



**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Avaliação de nanopartículas proteicas radiomarcadas dirigidas a tecidos tumorais como agentes diagnósticos**

**ARYEL HEITOR FERREIRA**

**Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Doutor em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientador:  
Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão**

**São Paulo  
2020**

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**Avaliação de nanopartículas proteicas radiomarcadas dirigidas a tecidos  
tumoriais como agentes diagnósticos**

**Versão Corrigida**

**Versão Original disponível no IPEN**

**ARYEL HEITOR FERREIRA**

**Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau de  
Doutor em Ciências na Área  
de Tecnologia Nuclear - Materiais**

**Orientador:  
Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão**

**São Paulo  
2020**

Fonte de Financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho,  
para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte

Como citar:

FERREIRA, A. H. ***Avaliação de nanopartículas proteicas radiomarcadas dirigidas a tecidos tumorais como agentes diagnósticos.*** 2020. 108 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo. Disponível em: (data de consulta no formato: dd/mm/aaaa)

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ferreira, Aryel Heitor

Avaliação de nanopartículas proteicas radiomarcadas dirigidas a tecidos tumorais como agentes diagnósticos / Aryel Heitor Ferreira; orientador Ademar Benévolo Lugão. -- São Paulo, 2020.  
108 p.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear (Materiais) -- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2020.

1. Nanoradiofármacos. 2. Nanocarreadores proteicos. 3. Nanopartículas de Albumina. 4. Nanopartículas de Papaína. I. Lugão, Ademar Benévolo, orient. II. Título.

## DEDICATÓRIA

À minha mãe.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, em especial minha mãe e minha vó, pois nada disso seria possível se não fosse vocês.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ademar Benévolo Lugão, pela amizade e apoio e confiança na realização deste trabalho e pelas diversas oportunidades de crescimento profissional.

Ao Dr. Fábio Luiz Navarro Marques, pela oportunidade e facilidade oferecida para a realização deste trabalho, permitindo que o mesmo pudesse ser conduzido no Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da USP.

Ao Dr. Gustavo Henrique Costa Varca, pela amizade e colaboração em todas as etapas deste trabalho.

Aos colaboradores do Centro de Medicina Nuclear: Larissa Estessi, Josy, Dra. Daniele Faria, Dra. Caroline Real, Msc. Mara Junqueira, Carlos Rossatto Jr. e Aline Moraes. Vocês foram fundamentais para este trabalho, seja no auxílio em experimentação ou em discussões enriquecedoras.

Aos amigos do laboratório Nanothera: Justine de Oliveira, Gabriela Fazolin, Caroline Lima, Jorge Gabriel, Lucas de Freitas e Kamila Nogueira.

Aos amigos da vida pelo apoio durante todo esse processo: Talles Lopes, Emanuel Gimenes, Rafaela Simão, Marcelle Riesco, Bruno Novaes, Wanderly Santiago, Carolina Noce.

Aos demais amigos.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa e reserva técnica concedidas, fundamentais para o desenvolvimento e divulgação do trabalho no país e no exterior.

## RESUMO

FERREIRA, A. H. ***Avaliação de nanopartículas proteicas radiomarcadas dirigidas a tecidos tumorais como agentes diagnósticos.*** 2020. 108 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Recentes avanços em nanomedicina e nanotecnologia têm expandido o desenvolvimento de nanoestruturas multifuncionais que combinem especificidade e funções terapêuticas e de diagnóstico em complexos nanoestruturados, a fim de superar barreiras biológicas que podem dificultar a administração e a captação seletiva e eficaz de medicamentos e agentes diagnósticos em tecidos tumorais. Nanopartículas vêm sendo utilizadas em Medicina Nuclear como carreadores de radionuclídeos emissores de radiação gama ( $\gamma$ ) ou pósitron ( $+\beta$ ) para imagens diagnósticas por PET, SPECT e emissores de partículas  $\alpha$  e  $-\beta$  utilizados em endorradioterapia para destruir especificamente o tecido tumoral. O objetivo deste trabalho concentrou-se no estudo da marcação com Tecnécio-99m de nanopartículas de papaína e albumina, sintetizadas por reticulação induzida por radiação, e na caracterização de seus comportamentos *in vitro* e *in vivo*, de modo a desenvolver novos nanorradiofármacos e avaliar seu potencial para realização de diagnóstico de tumores mamários utilizando a técnica de medicina nuclear SPECT. Técnicas de microscopia eletrônica e espalhamento de luz evidenciaram formação de nanopartículas esféricas com dispersão de tamanho de  $9,3 \pm 1,9$  nm para as nanopartículas de papaína e  $25,1 \pm 2,9$  nm para as nanopartículas de albumina. Um elevado rendimento radioquímico ( $>90\%$ ) e estabilidade frente aos agentes transquelantes presentes no soro foram observados para ambas as nanopartículas até pelo menos 6h. A biodistribuição em animais saudáveis demonstrou diferentes perfis de excreção, sendo a  $^{99m}\text{Tc-P-NPs}$  excretada principalmente pelo rim, enquanto a  $^{99m}\text{Tc-BSA-NPs}$  é excretada principalmente por via hepática. Nos estudos *in vitro*, as nanopartículas mostraram-se promissoras com 74% e 57,6% da captação total em células MDA-MB231, respectivamente para  $^{99m}\text{Tc-P-NPs}$  e  $^{99m}\text{Tc-BSA-NPs}$ . Nos estudos *in vivo* verificou-se acentuada captação tumoral com boa visualização em imagens adquiridas em micro-SPECT/CT. Deste modo, as nanopartículas proteicas

utilizadas no corrente trabalho mostraram-se promissoras para serem utilizadas como sistema de veiculação de radionuclídeos diagnósticos para estudos de sua distribuição sistêmica, bem como de sua aplicação como traçador SPECT em tumores mamários.

**Palavras Chaves:** Nanorradiofármacos, nanocarreadores proteicos, nanopartículas de albumina, nanopartículas de papaína.

## ABSTRACT

FERREIRA, A. H. ***Avaliação de nanopartículas proteicas radiomarcadas dirigidas a tecidos tumorais como agentes diagnósticos.*** 2020. 108 p. Tese (Doutorado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, São Paulo.

Recent advances in nanomedicine and nanotechnology have expanded the development of multifunctional nanostructures which combine specificity, diagnostic and therapeutic functions in nanostructured complexes in order to overcome biological barriers that may hinder the selective and effective administration and uptake of drugs and diagnostic agents in tumor tissue. Nanoparticles have been used in nuclear medicine as nano-radiopharmaceuticals to carry PET and SPECT  $\alpha$ - and  $\beta$ -emitting radioisotopes used in endoradiotherapy to specifically destroy tumor tissue. The aim of the present work was the study of radiolabeling albumin (BSA-NPs) and papain (P-NPs) nanoparticles synthesized by gamma irradiation, with  $^{99m}\text{Tc}$  and characterize their *in vitro* and *in vivo* properties as potentially novel nano-radiopharmaceuticals. Electron microscopy and light scattering techniques show spherical shapes of nanoparticles and average diameter of  $9.3 \pm 1.9$  nm for P-NPs and  $25.1 \pm 2.9$  nm for BSA-NPs. The radiolabeling reached around 90% yield, and the  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs showed stability for 24 h in all assayed conditions, while  $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs presented stability for 6 h in human serum. The biodistribution studies in healthy animals have shown different excretion profiles,  $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs featured a renal excretion. On the other hand the  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs were found in the liver and spleen to a larger extent, undergoing hepatic excretion. *In vitro* studies showed promising internalization rates for both nanoparticles with 74% and 57.6% of total uptake in MDA-MB231 cells, respectively for  $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs and  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs. *In vivo* studies in micro-SPECT/CT images also showed a high tumor uptake for both nanoparticles. The autoradiographic studies and immunohistochemistry assays revealed a high density of both papain and BSA nanoparticles in peripheral regions of tumor tissue and confirmed the efficacy of the developed nano-radiopharmaceuticals for targeting breast cancer.



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Sistema cromatográficos testados para otimização do controle de qualidade. <sup>1</sup>Sílica gel <sup>2</sup>citrato ácido dextrose.....45
- Tabela 2** - Fatores de retenção das espécies radioativas presentes na radiomarcção nos sistemas cromatográficos testados.....59
- Tabela 3** - Biodistribuição de nanopartículas de papaína radiomarcadas (<sup>99m</sup>Tc-P-NPs) em camundongos balb/C após administração endovenosa caudal (n=3 animais/tempo) (%DI/g). \*(%DI) .....65
- Tabela 4** - Biodistribuição de nanopartículas de albumina radiomarcadas (<sup>99m</sup>Tc-BSA-NPs) em camundongos balb/C após administração endovenosa caudal (n=3 animais/tempo) (%DI/g). \*(%DI) .....67
- Tabela 5** - Biodistribuição de nanopartículas de papaína radiomarcadas (<sup>99m</sup>Tc-P-NPs) em modelo de tumor de mama ortotópico 4T1 e espontâneo (MMTV-PyMT) após administração endovenosa caudal. (n=3 animais/tempo) (%DI/g). \*(%DI)...74
- Tabela 6** - Biodistribuição de nanopartículas de albumina radiomarcadas (<sup>99m</sup>Tc-BSA-NPs) em modelo de tumor de mama espontâneo (MMTV-PyMT) após administração endovenosa caudal. (n=3 animais/tempo) (%DI/g). \*(%DI).....75

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Visão frontal da albumina do soro humano (1AO6.pdb).....29
- Figura 2** - Estrutura da papaína dividida em subunidades, indicando alfa hélice, folha beta, ligações de hidrogênio e pontes de dissulfeto (9pap.pdb).....33
- Figura 3** - Métodos de marcação de nanopartículas. (a) Radiomarcção direta na superfície da nanopartícula, (b) radiomarcção através de um agente quelante funcionalizado na superfície da nanopartícula, (c) encapsulamento do radionuclídeo e (d) incorporação do radionuclídeo no interior de bicamadas lipídicas. Adaptado de KHARISOV et. al. 2014.....37
- Figura 4** - Obtenção do  $^{99m}\text{Tc}$  a partir de geradores  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ . (A) Esquema do gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  e (B) Esquema simplificado do decaimento de  $^{99}\text{Mo}$  a  $^{99m}\text{Tc}$ . Adaptado de AGUIAR, 2014.....38
- Figura 5** - Esquema das fitas cromatográficas utilizadas para determinação das purezas radioquímicas.....45
- Figura 6** - Análise de fluorescência das amostras de **(A)** nanopartículas de papaína e **(B)** nanopartículas de albumina ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) irradiadas a  $10 \text{ kGy}$ ,  $5 \text{ kGy.h}^{-1}$  em presença/ausência de etanol indicando formação de bitirosina ( $\lambda_{\text{Ex}} 350 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{Em}} 375\text{-}500 \text{ nm}$ ).....53
- Figura 7** - Distribuição de tamanho por número de partículas para P-NPs [ $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  e  $20\% \text{ EtOH (v/v)}$ ] irradiada a  $10 \text{ kGy}$  ( $5 \text{ kGy.h}^{-1}$ ) em banho de gelo. Diâmetro médio foi igual a  $9,3 \pm 1.9 \text{ nm}$  com índice de polidispersão de  $52,2\%$  ( $n=3$ ).....54
- Figura 8** - Potencial Zeta medido para P-NPs diluídas em água.  $Z = -11,1 \pm 5,5 \text{ mV}$  ( $n=3$ ).....54

<b>Figura 9</b> - Distribuição de tamanho por número de partículas para BSA-NPs (10 mg.m <sup>-1</sup> e 30% EtOH (v/v)) irradiada a 10 kGy (5 kGy.h <sup>-1</sup> ) em banho de gelo. Diâmetro médio foi igual a 25,1 ± 2,9 nm com índice de polidispersão de 20% (n=3).....	55
<b>Figura 10</b> - Potencial Zeta medido para BSA-NPs diluídas em água. Z= -14,7 ± 6,1 (n=3).....	55
<b>Figura 11</b> - Micrografia eletrônica de varredura de BSA-NPs (10 µg.mL <sup>-1</sup> ). Magnificação de 10 000 vezes.....	56
<b>Figura 12</b> - Micrografia eletrônica de varredura de BSA-NPs (10 µg.mL <sup>-1</sup> ). Magnificação de 5 000 vezes.....	56
<b>Figura 13</b> - Micrografia eletrônica de varredura de P-NPs (10 µg.mL <sup>-1</sup> ). Magnificação de 10 000 vezes.....	57
<b>Figura 14</b> - Micrografia eletrônica de varredura de P-NPs (10 µg.mL <sup>-1</sup> ). Magnificação de 15 000 vezes.....	57
<b>Figura 15</b> - Micrografia eletrônica de transmissão de BSA-NPs (10 µg.mL <sup>-1</sup> ).....	58
<b>Figura 16</b> - Micrografia eletrônica de transmissão de P-NPs (10 µg.mL <sup>-1</sup> ).....	58
<b>Figura 17</b> - Perfil do cromatograma (UV=280 nm) dos complexos não radiomarcados: <b>(1)</b> Nanopapaína, <b>(2)</b> Papaína irradiada e <b>(3)</b> Papaína Nativa. Fluxo de 2 mL/min.....	60
<b>Figura 18</b> - Perfil do radiocromatograma do <b>(1)</b> <sup>99m</sup> Tc-Nanopapaína, <b>(2)</b> <sup>99m</sup> Tc-Papaína irradiada e <b>(3)</b> <sup>99m</sup> Tc-Papaína Nativa. Fluxo de 2 mL/min.....	61
<b>Figura 19</b> - Perfil do radiocromatograma de <b>(1)</b> Na <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> e <b>(2)</b> <sup>99m</sup> Tc-Nanoalbumina. Fluxo de 0,5 mL/min.....	61

<b>Figura 20</b> - Estabilidade Radioquímica de <b>(a)</b> <sup>99m</sup> Tc-Papaína Nativa, <b>(b)</b> <sup>99m</sup> Tc-Papaína irradiada e <b>(c)</b> <sup>99m</sup> Tc-Nanopapaína. *<0.05.....	62
<b>Figura 21</b> - Estabilidade radioquímica em solução de histidina e soro humano de (A) <sup>99m</sup> Tc-BSA-NPs e (B) <sup>99m</sup> Tc-P-NPs.....	63
<b>Figura 22</b> – <b>(A)</b> Curva do clareamento sanguíneo e <b>(B)</b> Captação nos órgãos de excreção do <sup>99m</sup> Tc-P-NPs em camundongos balb/C (n=3). *Remoção do conteúdo lumial.....	64
<b>Figura 23</b> - <b>(A)</b> Curva do clareamento sanguíneo e <b>(B)</b> Captação nos órgãos de excreção de <sup>99m</sup> Tc-BSA-NPs em camundongos balb/C (n=3). *Remoção do conteúdo lumial.....	66
<b>Figura 24</b> - Viabilidade celular e cálculo do IC <sub>50</sub> em linhagem de câncer de mama humano (MDA-MB231). Tratadas com <b>(A)</b> e <b>(B)</b> papaína nativa por 24h e 48h, respectivamente e <b>(C)</b> e <b>(D)</b> Nanopartículas de papaína por 24h e 48h, respectivamente.....	68
<b>Figura 25</b> - Viabilidade celular e cálculo do IC <sub>50</sub> em linhagem de câncer de mama humano (MCF-7). Tratadas com <b>(A)</b> e <b>(B)</b> papaína nativa por 24h e 48h, respectivamente e <b>(C)</b> e <b>(D)</b> Nanopartículas de papaína por 24h e 48h, respectivamente.....	68
<b>Figura 26</b> - Viabilidade celular em linhagem de câncer de mama humano (MDA-MB231) tratadas com albumina de Soro Bovino nativa (BSA) e Nanopartícula de albumina (BSA-NPs).....	69
<b>Figura 27</b> - Ensaio <i>in vitro</i> de ligação às células tumorais. <b>(A)</b> Captação celular e internalização total de <sup>99m</sup> Tc-P-NPs em células MDA-MB231; <b>(B)</b> Captação celular e internalização total de <sup>99m</sup> Tc-P-NPs em células 4T1 e <b>(C)</b> Captação celular e internalização total de <sup>99m</sup> Tc-BSA-NPs em células MDA-MB231.....	70

<b>Figura 28</b> - Imagem SPECT/CT em modelo ortotópico de câncer de mama murino 4T1 em camundongo balb/C adquirida 2h pós-administração endovenosa de <sup>99m</sup> Tc-Nanopapaína. Planos (a) coronal; (b) sagital e (c) axial.....	71
<b>Figura 29</b> - Imagem SPECT/CT em modelo ortotópico de câncer de mama murino 4T1 em camundongo balb/C adquirida 6h pós-administração endovenosa de <sup>99m</sup> Tc-Nanopapaína. Planos (a) coronal; (b) sagital e (c) axial.....	72
<b>Figura 30</b> - Imagem SPECT/CT em modelo ortotópico de câncer de mama murino 4T1 em camundongo balb/C adquirida 24h pós-administração endovenosa de <sup>99m</sup> Tc-Nanopapaína. Planos (a) coronal; (b) sagital e (c) axial.....	72
<b>Figura 31</b> - Imagem SPECT/CT em camundongo MMTV-PyMT com tumor de mama adquirida 2h pós-administração endovenosa de <sup>99m</sup> Tc-Nanoalbumina. Planos (a) coronal; (b) sagital e (c) axial.....	73
<b>Figura 32</b> - Imagem SPECT/CT em camundongo MMTV-PyMT com tumor de mama adquirida 6h pós-administração endovenosa de <sup>99m</sup> Tc-Nanoalbumina. Planos (a) coronal; (b) sagital e (c) axial.....	73
<b>Figura 33</b> - Análise autorradiográfica <i>ex vivo</i> e imuno-histoquímica 2h p.i. em secções tumorais sequenciais de 10 µm de camundongo que foi administrado <sup>99m</sup> Tc-Nanopapaína. (A) controle negativo (B) cortes tumorais do camundongo injetado.....	76
<b>Figura 34</b> - Análise autorradiográfica <i>ex vivo</i> e imuno-histoquímica 6h p.i. e 24h p.i. em secções tumorais sequenciais de 10 µm de camundongo que foi administrado <sup>99m</sup> Tc-Nanopapaína.....	77
<b>Figura 35</b> - Análise autorradiográfica <i>ex vivo</i> e imuno-histoquímica 2h p.i. e 6h p.i. em secções tumorais sequenciais de 10 µm de camundongo que foi administrado <sup>99m</sup> Tc-Nanoalbumina.....	78

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%DI	Porcentagem de dose injetada
%DI/g	Porcentagem de dose injetada por grama de tecido
(v/v)	Volume por volume
+1 $\beta$	Pósitron
$\mu$ A	Microampère
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrômetro
<sup>111</sup> In	Radioisótopo de índio com número de massa 111
<sup>123</sup> I	Radioisótopo de iodo com número de massa 123
-1 $\beta$	Partícula beta
4T1	Linhagem celular de câncer de mama murino
<sup>60</sup> Co	Radioisótopo de cobalto com número de massa 60
<sup>68</sup> Ga	Radioisótopo de gálio com número de massa 68
<sup>99</sup> Mo	Radioisótopo de molibdênio com número de massa 99
<sup>99m</sup> Tc	Radioisótopo de tecnécio com número de massa 99
<sup>99m</sup> Tc-BSA-NPs	Nanopartículas de albumina bovina radiomarcada com tecnécio-99m
<sup>99m</sup> Tc-P-NPs	Nanopartículas de papaína radiomarcada com tecnécio-99m
ABC	Avidina-biotina-peroxidase
Asn	Asparagina
balb/C	Camundongos isogênicos
BSA	Albumina de soro bovino (do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i> )
BSA-NPs	Nanopartículas de albumina bovina
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEQMA	Centro de química e meio ambiente
CETER	Centro de tecnologia das radiações
Cis	Cisteína
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMN-InRad	Centro de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia
CPP	Contagem por pixel
CT	Tomografia computadorizada (do inglês <i>Computed</i>

	<i>tomography</i> )
DAB	3,3'diaminobenzidina
DFO	Deferroxamina
DLS	Espalhamento dinâmico de luz (do inglês <i>Dynamic light scattering</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DOTA	1,4,7,10-tetra-azaciclado - ácido decano-1,4,7,10-tetraacético
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentaacético
EDDA	Ácido etilenodiaminodiacético
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EPR	Efeito permeabilidade e retenção aumentados
FBP	Retroprojeção filtrada
FDA	Food and Drug Administration
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo
FOV	Medição do campo de visão (do inglês <i>field of view</i> )
g	grama
GP60	glicoproteína GP60
h	hora
HER2	Receptor de fator de crescimento epidérmico humano tipo 2 (do inglês <i>Human Epidermal growth factor Receptor-type 2</i> )
His	Histidina
HPLC	do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>
HSA	Albumina de soro humano
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana (do inglês <i>human umbilical vein endothelial cells</i> )
HYNIC	Ácido hidrazinonicotínico
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IQ-USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
kDa	Quilodalton
keV	Quiloeletrovolts
kGy	Quilogray
kV	Quilovolt

M	Molar
MBq	Megabequerel
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama humano estrôgeno-positiva
mCi	miliCurrie
MDA-MB231	Linhagem celular de câncer de mama humano triplo negativa
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MMTV-PyMT	Camundongos transgênicos modelo de câncer de mama metastático
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]
N	Normal
nA	Nanoampere
nm	Nanômetro
NOTA	Ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.i.	Pós-injeção
PB	Tampão fosfato
PBS	Tampão fosfato salina
PET	Tomografia por emissão de pósitron (do inglês <i>Positron emission tomography</i> )
pH	Potencial hidrogeniônico
P-NPs	Nanopartícula de papaína
R <sub>f</sub>	Fator de retenção
RM	Ressonância magnética
ROI	Região de interesse (do inglês <i>region of interest</i> )
SEC	Separação por exclusão de tamanho
SFB	Soro fetal bovino
SFM	Sistema fagocitário mononuclear



SPARC	Proteína secretada ácida e rica em cisteína (do inglês <i>Secreted protein acidic and rich in cysteine</i> )
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único (do inglês <i>Single-photon emission computed tomography</i> )
T <sub>½</sub>	Tempo de meia-vida
torr	Torricelli
Tyr	Tirosina
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i> )
Vis	Visível
W1	Whatman nº1
W3	Whatman nº3
Z	Potencial Zeta
A	Ampere
γ	Radiação gama

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1	Objetivo Geral .....	23
2.2	Objetivos Específicos.....	23
<b>3</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>24</b>
3.1	Nanomedicina .....	24
3.2	Nanomedicina e o câncer de mama .....	25
3.3	Sistemas nanoparticulados a base de proteínas .....	26
3.4	Nanopartículas baseadas em proteínas plasmáticas.....	27
3.4.1	Nanopartículas de albumina.....	28
3.4.2	Receptores celulares de albumina .....	30
3.5	Enzimas Proteolíticas.....	31
3.5.1	Enzimas proteolíticas terapêuticas em oncologia.....	31
3.5.2	Papaína .....	32
3.6	Rota de síntese de nanopartículas proteicas .....	34
3.7	Nanopartículas para imagem SPECT e PET .....	35
3.7.1	Estratégias para radiomarcagem de nanopartículas .....	36
3.7.2	Radiomarcagem com <sup>99m</sup> Tc para imagem SPECT .....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
4.1	Infraestrutura.....	40
4.2	Materiais .....	40
4.2.1	Reagentes .....	40
4.2.2	Equipamento, materiais e sistemas.....	41
4.2.3	Linhagens Celular.....	42
4.2.4	Animais.....	42
4.3	Métodos .....	43
4.3.1	Síntese das nanopartículas .....	43
4.3.2	Irradiação .....	43
4.3.3	Caracterização das nanopartículas .....	43
4.3.4	Otimização do controle de qualidade .....	44

4.3.5	Marcação das nanopartículas de albumina e papaína com tecnécio-99m	45
4.3.6	Avaliação radioquímica dos radiotraçadores	46
4.3.7	Estabilidade Radioquímica de bancada dos complexos de papaína	46
4.3.8	Estabilidade Radioquímica das Nanopartículas de papaína e albumina frente a Histidina e Soro Humano	47
4.3.9	Biodistribuição de nanopartículas em camundongos saudáveis balb/C	47
4.4	Estudos <i>in vitro</i>	48
4.4.1	Cultivo Celular	48
4.4.2	Análise de Proliferação Celular	48
4.4.3	Ensaio <i>in vitro</i> de ligação específica	49
4.5	Aquisição de imagem SPECT/CT	49
4.6	Biodistribuição em modelo tumoral	50
4.7	Imuno-histoquímica	50
4.8	Estudo auto-radiográfico <i>ex vivo</i>	52
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>53</b>
5.2	Síntese e caracterização das nanopartículas	53
5.3	Otimização do controle de qualidade	59
5.4	Radiomarcagem e avaliação radioquímica dos complexos	59
5.5	Estabilidade Radioquímica de bancada	62
5.6	Estabilidade Radioquímica frente a Histidina e Soro Humano	63
5.7	Biodistribuição de nanopartículas de papaína ( <sup>99m</sup> Tc-P-NPs) em camundongos saudáveis balb/C	63
5.8	Biodistribuição de nanopartículas de albumina ( <sup>99m</sup> Tc-BSA-NPs) em camundongos saudáveis balb/C	66
5.9	Análise de Proliferação Celular	67
5.10	Ensaio <i>in vitro</i> de ligação específica	69
5.11	Imagem SPECT/CT	70
5.12	Biodistribuição em camundongos portadores de tumor	74
5.13	Imunohistoquímica e ensaios autorradiográficos <i>ex vivo</i>	76
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>91</b>

<b>8 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>103</b>
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXO 3 .....</b>	<b>107</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença crônica caracterizada pelo crescimento celular desordenado resultante de alterações no material genético, sendo a segunda principal causa de mortes no mundo. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018, houve 18,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 9,6 milhões de mortes em todo mundo (WHO, 2018). Além disso, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer estima que um em cada cinco homens e uma em cada seis mulheres em todo o mundo desenvolvam câncer ao longo de suas vidas, e que um em cada oito homens diagnosticados e uma em onze mulheres morrerão da doença (IARC, 2019). No Brasil, estimou-se para o biênio de 2018-2019 a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer, reforçando a magnitude do problema no país (INCA, 2018).

O aumento da incidência e mortalidade do câncer de mama, por exemplo, tornou-se um problema de saúde pública mundial. É uma doença que apresenta variações histopatológicas, com diferentes graus de agressividade e potencial metastático. É o tipo de câncer que mais acomete as mulheres, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos. Cerca de 2,1 milhões de casos novos dessa neoplasia foram estimados para o ano de 2018, em todo o mundo, o que representa 11,6% de todos os tipos de câncer diagnosticados (WHO, 2018 e IARC, 2019).

Embora haja uma grande variedade de estratégias diagnósticas e terapêuticas para este tipo de câncer, existem barreiras biológicas que podem dificultar a administração e captação seletiva e eficaz de medicamentos e agentes diagnósticos no tecido tumoral (TRANS et. al., 2017). Recentes avanços em nanomedicina e nanotecnologia têm expandido o desenvolvimento de nanoestruturas multifuncionais que combinem especificidade e funções terapêuticas e de diagnóstico em complexos nanoestruturados a fim de superar essas barreiras, melhorando a eficácia de diagnósticos e terapias anticâncer e reduzindo a morbidade (HUA et. al., 2018).

A nanomedicina inaugurou, nas últimas décadas, uma nova era na oncologia clínica com a administração de medicamentos encapsulados em

nanopartículas que melhoraram consideravelmente os índices terapêuticos. alguns, como Doxil<sup>®</sup>(doxorubicina lipossômica), Onivyde<sup>®</sup>(irinotecano lipossômico) e Abraxane<sup>®</sup> (paclitaxel ligado à nanopartículas de albumina) já são aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) (TRANS, et. al., 2017).

Da mesma forma, nanopartículas estão sendo utilizadas em medicina nuclear como nanorradiofármacos no direcionamento de radionuclídeos emissores de radiação gama ( $\gamma$ ) ou pósitron ( $^{+1}\beta$ ) para imagens diagnósticas por PET (*Positron Emission Tomography*) e SPECT (*Single-photon emission computed tomography*) além de radioisótopos emissores de partículas  $\alpha$  e  $^{-1}\beta$  utilizados em endorradioterapia para destruir especificamente o tecido tumoral (ZHANG et. al., 2010). Entretanto diversos obstáculos são enfrentados no desenvolvimento de formulações nanoestruturadas com aplicações clínicas, incluindo a identificação de mecanismos de entrega apropriados, a ampliação da síntese, caracterização e radiomarcção reprodutível (RIZZO et. al., 2013).

Uma estratégia eficaz para superar tais obstáculos é a utilização de nanopartículas proteicas, visto que proteínas podem ser consideradas agentes ideais para aplicações biomédicas quando dirigidas a tecidos tumorais que expressam receptores específicos (TENG et. al., 2013). O interesse na identificação de novos nanomateriais biocompatíveis a partir de recursos naturais para diagnóstico e/ou terapia de tumores tem crescido consideravelmente.

Nesse sentido, nanopartículas à base de albumina e papaína sintetizadas por método alternativo, baseado na reticulação induzida por radiação ionizante, tem atraído considerável atenção devido à estabilidade e à facilidade de funcionalização da sua superfície (BENNET e KIM, 2014). O emprego desses sistemas proteicos para carregamento de radionuclídeos ou fármacos deve favorecer a estabilidade do ativo *in vivo* e prolongar a meia-vida de circulação. Contudo, há vários pré-requisitos para o uso desses sistemas em aplicações radiofarmacêuticas.

Também é importante observar outras propriedades relevantes dessas proteínas. A papaína, uma enzima isolada do látex do mamão, possui propriedades terapêuticas, antitumorais, antibacterianas e antioxidantes, as quais podem ser valiosas para aplicações médicas (SILVA-LÓPEZ e GONÇALVES,

2019). Somadas as vantagens de um sistema nanométrico, a utilização de nanopartículas de papaína pode apresentar efeitos sinérgicos ao tratamento. Da mesma forma, a identificação de receptores de albumina superexpressos em certos tipos de tumores sinalizam o potencial uso dessas nanopartículas para veicular radionuclídeos e/ou drogas.

Na busca de nanorradiofármacos com características adequadas para aplicação *in vivo*, que apresente o máximo de captação tumoral com o mínimo de acúmulo nos tecidos saudáveis, a síntese e radiomarcagem dessas nanopartículas constitui-se em contribuição de suma importância e oferece a possibilidade de desenvolvimento de novos compostos para diagnóstico e tratamento de tumores.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

O objetivo principal do trabalho concentrou-se no estudo da marcação com Tecnécio-99m de nanopartículas de papaína e albumina sintetizadas por reticulação induzida por radiação, e na caracterização de seus comportamentos *in vitro* e *in vivo*, de modo a desenvolver novos nanorradiofármacos e avaliar seu potencial para realização de diagnóstico de tumores mamários utilizando a técnica de medicina nuclear SPECT.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas;
- ✓ Otimizar as condições de radiomarkação das nanopartículas com tecnécio-99m para utilização em SPECT;
- ✓ Avaliar a estabilidade radioquímica *in vitro* dos complexos radiomarcados aplicando ensaios de transquelação;
- ✓ Avaliar a biodistribuição das nanopartículas radiomarcadas em camundongos saudáveis;
- ✓ Verificar a ligação dos conjugados às células de tumor mamário *in vitro*;
- ✓ Avaliar a biodistribuição das nanopartículas radiomarcadas em camundongos portadores de tumor;
- ✓ Avaliar a captação tumoral *in vivo* através da aquisição de imagens SPECT/CT em diferentes tempos.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Nanomedicina

O termo "nanotecnologia" refere-se a tecnologias que utilizam partículas muito pequenas, invisíveis a olho nu e menores que 1  $\mu\text{m}$  (WHATMORE, 2006). Durante uma reunião da *American Physical Society* em 1959, pela primeira vez, Richard Feynman discutiu sistematicamente o termo nanotecnologia, lançando as bases e diretrizes desta ciência (COLMAN, 2013). Posteriormente, esta área da ciência experimentou uma expansão maciça, e quase todos os países industrializados investiram em pesquisas em nanotecnologia em todos os campos, incluindo a medicina (CHAN, 2008).

A nanomedicina é uma ciência relativamente nova, que surgiu junto ao estabelecimento de tecnologias de microscópios de alta resolução para aplicações biotecnológicas que permitiram investigações de nanomateriais em níveis celulares (MIRZA e SIDDIQUI, 2014; AL-HATAMLEH et. al., 2019). Entre várias plataformas de nanomedicina, a entrega de medicamentos e radionuclídeos tem recebido o maior interesse da comunidade médica.

Como o câncer é um dos maiores desafios de saúde pública que a humanidade enfrenta, uma quantidade substancial de pesquisas concentrou-se no desenvolvimento de nanomateriais para atingir tecidos cancerígenos (LI, 2017). No entanto, o interesse entre os pesquisadores em diferentes tipos de câncer variou, com o câncer de mama recebendo a menor atenção da nanomedicina, apesar de ser o tipo de câncer mais difundido no mundo, com taxas de ocorrência alarmantes em muitos países (AL-HATAMLEH et. al., 2019). Além disso, a maioria desses estudos utilizou nanomateriais para atingir células cancerígenas com quimioterapia / drogas, enquanto poucos estudos se concentraram no uso de nanomateriais para diagnosticar/tratar o câncer de mama no contexto da medicina nuclear.

### 3.2 Nanomedicina e o câncer de mama

O câncer inclui uma série de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado e divisões anormais de células devido a alterações no material genético, o que causa tumores malignos (neoplasia). É um dos maiores desafios que o mundo enfrenta e vem causando enormes perdas sem soluções efetivas e abrangentes (SEYFRIED et. al., 2014 e IARC, 2019). O câncer de mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres no mundo e sua incidência aumentou mais de 20% desde 2008. Quase 1,5 milhões de novos casos de câncer de mama são relatados a cada ano, representando 25% de todos os cânceres diagnosticados em mulheres (TORRE et. al., 2017).

É uma doença altamente heterogênea, conseqüentemente possui classificações bastante complexas (SINN e KREIPE, 2013). Frequentemente é classificado com base no tipo histopatológico sendo a maioria dos casos de carcinoma ductal invasivo, mas outros subtipos menos prevalentes ainda chamam a atenção devido a agressividade e ocorrência em diferentes subpopulações, por exemplo, o câncer de mama inflamatório que geralmente ocorre em pacientes mais jovens (HOWLADER et. al., 2019)

A maior preocupação é com o estadiamento do tumor. À medida que a doença progride, o tumor primário, quando ainda está circunscrito no tecido mamário (estágio I), pode se espalhar para os tecidos e gânglios linfáticos próximos (estágio II-III) ou órgãos distantes, o que já caracteriza a metástase (estágio IV) as quais ocorrem principalmente nos pulmões, ossos, fígado e cérebro (WEIGELT et. al. 2005; SINN e KREIPE, 2013). O estadiamento tumoral é um dos fatores mais importantes para definir estratégias terapêuticas adequadas, visto que o envolvimento nodal axilar já é estabelecido como um indicador de mau prognóstico, com a sobrevida diminuindo em pacientes com essa condição.

Além disso, pode ser classificado com base nos graus e subtipos moleculares, incluindo luminal A, luminal B, HER2 e tipo triplo negativo (KREIPE, 2013). Independentemente da classificação, uma vez metastizado, as opções de tratamento diminuem consideravelmente e, devido às poucas alternativas terapêuticas eficazes no tratamento do Câncer de mama metastáticos, faz-se

necessário pesquisa de tratamentos alternativos que possam sensibilizar esse tipo de câncer.

A nanomedicina é uma promissora opção tanto do ponto de vista terapêutico quanto diagnóstico para esses tipos de tumores. Com o avanço na compreensão da biologia molecular do câncer de mama, várias estratégias nanotecnológicas foram traçadas e extensamente exploradas nas últimas décadas, principalmente para entregar seletivamente quimioterápicos às células tumorais através do encapsulamento desses agentes terapêuticos, que resultou em maior eficiência de tratamento em comparação com a quimioterapia e radioterapia convencional (WU, 2017).

### **3.3 Sistemas nanoparticulados a base de proteínas**

O desenvolvimento de sistemas nanoparticulados a base de proteínas como veículos para moléculas terapêuticas e radionuclídeos representa uma grande oportunidade para oncologia e medicina nuclear. As vantagens do uso de proteínas para síntese desses sistemas incluem a abundância de proteínas extraídas de fontes naturais, biocompatibilidade, biodegradabilidade e processo de síntese relativamente fácil, ao contrário de outros sistemas que utilizam metais e outros materiais inorgânicos e sintéticos (VERMA et. al., 2018).

Além disso, a abundância de grupos hidroxilas, aminos e carboxilas presentes nas nanopartículas proteicas oferece a possibilidade de modificação da superfície pela conjugação, através de ligações covalentes ou intermoleculares, de outros ligantes como peptídeos, proteínas, carboidratos, anticorpos e drogas, permitindo a modulação da entrega direcionada a tecidos e órgãos desejados, reduzindo ainda mais a toxicidade sistêmica (JAIN et. al., 2018; VARCA et. al., 2016).

A comunidade científica tem explorado o potencial de diversas proteínas de origem animal e vegetal como albumina, gelatina, fibroína, dentre outras (LOHCHAROENKAL et. al., 2014). Dependendo da natureza das proteínas, esses sistemas nanoparticulados podem ser administrados por

diversas vias incluindo administração oral, intravenosa, inalatória, subcutânea, etc.

O uso de nanopartículas proteicas para aplicações biotecnológicas já é uma realidade e tornou-se uma alternativa para melhorar propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas de diversos tipos de drogas e radiofármacos. Os nanomedicamentos a base de proteínas já aprovados pelo FDA são: o Abraxane<sup>®</sup> que consiste em paclitaxel encapsulado em nanopartículas de albumina com tamanho em torno de 130 nm, indicado para o tratamento de câncer de mama metastático (2005), câncer de pulmão (2012), e adenocarcinoma pancreático metastático (2013); o Ontak<sup>®</sup> que consiste em proteína recombinante da toxina da difteria, chamada *denileukin diftotox*, fusionada a interleucina-2 humana e indicado para o tratamento de linfoma cutâneo de células T recidivado ou refratário; e o Rebinyn<sup>®</sup> medicamento a base de Fator IX recombinante humano peguillado direcionado ao tratamento de hemofilia (FARJADIAN et. al., 2019).

### **3.4 Nanopartículas baseadas em proteínas plasmáticas**

Estratégias envolvendo a produção de nanopartículas direcionadas ao desenvolvimento de sistemas de entrega inteligentes visando aumentar a biodisponibilidade, especificidade ao tecido alvo e maior tempo de circulação sistêmica é alvo constante de pesquisas em nanomedicina. Nesse sentido, nanopartículas a base de proteínas plasmáticas mostram-se mais vantajosas frente a nanopartículas de materiais sintéticos, visto que possuem propriedades mais adequadas para aplicações *in vivo* como baixa toxicidade, biodegradabilidade e geralmente não desencadeiam respostas imunes (KRATZ e ELSADEK, 2012). Além disso, a utilização dessas proteínas pode contornar o problema da rápida depuração de partículas sintéticas e, portanto, estranhas ao organismo pelo sistema reticuloendotelial, e ajudar, por exemplo, a atravessar a barreira hematoencefálica (TEZCANER et. al., 2016).

O plasma sanguíneo é uma excelente fonte de biomateriais: albumina sérica (35-50 mg/mL), transferrina (2,5-3,5 mg/mL), globulinas (2,0-2,5 mg/mL) e

fibrinogênio (0,3-0,45 mg/mL) (KRATZ e ELSADEC, 2012). E a principal razão do aumento de pesquisas em nanopartículas baseadas nessas proteínas é o problema do reconhecimento de sistemas nanoparticulados pelos organismos através da adsorção de proteínas séricas e outras biomoléculas em sua superfície (corona proteica). A corona proteica altera o comportamento dos nanomateriais *in vivo* e sua biodistribuição que prejudicam o direcionamento e podem impedir a ligação e internalização das nanopartículas em seus alvos (LUNDQVIST et. al., 2008; CAPRIOTTI et. al., 2014).

### **3.4.1 Nanopartículas de albumina**

A albumina é a mais abundante proteína plasmática, perfazendo 55% das proteínas totais do soro humano. É uma molécula formada por uma cadeia de 584 aminoácidos, constituindo-se em um polipeptídeo com peso molecular em torno de 66,4 kDa com cerca de 5 nm (LEVINE, 2016; QUEIROZ et. al. 2016). É produzida no fígado, no qual cerca de 12% a 20% da capacidade de síntese hepática é disponibilizada para produção dessa proteína (PETERS, 1996).

Uma das importantes funções da albumina é o seu papel na regulação do pH sanguíneo, na manutenção do volume plasmático circulante e na modulação da distribuição de fluidos entre compartimentos corporais, sendo responsável por 80% da pressão oncótica. Por possuir grande capacidade de ligação, a albumina está envolvida no transporte de compostos endógenos e exógenos como moléculas lipossolúveis de ácidos graxos, hormônios, íons metálicos, peptídeos, proteínas e fármacos, aumentando sua biodisponibilidade e estabilidade em fluidos biológicos (FALANI et. al. 2012).

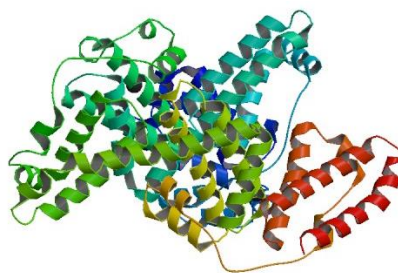


Figura 1 - Visão frontal da albumina do soro humano (1AO6.pdb)

O uso clínico da albumina foi estabelecido durante a Segunda Guerra Mundial, com o uso bem-sucedido em substituição a transfusão de sanguínea em soldados com grandes perdas de sangue, da mesma forma trabalhos datados de 1944 descrevem os benefícios o uso de albumina no tratamento de cirrose (PARODI et. al., 2019).

É um produto natural facilmente purificado e componente universal de tecidos líquidos e sólidos. O método de Cohn foi desenvolvido também nesta época para purificação de proteínas séricas, onde a proteína mais importante, a Fração V, ou seja, albumina, foi fracionada. O método é executado em temperaturas e concentrações salinas baixas e a precipitação das proteínas ocorre pela variação do pH e uso de diferentes concentrações de etanol (COHN et. al., 1944). O isolamento da albumina através desse método é consistente e reprodutível, tornando-a matéria-prima de baixo custo para a síntese de nanopartículas. A única desvantagem deste método está relacionada ao risco de contaminação do produto final por patógenos sanguíneos como vírus e príons. Esse problema pode ser facilmente resolvido através da produção de albumina pela tecnologia do DNA recombinante em sistemas bacterianos, por exemplo (HE et. al., 2011).

Como matéria-prima para a fabricação de nanocarreadores, a albumina é estável tanto em condições fisiológicas (sua meia-vida biológica é de cerca de três semanas) quanto na presença de solventes ou pHs heterogêneos. E devido às suas propriedades naturais como transportadora de moléculas endógenas e exógenas, pode ser conjugada com agentes terapêuticos, diagnósticos e teranósticos a fim de melhorar a farmacocinética (PARODI et. al.,2019).

Finalmente, a albumina é estável em ampla faixa de pH (na faixa de 4 a 9) e resistente ao calor (estável por pelo menos 10 horas a 60 ° C), representando

um substrato ideal para vários processos sintéticos e sínteses químicas, e pode ser armazenada, com pequenas alterações em sua estrutura, em concentrações relativamente altas (5 a 20%) por muitos anos (Pignatta et. al., 2015).

### 3.4.2 Receptores celulares de albumina

Essencialmente dois mecanismos são responsáveis pelo potencial sucesso do uso de nanopartículas de albumina em sistemas biológicos para diagnóstico e terapia de câncer: transporte ativo mediado por receptores através de GP60 e de caveolina-1 (transcitose) e a ligação ativa do complexo albumina-droga tumor através da proteína SPARC (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) (TENG et. al., 2013).

O receptor GP60 é uma proteína presente em células do endotélio vascular que atua aumentando a permeabilidade da membrana para a absorção de proteínas circulantes (LARSEN et. al., 2016). A ligação da albumina a este receptor, ativa a proteína de membrana caveolina-1, a qual induz a formação de pequenas vesículas na superfície celular, chamadas de cavéolas. As cavéolas migram através do citoplasma liberando seu conteúdo no interstício celular, sendo este o mecanismo que facilita a transcitose da albumina, protegendo-a da proteólise (COHEN et. al., 2004; PARAT e RIGGINS, 2012.)

Por outro lado, as proteínas SPARC são compostos secretados dentro do microambiente extracelular, as quais apresentam funções regulatórias, sendo capazes de afetar a proliferação e a invasão tumoral, assim como a angiogênese (CHONG et. al., 2012). São descritas como associadas à comunicação via matriz extracelular e como receptoras de nanopartículas de albumina. As SPARC são expressas em diferentes tipos de câncer de mama, próstata, esôfago, colorretal, fígado, pulmão, entre outros. A capacidade das SPARC de inibir ou promover progressão tumoral depende do tipo celular, do estágio tumoral e da interação com os diferentes componentes presentes no microambiente celular (ARNOLD e BREKKEN, 2009).

Ambos os mecanismos de internalização conferem grande potencial de aplicações efetivas de nanopartículas de albumina em oncologia.

### **3.5 Enzimas Proteolíticas**

Os seres humanos usam plantas para tratar doenças e condições adversas desde antiguidade e, conseqüentemente, empregam empiricamente proteases vegetais e seus derivados (PETROVSKA, 2012). Atualmente, no campo comercial, as proteases representam 60% total de enzimas produzidas pela indústria mundial, principalmente nas áreas de alimentação e de detergentes. Além disso, a identificação e caracterização de proteases vegetais fazem parte de um grande esforço da comunidade científica na busca de compostos com propriedades farmacológicas provenientes de biomassa (SILVA-LÓPEZ et. al., 2019).

As proteases catalisam a clivagem de ligações peptídicas de proteínas, principalmente por hidrólise ou eliminação de amônia, resultando em peptídeos de tamanhos variados e resíduos de aminoácidos livres (RAWLINGS et. al., 2016). Sua importância em conduzir as funções metabólicas e regulatórias essenciais é evidente, o que pode ser confirmado pela sua ocorrência em todas as formas de organismos vivos. Assim, medeiam e/ou participam de vários processos fisiológicos, como o catabolismo de proteínas, a coagulação sanguínea, o crescimento e a migração celulares, a formação de tecidos, a morfogênese em desenvolvimento, inflamações e crescimento de tumores, a ativação de zimogênios, a liberação de hormônios e de peptídeos farmacologicamente ativos de proteínas precursoras e, também, o transporte de proteínas através das membranas (TREMACOLDI, 2009).

A característica mais notável dessas enzimas é a alta capacidade de hidrolisar proteínas em temperaturas mais altas do que as enzimas animais. Devido à expressiva estabilidade térmica associada à boa atividade da protease, as proteases vegetais têm sido investigadas para fins terapêuticos (SILVA-LÓPEZ et. al., 2019).

#### **3.5.1 Enzimas proteolíticas terapêuticas em oncologia**

A administração de extratos vegetais com enzimas proteolíticas teve origem na América do Sul e Central (LEIPNER, 2000; VANHOOF, 1997).



Atualmente, este tipo de terapia vem sendo estudada para diversas indicações em oncologia, doenças infecciosas, trauma e inflamação (BEUTH, 2008; SILVA-LÓPEZ et. al., 2019).

A lógica científica da terapia enzimática sistêmica baseou-se na observação da alta incidência de câncer na população idosa concomitante à redução de enzimas pancreáticas nestes indivíduos. Isso levou Max Wolf e Helene Benitez (1950), administrarem uma combinação otimizada de proteinases vegetais e animais em pacientes oncológicos na tentativa de restaurar a atividade citotóxica já reduzida nos soros dos pacientes. Como resultado, observou-se uma melhora da atividade oncolítica pela administração oral dessas enzimas (LEIPNER, et. al. 2000; ZAENKER, et. al. 2001; LAUER et. al., 2001).

Em geral, as proteases terapêuticas de origem vegetal não são heterólogas, e são obtidas diretamente das plantas ou do seu látex, sendo possível extrair a proteína a baixo custo, sem afetar a viabilidade da planta. Algumas dessas enzimas têm sido importantes no planejamento racional de fármacos com aplicações diagnósticas e terapêuticas e, devido a alguns aspectos químicos, biológicos e farmacológicos, as proteases vegetais mais estudadas são a papaína, bromelina, ficina e cumisina.

### 3.5.2 Papaína

A papaína (EC 3.4.22.2) é uma enzima proteolítica com peso molecular de 23,4 kDa extraída do látex do fruto verde da *Carica papaya*. Sua estrutura é composta por 212 aminoácidos, entre eles a cisteína (Cis25), a histidina (His159) e a asparagina (Asn175) (SZABÓ et. al., 2006) que compõe o sítio ativo da enzima. Pertence à família das proteases de cisteína, classificadas como família C1, cruciais em vários processos biológicos em diversos organismos vivos. Destaca-se por sua especificidade relativa a proteínas e a substratos de baixa massa molecular, clivando ligações peptídicas de aminoácidos básicos como arginina, lisina e resíduos de fenilalanina. Apresenta estabilidade a altas temperaturas, em concentrações de solventes orgânicos elevadas e de agentes desnaturantes em uma ampla faixa de pH (3,0-9,0) e possui atividade máxima em pH 6,0-7,0 e 60°C (AMRI e MAMBOYA, 2012).



Figura 2 - Estrutura da papaína dividida em subunidades, indicando alfa hélice, folha beta, ligações de hidrogênio e pontes de dissulfeto (9pap.pdb)

É usada principalmente na indústria farmacêutica, na formulação de detergentes, tratamento de couro, amaciantes de carne e clarificação de cervejas (AZARKAN et. al., 2003).

Na medicina, é amplamente utilizada para tratamento de edemas, sinusite alérgica, síndrome do intestino permeável, intolerância ao glúten, hipocloridria e outros distúrbios digestivos, bem como na remoção de cáries (ZHANG et. al., 2006). Produtos à base de papaína com aplicação em curativos já estão disponíveis comercialmente devido a sua propriedade debridante que estimula o processo de cicatrização de feridas. São utilizados em tratamentos de ulcerações cutâneas em lesões diabéticas, quimioterápicas, hanseníase, síndrome de Fournier dentre outras lesões (LEITE et. al., 2012).

Possui outras propriedades farmacológicas muito valiosas para aplicações médicas como propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes (BUDAMA-KILINC et. al., 2018), além de atividade anticancerígena, antiproliferativa e antimetastática observadas e validadas por estudos experimentais *in vitro*, *in vivo* e estudos clínicos em pacientes com câncer de mama, colorretal e plasmocitoma (BEUTH, 2008). Da mesma forma, em estudos em modelo de carcinoma pulmonar de Lewis e melanoma, foi comprovada sua eficácia na inibição do crescimento do tumor primário e disseminação sistêmica, com aumento de sobrevida dos animais tratados (WALD et. al., 2001). Outros estudos em diferentes linhagens celulares corroboram com o fato de que a papaína pode modular vias de sinalização celular envolvidas no sistema

imunológico, apoptose e desenvolvimento do câncer (CHANDRAN e NACHIMUTHU, 2018).

### **3.6 Rota de síntese de nanopartículas proteicas**

Diversas rotas são utilizadas na síntese de nanopartículas proteicas. As principais incluem a dessolvatação, emulsificação e geleificação térmica. Mais recentemente, foram descritas outras técnicas, como evaporação do solvente e a secagem por aspersão (*spray drying*) (ELZOGHBY et. al., 2012). Dependendo de cada tipo de aplicação, o modo de preparo deve ser otimizado para alcançar propriedades de interesse, tais como a melhora da eficácia do ponto de vista da biocompatibilidade e o controle do tamanho das partículas.

A técnica da dessolvatação, em particular, tem sido aperfeiçoada e demonstra boa reprodutibilidade na distribuição dos tamanhos das partículas. Este método baseia-se no uso de cosolventes (etanol, metanol, acetona) para promover a agregação da proteína, e de um agente reticulante, ligando-as covalentemente e promovendo a formação das nanopartículas. No entanto, resíduos dos agentes reticulantes, caso não sejam devidamente removidos, podem induzir reações indesejáveis e toxicidade para sistemas biológicos (VARCA et. al., 2016).

Por outro lado, estudos recentes indicam que a utilização de método alternativo, baseado na reticulação induzida por radiação ionizante, a fim de se obter o controle de tamanho de nanopartículas com bioatividade, bem como com características estruturais tridimensionais preservadas para aplicações biomédicas, mostrou-se eficaz (SOTO-ESPINOZA et. al., 2011). Esse método apresenta vantagens sobre os convencionais, pois não se restringe à falta de monômeros no processo, além de, simultaneamente à formação das nanopartículas, ocorrer a esterilização do interior do frasco de reação. A ausência de agentes reticulantes garante baixa toxicidade residual e reduz possíveis etapas de purificação de monômeros remanescentes (QUEIROZ et. al., 2016).

### 3.7 Nanopartículas para imagem SPECT e PET

Embora nanopartículas representem um fenômeno relativamente novo na pesquisa médica e, particularmente, na rotina clínica, produtos similares foram aplicados por décadas na medicina nuclear. Esses compostos são conhecidos como radiofármacos à base de colóides ou simplesmente radiocolóides, e da mesma forma que sistemas nanoparticulados modernos, suas captações nos tecidos de interesse também se baseiam nos tamanhos das partículas, nas propriedades físico-químicas e mecanismos de direcionamento passivo (POLYAK e ROSS, 2018).

Esses radiotraçadores, como agregados a base de albumina, fitato, enxofre e estanho coloidal, são utilizados desde a década de 1960 para investigações de perfusão de órgãos do sistema reticuloendotelial (SRE) como fígado e baço. Quando injetados por via intravenosa, células do SRE identificam esses compostos como material estranho e os fagocitam, acumulando a radioatividade nos órgãos que compõem o sistema. As funções hepática e esplênica podem ser avaliadas através da taxa de perfusão que é estimada a partir da depuração do radiocolóide através de imagens SPECT. Também são aplicados em estudos de perfusão pulmonar, cintilografia pulmonar, e na detecção de linfonodo sentinela (ZOLLE, 2007).

Mais recentemente, métodos de imagem molecular foram importantes ferramentas no desenvolvimento de diversos nanocarreadores para veicular e entregar seletivamente compostos terapêuticos. E através de imagens PET e SPECT foi possível avaliar propriedades farmacocinéticas e de biodistribuição, permitindo a análise do comportamento, integridade e estabilidade desses sistemas *in vivo*. Ao mesmo tempo, essas investigações também oportunizaram a identificação de novos compostos candidatos a radiofármacos (LAMMERS et. al., 2010; MITRA et. al., 2006).

Esses sistemas de imagem podem ser combinados com a tomografia computadorizada (CT) ou ressonância magnética (RM) caracterizando técnicas de imagens híbridas (SPECT/CT, PET/CT, SPECT/RM ou PET/RM), que aumentam o poder diagnóstico com a fusão de imagens funcionais e anatômicas (POLYAK e ROSS, 2018). O desenvolvimento desses sistemas híbridos de imagem, também

oportunizou o surgimento de novas nanopartículas como as magnéticas radiomarcadas com  $^{18}\text{F}$  ou  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

Da mesma forma, verifica-se o desenvolvimento de nanopartículas teranósticas (que combinam funções terapêuticas e de diagnóstico), como a utilização de nanopartículas metálicas para visualização de tumores em ressonância magnética e que são projetadas para converter luz em calor e eliminar seletivamente células malignas através da hipertermia. Também pode-se citar nanopartículas de ouro-198, emissor de partículas  $\beta$  utilizadas em endorradioterapia e raios  $\gamma$  que podem formar imagens SPECT (ROMA-RODRIGUES et. al., 2019).

### 3.7.1 Estratégias para radiomarcção de nanopartículas

Para fins diagnósticos, são utilizados dois tipos de radioisótopos: emissores gama ( $\gamma$ ) para SPECT e emissores pósitrons ( $+\beta$ ) para PET. Para escolha do radioisótopo na marcação de nanopartículas, deve-se considerar dois fatores, a meia-vida física ( $T_{1/2}$ ) do radionuclídeo e o tempo que o nanomaterial leva para acumular-se no tecido de interesse.

Os radioisótopos PET utilizados com maior frequência são o  $^{18}\text{F}$  e  $^{68}\text{Ga}$  que possuem meia-vida relativamente curta, 109 e 68 minutos, respectivamente, e o tempo médio para início da imagem dependerá da atividade administrada. Por outro lado, os isótopos SPECT mais utilizados ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $T_{1/2}= 6,01\text{h}$ ;  $^{123}\text{I}$ ,  $T_{1/2} = 13,22\text{ h}$  e  $^{111}\text{In}$ ,  $T_{1/2}= 67,32\text{ h}$ ) podem fornecer 24 horas ou até vários dias para seu rastreamento biológico, que também dependerá da atividade (LEE et. al., 2015)

Diversas rotas podem ser utilizadas para marcar nanopartículas com esses radioisótopos, visto que possuem propriedades químicas distintas podendo ser classificados como halogênios e metais. Essas rotas incluem a marcação direta através da formação de ligações covalentes com superfície das nanopartículas ou indireta através da complexação desses átomos por agentes quelantes bifuncionais (Fig. 3) (Ramenda et. al., 2009; Hjelstuen, 1995).

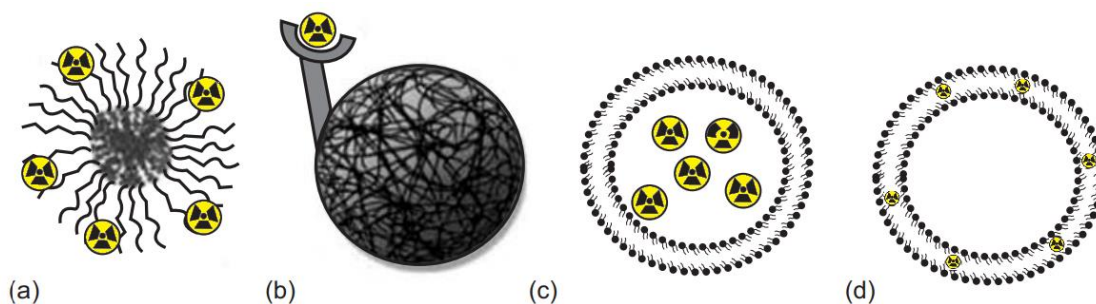


Figura 3: Métodos de marcação de nanopartículas. (a) Radiomarcção direta na superfície da nanopartícula, (b) radiomarcção através de um agente quelante funcionalizado na superfície da nanopartícula, (c) encapsulamento do radionuclídeo e (d) incorporação do radionuclídeo no interior de bicamadas lipídicas. Adaptado de KHARISOV et. al. 2014.

Os agentes quelantes bifuncionais formam núcleos permanentes onde o íon metálico é envolvido por ligações covalentes que posteriormente são complexados na superfície das nanopartículas ou incorporados em seus núcleos. Para radiometais os quelantes mais utilizados são 1,4,7,10-tetra-azaciclo - ácido decano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA), quelantes acíclicos desferoxamina (DFO) e ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) (JEON, 2019; LIU, 2008).

Para determinação da pureza radioquímica de nanopartículas radiomarcadas, comumente utiliza-se cromatografia em camada delgada ascendente com fases móvel e estacionária adequadas ao tipo de material utilizado na síntese das nanopartículas e ao radioisótopo selecionado. Para purificação geralmente são utilizados procedimentos como filtração, cromatografia de exclusão de tamanho ou até mesmo precipitação. É fortemente recomendado estudos de possíveis alterações na distribuição de tamanho das nanopartículas pós-radiomarcção (VARENNE et. al., 2016).

### 3.7.2 Radiomarcção com $^{99m}\text{Tc}$ para imagem SPECT

Nas imagens SPECT, o isótopo mais utilizado é o tecnécio-99m, cujo número atômico é 43 e pertencente ao grupo 7 da tabela periódica. Pode

apresentar-se em oito estados de oxidação (-1 a +7). Os estados +7 e +4 são os mais estáveis e são encontrados em óxidos, sulfetos, haletos e pertecnatos (SAHA, 2010).

Apresenta vantagens em relação a outros radioisótopos devido às suas propriedades nucleares: decaimento por emissão de energia monocromática de 140 keV, ideal para aquisição de imagens cintilográficas, e o período de semidesintegração ( $T_{1/2} = 6,01$  horas) que é suficientemente longo para realizar a radiomarkação das nanopartículas e suficientemente pequeno para minimizar a dose de radiação ao paciente. Além disso, é produzido a baixo custo a partir de geradores de  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  favorecendo sua logística e disponibilidade (Fig. 4). (BANERJEE et. al., 2005; FAINTUCH et. al., 2008).

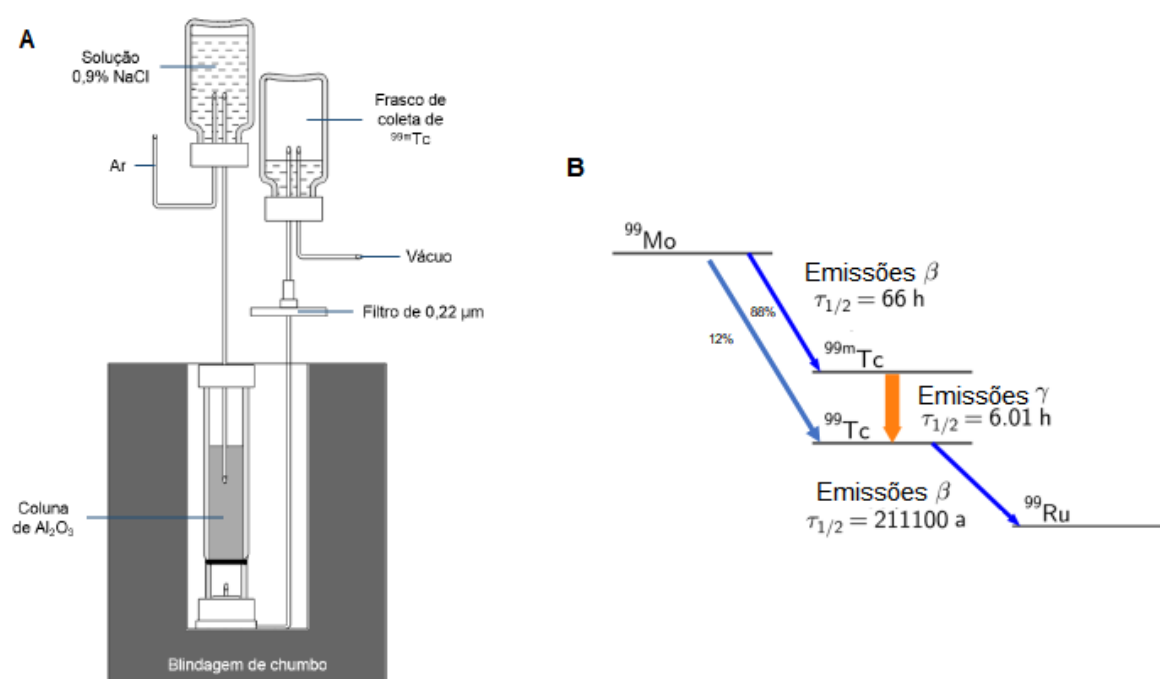


Figura 4: Obtenção do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  a partir de geradores  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ . (A) Esquema do gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  e (B) Esquema simplificado do decaimento de  $^{99}\text{Mo}$  a  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Adaptado de AGUIAR, 2014.

Várias técnicas de marcação de biomoléculas com tecnécio foram desenvolvidas na última década. O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  é eluído do gerador na forma de pertecnato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ) com número de oxidação +7, que é o mais

estável em solução aquosa, porém nesta forma química não consegue ligar-se às moléculas, por isso o uso de agentes redutores como cloreto de estanho II ( $\text{SnCl}_2$ ) ou boroidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) se faz necessário (BANERJEE et. al., 2005).

Na marcação direta, as cadeias do polímero presentes nas nanopartículas são ricas em grupos reativos como carboxilas ( $-\text{COOH}$ ), hidroxilas ( $-\text{OH}$ ), aminos ( $-\text{NH}_2$ ) e tiol ( $-\text{SH}$ ) que coordenam ligações com os cátions de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  reduzido (PANT et. al., 2017).

Já na radiomarcação indireta, pode-se utilizar diversos agentes quelantes bifuncionais para incorporar o  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  nos sistemas nanoestruturados, como DTPA, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido etilenodiaminodiacético (EDDA) e nicotinamida hidrazino (HYNIC) (LIU, 2008).

Ressalta-se que tanto na marcação direta quanto indireta, parâmetros como quantidade de nanopartícula, agente redutor, atividade do radioisótopo, pH, temperatura e tempo de reação devem ser otimizados para se obter alta pureza radioquímica.



## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Infraestrutura

Os ensaios de síntese e caracterização das nanopartículas proteicas descritos neste trabalho foram realizados nos laboratórios do Centro de Química e Meio Ambiente (CEQMA) e no Centro de Tecnologia das Radiações (CETER), sediados no IPEN. As caracterizações dos sistemas nanoparticulados foram realizadas nos Laboratórios do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), assim como no Laboratório de Nanotecnologia da Universidade do Missouri (EUA). Toda a parte de ensaios *in vitro* e *in vivo* foi realizada no Centro de Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia da Universidade de São Paulo (CMN-InRad), esse laboratório forneceu toda a infraestrutura necessária para a manipulação de materiais radioativos, células e animais.

### 4.2 Materiais

#### 4.2.1 Reagentes

Os principais reagentes utilizados neste trabalho foram:

- ✓ acetona (Merck, Alemanha);
- ✓ ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (Merck, Alemanha);
- ✓ álcool etílico (Merck, Alemanha);
- ✓ acetona ultrapura (Merck, Alemanha);
- ✓ ácido clorídrico ultrapuro (Merck, Alemanha);
- ✓ ácido trifluoroacético para CLAE (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ água purificada por equipamento de osmose reversa (Purificador Milli-RX 45 Millipore, EUA);
- ✓ meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab);
- ✓ soro fetal bovino (Cultilab);
- ✓ penicilina:estreptomicina (Cultilab);
- ✓ Cloreto estânico dihidratado – Merck, Alemanha;

- ✓ Fosfato de sódio monobásico – Merck, Alemanha;
- ✓ Fosfato disódico anidro – Merck, Alemanha;
- ✓ Gás nitrogênio, grau de pureza 99,99% – White Martins, Brasil;
- ✓ Glicina – Sigma Aldrich, EUA;
- ✓ Heparina (Liquemine®), solução 5000 U.I./mL – Roche, Brasil;
- ✓ Octanol, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- ✓ Radioisótopo tecnécio-99m, obtido do gerador molibdênio-99/tecnécio-<sup>99m</sup>Tc produzido no Centro de Radiofarmácia (CERF) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), Brasil;
- ✓ Solução de Tripsina/EDTA 0,25% - Gibco®, EUA.
- ✓ Solução fisiológica estéril (cloreto de sódio) 0,9% – Equiplax, Brasil.

#### **4.2.2 Equipamento, materiais e sistemas**

Os principais equipamentos, materiais e sistemas utilizados no trabalho foram:

- ✓ Contador de cintilação gama (Hidex)
- ✓ Espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu UV-PC – 2100)
- ✓ Detector de cintilação em fluxo (Perkin Elmer)
- ✓ PET/SPECT/CT para pequenos animais (Gamma Medica Ideas/Trifoil Triumph® II (Trimodality System))
- ✓ Centrífuga refrigerada (Eppendorff)
- ✓ Ultra freezer (-80 °C) vertical (Sanyo)
- ✓ Typhoon Scanner (GE Healthcare FLA 9500)
- ✓ Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (Shimadzu SCL-10AVP; Japão)
- ✓ Detector de radiação (NaI) para CLAE Radiomatic 610TR (PerkinElmer, EUA)
- ✓ Criostato (Leica CM3050S)
- ✓ Microscópio de mesa Binocular (Nikon Japan YS2-T 186360)
- ✓ Centrífuga portátil refrigerada (Eppendorf 5415R)
- ✓ Leitor de Placas por absorvância (VERSA Max)
- ✓ agitador/aquecedor Thermomixer comfort 1,5 mL (Eppendorf, EUA);
- ✓ calibrador de atividade (CRMTM-35R – Capintec, EUA);

- ✓ coluna de exclusão de tamanho (SEC-HPLC) ProteinPak 300SW (7,5 x 300 mm, Waters, Milford, MA, USA)
- ✓ frascos para cultivo de células (Costar, EUA);
- ✓ material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos tipo eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon e criotubos;
- ✓ pipetas automáticas (Brand e Socorex);
- ✓ suporte cromatográfico para cromatografia em camada delgada TLC-SG (Merck, Alemanha);
- ✓ vidraria em geral, tais como béqueres, erlemeyers, balões volumétricos, provetas e pipetas.

### 4.2.3 Linhagens Celular

Para os estudos *in vitro* foram utilizadas as linhagens celulares MCF-7, derivada de adenocarcinoma de mama humano estrógeno-positiva (ER-positiva), linhagem de câncer de mama humano triplo negativo MDA-MB-231 e linhagem de câncer de mama murinho triplo negativo 4T1. Todas adquiridas da *American Type Culture Collection* (Rockville, MD) e fazem parte do banco de linhagens celulares da Disciplina de Oncologia da FMUSP.

### 4.2.4 Animais

Os estudos *in vivo* foram realizados em camundongos saudáveis balb/C fêmeas de sete a oito semanas de idade e 18 a 25 gramas de peso, modelo ortotópico de câncer de mama 4T1 induzidos em animais balb/C e camundongos transgênicos modelo câncer de mama metastático MMTV-PyMT, de seis a dez semanas de idade e 20-25 gramas de peso, fêmeas (Biotério – FMUSP). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (nº 128/16).

## **4.3 Métodos**

### **4.3.1 Síntese das nanopartículas**

As nanopartículas de albumina e papaína foram sintetizadas na concentração de  $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ , 30% e 20% de etanol (v/v), respectivamente e tampão fosfato 50mM (pH 7,2), sob banho de gelo durante o processo, segundo a técnica de Varca et. al. (2014 e 2016). Após homogeneização e repouso por 6 horas em refrigerador, as amostras foram submetidas ao processo de irradiação.

### **4.3.2 Irradiação**

A irradiação foi realizada no Centro de Tecnologia das Radiações (CETR-IPEN) no Irradiador Multipropósito de Cobalto-60 na dose de 10 kGy com taxa de dose de  $5 \text{ kGy h}^{-1}$ . As amostras foram mantidas refrigeradas em recipiente isolante térmico, utilizando gelo sintético durante exposição para preservação da integridade proteica durante o processo. Esse procedimento foi realizado a fim de promover a reticulação de proteínas.

### **4.3.3 Caracterização das nanopartículas**

As nanopartículas foram avaliadas quanto a formação de bitirosinas, sua morfologia por meio de análises de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) e no que se refere ao tamanho hidrodinâmico e polidispersão, por espalhamento dinâmico de luz (DLS).

#### **4.3.3.1 Formação de Bitirosinas**

A formação de bitirosinas, um indicativo da eficiência de reticulação, foi monitorada por medições de fluorescência num espectrofotômetro Hitachi F-4500. Os parâmetros adotados foram:  $\lambda_{\text{ex}} = 325 \text{ nm}$  e  $\lambda_{\text{em}} = 340\text{-}500 \text{ nm}$ , velocidade de varredura de  $240 \text{ nm/min}$ . As amostras foram diluídas em tampão para atingir a absorbância equivalente entre si antes da análise.

#### **4.3.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

As amostras, previamente filtradas com filtros para seringa (0,22  $\mu\text{m}$ ), foram gotejadas em grades de cobre revestidas com filme de carbono (SmartGrids™) de 200 mesh. Posteriormente foram avaliadas em Microscópio eletrônico de transmissão modelo JEOL 1400 TEM (JEOL, LTE, Tóquio, Japão).

#### **4.3.3.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

As análises de MEV foram realizadas em um microscópio eletrônico Quanta 600 FEG-FEI sob condições de baixo vácuo (pressão 0,08 torr), tensão de aceleração 20 kV e corrente 10 nA. As amostras foram colocadas cuidadosamente em “stubs” de alumínio, coberto com ouro, secas e em seguida observadas no MEV.

#### **4.3.3.4 Espalhamento dinâmico de Luz**

As análises por espalhamento dinâmico de Luz foram realizadas em Zetasizer Nano S90 (Malvern Instruments Ltd., USA) por 10 segundos à 25 °C utilizando ângulo de 173 °C. As amostras foram filtradas com filtros para seringa (0,22  $\mu\text{m}$ ) previamente às análises. Para análise do potencial zeta foram realizadas medidas logo após o preparo das amostras e depois de 24 h. Foi utilizado o mesmo equipamento descrito acima com cubeta DTS1070, a 25 °C. Foram feitas três determinações independentes.

#### **4.3.4 Otimização do controle de qualidade**

Para a determinação do controle de qualidade das nanopartículas radiomarcadas foram testados diversos sistemas utilizando Cromatografia em papel ascendente (CP) ou Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (Tabela 1). Neste método, pingou-se uma pequena alíquota da preparação radiofarmacêutica em fitas de papel ou fitas cromatográficas de fibra de vidro impregnadas com sílica gel (ITLC-SG) e a cromatografia foi realizada mergulhando as fitas em um solvente apropriado contido em cubas de vidros, de modo que a amostra pingada permaneceu acima do solvente (SAHA, 2004). Cada sistema testado, era composto de duas fitas (Fita 1 e 2) a fim de separar e quantificar as três possíveis

espécies radioquímicas presentes nas amostras:  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ,  $\text{TcO}_2$  e  $^{99\text{m}}\text{Tc-NPs}$ . As fases estacionárias eram compostas de fitas com 8 cm de comprimento e 1 cm de largura que foram marcadas com finas linhas a lápis a partir da origem, como mostra a Figura 5.

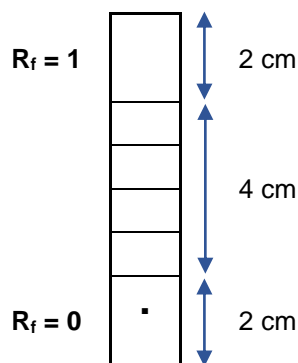


Figura 5: Esquema das fitas cromatográficas utilizadas para determinação das purezas radioquímicas.

Tabela 1: Sistema cromatográficos testados para otimização do controle de qualidade.

<sup>1</sup>Sílica gel <sup>2</sup>citrato ácido dextrose

Sistema	Fita 1		Fita 2	
	Fase Móvel	Fase Estacionária	Fase Móvel	Fase Estacionária
<b>A</b>	Metiletilcetona (MEK)	ITLC-SG <sup>1</sup>	Acetonitrila 50% (v/v)	ITLC-SG
<b>B</b>	$\text{NaCl}_{(\text{aq})}$ 0.9%	ITLC-SG	Etanol: $\text{NH}_4\text{OH}$ : $\text{H}_2\text{O}$ (2:1:5)	Whatman nº3
<b>C</b>	Acetona	Whatman nº1	Etanol: $\text{NH}_4\text{OH}$ : $\text{H}_2\text{O}$ (2:1:5)	ITLC-SG
<b>D</b>	Acetona	ITLC-SG	Piridina: Ácido Acético: $\text{H}_2\text{O}$ (3:5:1.5)	Whatman nº1
<b>E</b>	Acetona	Whatman nº1	Piridina: Ácido Acético: $\text{H}_2\text{O}$ (3:5:1.5)	Whatman nº1
<b>F</b>	Acetona	Whatman nº1	ACD <sup>2</sup>	ITLC-SG

#### 4.3.5 Marcação das nanopartículas de albumina e papaína com tecnécio-99m

O radioisótopo tecnécio-99m foi eluído de um gerador molibdênio-99/tecnécio-99m ( $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) (IPEN/CNEN-SP), em solução de cloreto de sódio

0,9 % na forma de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ). Em um frasco de reação foram colocados 1 mg de papaína nativa, papaína irradiada (sem a presença de etanol), nanopartícula de papaína (P-NPs) e nanopartícula de albumina (BSA-NPs), respectivamente, dissolvidas em solução tampão fosfato 50 mM (pH= 7,4). Em seguida, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  de uma solução 22 mM de cloreto estano (SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) em ácido clorídrico (HCl 0,1N), e 500  $\mu\text{L}$  de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ) com atividade de 740 MBq. A reação ocorreu sob agitação leve à temperatura de 45 °C, por 30 min. Após resfriamento o volume foi ajustado para 1 mL com solução de cloreto de sódio 0,9 %. Todas as soluções utilizadas na radiomarcagem foram previamente nitrogenadas.

#### **4.3.6 Avaliação radioquímica dos radiotraçadores**

A avaliação radioquímica foi realizada por Cromatografia em papel ascendente (Whatman 1), usando dois sistemas de solventes: acetona e solução de piridina:ácido acético:água (3:5:1,5). O cálculo radioquímico foi determinado em porcentagem da atividade de cada espécie radioquímica em relação a atividade total da fita, sempre de acordo com o fator de retenção ( $R_f$ ) correspondente.

A avaliação radioquímica também foi realizada por Cromatografia Líquida de alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu SCL-10AVP; Japão), equipado com detector de radioatividade Radiomatic 610TR (PerkinElmer, EUA) e detector UV-VIS Shimadzu SPD-10AVP. Foi utilizada uma coluna de exclusão de tamanho (SEC-HPLC) ProteinPak 300SW (7,5 x 300 mm, Waters, Milford, MA, USA) com detecção em 280 nm e fluxo de 2 mL/min ou 0,5 mL/min, respectivamente para complexos de papaína e albumina. O sistema de solventes no CLAE consistiu-se em solução de tampão fosfato 50 mM em modo isocrático.

#### **4.3.7 Estabilidade Radioquímica de bancada dos complexos de papaína**

A estabilidade de bancada dos complexos de papaína foi estudada armazenando as preparações a 4°C, 25°C e 37°C e, posteriormente, determinando as purezas radioquímicas em diferentes intervalos de tempo (1h, 3h e 6h ).

#### **4.3.8 Estabilidade Radioquímica das Nanopartículas de papaína e albumina frente a Histidina e Soro Humano**

A estabilidade das nanopartículas de albumina e papaína radiomarcadas frente ao aminoácido histidina ( $10^{-2}$  M) e ao soro humano, foi avaliada à temperatura ambiente nos tempos zero (controle), 1, 3, 6 e 24 horas após seu preparo. Para tal finalidade, alíquotas de 900  $\mu$ L destas soluções foram misturadas a 100  $\mu$ L das nanopartículas radiomarcadas em tubos Eppendorf®. As purezas radioquímicas foram quantificadas por cromatografia de camada delgada (CCD), seguindo o mesmo procedimento descrito no item 4.5.

#### **4.3.9 Biodistribuição de nanopartículas em camundongos saudáveis balb/C**

Os estudos de biodistribuições dos nanocarreadores foram realizados em camundongos balb/C fêmeas com massa corpórea entre 20 e 25 gramas. Foram administrados 50  $\mu$ L do marcador ( $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs e  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs) por via endovenosa caudal com atividade 37-74 MBq. Os estudos foram conduzidos com a eutanásia dos animais em 2h, 6h e 24h, após a administração das nanopartículas de radiomarcadas.

Tecidos, órgãos e fluídos (sangue, coração, pulmão, rins, baço, estômago, pâncreas, fígado, intestino grosso e delgado, músculo, osso e cérebro), foram retirados, pesados e colocados em tubos para que sua atividade radioativa fosse mensurada em contador do tipo poço NaI(Tl). A cauda foi utilizada para correção da atividade administrada.

O padrão foi preparado com uma alíquota da mesma solução injetada e colocado para a contagem da atividade simultaneamente à avaliação da atividade nos órgãos. As porcentagens de dose injetada por órgão (%DI/órgão) e por grama (%DI/g) foram calculadas considerando o padrão como 100% da dose administrada aos animais, e os experimentos conduzidos considerando um número amostral de três animais por tempo estudado.



## **4.4 Estudos *in vitro***

### **4.4.1 Cultivo Celular**

As células do carcinoma de mama humano das linhagens MDA-MB231 e MCF-7 foram cultivadas a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub> em meio de cultura RPMI 1640, enriquecido com 10 % (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. Após atingirem a confluência, as células foram então tripsinizadas, centrifugadas (5 min a 100xg), ressuspendidas em tampão fosfato-salina (PBS, pH=7,4) e disponibilizadas para plaqueamento e posterior ensaio.

### **4.4.2 Análise de Proliferação Celular**

A análise de proliferação celular foi realizada utilizando o kit brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio MTT (Sigma-aldrich), segundo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Este ensaio colorimétrico utiliza a atividade metabólica como parâmetro para a viabilidade celular e proliferação. O ensaio baseia-se na conversão do sal tetrazólio MTT em um formazan (sal insolúvel colorido). Esta redução do MTT é feita pela enzima succinato-tetrazólio redutase somente em células metabolicamente ativas. As células MDA-MB231 e MCF-7 foram cultivadas na proporção  $5 \times 10^3$  células/poço nas placas de 96 poços com meio completo e 10% de soro. Após adesão, as células foram tratadas com concentrações de nanopartícula de albumina e papaína variando entre 6,25 µg a 1 mg. Após 24h e 48h de incubação com as nanopartículas, removeu-se o meio e lavou-se duas vezes com PBS 1x para retirar qualquer traço do vermelho de fenol presente. Adicionou-se 10 µL de MTT (12 mM) às células e ao controle, que foi tratado apenas com meio, e deixou-se reagir por 4 horas a 37 °C. Após incubação, foram adicionados 100 µL de DMSO, os poços homogeneizados e a quantificação realizada através da leitura da absorbância das amostras no leitor de placas (BioTek, Winooski, VT, USA) operando no comprimento de onda 570 nm.

#### 4.4.3 Ensaio *in vitro* de ligação específica

Para realização dos ensaios *in vitro* as células foram ressuspensas em meio de cultura RPMI contendo 1% de SFB, e distribuídas em placas de seis poços a uma concentração final de  $7 \times 10^5$  células/poço. Após 24 horas de incubação, as placas foram disponibilizadas para os ensaios.

Os ensaios de ligação específica foram realizados com os marcadores  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanoalbumina em células MDA-MB231 e  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanopapaína nas células de tumor mamário MDA-MB231 e 4T1, na concentração de 1,35 nM, utilizando meio de cultura como solvente. As nanopartículas não radiomarcadas na concentração de 1  $\mu\text{M}$  por poço foram utilizadas como competidoras.

Para determinação da ligação total, adicionou-se aos poços 1400  $\mu\text{L}$  do meio de cultura e 100  $\mu\text{L}$  da nanopartícula radiomarcada. Para determinação da ligação não específica, 1300  $\mu\text{L}$  do meio de cultura, 100  $\mu\text{L}$  do competidor e 100  $\mu\text{L}$  do radiotraçador.

As células foram incubadas por 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Ao final de cada tempo, o sobrenadante foi coletado e as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salina (PBS) gelado. Para determinação da ligação à membrana celular, foi realizada lavagem ácida por 5 minutos com solução tampão glicina (50 mM Glicina e 1M NaCl, pH=2,8). E para avaliação da internalização as células, foram tripsinizadas com 200  $\mu\text{L}$  de Tripsina. O conteúdo de todas as lavagens foi acondicionado em tubos para mensuração da atividade radioativa.

#### 4.5 Aquisição de imagem SPECT/CT

As imagens foram adquiridas de camundongos fêmeas com tumor espontâneo de mama (*MMTV-PyMT*) quando os tumores já estavam sólidos e palpáveis. Os animais foram anestesiados com uma mistura de 3% de isoflurano em oxigênio (100%). A nanopartícula de papaína radiomarcada foi injetada por via endovenosa caudal, 37 MBq (1 mCi; 100  $\mu\text{L}$ ), e após 1 hora, imagens foram adquiridas no equipamento micro SPECT/PET/CT Triumph<sup>TM</sup> (Gamma Medica-Ideas, Sherbrooke, EUA) equipada com dois detectores de cintilação (opostos 180°) e uma fonte de raio-X de 45 kVp e corrente de 390  $\mu\text{A}$ .

Primeiramente, foram obtidas imagens SPECT utilizando colimador de alta resolução de 5 furos. Para aquisição da imagem, foi utilizado um protocolo

com um total de 32 projeções distribuídas em 180° de cada detector. A câmera de captura foi ajustada a um pico de energia de 140 KeV e o tempo de aquisição foi de 60 s por projeção.

Na sequência, sem qualquer realocação ou reposicionamento do animal, imagens CT foram obtidas através de 256 projeções com magnificação de 1,3x. Tempo total de aquisição de 1 min. Essas imagens foram reconstruídas aplicando-se algoritmo do tipo FBP (retroprojeção filtrada), com matriz de 512 x 512 e pixel de 0,17 x 0,17 mm, por meio do software Triumph X-OTM 4.2 (Gamma Medica-Ideas, EUA).

As imagens SPECT foram reconstruídas pelo método iterativo OSEM, com 5 iterações e 8 subconjuntos por iteração. Os dados reconstruídos foram processados através do software Amide, utilizando as imagens CT como referência anatômica.

Regiões de interesse tridimensionais (ROI; do inglês *region of interest*) foram delimitadas manualmente ao redor do tumor no plano coronal, sagital e axial, e seu valor médio de contagem por pixel (CPP) determinado. Uma ROI de mesma área foi desenhada em região desprovida de tecido neoplásico (músculo) para obtenção dos valores médios de CPP de fundo (*background*).

Os valores da razão  $\frac{\text{Tumor}}{\text{Músculo}}$  foram calculados para cada tumor encontrado nos animais.

#### **4.6 Biodistribuição em modelo tumoral**

Após aquisição das imagens SPECT/CT os animais foram eutanasiados e estudos de biodistribuição foram conduzidos como descrito no item 4.8. Os tumores localizados no FOV foram cortados em duas secções e disponibilizados para contagem radioativa e ensaio de imuno-histoquímica e autorradiografia.

#### **4.7 Imuno-histoquímica**

Os animais utilizados para imagem SPECT/CT foi eutanasiado por extirpação cardíaca e os tumores coletados. Após isolamento do material de interesse, este foi congelado em meio de congelamento (Tissue-Tek O.C.T) em

criostato. Os tecidos foram cortados em uma espessura de 10 µm em criostato (Leica CM), e os cortes histológicos coletados em lâminas gelatinizadas e mantidos em freezer -20 °C até o processamento das lâminas por imunoperoxidase com anticorpo específico para detecção de papaína.

Os cortes foram tratados com peróxido de hidrogênio 1% para remoção da peroxidase endógena, por 10 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em tampão fosfato (PB 0,1M) por três vezes de 10 minutos, e foram então incubados com anticorpo primário extraído de cabra contra papaína (NBP2-44059, Novus Biologicals) em uma concentração de 1:200, em PB com 0,3% de Triton X-100 e 5% do soro normal do animal em que foi produzido o anticorpo secundário, ou seja, soro normal de jumento (Jackson Immunoresearch labs INC, 017-000-121) ou com anticorpo primário extraído de coelho contra albumina Bovina (NBP1-94976, Novus Biologicals) também em concentração de 1:200 em PB com 0,3% de Triton X-100 e 5% de soro normal de burro (Jackson Immuno Research Lbs - 017-000-121) e anticorpo secundário - contra coelho feito em burro biotinizado ( Jackson Immuno Research Lbs - 711-005-152).

Os cortes foram incubados por um período de 14 a 18 horas à temperatura ambiente (25 °C).

Após incubação, os cortes foram lavados novamente em tampão fosfato à temperatura ambiente e incubados por duas horas com o anticorpo secundário biotinizado contra as imunoglobulinas do animal no qual foi feito o anticorpo primário, ou seja, anti-cabra feito em jumento em uma concentração 1:200. Após nova série de lavagens à temperatura ambiente, os cortes foram colocados por duas horas numa solução de Triton X-100 0,3% em tampão fosfato 0,1 M com 0,4 M de NaCl contendo o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC ELITE Kit, Vector Labs., Burlingame, CA, EUA). Após nova série de lavagens, os cortes foram imersos em um meio contendo 3,3'diaminobenzidina (DAB-Sigma-aldrich, Saint Louis, MO, EUA) 0,05 % em tampão fosfato 0,1M por 5 minutos. Foram acrescentados a seguir 1 mL de uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,1 % em água destilada, mantendo-se os cortes neste banho até que a reação fosse evidenciada. Atingida a imunorreatividade desejada com o desenvolvimento de coloração marrom, os cortes foram removidos da solução DAB e imersos em tampão PB 0,1 M. Depois de nova série de lavagens em tampão fosfato com objetivo de remoção do excesso de reagente, os cortes foram banhados em

solução de tetróxido de ósmio 0,1 %, por 15-30 segundos, desidratadas por uma série de álcoois em concentrações crescentes, clareadas com Xilol (Synth) e cobertas com lamínulas, tendo como meio de montagem o Permount (Sigma). Uma análise qualitativa de perfil de marcação foi realizada em microscópio de luz. Imagens digitais foram capturadas em microscópio óptico (E1000, Nikon) acoplado a uma câmera digital e ao programa Nikon Imaging Software ACT-U.

#### **4.8 Estudo auto-radiográfico *ex vivo***

Secções sequenciais (10  $\mu\text{m}$ ) dos mesmos tecidos utilizados para o estudo de imunohistoquímica foram usadas para os estudos auto-radiográficos após a aquisição das imagens SPECT/CT.

Secções de 30  $\mu\text{m}$  de espessura foram expostas em placas de fósforo fotossensível por 24 h, no interior de cassetes. A leitura das placas foi realizada em equipamento Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare, EUA) com tamanho de pixel de 50  $\mu\text{m}$ . As imagens foram analisadas qualitativamente para o perfil de marcação.

## 5 RESULTADOS

### 5.2 Síntese e caracterização das nanopartículas

Após a irradiação, as nanopartículas foram previamente filtradas utilizando filtro de seringa e caracterizadas quanto à formação de bitirosina, ao tamanho e à morfologia.

O efeito da radiação sobre as nanopartículas, entre outros, foi observado através da formação da bitirosina, originando uma ligação covalente Tyr-Tyr, que promoveu a reticulação das proteínas e consequentemente a formação das nanoestruturas (FAZOLIN et. al., 2018).

Quando esses grupos cromóforos foram avaliados por meio de medição de fluorescência, observou-se que a papaína irradiada e a nanopapaína apresentaram, respectivamente, 4 e 2,3 vezes mais ligações deste tipo que a proteína nativa. Enquanto a albumina irradiada e a nanoalbumina possuem, nesta ordem, 5,5 e 2 vezes mais ligações Tyr-Tyr que a proteína originária (Fig. 6).

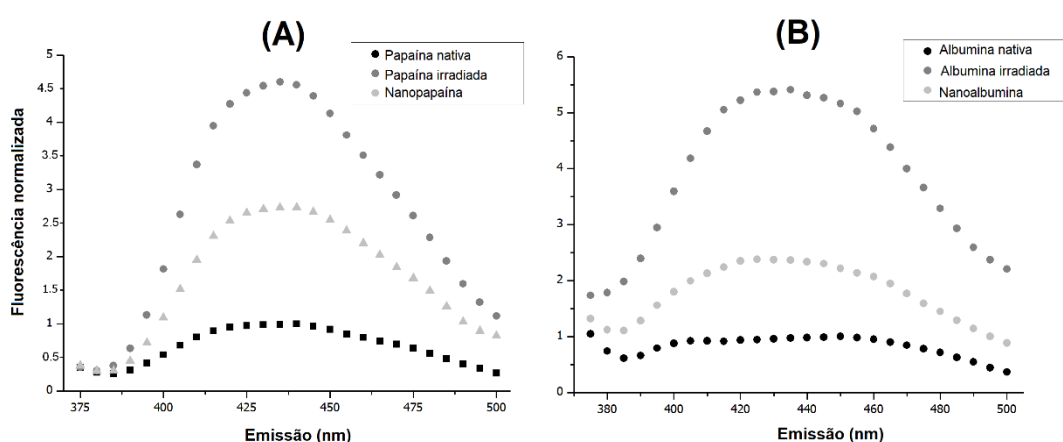


Figura 6 - Análise de fluorescência das amostras de **(A)** nanopartículas de papaína e **(B)** nanopartículas de albumina ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) irradiadas a  $10 \text{ kGy}$ ,  $5 \text{ kGy.h}^{-1}$  em presença/ausência de etanol indicando formação de bitirosina ( $\lambda_{\text{Ex}} 350 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{Em}} 375\text{-}500 \text{ nm}$ ).

O espalhamento dinâmico de luz foi utilizado para medir o tamanho hidrodinâmico médio das nanopartículas, logo após a síntese, e também em função do tempo decorrido após a síntese. Observou-se uma maior frequência de tamanho ocorrendo numa faixa de  $6,5$  a  $13,5 \text{ nm}$  para a solução de nanopapaína com potencial zeta de  $-11,1 \pm 5,5$  e índice de polidispersão de  $52,2\%$  (Fig. 7 e 8)

e de 14 a 59 nm para nanoalbumina com potencial zeta de  $-14,7 \pm 6,1$  e índice de polidispersão de 20% (Fig. 9 e 10), valores que condizem com a média encontrada nas análises das imagens de microscopia eletrônica de transmissão e varredura (MET e MEV) (Fig. 11, 12, 13, 14, 15 e 16), e que se mantiveram estáveis por até 15 dias após a síntese.

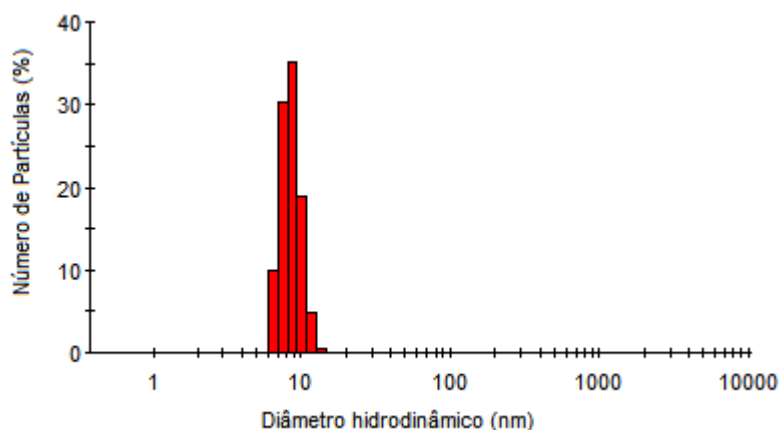


Figura 7 - Distribuição de tamanho por número de partículas para P-NPs [ $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  e 20% EtOH (v/v)] irradiada a 10 kGy ( $5 \text{ kGy.h}^{-1}$ ) em banho de gelo. Diâmetro médio foi igual a  $9,3 \pm 1,9 \text{ nm}$  com índice de polidispersão de 52,2% ( $n=3$ )

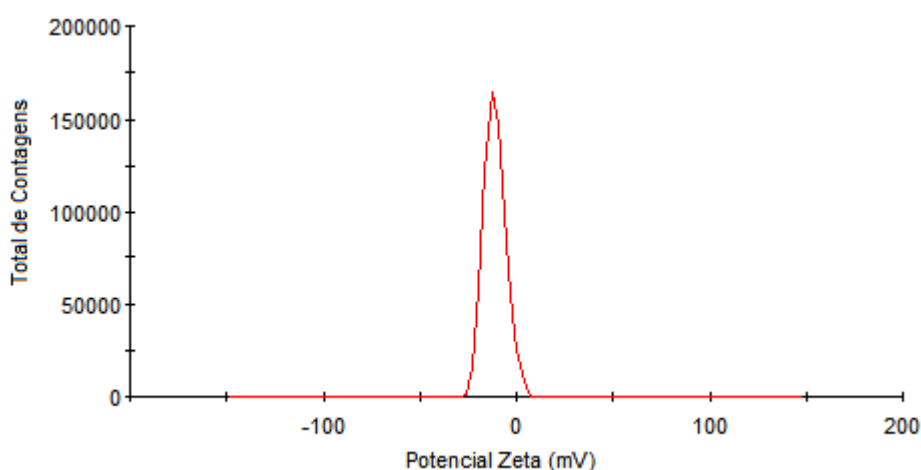


Figura 8 - Potencial Zeta medido para P-NPs diluídas em água.  $Z = -11,1 \pm 5,5 \text{ mV}$  ( $n=3$ )

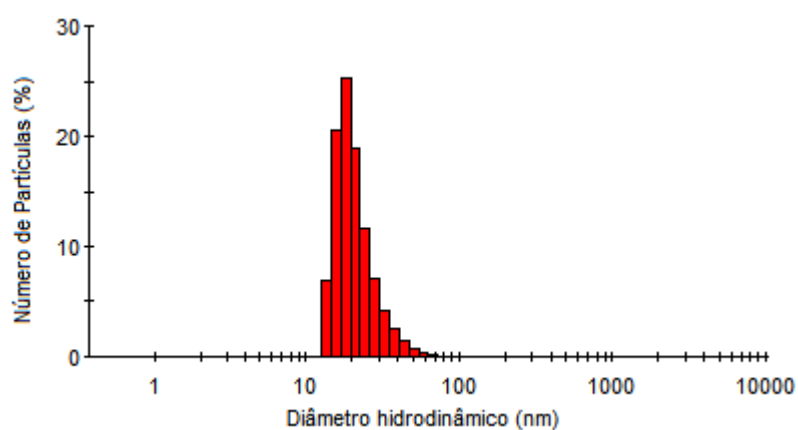


Figura 9 - Distribuição de tamanho por número de partículas para BSA-NPs ( $10 \text{ mg.mL}^{-1}$  e 30% EtOH (v/v)) irradiada a  $10 \text{ kGy}$  ( $5 \text{ kGy.h}^{-1}$ ) em banho de gelo. Diâmetro médio foi igual a  $25,1 \pm 2,9 \text{ nm}$  com índice de polidispersão de 20% ( $n=3$ )

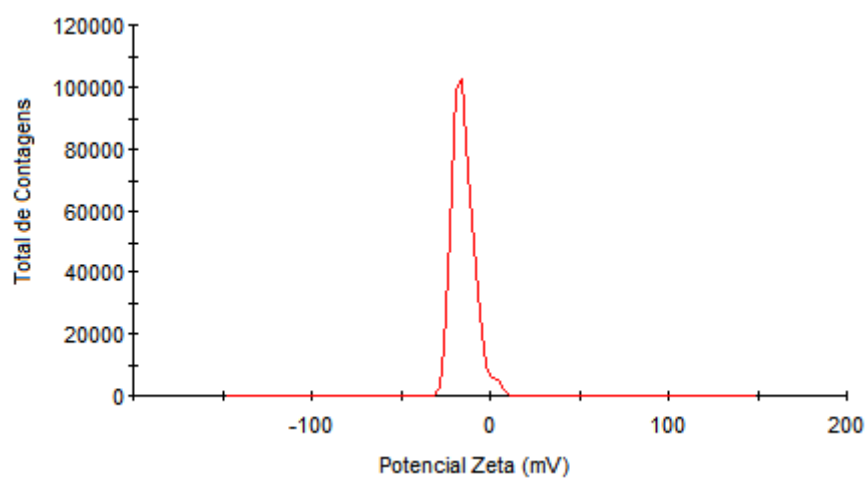


Figura 10 - Potencial Zeta medido para BSA-NPs diluídas em água.  $Z = -14,7 \pm 6,1$  ( $n=3$ )



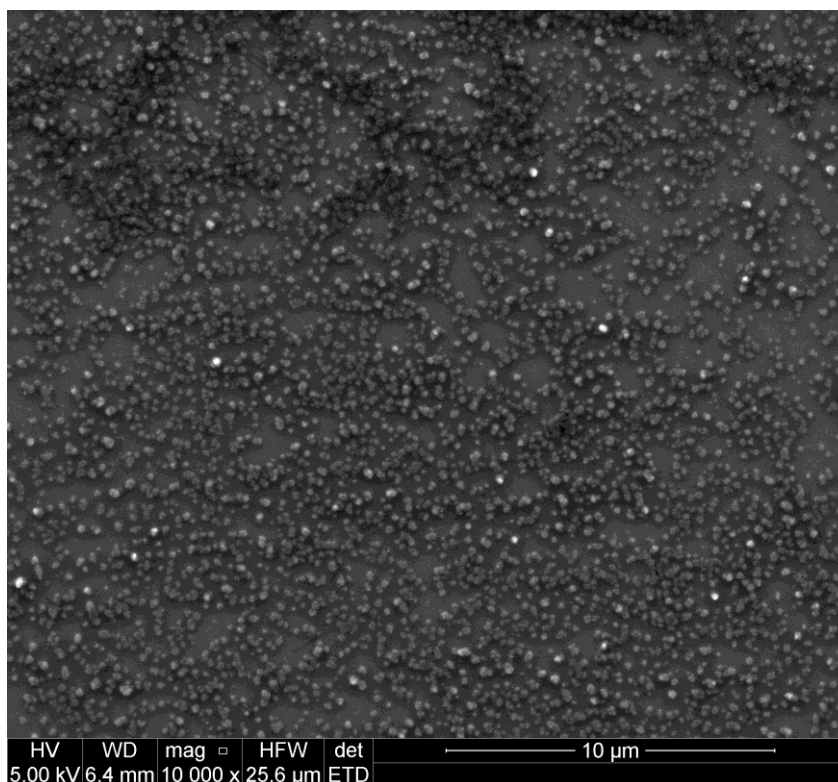


Figura 11 - Micrografia eletrônica de varredura de BSA-NPs ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Magnificação de 10 000 vezes.

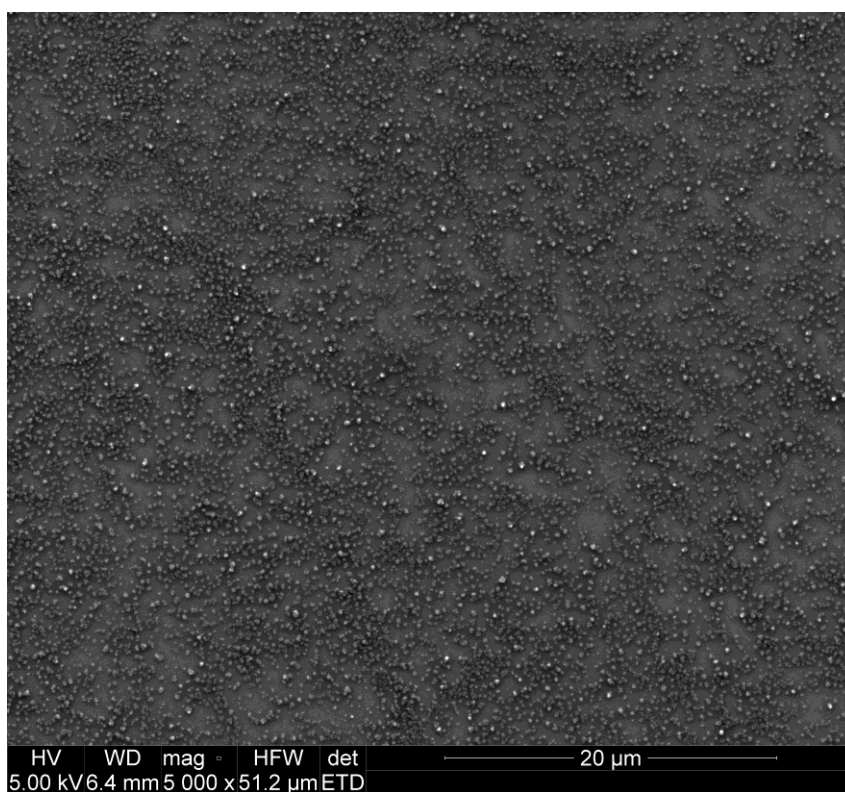


Figura 12 - Micrografia eletrônica de varredura de BSA-NPs ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Magnificação de 5 000 vezes.

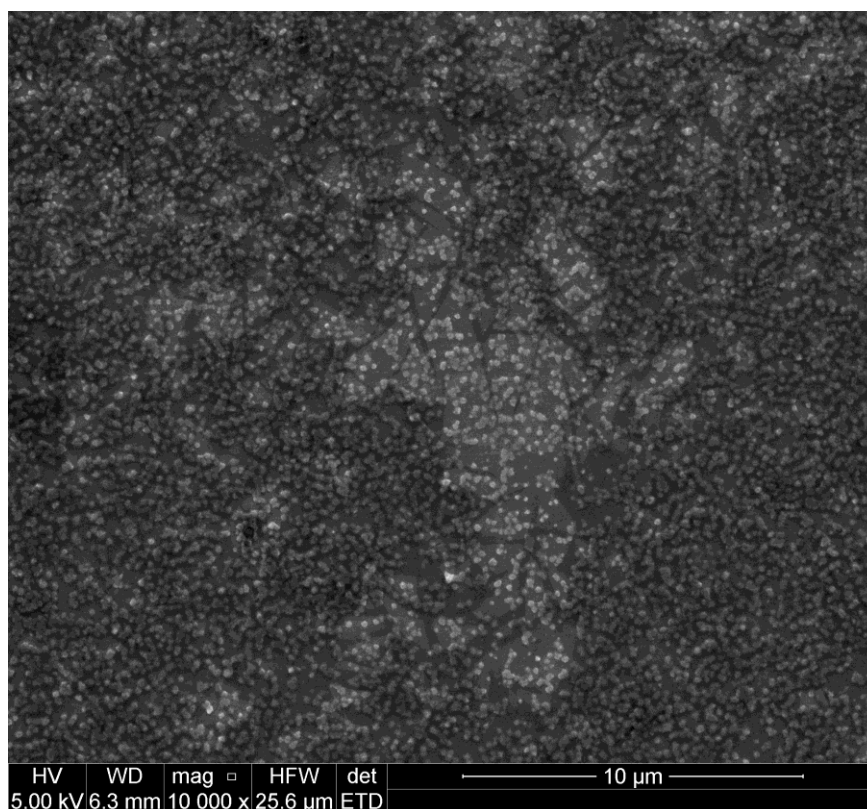


Figura 13 - Micrografia eletrônica de varredura de P-NPs ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Magnificação de 10 000 vezes.

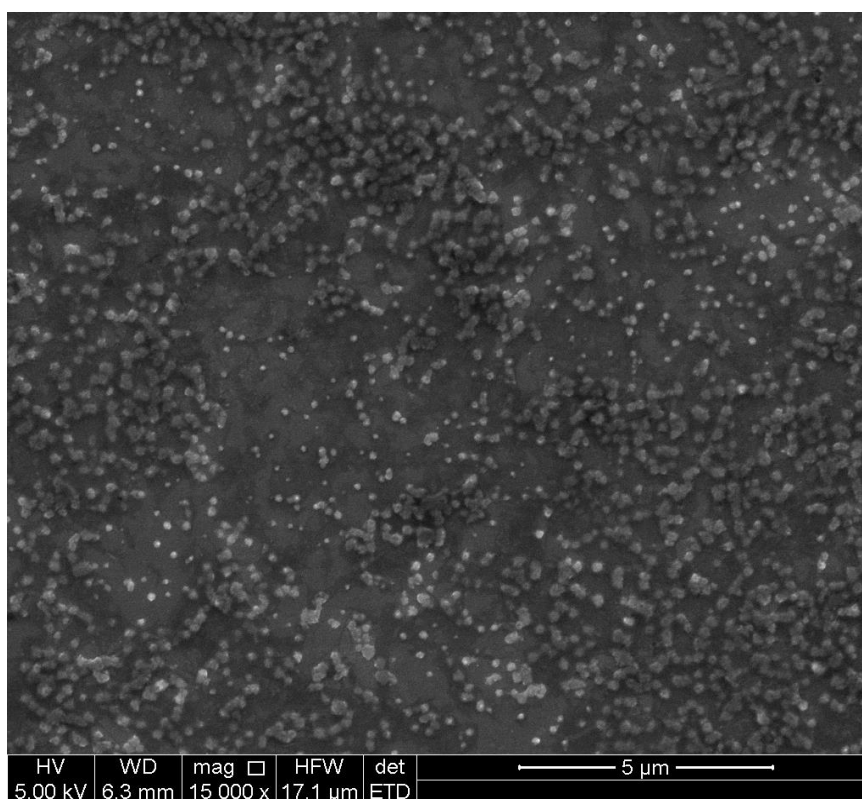


Figura 14 - Micrografia eletrônica de varredura de P-NPs ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Magnificação de 15 000 vezes.

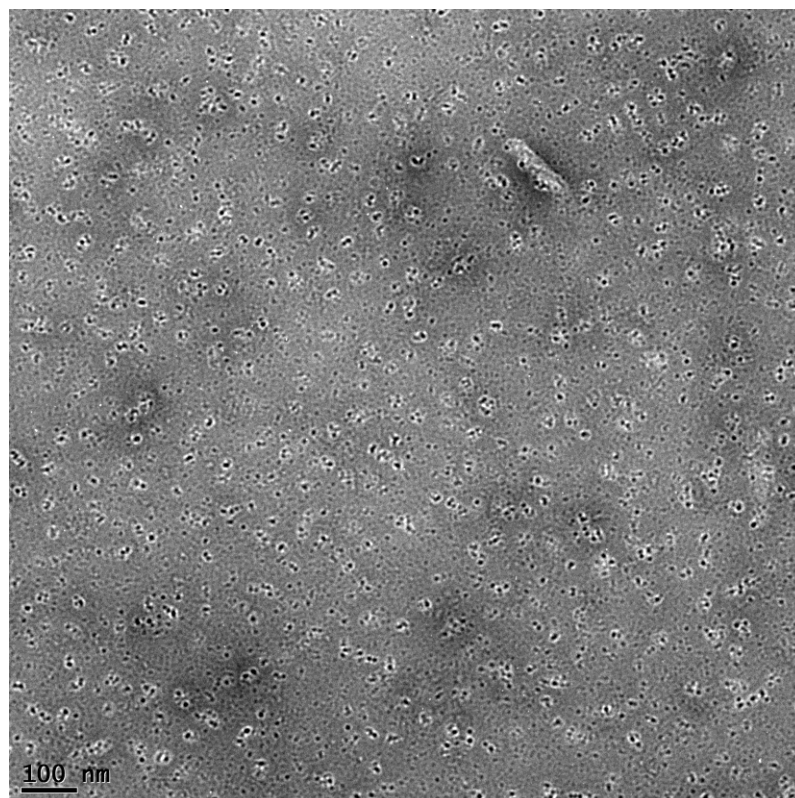


Figura 15 - Micrografia eletrônica de transmissão de BSA-NPs ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

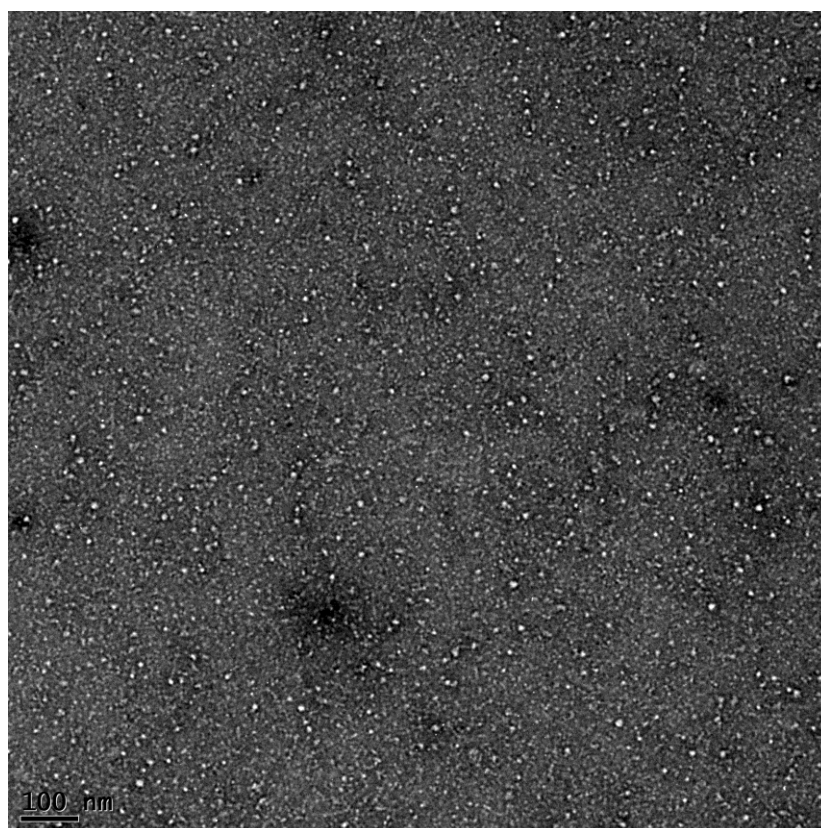


Figura 16 - Micrografia eletrônica de transmissão de P-NPs ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

### 5.3 Otimização do controle de qualidade

Dos diversos sistemas testados para otimizar o controle de qualidade das nanopartículas radiomarcadas, apenas dois mostraram-se adequados, sistema **D** e **E** (Tabela 1). Nesses sistemas, foi possível separar as três espécies radioativas presentes na marcação:  $\text{Na}^{99\text{mTcO}_4}$ ,  $^{99\text{mTcO}_2}$  e as nanopartículas radiomarcadas ( $^{99\text{mTc-NPs}}$ ), que apresentaram fatores de retenção diferentes nas fitas utilizadas (Tabela 2). O sistema E foi escolhido devido ao menor custo envolvendo os materiais utilizados.

Tabela 2: Fatores de retenção das espécies radioativas presentes na radiomarcção nos sistemas cromatográficos testados.

Sistema	Fator de Retenção ( $R_f$ ) Fita 1			Fator de Retenção ( $R_f$ ) Fita 2		
	$\text{Na}^{99\text{mTcO}_4}$	$^{99\text{mTcO}_2}$	$^{99\text{mTc-NPs}}$	$\text{Na}^{99\text{mTcO}_4}$	$^{99\text{mTcO}_2}$	$^{99\text{mTc-NPs}}$
<b>A</b>	1	0	0	1	0	0
<b>B</b>	1	0	0	1	0	0
<b>C</b>	1	0	0	1	0	0
<b>D</b>	1	0	0	1	0	0,5-1,0
<b>E</b>	1	0	0	1	0	0,5-1,0
<b>F</b>	1	0	0	1	0	0

### 5.4 Radiomarcção e avaliação radioquímica dos complexos

As purzas radioquímicas da  $^{99\text{mTc}}$ -papaína nativa,  $^{99\text{mTc}}$ -papaína irradiada,  $^{99\text{mTc}}$ -Nanopapaína e  $^{99\text{mTc}}$ -Nanoalbumina, foram avaliadas por Cromatografia em papel ascendente utilizando um sistema de solventes composto por (1) acetona e (2) piridina: ácido acético: água (3: 5: 1,5). Esse sistema foi conveniente para identificação das impurezas radioquímicas, pois cada espécie apresentou diferentes fatores de retenção. Em acetona, o pertecnetato de sódio  $\text{Na}^{99\text{mTcO}_4}$  apresentou  $R_f=1$ , enquanto o  $^{99\text{mTcO}_2}$  e o complexo radiomarcado permaneceram na origem da fita ( $R_f=0$ ). Já em solução de piridina: ácido acético: água (3: 5: 1,5), o  $\text{Na}^{99\text{mTcO}_4}$  e o complexo radiomarcado apresentaram  $R_f=0,5 - 1,0$  e  $^{99\text{mTcO}_2}$  e  $R_f=0$ .

Os complexos foram radiomarcados com atividade específica de 277,5 MBq/mg e, através de cromatografia em camada delgada, obteve-se uma pureza radioquímica de  $92,8 \pm 1,1\%$ ;  $89,8 \pm 2,3\%$ ;  $89,3 \pm 1,4\%$  e  $94,11 \pm 0,3\%$  respectivamente, para  $^{99m}\text{Tc}$ -papaína nativa,  $^{99m}\text{Tc}$ -papaína irradiada,  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanopapaína e  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanoalbumina.

Utilizando a Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC-HPLC), com o sistema de detecção dupla (UV=280 nm e detector radioativo), foi possível observar comportamentos semelhantes dos complexos de papaína não radiomarcados e radiomarcados, apresentando tempos de retenção entre 5 e 6 min (2 mL/min) (Fig. 17 e 18). É importante ressaltar que nesta análise, para os complexos de papaína o tempo de retenção do  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  (5,6 min) coincidiu com o dos complexos radiomarcados. Assim, a cromatografia planar deve ser realizada para excluir a presença desta impureza. Já para  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanoalbumina o tempo de retenção foi 10,6 min enquanto o  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  25,1 min (0,5 mL/min) (Fig. 19).

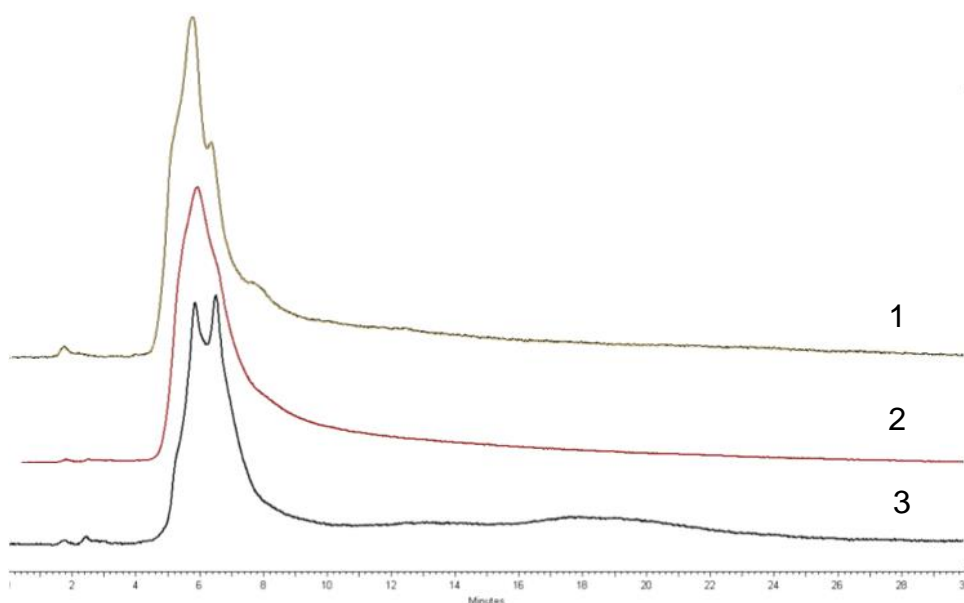


Figura 17 - Perfil do cromatograma (UV=280 nm) dos complexos não radiomarcados: **(1)** Nanopapaína, **(2)** Papaína irradiada e **(3)** Papaína Nativa. Fluxo de 2 mL/min.

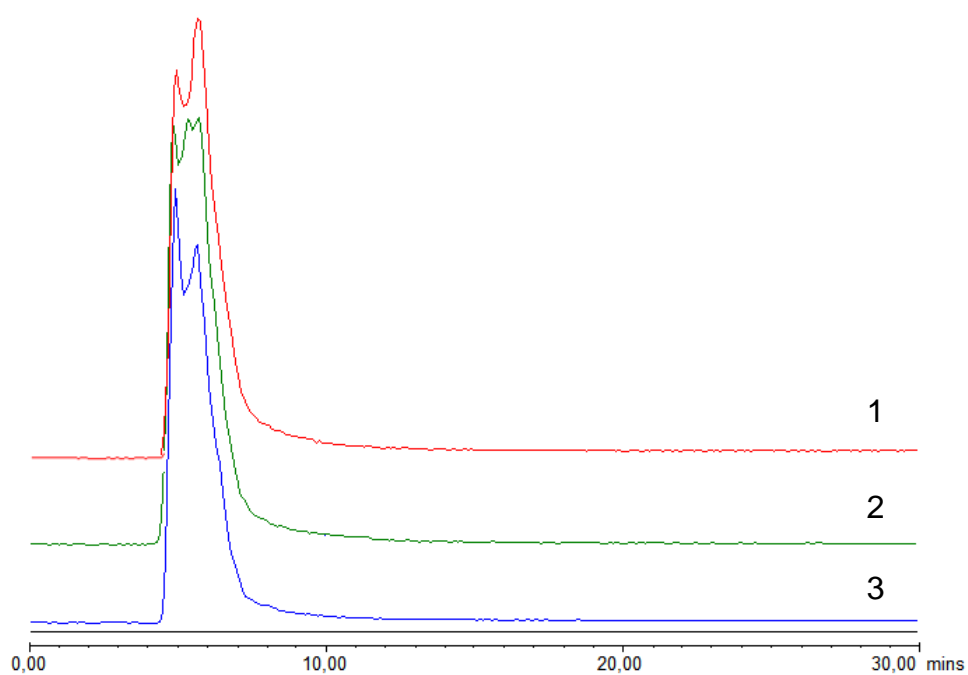


Figura 18 - Perfil do radiocromatograma do **(1)**  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanopapaína, **(2)**  $^{99m}\text{Tc}$ -Papaína irradiada e **(3)**  $^{99m}\text{Tc}$ -Papaína Nativa. Fluxo de 2 mL/min.

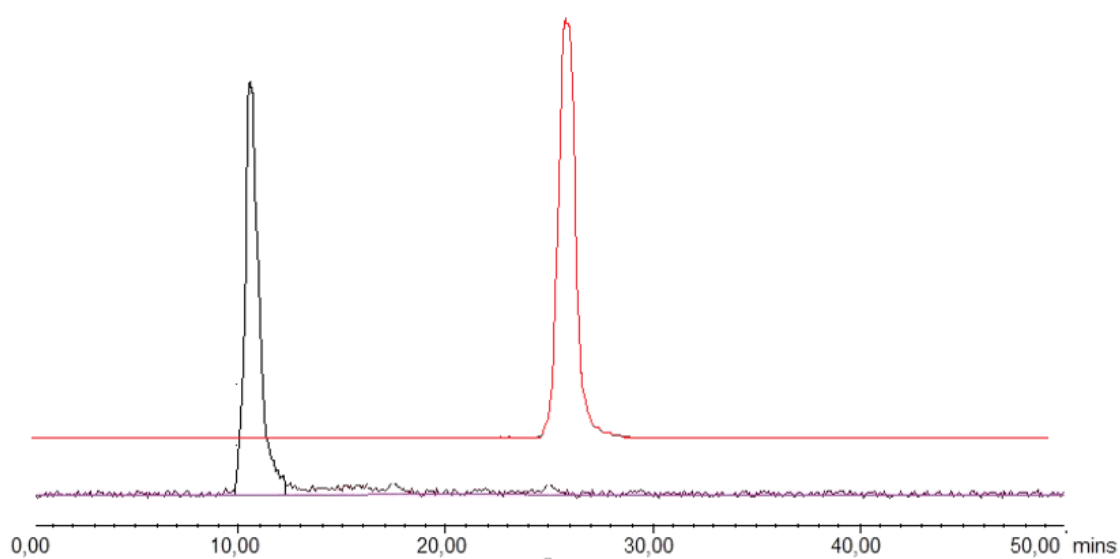


Figura 19 - Perfil do radiocromatograma de **(1)**  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  e **(2)**  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanoalbumina. Fluxo de 0,5 mL/min.

### 5.5 Estabilidade Radioquímica de bancada

A estabilidade radioquímica dos complexos de papaína foi avaliada nos tempos de 1, 3 e 6 h nas temperaturas de 4, 25 e 37 ° C. A  $^{99m}\text{Tc}$ -Papaína nativa mostrou-se estável em todos os tempos de estudo e em todas as condições de temperatura (Fig. 20A). Por outro lado, a  $^{99m}\text{Tc}$ -Papaína irradiada mostrou-se instável, principalmente a 25°C ( $p > 0,05$ ) (Fig. 20B). Enquanto a  $^{99m}\text{Tc}$ -nanopapaína, produto de interesse, apresentou boa estabilidade, exceto após 6 h de incubação a 25°C e 37°C (Fig. 20C), com aumento da concentração de  $\text{TcO}_4$  de 3,5% para 6%, entre a 3ª e a 6ª hora. Contudo, a concentração de  $\text{TcO}_2$  permaneceu constante em todos os tempos. Em relação a  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanoalbumina, o produto mostrou-se estável em todos os tempos de estudo, permanecendo com a pureza radioquímica descrita no item 5.4. Ressalta-se que não foram realizados radiomarcção e estudos de estabilidade com albumina nativa, por já ser um produto comercial utilizado em medicina nuclear com estabilidade descrita em literatura.

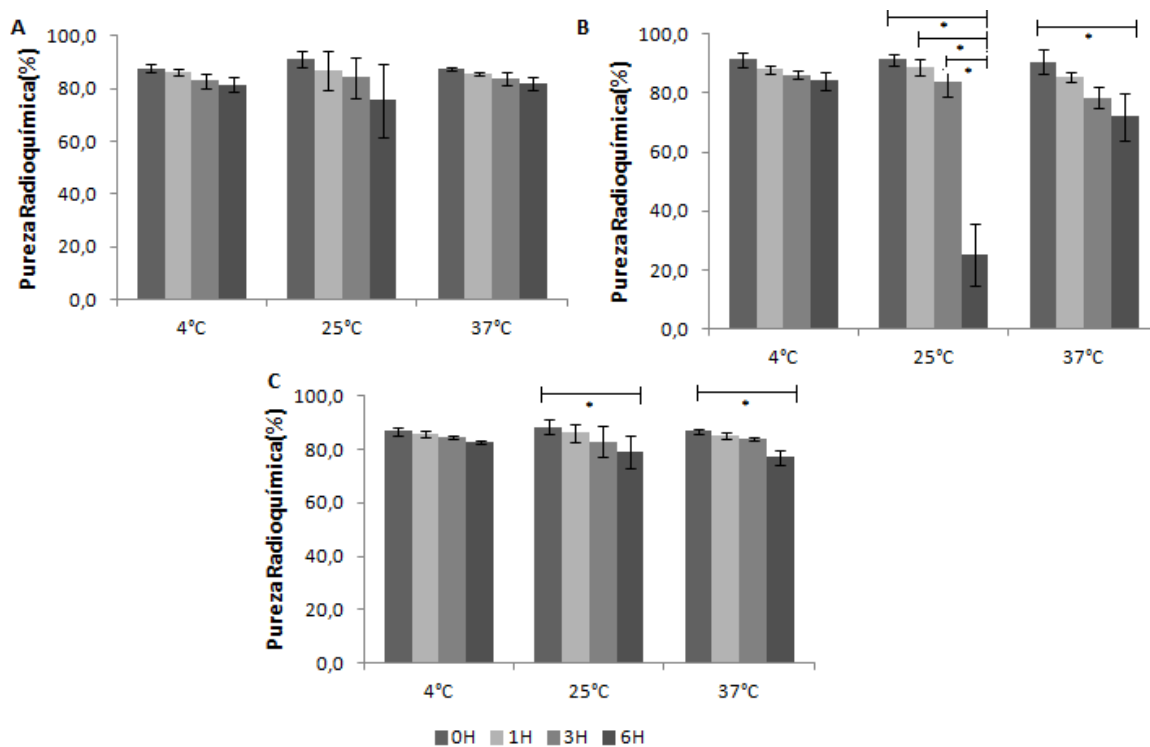


Figura 20 - Estabilidade Radioquímica de (a)  $^{99m}\text{Tc}$ -Papaína Nativa, (b)  $^{99m}\text{Tc}$ -Papaína irradiada e (c)  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanopapaína. \* $<0.05$

## 5.6 Estabilidade Radioquímica frente a Histidina e Soro Humano

As nanopartículas de papaína marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  permaneceram estáveis ( $\geq 90\%$ ) por 6 h durante incubação a  $37^\circ\text{C}$  em solução de histidina e soro humano recém-coletado. Em 24h, verificou-se uma média de degradação de 18,9% e 9,7%, respectivamente em solução de histidina e soro, demonstrando estabilidade em relação à transquelação até 6h pós-radiomarcção (Fig. 21B). Enquanto a  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs mostrou-se estável ( $\geq 95\%$ ) em todos os tempos de estudo e condições de incubação (Fig. 10A).

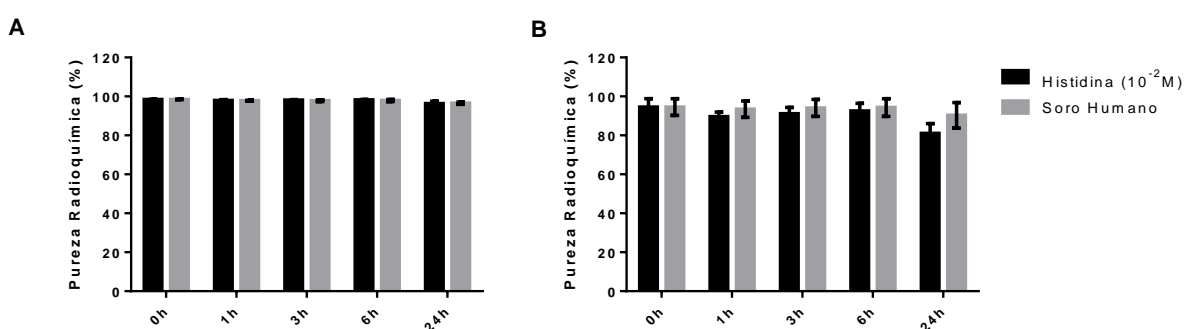


Figura 21 - Estabilidade radioquímica em solução de histidina e soro humano de (A)  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs e (B)  $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs

## 5.7 Biodistribuição de nanopartículas de papaína ( $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs) em camundongos saudáveis balb/C

O conhecimento da taxa de captação das nanopartículas em tecidos, alcançado através de estudos farmacocinéticos *ex vivo*, é essencial para prever sua aplicabilidade diagnóstica e terapêutica. Os resultados de biodistribuição de nanopartículas de papaína radiomarcadas em animais saudáveis balb/C fêmeas, são sumarizados nas Tabela 3 e Figura 22.

Os camundongos receberam uma única dose de nanopapaína radiomarcada com pureza em torno de 90%, como mencionado anteriormente. Esse cuidado é importante uma vez que impurezas radioquímicas  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  e  $^{99m}\text{TcO}_2$  podem comprometer a qualidade dos resultados obtidos, visto que essas impurezas são retidas no trato digestório e no fígado, respectivamente (ZOLLE, 2007).



A curva de clareamento sanguíneo pode ser visualizada na FIG. 22A em porcentagem da dose injetada por grama de sangue (%DI/g) em função do tempo após administração.

Foi observada depuração sanguínea moderada nos tempos iniciais: 2,80%DI/g (2h p.i.) para 1,23 %DI/g (6h p.i.), o que representa uma redução de 43,93% da captação sanguínea, seguida de depuração sanguínea lenta no tempo subsequente.

As captações nos órgãos de excreção são demonstradas na FIG. 22B. Pode-se observar uma concentração acentuada da radioatividade nos rins até 24h após administração da nanopartícula e na bexiga nos tempos iniciais. As maiores captações foram verificadas no tempo de 2h na bexiga ( $18,36 \pm 6,14\%$ DI/g) e rins ( $49,80 \pm 2,98\%$ DI/g), diminuindo gradativamente até o tempo de 24h.

Por outro lado, a radioatividade detectada nos intestinos delgado e grosso, nos tempos de 2h e 6h pós-administração da nanopapaína radiomarcada, sugere que a via hepática tem baixa participação na depuração desse produto. Os valores de %DI/g nesses tempos foram  $1,95 \pm 0,34$ ;  $2,19 \pm 0,75$  e  $0,90 \pm 0,43$ ;  $1,08 \pm 0,34$ , respectivamente.

De fato, os valores de radioatividade por grama detectados no fígado  $8,90 \pm 3,14$  %DI/g em 2h e  $4,08 \pm 1,80$  %DI/g em 6h, reforçam que este órgão tem participação limitada na depuração.

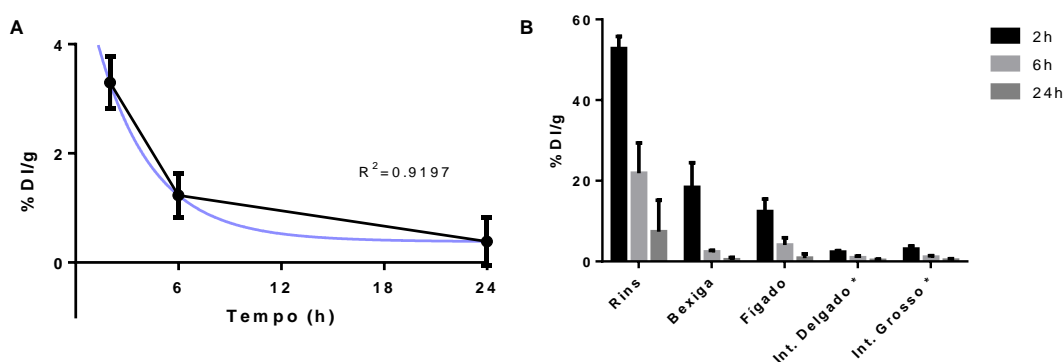


Figura 22 – (A) Curva do clareamento sanguíneo e (B) Captação nos órgãos de excreção do  $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs em camundongos balb/C (n=3). \*Remoção do conteúdo luminal

É importante observar os baixos valores de %DI/g no estômago e tireoide, que podem ser associados à baixa pureza radioquímica em estudos que envolvem radiomarcção com  $^{99m}\text{Tc}$ .

Além desses órgãos, a análise dos dados de biodistribuição revela importante retenção da nanopartícula radiomarcada no baço, com valores de %DI/g:  $12,11 \pm 5,54$  e  $3,80 \pm 1,69$  nos tempos de 2h e 6h, respectivamente.

Nos demais órgãos, as maiores captações, observadas em todos os tempos de estudo, ocorreram nos ossos incluindo a coluna vertebral, pulmões e coração, como pode ser observado na Tabela 3.

Pequenas atividades foram encontradas no cérebro, indicando que o radiotraçador não atravessa a barreira hematoencefálica. No músculo e pâncreas também foram encontradas pequenas atividades, apontando que a nanopartícula não possui afinidade com esses tecidos.

Tabela 3 - Biodistribuição de nanopartículas de papaína radiomarcadas ( $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs) em camundongos balb/C após administração endovenosa caudal (n=3 animais/tempo) (%DI/g). \*(%DI)

<b>ÓRGÃO/TEMPO</b>	<b>2h</b>	<b>6h</b>	<b>24h</b>
Sangue	$2,80 \pm 0,48$	$1,23 \pm 0,40$	$0,38 \pm 0,44$
Coração	$1,67 \pm 0,37$	$0,69 \pm 0,26$	$0,27 \pm 0,31$
Pulmão	$2,95 \pm 0,90$	$1,37 \pm 0,20$	$0,40 \pm 0,47$
Baço	$12,11 \pm 5,54$	$3,80 \pm 1,69$	$0,86 \pm 1,09$
Tireoide*	$0,39 \pm 0,08$	$0,13 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,05$
Cérebro	$0,09 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,02$	$0,02 \pm 0,02$
Pâncreas	$0,71 \pm 0,28$	$0,41 \pm 0,15$	$0,14 \pm 0,14$
Fígado	$8,90 \pm 3,14$	$4,08 \pm 1,80$	$0,85 \pm 1,04$
Estômago	$4,31 \pm 1,73$	$2,63 \pm 0,97$	$0,82 \pm 0,83$
Int. Delgado	$1,95 \pm 0,34$	$0,90 \pm 0,43$	$0,27 \pm 0,27$
Int. Grosso	$2,19 \pm 0,75$	$1,08 \pm 0,34$	$0,34 \pm 0,34$
Rins	$49,80 \pm 2,98$	$21,86 \pm 7,52$	$7,38 \pm 7,78$
Bexiga	$18,36 \pm 6,14$	$2,35 \pm 0,37$	$0,43 \pm 0,51$
Músculo	$0,64 \pm 0,28$	$0,39 \pm 0,17$	$0,10 \pm 0,09$
Osso	$5,54 \pm 1,18$	$4,17 \pm 1,52$	$2,14 \pm 2,38$
Coluna	$2,81 \pm 0,75$	$2,22 \pm 0,76$	$1,19 \pm 0,97$
Medula Óssea	$0,34 \pm 0,10$	$0,08 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,39$

### 5.8 Biodistribuição de nanopartículas de albumina ( $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs) em camundongos saudáveis balb/C

Os resultados do estudo de biodistribuição das nanopartículas de albumina radiomarcadas em camundongos saudáveis estão sumarizados em termos de porcentagem de dose injetada por grama (% DI/g) na Figura 23 e tabela 4 e avaliação da cinética de excreção na figura 23B.

Uma rápida depuração da radioatividade em todos os órgãos foi encontrada nos estudos de biodistribuição das  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs. Os baixos níveis de radioatividade (<2%) encontrados no estômago em todos os tempos estudados, indicam uma mínima ou nenhuma dissociação *in vivo* do radioamarcado (Tabela 4).

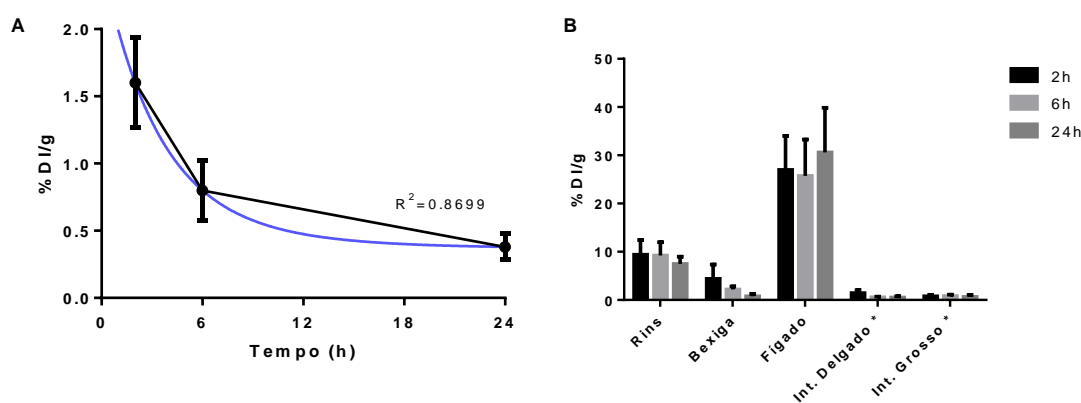


Figura 23 – **(A)** Curva do clareamento sanguíneo e **(B)** Captação nos órgãos de excreção do  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs em camundongos balb/C (n=3). \*Remoção do conteúdo luminal

Analisando os tempos de 2h, 6h e 24h após administração do nanoradiofármaco, foram observados níveis significantes de radioatividade retida no baço  $23,13 \pm 9,16\% \text{DI/g}$ ;  $14,26 \pm 1,41\% \text{DI/g}$  e  $22,36 \pm 4,37\% \text{DI/g}$ , respectivamente. (Tabela 4). Adicionalmente, uma acentuada captação foi observada no fígado,  $26,97 \pm 7,04\% \text{DI/g}$ ;  $25,73 \pm 7,53\% \text{DI/g}$  e  $30,61 \pm 9,24\% \text{DI/g}$  (FIG. 23B). Deste modo, o fígado e o baço provavelmente são os órgãos críticos para a dosimetria.

Seguindo a rota de excreção, uma moderada captação nos rins e bexiga ( $9,39 \pm 3,07\% \text{DI/g}$  e  $4,39 \pm 2,95\% \text{DI/g}$ ) foi obtida em 2h p.i., se mantendo elevada nos rins ( $7,49 \pm 1,47\% \text{DI/g}$ ) até 24h p.i. (FIG. 23B).

Tabela 4 - Biodistribuição de nanopartículas de albumina radiomarcadas ( $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs) em camundongos balb/C após administração endovenosa caudal (n=3 animais/tempo) (%DI/g). \*(%DI)

ÓRGÃO/TEMPO	2h	6h	24h
Sangue	1,60 ± 0,34	0,80 ± 0,23	0,38 ± 0,10
Coração	1,03 ± 0,30	0,43 ± 0,10	0,54 ± 0,18
Pulmão	1,06 ± 0,37	0,50 ± 0,11	0,65 ± 0,22
Baço	23,13 ± 9,16	14,26 ± 1,41	22,36 ± 4,37
Tireoide*	0,10 ± 0,02	0,08 ± 0,02	0,05 ± 0,01
Cérebro	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Pâncreas	0,35 ± 0,04	0,21 ± 0,08	0,36 ± 0,11
Fígado	26,97 ± 7,07	25,73 ± 7,53	30,61 ± 9,24
Estômago	1,42 ± 0,45	1,01 ± 0,25	0,84 ± 0,31
Int. Delgado	1,44 ± 0,62	0,55 ± 0,15	0,52 ± 0,26
Int. Grosso	0,78 ± 0,29	0,81 ± 0,28	0,65 ± 0,40
Rins	9,39 ± 3,07	9,22 ± 2,75	7,49 ± 1,47
Bexiga	4,39 ± 2,95	2,19 ± 0,62	0,76 ± 0,50
Músculo	0,23 ± 0,08	0,16 ± 0,02	0,19 ± 0,06
Osso	1,97 ± 1,70	3,76 ± 2,36	3,98 ± 1,41
Coluna	1,58 ± 0,56	1,16 ± 0,25	1,34 ± 0,33
Medula Óssea	0,14 ± 0,09	0,07 ± 0,04	0,13 ± 0,01

### 5.9 Análise de Proliferação Celular

Considerando que a papaína pode apresentar efeito citotóxico em diversas linhagens celulares, foi investigada a viabilidade celular por meio do ensaio de MTT. Os resultados mostraram que o processo de síntese por irradiação das nanopartículas de papaína reduziu a citotoxicidade do complexo quando comparado a papaína nativa em todas as linhagens celulares (Fig. 24 e 25).

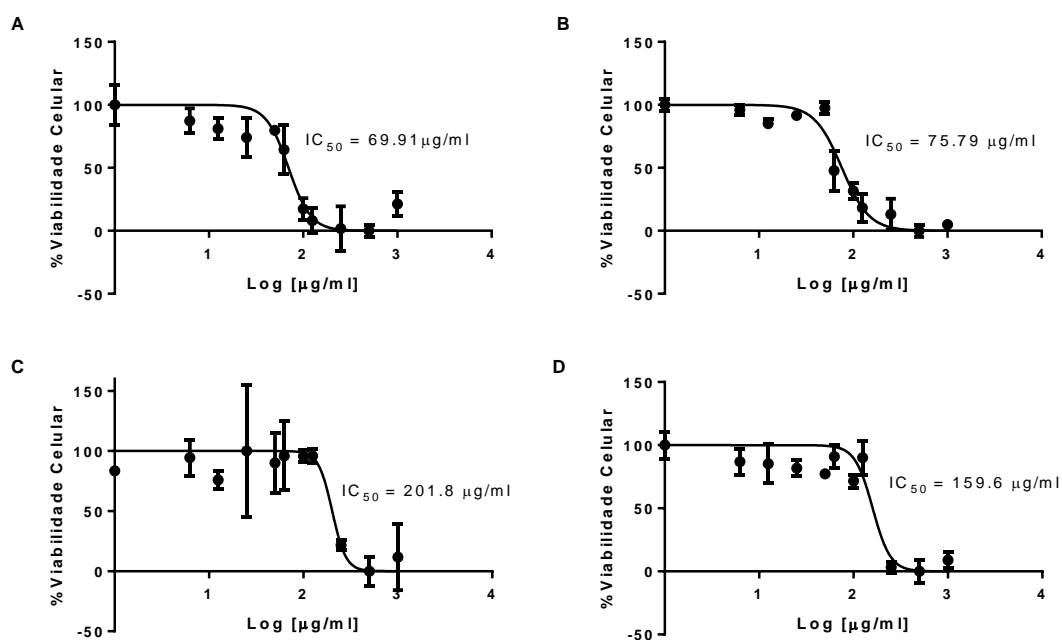


Figura 24 - Viabilidade celular e cálculo do IC<sub>50</sub> em linhagem de câncer de mama humano (MDA-MB231). Tratadas com **(A)** e **(B)** papaína nativa por 24h e 48h, respectivamente e **(C)** e **(D)** Nanopartículas de papaína por 24h e 48h, respectivamente.

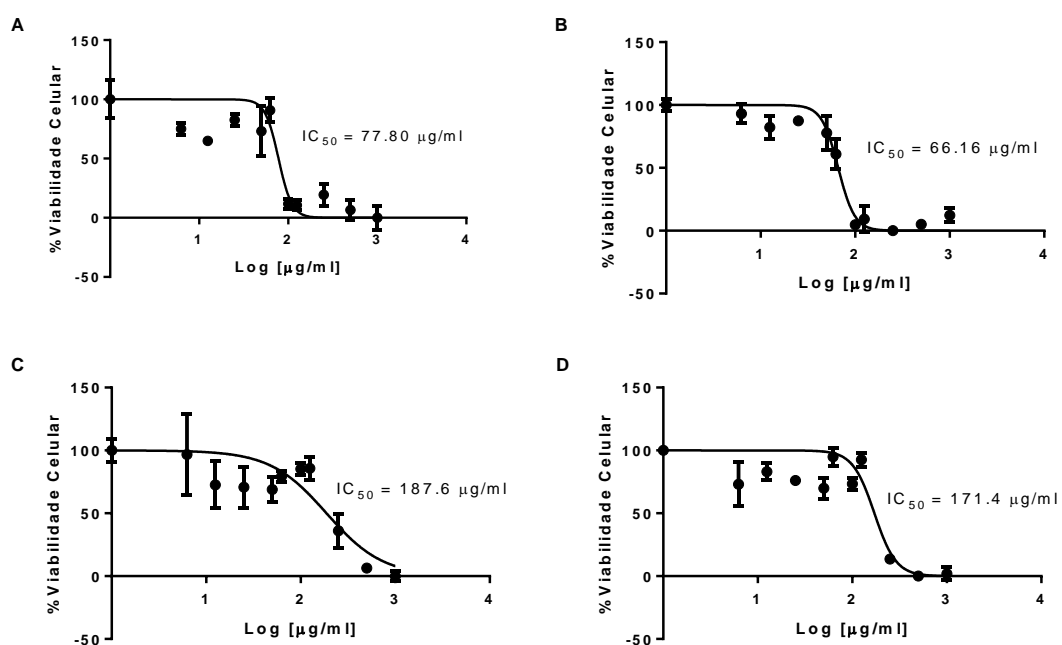


Figura 25 - Viabilidade celular e cálculo do IC<sub>50</sub> em linhagem de câncer de mama humano (MCF-7). Tratadas com **(A)** e **(B)** papaína nativa por 24h e 48h, respectivamente e **(C)** e **(D)** Nanopartículas de papaína por 24h e 48h, respectivamente.

Em relação à nanoalbumina, os resultados obtidos demonstraram que em todas as concentrações e linhagens celulares não houve citotoxicidade, sendo essas semelhantes estatisticamente ao controle ( $p > 0,05$ ) no período de 24h e 48h, e por este motivo não foi possível calcular a  $IC_{50}$  (Fig. 26).

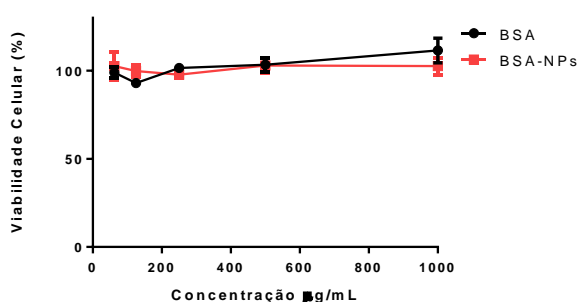


Figura 26 - Viabilidade celular em linhagem de câncer de mama humano (MDA-MB231) tratadas com albumina de Soro Bovino nativa (BSA) e Nanopartícula de albumina (BSA-NPs)

### 5.10 Ensaio *in vitro* de ligação específica

A determinação da afinidade de interação com a membrana celular e a internalização das nanopartículas são mecanismos na comunicação celular cruciais para prever a aplicabilidade destas nanopartículas.

O resultado do estudo de captação dos radiotraçadores *in vitro* às células de tumor mamário MDA-MB231 e 4T1 podem ser observados na Fig. 27.

A captação total do  $^{99m}Tc$ -Nanoalbumina em células MDA-MB231 demonstra um perfil de crescimento até 1h de incubação ( $0,62 \pm 0,02\%$ ), decrescendo após este tempo. A internalização seguiu a tendência da captação total, alcançando  $0,46 \pm 0,02\%$ , no tempo de 1h, o que representa aproximadamente 74% da captação total. (Fig. 27C). Já os resultados da  $^{99m}Tc$ -Nanopapaína para células MDA-MB231 demonstraram perfil de ligação crescente até 2h de incubação ( $0,92 \pm 0,08\%$ ) com internalização de mesma inclinação, alcançando 43,5% da captação celular total (Fig. 27A). Enquanto para células 4T1 a captação celular alcançou valor de  $1,46 \pm 0,15\%$  com internalização correspondente a 57,6% da ligação total (Fig. 27B).

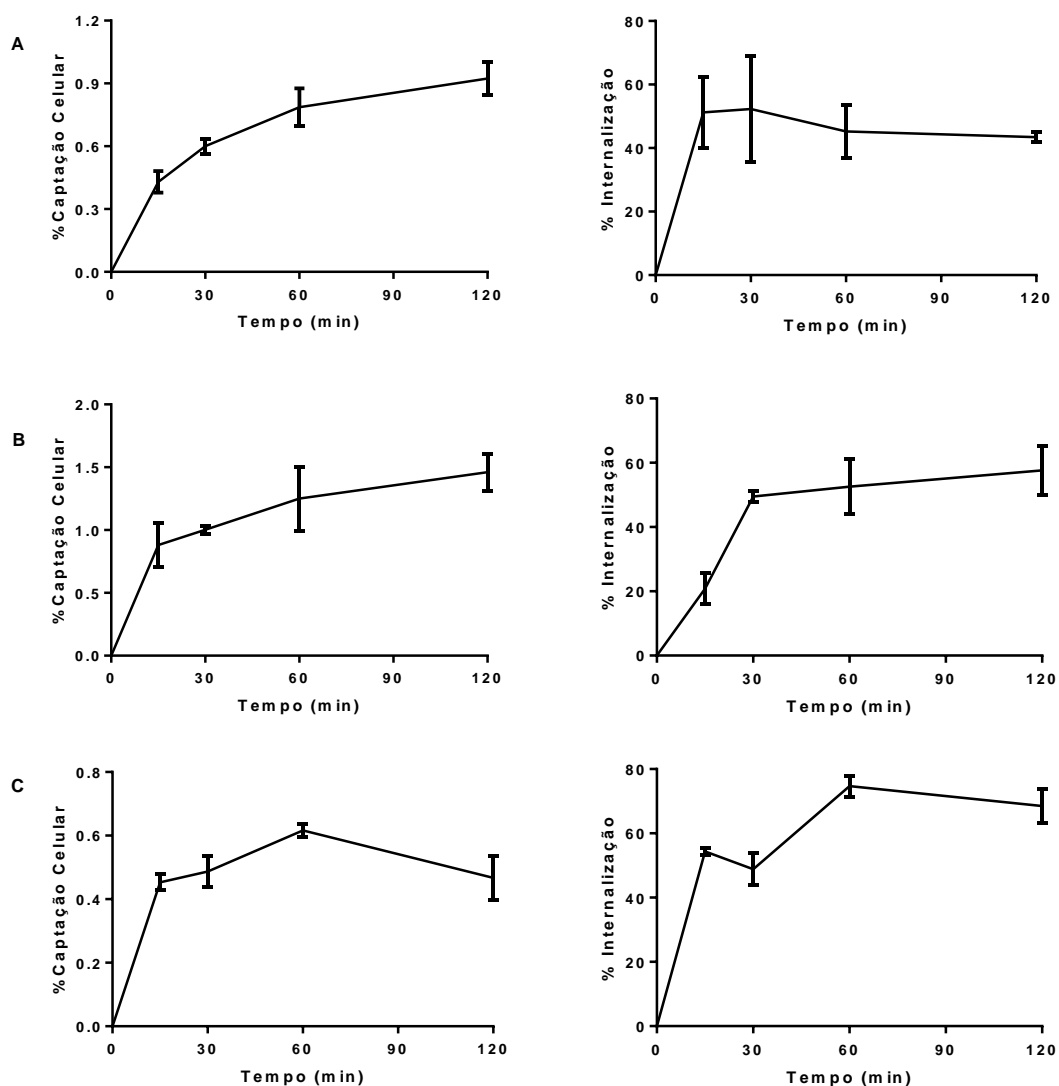


Figura 27 - Ensaio *in vitro* de ligação às células tumorais. **(A)** Captação celular e internalização total de  $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs em células MDA-MB231; **(B)** Captação celular e internalização total de  $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs em células 4T1 e **(C)** Captação celular e internalização total de  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs em células MDA-MB231.

### 5.11 Imagem SPECT/CT

As imagens obtidas nos tempos pós-administração dos radiotraçadores revelam, para nanopartícula de papaína, notável radioatividade nos rins e bexigas e em estruturas da coluna vertebral. Enquanto para  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanoalbumina, ficam evidenciados órgãos do sistema fagocitário monoculares, como fígado e baço. Esses achados corroboram aqueles obtidos por biodistribuição *ex vivo* descrita no item 5.7 e 5.8.

As imagens representativas de animais com tumores localizados no quadrante torácico superior (Fig. 28, 29, 30, 31 e 32) demonstram alto acúmulo de radioatividade no tecido tumoral para ambas nanopartículas. Apesar disso, as análises das imagens revelaram um padrão de captação tumoral heterogêneo. Esse sinal não uniforme é o provável resultado de múltiplos fatores, que incluem: suprimento sanguíneo anormal, diferenças de pressão entre os capilares que irrigam o tumor e fluido intersticial, bem como afinidade, estágio do tumor, presença de regiões necróticas e avasculares (SONG et. al. 2014).

Entretanto a determinação dos valores da razão tumor/músculo permite observar nível de captação superior à de tecidos não neoplásicos (Tabela 5 e 6).

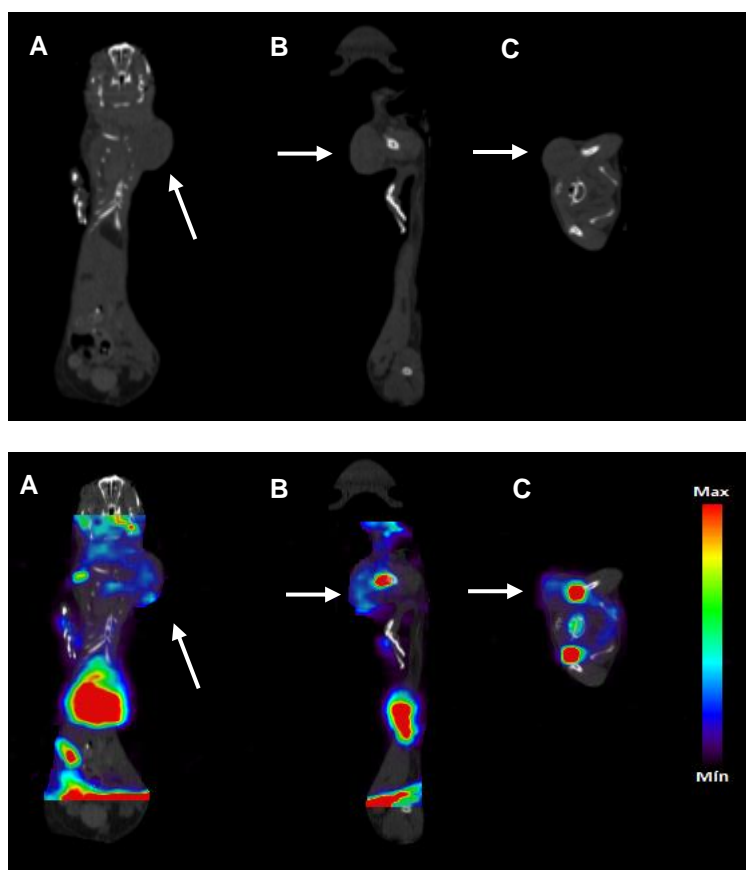


Figura 28 - Imagem SPECT/CT em modelo ortotópico de câncer de mama murino 4T1 em camundongo balb/C adquirida 2h pós-administração endovenosa de  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanopapaína. Planos (a) coronal; (b) sagital e (c) axial.



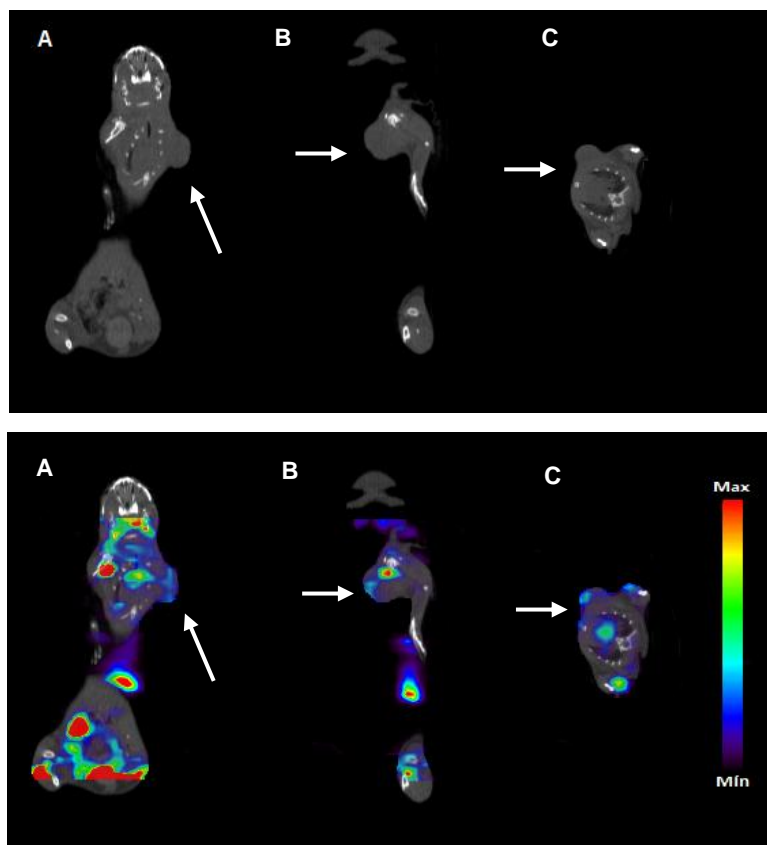


Figura 29 - Imagem SPECT/CT em modelo ortotópico de câncer de mama murino 4T1 em camundongo balb/C adquirida 6h pós-administração endovenosa de  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanopapaína. Planos (a) coronal; (b) sagital e (c) axial.

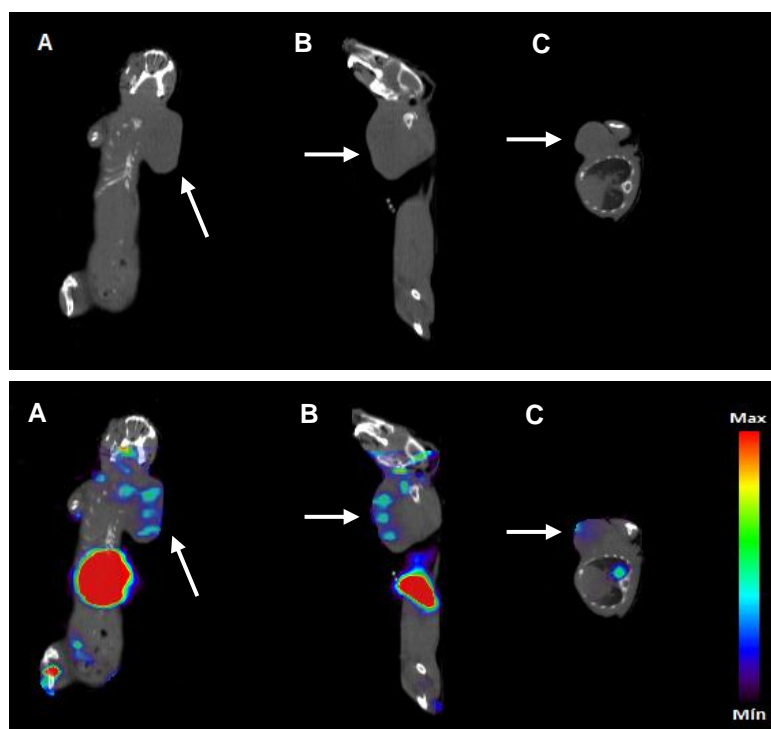


Figura 30 - Imagem SPECT/CT em modelo ortotópico de câncer de mama murino 4T1 em camundongo balb/C adquirida 24h pós-administração endovenosa de  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanopapaína. Planos (a) coronal; (b) sagital e (c) axial.

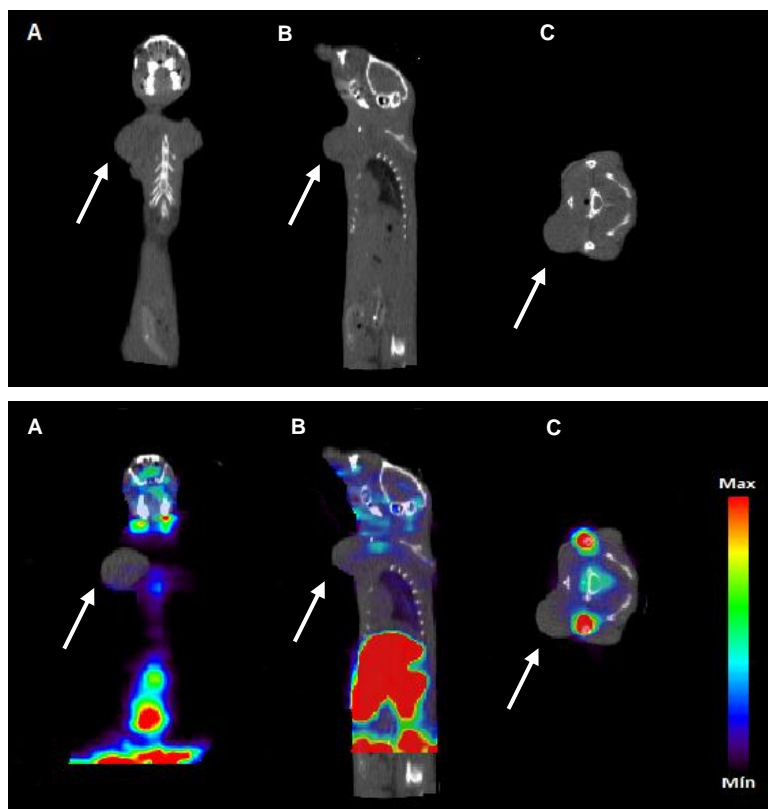


Figura 31 - Imagem SPECT/CT em camundongo MMTV-PyMT com tumor de mama adquirida 2h pós-administração endovenosa de  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanoalbumina. Planos (a) coronal; (b) sagital e (c) axial.

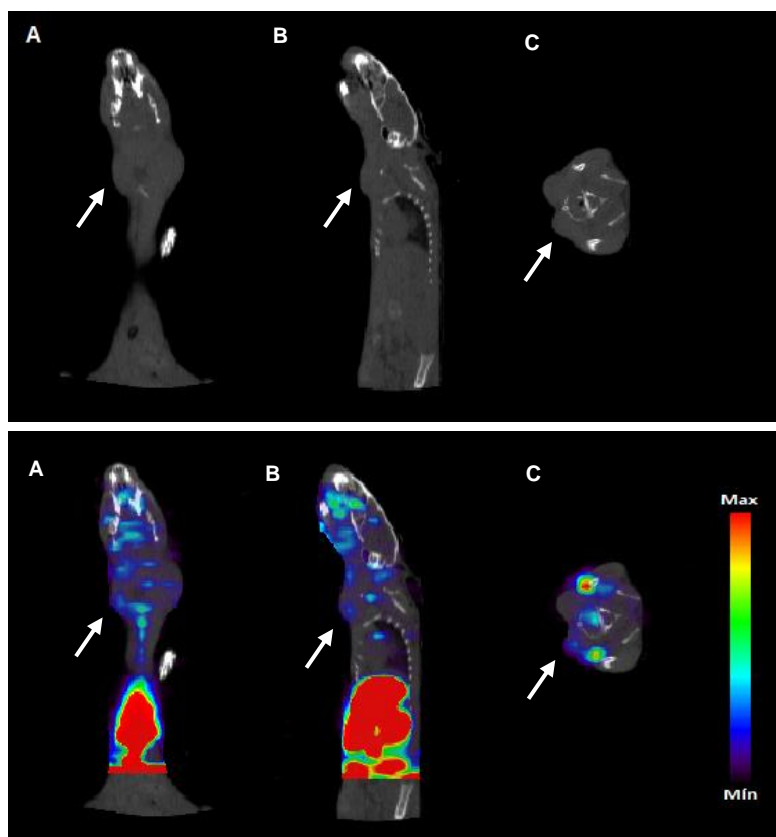


Figura 32 - Imagem SPECT/CT em camundongo MMTV-PyMT com tumor de mama adquirida 6h pós-administração endovenosa de  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanoalbumina. Planos (a) coronal; (b) sagital e (c) axial.

### 5.12 Biodistribuição em camundongos portadores de tumor

As biodistribuições das nanopartículas de papaína e albumina em modelos tumorais 4T1 e MMTV-PyMT podem ser visualizadas nas tabelas 5 e 6.

A captação média de ambas as nanopartículas pela maioria dos órgãos e tecidos em camundongos portadores de tumor foi baixa, com exceção dos órgãos de excreção e baço, confirmando o perfil encontrado nos estudos prévios de biodistribuição em animais saudáveis. Nota-se uma diferença significativa na captação esplênica nos diferentes modelos tumorais estudados para  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanopapaína.

Os resultados também revelam captação tumoral substancial de ambas nanopartículas nos tempos estudados, porém quando comparados, a  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanopapaína apresentou maiores captações em relação a  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanoalbumina. De qualquer maneira as razões tumor/músculo de ambas nanopartículas, confirmam maior afinidade pelo tecido tumoral.

Tabela 5 - Biodistribuição de nanopartículas de papaína radiomarcadas ( $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs) em modelo de tumor de mama ortotópico 4T1 e espontâneo (MMTV-PyMT) após administração endovenosa caudal. (n=3 animais/tempo) (%DI/g). \*(%DI)

$^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs					
Modelo	4T1			MMTV-PyMT	
Tempo/Órgão	2h	6h	24h	2h	6h
Sangue	1,63 ± 0,50	0,95 ± 0,35	1,30 ± 1,38	0,80 ± 0,13	0,44 ± 0,06
Coração	1,14 ± 0,25	0,58 ± 0,11	0,91 ± 0,86	0,73 ± 0,25	0,40 ± 0,21
Pulmão	8,36 ± 1,66	4,03 ± 1,02	1,63 ± 1,19	2,66 ± 0,34	1,09 ± 0,03
Baço	21,80±5,06	18,82±6,41	15,07±1,48	46,30±7,72	53,37±1,15
Tireoide*	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,07 ± 0,01
Cérebro	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Pâncreas	0,53 ± 0,08	0,33 ± 0,06	0,88 ± 0,59	0,75 ± 0,41	0,29 ± 0,15
Fígado	26,00±9,79	23,10±9,32	17,70±8,31	31,04±1,28	33,10±0,42
Estômago	3,26 ± 0,42	2,30 ± 0,51	1,70 ± 1,06	1,94 ± 0,20	1,11 ± 0,08
Int. Delgado	1,19 ± 0,19	0,68 ± 0,24	0,66 ± 0,32	0,78 ± 0,38	0,34 ± 0,01
Int. Grosso	1,30 ± 0,41	0,85 ± 0,13	0,85 ± 0,45	1,09 ± 0,41	0,57 ± 0,00
Rins	24,44 3,37	17,96 1,75	10,63 3,95	9,02 ± 1,54	6,01 ± 0,54

Bexiga	6,37 ± 0,06	1,73 ± 0,30	0,90 ± 0,57	31,99 ± 19,07	2,88 ± 0,22
Músculo	0,42 ± 0,18	0,20 ± 0,04	0,26 ± 0,09	0,30 ± 0,17	0,17 ± 0,07
Osso	2,65 ± 2,03	3,64 ± 0,54	3,97 ± 2,35	3,50 ± 0,17	3,57 ± 0,63
Coluna	3,00 ± 1,34	3,37 ± 2,92	2,06 ± 0,54	1,97 ± 0,20	1,07 ± 0,10
Medula Óssea	0,23 ± 0,18	0,19 ± 0,14	0,71 ± 0,46	0,11 ± 0,07	0,10 ± 0,04
Tumor	2,49 ± 0,32	1,51 ± 0,20	2,12 ± 1,76	1,19 ± 0,20	0,86 ± 0,31
Tumor/ Músculo	6,74 ± 2,70	7,62 ± 1,88	7,37 ± 3,58	3,99 ± 0,68	5,02 ± 1,81
Tumor/ Sangue	1,61 ± 0,43	1,70 ± 0,45	2,28 ± 1,26	1,48 ± 0,25	1,96 ± 0,71

Tabela 6 - Biodistribuição de nanopartículas de albumina radiomarcadas ( $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs) em modelo de tumor de mama espontâneo (MMTV-PyMT) após administração endovenosa caudal. (n=3 animais/tempo) (%DI/g). \*(%DI)

$^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs		
Modelo	MMTV-PyMT	
Tempo/Órgão	2h	6h
Sangue	1,52 ± 0,60	0,76 ± 0,24
Coração	0,76 ± 0,33	0,42 ± 0,08
Pulmão	1,37 ± 0,48	0,57 ± 0,10
Baço	31,18 ± 17,42	20,61 ± 3,07
Tireoide*	0,11 ± 0,06	0,06 ± 0,02
Cérebro	0,03 ± 0,02	0,02 ± 0,01
Pâncreas	0,41 ± 0,18	0,32 ± 0,13
Fígado	37,12 ± 17,49	27,37 ± 4,08
Estômago	1,25 ± 0,63	0,73 ± 0,10
Int. Delgado	1,13 ± 0,44	0,66 ± 0,12
Int. Grosso	0,85 ± 0,35	0,72 ± 0,19
Rins	10,37 ± 4,86	6,18 ± 0,64
Bexiga	4,34 ± 1,59	2,03 ± 1,22
Músculo	0,26 ± 0,15	0,12 ± 0,04
Osso	8,26 ± 4,08	4,98 ± 2,73
Coluna	1,79 ± 0,79	1,57 ± 0,41

Medula Óssea	0,09 ± 0,02	0,13 ± 0,09
Tumor	0,89 ± 0,44	0,61 ± 0,04
Tumor/Músculo	3,56 ± 0,36	5,42 ± 1,84
Tumor/Sangue	0,58 ± 0,17	0,84 ± 0,21

### 5.13 Imunohistoquímica e ensaios autorradiográficos *ex vivo*

Os resultados alcançados nas análises qualitativas de imunohistoquímica revelaram alta densidade de nanopartículas em regiões periféricas do tecido tumoral (imunorreatividade destacada pela coloração marrom) (Fig. 33, 34 e 35).

Esses resultados corroboram com o perfil de distribuição das nanopartículas radiomarcadas evidenciados pelas análises pareadas das imagens autorradiográficas com o correspondente corte adjacente utilizado no ensaio de imuno-histoquímica que também indicou uma maior concentração de radioatividade em borda. Importante observar que os resultados de imuno-histoquímica foram confirmados com controle negativo (secções tumorais com ausência das nanopartículas) para os anticorpos utilizado nos ensaios.

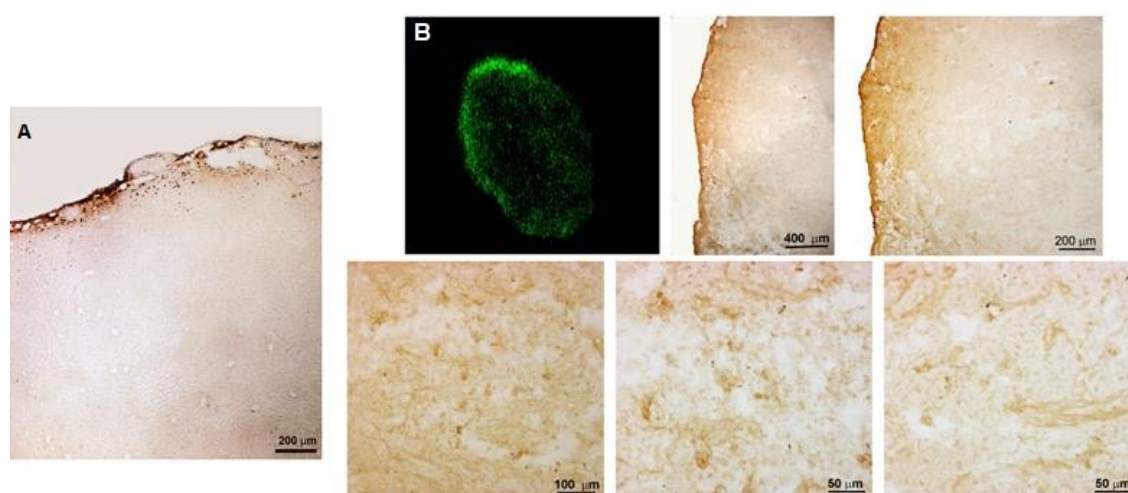


Figura 33 - Análise autorradiográfica *ex vivo* e imuno-histoquímica 2h p.i. em secções tumorais sequenciais de 10 µm de camundongo que foi administrado  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanopapaína. (A) controle negativo (B) secções tumorais do camundongo injetado.

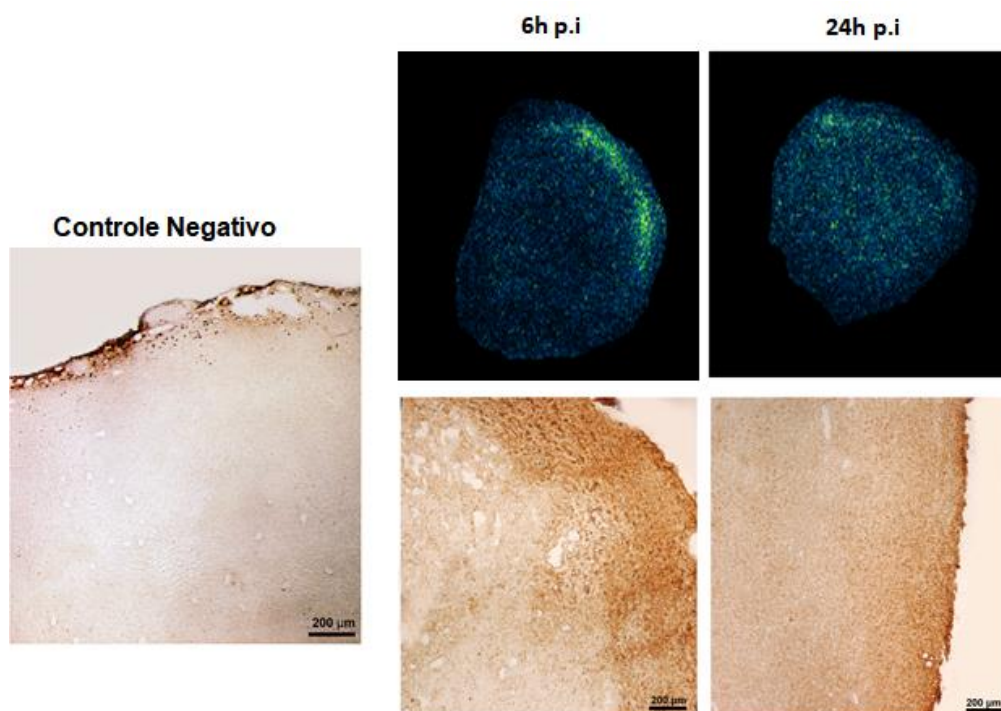


Figura 34 - Análise autorradiográfica *ex vivo* e imuno-histoquímica 6h p.i. e 24h p.i. em secções tumorais sequenciais de 10 μm de camundongo que foi administrado  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanopapaína

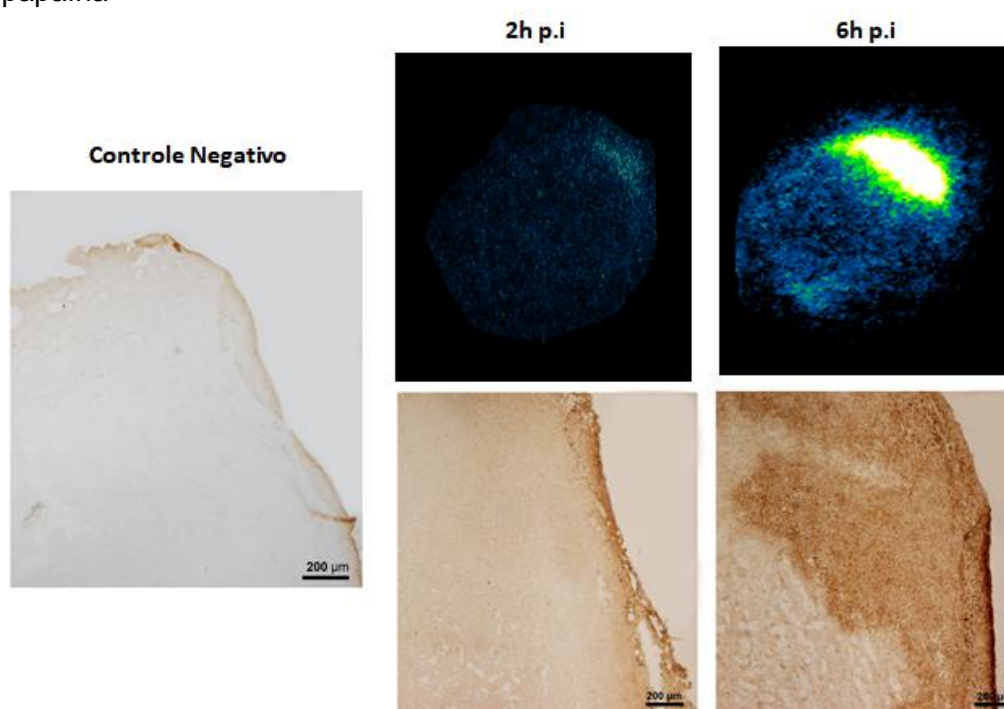


Figura 35 - Análise autorradiográfica *ex vivo* e imuno-histoquímica 2h p.i. e 6h p.i. em secções tumorais sequenciais de 10 μm de camundongo que foi administrado  $^{99m}\text{Tc}$ -Nanoalbumina.

## 6 DISCUSSÃO

Explorou-se neste trabalho o potencial diagnóstico de nanopartículas proteicas extraídas de fontes naturais e reticuladas através de radiação ionizante, que oferece vantagens em relação aos métodos comumente utilizados na síntese de nanopartículas.

Nanopartículas proteicas geralmente precisam ser quimicamente modificadas durante ou após a síntese para melhorar sua estabilidade e diminuir a taxa de degradação. Para este fim, utilizam-se agentes reticulantes sintéticos, como formaldeído ou glutaraldeído, característicos por serem extremamente tóxicos, ou até mesmo reticulantes naturais transglutaminase e genipina, menos tóxicos que os sintéticos, porém sempre há necessidade de etapas de lavagem para remoção adequada desses agentes (JAIN et. al., 2018).

Como alternativa, o uso da radiação para induzir reticulação tem como vantagem o controle de tamanho, sem a necessidade de agentes reticulantes, além de promover a esterilização do meio, dependendo da dose utilizada, sem a formação de subprodutos tóxicos (KADLUBOWSKI, 2014). A síntese de nanopartículas induzida por radiação, em solução aquosa, ocorre majoritariamente por meio dos radicais livres gerados a partir da radiólise da água. A exposição das proteínas a essas espécies provoca mudanças conformacionais levando a proteína a condições de estresse oxidativo, e formando ligações de bitirosina, tidas como uma das principais ligações envolvidas na reticulação proteica (FAZOLIN, 2019).

O tamanho das nanopartículas é a característica essencial para torná-las eficazes em comparação a outros sistemas para transporte de radionuclídeos e medicamentos. A interação das nanopartículas com células e membranas desempenha papel importante em seu potencial como nanocarreador (JAIN et. al., 2018) e alguns estudos demonstram que geralmente a capacidade de penetração em tumores é inversamente proporcional ao tamanho das nanopartículas.

Além disso, o diâmetro médio da partícula em meio aquoso, denominado tamanho hidrodinâmico, deve ser menor que 500 nm para que não haja a ativação da cascata da coagulação e formação de trombos, os quais se causarem a obstrução de um vaso sanguíneo de pequeno calibre em

determinados tecidos, como encéfalo e pulmão, podem levar o indivíduo ao óbito (SANTOS, 2018).

Diversos estudos com diferentes materiais comprovaram a proporcionalidade inversa entre tamanho de nanopartícula e penetração tumoral. Chauhan et. al. (2012) conduziram estudo onde foi demonstrado que nanopartículas de 12 nm penetraram o tecido tumoral de maneira mais rápida e eficiente que nanopartículas de 125 nm. Em pesquisa com nanoconjugados de sílica com diâmetro médio de 50 nm e 200 nm também foi demonstrado diferença significativa de penetração tumoral, sendo mais profunda das partículas de menor diâmetro (TANG et. al., 2013). Outro experimento mais abrangente conduzido por Cabral et al., comparou-se a eficácia micelas poliméricas com tamanhos variando de 30 a 100 nm. Em tumores altamente permeáveis, verificou-se captação de praticamente todos os tamanhos de micelas, mas em tumores pouco permeáveis a captação de micelas de 30 nm foi significativamente superior (CABRAL et. al., 2011)

Também é relatado na literatura que nanopartículas esféricas apresentam captação celular 5 vezes maior que nanopartículas em forma de bastonetes, o que sugere que a captação de nanocarreadores é altamente dependente de sua forma e tamanho (CHITHRANI e CHAN, 2007). Portanto, considera-se ideal para esses fins, nanopartículas com tamanhos inferiores a 500 nm e com morfologia esférica, características contempladas nas nanopartículas albumina e papaína desenvolvidas neste trabalho.

O índice de polidispersão apresentado pelas nanopartículas de albumina e papaína nesse estudo foram de 20% e 52,2%, respectivamente, tal resultado sugere que as nanopartículas de papaína obtidas não formam um sistema monodisperso em água, uma vez que, idealmente, sistemas monodispersos apresentam índice de polidispersão menor que 30% (DANAIE et. al., 2018). Todavia, o tamanho hidrodinâmico apresentado pelas NPs desenvolvidas habilita-as à realização de ensaios, *in vivo*, com segurança.

Materiais candidatos a aplicações em nanomedicina, sejam como agente terapêutico ou de diagnóstico, devem ser submetidos a ensaios, *in vitro* e *in vivo*, que comprovem a sua segurança em meio biológico. A toxicidade de nanomateriais depende diretamente de suas propriedades físicas e químicas, tais como, composição, estrutura cristalina, tamanho, carga superficial, propriedades



elétricas, dentre outras (BROHI et. al., 2017). Fundamentando-se nos relatos descritos na literatura sobre a citotoxicidade seletiva da papaína, foram realizados estudos *in vitro* de proliferação celular.

Nas linhagens celulares estudadas neste trabalho, as nanopartículas de papaína mostraram-se menos tóxicas que a proteína nativa em todas as concentrações. De qualquer maneira, estudo publicado por Mohr e Desser (2013) mostraram que a papaína em concentrações de até 100 µg/mL não interfere significativamente no crescimento de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) quando comparados ao controle. Neste mesmo estudo foi demonstrado um forte efeito antiangiogênico da papaína através da inativação de Fatores de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF). Esses resultados indicam que essa enzima proteolítica extraída do mamão demonstra grande potencial em ser utilizada como agente de prevenção e terapêutico em doenças que envolvem processos angiogênicos. Em relação as nanopartículas de albumina, nenhum efeito citotóxico nem estimulante foi observado, tornando-a um material ideal para utilização como nanocarreador.

Nos últimos anos, estratégias de imagem molecular utilizando nanopartículas radiomarcadas têm despertado interesse para diagnóstico e terapias de tumores sólidos, em decorrência da alta capacidade desses sistemas de circularem através dos microvasos tumorais, tornando-as agentes promissores para localização e caracterização de tumores *in vivo*.

A aplicabilidade diagnóstica das nanopartículas descritas neste trabalho foi avaliada em camundongos saudáveis, em modelo de câncer mama murino induzidos em camundongos balb/C, assim como em animais transgênicos MMTV-PyMT que desenvolvem tumores de mama espontaneamente de acordo com o exposto em MATERIAIS E MÉTODOS (item 4.2.3). Para esta avaliação o primeiro passo foi o desenvolvimento e otimização da radiomarcagem das nanopartículas e do procedimento de controle de qualidade.

Diversos estudos foram publicados com a radiomarcagem de proteínas, principalmente  $^{99m}\text{Tc}$ -HSA, no final dos anos 60 e início dos anos 70, conseqüentemente existem vários métodos descritos para realização do procedimento (PERSSON e LIDÉN 1969; RHODES, 1974). Dentre eles, a via direta foi escolhida para radiomarcagem das nanopartículas de albumina e papaína empregando solução de cloreto de estanho II ( $\text{SnCl}_2$ ) para reduzir o

estado de oxidação dos átomos de  $^{99m}\text{Tc}$  e formar complexos do radiometal com grupos reativos presentes na superfícies das proteínas: carboxilas (-COOH), hidroxilas (-OH), aminos (-NH<sub>2</sub>) e tiol (-SH). Esse método é comumente utilizado na preparação de diversos radiofármacos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  pela facilidade, disponibilidade e reprodutibilidade (WANG, et. al., 2011).

As nanopartículas foram radiomarcadas com 740 MBq (20 mCi) de  $^{99m}\text{Tc}$  recém-eluído de gerador  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  (IPEN, Brasil). A fim de se obter alto rendimento e pureza radioquímica nas marcações, foram utilizados eluatos com alta atividade específica, alcançada através da eluição dos geradores 24h precedentes aos ensaios. Essa estratégia reduz a quantidade do isótopo estável  $^{99}\text{Tc}$ , produto de decaimento da espécie radioativa  $^{99m}\text{Tc}$ , que pode competir e comprometer o rendimento da marcação. De qualquer maneira, em eluatos de geradores de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ , sempre há a espécie não radioativa  $^{99}\text{Tc}$  visto que 12% dos átomos  $^{99}\text{Mo}$  decaem diretamente para esta forma (Fig. 4) (ZOLLE, 2007).

As impurezas radioquímicas decorrentes da marcação foram determinadas por cromatografia em papel ascendente ou cromatografia em camada delgada. E as impurezas ocasionalmente detectadas nas preparações foram tecnécio livre na forma de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ) e a forma coloidal reduzida ( $^{99m}\text{TcO}_2$ ).

A formação de  $^{99m}\text{TcO}_2$  ocorre quando o átomo reduzido de  $^{99m}\text{Tc}$  sofre hidrólise em solução, essa espécie apresenta tamanho na faixa de 10 nm a 1  $\mu\text{m}$ , sendo que 80% das partículas possuem 910 nm (SAHA, 2018; JANKOVIĆ et. al., 2008). Esta hidrólise compete com o processo de quelação do  $^{99m}\text{Tc}$  na superfície da proteína e reduz o rendimento da marcação. Essa reação torna-se mais provável quando o cloreto de estanho II é utilizado em solução aquosa em pH 6,0-7,0. Para evitar a hidrólise do  $\text{Sn}^{2+}$ , a quantidade do agente redutor foi otimizada em solução de 0,1 M (HCl) e, para evitar a presença de oxigênio, ar ou qualquer agente oxidante no frasco, todas as soluções foram purgadas em gás nitrogênio antes do procedimento de radiomarkação (SAHA, 2018).

Essas impurezas também podem ser ocasionadas pela decomposição do composto radiomarcado em solução devido a alterações de temperatura, pH ou da presença de agentes oxidantes ou redutores. Além disso, a própria radiação do  $^{99m}\text{Tc}$  pode provocar radiólise de moléculas de água e

consequentemente produzir radicais livres que podem influenciar a complexação do átomo de  $^{99m}\text{Tc}$  na superfície da proteína (ZOLLE, 2007).

Apesar dos vários estudos de radiomarcção de proteínas com  $^{99m}\text{Tc}$  descritos na literatura, o controle de qualidade é pouco documentado no que diz respeito à quantificação de  $^{99m}\text{TcO}_2$  (ZOLLE et. al., 1973; RHODES, 1974; KLEISNER, et. al., 2000; WANG et al., 2011). De acordo com os procedimentos de controle de qualidade disponíveis, especificamente em relação à quantificação de  $^{99m}\text{TcO}_2$ , são aplicados sistema compostos por duas fitas cromatográficas com solventes adequados para isolá-lo e quantificá-lo. Na primeira fita, assume-se para a  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  valores de  $R_f$  diferente de zero e para as moléculas radiomarcadas e  $^{99m}\text{TcO}_2$   $R_f$  igual a zero; na segunda, é possível considerar o valor de  $R_f$  das molécula radiomarcadas e  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  diferente de zero e para  $^{99m}\text{TcO}_2$   $R_f$  igual a zero. Visto que as nanopartículas estudadas neste trabalho possuem características coloidais tanto quanto o tecnécio hidrolisado diversos métodos de controle de qualidade foram testados para a separação das  $^{99m}\text{Tc}$ -NPs e  $^{99m}\text{TcO}_2$  em fitas cromatográficas.

Dos sistemas testados neste trabalho, o mais aquedado e acessível para separação do  $^{99m}\text{TcO}_2$  foi o Sistema **E**, composto por fitas de papel Whatman nº1 e fase móvel de Piridina:Ácido Acético:H<sub>2</sub>O (3:5:1,5), onde houve um arraste de  $^{99m}\text{Tc}$ -NPs e  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  ao longo do suporte, resultando em  $R_f$  entre 0,5 -1,0. O oposto foi observado na fita composta pela mesma fase estacionária em acetona, onde as nanopartículas radiomarcadas e  $^{99m}\text{TcO}_2$  permaneceram no ponto de aplicação da amostra ( $R_f = 0,0$ ) enquanto o pertecnetato de sódio  $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$  apresentou  $R_f=1$ .

Comparado a outras técnicas, métodos de cromatografia planar preenchem a necessidade de análises rápidas, de fácil execução e de baixo custo. Esse método mostra-se adequado para avaliar a pureza radioquímica, uma vez que 100% da amostra aplicada permanecem na fase sólida, não havendo, assim, perda de radioatividade durante a análise, o que não ocorre nas análises de CLAE.

Para avaliação de  $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs e  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs utilizou-se coluna de gel-filtração Protein-Pak 300SW, composta por partículas de 10  $\mu\text{m}$  e poros de 300 Å. Visto que as nanopartículas estudadas neste trabalho possuem diâmetros menores que 1  $\mu\text{m}$  essa coluna foi adequada para análise cromatográfica das

NPs, mas a técnica permite uma recuperação incompleta da amostra, pois a espécie  $^{99m}\text{TcO}_2$ , por ultrapassar o tamanho dos poros ( $\sim 300 \text{ \AA}$ ) da coluna cromatográfica utilizada, permanece retida e, assim, não é possível detectá-las. Uma vez que a determinação da pureza radioquímica depende da detecção de todos os constituintes do produto marcado com  $^{99m}\text{Tc}$ , cálculos baseados apenas na área do pico eluído por CLAE podem superestimar o valor da pureza radioquímica. De qualquer maneira, para excluir a presença de  $^{99m}\text{TcO}_2$ , as soluções foram filtradas em filtros de seringa  $0,22 \mu\text{m}$  como descrito por Oda et. al. (2017).

Apesar disso, em decorrência de seu alto poder de resolução e da possibilidade de recuperação da amostra, métodos de CLAE são adequados para caracterizar o perfil de eluição de moléculas proteicas.

A radiomarcção das nanopartículas de albumina e papaína com  $^{99m}\text{Tc}$  resultou em rendimento superior a 90%. Esses dados estão de acordo com o recomendado pela farmacopeia americana e pela farmacopeia europeia, segundo as quais a pureza radioquímica específica para cada radiofármaco deve ser superior a 90% (BRADDOCK, 2012).

Previamente aos estudos em modelos animais, é crucial determinar a estabilidade de complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  *in vitro* em condições que simulam o ambiente biológico. Neste trabalho, avaliou-se a estabilidade das nanopartículas em soro recém-coletado de humano saudável e paralelamente foram conduzidos ensaios de desafio à histidina, um aminoácido endógeno presente em altas concentrações *in vivo* e que está relacionado a instabilidade de compostos radiomarcados com  $^{99m}\text{Tc}$  devido a transquelação. As nanopartículas de papaína radiomarcadas mostraram-se estáveis até 6h pós-radiomarcção, enquanto as nanopartículas de albumina mostraram-se estáveis em todas as condições e tempos de estudo.

Os estudos de biodistribuição, bem como as imagens SPECT/CT, mostraram perfis distintos para nanopartículas de albumina e papaína. Em relação aos perfis de excreção, verificou-se que para  $^{99m}\text{Tc}$ -P-NPs a excreção renal é a principal via de eliminação, enquanto para  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs a excreção hepática é mais acentuada. Isso se deve aos tamanhos das partículas, uma vez que partículas com diâmetro igual ou menor a 10 nm tendem a ser eliminadas

pelos rins, enquanto partículas maiores, pelo fígado. Da mesma forma, os dados revelaram captações relevantes em órgãos do sistema fagocitário mononuclear (SFM), como fígado e baço. Esses achados estão em consonância com a literatura, uma vez que já é amplamente descrito que nanopartículas são rapidamente opsonizadas e retiradas da circulação por macrófagos do SFM (SONG et. al., 2014).

Pode-se observar também que, para ambas nanopartículas, os demais órgãos avaliados, principalmente estômago e tireoide, apresentaram baixa captação durante todo o experimento. Esse dado é de extrema relevância, pois sugere que o teor de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , uma das impurezas radioquímicas decorrente do processo de marcação, e o tecnécio em sua forma livre, decorrente de baixa estabilidade do sistema, estão dentro dos limites preconizados, uma vez que é sabido que sua captação ocorre, preferencialmente, nestes órgãos (AGUIAR, 2014).

Em relação a captação tumoral, observa-se que a atividade detectada no músculo é inferior à encontrada no tumor (Tabelas 3 e 4). A análise dos valores médios de razão tumor/músculo para ambas nanopartículas sugerem maior afinidade pelo tecido tumoral. As imagens SPECT/CT confirmam os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição, apontando maior afinidade pelo tecido tumoral quando comparado ao músculo em todos os tempos observados.

O acúmulo dessas nanopartículas no tecido tumoral se deve, em parte, pelo direcionamento passivo que ocorre devido ao efeito de permeação e retenção aumentados (do inglês *Enhanced Permeability and Retention*; EPR) presentes em tumores sólidos. Esse efeito ocorre devido ao processo de angiogênese tumoral no qual os vasos são produzidos de maneira rápida, de forma a suprir as necessidades nutricionais do tumor, e de maneira defeituosa, formando fenestrações e baixa adesão entre as células endoteliais (JAIN e STYLIANOPOULOS, 2010).

Matsumura, Y. e Maeda, H. (1986) foram os primeiros a observarem o acúmulo de macromoléculas no interstício de tumores sólidos. Em estudo de biodistribuição de albumina corada com azul de Evans e proteínas séricas radiomarcadas, como transferrina e imunoglobulina, verificou-se retenção prolongada dessas proteínas no tecido tumoral quando comparado com os

tecidos normais, do qual são rapidamente eliminadas. O acúmulo de albumina também foi observado posteriormente em uma variedade de modelos tumorais, incluindo sarcoma, câncer de ovário e hepatocarcinomas (MERLOT et. al., 2014).

Tumores sólidos também apresentam deficiência no sistema linfático (SL), que em células normais drena continuamente o líquido extracelular, facilitando a entrada e saída de macromoléculas presentes na circulação. Devido a compressão e eventual colapso dos vasos linfáticos causado pelo rápido crescimento celular essa drenagem é prejudicada. A elevada permeabilidade vascular, associada à escassez de drenagem linfática e baixo retorno venoso, resulta na retenção de nanoestruturas e macromoléculas, fazendo com que as partículas permaneçam por mais tempo no local (ABRIATA, 2018; MATSUMURA e MAEDA, 1986)

Além disso, a diferença de concentração de albumina no sangue (40 mg/mL) e no interstício celular (14 mg/mL), que varia em diferentes regiões anatômicas, impulsiona a difusão desta macromolécula para o interior do tumor, visto que a albumina é a principal responsável pela pressão oncótica (EVANS, 2002).

Recentemente, estudo translacional sobre o efeito EPR na biodistribuição e eficácia terapêutica de nanocarreadores foi conduzido diante a disparidade observada entre a retenção desses sistemas em modelos tumorais pré-clínicos e ensaios clínicos em humanos. Os autores demonstraram que a angiogênese em modelos tumorais induzidos em animais ocorre mais rapidamente quando comparados a tumores sólidos humanos, e que essa diferença fisiológica exacerba o efeito nos modelos pré-clínicos. Também há um espectro bastante heterogêneo do efeito EPR que pode ser mais acentuado em alguns subtipos de tumores humanos (MILLER et. al., 2015). Curiosamente, estudos em diferentes modelos de câncer de mama, a albumina apresentou captação 4 vezes maior que lipossomos com diâmetro médio de 100 nm (QIN et. al., 2014).

Além do acúmulo passivo no tecido tumoral, a albumina também pode ser internalizada por outros mecanismos. Em 2013, Commisso et. al. relataram mecanismo pelo qual células tumorais suprem necessidades metabólicas e de

crescimento pela captação ativa de proteínas extracelulares através da macropinocitose. Neste estudo, observou-se que células que expressam Ras oncogênica, uma proteína da membrana cuja expressão está associada a fenótipos malignos, utilizam mais proteínas extracelulares como fonte de aminoácidos comparadas a células que não expressam (CAMPBELL e DER, 2004; COMMISSO et. al., 2013).

Outro estudo demonstrou que células de adenocarcinoma pancreático ductal crescem indefinidamente em meios com ausência de aminoácidos essenciais e presença de albumina (KAMPHORST et. al., 2015). Também foi observado que a hipoalbuminemia é uma característica comum em pacientes com tumores sólidos em estágios avançados (HAUSER et. al. 2006). A diminuição da albumina sérica nesses pacientes indica aumento do catabolismo da albumina como fonte anormal de aminoácidos utilizados para atender a altas demandas metabólicas devido à proliferação do tumoral (STEHLE et. al. 1997). Esses achados forneceram informações importantes sobre a capacidade da albumina ser internalizada preferencialmente pelas células cancerígenas em relação às células normais.

Algumas células tumorais também utilizam vias de captação de albumina mediada por receptores (GP 60), além de mecanismos macropinocíticos não específicos. Essa evidência baseia-se na descoberta de correlação entre a expressão de receptores relacionados à albumina e a eficácia de terapias baseadas em nanopartículas albumina em diferentes tipos de câncer, especialmente o nab-paclitaxel.

Já havia sido postulado que a expressão de proteína SPARC é crítica na captação da albumina e aumenta a eficácia do tratamento com nab-paclitaxel. Através de estudo clínico em pacientes com câncer de cabeça e pescoço e câncer de mama, foi demonstrada correlação entre a expressão e a resposta ao tratamento (DESAI et. al., 2008; DESAI et. al., 2009). No entanto, em ensaio clínico de fase III em pacientes com câncer de pâncreas metastático, essa correlação não foi comprovada (HIDALGO et. al., 2015).

As cavéolas, invaginações em forma de ômega formadas nas membranas plasmáticas também desempenham papel importante na captação de albumina pelas células tumorais (WILLIAMS e LISANTI, 2015). Elas são descritas em diversos processos celulares incluindo endocitose, transcitose e transdução

de sinais (GUMBLETON, 2001; RAZANI et. al., 2002). A proteína primária necessária para a formação de cavéolas é denominada caveolina-1 (Cav-1), e está associada à progressão tumoral, sendo expressa em diversos tipos de câncer, incluindo mama, pâncreas e próstata (CHATTERJEE et. al., 2017; PINILLA et. al., 2006; SUZUOKI et. al. 2002)

Em estudo com camundongos transgênicos que não expressam Cav-1 foi comprovado o papel crítico das cavéolas na internalização de albumina radioiodada (SCHUBERT et. al., 2001). Da mesma forma, estudo de atenuação mediada por RNAi de Cav-1 em células cancerígenas reduziu a captação de albumina e nab-paclitaxel e causou resistência à apoptose induzida pelo quimioterápico (CHATTERJEE et. al., 2017).

Importante destacar que na condução dos experimentos *in vivo* com as nanopartículas de albumina radiomarcadas em modelo 4T1, todos os animais injetados vieram a óbito aproximadamente 20-30 minutos pós-administração e por este motivo o experimento foi suspenso. Verificou-se nesses animais letargia, dificuldade respiratória e cianose.

Na tentativa de elucidar o ocorrido, as doses foram diminuídas e administradas nanopartículas de albumina e albumina nativa em diferentes animais saudáveis (balb/C), modelo MMTV-PyMT e 4T1. Como resultado, os animais saudáveis balb/C e modelo MMTV-PyMT não apresentaram nenhum efeito adverso, já os animais do modelo 4T1 continuaram vindo a óbito.

Realizou-se dissecação dos animais mortos, e foi observado que os baços estavam extremamente aumentados, também foi realizada imagem planar *ex vivo* do fígado, pulmão, coração e tumor, onde verificou-se concentração da radioatividade no fígado (Anexo 1). Amostras de sangue de dois animais modelo 4T1 foram coletadas e enviadas para laboratório de análises clínicas e realizados exames bioquímicos ALT (TGP), AST (TGO) e coagulograma (tempo de protrombina, tempo de tromboplastina parcial ativada, fibrinogênio (Anexos 2 e 3). Todos os parâmetros hematológicos estudados estavam alterados neste modelo.

Uma das possíveis explicações para o ocorrido reside no fato de que podem ocorrer interações de nanopartículas administradas sistemicamente com células sanguíneas, proteínas, células endoteliais, e sistema de coagulação, como plaquetas e fatores de coagulação plasmática que podem induzir reações



indesejáveis como toxicidade grave e até fatais com complicações trombóticas (ILINSKAYA e DOBROVOLSKAIA, 2013).

Essas coagulopatias induzidas por nanopartículas são caracterizadas pela formação de pequenos coágulos intravasculares, seguidos por hemorragias anormais ou pela formação de coágulos em veias profundas que podem mover-se para os pulmões e causar embolia pulmonar. Incidentes de trombose vascular já foram relatados na literatura para alguns nanomateriais (FURIE e FURIE, 2008; RADOMSKI et. al.,2005). Portanto, diante das características hematológicas verificadas no modelo tumoral, é possível que esse modelo seja propenso a tais reações.

Para alta captação tumoral verificada para as nanopartículas de papaína, além do efeito EPR, uma das hipóteses é da própria ação proteolítica desta enzima que degrada a matriz extracelular (MEC) facilitando a difusão das nanopartículas no interstício tumoral. A utilização desta proteína para projetar um nanocarreador enzimático fundamentou-se na possibilidade da modulação do microambiente tumoral para superar obstáculos relacionados à penetração e aumentar a eficácia da administração, considerando que a MEC é altamente suscetível à ação de proteases (EIKENES et. al., 2005; GANESH et. al., 2008; GULLOTTI et. al., 2009; RAKESH et. al., 2010)

A MEC é uma barreira biológica intrínseca ao parênquima tumoral composta por proteoglicanos, ácido hialurônico, colágeno, elastina, laminina e outras proteínas estruturais, que restringe a difusão de fármacos, macromoléculas terapêuticas e nanocarreadores em células distantes dos vasos sanguíneos (MINCHINTON E TANNOCK, 2006; BEYER et. al., 2011). Diversos modelos matemáticos foram utilizados para definir parâmetros de difusão nanoestruturas na MEC de tumores, sugerindo que características físicas como tamanho, forma e carga superficial podem afetar substancialmente a distribuição (STYLIANOPOULOS et. al., 2010; PLOPPER et. al., 2007; MITRAGOTRI e LAHANN, 2012).

A modulação do microambiente tumoral através da degradação da MEC é descrita na literatura como método eficaz para aumentar a captação de nanopartículas. Gong et. Al (2016) demonstraram em ensaios pré-clínicos com modelo câncer de mama murinho 4T1 que o tratamento prévio a administração de nanoestruturas com hialuronidase (HAase) aumentou a captação de

nanopartículas direcionadas ao tratamento fotodinâmico. Neste estudo foi observado que após o tratamento com HAase a densidade de vasos sanguíneos tumorais aumenta e ocorre a dilatação dos vasos, melhorando o estado de hipóxia tumoral. Conseqüentemente, o efeito EPR é mais pronunciado pela melhor perfusão do tumor (GONG et. al. 2016; ZHOU et. al. 2016). Estratégia semelhante também é relatada utilizando losartan para depleção do colágeno I da MEC (ZHANG et. al. 2015; DIOP-FRIMPONG et. al., 2011).

Parodi et al. (2014) usaram um complexo enzimático de bromelina, para funcionalizar a superfície de nanopartículas de sílica mesoporosa o que favoreceu a internalização celular da NPs demonstrando digestão e difusão eficientes em MEC. Após administração intratumoral, observou-se que as nanopartículas funcionalizadas difundiam-se em maior extensão quando comparadas à distribuição das que não tinham bromelina na superfície (PARODI et. al., 2014).

É descrito na literatura que o aumento da atividade proteolítica em tumores está relacionado a progressão e disseminação da doença. Nesse sentido, estudos da atividade proteolítica das nanopartículas de papaína utilizadas nesse trabalho devem ser minuciosamente conduzidos antes de uma possível aplicação clínica. Outro aspecto importante a ser caracterizado relaciona-se com a segurança e imunogenicidade dessas nanopartículas. De qualquer maneira, os resultados obtidos neste estudo demonstram que a utilização da papaína em sistemas nanométricos representa uma grande oportunidade para controlar e melhorar a difusão de agentes diagnósticos e terapêuticos no parênquima tumoral.

Neste trabalho, optou-se pelo uso do tecnécio-99m, dada a facilidade na obtenção por meio de geradores, além da facilidade para marcação de proteínas por via direta, porém diversos radionuclídeos diagnósticos e/ou terapêuticos podem acoplados a estas nanopartículas. Da mesma maneira, os resultados sugerem para o potencial dessas nanopartículas carregarem drogas no tratamento contra o câncer.

De modo geral, os resultados apresentados neste trabalho mostram que as nanopartículas aqui estudadas possuem notável potencial como ferramentas para aplicações diagnósticas, constituindo-se de uma estratégia para monitorar de forma não invasiva tumores de mama. Da mesma forma os

resultados evidenciam a possibilidade da utilização desses sistemas proteicos para fins terapêuticos e ou teranósticos, visto que houve captação tumoral significativa.

## 7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, foi possível concluir que síntese induzida por radiação ionizante produziu nanopartículas de papaína e albumina com tamanho médio desejável  $9,3 \pm 1,9$  e  $25,1 \pm 2,9$  nm, respectivamente, distribuição de tamanho homogêneo e com morfologia esférica, características ideais para nanocarreadores. As mesmas, foram eficientemente radiomarcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  e mostram-se estáveis em meios biológicos por até, pelo menos, 6h. Nesse período os radiomarcados não apresentaram tendência a instabilidade frente a transquelação a aminoácidos presentes em soro humano.

Os ensaios de biodistribuição em animais saudáveis, mostraram diferentes perfis excreção para as nanopartículas estudadas. As nanopartículas de papaína possuem acentuada excreção renal enquanto as nanopartículas de albumina foram eliminadas preferencialmente por via hepática.

Os ensaios *in vitro* em cultura celular nas linhagens MDA-MB231 e 4T1 demonstraram internalização significativa desses sistemas proteicos. Já nos estudos *in vivo* em modelos tumorais foi possível comprovar a eficiência na captação por tumores mamários conforme evidenciado por métodos de medicina nuclear.

Deste modo, as nanopartículas proteicas utilizadas no corrente trabalho mostraram-se promissoras a serem utilizadas como sistema de veiculação de radionuclídeos diagnósticos para estudos de sua distribuição sistêmica, bem como de sua aplicação como traçador SPECT em tumores mamários. Esses achados também apontam e incentivam estudos posteriores para a possível aplicabilidade como nanocarreadores de radionuclídeos PET, terapêuticos e/ou teranósticos, assim como no possível potencial em entrega seletiva de drogas (*drug delivery*). Da mesma forma, sugere-se estudos complementares em outros tipos de tumores.

## 8 REFERÊNCIAS

- ABRIATA, J. P. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de policaprolactona contendo paclitaxel funcionalizadas com folato para otimização de terapia do câncer de ovário**. 2018. 94f Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.
- AGUIAR, R. B. **Aplicação diagnóstica e terapêutica de um novo anticorpo anti-FGF2 em processos de angiogênese em melanoma experimental**. Tese(doutorado)-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2014.
- AL-HATAMLEH, M. A. I.; AHMAD, S.; BOER, J. C.; LIM, J.; CHEN, X.; PLEBANSKI, M.; MOHAMUD, R. A Perspective Review on the Role of Nanomedicine in the Modulation of TNF-TNFR2 Axis in Breast Cancer Immunotherapy. **Journal of Oncology**. 2019.
- AMRI, E.; MAMBOYA, F. Papain, a Plant Enzyme of Biological Importance: A Review. **American J. of Bioch. and Biotech.** v.8, n.2, 2012.
- ARNOLD, S. A.; BREKKEN, R. A. SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. **J. Cell Commun Signal.** v.3, p. 255-273, 2009.
- AZARKAN, M.; EL MOUSSAOUI, A.; VAN WUYTSWINKEL, D.; DEHON, G.; LOOZE, Y. Fractionation and purification of the enzymes stored in the latex of Carica papaya. **J Chromatogr B. Anal Technol Biomed Life Sci.** 2003.
- BANERJEE, S.R., MARESCA, K.P., FRANCESCONI, L., VALLIANT, J., BABICH, J.W., ZUBIETA, J. New directions in the coordination chemistry of <sup>99m</sup>Tc: a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. **Nucl. Med. Biol.**, v.32, p.1-20, 2005.
- BENNET, D., KIM, S. Polymer Nanoparticles for Smart Drug Delivery. **Application of Nanotechnology in Drug Delivery.** p.257-310, 2014.
- BEUTH, J. Proteolytic enzyme therapy in evidence-based complementary oncology: fact or fiction? **Integr Cancer Ther.** 2008
- BEYER, I.; LI, Z.; PERSSON, J.; LIU, Y.; VAN RENSBERG, R.; YUMUL, R.; ZHANG, X. B.; HUNG, M. C.; LIEBER, A. Controlled Extracellular Matrix Degradation in Breast Cancer Tumors Improves Therapy by Trastuzumab **Mol. Ther.** 2011
- BRADDOCK M. Biomedical Imaging: The Chemistry of Labels, Probes and Contrast Agents. Cambridge : Royal Society of Chemistry; 2012.
- BROHI, R., D.; WANG, L.; TALPUR, H. S.; WU, D; KHAN, F. A.; BHATTARAI, D.; REHMAN, Z.; FARMANULLAH, F.; HUO, L. Toxicity of Nanoparticles on the Reproductive System in Animal Models: A Review. **Front Pharmacol.** v.8, p.606, 2017.

BUDAMA-KILINC, Y.; CAKIR-KOC, R.; KECEL-GUNDUZ, S.; ZORLU T.; KOKCU, Y.; BICAK, B.; KARAVELIOGLU, Z.; OZEL, A. E. Papain Loaded Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) Nanoparticles: In-silico and In-Vitro Studies. **Journal of Fluorescence**. 2018

CABRAL, H.; MATSUMOTO, Y.; MIZUNO, K.; CHEN, Q.; MURAKAMI, M.; KIMURA, M.; TERADA, Y.; KANO, M. R.; MIYAZONO, K.; UESAKA, M.; NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. **Nat Nanotechnol**. 2011.

CAMPBELL, P. M.; DER, C. J. Oncogenic Ras and its role in tumor cell invasion and metastasis. **Seminars in Cancer Biology**. 2004.

CAPRIOTTI, A. L.; CARACCILO, G.; CAVALIERE, C.; COLAPICCHIONI, V.; PIOVESANA, S.; POZZI, D.; LAGANÀ, A. Analytical methods for characterizing the nanoparticle -protein corona. **Chromatographia** 2014.

CHAN, C. From Nanotech to Nanoscience. **Distillations**, 2008.

CHANDRAN, S. P.; NACHIMUTHU, K. Immunostimulatory Potential of Papain Encapsulated Solid Lipid Nanoparticles. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. 2018.

CHATTERJEE, M.; BEN-JOSEF, E.; ROBB, R.; VEDAIE, M.; SEUM, S.; THIRUMOORTHY, K.; PALANICHAMY, K.; HARBRECHT, M.; CHAKRAVARTI, A.; WILLIAMS, T. M. Caveolae-Mediated Endocytosis Is Critical for Albumin Cellular Uptake and Response to Albumin-Bound Chemotherapy. **Cancer Res**. 2017.

CHAUHAN, V. P.; STYLIANOPOULOS, T.; MARTIN, J. D.; POPOVIĆ, Z.; CHEN, O.; KAMOUN, W. S.; BAWENDI, M. G.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner. **Nat Nanotechnol**. 2012.

CHITHRANI, B. D.; CHAN, W. C. W. Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes. **Nano Lett**. v.7, p. 1542– 1550, 2007.

CHONG, H. C.; TAN, C. K.; HUANG, R. L.; TAN, N. S. Matricellular proteins: a sticky affair with cancer. **J Oncol**. 2012.

COHEN, A. W.; RAZANI, B.; SCHUBERT, W.; WILLIAMS, T. M.; WANG, X. B.; IYENGAR, P.; BRASAEMLE, D. L.; SCHERER, P. E.; LISANTI, M. P. Role of caveolin-1 in the modulation of lipolysis and lipid droplet formation. **Diabetes**. v.53, n.5, p.1261-1270, 2004.

COHN, E.J.; ONCLEY, J.L.; STRONG, L.E.; HUGHES, W.L.; ARMSTRONG, S.H. Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation. I. The characterization of the protein fractions of human plasma. **J. Clin. Investig**. 1944.

COLMAN, D. Richard Feynman introduces the world to nanotechnology with two seminal lectures (1959 & 1984), **Open Culture**, 2013.

COMMISSO, C.; DAVIDSON, S. M.; SOYDANER-AZELOGLU, R. G.; PARKER, S. J.; KAMPHORST, J. J.; HACKETT, S.; GRABOCKA, E.; NOFAL, M.; DREBIN, J. A.; THOMPSON, C. B.; RABINOWITZ, J. D.; METALLO, C. M.; VANDER HEIDEN, M. G.; BAR-SAGI, D. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. **Nature**. 2013.

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**. 2018.

DESAI, N. P.; TRIEU, V.; HWANG, L. Y.; WU, R.; SOON-SHIONG, P.; GRADISHAR, W. J. Improved effectiveness of nanoparticle albumin-bound (nab) paclitaxel versus polysorbate-based docetaxel in multiple xenografts as a function of HER2 and SPARC status. **Anti-Cancer Drugs**. 2008.

DESAI, N.; TRIEU, V.; DAMASCELLI, B.; SOON-SHIONG, P. SPARC Expression Correlates with Tumor Response to Albumin-Bound Paclitaxel in Head and Neck Cancer Patients. **Translational Oncology**. 2009

DIOP-FRIMPONG, B.; CHAUHAN, V.P.; KRANE, S.; BOUCHER, Y.; JAIN, R.K. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. **PNAS** 2011

EIKENES, L.; TARI, M.; TUFTO, I.; BRULAND, Ø. S.; DE LANGE DAVIES, C. Hyaluronidase Induces a Transcapillary Pressure Gradient and Improves the Distribution and Uptake of Liposomal Doxorubicin (Caelyx) in Human Osteosarcoma Xenografts. **Br. J. Cancer** 2005

ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. **Journal of Controlled Release**. v.157, p.168-182, 2012.

EVANS, T.W. Review article: albumin as a drug—biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. **Alimentary Pharm. & Therapeutics**. 2002.

FAINTUCH, B.L.; SANTOS, R.L.S.R.; TEODORO, R.; MURAMOTO, E.; MORGANTI, L; NUNES, I.V.S; OKAMOTO, M.R.Y. Labeling of small biomolecules using novel technetium-99m cores: results of a coordinated research project 2003-2006. **International Atomic Energy Agency** (IAEA) Technical reports series, ISSN 0074-1914; n.459, Viena, 2008.

FANALI, G.; MASSI, A. D.; TREZZA, V.; MARINO, M.; FASANO, M.; ASCENZI, P. Human serum albumin: From bench to bedside. **Molecular Aspects of Medicine**. v.33, n.3, p.209-290, 2012.

FARJADIAN, F.; GHASEMI, A.; GOHARI, O.; ROOINTAN, A.; KARIMI, M.; HAMBLIN, M. R. Nanopharmaceuticals and nanomedicines currently on the market: challenges and opportunities. *Nanomedicine (Lond)*. 2019

FAZOLIN, G. N. **Síntese induzida por radiação de nanocarreadores bioativos base de papaína para carregamento de radiofármacos**. 2019. 85 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN/CNEN/SP, São Paulo.

FURIE, B.; FURIE, B. C. Mechanisms of thrombus formation. *N Engl J Med*. 2008.

GANESH, S.; GONZALEZ-EDICK, M.; GIBBONS, D.; VAN ROEY, M.; JOOSS, K. Intratumoral Coadministration of Hyaluronidase Enzyme and Oncolytic Adenoviruses Enhances Virus Potency in Metastatic Tumor Models *Clin. Cancer Res*. 2008

GONG, H.; CHAO, Y.; XIANG, J.; HAN, X.; SONG, G.; FENG, L.; LIU, J.; YANG, G.; CHEN, Q.; LIU, Z. Hyaluronidase to enhance nanoparticle-based photodynamic tumor therapy. *Nano Lett*. 2016

GULLOTTI, E.; YEO, Y. Extracellularly Activated Nanocarriers: A New Paradigm of Tumor Targeted Drug Delivery *Mol. Pharmaceutics* 2009

GUMBLETON, M. Caveolae as potential macromolecule trafficking compartments within alveolar epithelium. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2001.

HAUSER, C.A.; STOCKLER, M.R.; TATTERSALL, M.H.N. Prognostic factors in patients with recently diagnosed incurable cancer: a systematic review. *Support Care Cancer*. 2006.

HE, Y.; NING, T.; XIE, T.; QIU, Q.; ZHANG, L.; SUN, Y.; JIANG, D.; FU, K.; YIN, F.; ZHANG, W. Large-scale production of functional human serum albumin from transgenic rice seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011, 108, 19078–19083.

HIDALGO, M.; PLAZA, C.; MUSTEANU, M.; ILLEI, P.; BRACHMANN, C. B.; HEISE, C.; PIERCE, D.; LOPEZ-CASAS, P. P.; MENENDEZ, C.; TABERNERO, J.; ROMANO, A.; WEI, X.; LOPEZ-RIOS, F.; VON HOFF, D. D. SPARC Expression Did Not Predict Efficacy of *nab*-Paclitaxel plus Gemcitabine or Gemcitabine Alone for Metastatic Pancreatic Cancer in an Exploratory Analysis of the Phase III MPACT Trial. *Clin Cancer Res*. 2015.

HJELSTUEN, O.K. Technetium-99m chelators in nuclear medicine. A review. *Analyst (Lond.)*, 1995.

HOWLADER, N; NOONE A. M.; KRAPCHO, M.; MILLER, D; BREST, A.; YU, M.; RUHL, J.; TATALOVICH, Z.; MARIOTTO, A.; LEWIS, D. R.; CHEN, H. S.; FEUER, E. J.; CRONIN, K. A. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016, National Cancer Institute. 2019. Disponível em: <[https://seer.cancer.gov/Csr/1975\\_2016/](https://seer.cancer.gov/Csr/1975_2016/)> Acesso em: 21 set 2019.



HUA, S.; DE MATOS, M. B. C.; METSELAAR, J. M.; STORM, G. Current Trends and Challenges in the Clinical Translation of Nanoparticulate Nanomedicines: Pathways for Translational Development and Commercialization. **Front. Pharmacol.**, 2018.

IARC – International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory: Cancer Today. 2019. Disponível em: <<http://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 10 out 2019.

ILINSKAYA, A. N.; DOBROVOLSKAIA, M. A. Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: safety concerns. **Nanomedicine (Lond)**. 2013

INCA - Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer; 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2019.

JAIN, A.; SINGH, S. K.; ARYA, S. K.; KUNDU, S. C.; KAPOOR, S. Protein Nanoparticles: Promising Platforms for Drug Delivery Applications. **ACS Biomater. Sci. Eng.** 2018.

JAIN, R., STYLIANOPOULOS, T. Delivering nanomedicine to solid tumors. **Nat Rev Clin Oncol**. 2010.

JANKOVIĆ, D.; MAKSIN, T.; DJOKIĆ, D.; MILONJIĆ, S.; NIKOLIĆ, N.; MIRKOVIĆ, M.; VRANJES-DJURIĆ, S. Particle size analysis: <sup>90</sup>Y and <sup>99m</sup>Tc-labelled colloids. **J Microsc.** 2008.

JEON, J. Review of Therapeutic Applications of Radiolabeled Functional Nanomaterials. *Int. J. of Molecular Sciences*. 2019.

KADLUBOWSKI, S. Radiation-induced synthesis of nanogels based on poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) – A review. **Rad Phys Chem**. v 102. p 29-39. 2014.

KAMPHORST, J. J.; NOFAL, M.; COMMISSO, C.; HACKETT, SEAN R.; LU, W.; GRABOCKA, E.; VANDER HEIDEN, M. G.; MILLER, G.; DREBIN, J. A.; BAR-SAGI, D.; THOMPSON, C. B.; RABINOWITZ, J. D. Human Pancreatic Cancer Tumors Are Nutrient Poor and Tumor Cells Actively Scavenge Extracellular Protein. **Cancer Res**. 2015.

KHARISOV, B. I.; KHARISSOVA, O. V.; BERDONOSOV, S. S. Radioactive nanoparticles and their main applications: recent advances. **Recent Pat Nanotechnol**. 2014.

KLEISNER, I.; KOMÁREK, P.; KOMÁRKOVÁ, I.; KONOPKOVÁ, M. The use of redox polymers in labelling procedures of proteins and peptides with <sup>99m</sup>Tc. I. Properties of redox polymers and technique of labelling. **Nucl Med Rev Cent East Eur**. 2000.

KRATZ, F.; ELSADEK, B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. **J Control Release**. 2012.

LAMMERS, T.; KIESSLING, F.; HENNINK, W. E.; STORM, G. Nanotheranostics and image-guided drug delivery: current concepts and future directions. *Mol Pharm.* 2010

LARSEN, M. T.; KUHLMANN, M.; HVAM, M. L.; HOWARD, K. A. albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Molecular and Cellular Therapies.* v.4, n.1, p.1, 2016.

LAUER, D.; MUELLER, R.; OTTO, A.; NAUMANN, M.; BIRKENMEIER, G. Modulation of growth factor binding properties of  $\alpha$ -2-macroglobulin by enzyme therapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001.

LEE, Y-S.; KIM, Y.I.; LEE, D.S. Future Perspectives of Radionanomedicine Using the Novel Micelle-Encapsulation Method for Surface Modification. *Nucl. Med. Mol. Imaging,* 2015.

LEIPNER J, SALLER R. Systematic enzyme therapy in oncology: effect and mode of action. *Drugs.* v.59 p.769-780. 2000.

LEITE, A. P.; DE OLIVEIRA, B. G.; SOARES, M. F.; BARROCAS, D. L. Use and effectiveness of papain in the wound healing process: a systematic review. *Rev Gaúcha Enf.* 2012.

LEVINE, S. M. albumin and multiple sclerosis. *BMC Neurology.* v.16, n.1, p.1, 2016.

LI, Z.; TAN, S.; LI, S.; SHEN, Q.; WANG, K. Cancer drug delivery in the nano era: an overview and perspectives (Review). *Oncology Reports,* v. 38, p. 611–624, 2017.

LIU, S. Bifunctional Coupling Agents for Radiolabeling of Biomolecules and Target-Specific Delivery of Metallic Radionuclides. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008.

LOHCHAROENKAL, W.; WANG, L.; CHEN, Y. C.; ROJANASAKUL, Y. Protein Nanoparticles as Drug Delivery Carriers for Cancer Therapy. *BioMed Research International.* 2014.

LUNDQVIST M.; STIGLER, J.; ELIA, G.; LYNCH, I.; CEDERVALL, T.; DAWSON, K. A. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci* 2008.

MATSUMURA, Y.; MAEDA, H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumorotropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Res.* 1986.

MERLOT, A. M., KALINOWSKI, D. S.; RICHARDSON, D. R. Unraveling the mysteries of serum albumin—more than just a serum protein. *Front. Physiol.* 2014.

MILLER, M. A.; GADDE, S.; PFIRSCHKE, C.; ENGBLOM, C.; SPRACHMAN, M. M.; KOHLER, R. H.; YANG, K. S.; LAUGHNEY, A. M.; WOJTKIEWICZ, G.; KAMALY, N.; BHONAGIRI, S.; PITTET, M. J.; FAROKHZAD, O. C.;

- WEISSLEDER, R. Predicting therapeutic nanomedicine efficacy using a companion magnetic resonance imaging nanoparticle. **Science Translational Medicine**. 2015
- MINCHINTON, A.I.; TANNOCK, I.F. Drug penetration in solid tumours. **Nat. Rev. Cancer**. 2006.
- MIRZA, A. Z.; SIDDIQUI, F. A. Nanomedicine and drug delivery: a mini review. **International Nano Letters**, v. 4, p. 94, 2014.
- MITRA, A.; NAN, A.; LINE, B. R.; GHANDEHARI, H. Nanocarriers for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. **Curr Pharm Des**. 2006
- MOHR, T.; DESSER, L. Plant proteolytic enzyme papain abrogates angiogenic activation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. **BMC Complement altern Med**. v.13, p.231, 2013.
- ODA, C. M. R.; FERNANDES, R. S.; DE ARAÚJO LOPES, S. C.; DE OLIVEIRA, M. C.; CARDOSO, V. N.; SANTOS, D. M.; DE CASTRO PIMENTA, A. M.; MALACHIAS, A.; PANIAGO, R.; TOWNSEND, D. M.; COLLETTI, P. M.; RUBELLO, D.; ALVES, R. J.; DE BARROS, A. L. B.; LEITE, E. A. Synthesis, characterization and radiolabeling of polymeric nano-micelles as a platform for tumor delivering. **Biomed Pharmacother**. v.89, p.268-275, 2017.
- PANT, K.; SEDLÁČEK, O.; NADAR, R. A.; HRUBÝ, M.; STEPHAN, H. Radiolabelled Polymeric Materials for Imaging and Treatment of Cancer: Quo Vadis? **Advanced Healthcare Materials**. 2017.
- PARAT, M. O.; RIGGINS, G. J. Caveolin-1, caveolae, and glioblastoma. **Neuro Oncol**. v.14, n.6, p.679-688, 2012.
- PARODI, A.; HADDIX, S.G.; TAGHIPOUR, N.; SCARIA, S.; TARABALLI, F.; CEVENINI, A.; YAZDI, I.K.; CORBO, C.; PALOMBA, R.; KHALED, S.Z.; MARTINEZ, J. O.; BROWN, B. S.; ISENHART, L.; TASCIOTTI, E. Bromelain surface modification increases the diffusion of silica nanoparticles in the tumor extracellular matrix. **ACS Nano**. 2014
- PARODI, A.; MIAO, J.; SOOND S. M.; RUDZIŃSKA, M.; ZAMYATNIN, A. A. albumin Nanovectors in Cancer Therapy and Imaging. **Biomolecules**. 2019
- PERSSON, R. B.; LIDÉN, K. 99m Tc-labelled human serum albumin: a study of the labelling procedure. **Int J Appl Radiat Isot**. 1969.
- PETERS JR., T. all About albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications. **Academic Press**, San Diego and London ,1996.
- PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacogn Rev**. v. 6(11):1-5, 2012.
- PIGNATTA, S.; ORIENTI, I.; FALCONI, M.; TETI, G.; ARIENTI, C.; MEDRI, L.; ZANONI, M.; CARLONI, S.; ZOLI, W.; AMADORI, D. albumin nanocapsules containing fenretinide: Pre-clinical evaluation of cytotoxic activity in experimental

models of human non-small cell lung cancer. **Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.** v.11, p. 263-273. 2015.

PINILLA, S.M.; HONRADO, E.; HARDISSON, D.; BENÍTEZ, J.; PALACIOS, J. Caveolin-1 expression is associated with a basal-like phenotype in sporadic and hereditary breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 2006.

POLYAK, A.; ROSS, T. L. Nanoparticles for SPECT and PET Imaging: Towards Personalized Medicine and Theranostics. **Current Medicinal Chemistry.** v.25 , n.34 , 2018.

QIN, S.; FITE, B. Z.; GAGNON, M. K.; SEO, J. W.; CURRY, F. R.; THORSEN, F.; FERRARA, K. W. A Physiological Perspective on the Use of Imaging to Assess the *In vivo* Delivery of Therapeutics. **Ann Biomed Eng.** 2014.

QUEIROZ, R. G.; VARCA, G. H. C.; KADLUBOWSKI, S.; ULANSKI, P.; LUGÃO, A. B. Radiation-synthesized protein-based drug carriers: Size-crontolles BSA nanoparticles. **Int J Biol Macromol.** v.85, p.82-91, 2016.

RADOMSKI, A.; JURASZ, P.; ALONSO-ESCOLANO, D.; DREWS, M.; MORANDI, M.; MALINSKI, T.; RADOMSKI, M. W. Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis. **Br J Pharmacol.** 2005

RAKESH, K. J.; TRIANTAFYLLOS, S. Delivering Nanomedicine to Solid Tumors **Nat. Rev. Clin. Oncol.** 2010

RAMENDA, T.; KNISS, T.; BERGMANN, R.; STEINBACH, J.; WUEST, F. Radiolabelling of proteins with fluorine-18 *via* click chemistry. **Chem. Commun. (Camb.)**, 2009

RAWLINGS N. D.; BARRETT, A. J., FINN, R. Twenty years of the MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Res.** 2016.

RAZANI, B.; WOODMAN, S. E.; LISANTI, M. P. Caveolae: From Cell Biology to Animal Physiology. **Pharmacological Reviews.** 2002.

RHODES B. A. Considerations in the radiolabeling of albumin. **Semin Nucl Med.** 1974.

RIZZO, L. Y.; THEEK, B.; STORM, G.; KIESSLING, F.; LAMMERS, T. Recent Progress in Nanomedicine: Therapeutic, Diagnostic and Theranostic Applications, **Curr Opin Biotechnol**, 2013.

ROMA-RODRIGUES, C.; POMBO, I.; RAPOSO, L., PEDROSA, P.; FERNANDES, A. R.; BAPTISTA, P. V. Nanotheranostics Targeting the Tumor Microenvironment. **Front. Bioeng. Biotechnol.** 2019.

SAHA, G. B. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 7th edition. New York: Springer; 2018.

SANTOS, C. J. **Estudo da atividade anti-angiogênica de tungstato de zinco sintetizado por rota química**. 2018. 177f Tese (Doutorado). Universidade Federal de Itajubá, Itajubá, 2018.

SCHUBERT, W.; FRANK, P. G.; RAZANI, B.; PARK, D. S.; CHOW, C. W.; LISANTI, M. P. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin *in vivo*. **The Journal of Biological Chemistry**. 2001.

SEYFRIED, T. N.; FLORES, R. E.; POFF, A. M.; D'AGOSTINO, D. P. Cancer as a metabolic disease: implications for novel therapeutics. **Carcinogenesis**, vol. 35, no. 3, pp. 515–527, 2014.

SILVA-LÓPEZ, R. E.; GONÇALVES, R. N. Therapeutic proteases from plants: biopharmaceuticals with multiple applications. **J. Appl. Biotechnol. Bioeng**. V.6(2):101–109, 2019.

SINN, H. P.; KREIPE, H. A brief overview of the WHO classification of breast tumors. **Breast Care**. v.8, p. 149–154, 2013.

SONG G; PETSCHAUER J. S; MADDEN, A. J.; ZAMBONI, W. C. Nanoparticles and the mononuclear phagocyte system: pharmacokinetics and applications for inflammatory diseases. **Curr Rheumatol Rev**. v.10, p.22-34, 2014.

SOTO-ESPINOZA, S.L.; SÁNCHEZ, M.L.; RISSO, V.; SMOLKO, E.; GRASSELLI, M. Radiation synthesis of seroalbumin nanoparticles. **Radiat Phys Chem.**, v. 81 p.1417-1421, 2011.

STEHLE, G.; SINN, H.; WUNDER, A.; SCHRENK, H. H.; STEWART, J. C. M.; HARTUNG, G.; MAIER-BORST, W.; HEENE, D. L. Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself—implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**.1997.

STYLIANOPOULOS, T.; POH, M.-Z.; INSIN, N.; BAWENDI, M. G.; FUKUMURA, D.; MUNN, L. L.; JAIN, R. K. Diffusion of Particles in the Extracellular Matrix: The Effect of Repulsive Electrostatic Interactions **Biophys. J**. 2010

SU, H.; HU, S. Functional Nanoparticles for Tumor Penetration of Therapeutics. **Pharmaceutics**. 2018.

SUZUOKI, M.; MIYAMOTO, M.; KATO, K.; HIRAOKA K; OSHIKIRI, T.; NAKAKUBO, Y.; FUKUNAGA, A.; SHICHINOHE, T.; SHINOHARA, T.; ITOH, T.; KONDO, S.; KATOH, H. Impact of caveolin-1 expression on prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma. **Br J Cancer**. 2002.

SZABÓ, A.; KOTORMÁN, M.; LACZKÓ, I.; SIMON, M. Spectroscopic studies of stability of papain in aqueous organic solvents. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v.41, p.43-48, 2006.

TAHIR, S. A.; YANG, G.; EBARA, S.; TIMME, T. L.; SATOH, T.; LI, L.; GOLTSOV, A.; ITTMANN, M.; MORRISETT, J. D.; THOMPSON, T. C. Secreted Caveolin-1 Stimulates Cell Survival/Clonal Growth and Contributes to Metastasis in Androgen-insensitive Prostate Cancer. **Cancer Res**. 2001.

TANG, L.; CHENG, J. Nonporous Silica Nanoparticles for Nanomedicine Application. **Nano Today**. 2013.

TANG, L.; GABRIELSON, N.P.; UCKUN, F.M.; FAN, T.M.; CHENG, J. Size-dependent tumor penetration and *in vivo* efficacy of monodisperse drug-silica nanoconjugates. **Mol. Pharm.** 2013

TENG, X.Y.; GUAN, Z.Z.; YAO, Z.W.; LIU, D.G.; ZHOU, N.N.; LUO, H.Y.; HAWKINS, M.; SOON-SHIONG, P.; ERGUL, M.; ERGUL, M.; YUSUF, T. Important Anti-Cancer Applications of Protein Based Nanoparticles. **Curr Proteomics**. v.10, n.4, p. 334-340, 2013.

TEZCANER, A.; BARAN, E. T.; KESKIN, D. Nanoparticles Based on Plasma Proteins for Drug Delivery Applications. **Current Pharmaceutical Design**. 2016

TORRE, L. A.; ISLAMI, F; SIEGEL R. L.; WARD, E. M.; JEMAL, A. Global cancer in women: burden and trends. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. v.26, p. 444–457. 2017.

TRAN S.; DEGIOVANNI, P.; PIEL, B.; RAI, P. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. **Clinical and Translational Medicine**. v.6, 2017.

TREMACOLDI, C. R. Proteases e inibidores de proteases na defesa de plantas contra pragas – Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental**, 2009.

VANHOOF G, COOREMAN W. Bromelain. **Pharmaceutical Enzymes**. New York, NY: Marcel Dekker; 1997.

VARCA, G. H. C.; QUEIROZ, R. G.; LUGÃO, A. B. Irradiation as an alternative route for protein crosslinking: Cosolvent free BSA nanoparticles. **Radiation Physics and Chemistry**. v.124, p.111-115, 2016.

VARENNE, F.; MAKKY, A.; GAUCHER-DELMAS, M.; VIOLLEAU, F.; VAUTHIER, C. Multimodal Dispersion of Nanoparticles: A Comprehensive Evaluation of Size Distribution with 9 Size Measurement Methods. **Pharm. Res.**, 2016.

VERMA, D.; GULATI, N.; SHREYA, K.; MUKHERJEE, S.; NAGAI, U. Protein Based Nanostructures for Drug Delivery. **J Pharm**. 2018.

WALD M, OLEJAR T, SEBKOVA V, ZADINOVA M, BOUBELIK M, POUCKOVA P. Mixture of Trypsin, chymotrypsin and papain reduces formation of metastases and extends survival time in C57Bl6 mice with syngeneic melanoma B16. **Cancer Chemother Pharmacol**. 2001.

WANG, Y. F.; CHEN, Y. C.; LI, D. K.; CHUANG, M. H. Technetium-99m-labeled autologous serum albumin: a personal-exclusive source of serum component. **J Biomed Biotechnol**. 2011.

WEIGELT, B.; PETERSE, J. L.; VAN'T VEER, L. J. Breast cancer metastasis: markers and models. **Nat Rev Cancer**. 2005;5(8):591–602.

WHATMORE, R. W. Nanotechnology—what is it? should we be worried? **Occupational Medicine**, v. 56, p. 295–299, 2006.

WHO – World Health Organization. Cancer. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Cancer>>. Acesso em: 10 out 2019.

WILLIAMS, T. M.; LISANTI, M. P. Caveolin-1 in oncogenic transformation, cancer, and metastasis. **American J. of Physiology-Cell Physiology**. 2005.

WU, D.; SI, W.; XUE, H.; WONG, H. Nanomedicine applications in the treatment of breast cancer: current state of the art. **International Journal of Nanomedicine**. 2017.

ZAENKER KS. The use of systemic enzyme therapy in oncology. **Cancer Chemother Pharmacol**. 2001.

ZHANG, L.; CHEN, H.; WANG, L.; LIU, T.; YEH, J. LU, G.; YANG, L.; MAO, H. Delivery of therapeutic radioisotopes using nanoparticle platforms: potential benefit in systemic radiation therapy. **Nanotechnol Sci Appl**. 2010

ZHANG, L.; WANG, Y.; YANG, Y.; LIU, Y.; RUAN, S.; ZHANG, Q.; TAI, X.; CHEN, J.; XIA, T.; QIU, Y.; GAO, H.; HE, Q. High tumor penetration of paclitaxel loaded pH sensitive cleavable liposomes by depletion of tumor collagen I in breast cancer. **ACS Appl. Mater. Interfaces**. 2015

ZHANG, M.; WEI, Z.; CHANG, S.; TENG, M.; GONG, W. Crystal structure of a papain-fold protein without the catalytic residue: a novel member in the cysteine proteinase family. **J Mol Biol**. 2006.

ZHOU, H.; FAN, Z.; DENG, J.; LEMONS, P.K.; ARHONTOULIS, D.C.; BOWNE, W.B.; CHENG, H. Hyaluronidase embedded in nanocarrier peg shell for enhanced tumor penetration and highly efficient antitumor efficacy. **Nano Lett**. 2016

ZOLLE, I. Technetium-99m Pharmaceuticals. Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine. Austria, **Springer**. 2007.

ZOLLE, I.; ONICIU, L.; HÖFER, R. Contribution to the study of the mechanism of labelling human serum albumin (HSA) with technetium-99m. **Int J Appl Radiat Isot**. 1973.

## ANEXO 1

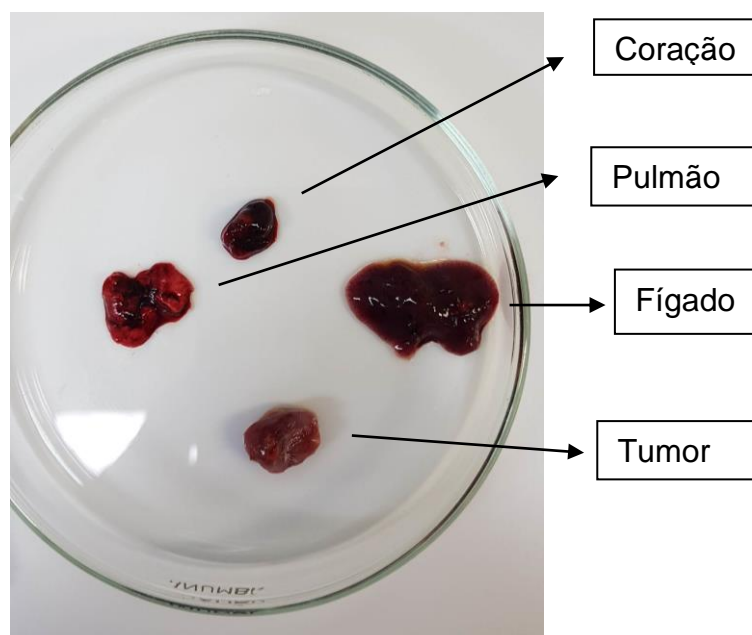


Figura 1 – Posicionamento dos órgãos (coração, pulmão, fígado e tumor) para imagem cintilográfica planar, extraídos de animal modelo 4T1 que veio a óbito pós-administração de  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs



Figura 2 – Cintilografia planar de órgãos (coração, pulmão, fígado e tumor) extraídos de animal modelo 4T1 que veio a óbito pós-administração de  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs. Radioatividade concentrada apenas no fígado.





Figura 3 – Cintilografia planar da carcaça do animal modelo 4T1 que veio a óbito pós-administração de  $^{99m}\text{Tc}$ -BSA-NPs. Verifica-se concentração da radioatividade no fígado.

## ANEXO 2

**Provet**  
Veterinária Diagnóstica

Unidade Aratás  
Avenida Aratás, 1009  
Moema - São Paulo  
CEP: 04081-004  
Tel.: (11) 3579-1427  
provet@provet.com.br  
www.provet.com.br

<b>Nº OS:</b> 001-0136486	<b>PACIENTE:</b> MOUSE 01	<b>DATA:</b> 17/09/2019
<b>Espécie:</b> MUS MUSCULUS - CAMUNDONGO	<b>Raça:</b> MAMÍFERO	
<b>Sexo:</b> M Data Nasc: 17/06/2019 Idade: 3 meses	<b>Microchip:</b>	
<b>Responsável:</b> ADEMAR BENEVOLO LUGAO	<b>Fone:</b> 11 31339250 -	
<b>Requisitante:</b> RICARDO DUARTE LOPES	<b>Nº RG:</b>	
<b>Clínica:</b> PROVET - MOEMA	<b>Tatuagem:</b>	

**ALT (TGP)**

Material: SORO OU PLASMA DE HEPARINA DE LITIO  
Metodologia: BIOQUÍMICA SECA

Resultado: **111**  
Observação: **AMOSTRA INTENSAMENTE HEMOLISADA**

Referência  
U/L

Assinado eletronicamente por: CRMV-SP:17187 - RICARDO DUARTE LOPES

**AST (TGO)**

Material: SORO OU PLASMA DE HEPARINA DE LITIO  
Metodologia: BIOQUÍMICA SECA

Resultado: **1193**  
Observação: **AMOSTRA INTENSAMENTE HEMOLISADA**

Referência  
U/L

Assinado eletronicamente por: CRMV-SP:17187 - RICARDO DUARTE LOPES



Ricardo Duarte Lopes  
CRMV - SP 17187

Responsável Técnico: Rubem Montoni Junior - Médico Veterinário - CRMV-SP: 5421 . Registro no CRMV: SP-05421-VP

\*A interpretação dos exames laboratoriais deverá ser realizada pelo Médico Veterinário responsável, mediante a sintomatologia clínica do animal

<b>Nº OS:</b> 001-0136486	<b>PACIENTE:</b> MOUSE 01	<b>DATA:</b> 17/09/2019
<b>Espécie:</b> MUS MUSCULUS - CAMUNDONGO	<b>Raça:</b> MAMÍFERO	
<b>Sexo:</b> M Data Nasc: 17/06/2019 Idade: 3 meses	<b>Microchip:</b>	
<b>Responsável:</b> ADEMAR BENEVOLO LUGAO	<b>Fone:</b> 11 31339250 -	
<b>Requisitante:</b> RICARDO DUARTE LOPES	<b>Nº RG:</b>	
<b>Clínica:</b> PROVET - MOEMA	<b>Tatuagem:</b>	

#### Tempo de Protombina (TP)

Material: PLASMA DE CITRATO DE SÓDIO  
Metodologia: TROMBOPLASTINA

Resultado: **9.0**

Referência  
segundos

Interpretação: A determinação do tempo de protombina é uma prova global para avaliar a coagulação extrínseca, sendo sensível ao fator II ou protombina, fator V ou proacelerina, fator VII ou proconvertina e fator X ou Stuart-Prower.

Assinado eletronicamente por: CRMV-SP:17187 - RICARDO DUARTE LOPES

#### Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)

Material: PLASMA DE CITRATO DE SÓDIO  
Metodologia: ÁCIDO ELLÁGICO

Resultado: **18.3**

Referência  
segundos

Interpretação: A determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada serve para avaliar anomalias da via intrínseca da coagulação para a ativação da protombina, sendo sensível aos fatores VIII, IX, XI, e XII, e deficiências severas dos fatores II, V, X e fibrinogênio

Assinado eletronicamente por: CRMV-SP:17187 - RICARDO DUARTE LOPES

#### Fibrinogênio

Material: PLASMA DE CITRATO DE SÓDIO  
Metodologia: TROMBINA

Resultado: **146**

Referência  
mg/dL

Assinado eletronicamente por: CRMV-SP:17187 - RICARDO DUARTE LOPES



Ricardo Duarte Lopes  
CRMV - SP 17187

Responsável Técnico: Rubem Montoni Junior - Médico Veterinário - CRMV-SP: 5421 - Registro no CRMV : SP-05421-VP

\*A interpretação dos exames laboratoriais deverá ser realizada pelo Médico Veterinário responsável, mediante a sintomatologia clínica do animal

## ANEXO 3

**Provet**  
Veterinária Diagnóstica

Unidade Aratás  
Avenida Aratás, 1009  
Moema - São Paulo  
CEP: 04081-004  
Tel: (11) 3579-1427  
provet@provet.com.br  
www.provet.com.br

<b>N° OS:</b> 001-0136487	<b>PACIENTE:</b> MOUSE 05	<b>DATA:</b> 17/09/2019
<b>Espécie:</b> MUS MUSCULUS - CAMUNDONGO	<b>Raça:</b> MAMÍFERO	
<b>Sexo:</b> F <b>Data Nasc:</b> 17/06/2019 <b>Idade:</b> 3 meses	<b>Microchip:</b>	
<b>Responsável:</b> ADEMAR BENEVOLO LUGAO	<b>Fone:</b> 11 31339250 -	
<b>Requisitante:</b> RICARDO DUARTE LOPES	<b>N° RG:</b>	
<b>Clínica:</b> PROVET - MOEMA	<b>Tatuagem:</b>	

**ALT (TGP)**

**Material:** SORO OU PLASMA DE HEPARINA DE LITIO  
**Metodologia:** BIOQUÍMICA SECA

**Resultado:** 321  
**Observação:** AMOSTRA INTENSAMENTE HEMOLISADA

Referência  
U/L

Assinado eletronicamente por: CRMV-SP:17187 - RICARDO DUARTE LOPES

**AST (TGO)**

**Material:** SORO OU PLASMA DE HEPARINA DE LITIO  
**Metodologia:** BIOQUÍMICA SECA

**Resultado:** 2460,0  
**Observação:** AMOSTRA INTENSAMENTE HEMOLISADA

Referência  
U/L

Assinado eletronicamente por: CRMV-SP:17187 - RICARDO DUARTE LOPES



Ricardo Duarte Lopes  
CRMV - SP 17187

Responsável Técnico: Rubem Montoni Junior - Médico Veterinário - CRMV-SP: 5421 . Registro no CRMV: SP-05421-VP

\*A interpretação dos exames laboratoriais deverá ser realizada pelo Médico Veterinário responsável, mediante a sintomatologia clínica do animal

<b>N° OS:</b> 001-0136487	<b>PACIENTE:</b> MOUSE 05	<b>DATA:</b> 17/09/2019
<b>Espécie:</b> MUS MUSCULUS - CAMUNDONGO	<b>Raça:</b> MAMÍFERO	
<b>Sexo:</b> F Data Nasc: 17/06/2019 Idade: 3 meses	<b>Microchip:</b>	
<b>Responsável:</b> ADEMAR BENEVOLO LUGAO	<b>Fone:</b> 11 31339250 -	
<b>Requisitante:</b> RICARDO DUARTE LOPES	<b>N° RG:</b>	
<b>Clínica:</b> PROVET - MOEMA	<b>Tatuagem:</b>	

#### Tempo de Protombina (TP)

Material: PLASMA DE CITRATO DE SÓDIO  
Metodologia: TROMBOPLASTINA

Resultado: **9.8**

Referência  
segundos

Interpretação: A determinação do tempo de protombina é uma prova global para avaliar a coagulação extrínseca, sendo sensível ao fator II ou protombina, fator V ou proacelerina, fator VII ou proconvertina e fator X ou Stuart-Prower.

Assinado eletronicamente por: CRMV-SP:17187 - RICARDO DUARTE LOPES

#### Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (TTPA)

Material: PLASMA DE CITRATO DE SÓDIO  
Metodologia: ÁCIDO ELLÁGICO

Resultado: **27.5**

Referência  
segundos

Interpretação: A determinação do tempo de tromboplastina parcial ativada serve para avaliar anomalias da via intrínseca da coagulação para a ativação da protombina, sendo sensível aos fatores VIII, IX, XI, e XII, e deficiências severas dos fatores II, V, X e fibrinogênio

Assinado eletronicamente por: CRMV-SP:17187 - RICARDO DUARTE LOPES

#### Fibrinogênio

Material: PLASMA DE CITRATO DE SÓDIO  
Metodologia: TROMBINA

Resultado: **180**

Referência  
mg/dL

Assinado eletronicamente por: CRMV-SP:17187 - RICARDO DUARTE LOPES



Ricardo Duarte Lopes  
CRMV - SP 17187

Responsável Técnico: Rubem Montoni Junior - Médico Veterinário - CRMV-SP: 5421 . Registro no CRMV : SP-05421-VP

\*A interpretação dos exames laboratoriais deverá ser realizada pelo Médico Veterinário responsável, mediante a sintomatologia clínica do animal

---

---

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
Diretoria de Pesquisa, Desenvolvimento e Ensino  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 – Cidade Universitária CEP: 05508-000  
Fone/Fax(0XX11) 3133-8908  
SÃO PAULO – São Paulo – Brasil  
<http://www.ipen.br>

O IPEN é uma Autarquia vinculada à Secretaria de Desenvolvimento, associada à Universidade de São Paulo e gerida técnica e administrativamente pela Comissão Nacional de Energia Nuclear, órgão do Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações.

---

---

---