koritzinsky M, Wouters BG. Molecular targeting of hypoxia in radiotherapy. *Advanced drug delivery reviews*. 2017;109:45-62.
86. Begg K, Tavassoli M. Inside the hypoxic tumour: reprogramming of the DDR and radioresistance. *Cell Death Discovery*. 2020;6(1):1-15.
87. Rockwell S, Dobrucki IT, Kim EY, Marrison ST, Vu VT. Hypoxia and radiation therapy: Past history, ongoing research, and future promise. *Current molecular medicine*. 2009;9(4):442-58.
88. Vaupel P, Höckel M, Mayer A. Detection and characterization of tumor hypoxia using pO₂ histography. *Antioxid Redox Signal*. 2007;9(8):1221-35.
89. McKeown S. Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response. *The British journal of radiology*. 2014;87(1035):20130676.
90. Hall EJ, Giaccia AJ. *Radiobiology for the Radiologist*: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
91. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature Reviews Cancer*. 2008;8(6):425-37.
92. Fanti S, Farsad M, Mansi L. *PET-CT beyond FDG: a quick guide to image interpretation*: Springer Science & Business Media; 2010.
93. Mahon PC, Hirota K, Semenza GL. FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1 α and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity. *Genes Dev*. 2001;15(20):2675-86.
94. Lando D, Peet DJ, Gorman JJ, Whelan DA, Whitelaw ML, Bruick RK. FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & development*. 2002;16(12):1466-71.
95. Yu L, Chen X, Wang L, Chen S. The sweet trap in tumors: aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget*. 2016.
96. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2003;3(10):721-32.
97. Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu C-J, et al. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & development*. 2006;20(5):557-70.
98. Wu C, Zhu J, Baeslack J, Zaremba A, Hecker J, Kraso J, et al. Longitudinal positron emission tomography imaging for monitoring myelin repair in the spinal cord. *Annals of neurology*. 2013;74(5):688-98.
99. Duan C. Hypoxia-inducible factor 3 biology: Complexities and emerging themes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2015;ajpcell. 00315.2015.
100. Pan S-Y, Chiang W-C, Chen Y-M. The journey from erythropoietin to 2019 Nobel Prize: Focus on hypoxia-inducible factors in the kidney. *Journal of the Formosan Medical Association*. 2020.
101. Rodgers B, Kotlyarov E. Current Challenges for Imaging of Hypoxia in 2019. *Journal of Nuclear Medicine*. 2019;60(supplement 1):1128-.
102. Machulla H-J. *Imaging of hypoxia: tracer developments*: Springer Science & Business Media; 1999.
103. Tran E, Hamilton S, Wilson D, Benard F, Tran A, Lacroix-Poisson F, et al., editors. Non-invasive imaging of tumour hypoxia using EF5 and PET-CT in head and neck cancer: A pilot study. *Radiotherapy and Oncology*; 2019: ELSEVIER IRELAND LTD ELSEVIER HOUSE, BROOKVALE PLAZA, EAST PARK SHANNON, CO
104. Paulai FR, Serrano SHP, Tavares LC. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Química Nova*. 2009;32(4):1013-20.
105. Deshayes F, Nahmias C. Angiotensin receptors: a new role in cancer? *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2005;16(7):293-9.

106. Kizaka-Kondoh S, Konse-Nagasawa H. Significance of nitroimidazole compounds and hypoxia-inducible factor-1 for imaging tumor hypoxia. *Cancer science*. 2009;100(8):1366-73.
107. Raleigh J, Chou S, Arteel G, Horsman M. Comparisons among pimonidazole binding, oxygen electrode measurements, and radiation response in C3H mouse tumors. *Radiation research*. 1999;151(5):580-9.
108. Cline J, Thrall D, Page R, Franko A, Raleigh J. Immunohistochemical detection of a hypoxia marker in spontaneous canine tumours. *British journal of cancer*. 1990;62(6):925-31.
109. Chapman J, Franko A, Sharplin J. A marker for hypoxic cells in tumours with potential clinical applicability. *British Journal of Cancer*. 1981;43(4):546.
110. Rasey JS, Grunbaum Z, Magee S, Nelson NJ, Olive PL, Durand RE, et al. Characterization of radiolabeled fluoromisonidazole as a probe for hypoxic cells. *Radiation research*. 1987;111(2):292-304.
111. Grönroos TJ, Minn H, Hicks RJ. Imaging of Hypoxia with PET-CT. *PET-CT Beyond FDG A Quick Guide to Image Interpretation*: Springer; 2010. p. 181-93.
112. Troost EG, Laverman P, Philippens ME, Lok J, van der Kogel AJ, Oyen WJ, et al. Correlation of [18 F] FMISO autoradiography and pimonidazole immunohistochemistry in human head and neck carcinoma xenografts. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2008;35(10):1803-11.
113. Peeters SG, Zegers CM, Lieuwes NG, van Elmpt W, Eriksson J, van Dongen GA, et al. A comparative study of the hypoxia PET tracers [18F] HX4, [18F] FAZA, and [18F] FMISO in a preclinical tumor model. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2015;91(2):351-9.
114. Dubois L, Peeters S, Zegers C, Lambin P, Yaromina A, van Elmpt W. Current preclinical and clinical applications of hypoxia PET imaging using 2-nitroimidazoles. *Quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2015;59.
115. Kersemans V, Cornelissen B, Hueting R, Tredwell M, Hussien K, Allen PD, et al. Hypoxia imaging using PET and SPECT: the effects of anesthetic and carrier gas on [64 Cu]-ATSM, [99m Tc]-HL91 and [18 F]-FMISO tumor hypoxia accumulation. *PLoS One*. 2011;6(11):e25911.
116. Sorace AG, Syed AK, Barnes SL, Quarles CC, Sanchez V, Kang H, et al. Quantitative [18 F] FMISO PET imaging shows reduction of hypoxia following trastuzumab in a murine model of HER2+ breast cancer. *Molecular imaging and biology*. 2017;19(1):130-7.
117. Löck S, Perrin R, Seidlitz A, Bandurska-Luque A, Zschaek S, Zöphel K, et al. Residual tumour hypoxia in head-and-neck cancer patients undergoing primary radiochemotherapy, final results of a prospective trial on repeat FMISO-PET imaging. *Radiotherapy and Oncology*. 2017;124(3):533-40.
118. Thorwarth D, Eschmann SM, Paulsen F, Alber M. A kinetic model for dynamic [18F]-Fmiso PET data to analyse tumour hypoxia. *Physics in Medicine & Biology*. 2005;50(10):2209.
119. Lin Z, Mechalakos J, Nehmeh S, Schoder H, Lee N, Humm J, et al. The influence of changes in tumor hypoxia on dose-painting treatment plans based on 18F-FMISO positron emission tomography. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 2008;70(4):1219-28.
120. Mortensen LS, Buus S, Nordmark M, Bentzen L, Munk OL, Keiding S, et al. Identifying hypoxia in human tumors: a correlation study between 18F-FMISO PET and the Eppendorf oxygen-sensitive electrode. *Acta oncologica*. 2010;49(7):934-40.
121. Hendrickson K, Phillips M, Smith W, Peterson L, Krohn K, Rajendran J. Hypoxia imaging with [F-18] FMISO-PET in head and neck cancer: Potential for guiding intensity modulated radiation therapy in overcoming hypoxia-induced treatment resistance. *Radiotherapy and Oncology*. 2011;101(3):369-75.

122. Busk M, Munk OL, Jakobsen S, Wang T, Skals M, Steiniche T, et al. Assessing hypoxia in animal tumor models based on pharmacokinetic analysis of dynamic FAZA PET. *Acta Oncologica*. 2010;49(7):922-33.
123. Juergens S, Herrmann WA, Kuehn FE. Rhenium and technetium based radiopharmaceuticals: Development and recent advances. *Journal of Organometallic Chemistry*. 2014;751:83-9.
124. Lepareur N, Lacœuille F, Bouvry C, Hindré F, Garcion E, Chérel M, et al. Rhenium-188 Labeled Radiopharmaceuticals: Current Clinical Applications in Oncology and Promising Perspectives. *Frontiers in Medicine*. 2019;6(132).
125. Nanjappan P, Raju N, Ramalingam K, Nowotnik DP. An efficient synthesis of some 6-substituted 4,8-diaza-3,3,9,9-tetramethylundeca-2,10-dione dioximes (propylene amine oximes, PnAOs): Ligands for ^{99m}Tc complexes used in structure distribution relationship (SDR) studies. *Tetrahedron*. 1994;50(29):8617-32.
126. Linder KE, Chan YW, Cyr JE, Malley MF, Nowotnik DP, Nunn AD. TcO (PnAO-1-(2-nitroimidazole))[BMS-181321], a new technetium-containing nitroimidazole complex for imaging hypoxia: synthesis, characterization, and xanthine oxidase-catalyzed reduction. *Journal of medicinal chemistry*. 1994;37(1):9-17.
127. Archer C, Edwards B, Kelly J, King A, Burke J, Riley A. Technetium labelled agents for imaging tissue hypoxia in vivo. *Technetium and rhenium in chemistry and nuclear medicine*. 1995;4:535-9.
128. Archer CM, Edwards B, Powell NA. Radiopharmaceuticals for imaging hypoxia. *Current directions in radiopharmaceutical research and development*: Springer; 1996. p. 81-8.
129. Zhang X, Melo T, Ballinger J, Rauth A. Studies of ^{99m}Tc-BnAO (HL-91): a non-nitroaromatic compound for hypoxic cell detection. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 1998;42(4):737-40.
130. Siim BG, Laux WT, Rutland MD, Palmer BN, Wilson WR. Scintigraphic imaging of the hypoxia marker ^{99m}technetium-labeled 2, 2'-(1, 4-diaminobutane) bis (2-methyl-3-butanone) dioxime (^{99m}Tc-labeled HL-91; Prognox): noninvasive detection of tumor response to the antivascular agent 5, 6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *Cancer research*. 2000;60(16):4582-8.
131. Iyer RV, Haynes PT, Schneider RF, Movsas B, Chapman JD. Marking hypoxia in rat prostate carcinomas with β -D-[125I] azomycin galactopyranoside and [^{99m}Tc] HL-91: correlation with microelectrode measurements. *Journal of Nuclear Medicine*. 2001;42(2):337-44.
132. Lee B-f, Chiu N-t, Hsia C-c, Shen L-h. Accumulation of Tc-^{99m} HL91 in tumor hypoxia: in vitro cell culture and in vivo tumor model. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2008;24(9):461-72.
133. Jia H-M, Fang D-C, Feng Y, Zhang J-Y, Fan W-B, Zhu L. The interconversion mechanism between TcO₃⁺ and TcO₂⁺ core of ^{99m}Tc labeled amine-oxime (AO) complexes. *Theoretical Chemistry Accounts*. 2008;121(5-6):271-8.
134. Suzuki T, Nakamura K, Kawase T, Kubo A. Biodistribution of hypoxic marker, ^{99m}Tc-HL91 (4, 9-diaza-3, 3, 10, 10-tetramethyldodecan-2, 11-dione dioxime). *Kaku igaku The Japanese Journal of Nuclear Medicine*. 2001;38(4):333-41.
135. Suzuki T, Nakamura K, Kawase T, Kubo A. Monitoring of response to radiation therapy for human tumor xenografts using ^{99m}Tc-HL91 (4,9-diaza-3,3,10,10-tetramethyldodecan-2,11-dione dioxime). *Annals of Nuclear Medicine*. 2003;17(2):131.
136. Cook GJ, Houston S, Barrington SF, Fogelman I. Technetium-^{99m}-labeled HL91 to identify tumor hypoxia: correlation with fluorine-18-FDG. *Journal of Nuclear Medicine*. 1998;39(1):99-103.
137. Zhang X, Melo T, Rauth A, Ballinger JR. Cellular accumulation and retention of the technetium-^{99m}-labelled hypoxia markers BRU59-21 and butylene amine oxime. *Nuclear medicine and biology*. 2001;28(8):949-57.

138. Honess DJ, Hill SA, Collingridge DR, Edwards B, Brauers G, Powell NA, et al. Preclinical evaluation of the novel hypoxic marker ^{99m}Tc -HL91 (prognox) in murine and xenograft systems *in vivo*. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*. 1998;42(4):731-5.
139. RA Pillai M, Dash A, F Knapp F. Rhenium-188: availability from the $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generator and status of current applications. *Current radiopharmaceuticals*. 2012;5(3):228-43.
140. Khalil MM, Tremoleda JL, Bayomy TB, Gsell W. Molecular SPECT imaging: an overview. *International journal of molecular imaging*. 2011;2011.
141. Stabin MG. *Fundamentals of nuclear medicine dosimetry*: Springer Science & Business Media; 2008.
142. Maina T, Konijnenberg MW, KolencPeitl P, Garnuszek P, Nock BA, Kaloudi A, et al. Preclinical pharmacokinetics, biodistribution, radiation dosimetry and toxicity studies required for regulatory approval of a phase I clinical trial with ^{111}In -CP04 in medullary thyroid carcinoma patients. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;91:236-42.
143. BRASIL R. No. 64; de 18 de dezembro de 2009. DOU 23/12/2009. Dispõe sobre o registro de radiofármacos. Anvisa; 2009.
144. Mengatti J. O estado da arte na produção de radiofármacos no Brasil. XI ENAN. 2013.
145. Cunha L, Horvath I, Ferreira S, Lemos J, Costa P, Vieira D, et al. Preclinical imaging: an essential ally in modern biosciences. *Molecular diagnosis & therapy*. 2014;18(2):153-73.
146. Bogdanov A, Licha K. *Molecular imaging: an essential tool in preclinical research, diagnostic imaging, and therapy*: Springer Science & Business Media; 2004.
147. Kagadis GC, Ford NL, Karnabatidis DN, Loudos GK. *Handbook of Small Animal Imaging: Preclinical Imaging, Therapy, and Applications*: CRC Press; 2016.
148. Kiessling F, Pichler BJ. *Small animal imaging: basics and practical guide*: Springer Science & Business Media; 2010.
149. Klingensmith WC. Overview of Part II: Mathematics of the Biodistribution of Radiopharmaceuticals. *The Mathematics and Biology of the Biodistribution of Radiopharmaceuticals-A Clinical Perspective*: Springer; 2016. p. 29-32.
150. Elgazzar AH, Alenezi S. *Basic Principles of Nuclear Medicine. A Concise Guide to Nuclear Medicine*: Springer; 2020. p. 1-11.
151. Willowson KP. Production of radionuclides for clinical nuclear medicine. *European Journal of Physics*. 2019;40(4):043001.
152. Saha GB, Saha GB. *Fundamentals of nuclear pharmacy*: Springer; 2010.
153. Bonatti E. SR Cherry, JA Sorenson, ME Phelps, *PHYSICS IN NUCLEAR MEDICINE*, Saunders, Philadelphia, PA (2003), 523 pages, 319 illustrations. Elsevier; 2004.
154. Yap JT, Hall NC, Townsend DW, Wall JS, Solomon A, Kabalka GW, et al., editors. *Combined Clinical PET/CT and MicroPET small animal imaging*. IEEE Symposium Conference Record Nuclear Science 2004; 2004: IEEE.
155. Phelps ME. *PET: molecular imaging and its biological applications*: Springer Science & Business Media; 2004.
156. Gong K, Berg E, Cherry SR, Qi J. Machine learning in PET: from photon detection to quantitative image reconstruction. *Proceedings of the IEEE*. 2019;108(1):51-68.
157. Carrió I. H.-J. Biersack, LM Freeman (eds): *Clinical nuclear medicine*. Springer; 2009.
158. Couceiro M, Blanco A, Ferreira NC, Marques RF, Fonte P, Lopes L. RPC–PET: Status and perspectives. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*. 2007;580(2):915-8.

159. Williams LE, Zanzonico P. Radiopharmaceuticals: Introduction to Drug Evaluation and Dose Estimation. *MedPh*. 2012;39(5):2949.
160. Lewis DH, Bluestone JP, Savina M, Zoller WH, Meshberg EB, Minoshima S. Imaging cerebral activity in recovery from chronic traumatic brain injury: a preliminary report. *Journal of Neuroimaging*. 2006;16(3):272-7.
161. Ritt P, Sanders J, Kuwert T. SPECT/CT technology. *Clinical and Translational Imaging*. 2014;2(6):445-57.
162. Manceau V, Palard X, Rolland Y, Pracht M, Le Sourd S, Laffont S, et al. A MAA-based dosimetric study in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma treated with a combination of chemotherapy and 90 Y-loaded glass microsphere selective internal radiation therapy. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2018;45(10):1731-41.
163. Scully PR, Morris E, Patel KP, Treibel TA, Burniston M, Klotz E, et al. DPD quantification in cardiac amyloidosis: a novel imaging biomarker. *JACC: Cardiovascular Imaging*. 2020;13(6):1353-63.
164. Maltais DD, Jordan LG, Min H-K, Miyawaga T, Pryzbleski S, Lesnick TG, et al. Confirmation of 123I-FP-CIT-SPECT (ioflupane) quantification methods in dementia with Lewy body and other neurodegenerative disorders. *Journal of Nuclear Medicine*. 2020;jnumed. 119.239418.
165. Chua S. *Pet/ct in Radiotherapy Planning*: Springer; 2017.
166. Soret M, Bacharach SL, Buvat I. Partial-volume effect in PET tumor imaging. *Journal of nuclear medicine*. 2007;48(6):932-45.
167. Thie JA. Understanding the standardized uptake value, its methods, and implications for usage. *Journal of Nuclear Medicine*. 2004;45(9):1431-4.
168. Gallivanone F, Stefano A, Grosso E, Canevari C, Gianolli L, Messa C, et al. PVE correction in PET-CT whole-body oncological studies from PVE-affected images. *IEEE Transactions on Nuclear Science*. 2011;58(3):736-47.
169. van den Hoff J, Oehme L, Schramm G, Maus J, Lougovski A, Petr J, et al. The PET-derived tumor-to-blood standard uptake ratio (SUR) is superior to tumor SUV as a surrogate parameter of the metabolic rate of FDG. *EJNMMI research*. 2013;3(1):1-8.
170. Hoetjes NJ, van Velden FH, Hoekstra OS, Hoekstra CJ, Krak NC, Lammertsma AA, et al. Partial volume correction strategies for quantitative FDG PET in oncology. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2010;37(9):1679-87.
171. Dawood M, Jiang X, Schäfers K. *Correction Techniques in Emission Tomography*: CRC Press; 2012.
172. Xu Z, Gao M, Papadakis GZ, Luna B, Jain S, Mollura DJ, et al. Joint solution for PET image segmentation, denoising, and partial volume correction. *Medical image analysis*. 2018;46:229-43.
173. Abrantes AM, Serra MES, Gonçalves AC, Rio J, Oliveiros B, Laranjo M, et al. Hypoxia-induced redox alterations and their correlation with 99mTc-MIBI and 99mTc-HL-91 uptake in colon cancer cells. *Nuclear medicine and biology*. 2010;37(2):125-32.
174. Commission EP. *European pharmacopoeia*: Maisonneuve; 1980.
175. Reischl G, Ehrlichmann W, Bieg C, Solbach C, Kumar P, Wiebe L, et al. Preparation of the hypoxia imaging PET tracer [18F] FAZA: reaction parameters and automation. *Applied Radiation and Isotopes*. 2005;62(6):897-901.
176. Kocatürk B, Versteeg HH. Orthotopic injection of breast cancer cells into the mammary fat pad of mice to study tumor growth. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2015(96):e51967.
177. Togo S, Shimada H, Kubota T, Moossa A, Hoffman RM. Host organ specifically determines cancer progression. *Cancer research*. 1995;55(3):681-4.
178. Goddio MV, Gattelli A, Slomiansky V, Lacunza E, Gingerich T, Tocci JM, et al. Mammary differentiation induces expression of Tristetraprolin, a tumor suppressor AU-rich mRNA-binding protein. *Breast cancer research and treatment*. 2012;135(3):749-58.

179. Shaw TJ, Senterman MK, Dawson K, Crane CA, Vanderhyden BC. Characterization of intraperitoneal, orthotopic, and metastatic xenograft models of human ovarian cancer. *Molecular therapy*. 2004;10(6):1032-42.
180. Wahl RL, Henry CA, Ethier SP. Serum glucose: effects on tumor and normal tissue accumulation of 2-[F-18]-fluoro-2-deoxy-D-glucose in rodents with mammary carcinoma. *Radiology*. 1992;183(3):643-7.
181. Srinivas SM, Dhurairaj T, Basu S, Bural G, Surti S, Alavi A. A recovery coefficient method for partial volume correction of PET images. *Annals of nuclear medicine*. 2009;23(4):341-8.
182. Aide N, Lasnon C, Veit-Haibach P, Sera T, Sattler B, Boellaard R. EANM/EARL harmonization strategies in PET quantification: from daily practice to multicentre oncological studies. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 2017;44(1):17-31.
183. Enoka RM, Duchateau J. Muscle fatigue: what, why and how it influences muscle function. *The Journal of physiology*. 2008;586(1):11-23.
184. Bollineni VR, Kerner GS, Pruij J, Steenbakkers RJ, Wiegman EM, Koole MJ, et al. PET imaging of tumor hypoxia using 18F-fluoroazomycin arabinoside in stage III–IV non–small cell lung cancer patients. *Journal of Nuclear Medicine*. 2013;54(8):1175-80.
185. Havelund BM, Holdgaard PC, Rafaelsen SR, Mortensen LS, Theil J, Bender D, et al. Tumour hypoxia imaging with 18F-fluoroazomycin arabinofuranoside PET/CT in patients with locally advanced rectal cancer. *Nuclear medicine communications*. 2013;34(2):155-61.
186. Kersemans V, Cornelissen B, Hueting R, Tredwell M, Hussien K, Allen PD, et al. Hypoxia imaging using PET and SPECT: the effects of anesthetic and carrier gas on [64Cu]-ATSM, [99mTc]-HL91 and [18F]-FMISO tumor hypoxia accumulation. *PLoS One*. 2011;6(11):e25911.
187. Hung G-U, Weng Y-C, Lin W-Y, Wang S-J, Hsia C-C, Wey S-P, et al. Preliminary study of 99mTc-HL91 on a tumor mouse model. *Ann Nucl Med Sci*. 2002;15:85-91.
188. Belloli S, Brioschi A, Politi LS, Ronchetti F, Calderoni S, Raccagni I, et al. Characterization of biological features of a rat F98 GBM model: a PET-MRI study with [18F] FAZA and [18F] FDG. *Nuclear Medicine and Biology*. 2013;40(6):831-40.
189. Vanhove C, Bankstahl JP, Krämer SD, Visser E, Belcari N, Vandenberghe S. Accurate molecular imaging of small animals taking into account animal models, handling, anaesthesia, quality control and imaging system performance. *EJNMMI physics*. 2015;2(1):1-25.
190. Azmi NHM, Suppiah S, Liong CW, Noor NM, Said SM, Hanafi MH, et al. Reliability of standardized uptake value normalized to lean body mass using the liver as a reference organ, in contrast-enhanced 18F-FDG PET/CT imaging. *Radiation Physics and Chemistry*. 2018;147:35-9.
191. Muzi M, Peterson LM, O'Sullivan JN, Fink JR, Rajendran JG, McLaughlin LJ, et al. 18F-fluoromisonidazole quantification of hypoxia in human cancer patients using image-derived blood surrogate tissue reference regions. *Journal of Nuclear Medicine*. 2015;56(8):1223-8.
192. Cohen E, Eisenkraft JB. Positive end-expiratory pressure during one-lung ventilation improves oxygenation in patients with low arterial oxygen tensions. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*. 1996;10(5):578-82.
193. Delbeke D, Martin WH, Sandler MP, Chapman WC, Wright Jr JK, Pinson CW. Evaluation of benign vs malignant hepatic lesions with positron emission tomography. *Archives of Surgery*. 1998;133(5):510-6.