



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thaís Ligiéro Braga

**Nano-octreotida radiomarcada com tecnécio-99 metaestável como agente
diagnóstico de tumor secretor de polipeptídeo pancreático (PPoma)**

Rio de Janeiro

2019

Thaís Ligiéro Braga

Nano-octreotida radiomarcada com tecnécio-99 metaestável como agente diagnóstico de tumor secretor de polipeptídeo pancreático (PPoma)

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

B813 Braga, Thaís Ligiéro.
Nano-octreotida radiomarcada com tecnécio-99 metaestável como agente diagnóstico de tumor secretor de polipeptídeo pancreático (PPoma) / Thaís Ligiéro Braga. – 2019.
111 f.

Orientador: Ralph Santos Oliveira

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Pâncreas – Teses. 2. Octreotida. 3. Polipeptídeo Pancreático. 4. Compostos Radiofarmacêuticos. 5. Tecnécio. I. Oliveira, Ralph Santos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.39

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Thaís Ligiéro Braga

Nano-octreotida radiomarcada com tecnécio-99 metaestável como agente diagnóstico de tumor secretor de polipeptídeo pancreático (PPoma)

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 30 de maio de 2019.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos Oliveira

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes- UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes- UERJ

Prof. Dr. Eduardo Ricci Júnior

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Luciana Magalhães Rebêlo Alencar

Universidade Federal do Maranhão

Rio de Janeiro

2019

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus filhos, Bernardo Vicente Ligiéro Braga Souto e Maria Antonia Ligiéro Braga Souto e ao meu marido, Felipe Vicente Rodrigues Souto, que formam a minha família e que compreenderam minha ausência para a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela oportunidade única de ir além do que eu imaginava ser capaz, me fortalecer para o contato com quem precisava do meu conhecimento.

Ao meu marido Felipe Vicente Rodrigues Souto, que sempre me incentivou a enfrentar novos desafios, sem cobrar da minha ausência e muitas vezes ficou com os nossos filhos para eu poder estudar. Aos meus filhos Bernardo Vicente Ligiéro Braga Souto e Maria Antonia Ligiéro Braga Souto que do jeitinho deles, compreenderam a minha ausência e são a minha grande inspiração para a realização desse trabalho.

Aos meus pais, Teresa Cristina Soares Ligiéro Braga e Ronaldo Cancela Braga, pelo sentimento e expressão de orgulho em mais uma etapa conquistada. Agradeço também a eles pela ajuda com o Bernardo Vicente e a Maria Antonia. Aos meus familiares pelo apoio, afeto e reconhecimento.

Aos avôs do meu marido, Candida e Antonio Vicente, à tia Elsa, aos meus sogros Vera Lúcia, Severino e o meu cunhado Severino Filho, que me ajudaram principalmente tomando conta das minhas jóias raras, Bernardo Vicente e Maria Antonia, para eu poder estudar.

À minha tia Letícia Boechat primeiramente pelo exemplo profissional, pelo incentivo e espírito inovador, apontando os caminhos a seguir, e a serem melhorados durante toda a minha carreira acadêmica e profissional.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira, pela paciência, principalmente na correção do trabalho, pela presença nos momentos de dúvidas, me auxiliando e dividindo comigo a alegria de construir um conhecimento.

A Marta de Souza Albernaz, que desde início foi a minha grande incentivadora na área de Radiofarmácia e que me ajudou no desenvolvimento do trabalho. Mostrou-me que é possível quando se tem dedicação e amor à profissão

Aos amigos do Laboratório de Nanorradiofármacos e Novos Radiofármacos, pela ajuda durante o caminho. Em especial, os mestrandos Suyene, Sarah e Filipe Portilho pela ajuda nos experimentos.

Às fontes financiadoras, FAPERJ e CNPq, pela verba para a compra de equipamentos e insumos para a realização do projeto de pesquisa.

Por fim agradeço imensamente a todos que me apoiaram neste trabalho, acreditaram na minha capacidade e me incentivaram a seguir em frente.

Os dias prósperos não vêm por acaso; nascem de muita fadiga e persistência.

Henry Ford

RESUMO

BRAGA, Thaís Ligiéro. *Nano-octreotida radiomarcada com tecnécio-99 metaestável como agente diagnóstico de tumor secretor de polipeptídeo pancreático (PPoma)*. 2019. 111f. Tese (Doutorado em Bioências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

O câncer de pâncreas está prestes a se tornar a segunda causa de morte por câncer no mundo. Dentre os seus tipos tumorais, tem-se o Tumor Secretor de Polipeptídeo Pancreático (PPoma). Tumor raro que apresenta alta taxa de malignidade (90%) ocorrendo preferencialmente metástase no fígado e de prognóstico ruim, com taxas de sobrevivência em 5 anos menores do que 10%. Isto se deve, principalmente pela demora no diagnóstico, que geralmente é feito de modo acidental ou pelo efeito de massa que causa uma dor abdominal inespecífica pela hepatomegalia ou sintomas sugestivos de obstrução do ducto pancreático ou biliar. O PPoma é classificado como um tumor neuroendócrino pancreático não funcional que superexpressa o SSTR 2 (Receptor de Somatostatina do subtipo 2). A Octreotida possui alta afinidade pelo SST 2, mas sua marcação com Tecnécio-99 metaestável (^{99m}Tc) pelo modo direto tem-se demonstrado com baixo rendimento. Com o advento da nanotecnologia, problemas no direcionamento para células tumorais na produção e na adesão do radiofármaco no órgão alvo têm sido superados. Assim o presente trabalho tem como objetivo principal a produção de um nanorradiofármaco com base de nanopartículas poliméricas de ácido polilático (PLA) carregado com Octreotida e radiomarcadas com ^{99m}Tc para obtenção de um agente diagnóstico do PPoma. A Octreotida foi encapsulada na forma de nanopartículas pelo método de dupla emulsificação utilizando o polímero PLA e o tensoativo álcool polivinílico (PVA) na concentração de 4% do fármaco. A caracterização das nanopartículas foi realizada pela técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM) e Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) e a eficiência da encapsulação pela análise indireta no espectrofotômetro a 279 nm para leitura da Octreotida. A avaliação da citotoxicidade realizada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) em várias concentrações do nanossistema frente a linha celular de carcinoma pancreático humano (MIA Paca-2) que expressa SSTR 2 mimetizando o PPoma. Pelo método direto fez-se a radiomarkação do nanossistema com ^{99m}Tc . Em seguida determinou o seu rendimento e estabilidade da radiomarkação até 24 horas pela cromatografia em papel, utilizando a fase estacionária papel de Whatman nº 1 e para a fase móvel a acetona. No estudo de biodistribuição foram utilizados camundongos machos de Balb/c induzidos pelo xenoinxerto de MIA Paca-2 divididos em dois grupos cada um com 6 animais para avaliar nanopartículas com e sem a Octreotida. Após duas horas da administração do nanorradiofármaco, os animais foram sacrificados e dissecados para contagem dos órgãos no contador gama. Os resultados mostraram que as nanopartículas eram de tamanho em torno de 189 nm, tanto pelo DLS quanto pelo AFM e com Índice de Polidispersão (PDI) de 0,097 corroborando o comportamento monodispersivo. A eficiência do encapsulamento da Octreotida foi de 60%. As nanopartículas foram radiomarcadas com sucesso e estáveis por 24 h com ^{99m}Tc , demonstrando uma excelente absorção pelo tumor induzido. O ensaio MTT corroborou a segurança do nanossistema para as células. Portanto, o uso de nanopartículas de PLA/PVA/Octreotida marcadas com ^{99m}Tc podem ser utilizadas como agente de imagem para o PPoma.

Palavras-chaves: PPoma. Octreotida. Nanorradiofármaco. Radiofarmácia. Agente de imagem.

ABSTRACT

BRAGA, Thaís Ligiéro. *Metastable technetium-99 Radiolabeled Nano-Octreotide as a diagnostic agent for pancreatic polypeptide-secreting tumor of the distal pancreas (PPoma)*. 2019. 111f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Pancreatic cancer is about to become a cause of cancer death in the world. Among its tumors, there is the Pancreatic Polypeptide-Secreting Tumor of the Distal Pancreas (PPoma). A rare tumor that belongs to the malignancy rate (90%), occurring mainly with bad breath and poor prognosis, with survival rates in 5 years of less than 10%. In the absence of diagnosis, this should be done in an intensive or accidental manner or with mass effect, which causes non-specific abdominal pain due to hepatomegaly or symptoms suggestive of obstruction of the pancreatic or biliary duct. PPoma is classified as a non-functional pancreatic neuroendocrine tumor that overexpresses SSTR 2 (Somatostatin Receptor of subtype 2). Octreotide has a high affinity for SSTR 2, but its labeling with Technetium-99 meta-stable (^{99m}Tc) by direct mode has been shown to be low yield. With the advent of nanotechnology, the problems in the targeting of tumor cells in the production and in the adhesion to the radiopharmaceutical are not favorable agents to those overcome. Thus the present work has as main objective the production of nanoradiopharmaceuticals based on polymeric nanoparticles of polylactic acid (PLA) loaded with Octreotide and radiolabeled with ^{99m}Tc to obtain a diagnostic agent of the PPoma. Octreotide was encapsulated in alcohol nanoparticles by the emulsion emulsion method using the PLA polymer and the poly(vinyl alcohol) surfactant (PVA) at 4% concentration of the drug. The characterization of the nanoparticles was performed using the technique of Atomic Force Microscopy (AFM) and Dynamic Light Scattering (DLS) and the efficiency of the encapsulation of the indirect analysis in the spectrophotometer at 279 nm for the reading of Octreotide. Evaluation of cytotoxicity by the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) at various concentrations of the nanosystem against a human pancreatic carcinoma cell line (MIA Paca-2) SSTR 2 by mimicking the PPoma and by direct method radiolabeled the nanosystem with ^{99m}Tc and then determined its yield and radiolabel stability up to 24 hours by paper chromatography using a Whatman n° 1 paper stationary phase and for a mobile acetone phase. The bioavailability study was used in males of Balb/c induced by the MIA Paca-2 xenograft divided into two groups each with 6 animals for the effect of nanoparticles with and without an Octreotide. The results were as nanoparticles of size around 189 nm, by size as well as by AFM and with Polydispersity Index (PDI) 0.097 corroborating the monodisperse behavior. The efficiency of the Octreotide encapsulation was 60%. As nanoparticles were successfully radiolabeled and stable for 24 hours with ^{99m}Tc , demonstrating an excellent induced tumor. The MTT assay corroborated a safety of the nanosystem for the cells. Therefore, the use of ^{99m}Tc -labeled PLA/PVA/Octreotide nanoparticles can be used as an image agent for PPoma.

Keywords: PPoma. Octreotide. Nanoradiopharmaceuticals. Radiopharmacy. Imaging agent.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Localização anatômica do pâncreas e dos tumores pancreáticos	22
Figura 2 –	Representação da Somatostatina 14 e 28.....	24
Tabela 1 –	Perfil de afinidade <i>in vitro</i> (concentração inibitória de 50% (IC ₅₀) em mmol/L ± erro padrão da média) para o receptor de somatostatina humana de vários análogos da somatostatina.....	26
Figura 3 –	Comparação estrutural da Somatostatina (A) e da Octreotida (B).....	27
Figura 4 –	Mecanismo de Ação da Octreotida.....	29
Figura 5 –	Comparação de diversas tecnologias de imagem molecular utilizadas na prática da clínica médica.....	32
Tabela 2 –	Alguns exemplos de fármacos utilizados na prática clínica que são entregues por nanopartículas poliméricas.....	37
Figura 6 –	Representação dos Tipos de Nanopartículas Poliméricas, Nanocápsulas e Nanoesferas.....	39
Figura 7 –	Estratégias de direcionamento das Nanopartículas pela sinalização passiva e ativa.....	42
Figura 8 –	Proposta do reconhecimento da Nanopartícula polimérica com Octreotida e radiomarcada com Tecnécio-99 metaestável pelo receptor de Somatostatina (SSTR 2).....	44
Figura 9 –	Mecanismos de captação de nanopartículas.....	45
Figura 10 –	Principais vias para estudos de Nanotoxicidade.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FU	5-fluorouracil
Aa	Aminoácidos
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i> _Comitê Conjunto Americano de Câncer
AFM	<i>Atomic Force Microscopy</i> _Microscopia de Força Atômica
AMPc	Adenosina 3',5'-Monofosfato cíclico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	Emulsão Água/Óleo
A/O/A	Emulsão Água/Óleo/Água
APUD	<i>Amine Precursor Uptake and Decarboxylation</i> _Absorção e Decarboxilação do Precursor Amínico
ATRP	Polimerização por Radicais de Transferência de Átomos
BC	<i>Before Christ</i> _Antes de Cristo
BHE	Barreira Hematoencefálica
CA 19.9	Antígeno Carboidrato
CEUA	Comitê de Ética para uso de Animais
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CNPQ	<i>National Scientific and Technological Research Council</i> _Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CT	<i>Computed Tomography</i> _Tomografia Computadorizada
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i> _Espalhamento Dinâmico da Luz
DMEM	<i>Dulbecco modified Eagle's Minimal Essential Medium</i> _Meio essencial de Eagle Modificado por Dulbecco
DTPA	<i>Diethylene Triamine Pentacetic Acid</i> _Ácido Dietileno Triamino Pentácético
DOTA	<i>1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid</i> _Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
DOTANOC	DOTA-1-NaI ₃ -Octreotida_1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético-1-Iodeto de Sódio_Octreotida
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> _Ácido Etilenodiamino Tetra-

	acético
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> _Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EE	<i>Entrapment Efficiency</i> _Eficiência de Encapsulação
ENETS	<i>European Society of Neuroendocrine Tumors</i> _Sociedade Europeia de Tumores Neuroendócrinos
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i> _Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentadas
EUA	Estados Unidos da América
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> _Soro Fetal Bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> _Administração de Alimentos e Medicamentos
G1	<i>Low-grade</i> _Baixo Grau
G2	<i>Intermediate grade</i> _Grau intermediário
G3	<i>High-grade</i> _Alto Grau
GEP	<i>Gastroenteropancreatic Carcinomas</i> _Carcinomas Gastroenteropancreáticos
GH	Hormônio do Crescimento
HEPES	<i>N-2 Hydroxyethyl Piperazine-N'-2 Sulfonic Acid Ethane</i> _N-2 Hidroxietil Piperazine - N'-2 Ácido Sulfônico Etano
HER-2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> _Receptor Epidérmico Humano2
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> _Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer
IC ₅₀	Valor da metade da concentração inibitória máxima
ICD-O	<i>International Classification of Diseases for Oncology</i> _Classificação Internacional de Doenças para Oncologia
IHC	<i>Immunohistochemical</i> _Imuno-histoquímica
IM	Intramuscular
¹¹¹ In-DTPA-Octreotida	Índio-111-Dietilenotriaminopentacético-Octreotida
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
¹¹¹ In-Octreotida	Índio-111-Octreotida
IPEN/CNEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/Comissão Nacional

	de EnergiaNuclear_ <i>Institute of Energy and Nuclear Research/National Nuclear Energy Commission</i>
IV	<i>Intravenous</i> _Intravenosa
LPD	<i>Laparoscopic Pancreatoduodenectomy</i> _Pancreatoduodenectomia laparoscópica
¹⁷⁷ Lu-octretide	Lutécio-177-Octreotida
MANEC	<i>Mixed Adenoneuroendocrine Carcinoma</i> _Carcinoma Adenoneuroendócrino Misto
MEEC	<i>Mixed Exocrine-Endocrine Carcinoma</i> _Carcinoma Exócrino-Endócrino Misto
MEN	<i>Multiple Endocrine Neoplasia</i> _ Neoplasia Endócrina Múltipla
MEN-1	<i>Multiple Endocrine Neoplasia Type 1</i> _Neoplasia Endócrina Múltipla do Tipo 1
MEN-2	<i>Multiple Endocrine Neoplasia Type 2</i> _Neoplasia Endócrina Múltipla do Tipo 2
MIA Paca-2	<i>Human Pancreatic Carcinoma Cel Lline</i> _Linha Celular de Carcinoma Pancreático Humano
MIPS	<i>Minimally Invasive Pancreatoduodenectomy</i> _Pancreatoduodenectomia Minimamente Invasiva
MPS	<i>Mononuclear Phagocytic System</i> _Sistema Fagocítico Mononuclear
MR	<i>Magnetic Resonance</i> _Resonância Magnética
MRI	<i>NuclearMagnetic Resonance Imaging</i> _Imagem de Ressonância Magnética Nuclear
MTT	brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-YL)-2,5-difeniltetrazólio
NET	<i>Neuroendocrine Tumors</i> _Tumores Neuroendócrinos
NPs	Nanopartículas
OCT	Octreotida
PACA	Polialquilcianoacrilato
PBCA	Acrilato de Polibutilciano
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PDI	<i>Polydispersity Index</i> _Índice de Polidispersão

PDEC	<i>Poorly differentiated endocrine carcinoma/small cell carcinoma_</i> Carcinoma endócrino pouco diferenciado/carcinoma de pequenas células
PEG	Polietilenoglicol
PET	<i>Positron Emission Tomography_Tomografia por Emissão de Pósitron</i>
PFS	<i>Progression-free survival_Sobrevida livre de progressão</i>
PGP 95	<i>Protein Gene Product 9.5_Produto Gene Proteico 9.5</i>
PLA	<i>Polylactic Acid_Ácido Poliláctico</i>
PLA-b-PEG	Polissorbato 80 revestido poli (ácido láctico) -b-poli (etilenoglicol)
PLGA	Poli(Ácido Láctico-co-Ácido Glicólico)
PMMA	Poli(Metil-Metacrilato)
PNC	<i>Pancreatic Neuroendocrine Carcinomas_Carcinoma Neuroendócrino Pancreático</i>
PNET	<i>Pancreatic Neuroendocrine Tumors_Tumores Neuroendócrinos Pancreáticos</i>
PP	<i>Pancreatic Polypeptide_Polipeptídeo Pancreático</i>
PPoma	<i>Pancreatic Polypeptide-Secreting Tumor of the Distal Pancreas_TumorSecretor de Polipeptídeo Pancreático</i>
PRRNT	<i>Peptide Receptor Radionuclide Therapy_Terapia com Radionuclídeos de Receptor Peptídico</i>
PTH	<i>Parathyroid Hormone_Hormônio da Paratireóide</i>
PVA	<i>Poly(Vinyl Alcohol)_Álcool Polivinílico</i>
QDs	<i>Quantum Dots</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute_Instituto Memorial Roswell Park</i>
SC	<i>Subcutaneous_Subcutâneo</i>
SD	<i>Standard Deviation_Desvio Padrão</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results_Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais</i>
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SPECT	<i>Single-photon Emission Computed Tomography_Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único</i>
SST	Somatostatina

SST-14	Somatostatina original
SST-28	Somatostatina ampliada de 28 aminoácidos
SST-28(1-12)	Fragmento contendo 12 aminoácidos iniciais da Somatostatina
SSTR	<i>Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor</i> _Receptor Celular denominados de Receptores de Somatostatina
SSTR 1	<i>Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor subtype 1</i> _Receptor Celular denominados de Receptores de Somatostatina do subtipo 1
SSTR 2	<i>Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor subtype 2</i> _Receptor Celular denominados de Receptores de Somatostatina do subtipo 2
SSTR 3	<i>Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor subtype 3</i> _Receptor Celular denominados de Receptores de Somatostatina do subtipo 3
SSTR 4	<i>Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor subtype 4</i> _Receptor Celular denominados de Receptores de Somatostatina do subtipo 4
SSTR 5	<i>Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor subtype 5</i> _Receptor Celular denominados de Receptores de Somatostatina do subtipo 5
TFP	<i>Time For Progression</i> _Tempo Para a Progressão
TLL	<i>Tumour-like lesions</i> _Tumor como lesões
TNM	<i>Tumor, Nodes, Metastasis</i> _Tumor, Nódulos, Metástase
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>
UK	<i>United Kingdom</i> _Reino Unido
US	<i>Ultrasonography</i> _Ultrassonografia
USA	<i>The United States of America</i> _Estados Unidos da América
UT	<i>Untreated cells</i> _Células não tratadas
VIP	<i>Vasoactive Intestinal Peptide</i> _Peptídeo Intestinal Vasoativo
VO	Via Oral
WDEC	<i>Well-differentiated endocrine carcinoma</i> _Carcinoma Endócrino bem diferenciado
WDET	<i>Well-differentiated endocrine tumour</i> _Tumor endócrino bem

	diferenciado
WHO	<i>World Health Organisation</i> _Organização Mundial de Saúde
W/O	<i>Water/Organic emulsion</i> _Emulsão Água/Óleo
W/O/W	<i>Water/Organic emulsion/Water</i> _Emulsão Água/Óleo/Água
⁹⁰ Y-Octreotide	Ítrio-90-Octreotida

LISTA DE SÍMBOLOS

Ag	Prata
Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Au	Ouro
Ca ²⁺	Cálcio
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
Cm	Centímetro
cm ³	Centímetro cúbico
CO ₂	<i>Carbon Dioxide</i> _Dióxido de Carbono
Cys	Cisteina
Da	Dalton
¹⁸ F	Flúor-18
⁶⁸ Ga	Gálio-68
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
g/L	Gramas por Litro
H	Hora
Hz	Hertz
¹²³ I	Iodo-123
¹¹¹ In	Índio-111
K ⁺	Potássio
keV	Quiloelétron-volt
kHz	Quilohertz
¹⁷⁷ Lu	Lutécio-177
Lys	Lisina
MBq	Megabecquerel
Met	Metionina
μCi	Microcurie
μg/mL	Micrograma/Mililitro

μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
Mg	Miligrama
mg/day	Miligrama/Dia
mg/mL	Miligrama/Mililitro
mg/month	Miligrama/Mês
mL	Mililitro
mm^2	Milimetro Quadrado
mmoL/L	Milimol/Litro
Min	Minuto
$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	Molibidênio-99/Tecnécio-99 mestaestável
NaI(Tl)	Iodeto de Sódio dotado com Tálcio
$\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$	Pertecnetato de Sódio
NaHCO_3	<i>Sodium Bicarbonate</i> _Bicarbonato de Sódio
Nm	Nanômetro
ng/mL	Nanograma/Mililitro
N/m	Newton por Metro
n°	Número
pg/mL	Picograma/Mililitro
Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Rpm	Rotações por Minuto
Ser	Serina
SnCl_2	<i>Stannous Chloride</i> _Cloreto Estanoso
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Technetium-99 metastable_Tecnécio-99 metaestável
Thr	Treonina
Trp	Triptofano
Try^3	<i>Tyrosine at position 3</i> _Tirosina na posição 3
U/mL	Unidades por Mililitro
^{90}Y	Ítrio-90
W	Watts
w/v	<i>Water/volume</i> _Água por volume

3D	Três Dimensões
3p25	<i>Von Hippel Lindau gene</i> _gene Von Hippel Lindau
11q13	<i>long arm of chromosome 11</i> _braço longo do cromossomo 11
A	Alfa
Γ	Gama
Λ	Lambda
%	Porcentagem
Σ	Somatório
±	Mais ou menos
<	Menor que
>	Maior que
°C	Grau Celsius
°	Grau
ID/organ	<i>Dose per Organ</i> _Dose por Órgão
®	Produto registrado

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	19
1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.1	Tumor Secretor de Polipeptídeo Pancreático <i>Pancreatic Polypeptide-Secreting Tumor of the Distal Pancreas (PPoma)</i>	21
1.2	Somatostatina	24
1.3	Octreotida	27
1.3.1	<u>Farmacodinâmica e Farmacocinética da Octreotida</u>	27
1.4	Radiofármacos	30
1.5	Métodos de Diagnósticos do PPoma	31
1.6	Nanotecnologia	33
1.6.1	<u>Tipos de Nanopartículas</u>	35
1.6.2	<u>Nanopartículas Poliméricas</u>	36
1.6.3	<u>Mecanismos de Captação das Nanopartículas</u>	42
1.6.4	<u>Nanotoxicologia</u>	46
2	OBJETIVOS	50
2.1	Objetivo geral	50
2.2	Objetivos específicos	50
3	ARTIGO CIENTÍFICO 1 - PPoma Review: Epidemiology, Aetiopathogenesis, Prognosis and Treatment (Artigo científico publicado)	51
4	ARTIGO CIENTÍFICO 2 - Octreotide Nanoparticles showed affinity for <i>in vivo</i> MIA Paca-2 Inducted Pancreas Ductal Adenocarcinoma mimicking Pancreatic Polypeptide-secreting Tumor of the Distal Pancreas (PPoma) (Artigo científico aguardando aprovação)	71
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
	REFERÊNCIAS	94
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética para uso de Animais (CEUA)	104
	ANEXO B - Produção de Nanopartículas Poliméricas pelo Método de Dupla Emulsificação	105

ANEXO C - Diagrama do Estudo de Biodistribuição no modelo animal induzido.....	110
ANEXO D - Comprovação de submissão do 2 ^o artigo científico.....	111

INTRODUÇÃO

O Tumor Secretor de Polipeptídeo Pancreático, do inglês, *Pancreatic Polypeptide-Secreting Tumor of the Distal Pancreas* (PPoma) é classificado como um tipo de neoplasia pancreática endócrina responsável por acometer o lado direito do órgão (a cabeça) onde encontra-se 90% das células PP que produzem o hormônio, polipeptídeo pancreático (PP), secretado por este tipo tumoral (BRERETON et al., 2015; VINIK; FELIBERTI; PERRY, 2017; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; INCA, 2019). Embora tenha os níveis aumentados deste hormônio, não gera síndrome metabólica, uma vez que este hormônio é biologicamente inativo, sendo considerado um tumor clinicamente silencioso, classificado como um tipo de tumor neuroendócrino, do inglês, *Neuroendocrine Tumors* (NET) não funcional, com incidência próxima a 1% sendo, portanto, raro e agressivo (JENSEN, 2008; ALEXAKIS & NEOPTOLEMOS, 2008; SANTOS, 2011; PRRNT, 2013; MAXWELL, O'DORISIO & HOWE, 2016). Na maioria das vezes é diagnosticado acidentalmente ou devido a sintomas inespecíficos. Todo esse cenário, resulta no grande desafio para um diagnóstico precoce do PPoma, acarretando um tratamento curativo restrito, e uma alta taxa de metástase hepática (90%), ocasionando uma baixa taxa de sobrevida relativa de 5 anos, com queda acentuada desse tempo nos casos metastáticos (MULLAN et al., 2001; SANTOS, 2011; PRRNT, 2013; MAXWELL; O'DORISIO; HOWE, 2016; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; VINIK; FELIBERTI; PERRY, 2017).

Dentre os medicamentos mais sensíveis e específicos ao tratamento do câncer, encontram-se o Radiofármaco que é definido como “medicamento com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando pronto para o uso, contém um ou mais radionuclídeos” (ANVISA, RDC N° 38/2008). A nanotecnologia vem sendo aplicada ao campo da radiofarmácia, objetivando o desenvolvimento de micro e/ou nanopartículas, com o objetivo de melhorar a biodisponibilidade do radiofármaco, permitir maior eficiência no direcionamento nas diversas formas farmacêuticas e facilitar a incorporação do fármaco na formulação, consequentemente melhorando os resultados do diagnóstico e/ou terapia (WANG et al., 2015; SARCINELLI et al., 2016; ODA et al., 2017; PORTILHO et al., 2018). Assim com o advento do desenvolvimento de radiofármacos em escala nanométrica, chamados nanorradiofármacos, propicia-se um novo paradigma tanto para a Medicina Nuclear quanto para a Radiofarmácia e desponta como alternativa viável ao tratamento e diagnóstico de tumores (TING et al., 2010; ODA et al., 2017; SANTOS-OLIVEIRA; STABIN, 2018).

Frente a todo esse cenário do PPoma, cujos os métodos convencionais não apresentam resolutividade, nem sensibilidade para a detecção da doença em estágios muito iniciais (PRRNT, 2013; BRERETON et al., 2015; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Mister se faz o desenvolvimento de uma tecnologia específica, sensível e confiável que permita a realização do diagnóstico precoce e preciso, lançando-se ao uso da nanotecnologia (OLIVEIRA et al., 2012; ALBERNAZ et al., 2014; GHOREISHI et al., 2018; PINTO et al., 2018). Assim, se justifica a pesquisa e desenvolvimento de nanorradiofármacos a base de análogos da Somatostatina (Octreotida) para a detecção precoce do câncer de pâncreas.

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Tumor Secretor de Polipeptídeo Pancreático *Pancreatic Polypeptide-Secreting Tumor of the Distal Pancreas (PPoma)*

O câncer de pâncreas congrega-se muito próximo a segunda principal causa de morte relacionada ao câncer e o seu prognóstico ruim se mantém praticamente inalterado, apresentando uma das menores taxa de sobrevida relativa de 5 anos que é de apenas 6%. Atualmente, a prevenção ou diagnóstico precoce em um estágio curável é extremamente difícil. A ressecção cirúrgica com quimioterapia sistêmica adjuvante, correspondendo apenas 10 a 20% dos casos, atualmente, fornece a única chance de sobrevida em longo prazo demonstrando um aumento na taxa de sobrevida relativa de 5 anos para 30 a 40% (RAHIB et al., 2014; STROBEL et al., 2018; COLLISSON et al. 2019; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019).

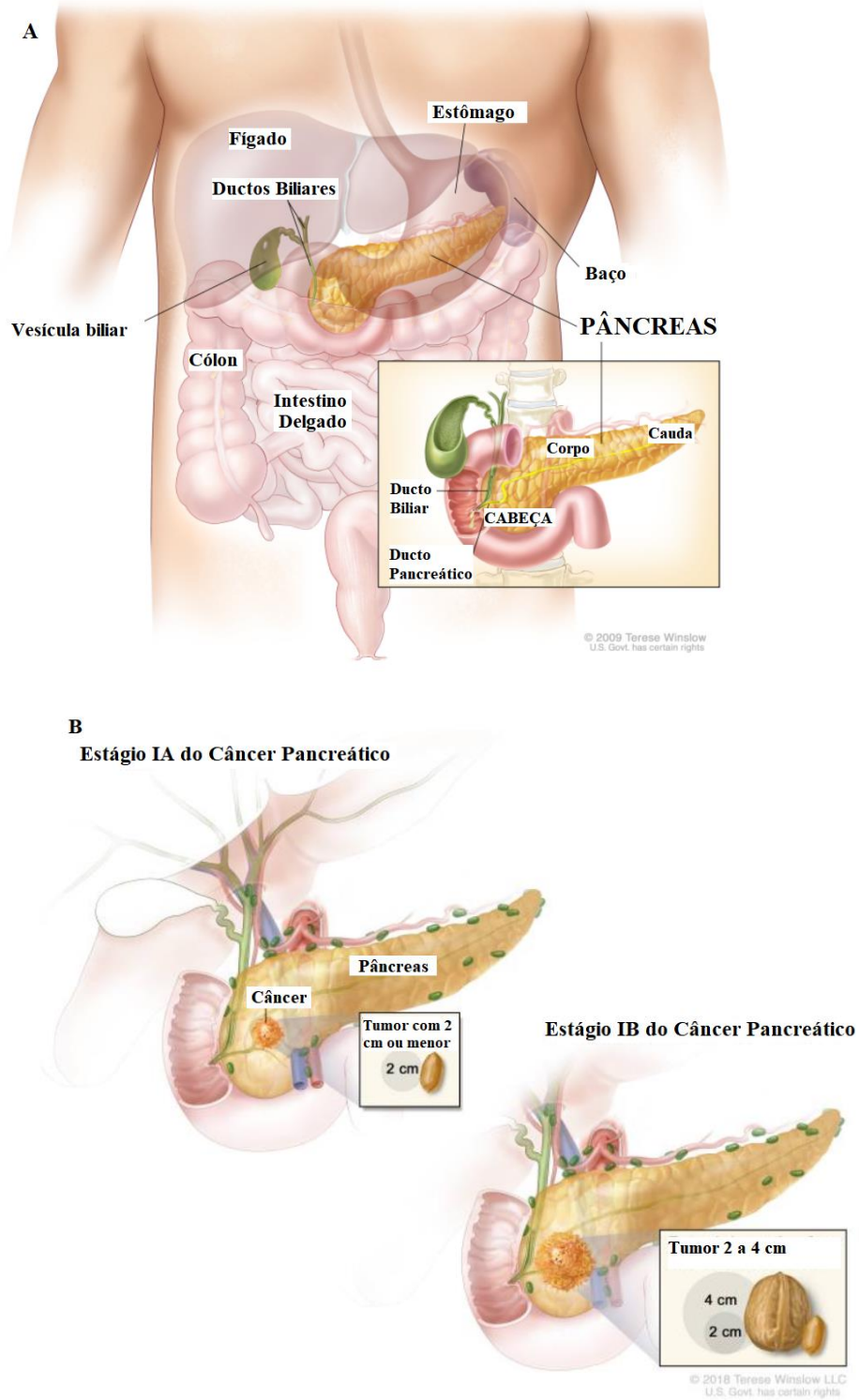
As neoplasias pancreáticas são classificadas de acordo com a fisiologia em dois grandes grupos: câncer de pâncreas exócrino (aproximadamente 94%), representado, principalmente, pelo adenocarcinoma, e câncer endócrino (aproximadamente 6%), sendo tumores neuroendócrinos (NET) os maiores representantes (ILIC, M.; ILIC, I., 2016; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). Dentre os NETs há uma divisão em relação à geração ou não de uma síndrome metabólica causada principalmente pelo excesso do hormônio secretado em cada tipo tumoral, assim, são classificados em NET funcionais (40-50%) pela presença da síndrome metabólica e NET não funcionais (50-60%) pela ausência da síndrome (PRRNT, 2013; ALURI; DILLON, 2017).

Os NETs são encontrados em vários órgãos, por isto recebem o nome de Tumores Neuroendócrinos Pancreáticos, do inglês, *Pancreatic Neuroendocrine Tumors* (PNET) que representam em torno de 4 a 7% dos NET gastroenteropancreáticos e 1 a 2% das neoplasias pancreáticas (HAUGVIK et al., 2015). Os PNETs não funcionantes correspondem a 68-90% dos casos (MAXWELL; O'DORISIO; HOWE, 2016).

Dentre os NETs, Tumor Secretor de Polipeptídeo Pancreático (PPoma) acomete a cabeça do pâncreas (Figura 1) onde se encontram 90% das células PP que liberam o hormônio PP, estando o mesmo elevado neste tipo tumoral. Contudo, não leva a síndrome metabólica,

sendo classificado dessa forma como um tumor neuroendócrino não funcional (PRRNT, 2013; MAXWELL; O'DORISIO; HOWE, 2016).

Figura 1 – Localização anatômica do pâncreas e dos tumores pancreáticos.



Legenda: A – Localização anatômica e partes do Pâncreas; B – Estágios do câncer pancreático. No estágio IA, o tumor é de 2 cm ou menor. No estágio IB, o tumor é maior que 2cm, mas não maior que 4 cm de diâmetro.

Fonte: Pancreatic Cancer Treatment (PDQ[®]), 2019.

A incidência do PPoma é menor que 1% dentre todos os NET não funcionais, sendo considerado um tumor raro e mais prevalente em indivíduos entre a 5ª e 6ª década de vida. Os únicos efeitos fisiológicos da alta liberação do hormônio PP são a inibição da contração da vesícula biliar e a secreção enzimática pancreática, alterações sutis e que fazem com que esse tumor seja classificado como clinicamente silencioso. Por isto, geralmente são diagnosticados acidentalmente (por exemplo, por endoscopia) ou devido a sintomas inespecíficos tais como: hepatomegalia, obstrução do ducto pancreático ou icterícia. Cabe lembrar, contudo que o PPoma está ainda, relacionado a apresentação clínica da Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 1, do inglês, *Multiple Endocrine Neoplasia Type 1* (MEN-1), caracterizada geneticamente como uma hiperplasia ou neoplasia em duas ou mais glândulas endócrinas de uma mesmo paciente. Apesar de ser uma síndrome rara, a MEN-1 está associada ao PPoma em entre 18 a 44% (MULLAN et al., 2001; KUO et al., 2008; PRRNT, 2013; MAXWELL; O'DORISIO; HOWE, 2016; VINIK; FELIBERTI; PERRY, 2017). Devido a essa demora no diagnóstico e de sua natureza altamente vascular, o PPoma mesmo tendo uma crescimento lento, quando consegue ser diagnosticado possui tamanho grande (> 4 cm) (Figura 1) e em torno de 90% dos casos, já apresenta metástase hepática (MULLAN et al., 2001; METZ, JENSEN, 2008; MAXWELL; O'DORISIO; HOWE, 2016; VINIK; FELIBERTI; PERRY, 2017).

Um ponto importante é a diferenciação entre um NET pancreático não funcional, como o PPoma, e um adenocarcinoma do pâncreas, uma vez que a diferença entre esses dois tipos de tumores são sutis, o que torna, muitas vezes, difícil sua distinção. Em especial pelo fato de ambos expressarem receptores de somatostatina do subtipo 2, do inglês, *Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor subtype 2* (SSTR 2) (JENSEN, 2008; HALFDANARSON et al., 2008; DAVIES; CONLON, 2009; PRRNT, 2013; MAXWELL; O'DORISIO; HOWE, 2016; VINIK; FELIBERTI; PERRY, 2017).

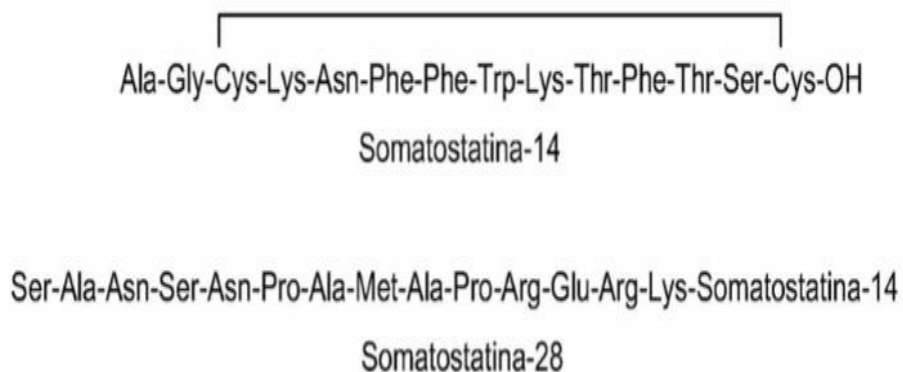
Os principais fatores de risco relacionados com PPoma são: alto consumo de gordura saturada; malignidade - comprometimento associado no metabolismo da glicose; disfunção tireoidiana; consumo de álcool; tabagismo; condições médicas, como diabetes mellitus e fatores ambientais, como a radiação. Sabe-se que risco para desenvolver o câncer pancreático é de 1 em 67 (YAO; HOFF. P; HOFF A., 2011; SIEGEL et al., 2015; VINIK; FELIBERTI; PERRY, 2017; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

1.2 Somatostatina

Krulich e colaboradores (1968) fazendo experimentos de pesquisa sobre fatores hipotalâmicos descobriram somatostatina (SST), sendo mais tarde identificada nas células delta das ilhotas de Langerhans e em células semelhantes do trato gastrointestinal e sistema nervoso central.

A SST é um hormônio composto por um peptídeo cíclico contendo 14 aminoácidos que pertence a um grupo de peptídeos que incluem a somatostatina original (SST-14), uma molécula ampliada de 28 aminoácidos (SST-28) e um fragmento contendo 12 aminoácidos iniciais da somatostatina 28 [SST-28(1-12)] (Figura 2). A SST é considerada um peptídeo multifuncional, sintetizada pelo hipotálamo, em tecidos periféricos (hipófise, pâncreas) e trato gastrointestinal. No pâncreas é secretada pelas células D (delta) das ilhotas de Langerhans (SUN; COY, 2015; MARTÍN-GAGO et al., 2016; RORSMAN; HUISING, 2018).

Figura 2 – Representação da Somatostatina 14 e 28



Legenda: Ala: Alanina; Arg: Arginina; Asn: Asparagina; Cys: Cisteína; Glu: Glutamato; Gly: Glicina; Lys: Lisina; Met: Metionina; Phe: Fenilalanina; Pro: Prolina; Ser: Serina; Thr: Treonina; Trp: Triptofano.
Fonte: MELO, 2008.

A SST é sintetizada com um pró-hormônio precursor (96 aminoácidos) e processada por clivagem proteolítica para dar origem a duas formas predominantes: SST-14 e a SST-18, sendo encontradas no plasma, > 90% e 5-10%, respectivamente. Tem um tempo de meia-vida biológica curto, de um a três minutos. Atua como neurotransmissor no sistema nervoso central e como hormônio em outros sítios, tendo a função de inibição da liberação de diversos hormônios como os pancreáticos e do hormônio do crescimento. Assim é classificada como um amplo neuropeptídeo inibitório (RAI et al., 2015; SUN; COY, 2015; MARTÍN-GAGO et

al., 2016; BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018; RORSMAN; HUISING, 2018).

Os aminoácidos da SST formam o hormônio tetradecapeptídeo cíclico endógeno que se ligam ao receptor celular de somatostatina, do inglês, *Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor* (SSTR), acoplado à proteína G inibitória de modo a inibir o acúmulo de AMPc (Adenosina 3',5'-Monofosfato cíclico) e ativam os canais de K⁺ (potássio) bem como as fosfatase da fosfotirosina estando presente tanto nas células normais quanto nas tumorais. A superexpressão de receptores de somatostatina em células tumorais é 100 vezes maior do que em células normais, principalmente de origem neuroendócrina como carcinóides, tumor de célula da ilha pancreática (onde se encontra o PPoma), carcinoma pulmonar de células pequenas e alguns carcinomas de tireóide. Foram isolados, clonados e sequenciados 5 subtipos de SSTR, tendo-se observado que cada tipo tumoral tem a expressão de um ou mais dos tipos de SSTR. No caso do PPoma tem-se a expressão do subtipo 2 do SSTR (KWEKKEBOOM et al., 2010; PRRNT, 2013; RAI et al., 2015; SUN; COY, 2015; ABDELLATIF et al., 2018; BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018; ŁUKOMSKA et al., 2018; WILLIAMS et al., 2019).

Os usos terapêuticos da SST *in natura* incluem bloqueio da liberação hormonal em tumores pancreáticos endócrinos secretores, carcinóides e adenomas secretores do hormônio do crescimento. Contudo, ela apresenta diversas desvantagens como: meia-vida biológica muito curta (1 a 3 minutos) e espectro inespecífico de atuação (RAI et al., 2015; RORSMAN; HUISING, 2018). Tais fatos impulsionaram o desenvolvimento de análogos de somatostatina tanto para diagnóstico como para terapia, levando a criação de agonistas seletivos de longa duração dos receptores de SST. A maioria dos análogos de somatostatina liga-se fortemente a dois dos cinco subtipos de receptores, embora recentemente tenha sido introduzido um agonista de maior afinidade. Na Tabela 1, apresenta os principais análogos de SST usado na prática clínica da Medicina Nuclear podendo ser para diagnóstico através da obtenção de imagens de Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único, do inglês, *Single-Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) e Tomografia por Emissão de Póstron, do inglês, *Positron Emission Tomography* (PET) ou para Terapia com Radionuclídeos de Receptor Peptídico, do inglês, PRRNT, *Peptide Receptor Radionuclide Therapy* (PRRNT) (Tabela 1) (KWEKKEBOOM et al., 2010; SUN; COY, 2015; ABDELLATIF et al., 2018; BEHLING et al., 2018; ŁUKOMSKA et al., 2018; PAUWELS et al., 2018; RAMAGE; NARAEV; HALFDANARSON, 2018; WILLIAMS et al., 2019).

Tabela 1 – Perfil de afinidade *in vitro* (concentração inibitória de 50% (IC₅₀) em mmol/L ± erro padrão da média) para o receptor de somatostatina humana de vários análogos da somatostatina

Peptídeo	SSTR 1	SSTR 2	SSTR 3	SSTR 4	SSTR 5
Somatostatina-28	5,2±0,3	2,7±0,3	7,7±0,9	5,6±0,4	4±0,3
Análogos da Somatostatina					
Octreotida	> 10 000	2±0,7	187±55	> 1 000	22±6
DTPA-Octreotida	> 10 000	12±2	376±84	> 1 000	299±50
DOTA-[Try ³]Octreotida	> 10 000	14±2,6	880±324	> 1 000	393±84
DOTA-[Try ³]Octreotato	> 10 000	1,5±0,4	> 1 000	453±176	547±160
DOTA-Lanreotide	> 10 000	26±3,4	771±229	> 10 000	73±12
Imagem SPECT					
¹¹¹ In-DTPA-Octreotida	> 10 000	22±3,6	182±13	> 1 000	237±52
Imagem PET					
⁶⁸ Ga-DOTA-[Try ³]Octreotato	> 10 000	0,2±0,04	> 1 000	300±140	377±18
⁶⁸ Ga-DOTA-[Try ³]Octreotida	> 10 000	2,5±0,5	613±140	> 1 000	73±12
⁶⁸ Ga-DOTANOC	> 10 000	1,9±0,4	40±5,8	260±74	7,2±1,6
PRRNT					
⁹⁰ Y-DOTA-[Try ³]Octreotida	> 10 000	11±1,7	389±135	> 10 000	114±29
⁹⁰ Y-DOTA-[Try ³]Octreotato	> 10 000	1,6±0,4	> 1 000	523±239	187±50
⁹⁰ Y-DOTA-Lanreotida	> 10 000	23±5	290±105	> 10 000	16±3,4
¹⁷⁷ Lu-DOTA-[Try ³]Octreotato	> 1 000	2,0±0,8	162±16	> 1 000	> 1 000

Legenda: DTPA: *Diethylene Triamine Pentacetic Acid*_Ácido Dietileno Triamino Pentácetico; DOTA: *1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-Tetraacetic Acid*_Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético; DOTANOC: DOTA-1-NaI₃-Octreotida; SPECT: *Single-Photon Emission Computed Tomography*_Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único; ⁶⁸Ga: Gálio-68; ¹¹¹In: Índio-111; ¹⁷⁷Lu: Lutécio-177; PET: *Positron Emission Tomography*_Tomografia por Emissão de Pósitron; PRRNT: *Peptide Receptor Radionuclide Therapy*_Terapia com Radionuclídeos de Receptor Peptídico; SSTR 1: *Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor subtype 1*_Receptor Celular denominados de Receptores de Somatostatina do subtipo 1; SSTR 2: *Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor subtype 2*_Receptor Celular denominados de Receptores de Somatostatina do subtipo 2; SSTR 3: *Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor subtype 3*_Receptor Celular denominados de Receptores de Somatostatina do subtipo 3; SSTR 4: *Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor subtype 4*_Receptor Celular denominados de Receptores de Somatostatina do subtipo 4; SSTR 5: *Cellular Receptors Termed Somatostatin Receptor subtype 5*_Receptor Celular denominados de Receptores de Somatostatina do subtipo 5; Try³: Tyrosine at position 3_Tirosina na posição 3; ⁹⁰Y: Ítrio-90.

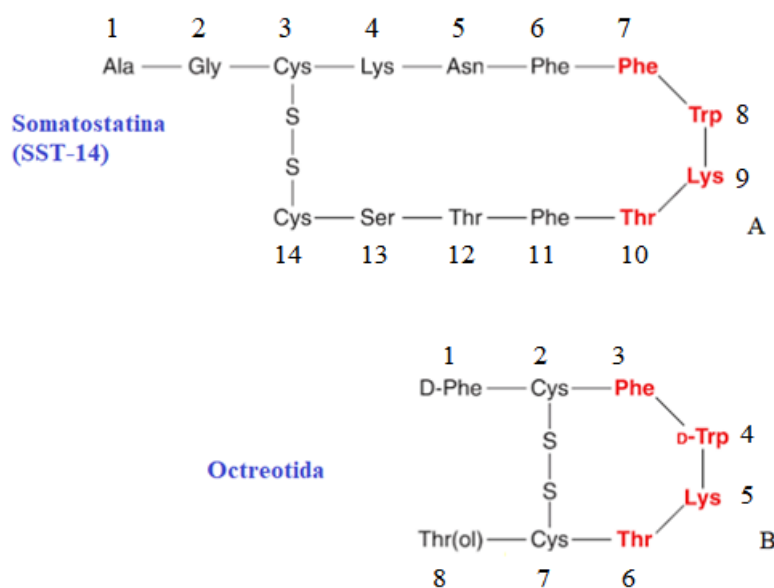
Nota: Todos os valores são metade da concentração inibitória máxima (IC₅₀).

Fonte: Adaptação de KWEKKEBOOM et al., 2010, PAUWELS et al., 2018 e RAMAGE; NARAEV; HALFDANARSON, 2018.

1.3 Octreotida

A octreotida (OCT) é um análogo sintético da somatostatina que possui alta afinidade pelos receptores de somatostatina, principalmente os subtipos 2 e 5, que podem ser encontrados no cérebro, hipófise, pâncreas e vasos sanguíneos. A OCT tem uma afinidade relativamente maior pelo subtipo 2 (expresso no PPoma) do que a SST (Tabela 1). Outro aspecto importante é que a OCT tem maior utilidade clínica, pois é mais potente e possui uma meia-vida biológica mais longa (90 a 120 minutos) do que a somatostatina. Na figura 3 demonstra-se a semelhança estrutural desses peptídeos (KWEKKEBOOM et al., 2010; PRRNT, 2013; MARTÍN-GAGO et al., 2016; YAU et al., 2017; PAUWELS et al., 2018; WILLIAMS et al., 2019; ZHU et al., 2019).

Figura 3 – Comparação estrutural da Somatostatina (A) e da Octreotida (B)



Legenda: Ala: Alanina; Asn: Asparagina; Cys: Cisteína; Gly: Glicina; Lys: Lisina; Phe: Fenilalanina; Ser: Serina; Thr: Treonina; Trp: Triptofano.

Fonte: Adaptação de BRUNTON LL; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018.

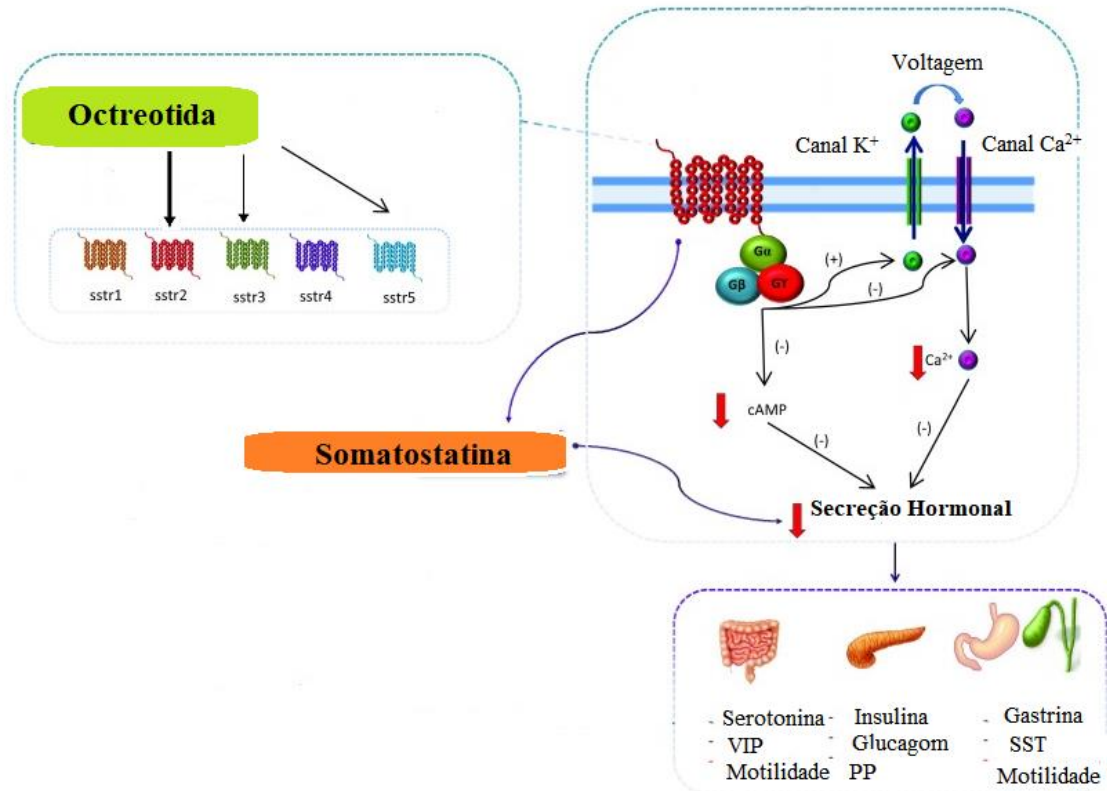
1.3.1 Farmacodinâmica e Farmacocinética da Octreotida

Em 1988 a Octreotida (Sandostatin[®]) teve a sua primeira aprovação no FDA (*Food and Drug Administration*) para tumores carcinóides e tumores secretores de

peptídeo vasoativo intestinal. Atualmente há várias outras indicações aprovadas. Entretanto, na listagem ainda não se encontra o PPoma (FDA, 2019). O mesmo se observa no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aprovou o uso da Octreotida (Sandostatin[®]) em 1995 e até hoje tem várias indicações, mas não para o PPoma (ANVISA, 2019).

A OCT inibe a secreção patologicamente aumentada do hormônio do crescimento (GH), de diversos peptídeos endógenos (peptídeos vasoativos intestinais, gastrina, motilina, insulina, glucagon, secretina e polipeptídeos pancreáticos) e da serotonina produzidas dentro do sistema endócrino gastroenteropancreático. Sua ação se deve pela inibição, principalmente, do SSTR 2, consequentemente inibição de diversos hormônios, como os pancreáticos, dentre eles o PP. A cascata de eventos se dá pela inibição da sinalização da quinase c-Jun N-terminal, ou seja, ligação ao receptor acoplado à proteína G inibitória de modo a inibir o acúmulo de AMPc e ativam os canais de K⁺ (potássio) com consequente bloqueio dos canais de cálcio (Ca²⁺) voltagem-dependente do tipo L e do tipo N. Com a inibição da abertura do canal de Ca²⁺, impossibilita a entrada de cálcio no meio intracelular, consequentemente impede a liberação de neurotransmissores e/ou hormônios (Figura 4) (BODMER et al., 2016; NORVATIS, 2017; RAMAGE; NARAEV; HALFDANARSON, 2018; HERRERA-MARTÍNEZ et al., 2019; ZHU et al., 2019; WILLIAMS et al., 2019).

Figura 4 – Mecanismo de Ação da Octreotida



Legenda: AMPc: Adenosina 3',5'-Monofosfato cíclico; Ca²⁺: Cálcio; K⁺: Potássio; PP: Polipeptídeo Pancreático; SST: Somatostatina; VIP: Peptídeo Intestinal Vasoativo.

Fonte: Adaptação de HERRERA-MARTÍNEZ et al., 2019.

A OCT pode ser administrada por via subcutânea apresentando uma biodisponibilidade plasmática máxima em 2 horas, sendo o efeito supressor persistente por um período de até doze horas. Também pode ser administrada por via intravenosa (na forma de *bolus*) tendo biodisponibilidade plasmática máxima em 1 hora após a administração (NORVATIS, 2017; BRUNTON; HILAL-DANDAN; KNOLLMANN, 2018; PARAGLIOLA, SALVATORI, 2018).

O uso da Octreotida radiomarcada para fins diagnósticos em Medicina Nuclear é datada de muitos anos. A OCT pode ser radiomarcada com Tecnécio-99 metaestável (^{99m}Tc) e Índio-111 (¹¹¹In) para imagens de Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único, do inglês, *Single-Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) ou com Gálio-68 (⁶⁸Ga) para imagens de Tomografia por Emissão de Pósitron, do inglês, *Positron Emission Tomography* (PET), principalmente para detecção dos tumores neuroendócrinos, onde se encaixa o PPoma. Contudo, até o presente momento, não há estudos desses radiofármacos para

o diagnóstico específico e diferencial do PPoma (PRRNT, 2013; OVALLES; VERA; OLIVIERIA, 2014; SUN; COY, 2015; PAUWELS et al., 2018; ZHU et al., 2019).

1.4 Radiofármaco

Historicamente, os radiofármacos começaram a ser utilizados em 1905, após a descoberta da radioatividade, em 1895, por Henri Becquerel e Wilhelm Conrad Röntgen. Em 1886 Henry Becquerel descreveu o fenômeno da radioatividade do urânio, e em 1898, Marie e Pierre Curie descobriram o Rádio e Polônio. Em 1903, o Prêmio Nobel de Física foi concedido em conjunto a Henry Becquerel e Marie e Pierre Curie pela descoberta da radioatividade. Maria Skłodowska Curie recebeu o Prêmio Nobel de Química de 1911 por sua descoberta de Rádio e Polônio (KUŁAKOWSKI, 2011; SNMMI, 2019).

Radiofarmácia é uma especialidade farmacêutica, sendo uma sessão dentro da área de Medicina Nuclear encarregada da pesquisa, produção, distribuição e dispensação de espécies químicas contendo material radioativo, usualmente denominado Radiofármaco (HIRONAKA et al., 2012). A ANVISA definiu em 2008 Radiofármaco como “medicamento com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando pronto para o uso, contém um ou mais radionuclídeos” (ANVISA, RDC Nº 38/2008).

Os radiofármacos são, em geral, administrados por via intravenosa (IV), aguardando-se a concentração no tecido-alvo antes de adquirir as imagens. As imagens obtidas na câmara de cintilação refletem a distribuição do radiofármaco no paciente e podem ser planas ou tomográficas (SPECT – tomografia por emissão de fóton único). No caso de radiofármacos emissores de pósitrons, as imagens sempre são tomográficas (PET – tomografia por emissão de pósitrons) (GUTFILEN; VALENTINI, 2014; SAHA, 2018).

Devido às propriedades físicas ideais do Tecnécio-99 metaestável (^{99m}Tc), tais com baixo custo de produção, fácil disponibilidade através do gerador de Molibidênio-99/Tecnécio-99 metaestável ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$), emissão de gama puro com energia de 140 keV e meia-vida física de 6 hora, sendo ideal para formação de imagens SPECT, número de oxidação variável possibilitando a marcação com vários fármacos, torna o ^{99m}Tc o radionuclídeo de maior aplicação clínica na Medicina Nuclear, correspondendo a mais de 90% dos procedimentos atuais. Por isto, pesquisas com este radionuclídeo são justificadas

com forte indício de aplicação clínica futura (SAGER et al., 2013; MIKOŁAJCZAK; MAECKE, 2016; PAUWELS et al., 2018; SAHA, 2018).

1.5 Métodos de Diagnósticos do PPoma

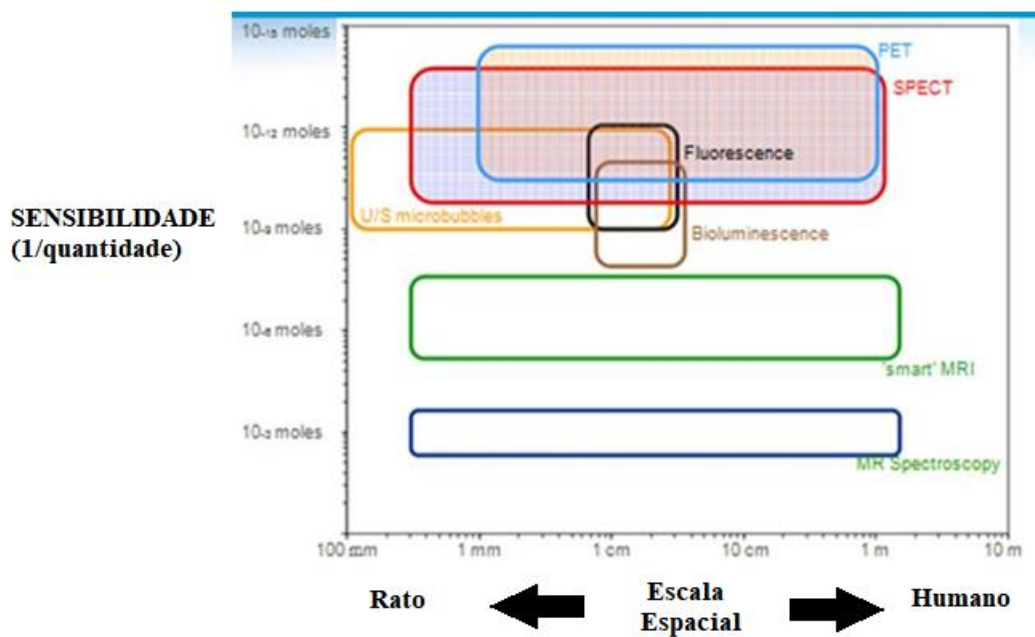
Segundo o protocolo de investigação do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) (2019), não existe sinal ou sintoma cuja presença seja sinônimo do diagnóstico de qualquer tipo de câncer de pâncreas. Recomenda-se, exames de imagem, como ultrassonografia (convencional ou endoscópica), tomografia computadorizada, e ressonância magnética no processo diagnóstico. Além deles, os exames de sangue, incluindo a dosagem do Antígeno Carboidrato CA 19.9, podem auxiliar no raciocínio diagnóstico. O laudo histopatológico, obtido após biópsia de material ou da peça cirúrgica define o diagnóstico da neoplasia (INCA, 2019). No entanto, devido à sua sensibilidade e especificidade relativamente baixas (70-90% e 68-91%, respectivamente), o CA 19.9 não é um biomarcador ideal para o rastreio e a detecção precoce de câncer de pâncreas e a sua principal aplicação clínica é no monitoramento da terapia e/ou progressão da doença (ZHOU et al., 2017).

As técnicas não invasivas de diagnóstico por imagem, como a tomografia computadorizada e a ressonância magnética, são utilizadas para obter imagens das alterações morfológicas e anatômicas, normalmente, associadas a alguma patologia. No entanto, essas técnicas são pouco específicas e sensíveis para o diagnóstico precoce de vários tipos de câncer ou para a detecção de pequenos neoplasmas (menores que 1 cm) (BOENO; NABINGER; SCHMITT, 2014). Dentre as técnicas de imagens utilizadas em Medicina Nuclear, tem-se: a Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único, do inglês, *Single-Photon Emission Computed Tomography* (SPECT) e Tomografia por Emissão de Póstron, do inglês, *Positron Emission Tomography* (PET), as quais possibilitam a avaliação de parâmetros funcionais e metabólicos *in vivo*, de forma não invasiva, mediante administração dos radiofármacos que podem ser gama emissores para SPECT, principalmente, Tecnécio-99 metaestável (^{99m}Tc) e Iodo-123 (^{123}I) ou emissores de póstron, sendo os principais, Flúor-18 (^{18}F) e Gálio-68 (^{68}Ga). As informações fornecidas podem auxiliar no raciocínio clínico em várias situações nas quais os métodos de imagem anatômicos são limitados (por exemplo, infiltração de pequenos linfonodos ou pesquisa de tumor residual após tratamento). Além disso, as doses absorvidas pelos pacientes são relativamente menores, sendo uma técnica mais

segura tanto para adulto quanto para crianças (BOENO; NABINGER; SCHMITT, 2014; BIASSONI; EASTY, 2017; FAHEY et al., 2017; YORDANOVA et al., 2017).

Os métodos diagnósticos que utilizam radiofármacos apresentam uma sensibilidade de detecção na escala de 10^{-15} moles (Figura 5). Isto quer dizer, de maneira geral, que com uma quantidade muito pequena de um radiofármaco, 10^{-15} moles, já consegue obter uma imagem precisa, ou seja, apresenta alta especificidade. Outro ponto importante é o seu escalonamento espacial, por ser um método altamente específico a possibilidade de translacionamento é a maior de todas as técnicas disponíveis. Isto é essencial, porque o ato de translacionar, agiliza a transferência de resultados da pesquisa básica para pesquisas clínicas, a fim de produzir benefícios para a comunidade como um todo (DEBBAGE; JASCHKE, 2008; CHAKRAVARTY; HONG; CAI, 2014; SANTOS-OLIVEIRA, 2016; CHAKRAVARTY et al., 2017; GOEL et al., 2017).

Figura 5 – Comparação de diversas tecnologias de imagem molecular utilizadas na prática da clínica médica



Legenda: MR: *Magnetic Resonance*_Resonância Magnética; MRI: *Magnetic Resonance Imaging*_Imagem de Resonância Magnética; PET: *Positron Emission Tomography*_Tomografia por Emissão de Pósitron; SPECT: *Single-Photon Emission Computed Tomography*_Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único; US: *Ultrasonography*_Ultrassonografia.

Fonte: Adaptação de SANTOS-OLIVEIRA, 2016.

Cabe ressaltar que quando a Figura 5 é projetada para um radiofármaco na escala nanométrica, chamado de nanorradiofármaco, a escala de sensibilidade pode alcançar valores

de referência ainda mais baixos, cerca de 10^{-19} a 10^{-22} , devido à permeabilidade, biodirecionamento e efetividade dos radiofármacos em escala nano. Com a junção da alta especificidade do radiofármaco na imagem molecular com a nanotecnologia aumentando ainda mais a sensibilidade, faz com que este medicamento atinja um patamar de superioridade inalcançável por qualquer outra técnica disponível no mundo atualmente. Portanto, torna-se essencial o desenvolvimento de uma tecnologia específica, sensível e confiável que permita a realização do diagnóstico precoce e preciso. Novas abordagens com o intuito do desenvolvimento, tanto terapêutico quanto de diagnóstico, tem sido intensificadas nos últimos anos com o objetivo de um diagnóstico precoce e maior direcionamento no tratamento, principalmente na área da oncologia (CHOI; KWAK; PARK, 2010; SARCINELLI et al., 2016; CHAKRAVARTY et al., 2017; GOEL et al., 2017).

1.6 Nanotecnologia

A nanotecnologia é uma tecnologia revolucionadora no campo da medicina e trouxe inovações desafiadoras tanto no diagnóstico quanto no tratamento de doenças, em especial na construção de nano-agentes de várias modalidades da imagiologia, por fornecer substâncias biologicamente ativas aos tecidos ou órgãos (MORITZ; GESZKE-MORITZ, 2015; GOEL et al., 2017).

Na oncologia, esta revolução se deve, principalmente, na tentativa de superar os limites intrínsecos das terapias convencionais contra o câncer e de modificar os agentes de diagnóstico que na sua maioria aumentam o contraste de imagem entre os tipos de tecido, com base, principalmente, em propriedades físicas diferentes (prioritariamente pela perfusão) gerando imagens de baixa resolução (PATEL S.; PATEL P.; PARE, 2014; CHAKRAVARTY et al. 2017; SCHEINBERG et al., 2017; PELAZ et al., 2017; PAN et al., 2019).

Atualmente, tem-se observado avanços na nanomedicina, nanotecnologia aplicada na área da saúde, como a utilização de múltiplos tipos de nanopartículas (NPs) marcadas com radionuclídeos (nanoradiofármacos) para diagnóstico e terapia. Estas NPs exibem melhores resultados diagnósticos e efeitos terapêuticos, menor toxicidade e biodistribuição controlável, em comparação com radiofármacos de pequenas moléculas. Portanto, a nanotecnologia representa uma abordagem promissora e versátil para o desenvolvimento de nano-agentes altamente especializados, demonstrando ser uma excelente estratégia para o diagnóstico precoce e diferencial por meio do uso de técnicas não invasivas: SPECT ou PET

(SARCINELLI et al., 2016; SHI et al., 2017; ZHAO et al., 2017; GOEL et al., 2017). Além disso, recentemente, o uso de NPs radioativas como agentes de imagem e terapia, definidos como agentes teranósticos, é altamente esperado pelo mercado farmacêutico (PELAZ et al., 2017; GOEL et al., 2017; YORDANOVA et al., 2017; ZHAO et al., 2017; SANTOS-OLIVIERA; STABIN, 2018).

De modo geral, para a aplicação em nanomedicina, adota-se o conceito de nanopartículas como agentes com tamanho entre 1 a 100 nm. Contudo, as NPs destinadas à administração de fármaco tem esse espectro de grandeza ampliado, utilizando-se partículas de 1 a 1000 nm, visto a necessidade intrínseca de processos biológicos singulares, tais como fenestrações específicas e angiogênese diferenciada (PATEL S.; PATEL P.; PARE, 2014; ZDROJEWICZ et al., 2015; HUANG; ZHANG, 2018; OJHA; KUMAR, 2018).

A principal justificativa do usos sistemas nanoestruturados como agentes diagnósticos e terapêuticos em oncologia é máxima ação seletiva sobre as células tumorais. Ou seja, o controle do tamanho da partícula, bem como da sua constituição química e características físicas e biológicas, permite conseguir um transporte eficiente e uma distribuição mais seletiva (alvo-específica) do fármaco, superando as limitações encontradas nos tratamentos e nos métodos de diagnósticos convencionais (ALAM et al., 2014; ZDROJEWICZ et al., 2015; LUCAS et al., 2017; PAN et al., 2019). Com isso, as NPs são absorvidas pelas células de forma mais eficiente que as micromoléculas e, portanto, podem ser utilizadas como sistemas de transporte e entrega eficazes. Atribuição da sua eficácia é ao seu pequeno tamanho que possibilita a penetração nas membranas celulares, à estabilização e ligação às proteínas e ao escape da degradação lisossomal (NAOUM et al., 2016).

Uma desvantagem relativa às nanopartículas é a sua opsonização¹ por anticorpos e fatores do sistema complemento, facilitando a fagocitose pelos macrófagos e neutrófilos. Com isso, a retirada das NPs da circulação sanguínea pode ocorrer rapidamente em menos de 5 minutos e concentrá-las, principalmente, no fígado, baço e nódulos linfáticos, onde há maior concentração de células do sistema mononuclear fagocitário pertencente ao sistema retículoendotelial. Esse processo é dependente das características físico-químicas dos nanocompostos tais como: tamanho, carga e hidrofobicidade. Sabe-se que nanocompostos menores que 200 nm conseguem passar pelas fenestrações entre as células de Kupffer no fígado, sendo aprisionadas neste órgão (PATRÍCIO, 2012; ALAM et al., 2014; HOSHYAR et al., 2016; PELAZ et al., 2017; CALZONI et al., 2019).

O processo de excreção costuma ser dependente do tamanho: partículas pequenas (< 20 a 30 nm) são eliminadas por excreção renal enquanto partículas maiores são rapidamente

reconhecidas por células do sistema fagocitário mononuclear presentes no fígado, baço e, em menor grau, na medula óssea. Assim NPs com tamanho na faixa de 30 a 150 nm são localizadas na medula óssea, coração, rins e estômago, enquanto as NPs de 150 a 300 nm são concentradas principalmente no fígado e baço (PELAZ et al., 2017; DANAEI et al., 2018; HUANG; ZHANG, 2018).

Uma vantagem no uso das nanopartículas é seu efeito protetor contra o reconhecimento por mecanismos de resistência a fármacos, como a resistência mediada pela glicoproteína P, acarretando assim uma maior concentração do fármaco no interior das células cancerosas (MIAO; HUANG, 2015; LUCAS et al., 2017). Com isso, o uso de sistemas nanoestruturados tem demonstrado melhorar as propriedades farmacológicas, terapêuticas e toxicológicas dos agentes utilizados no tratamento e diagnóstico do câncer (MIAO; HUANG, 2015; SUN et al., 2017).

¹O termo *opsonização* é utilizado em Imunologia para definir o processo que consiste em fixar opsoninas, e.g. imunoglobulinas, em epítopes do antígeno, permitindo a fagocitose (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

1.6.1 Tipos de Nanopartículas

O conhecimento da fisiopatologia a nível molecular atrelada a modulação e regulação dinâmica, permitiu às NPs aplicadas na medicina, alcançarem um excelente controle das doenças com elevada precisão. Portanto vários sistemas são propostos para a utilização em nanomedicina podendo ser classificadas de acordo com os seus componentes e tipos de material encapsulante, sendo as mais estudadas: i) nanopartículas poliméricas, ii) micelas poliméricas, iii) dendrímeros, iv) lipossomas, v) nanopartículas lipídicas sólidas, vi) micelas fosfolipídicas, vii) nanopartículas de ouro, viii) nanopartículas magnéticas, ix) *quantum dots* (QDs) e x) sílicas mesoporosas. Além disso, podem ser divididas em dois grandes grupos principais dependendo do material de construção principal presente, NPs orgânicas e inorgânicas. Lipossomas, dendrímeros e NPs de carbono são bons exemplos de NPs orgânicas. Enquanto, *quantum dots* (QDs), NPs de ouro (Au) ou de óxido de prata (Ag) são exemplos de NPs inorgânicas (CONNIOT et al., 2014; PATEL S.; PATEL P.; PARE, 2014; ZHAO et al., 2017).

Seu tamanho ajustável, química de superfície e arquitetura confere as NPs propriedades biológicas distintas e permitem o transporte de diversas moléculas com alta eficiência (SCHEINBERG et al., 2017). Analisando as características intrínsecas dos fármacos e dos nanosistemas, por exemplo, uma plataforma de lipossomas, nanopartículas poliméricas, dendrímeros ou micelas poliméricas, melhoraram a solubilidade em água de fármacos pouco solúveis em água e, subsequentemente, aumentar a estabilidade do fármaco nas células tumorais, prolongando o tempo de circulação do fármaco no sangue, proporcionando habilidades passivas e ativas de direcionamento de tumores e captação inespecífica pelo sistema reticuloendotelial (CHAKRAVARTY; HONG; CAI, 2014; GENDELMAN et al. 2015).

1.6.2 Nanopartículas Poliméricas

As NPs poliméricas apresentam-se como sistemas de distribuição capazes de promover um melhor controle da liberação do fármaco e uma distribuição direcionada no órgão-alvo, alcançando, assim, altas taxas de captação intracelular e menor exposição aos órgão-não-alvos, mostrando ser um potencial veículo de entrega de fármacos (CONNIOT et al., 2014; HUANG; ZHANG, 2018). Com isso, tem sido dada mais atenção às NPs poliméricas, principalmente devido ao seu potencial para transportar fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos, características favoráveis de liberação controlada do fármaco, baixa toxicidade, alta estabilidade e tempo de circulação prolongado que aumenta o acúmulo nos alvos tumorais. Muitos trabalhos de pesquisa e revisão envolvendo a coadministração de agentes terapêuticos por NPs poliméricas na terapia do câncer foram publicados (PAN et al., 2019). Portanto, a grande vantagem desse tipo de sistema de liberação nanoestruturado polimérico é o aumento da estabilidade física, química e biológica do fármaco (MOREIRA, 2013).

Em 1995, com a aprovação do Doxil[®] (doxorubicina lipossomal) pelo FDA dos Estados Unidos da América (EUA), a nanotecnologia farmacêutica passou seu primeiro marco evolucionário com a subsequente aprovação de outros produtos, mas as aprovações estão em seu estágio iniciais com menos de 50 fármacos aprovados pelo FDA nos EUA (KOOPEI; ABDOLLAHI, 2016). Na Tabela 2 relata o tipo de polímero utilizado na confecção das NPs polimérica, a indicação e o efeito dos fármacos já aprovados pelo FDA (SAAD; JAHAN; BAGUL, 2012).

Tabela 2 – Alguns exemplos de fármacos utilizados na prática clínica que são entregues por nanopartículas poliméricas

Fármaco	Tipo de Polímero / Funcionalização	Indicação / Atividade	Efeitos
Anfotericina B	PLA-b-PEG	Doenças neurodegenerativas	Transporte aprimorado através do BHE
Cisplatina	Aptâmero-PEG-PLGA	Câncer de Próstata	Aumento da eficiência
Doxorrubicina + Ciclosporina A	PACA	Vários tipos de câncer	Efeito sinérgico
Estavudina	PBCA	SIDA	Aumento da permeabilidade de 8 a 20 vezes
Fator de Crescimento Nervoso	PBCA revestido com polissorbato 80	Parkinsonismo	Transporte aprimorado através do BHE
Lamivudina	Metilmetacrilato-sulfopropilmetacrilato	SIDA	Aumento de 100% as permeabilidade pela BHE
Paclitaxel	Aptâmero-PEG-PLGA	Gliomas	Entrega aprimorada
Vincristina + Verapamil	PLGA	Carcinoma Hepatocelular	Redução da resistência de múltiplos fármacos
Zidovudina	Poli (isohexil cianato)	Segmentação de tecido linfóide	Aumento de 4 vezes dos níveis plasmáticos do fármaco
	Acrilato de polihexilciano		Níveis mais altos de Zidovudina no organismo

Legenda: BHE: Barreira Hematoencefálica; PACA: Polialquilcianoacrilato; PBCA: Acrilato de Polibutilciano; PEG: Polietilenoglicol; PLA-b-PEG: Polissorbato 80 revestido poli (ácido láctico) -b-poli (etilenoglicol); PLGA: poli(ácido láctico-co-ácido glicólico); SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

Fonte: SAAD; JAHAN; BAGUL, 2012.

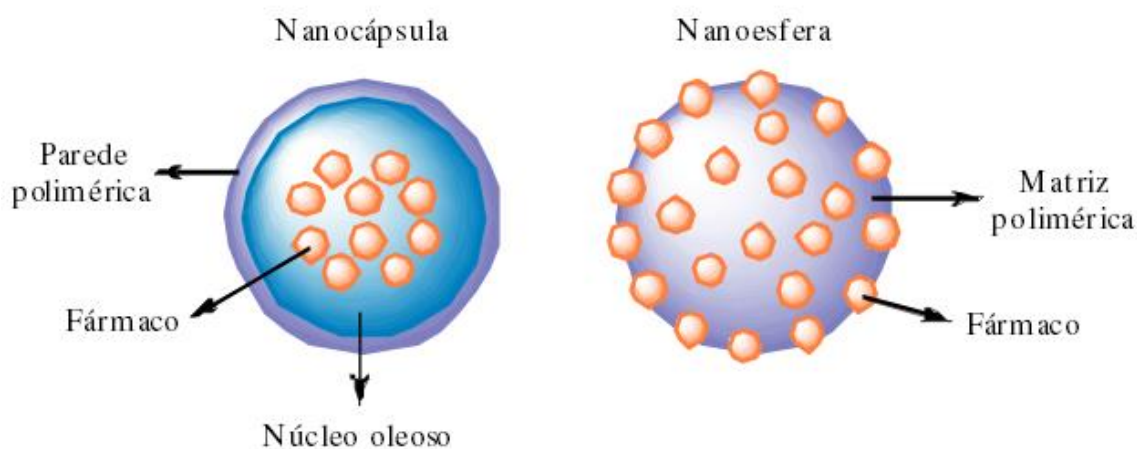
Em contra partida, vários estudos tem demonstrado a aplicabilidade de NPs poliméricas através de modificações na sua superfície com ligantes que lhe permitam atingir com precisão o microambiente tumoral ou organelas de células tumorais. Por exemplo, ligação aos anticorpos monoclonais para interromper o crescimento ou invasão celular; entrega e liberação intracelular de quimioterápicos ou agentes de terapia genética por endocitose para melhorar a ação do fármaco; distribuição de fármacos no tecido cerebral devido a capacidade de penetração das NPs poliméricas na barreira hematoencefálica, possibilitando o tratamento das doenças de Alzheimer, Parkinson e Epilepsia; na vacinação

oral (SAAD; JAHAN; BAGUL, 2012; HUANG; ZHANG, 2018; ZHANG et al., 2018; PAN et al., 2019; LI et al., 2019; MUSUMECI; BONACCORSO; PUGLISI, 2019; WONG et al., 2019). No entanto, o transporte das NPs poliméricas pela circulação sanguínea para os tecidos e células patológicas é fortemente dependente do tamanho, assim o tamanho das NPs poliméricas é um fator crítico no desenvolvimento destas (BANIK; FATTAHI; BROWN, 2016; HUANG; ZHANG, 2018).

Denomina-se NPs poliméricas os sistemas coloidais poliméricos com tamanho entre 10 e 1000 nm, onde o fármaco pode se encontrar dissolvido, recoberto, encapsulado ou disperso (BHATIA, 2016; ZAMBRANO-ZARAGOZA et al., 2018; HUANG; ZHANG, 2018).

As NPs poliméricas podem ser divididas em nanoesferas e nanocápsulas as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (Figura 6). As nanoesferas possuem um tipo de matriz de estrutura, uma matriz polimérica. Fármacos podem ser absorvidos na superfície da esfera ou distribuídos/encapsulados de forma homogênea no interior da matriz, sendo libertados por difusão. Desta forma obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Além disso, nanoesferas não apresentam óleo na composição. Já as nanocápsulas são sistemas vesiculares nos quais o fármaco é confinado a uma cavidade que consiste em um núcleo líquido interno cercado por uma membrana polimérica, ou seja, invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso. Neste caso, as substâncias ativas são geralmente dissolvidas no núcleo interno, mas também podem ser adsorvidas à superfície da cápsula na parede polimérica, sendo denominadas os sistemas do tipo reservatório (ASSIS et al., 2012; CONNIOT et al., 2014; SUTRADHAR; AMIN, 2014; BHATIA, 2016; CALZONI et al., 2019).

Figura 6 – Representação dos Tipos de Nanopartículas Poliméricas, Nanocápsulas e Nanoesferas



Fote: GIORDANI, 2012.

As taxas de absorção de células também são fortemente afetadas pelo tamanho das NPs poliméricas. As células internalizam partículas através de diferentes vias dependendo do tamanho, geralmente, endocitose mediada por receptor para partículas de 100 a 200 nm e fagocitose para as maiores. A taxa diminuiu exponencialmente quando o tamanho ultrapassa os 100 nm. Por outro lado, verifica-se que NPs de 150 nm tem a taxa de captação ótima por não-fagócitos murinos. Alguns estudos demonstram que partículas inferiores a 200 nm e com um Índice de Polidispersão (PDI), que mede a dispersão do tamanho em torno da média, menor que 0,2, obtendo partículas monodispersas, podem diminuir a captação pelo fígado, prolongar o tempo de circulação no sangue e melhorar a biodisponibilidade (BANIK; FATTAHI; BROWN, 2016; HUANG; ZHANG, 2018; LI et al., 2019). Além disso, a disponibilização do fármaco no meio tumoral por parte da NPs poliméricas está atrelada a dissolução e desintegração do polímero da NP e da difusão do fármaco pela NP (DELGADO, 2013).

Nos últimos anos, várias pesquisas têm sido realizadas no intuito desenvolver NPs baseadas em polímeros biocompatíveis e biodegradáveis, como poliésteres de ácido polilático (PLA) e seus copolímeros com ácido glicólico (PLGA), demonstrando a formação de sistemas nanoestruturados com melhor estabilidade do fármaco e maior eficiência de aprisionamento (SHARMA et al., 2014; BHATIA, 2016; CALZONI et al., 2019). Apesar de sintéticos, esses polímeros são degradados no corpo em oligômeros e monômeros que são eliminados através das vias metabólicas normais, como o ciclo de Krebs (DÍAZ; VIVAS-MEJIA, 2013; CALZONI et al., 2019).

Em 2004, o FDA aprovou para uso em humanos os polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, PLA e o PLGA (MUSUMECI; BONACCORSO; PUGLISI, 2019). Pode-se dizer que os polímeros biodegradáveis são preferidos pelo fato da rápida eliminação do organismo e possibilidade de maior controle e manutenção da liberação do fármaco, isto porque, dependendo da formulação escolhida, podem decompor-se em poucas horas ou resistirem à degradação pelo organismo durante dias ou até mesmo semanas. Os polímeros biodegradáveis são divididos em dois grupos: os naturais (tais como albumina, celulose, alginatos, colágeno e quitosano) e os sintéticos (como PLA, PGLA, a poli (ϵ -caprolactona) (PCL) e o poli(metil-metacrilato) (PMMA)). A natureza do polímero influencia significativamente no perfil de liberação do fármaco e, de modo geral, os polímeros naturais promovem uma liberação mais rápida do que os sintéticos. Portanto, para a seleção do tipo de polímero que será utilizado para o desenvolvimento da NP polimérica de liberação controlada de fármacos, avalia-se principalmente a biocompatibilidade, a velocidade de degradação e a facilidade de obtenção/produção do polímero (DELGADO, 2013; WONG et al., 2019).

Os métodos clássicos para a obtenção de NPs polimérica são: nanoprecipitação, emulsão-difusão, emulsificação-coacervação, emulsificação dupla, polimerização superficial e métodos camada-a-camada. Além disso, estruturas poliméricas multifuncionais com morfologia precisamente definida podem ser obtidas por um método controlado de polimerização por radicais de transferência de átomos (ATRP) (CONNIOT et al., 2014; SHARMA et al., 2014; BHATIA, 2016; PAN et al., 2019).

A escolha do método de encapsulamento está relacionada com as características físico-químicas do fármaco. Segundo Felippi (2008) a taxa de associação ou eficiência de encapsulamento está relacionada à solubilidade do fármaco na fase orgânica. Na literatura, os teores de associação utilizando a técnica de polímero pré-formado variam muito. Sabe-se que diversos são os fatores que influenciam o teor de encapsulamento do fármaco, os mais importantes são: as características físico-químicas do fármaco, o pH do meio, a superfície das partículas ou a natureza do polímero, a quantidade de fármaco adicionada à suspensão, a ordem de adição do fármaco na suspensão, a natureza do óleo utilizado e o tipo de tensoativo utilizado (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; MIRAKABAD et al., 2014; BHATIA, 2016; LI et al., 2019; TAO; CHOW; ZHENG, 2019; WONG et al., 2019).

O método dupla emulsificação água/óleo/água (A/O/A) é o mais adequado para encapsular fármacos hidrossolúveis, como peptídeos, tal como a Octreotida, proteínas e vacinas, enquanto o método de simples emulsificação água/óleo (A/O) é perfeito para fármacos hidrofóbicos, como esteróides. No caso dos princípios ativos hidrossolúveis são

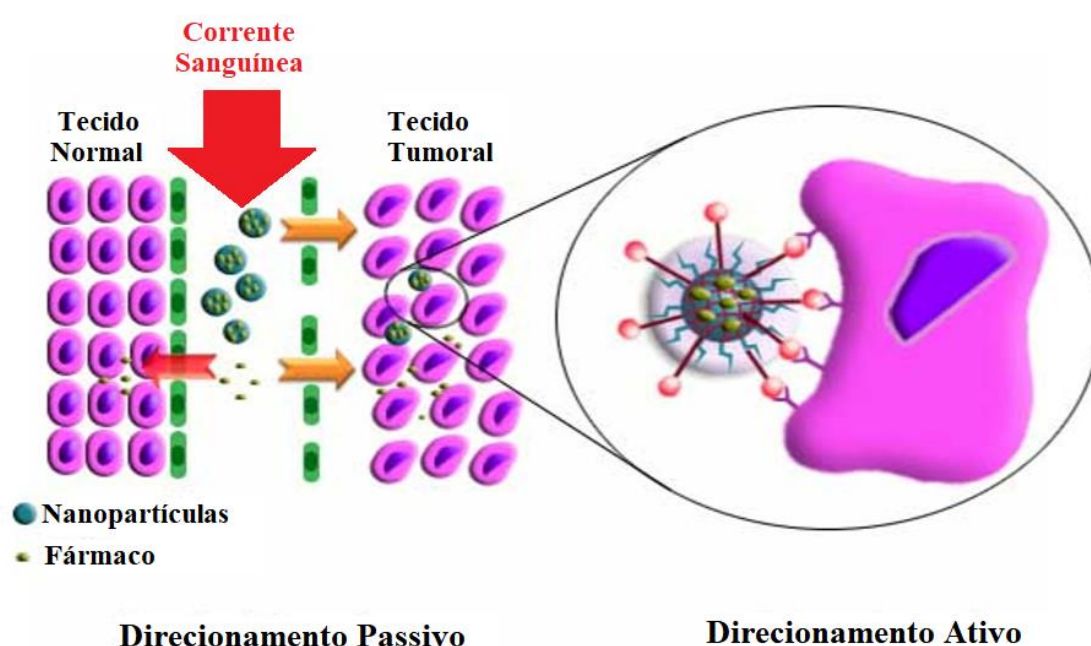
dissolvidos numa fase aquosa incorporada por dispersão na fase orgânica, esta constituída do polímero dissolvido num solvente orgânico tal como diclorometano, clorofórmio ou acetato de etila, posteriormente vai constituir a fase interna de uma emulsão múltipla A/O/A. Como a fase aquosa interna tem tendência para coalescer durante a agitação, para formação da emulsão, a presença de um tensoativo na fase aquosa é essencial para aumentar a estabilidade da emulsão primária A/O e, em consequência, da emulsão múltipla A/O/A. A agitação da emulsão é a etapa determinante para a obtenção das nanosferas e deve ser realizada antes da precipitação do polímero, de modo a serem obtidas gotículas de fase interna de dimensões coloidais. Por fim, promove-se a remoção do solvente orgânico, ocorrendo a precipitação do polímero na fase externa aquosa e consequente formação das nanoesferas (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; MIRAKABAD et al., 2014; BHATIA, 2016; MORITZ; GESZKE-MORITZ, 2015).

O tensoativo também é denominado surfactante ou estabilizador da emulsão. Sua seleção e concentração são parâmetros fundamentais para as NPs poliméricas, tanto para estabilizar quanto para a obtenção de NPs contendo o fármaco com menor tamanho. Os tensoativos são moléculas anfifílicas que apresentam apetência para água e óleo por possuírem na sua estrutura duas regiões com polaridades opostas, uma hidrofílica (polar) e outra hidrofóbica (apolar). Devido à sua estrutura ser composta por duas regiões distintas, os tensoativos promovem a estabilidade de uma emulsão reduzindo a tensão interfacial entre dois líquidos imiscíveis. Por isto, seu uso na formulação é essencial. Há vários tipos de tensoativos que podem ser: polímero não iônico (exemplo, PMMA), polímero iônico (exemplo, quitosana), polímero linear (exemplos, PVA e polietilenoglicol (PEG)), polímero hidrofóbico (exemplos, PLGA e PLA), copolímero anfifílico (exemplo PEG-PLA), surfactante do tipo iônico (exemplos, ácido cólico de sódio e sódio desoxicólico ácido) ou não-iônico (exemplos, Tween e lecitina). A afinidade de diferentes estabilizadores na superfície do fármaco determina sua cinética de adsorção. Assim, a quanto maior afinidade do estabilizador-fármaco, mais rápido o estabilizado adsorve na superfície do fármaco, obtendo NPs de tamanho menores. Mas esta afinidade depende das propriedades físico-químicas tanto do estabilizador quanto do fármaco. Por exemplo, estabilizadores com maior hidrofobicidade e maior capacidade de ligação a hidrogênio (com mais grupos hidroxila e carboxila) frequentemente tiveram melhor afinidade com a superfície da partícula (SOUTO; SEVERINO; SANTANA, 2012; DELGADO, 2013; MIRAKABAD et al., 2014; MORITZ; GESZKE-MORITZ, 2015; RAUDSZUS; MULAC; LANGER, 2018; TAO; CHOW; ZHENG, 2019; WONG et al., 2019).

1.6.3 Mecanismos de Captação das Nanopartículas

Em 2009, Kim e colaboradores já demonstravam as estratégias de sistemas de direcionamento (Figura 7) das NPs a um alvo como basicamente duas: 1) sinalização passiva, que age em consonância com o Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentadas, do inglês, *Enhanced Permeability and Retention* (EPR) e 2) sinalização ativa, que emprega vetores ou ligantes direcionais. Além disso, outras estratégias foram descritas como: modificação da farmacocinética e da distribuição biológica dos fármacos; presença prolongada na corrente sanguínea quando a sua superfície é revestida com molécula de polietilenoglicol (PEG) que ajuda a escapar da fagocitose pelas células do sistema reticuloendotelial (BERTRAND et al., 2014; DING et al., 2016; CHAKRAVARTY et al. 2017). Observa-se que o direcionamento ativo é estritamente dependente do direcionamento passivo e garantido pela adequada funcionalização dos NPs através da ligação na superfície de anticorpos, proteínas ou peptídeos específicos. Em geral, o ligante é escolhido com base no tipo de receptor que é homogeneamente sobre-expresso em células tumorais (BERTRAND et al., 2014; CALZONI et al., 2019).

Figura 7 – Estratégias de direcionamento das Nanopartículas pela sinalização passiva e ativa



O direcionamento passivo é conseguido por meio da incorporação do agente terapêutico em uma macromolécula ou NPs que atinge o órgão alvo de forma passiva. Fármacos encapsulados em NPs ou acoplados a macromoléculas podem passivamente chegar aos tumores através do efeito EPR (MIRAKABAD et al., 2014; BHATIA, 2016), mecanismo descoberto por Matsumura e Maeda em 1986. Alguns estudos mencionam que o direcionamento passivo via EPR é obtido com NPs com tamanho até 200 nm promovendo acúmulo destas no tumor (MIRAKABAD et al., 2014; CHAKRAVARTY et al. 2017; DANAEI et al., 2018).

A vasculatura de tecidos saudáveis é extremamente unida, logo as fenestrações do endotélio são de aproximadamente 2 a 4 nm, impossibilitando a penetração passiva dos nanocarreadores. Entretanto, nos tecidos tumorais possuem uma deficiência nos vasos linfáticos funcionais e demonstram um aumento de permeabilidade, regulado, parcialmente, pela secreção anormal de fator de crescimento do endotélio vascular; bradicinina; óxido nítrico; prostaglandinas; metaloproteinases apresentando fenestrações bem maiores (300 a 780 nm) permitindo, assim, a entrada dos NPs na região tumoral (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015; BHATIA, 2016; DING et al., 2016; CHAKRAVARTY et al. 2017; CALZONI et al., 2019). No caso de tumores sólidos, os neovasos têm fenestrações numa faixa que varia de 100 a 780 nm (OLIVEIRA et al. 2012).

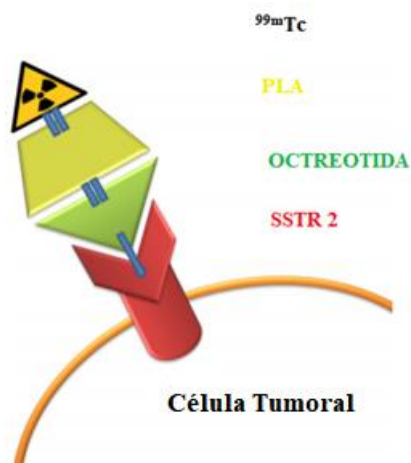
As NPs poliméricas, micelas ou lipossomas com tamanhos característicos na faixa de 10 a 500 nm, aproveitam dessa característica do microambiente tumoral, o aumento da permeabilidade vascular, ou seja, EPR e carregam fármacos anticancerígenos para o interior dos tecidos afetados (Figura 7) (SUTRADHAR; AMIN, 2014; PAN et al., 2019). Em alguns casos, esse efeito pode aumentar a concentração do fármaco encapsulado nos tumores sólidos em 70 vezes (OLIVEIRA et al. 2012; LIECHTY; PEPPAS, 2012). A eficiência desses sistemas é tão maior quanto maior for a capacidade da partícula de prolongar os períodos de circulação sanguínea (BHATIA, 2016).

O modo de direcionamento ativo confere ao sistema de liberação de fármacos pelas NPs um "juízo inteligente"² para discriminar as células cancerosas (DING et al., 2016). Isto se deve principalmente pelos receptores de superfície celular propensos à internalização, que são superexpressos por células cancerosas, conseqüentemente melhoraram a captação celular dos nanocarreadores (Figura 7). A especificidade e concentração desejadas são melhores alcançadas pelo direcionamento ativo das NPs pelos pequenos ligantes, anticorpos e biomarcadores capazes de se ligar especificamente a receptores moleculares expressos pelo tumor, facilitando a captação eficiente do tumor, internalização e endocitose mediada por

receptor em concentrações elevadas em células tumorais. Portanto, o direcionamento ativo torna-se muito atraente para a entrega intracelular de fármacos encapsulados em NPs e aumento da eficácia antitumoral (OLIVEIRA et al. 2012; ALAM et al., 2014; BERTRAND et al., 2014; MIRAKABAD et al., 2014). Além disso, esta estratégia aumenta a concentração de NPs no ambiente tumoral, servindo com um agente diagnóstico (ALAM et al., 2014; BERTRAND et al., 2014; CHAKRAVARTY et al. 2017; ODA et al., 2017). Na Figura 8 demonstra de forma planar o possível mecanismo de captação de uma NP polimérica carregando a Octreotida que irá reconhecer seu receptor celular (SSTR 2) numa célula tumoral, como o PPoma, servindo como um agente de diagnóstico.

²N.A: “Julgamento Inteligente”: no sentido de fazer uma escolha acertiva e justificada pelo princípio da técnica, que no caso, é o direcionamento ativo para células cancerosas, conseguindo reconhecê-las.

Figura 8 – Proposta do reconhecimento da Nanopartícula polimérica com Octreotida e radiomarcada com Tecnécio-99 metaestável pelo receptor de Somatostatina (SSTR 2)



Nota: PLA: Ácido Polilático; SSTR 2: Receptor de Somatostatina do subtipo 2; ^{99m}Tc: Tecnécio-99 metaestável.

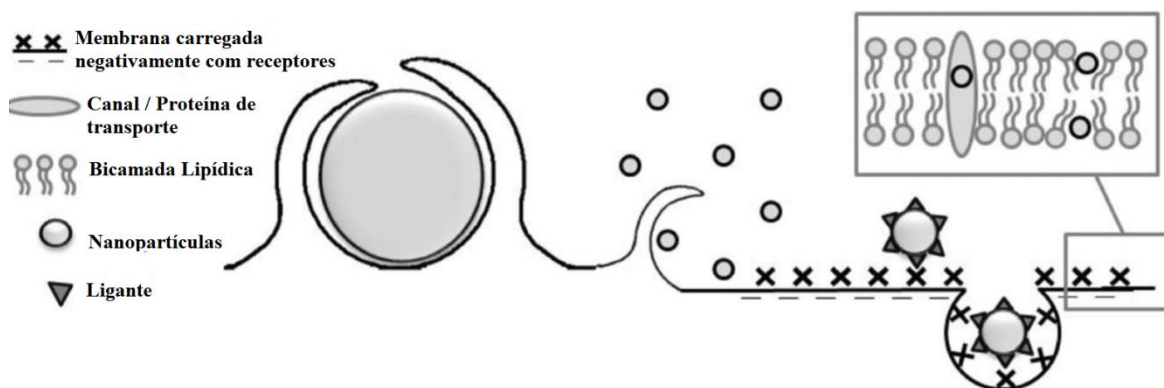
Fonte: Adaptação de YORDANOVA et al., 2017.

A aptidão da NP para ser internalizada após a ligação à célula-alvo é um critério primordial na seleção de ligantes de direcionamento adequados. Os receptores mais propensos à internalização são: i) receptor da transferrina, que podem ser até 100 vezes mais expressos nas células tumorais que nas normais; ii) receptor de folato, sendo a isoforma alfa (α) (receptor de folato- α) superexpressa em 40% dos cânceres humanos; iii) Glicoproteínas

expressas nas superfícies celulares sendo reconhecidas pelas lectinas, por exemplo; iv) O receptor do fator de crescimento epidérmico, do inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), superexpressos em vários tipos tumorais, por exemplo, o receptor epidérmico humano-2, do inglês, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (HER-2) é relatado como sendo expresso em 14 a 91% dos pacientes com câncer de mama; v) receptor celular como receptores de somatostatina que são supreexpressos nas células tumorais, sendo SSTR 2 presente em 80% dos NET gastroenteroepáticos (ALAM et al., 2014; BERTRAND et al., 2014; MIRAKABAD et al., 2014; ABDELLATIF et al., 2018; ŁUKOMSKA et al., 2018).

As dimensões máximas das vesículas formadas para internalização das NPs independente da via não são definitivas, mas suas dimensões tendem a limitar este processo de internalização. Os tamanhos das vesículas diferem para cada espécie, tipo de célula e carga, sejam NPs ou microorganismos estranhos como os vírus. Portanto, assume um tamanho máximo de NP para internalização de até 200 nm. De modo resumido, pode-se dizer que o mecanismo de captação das NPs ocorre da seguinte maneira: captação de uma NP grande por fagocitose, internalização por macropinocitose, ligação específica de ligantes a receptores de superfície celular e subsequente endocitose mediada por receptor e difusão de NP através da membrana celular (Figura 9) (LIECHTY; PEPPAS, 2012; KETTLER et al., 2014; CHAKRAVARTY et al. 2017; HUANG; ZHANG, 2018). O tamanho da NP e o PDI dos sistemas nanocarreadores são os principais atributos físico-químicos que influenciam a absorção celular dependente de endocitose (DANAEI et al., 2018). Após a internalização, as NPs geralmente atingem o compartimento lisossomal, no qual as enzimas hidrolíticas degradam a NP, liberando o seu conteúdo, fármaco (SUTRADHAR; AMIN, 2014).

Figura 9 – Mecanismos de captação de nanopartículas



Fonte: Adaptação de KETTLER et al., 2014.

Uma vez que um objeto estranho entra em um corpo, a opsonização começa. Proteínas Opsonina se anexam ao objeto estranho e torná-lo mais visível para o sistema fagocítico mononuclear (MPS). Uma resposta rápida do MPS resulta na depuração de NPs não revestidas da corrente sanguínea dentro de poucas horas após a injeção, o que poderá limitar o seu uso, pois com a rápida depuração não haverá tempo para atingir o tecido alvo. Uma estratégia de evitar o MPS é o direcionamento ativo, que irá promover alterações estruturais, principalmente na superfície trapalhando o reconhecimento pelo MPS e facilitará a passagem pelas barreiras biológicas, viabilizando o seu uso clínico (LIECHTY; PEPPAS, 2012; BERTRAND et al., 2014; BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015; HOSHYAR et al., 2016; CHAKRAVARTY et al. 2017). Porém, isto ainda é controverso, pois alguns estudos relatam que a opsonização é prejudicial às estratégias de direcionamento ativo para NPs, já que as suas alterações estruturais facilitam o reconhecimento pelo MPS, resultando em uma redução acentuada na especificidade (BLANCO; SHEN; FERRARI, 2015; CHAKRAVARTY et al. 2017).

1.6.4 Nanotoxicologia

A absorção das NPs pelas células ocorre rapidamente através de mecanismos ativos e passivos e os mesmos podem apresentar comportamentos diferentes devido a variações no tamanho, forma, revestimento superficial e carga das NPs. Isso dificulta a categorização do comportamento das NPs nos sistemas biológicos e a identificação da sua toxicidade. Ao contrário da toxicologia clássica, a métrica de dose das NPs não é direta, os protocolos de bioensaios envolvendo nanomateriais estão sendo desenvolvidos e ainda não há validação internacional (ALAM et al., 2014). De fato, conhecer a toxicidade desses nanomateriais tanto na saúde humana quanto no meio ambiente é crucial, ao ponto em que a nanotoxicologia está se consolidando como um novo ramo da toxicologia. Tem-se observado que os sistemas nanoestruturados não obedecem completamente aos princípios científicos que formam a base para do conhecimento sobre como o sistema fisiológico humano frente aos compostos exógenos e os testes de toxicidade também não abordam adequadamente as questões de nanotoxicidade (KOOPAEI; ABDOLLAHI, 2016; CALZONI et al., 2019).

Muitas variáveis, como dispersão, aglomeração, agregação, concentração e matriz, requerem mais considerações nas pesquisas com os nanomateriais *in vitro* e *vivo*. Com todas

as características em mente, há certas preocupações com relação à estrutura nanoparticulada para uso humano. A toxicidade das NPs tem atraído a crítica mais vital porque elas representam características excepcionais como tamanho, distribuição de tamanho (PDI), carga superficial, grande área de superfície, composição química, solubilidade, geometria e estabilidade, características essas que as tornam únicas. Por exemplo, há uma relação inversa entre o tamanho e concentração dos *quantum dots* afetando a citotoxicidade, ou seja, quanto menor o tamanho e a concentração, são mais tóxicos. A toxicidade de NP poliméricas varia dependendo da superfície da natureza do revestimento aplicado a NP (KOOPAEI; ABDOLLAHI, 2016; LI et al., 2016; RADOMSKA; LESZCZYSZYN; RADOMSKI, 2016; CALZONI et al., 2019).

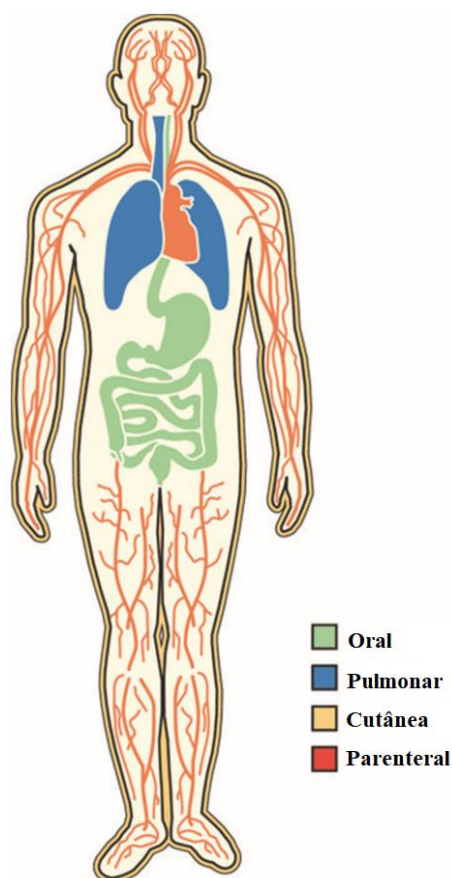
Embora as rotas de entrada de nanomedicamentos nos seus alvos terapêuticos tenham sido identificadas, mecanismos detalhados precisam ser melhores compreendidos para elucidação dos possíveis efeitos tóxicos (ALAM et al., 2014). Estudos iniciais podem ser realizados a partir do acúmulo da NP nos seus órgãos alvos, pois sua deposição provoca alterações intracelulares que podem afetar a integridade celular e, portanto, a função de órgão (CIAPPELLANO et al., 2016; KANNAN et al., 2014).

Em contrapartida, estudos têm sido realizados na tentativa de controlar e minimizar os efeitos indesejáveis de NPs utilizam abordagens químicas, tais como, a adição de grupos funcionais. Entre os polímeros biodegradáveis sintéticos como o polietilenoglicol (PEG) tem sido amplamente investigado devido à sua hidrofiliabilidade, que leva à formação de uma barreira altamente ligada à água, resultando em baixa adesão celular e baixa absorção de proteínas. Essas propriedades são extremamente atraentes, pois conferem recursos as NPs de PEG, que podem, assim, evitar a ligação de opsoninas e uma menor limpeza pelo sistema imunológico, consequentemente aumentando o tempo de meia-vida das NPs na circulação (OJER et al., 2015; RADOMSKA; LESZCZYSZYN; RADOMSKI, 2016; CALZONI et al., 2019). De maneira geral, uma NP biocompatível tenderá ao sucesso se apresentar baixa toxicidade, uniformidade de tamanho, grande capacidade para cargas diversas, alta rastreabilidade, estabilidade coloidal, ligação e internalização específicas de células seletivas e liberação de carga desencadeada (CIAPPELLANO et al., 2016; RADOMSKA; LESZCZYSZYN; RADOMSKI, 2016).

A interação de NPs com a pele recebeu recentemente uma atenção significativa, na visão da nanotoxicidade, devido ao uso crescente de NPs em roupas resistentes a manchas, cosméticos e protetores solares. A via dérmica de exposição também é importante devido à tendência das NPs transportadas pelo ar se aglomerarem, acomodarem na superfície da pele e

imperidem o contato de outras partículas e sua penetração. No entanto, o uso de NPs na medicina deve ser cauteloso, tendo em vista os potenciais riscos à saúde que elas podem representar porque os seus efeitos tóxicos não foram estudados em detalhes e tão pouco elucidados (ALAM et al., 2014). Assim é importante compreender as vias de contato da NP com o organismo humano. Na figura 10 demonstra as principais vias que devem ser estudadas para os estudos de nanotoxicidade, de acordo com a sua aplicabilidade.

Figura 10 – Principais vias para estudos de Nanotoxicidade



Fonte: Adaptação de ALAM et al., 2014.

A expansão do conhecimento nos mecanismos envolvidos na nanotoxicidade terá um grande potencial para auxiliar na compreensão dos riscos associados à nanotecnologia e ao projeto de nanomateriais mais seguros e até mesmo de nanomedicamentos, entre eles os nanorradiofármacos. Além disso, o potencial de eficácia terapêutica das NPs para o câncer pode, de fato, depender muito dos mecanismos que induzem sua toxicidade (GULUMIAN; ANDRAOS, 2018; PINTO et al., 2018). Uma etapa primordial para a aplicação clínica de NPs poliméricas são os estudos de segurança que precisam ser realizados por longos períodos

de tempo para que a potencial toxicidade das substâncias exógenas que se acumulam no corpo possa ser descartada. Como consequência, enormes custos devem ser cobertos durante a realização de ensaios destinados a verificar a aplicabilidade do sistema no corpo humano (CALZONI et al., 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar nanopartículas de PLA/PVA com Octreotida radiomarcada com Tecnécio-99 metaestável como agente de diagnóstico para o Tumor Secretor de Polipeptídeo Pancreático, em inglês, *Pancreatic Polypeptide-Secreting Tumor of the Distal Pancreas* (PPoma).

2.2 Objetivos específicos

- a) Produzir de nanopartículas de PLA/PVA com Octreotida à 4%;
- b) Caracterizar as nanopartículas de PLA/PVA/Octreotida quanto ao tamanho e índice de polidispersão;
- c) Avaliar a citotoxicidade das nanopartículas de PLA/PVA/Octreotida;
- d) Incorporar o radionuclídeo Tecnécio-99 metaestável nas nanopartículas de PLA/PVA/Octreotida;
- e) Avaliar o perfil de biodistribuição das nanopartículas de PLA/PVA/Octreotida marcadas com Tecnécio-99 metaestável em camundongos machos BALB/c nude com modelo xenográfico de câncer de pâncreas (MIA Paca 2) com expressão de SSTR 2.

3 ARTIGO CIENTÍFICO 1: PPoma Review: Epidemiology, Aetiopathogenesis, Prognosis and Treatment (Artigo científico publicado)



Review

PPoma Review: Epidemiology, Aetiopathogenesis, Prognosis and Treatment

Thais Ligiero Braga and Ralph Santos-Oliveira *

Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Rio de Janeiro 21941906, Brazil; thaisblig@gmail.com

* Correspondence: presidenciaradiofarmacia@gmail.com; Tel.: +552121733964

Received: 19 September 2017; Accepted: 13 November 2017; Published: 11 January 2018

Abstract: Generally, pancreatic polypeptide-secreting tumor of the distal pancreas (PPoma) is classified as a rare tumor, and may occur sporadically or be associated in families or with multiple endocrine neoplasia type 1 (NEM 1). It grows slowly, reaching large dimensions at the time of diagnosis and the symptomatology is fundamentally due to the mass effect, causing either non-specific abdominal pain or symptoms suggestive of obstruction of the pancreatic or biliary duct. Therefore, when detected, they are usually malignant, with metastases mainly in the liver. The combination of serum analysis of increased levels of chromogranin A and pancreatic polypeptide and pancreastatin is very useful with a sensitivity of up to 95%. However, in addition, scintigraphic exams with somatostatin analogues should be performed to better clarify the diagnosis. Surgical resection is the treatment of choice, despite surgical difficulty and because they are generally palliative due to the metastases. Surgeries for tumor volume reduction are also performed to relieve symptoms. Chemotherapy commonly uses streptozotocin and somatostatin analogues to treat residual disease. Unfortunately, the survival rates are still very low, less than 10%, and if metastases already exist, this percentage drops to 3%.

Keywords: cancer; oncology; imaging; radiopharmacy; nuclear medicine

1. Introduction

Historically, the first time that the pancreas was spoken of was by a Greek anatomist and surgeon known as Herophilus (335–280 BC). However, it is only much later that Ruphos, another Greek anatomist, gave the pancreas its name [1]. In antiquity and the middle ages, knowledge about the anatomy of the pancreas was very limited and its function was completely unknown. Significant progress was first made in the seventeenth and eighteenth centuries. Johann Georg Wirsung, the prosector of the University of Padua, discovered the main pancreatic duct, and Giovanni Santorini discovered the accessory duct. Regnierde Graaf was the first to perform a pancreatic exocrine study, and Paul Langerhans's discovery of pancreatic islets was in 1869. After the discovery of Langerhans, the first steps toward recognizing the pancreas as an endocrine gland were done. The twentieth century brought the discovery of insulin and other pancreatic hormones. Early, pancreatic studies led to crucial advances in scientific knowledge and were recognized, among other things, with seven Nobel Prizes. The first of these went to Ivan Pavlov in 1904 for his work on the physiology of digestion. The most recent was awarded to Günter Blobel in 1999 for discovering signaling mechanisms that govern the transport and localization of proteins within pancreatic acinar cells [2–4].

The pancreas consists of a gland that has an elongated, pointed shape measuring about 15 cm and which is located below the stomach, between the duodenum and the spleen. It is part of the digestive system and the endocrine system of vertebrates, and consists of endocrine cells introduced into exocrine tissue [5].

The endocrine part of the pancreas is made up of clusters of cells known as the islets of Langerhans. In these islets, there are four types of cells (alpha, beta, delta and PP) that although difficult to differentiate, can nevertheless be classified according to the material that they secrete. PP cells, which account for less than 2% of the islets, produce the pancreatic polypeptide (PP) whose function is to inhibit the exocrine pancreas and reduce the release of somatostatin. In addition to enzymes and hormones, the pancreas also secretes large amounts of sodium bicarbonate, which is intended to protect the duodenum from acid from the stomach by neutralization [5,6]. Although the pancreatic polypeptide (PP) is secreted by the PP cells in the endocrine pancreas, these cells are also spread throughout the exocrine pancreas. It consists of 36 amino acids and has a molecular weight of approximately 4200 Da, being a cholecystokinin antagonist, suppressing pancreatic secretion and stimulating gastric secretion [7]. Its secretion in humans is increased after a protein meal, fasting, exercise and acute hypoglycaemia, and is reduced by somatostatin and intravenous glucose. The role of PP is unknown, but effects on hepatic glycogen levels and gastrointestinal secretions, such as the stimulation of gastric and intestinal enzyme secretion and inhibition of intestinal motility, have been suggested [8,9]. The highest concentration of PP cells is in the head of the pancreas, where 90% of all PP cells are located [6]. PP was first reported in 1972 when it was simultaneously isolated by two independent laboratories [10,11].

Pancreatic neoplasms are divided into two groups: exocrine pancreatic cancer (approximately 94%), represented mainly by adenocarcinoma, and endocrine pancreatic cancer (approximately 6%), represented by carcinoid tumors (well-differentiated neuroendocrine tumor) and neuroendocrine tumors (NETs) [12–14]. Neuroendocrine tumors (NETs) are also found in the stomach and intestine, but are heterogeneous in their morphology, function and biology. Therefore, the WHO classification distinguishes gastroenteropancreatic NET according to its location, histopathology, proliferative activity, extension, functional activity and hereditary antecedents [15]. Most cases of pancreatic neuroendocrine tumors affect the right side of the organ (the head); gastrinomas, pancreatic polypeptide (Secretory Tumor of the Distal Pancreas) and somatostatinomas are more frequent, whereas insulinomas and glucagonomas predominate in the centre (body) and in the left side (tail) [16]. Its location in the retroperitoneum is associated with its natural history, and forms a great challenge for early diagnosis. All pancreatic neuroendocrine tumors are considered malignant and have the potential of metastasis; for this reason, its curative treatment is still restricted to a minority of patients; in addition, lesions are generally unresectable and 50% are metastatic at diagnosis; in the case of PPoma, the number of metastatic tumors at diagnosis rises to 90% [12,13,17].

Clinically, neuroendocrine tumors (NET), including endocrine pancreatic tumors, can be divided into functional and non-functional tumors [12]. Non-functional tumors account for 50–60% of all NETs and include those which are clinically quiet but secrete a predominant substance, e.g., the PPoma, which make up about 50% of all pancreatic NETs (PNET). Tumors are non-functioning or are diagnosed incidentally (for example, by endoscopy) or due to the nonspecific symptoms of mass effects, such as enlarged liver, obstruction of the pancreatic duct, or jaundice being diagnosed mainly in the head of the pancreas and between the 5th and 6th decade of life. PPoma presents a shorter overall survival time than functioning tumors [13,18,19]. Also, differentiation between a non-functional pancreatic NET and an adenocarcinoma of the pancreas is extremely important because the prognosis is clearly different; usually, NETs have a better prognosis than exocrine tumors of the pancreas. However, because the differences between these two types of tumors may be subtle, it is often difficult to distinguish between them [19–23].

2. Epidemiology

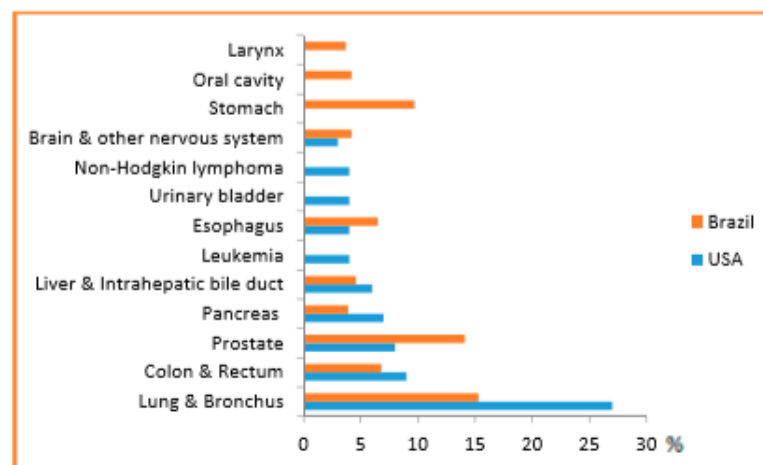
Cancer is considered a worldwide public health issue, especially among developing countries, according to the World Cancer Report database of the International Agency for Research on Cancer (IARC) of the World Health Organisation (WHO). It is estimated that in the coming decades, the impact

of cancer on the population will correspond to 80% of the more than 20 million new cases estimated for 2025 [24].

In this scenario, we have the pancreatic cancer. This type of cancer is rare before the age of 30, but becomes more common from the age of 60. According to the International Union Against Cancer (UICC), cases of pancreatic cancer increase with age: from 10/100,000 inhabitants between 40 and 50 years to 116/100,000 inhabitants between 80 and 85 years. The incidence in the Brazilian population is more significant in men, with 8710 deaths having occurred in 2013, of which 4373 were men and 4335 were women. Between 62% and 82% of the patients present with tumors originating in the gastrointestinal tract [12,25]. When evaluating endocrine tumors of the pancreas (PNET), the annual incidence is even lower, approximately one in 100,000 or 1–2% of all pancreatic neoplasms [26,27].

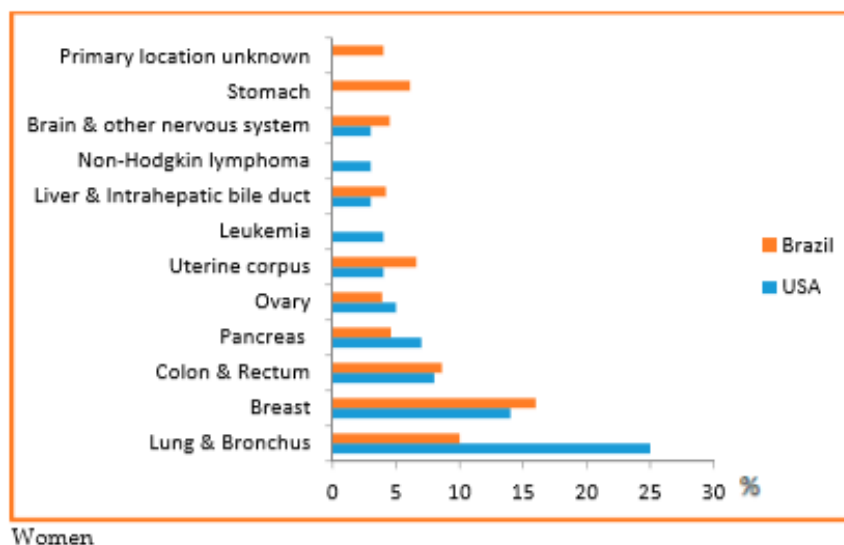
Nonfunctional pancreatic tumors like Ppoma, are the most common PNETs, representing approximately 50–60% of all PNET. These tumors are diagnosed more frequently between the 5th and 6th decade of life. They occur more frequently in the head of the pancreas and most of these tumors are malignant. Non-functional PETs are tumors that do not present the clinical syndrome of hormonal hypersecretion, which means that most of them are silent. These tumors may occur in 20–40% of patients with MEN (multiple endocrine neoplasia) and they can also be found in Von Hippel-Lindau's disease. In fact, PNETs whose are associated with this disease are almost always non-functional tumors [28,29].

PPoma is considered a rare disease, since it represents less than 1% of non-functional neuroendocrine tumors [30]. For all combined stages, the relative five-year survival rate is 8%. For the small percentage of people diagnosed with local disease (9%), the five-year survival is only 29%. About half (52%) of patients are diagnosed at an advanced stage, for which the five-year survival is 3% [14]. Most of this situation is due to the fact that it is difficult to detect, and pancreatic cancer has a high mortality rate because of the late diagnosis and aggressive behavior. In Brazil, it accounts for about 2% of all cancers diagnosed and 4% of all cancer deaths [25]. It is considered one of the main causes of cancer death in Brazil, being the ninth highest cause among men and the sixth highest cause among women [31]. In the US, it is estimated that 53,670 new cases of pancreatic cancer will be diagnosed in 2017 and it is considered the third leading cause of cancer death in men and women in US, since they are associated with a wide range of other tumors, for example, ovarian, breast, endometrial, bladder, prostate, or esophageal cancer, with a predicted 43,090 deaths in 2017, and a risk of one in 67 (Figure 1) [14,32–34].



Men

Figure 1. Cont.



Women

Figure 1. Top causes of cancer death, by sex in Brazil, 2008 [31] and the US [14]—Estimates for 2017. As estimates are rounded to more than ten cases, the exclusive cases of basal cells and squamous cells are skin cancers and carcinoma in situ, except for bladder urinary tract infection. Brazilian source: MS/SVS/DASIS/CGIAE/ Sistema de Informações sobre Mortalidade—SIM; MS/INCA/Conprev/ Divisão de Informação e análise de Situação. American Source: AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2017. Atlanta; 2017 [14].

From 2004 to 2013, pancreatic cancer incidence rates increased by about 1% per year in Caucasian individuals, but were stable in afro descendant [14]. Regarding mortality rates, an increase of 0.3% per year was observed in Caucasian men from 2005 to 2014, and a decrease of 0.5% per year was observed in afro descendants both men and women in the same period [14]. The relative five-year survival rate has increased from 3% in the mid-1970s to 9% in the most recent period (2006–2012) [35].

3. Risk Factors

Some risk factors for pancreatic cancer have been identified and an important association has been found in relation to age, since incidence rates increase progressively with age, with more than 80% of cases of pancreatic cancer occurring in individuals aged between 60 and 80 years [36].

Tobacco use is one of the main risk factors for pancreatic cancer, showing that it clearly plays an important role in this neoplasia [31]. Some cigarette smokers have a risk of developing pancreatic cancer that is about twice as high as that for individuals who have never smoked. The use of smokeless tobacco also increases the risk (Figure 2) [33].

Other risk factors include a family history of pancreatic cancer, a personal history of chronic pancreatitis or diabetes mellitus, obesity, a diet rich in meat and fats, and low levels of serum folate. Excessive alcohol consumption can increase the risk. Individuals with Lynch syndrome and certain other genetic syndromes, as well as *BRCA1* and *BRCA2* mutation carriers, are also at an increased risk [14,37]. In addition, approximately 7–10% of patients show a familial predisposition for pancreatic cancer [38]. Consuming fruits and vegetables reduces the risk of pancreatic cancer [39].

Regarding specific risk factors to PPoma, there are some that deserve attention: (i) high intake of saturated fat, (ii) malignancy and associated impairment in glucose metabolism, (iii) thyroid dysfunction, (iv) alcohol consumption, (v) cigarette smoking, (vi) chronic medical conditions, like diabetes mellitus, and (vii) environmental factors, like radiation [40].

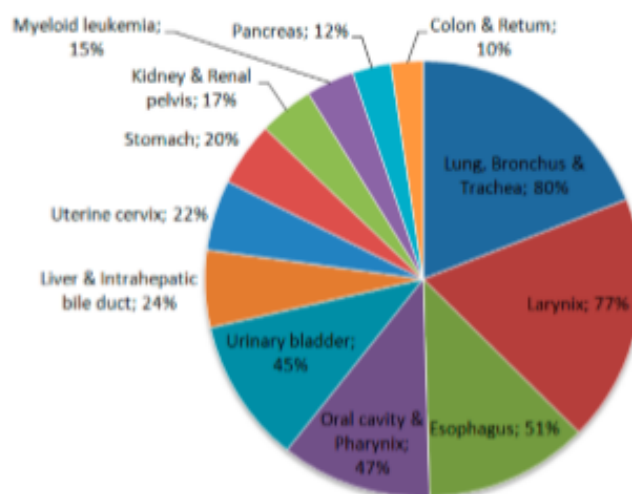


Figure 2. Proportion of cancer deaths attributable to smoking in adults aged 35 years and over, USA, 2011. Source: Adapted from Siegel et al. 2015 [28].

4. Actiopathogenesis

According to the distribution the cells in the islets of Langerhans of the pancreas, there is a predominance of certain tumors. The head is the area of the gland with the greatest density of PP cells, which produce PP, and give rise to PPoma, The current targets of screening include identification of early pancreatic cancer, as well as the two most important precursor lesions intraductal papillary mucinous neoplasm and high grade pancreatic intraepithelial neoplasia. In other words, it is more likely that endocrine pancreatic tumors originate from the already differentiated cells of the islets of Langerhans [6,16,18,23,26,27].

Pancreatic neuroendocrine tumors (PNET) are uncommon neoplasms, with an annual incidence of approximately one in 100,000; these are distinguished by several characteristics and account for only 1–2% of all pancreatic malignancies [26,41]. Neuroendocrine cells (derived from Enterochromaffin cells or Kulchitsky cells) are distributed throughout the body. They exhibit similar biochemical and functional behavior, with the possibility of taking up precursors of amines and their decarboxylation; therefore, they also receive the designation of cells of the amine precursor uptake and decarboxylation (APUD) system. The embryological origin appears to be the gastroenteropancreatic tract, not the neural crest as previously thought. Neoplasms from cells of the APUD system have the ability to synthesize and secrete polypeptides that have specific endocrine hormone activity, such as the PPoma [12,18,42,43].

Clinical behavior and the occurrence of well-defined syndromes depend on the production of substances secreted by tumor cells (insulin, glucagon, etc.). As PPoma is a non-functioning (non-secreting) tumor, it has no clinical manifestation until it is large enough to cause compressive symptoms, despite having high serum levels of pancreatic polypeptides. However, histologically, non-secretory tumors are indistinguishable from secretors, but they do not have the characteristic of the production of molecules with hormonal activity [18,44,45].

The 2010 World Health Organisation (WHO) classification of neuroendocrine neoplasms arising in the digestive system (gastroenteropancreatic NETs) separates these tumors into two broad categories [46]. The first includes well-differentiated neuroendocrine tumors, which show a solid, trabecular, gyriform, or glandular pattern, with fairly uniform nuclei, salt-and-pepper chromatin, and finely granular cytoplasm. These tumors have been traditionally referred to as carcinoid tumors when arising in the tubular gastrointestinal tract or pancreatic neuroendocrine (islet cell) tumors, where the PPoma fits and has a high degree of malignancy [38,47]. The second includes poorly differentiated neuroendocrine carcinomas, which are high-grade carcinomas that resemble small cell or large cell neuroendocrine carcinoma of the lung [48]. Poorly differentiated neuroendocrine carcinomas

are often associated with a rapid clinical course; as such, their clinical behavior is similar to that of small cell carcinoma of the lung, and they are treated similarly, using platinum-based chemotherapy [49,50].

In contrast, well-differentiated neuroendocrine tumors of the digestive system generally have a much better prognosis. However, these tumors are not a homogeneous group, but instead display a spectrum of aggressiveness. Even in the presence of liver metastases, some patients may survive for many years. Within the subgroup of well-differentiated NETs, morphology alone cannot predict tumor behavior. Proliferative rate, as assessed by mitotic count and/or Ki67 labelling index, is of prognostic significance, independent of tumor stage [49,50]. The WHO classification separates well-differentiated gastroenteropancreatic NETs into low-grade (G1) and intermediate grade (G2) categories based upon proliferative rate (Table 1). All poorly differentiated neuroendocrine tumors are high-grade (G3) neuroendocrine carcinomas according to this classification scheme. However, there is a small subset of tumors that displays a high proliferation rate but well-differentiated morphology [46].

Table 1. Evolution in WHO terminology of neuroendocrine tumors of the digestive tract.

WHO 1980	WHO 2000	WHO 2010
I. Carcinoid	1. Well-differentiated endocrine tumor (WDET) *	1. Neuroendocrine tumor grade 1 (G1) (carcinoid)
	2. Well-differentiated endocrine carcinoma (WDEC) *	2. Neuroendocrine tumor grade 2 (G2)
	3. Poorly differentiated endocrine carcinoma/small cell carcinoma (PDEC)	3. Neuroendocrine carcinoma (large cell or small cell type)
II. Mucocarcinoid	4. Mixed exocrine-endocrine carcinoma (MEEC)	4. Mixed adenoneuroendocrine carcinoma (MANEC)
III. Mixed forms carcinoid adenocarcinoma		
IV. Pseudotumor lesions	5. Tumor-like lesions (TLL)	5. Hyperplastic and pre-neoplastic lesions

* The difference between WDET and WDEC was defined according to staging features in the WHO 2000 classification. G2 NET does not necessarily translate into WDEC of the WHO 2000 classification. Definition in parentheses for the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) coding.

The term “Neuroendocrine tumor grade 3 (G3)” has been used for this category but is not advised, since neuroendocrine tumors are, by definition, well-differentiated. Reproduced with permission from: WHO Classification of Tumors of the Digestive System, 4th edition, Rindi GAR et al. [46]

5. Clinicopathological Presentation

Most of the signs and symptoms of neuroendocrine pancreatic tumors are caused by the excess hormones that tumors release into the bloodstream. In PPoma, there is an overproduction of the pancreatic polypeptide, which helps to regulate both the exocrine and endocrine pancreas. However, this excess hormone does not usually cause any identifiable hormonal syndrome, since the hormone is biologically inactive. Thus, they grow slowly, reaching large dimensions at the time of diagnosis; the symptomatology is mainly due to mass effect, causing abdominal pain, jaundice, altered general condition, palpable mass, diabetes mellitus and weight loss, with some patients also presenting gastrointestinal bleeding and watery diarrhea. The latter has been associated with very high levels of PP; in addition, most cases of PPoma are malignant when diagnosed (90%). Jaundice (yellowing of the skin and eyes) can sometimes facilitate early diagnosis. A recent report suggests the association of PPomas with diabetes mellitus, demonstrated in five case reports where patients had an improvement or resolution of diabetes after resection of the tumor [13,17,18,33,51,52]. The literature also reports on the use of genetic algorithms in the development of genetic resources in the United States. The evolution of patients with pancreatic neuroendocrine tumors is quite variable. Indolent tumors can lead to the patient being asymptomatic, even without specific treatment. Other patients require therapy due to compressive symptoms, or hormone peptide production. The predominant site of metastasis is the liver [3,17,18]. In PPoma, enlargement of the liver is one of the main symptoms used for its detection [33].

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1) was first described in 1954 by Wermer [53]; for this reason, it is also known as Wermer syndrome [54–56]. MEN-1 syndrome is rare, occurring with a prevalence of 0.001–0.25%, and reaches all age groups, presenting an identical distribution in both sexes. It results from inactivation of the tumor suppressor gene MEN-1, has autosomal dominant transmission and the penetrance is almost 100% with age. It is observed that penetrance increases with age, because it is estimated that penetrance is 3% at 20 years of age in non-functional pancreatic neuroendocrine tumors, increasing to 53% at 80 years. The term multiple endocrine neoplasia (MEN) encompasses distinct, genetically determined disorders associated with the process of hyperplasia or neoplasia in two or more endocrine glands of the same patient. The major MEN types are multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1), primarily affecting the parathyroid, pancreas and pituitary gland, and multiple neoplasia type 2 (MEN-2), which involves the thyroid (medullary carcinoma), parathyroid and adrenal medulla (phaeochromocytoma). However, von Hippel Lindau's syndrome, neurofibromatosis type 1 and the Carney complex are still part of the MEN spectrum [12,54,57–59].

The gene related to MEN-1 was identified in 1997 and is located on the long arm of chromosome 11 (11q13). It consists of ten exons, spans approximately 9 Kb and encodes a nuclear protein of 610 amino acids, called MENIN or *girl*. Since the characterization of the *MEN-1* gene, different studies have demonstrated multiple mutations causing familial and sporadic MEN-1. Approximately 261 germline mutations were reported in independent families [12,54]. Mutation of the *MEN-1* gene is the most common genetic alteration found in pancreatic neuroendocrine carcinomas (PNC), but with distinctly different frequencies between them; PPoma is present in 18–44% of the cases [60]. In the case of insulinomas (7%), the first genetic key [61] has been revealed. The fact that mutations in *MEN-1* are found in non-functioning PNC is not surprising when considering that non-functioning PNC are common in patients with multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN-1) and higher morbidity and mortality are associated with MEN-1, not to mention that the average life expectancy for patients with these tumors was lower than that of patients with MEN-1 who did not present with PNC tumors. In the last few decades, MEN has aroused special attention, since the inheritance characteristic of these syndromes offers a unique opportunity to the study of genes involved in the process of carcinogenesis [12,62].

Rarely, neuroendocrine tumors are associated with von Hippel Lindau disease, characterized by pancreatic islet tumor, where the PPoma is located. This syndrome is characterized by inactivating mutations of the *VHL* gene (3p25) encoding the elonginprotein [12,54].

6. Diagnosis

The vast majority of non-functional pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs) are diagnosed as a result of nonspecific abdominal pain or symptoms of pancreatic or biliary duct obstruction. Because of this, non-functional PNETs tend to be larger when detected (5.9 cm), have a higher rate of metastasis (60% in general, but rising to 90% in the case of PPoma) and a worse prognosis (33% survival in 5 years) [52].

Neuroendocrine tumors comprise a large family of neoplasms of neuroectodermal origin or pluripotent cells. They are characterized by the presence of neurosecretory granules identified by electron microscopy or by immunohistochemical study of chromogranin, synaptophysin, specific neural enolase or PGP 95 (Protein of the product gene 9.5—Protein Gene Product 9.5). Biomedical evidence shows that abnormal serum concentrations of nonspecific neuroendocrine markers, such as chromogranin A (60–100%), pancreatic polypeptide (PP) (25–70%) and pancreastatin, are the main findings. Chromogranin A, called secretagranin I, is from a group of proteins present in several neuroendocrine tissues, and is a good marker for both neuroendocrine tumors and pancreatic islet cell carcinoma, as well as multiple endocrine neoplasia. The reference range in the serum is from 10 ng/mL to 50 ng/mL. The dosage of chromogranin-A should be assessed annually for follow-up, but this marker is found to be 60–80% higher in patients with neuroendocrine tumors, regardless of the primary site. PP dosage is determined by the radioimmunoassay technique, using plasma

EDTA, with a standard value lower than 300 pg/mL. For the most part, the co-association of elevated PP levels in PNETs and other hormones has maintained its value in the diagnosis and follow-up of patients with functional and non-functional PNETs. Therefore, PP is a good marker to test in all cases of suspected PNET, in addition to the hormones suggested by a clinical syndrome, if present. However, this parameter has some interferences like other PNETs, nesidioblastosis, PP cell hyperplasia and renal dysfunction. Pancreastatin, a pancreatic peptide derived from chromogranin A, has a counter-regulatory effect on insulin action, and is also useful for monitoring the effects of therapy and the progression of PPoma [63]. In this paper, we present the results of a study of the results obtained in the literature based on literature review of PPoma [12,17,18,44,63–66]. Figures 3 and 4 show some immunohistochemical evidence of PPoma cases.

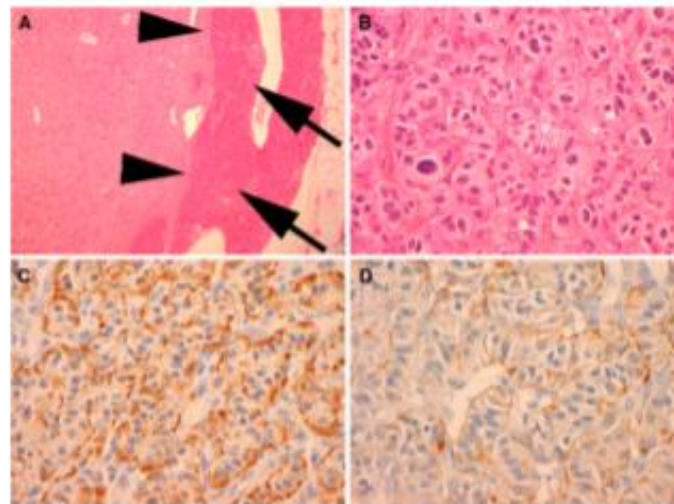


Figure 3. Immunohistochemical (IHC) analysis to PP (Novocastra NCL-PPp, dilution 1/500) (A). All PPomas were not encapsulated but well circumscribed and separated from the adjacent normal pancreas (arrows) by a smooth pseudocapsule (arrow heads) (B). All PPomas exhibit characteristic features typical of neuroendocrine differentiation, including speckled chromatin (“salt and pepper”) and a nested and trabecular architecture. Original H & E 600× amplification (C). All PPomas show strong diffuse positive staining for general markers of neuroendocrine differentiation including chromatin immunohistochemistry. IHC original amplification 600× (D) [30]. All PPomas showed positive labelling for pancreatic peptide by immunohistochemistry. Immunohistochemistry of pancreatic polypeptide, original amplification 600× [30] (Figure 4).

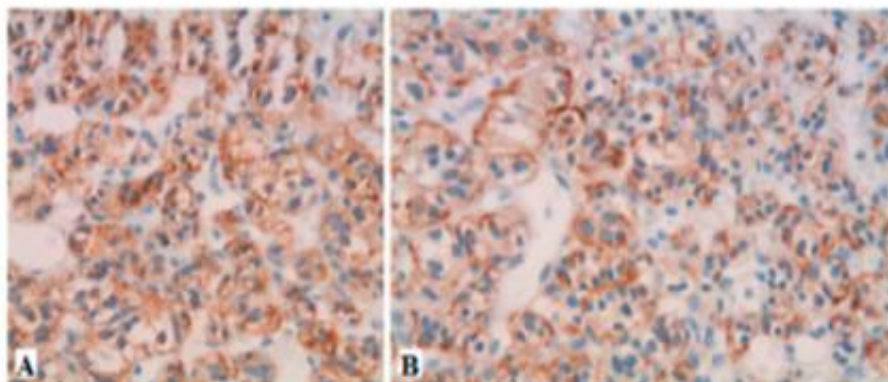


Figure 4. Immunohistochemistry showing strong positive staining for chromogranin A (A) and PP (B) in a case of PPOMA [26].

The use of radiopharmaceuticals to achieve nuclear medicine imaging is the best way to anatomically and functionally identify an organ. This technique allows the characterization of functional and metabolic parameters *in vivo* and in a non-invasive way, by the administration of radiopharmaceuticals ready for use or coupled to other molecules. The information provided may assist in clinical reasoning in several situations in which anatomical imaging methods are limited (e.g., small lymph node infiltration or residual tumor screening after treatment). Thus, the diagnostic applications of nuclear medicine in oncology include the detection and characterization of the primary lesion, staging and control of the therapeutic response [12,67,68].

Radiopharmaceuticals are generally administered via IV (intravenous), awaiting concentration on the target tissue prior to acquisition of the images. The images obtained in the scintillation chamber reflect the distribution of the radiopharmaceutical in the patient and can be flat or tomographic single photon emission tomography (SPECT) [12,69,70].

In the 1960s, in a study of hypothalamic factors, somatostatin [71] was discovered and later identified in the delta cells of the islets of Langerhans and similar cells of the gastrointestinal tract and central nervous system. This hormone is a cyclic peptide containing 14 amino acids (aa) and belongs to a group of peptides including the original somatostatin (S-14), an enlarged molecule of 28 aa (S-28), and an initial 12 aa fragment of somatostatin 28 [S-28 (1–12)] [20]. These bind cellular receptors termed somatostatin receptor (SSTRs) in normal and tumor cells. Five SSTR subtypes were isolated, cloned and sequenced [72], and subtype 2 was found in PPoma [17]. Somatostatin inhibits the release of various hormones such as those from the pancreas [73]. Therapeutic uses of this polypeptide include blocking hormone release in secretory endocrine pancreatic, carcinoid and GH-secreting adenomas [74]. Therefore, knowing these properties, somatostatin analogues (octreotide and lanreotide) are labelled with radioactive substances for the acquisition of SPECT images.

Octreotide conjugated to indium-111-labeled diethylene triaminepentaacetic acid (DTPA) (Octreoscan: ^{111}In -DTPA-octreotide) has a high affinity for somatostatin receptors (mainly subtypes 2 and 5) expressed in several neuroectodermal lineage tumors. This enables positive images to be acquired for PPoma (Figure 5), showing progression of the tumor or new lesions, but other options should be considered for PPoma tumors. The sensitivity of the test is dependent on the expression of somatostatin receptors [12,17,75].

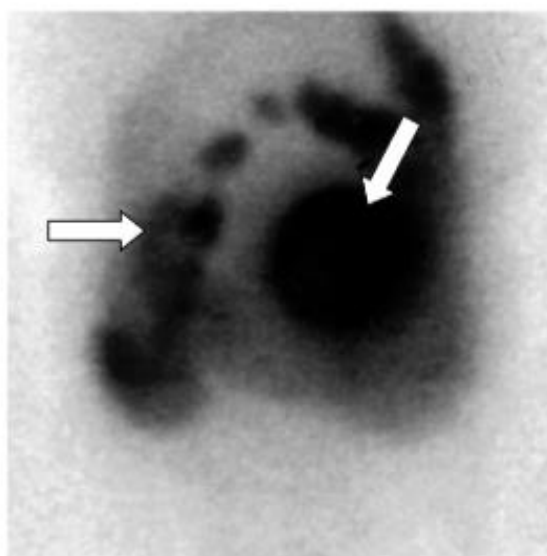


Figure 5. Octreoscan scintigraphy (Octreotide labelled ^{111}In -DTPA-octreotide) showing tumor-free uptake of the pancreatic head (arrows). There is normal absorption of the marker by the liver, spleen, and kidney. Normal excretion of non-intestinal radioactivity is observed [18].

Scintigraphic exams with somatostatin analogues of the pancreas can be performed every three years. These tests are not performed annually because it is known that, mainly in the case of pancreatic tumors, its diagnosis is based almost exclusively on biochemical screening by the detection of Chromogranin-A, since the abnormality of pancreatic hormones precedes the radiological detection of these tumors by at least five years [54].

7. Prognosis

PPoma remains a reserved prognosis neoplasm due to its aggressive biological power, both locally and in relation to the spread of the disease [36]. The poor prognosis of this neoplasm is, in part, related to the difficulty of early detection. When the first symptoms appear, the majority of the patients present at an advanced stage of disease, usually metastatic, where curative surgery is no longer possible [13,76]. In this case, we pay attention to some initial symptoms, such as epigastric malaise, diarrhea or jaundice is crucial and should not be neglected [12,13,17,33,76].

Surgical resection is only performed in approximately 20% of cases, although it is the treatment of choice. Surgeries for tumor volume reduction are also performed to alleviate the effects of mass and malignant behavior. Complementary therapies are generally ineffective. Unfortunately, there is currently no sensitive and effective screening test for the early detection of PPoma or even to identify individuals predisposed to the development of this neoplasia [14,18,36].

8. Staging

Staging must be performed from two anatomical and functional points of view, besides TNM. Anatomic staging should be performed by computed tomography (CT) of the thorax, abdomen and pelvis, and nuclear magnetic resonance imaging (MRI) of the liver may be useful in the characterization of liver metastases (Figures 6–8). Upper digestive endoscopy with ultrasonography (US) helps to detect small lesions, allowing needle biopsy. Octreoscan, restricted to some centers, is an important staging test, and is important for *in vivo* evaluation of tumor expression of somatostatin type 2 receptors. In-111-labeled octreotide scintigraphy in combination with conventional imaging (CT or MRI), has improved the detection of primary and metastatic lesions, as well as selecting patients for radioactive therapies. However, research aimed at early detection should be an incentive for PPoma because of its high degree of malignancy. In patients with suspected MEN-1, US is used for evaluation of the parathyroid, since 90–97% of patients with this syndrome have primary hyperparathyroidism. Bone scintigraphy should be performed in patients with suspected bone metastases [17,68,77,78].



Figure 6. CT scan showing a PPoma of the head (solid arrow) of the pancreas causing pancreatic duct dilation (dashed arrow). The tumor is a discrete lesion, with well-defined borders, and shows contrast enhancement in the arterial phase [30].

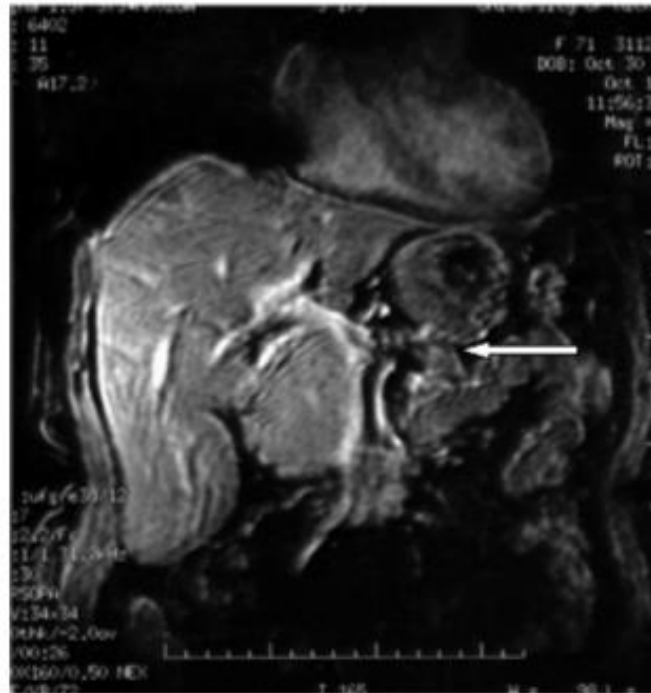


Figure 7. 3D axial magnetic resonance imaging showing pancreatic polypeptide-producing tumors in the head of the pancreas (arrow) [18].

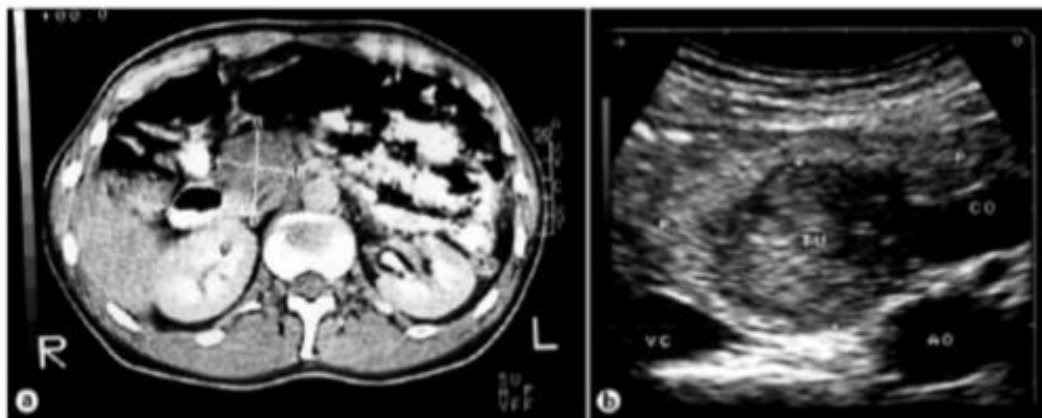


Figure 8. (a) Computed tomography of the abdomen showing a tumor of the pancreas 4.2×3.3 cm in size. (b) Intraoperative ultrasound showing a hypoechoic tumor [26].

Functional staging involves plasma chromogranin A, which is increased in about 80% of cases, regardless of whether the tumor is functioning or not. This marker correlates well with the hormonal secretion of the tumor, and may not be related to the tumor mass. Its elevation may anticipate tumor growth detected by imaging tests. In addition, the pancreatic polypeptide-specific polypeptide should be dosed. Calcium and serum phosphorus, parathyroid hormone (PTH) and urinary calcium for characterization of hyperparathyroidism (present in MEN-1 in more than 90% of cases) should be performed at least once at diagnosis [17,52,78].

The first results published by the National Cancer Institute's SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results) program separated tumors by localized extension, regional extension or with distant metastases; these parameters were fundamental to initiate the first classification systems of

neuroendocrine tumors NET) [79]. In 2006, a work group of the European Society of Neuroendocrine Tumors (ENETS_European Neuroendocrine Tumor Society) [80] developed and published a proposal for TNM classification of neuroendocrine tumors (NET) of the anterior intestine (stomach, duodenum and pancreas). This was the first TNM (Tumor, Nodes, Metastasis) classification to be developed for NETs that takes into account the distinctive growth patterns of these tumors and differentiates these tumors from other gastroenteropancreatic carcinomas (GEP). These classification systems complemented the WHO classification of GEP-NETs, using some aspects that had already been recognized as prognostically relevant. In the years following the publication of these proposed TNM classifications, the GEP-NET classifications of the previous gut and particularly pancreatic NETs were validated by several studies, and their biological relevance and the power to discriminate between the prognostic groups was broadly confirmed [81].

Later in 2009, the seventh edition of the TNM staging manual was published by the American Joint Committee on Cancer (AJCC) and the International Union Against Cancer (UICC) for all tumors, also including NET of all tumor sites, such as TNM of gastrointestinal carcinoids and pancreatic neuroendocrine tumors, which had not previously been included in the AJCC/UICC staging classifications. However, the seventh edition of the AJCC/UICC TNM classification does not apply to high-grade neuroendocrine carcinomas (large and small cells) and does not exactly follow the ENETS classifications for some anatomical sites, especially for tumors of the pancreas, stomach and appendix, although both TNM classifications overlap in the great majority [82]. No data are presented to justify the use of different staging parameters. The result is that there are now two parallel systems, each of which uses identical TNM terminology, but may refer to different types and extensions of disease for particular NETs. This discrepancy leads to much confusion among clinicians and probably limits the ability to compare research studies that use TNM staging as a prognostic factor or to stratify treatment [81].

Specifically, the AJCC/UICC and ENETS scores differ in the definitions of T stages for pancreatic tumors (Table 2). The ENETS system is widely used in Europe; in the United States of America, many professionals are already required to use the AJCC/UICC system. The confusion that will arise from these parallel systems is a problem. When a TNM classification is being applied in practice, it is important, therefore, to make clear which classification is being used. Another point is that, given the differences in these two systems, it is critical to document the underlying characteristics that contribute to the T-stage (tumor size, extent of invasion, etc.) classification in the pathology reports to allow translation between the ENETS and AJCC/UICC classifications [81]. Therefore, it is recommended that the pathologist's report show, in addition to the TNM classification system, its basis for classification, which essentially includes the size of the tumor and the level of invasion [83].

Table 2. Comparison of the criteria for the T category in the ENETS and UICC TNM classifications of pancreatic neuroendocrine tumors [81].

TNM	ENETS	AJCC/UICC
T1	Confined to pancreas, <2 cm	Confined to pancreas, <2 cm
T2	Confined to pancreas, 2–4 cm	Confined to pancreas, >2 cm
T3	Confined to pancreas, >4 cm, or invasion of duodenum or bile duct	Peripancreatic spread, but without major vascular invasion (superior celiac or mesenteric vessels)
T4	Invasion of adjacent organs or major vessels	Major vascular invasion (celiac axis or the superior mesenteric artery)

9. Treatment

Surgery and chemotherapy are treatment options that aim to prolong survival and/or alleviate symptoms, but rarely produce a cure [14]. Thus, to define the treatment strategy for neuroendocrine tumors, the characteristics of tumor resectability are characterized, regardless of the condition of asymptomatic or symptomatic patients. PPomais are usually included in the classification of

metastatic tumors and resectability, depending on the size of the tumor to be classified as resectable or unresectable. Resectable metastatic tumor resection of hepatic metastasis is curative and they present five-year survival in 70%; however, the use of somatostatin analogues is controversial. For metastatic and unresectable tumors, treatment will depend on the symptoms. If the patient is asymptomatic, somatostatin analogues will be used, although this is considered controversial when one suspects the progression of the disease. There are studies that show an improvement of symptoms with the use for short periods of time (less than three months). The symptomatic symptom control is mandatory [17,18,60].

Due the lack of early symptoms, patients with non-functional endocrine tumors of the pancreas (PNET) tend to present with much larger lesions than with functional tumors (4 cm vs. 1.9 cm) and, consult doctors in the late stages. Therefore, at the time of diagnosis, advanced metastatic disease is present [13,20,84–86]. For this reason, one study demonstrated that the five-year survival of malignant PNETs was lower in non-functional tumors (29%) than in functional tumors (41%) [87].

Unfortunately, curative surgical resection can only be performed in a minority of patients with pancreatic cancer (about 20%), since most have metastatic disease at diagnosis; in cases of PPoma, this percentage drops to less than 10% of eligible patients [10,13]. There are reports of cases of resection of PPoma tumors that present a well-defined solitary mass with benign histological characteristics resulting in good long-term survival (Figure 9) [25]. It is worth noting that total pancreatectomy, although resulting in a cure, is not indicated as it results in diabetes mellitus and exocrine pancreatic insufficiency. This procedure is only acceptable in patients from families with a high incidence of metastatic disease, because in this case, despite the consequences, total pancreatectomy can prevent early death [54]. There is also indication for cases of neuroendocrine tumors associated to MEN-1 [88,89]. It is important to emphasize that in patients with PPoma, they usually have distant metastasis, especially in the liver, meaning that they are considered incurable and therefore considered inoperable most of the time [12,13,17]. Another strategy is to submit patients to adjuvant chemotherapy (and sometimes radiation) treatment in order to reduce the risk of recurrence [14].

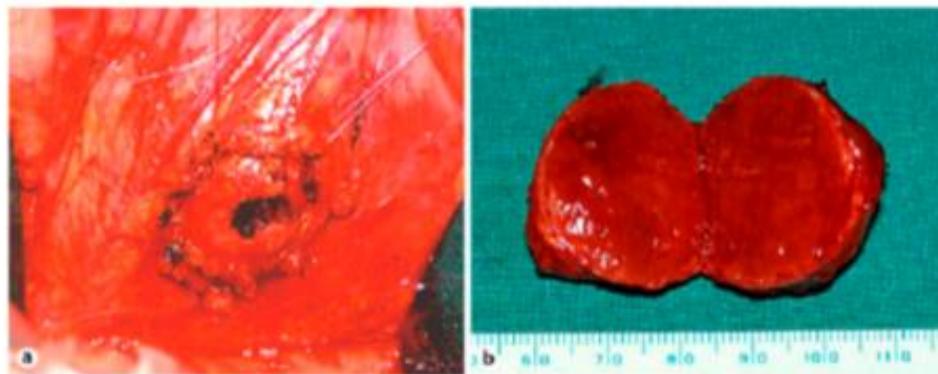


Figure 9. (a) Situsintra-operators showing the tumor before enucleation. The tumor is flanked by four sutures that attach and enucleate from the surrounding tissue. (b) Specimen showing tumor 3 cm in diameter [26].

Recently, the technique of minimally invasive pancreatoduodenectomy (MIPS) as a laparoscopic pancreatoduodenectomy (LPD), has become a safe and viable alternative for benign tumors. However, this technique cannot be used for tumors in the head of the pancreas (where PPoma is located). The main concern regarding MIPS relies in blood loss, and although alternative, is a traumatic surgery proceeding [90].

With the identification of the *MEN-1* gene and mutations causing this syndrome, it was believed that it would be possible to identify the mutations associated with the malignancy of the pancreatic tumors and to identify patients at high risk of developing metastatic disease. However,

mutational analysis of hundreds of families around the world did not demonstrate any significant phenotype–genotype correlation [91]. For the reasons mentioned above, the surgical goal is to remove the maximum tumor mass without a loss of pancreatic function [54]. In addition, tumor resection has shown an improvement or resolution of tumor-borne diabetes mellitus [52].

Since liver metastasis is common in PPoma, liver resection may be considered for localized disease without compromising organ function or extensive metastasis beyond the liver. Due to the indolent nature of most pancreatic neuroendocrine tumors, liver resection can lead to both long-term symptom relief and increased survival [12]. However, some authors consider treating patients with liver metastases to be somewhat controversial. In non-functional tumors less than 2 cm in diameter associated with MEN-1, surgery is not recommended [87].

In patients with predominantly hepatic disease, one strategy is embolization of the hepatic artery for those patients who are not candidates for surgery, observing response rates higher than 50%, although this is fleeting [12]. Thus, the combination of cytotoxic chemotherapy and local ischaemia, i.e., chemoembolisation, was evaluated in several studies. Symptomatic responses were obtained in most patients, whereas tumor shrinkage was observed in about half of patients with progressive disease prior to chemoembolisation [92]. Therefore, this procedure, which results in the ischaemia and necrosis of tumor tissue, has been useful for the reduction of hormonal hypersecretion syndromes [54]. The results of embolization show that symptom control and tumor growth occur in 90% of cases, leading to a five-year survival of up to 40%, and median survival of up to 32 weeks [12].

In cases where curative surgery is not possible, the debulking type should be considered. The advantages of cytoreduction (resection of up to 90% of the tumor volume must be achieved) include the reduced production of hormones by the tumor, control of symptoms and a decrease in tumor mass for the optimization of systemic chemotherapy doses. Clinical remission can be induced by palliative surgery, so the presence of lymph node and/or hepatic metastases is not necessarily a contraindication to surgery, obviously in the individual context of each patient. Thus, the cytoreduction of hepatic metastases with palliative intent to control symptoms increases median survival by 3–4 times, as well as providing excellent symptom control [12,93].

Radiofrequency ablation or cryoablation can be used for solitary liver lesions. Although less morbid, they can only be used in small lesions. Radiofrequency ablation in tumors <5 cm in size have shown 70–80% symptomatic responses with the control of symptoms for up to a year [17,85,94].

When surgical intervention is not indicated or when it does not result in the control of hormonal hypersecretion, patients are treated with drug therapy. This includes somatostatin analogues (octreotide and lanreotide), which have the power to inhibit the secretion of virtually all hormones, and from more specific treatments, which is not the case with PPoma [54]. Octreotide acts on somatostatin 2 and 5 receptors, inhibiting the release of neurohormones. It promotes optimal symptomatic control, with a significant improvement in the quality of life by up to 80%, a biochemical response of up to 70% and tumor stabilization in up to 20% of progression cases. However, the objective radiological decrease of the tumor occurs in less than 10% of cases. Therefore, the use of somatostatin analogues such as octreotide is highly effective in controlling signs and symptoms. Although octreotide may also decrease tumor size, evidence of its objective relationship is rare. Regarding the administration of octreotide, there is a need for reapplication every 8 h, which was supplanted by the availability of the deposit presentation, Sandostatin LAR[®], which can be applied on a monthly basis. Long-term octreotide is initiated at a dose of 20 mg IM (intramuscular), with a gradual increase to the dose that is necessary for symptom relief after a period of sensitization. It is generally well tolerated; however, it has some side effects, such as nausea, abdominal discomfort, diarrhea and malabsorption of fats, which are mostly self-limited. In a randomized study, Sandostatin LAR[®] at 10, 20 and 30 mg monthly doses was compared to daily octreotide SC (subcutaneous) (0.3–0.9 mg/day). The efficacy was similar in all groups in relation to control of the number of episodes of diarrhea ($p > 0.72$), and the 20 mg/month dose showed the best control of hot flushes. In patients who maintain symptoms at the

dose of Sandostatin LAR 20 mg/month, dose escalation seems to rescue patients with initially resistant disease [12,17,95,96].

Systemic chemotherapy is used in patients with progressive metastatic disease. In this condition, patients with pancreatic islet tumors, where the PPoma is located, are more sensitive to systemic chemotherapy and therefore this is the treatment of choice. The chemotherapeutic agents used include streptozocin, doxorubicin, 5-fluorouracil (5-FU), dacarbazine and cyclophosphamide, but the responses are modest. The combination of streptozocin and doxorubicin is currently the chemotherapeutic regimen of choice; when compared to streptozocin alone, this combination improves the objective response from 36% to 65%, increases the mean duration of response to 20 months, and increases survival. Schemes combining doxorubicin and streptozotocin, with or without 5-FU, for four to six cycles, produce objective response rates ranging from 6% to 45%. Other agents such as taxanes and gemcitabine are relatively inactive in neuroendocrine tumors. Dacarbazine appears to be the single most active agent and is a good option for debilitated patients. In a phase II study of the Eastern Cooperative Oncology Group with 42 patients, an objective response rate of 33% was achieved. Like temozolamide, an alkylating agent was developed as a less toxic oral regimen than that of dacarbazine in a phase II study published in the *Journal of Clinical Oncology* in 2006, where twenty-nine patients were treated with a combination of temozolamide and showed a radiological response rate of 45%, which is comparable to that of studies of dacarbazine and streptozocin. It is important to emphasize that objective responses with chemotherapy can take up to four months to be documented [54,97,98].

Complete responses to chemotherapy treatment are rare and the vast majority of patients show recurrence. For this reason, and since it is generally an indolent process, chemotherapy should only be initiated when periodic monitoring demonstrates significant progression [54]. Against this background, new therapeutic approaches are being studied, such as the use of “target radiotherapy” and regimens incorporating the use of angiogenesis and tyrosine kinase inhibitors, such as sunitinib and gefitinib (Table 3). Sunitinib has been available in Brazil since 2006, and is used in the daily dose of 50 mg, VO (via oral), for four consecutive weeks every six weeks [12]. Therefore, when chemotherapy (sometimes along with a target therapy drug) prolongs survival for advanced disease, clinical trials are needed to further improve survival, and are currently in progress for several new agents [14].

Table 3. Studies with new target therapies for neuroendocrine tumors.

Agent	Target	Patients	Response	PFS or TFP
Sunitinib	PDGFR; RET	66	17%	33 weeks (TFP)
Gefitinib	EGFR	31	6%	No response
Everolimus	mTOR	13	15%	No response
Temsirolimus	mTOR	15	7%	No response

PFS: Progression-free survival; TFP: Time for progression.

In patients with octreotide (Octreotide-labelled Octreotide 111) hypercapitation, especially when this uptake is greater than that of the hepatic parenchyma, the use of radioactive molecules coupled to a somatostatin analogue becomes a very attractive option. There are currently three radioactive compounds with different characteristics: 111-In-octreotide, 90-Y-octreotide and 177-Lu-octeotate. 111-In-octreotide has a lower tissue penetration, but in a small study with 16 patients (most with carcinoids) it showed a clinical benefit in 70% of the cases, for at least six months after the last application. In 30% of patients, the clinical benefit persisted for 18 months, without significant toxicities. 90-Y-octreotide has higher energy and, therefore, greater tissue penetration. Partial responses of the order of 8–29% were recently reported [12]. The most promising analogue appears to be 177-Lu-octreotide. Another study demonstrated that the octreotide somatostatin analogue has an affinity for somatostatin subtype 2 receptor that is nine times greater than octreotide. Using 177-Lu-octreotide in 131 patients with neuroenteropancreatic tumors resulted in a 2% partial response, with a median duration of response exceeding 36 months. In addition, a smaller response (reduction between 25% and 50%) was observed in more than 19% of the patients treated [99].

10. Conclusions

It is already fully accepted that the development of cancer involves the accumulation of genetic alterations. Knowledge and understanding of the genetic basis of cancer were mainly results of the rapid progress in molecular engineering.

Studies of the biology of pancreatic cancer have increased intensely making it very well-characterized. The demonstration that ductal adenocarcinoma presents distinct molecular characteristics compared to non-ductal and neuroendocrine tumors has important implications for the development of genetic tests, as well as for early diagnosis and prognostic markers.

Although there has been substantial progress in diagnostic imaging methods such as helical CT, endoscopic ultrasound associated with tumor markers and SPECT, there has been no significant improvement in cure rates in recent years.

It is hoped that with the prospect and availability of new technologies and the constant contributions of researchers in many related disciplines, we will obtain better results, not only for prevention and early diagnosis, but also to cure this fatal disease.

Against this background, PPoma has advanced from one of the most difficult objects of study, for which there was previously little genetic knowledge, to one of the best characterized human tumors. Therefore, the development of new diagnostic, preventive and treatment modalities requires an understanding of the molecular mechanisms of the complex multi-stage processes of tumorigenesis of the pancreas; research into these fields must therefore be performed.

Acknowledgments: The authors would like to thank the National Scientific and Technological Research Council (CNPQ).

Author Contributions: Ralph Santos-Oliveira: Study conception and design; Acquisition of data; Analysis and interpretation of data; Drafting of manuscript; Critical revision. Thais Braga Ligeró: Study conception and design; Acquisition of data; Analysis and interpretation of data; Drafting of manuscript; Critical revision.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Busnardo, A.C.; DiDio, L.J.; Tidrick, R.T.; Thomford, N.R. History of the pancreas. *Am. J. Surg.* **1983**, *146*, 539–550. [[CrossRef](#)]
2. Ceranowicz, P.; Cieszkowski, J.; Warzecha, Z.; KuVnierz-Cabala, B.; Dembiński, A. The Beginnings of Pancreatology as a Field of Experimental and Clinical Medicine. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 128095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Vinik, A.; Feliberti, E.; Perry, R.R. Pancreatic Polypeptide (PPoma). In *Source Endotext*; De Groot, L.J., Chrousos, G., Dungan, K., Feingold, K.R., Grossman, A., Hershman, J.M., Koch, C., Korbonits, M., McLachlan, R., New, M., et al., Eds.; MDText.com, Inc.: South Dartmouth, MA, USA, 2017.
4. Talmon, G.A.; Wren, J.D.; Nguyen, C.L.; Pour, P.M. Pancreatic Polypeptide Cell Proliferation in the Pancreas and Duodenum Coexisting in a Patient with Pancreatic Adenocarcinoma Treated with a GLP-1 Analog. *Pancreas* **2017**, *46*, 820–824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*, 7th ed.; Kumar, V., Abul, K., Abbas, N.F., James, A.P., Eds.; Elsevier Saunders: Philadelphia, PA, USA, 1999.
6. Brereton, M.F.; Vergari, E.; Zhang, Q.; Clark, A. Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? *J. Histochem. Cytochem.* **2015**, *63*, 575–591. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Ceranowicz, P.; Warzecha, Z.; Dembinski, A. Peptidyl hormones of endocrine cells origin in the gut—Their discovery and physiological relevance. *J. Physiol. Pharmacol.* **2015**, *66*, 11–27. [[PubMed](#)]
8. Adkisson, C.D.; Stauffer, J.A.; Bowers, S.P.; Raimondo, M.; Wallace, M.B.; Riegert-Johnson, D.L.; Asbun, H.J. What extent of pancreatic resection do patients with MEN-1 require? *JOP J. Pancreas* **2012**, *13*, 402–408.
9. Robbins, S.L.; Cotran, R.S.; Kumar, V.; Schoen, F.J. *Patologia Estrutural e Funcional*, 6th ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, Brazil, 2000.

10. Chance, R.; Jones, W. Polypeptides from Bovine, Ovine, Human and Porcine Pancreas. U.S. Patent 3,842,063, 15 October 1974.
11. Kimmel, J.R.; Pollock, H.G.; Hazelwood, R.L. Isolation and characterization of chicken insulin. *Endocrinology* **1968**, *83*, 1323–1330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Guimarães, J.R.Q. *Manual de Oncologia*; BBS: Rio de Janeiro, Brazil, 2008.
13. Jensen, R.T. Endocrine tumors of the gastrointestinal tract and pancreas. In *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 17th ed.; Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J.L., Loscalzo, J., Eds.; McGraw-Hill Medical Publishing Division: New York, NY, USA, 2008; pp. 2347–2358.
14. Society, A.C. *Cancer Facts & Figures 2017*; American Cancer Society: Atlanta, GA, USA, 2017.
15. Kloppel, G.; Perren, A.; Heitz, P.U. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: The WHO classification. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, *1014*, 13–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Gomes, J.M.L.T. *Pancreas: Um Órgão Único com Duas Partes*; University of Porto: Porto, Portugal, 1992.
17. Zaknun, J.J.; Bodei, L.; Mueller-Brand, J.; Pavel, M.E.; Baum, R.P.; Hörsch, D.; O'Dorisio, M.S.; O'Dorisio, T.M.; Howe, J.R.; Cremonesi, M.; et al. The joint IAEA, EANM, and SNMMI practical guidance on peptide receptor radionuclide therapy (PRRT) in neuroendocrine tumors. *Eur. J. Nuclear Med. Mol. Imaging* **2013**, *40*, 800–816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Mullan, M.H.; Gauger, P.G.; Thompson, N.W. Endocrine tumors of the pancreas: Review and recent advances. *ANZ J. Surg.* **2001**, *71*, 475–482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Oberg, K.; Eriksson, B. Endocrine tumors of the pancreas. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2005**, *19*, 753–781. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Davies, K.; Conlon, K.C. Neuroendocrine tumors of the pancreas. *Curr. Gastroenterol. Rep.* **2009**, *11*, 119–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Chang, M.C.; Wu, C.H.; Yang, S.H.; Liang, P.C.; Chen, B.B.; Jan, I.S.; Chang, Y.T.; Jeng, Y.M. Pancreatic cancer screening in different risk individuals with family history of pancreatic cancer—a prospective cohort study in Taiwan. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 357–369. [[PubMed](#)]
22. Das, K.K.; Early, D. Pancreatic Cancer Screening. *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* **2017**, *44*, 109–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lindquist, C.M.; Miller, F.H.; Hammond, N.A.; Nikolaidis, P. Pancreatic cancer screening. *Abdom. Radiol.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil*; INCA: Rio de Janeiro, Brazil, 2015.
25. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Dados de Incidência e Mortalidade. Available online: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pancreas> (accessed on 23 January 2017).
26. Amrilleva, V.; Slater, E.P.; Waldmann, J.; Bonorden, D.; Fendrich, V. A Pancreatic Polypeptide-Producing Pancreatic Tumor Causing WDHA Syndrome. *Case Rep. Gastroenterol.* **2008**, *2*, 238–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. De Lellis, R.A. *Pathology and Genetics of Tumors of Endocrine Organs*; IARC Press: Lyon, France, 2004.
28. Catts, Z.A.; Baig, M.K.; Milewski, B.; Keywan, C.; Guarino, M.; Petrelli, N. Statewide Retrospective Review of Familial Pancreatic Cancer in Delaware, and Frequency of Genetic Mutations in Pancreatic Cancer Kindreds. *Ann. Surg. Oncol.* **2016**, *23*, 1729–1735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Mastoraki, A.; Chatzimavridou-Grigoriadou, V.; Chatzipetrou, V.; Mastoraki, S.; Papanikolaou, I.S.; Dianas, N.; Smyrniotis, V.; Arkadopoulos, N. Familial Pancreatic Cancer: Challenging Diagnostic Approach and Therapeutic Management. *J. Gastrointest. Cancer* **2014**, *45*, 256–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Kuo, S.C.; Gananadha, S.; Scarlett, C.J.; Gill, A.; Smith, R.C. Sporadic pancreatic polypeptide secreting tumors (PPomas) of the pancreas. *World J. Surg.* **2008**, *32*, 1815–1822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *ABC Do Câncer: Abordagens Básicas Para o Controle do Câncer/ABC of Cancer: Basic Approaches to the Cancer Control*, 2nd ed.; INCA: Rio de Janeiro, Brazil, 2012.
32. Ehehalt, F.; Saeger, H.D.; Schmidt, C.M.; Grützmann, R. Neuroendocrine Tumors of the Pancreas. *Oncologist* **2009**, *14*, 456–467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. American Cancer Society. Cancer Statistics 2017 Slide Presentation (PPT). Available online: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html> (accessed on 4 February 2017).

34. American Cancer Society. Pancreatic Cancer Overview. 2015. Available online: www.cancer.org (accessed on 20 January 2017).
35. American Cancer Society. Signs and Symptoms of Pancreatic Cancer. Available online: <http://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/detection-diagnosis-staging/signs-and-symptoms.html> (accessed on 25 January 2017).
36. Lillemoe, K.D.; Yeo, C.J.; Cameron, J.L. Pancreatic cancer: State-of-the-art care. *CA Cancer J. Clin.* **2000**, *50*, 241–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Maisonneuve, P.; Lowenfels, A.B. Epidemiology of pancreatic cancer: An update. *Dig. Dis.* **2010**, *28*, 645–656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Siegel, R.L.; Jacobs, E.J.; Newton, C.C.; Feskanich, D.; Freedman, N.D.; Prentice, R.L.; Jemal, A. Deaths Due to Cigarette Smoking for 12 Smoking-Related Cancers in the United States. *JAMA Intern. Med.* **2015**, *175*, 1574–1576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Wu, Q.J.; Wu, L.; Zheng, L.Q.; Xu, X.; Ji, C.; Gong, T.T. Consumption of fruit and vegetables reduces risk of pancreatic cancer: Evidence from epidemiological studies. *Eur. J. Cancer Prev.* **2016**, *25*, 196–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Yao, J.C.; Hoff, P.M.; Hoff, A.O. *Neuroendocrine Tumors*; Humana Press: New York, NY, USA, 2011.
41. Milan, S.A.; Yeo, C.J. Neuroendocrine tumors of the pancreas. *Curr. Opin. Oncol.* **2012**, *24*, 46–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Boyd, C.A. Amine uptake and peptide hormone secretion: APUD cells in a new landscape. *J. Physiol.* **2001**, *531*, 581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Rosai, J. The origin of neuroendocrine tumors and the neural crest saga. *Modern Pathol.* **2011**, *24*, S53–S57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Santos, A.P. Tumores Neuroendócrinos: Requisitos Mínimos para o Diagnóstico Clínico. *Revista Portuguesa de Cirurgia* **2011**, *16*, 28–34.
45. Costa, O.L.; Zago, M.P.; Santos, M.C.S.; Musso, C.; Louro, I.D. Apudomas pancreáticos: Um desafio para clínicos e cirurgiões. *Rev. Col. Bras. Cir.* **2002**, *29*, 19–24. [[CrossRef](#)]
46. Rindi, G.A.R.; Bosman, F.T.; Capela, C.; Klimstra, D.S.; Kloppel, G.; Komminoth, P.; Solcia, E. Nomenclature and classification of neuroendocrine neoplasms of the digestive system. In *WHO Classification of Tumors of the Digestive System*, 4th ed.; Bosman, T.F., Carneiro, F., Hruban, R.H., Theise, N.D., Eds.; International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, France, 2010.
47. Klimstra, D.S. Nodular neoplasms of the pancreas. *Modern Pathol.* **2007**, *20*, S94–S112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Gustafsson, B.I.; Kidd, M.; Chan, A.; Malfertheiner, M.V.; Modlin, I.M. Bronchopulmonary neuroendocrine tumors. *Cancer* **2008**, *113*, 5–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Khan, M.S.; Luong, T.V.; Watkins, J.; Toumpanakis, C.; Caplin, M.E.; Meyer, T. A comparison of Ki-67 and mitotic count as prognostic markers for metastatic pancreatic and midgut neuroendocrine neoplasms. *Br. J. Cancer* **2013**, *108*, 1838–1845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Ter-Minassian, M.; Chan, J.A.; Hooshmand, S.M.; Brais, L.K.; Daskalova, A.; Heafield, R.; Buchanan, L.; Qian, Z.R.; Fuchs, C.S.; Lin, X. Clinical presentation, recurrence, and survival in patients with neuroendocrine tumors: Results from a prospective institutional database. *Endocr. Relat. Cancer.* **2013**, *20*, 187–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Maxwell, J.E.; O'Dorisio, T.M.; Bellizzi, A.M.; Howe, J.R. Elevated pancreatic polypeptide levels in pancreatic neuroendocrine tumors and diabetes mellitus: Causation or association? *Pancreas* **2014**, *43*, 651–656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Maxwell, J.E.; O'Dorisio, T.M.; Howe, J.R. Biochemical Diagnosis and Preoperative Imaging of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **2016**, *25*, 171–194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Wermer, P. Genetic aspects of adenomatosis of endocrine glands. *Am. J. Med.* **1954**, *16*, 363–371. [[CrossRef](#)]
54. Hoff, A.O.; Hauache, O.M. Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1: Diagnóstico Clínico, Laboratorial e Molecular e Tratamento das doenças Associadas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* **2005**, *49*, 735–746. [[CrossRef](#)]
55. Guimarães, J. Neoplasias Endócrinas Múltiplas. *Acta Med. Port.* **2007**, *20*, 7.
56. Sherman SI GR. Multiple endocrine neoplasias and autoimmune endocrinopathies. In *Harrison's Endocrinology*; Vasquez, C.J., Gagel, R.F., Eds.; McGraw-Hill: New York, NY, USA, 2006; pp. 387–399.

57. Lourenço, D.M., Jr.; Toledo, R.A.; Toledo, S.P.; Nunes, A.B.; Ezabella, M.C.; Hayashida, C.Y. Neoplasia Endócrina Múltipla. In *Tratado de Clínica Médica*; Antonio Carlos Lopes, V.A., Ed.; Roca: São Paulo, Brazil, 2006; Volume 2, pp. 3535–3548.
58. Mesquita, J.; Varela, A.; Medina, J.L. Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1 Multiple Endocrine Neoplasia type 1. *Rev. Port. Endocrinol. Diabetes Metab.* **2009**, *2*, 10.
59. Pieterman, C.R.; Vriens, M.R.; Dreijerink, K.M.; Van der Luijt, R.B.; Valk, G.D. Care for patients with multiple endocrine neoplasia type 1: The current evidence base. *Fam. Cancer* **2011**, *10*, 157–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Barakat, M.T.; Meeran, K.; Bloom, S.R. Neuroendocrine tumors. *Endocr. Relat. Cancer* **2004**, *11*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Gumbs, A.A.; Moore, P.S.; Falconi, M.; Bassi, C.; Beghelli, S.; Modlin, I.; Scarpa, A. Review of the clinical, histological, and molecular aspects of pancreatic endocrine neoplasms. *J. Surg. Oncol.* **2002**, *81*, 45–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Falchetti, A.; Marini, F.; Luzi, E.; Giusti, F.; Cavalli, L.; Cavalli, T.; Brandi, M.L. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): Not only inherited endocrine tumors. *Genet. Med.* **2009**, *11*, 825–835. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Sanchez-Margalet, V.; Gonzalez-Yanes, C.; Najib, S. Pancreastatin, a chromogranin A-derived peptide, inhibits DNA and protein synthesis by producing nitric oxide in HTC rat hepatoma cells. *J. Hepatol.* **2001**, *35*, 80–85. [[CrossRef](#)]
64. Falconi, M.; Bartsch, D.K.; Eriksson, B.; Klöppel, G.; Lopes, J.M.; O'Connor, J.M.; Salazar, R.; Taal, B.G.; Vullierme, M.P.; O'toole, D. ENETS Consensus Guidelines for the management of patients with digestive neuroendocrine neoplasms of the digestive system: Well-differentiated pancreatic non-functioning tumors. *Neuroendocrinology* **2012**, *95*, 120–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Ito, T.; Igarashi, H.; Jensen, R.T. Pancreatic neuroendocrine tumors: Clinical features, diagnosis and medical treatment: Advances. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2012**, *26*, 737–753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Krampitz, G.W.; Norton, J.A. Pancreatic neuroendocrine tumors. *Curr. Probl. Surg.* **2013**, *50*, 509–545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Sergieva, S. Clinical Applications of SPECT-CT in Oncology. *World J. Nuclear Med.* **2011**, *10*, 142–177.
68. Sapienza, M.T.; Buchpieguel, C.; Hironaka, F.H. *Medicina Nuclear em Oncologia*; Editora Atheneu: São Paulo, Brazil, 2008.
69. Saha, G.B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 6th ed.; Springer: New York, NY, USA, 2010.
70. Gutfilen, B.; Valentini, G. Radiopharmaceuticals in nuclear medicine: Recent developments for SPECT and PET studies. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 426892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Krulich, L.; Dhariwal, A.P.; McCann, S.M. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary in vitro. *Endocrinology* **1968**, *83*, 783–790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Bauer, W.; Briner, U.; Doepfner, W.; Haller, R.; Huguenin, R.; Marbach, P.; Petcher, T.J.; Pless, J. SMS 201–995: A very potent and selective octapeptide analogue of somatostatin with prolonged action. *Life Sci.* **1982**, *31*, 1133–1140. [[CrossRef](#)]
73. O'Dorisio, T.M.; Redfern, J.S. Somatostatin and somatostatin-like peptides: Clinical research and clinical applications. *Adv. Endocrinol. Metab.* **1990**, *1*, 175–230.
74. Ratner, B.D.; Hoffman, A.S.; Schoen, F.J. *Biomaterials Science—Introduction to Materials in Medicine*, 1st ed.; Elsevier: London, UK, 2004.
75. Ovalles, M.A.; Vera, L.; Olivieri, M.B. Diagnóstico y tratamiento de tumores neuroendocrinos productores de acth. *Rev. Venez. Endocrinol. Metab.* **2014**, *12*, 2.
76. Ferreira, C.G.; Rocha, J.C.C. *Oncologia Molecular*, 1st ed.; Editora Atheneu: São Paulo, Brazil, 2004.
77. Brandi, M.L.; Gagel, R.F.; Angeli, A.; Bilezikian, J.P.; Beck-Peccoz, P.; Bordi, C.; Conte-Devolx, B.; Falchetti, A.; Gheri, R.G.; Libroia, A.; et al. Consensus: Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, *86*, 5658–5671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Ziessman, H.A.; O'Malley, J.P.; Thrall, J.H.; Fahey, F.H. *Medicina Nuclear*, 4th ed.; Elsevier: Rio de Janeiro, Brazil, 2015.
79. Kloppel, G. Classification and pathology of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr.-Relat. Cancer* **2011**, *18*, S1–S16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

80. Rindi, G.; Kloppel, G.; Alhman, H.; Caplin, M.; Couvelard, A.; De Herder, W.W.; Eriksson, B.; Falchetti, A.; Falconi, M.; Komminoth, P.; et al. TNM staging of foregut (neuro)endocrine tumors: A consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch.* **2006**, *449*, 395–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Kloppel, G.; Rindi, G.; Perren, A.; Komminoth, P.; Klimstra, D.S. The ENETS and AJCC/UICC TNM classifications of the neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract and the pancreas: A statement. *Virchows Arch.* **2010**, *456*, 595–597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Sobin, L.H.; Gospodarowicz, M.K.; Wittekind, C. *UICC: TNM Classification of Malignant Tumors*, 7th ed.; Wiley-Blackwell: Oxford, UK, 2009.
83. Garcia-Carbonero, R.; Imenez-Fonseca, P.; Teule, A.; Barriuso, J.; Sevilla, I. Spanish Society for Medical O. SEOM clinical guidelines for the diagnosis and treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms (GEP-NENs) 2014. *Clin. Transl. Oncol.* **2014**, *16*, 1025–1034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Mansour, J.C.; Chen, H. Pancreatic endocrine tumors. *J. Surg. Res.* **2004**, *120*, 139–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Metz, D.C.; Jensen, R.T. Gastrointestinal neuroendocrine tumors: Pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology* **2008**, *135*, 1469–1492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. O'Grady, H.L.; Conlon, K.C. Pancreatic neuroendocrine tumors. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2008**, *34*, 324–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Alexakis, N.; Neoptolemos, J.P. Pancreatic neuroendocrine tumors. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2008**, *22*, 183–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Delcore, R.; Friesen, S.R. Gastrointestinal neuroendocrine tumors. *J. Am. Coll. Surg.* **1994**, *178*, 187–211. [[PubMed](#)]
89. Solcia, E.; Sessam, F.; Rind, G.; Bonato, M. *Pancreatic Endocrine Tumors: General Concepts*; Endocrine Pathology of the Gut and the Pancreas; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1999; pp. 105–130.
90. Pedziwiatr, M.; Małczak, P.; Major, P.; Witowski, J.; Kusniercz-Cabala, B.; Ceranowicz, P.; Budzynski, A. Minimally Invasive Surgery of Pancreatic Cancer: What Is the Current Evidence? *Med. Oncol.* **2017**, *34*, 125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Thakker, R.V. Genetics of endocrine and metabolic disorders: Parathyroid. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **2004**, *5*, 37–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Oberg, K.; Kvols, L.; Caplin, M.; Delle Fave, G.; de Herder, W.; Rindi, G.; Ruszniewski, P.; Woltering, E.A.; Wiedenmann, B. Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *Ann. Oncol.* **2004**, *15*, 966–973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Ramage, J.K.; Davies, A.H.; Ardill, J.; Bax, N.; Caplin, M.; Grossman, A.; Hawkins, R.; McNicol, A.M.; Reed, N.; Sutton, R.; et al. Guidelines for the management of gastroenteropancreatic neuroendocrine (including carcinoid) tumors. *Gut* **2005**, *54*, iv1–iv16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Oberg, K.; Knigge, U.; Kwekkeboom, D.; Perren, A. ESMO Guidelines Working Group. Neuroendocrine gastro-entero-pancreatic tumors: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* **2012**, *23*, vii124–vii130. [[PubMed](#)]
95. Diez, M.; Teule, A.; Salazar, R. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: Diagnosis and treatment. *Ann. Gastroenterol.* **2013**, *26*, 29–36. [[PubMed](#)]
96. Rubin, J.; Ajani, J.; Schirmer, W.; Venook, A.P.; Bukowski, R.; Pommier, R.; Saltz, L.; Dandona, P.; Anthony, L. Octreotide acetate long-acting formulation versus open-label subcutaneous octreotide acetate in malignant carcinoid syndrome. *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17*, 600–606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Gonzalez, M.A.; Biswas, S.; Clifton, L.; Corrie, P.G. Treatment of neuroendocrine tumors with infusional 5-fluorouracil, folinic acid and streptozocin. *Br. J. Cancer* **2003**, *89*, 455–456. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Ramanathan, R.K.; Cnaan, A.; Hahn, R.G.; Carbone, P.P.; Haller, D.G. Phase II trial of dacarbazine (DTIC) in advanced pancreatic islet cell carcinoma. Study of the Eastern Cooperative Oncology Group-E6282. *Ann. Oncol.* **2001**, *12*, 1139–1143. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Kwekkeboom, D.J.; Teunissen, J.J.; Bakker, W.H.; Kooij, P.P.; de Herder, W.W.; Feelders, R.A.; van Eijck, C.H.; Esser, J.P.; Kam, B.L.; Krenning, E.P. Radiolabeled somatostatin analog [¹⁷⁷Lu-DOTA0,Tyr3] octreotate in patients with endocrine gastroenteropancreatic tumors. *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23*, 2754–2762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



4 ARTIGO CIENTÍFICO 2: Octreotide Nanoparticles showed affinity for *in vivo* MIA Paca-2 Inducted Pancreas Ductal Adenocarcinoma mimicking Pancreatic Polypeptide-secreting Tumor of the Distal Pancreas (PPoma) (Artigo científico aguardando aprovação)

Thaís Ligiéro Braga¹, Suyene Rocha Pinto¹, Sara Rhaissa Rezende dos Reis¹, Edward Helal-Neto¹, Emerson Soares Bernardes², Sofia Nascimento dos Santos², Luciana Magalhães Rebelo Alencar^{1,3}, Eduardo Ricci-Junior⁴, Ralph Santos-Oliveira^{1,5}

- 1- Brazilian Nuclear Energy Commission, Nuclear Engineering Institute, Rio de Janeiro, Brazil
- 2- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Radiofarmácia, São Paulo, Brazil
- 3- Federal University of Maranhão, Department of Physics, Maranhão-Brazil
- 4- Federal University of Rio de Janeiro, Faculty of Pharmacy, Rio de Janeiro, Brazil
- 5- Zona Oeste State University, Laboratory of Radiopharmacy and Nanoradiopharmaceuticals, Rio de Janeiro, Brazil

All correspondence to:

Dr. Ralph Santos-Oliveira

Brazilian Nuclear Energy Commission

presidenciaradiofarmacia@gmail.com

ABSTRACT

Purpose: Pancreatic Polypeptide-secreting tumor of the distal pancreas (PPoma) is a rare, difficult and indolent type of cancer with a survival rate of 5-year in only 10% of all cases. The PPoma is classified as a neuroendocrine tumor (NET) not functioning that overexpresses SSTR 2 (somatostatin receptor subtype 2). Thus, in order to improve the diagnosis of this type of tumor, we developed nanoparticulate drug carriers based on polylactic acid (PLA) polymer loaded with octreotide and radiolabeled with Technetium-99m (^{99m}Tc).

Methods: PLA/PVA octreotide nanoparticles were developed by double-emulsion technique. These nanoparticles were characterized by Atomic Force Microscopy (AFM) and Dynamic Light Scattering (DLS) and radiolabeled with ^{99m}Tc by the direct via forming ^{99m}Tc-PLA/PVA octreotide nanoparticles. Then, this nanosystem were evaluated in xenografted inducted animals (n=12) as were evaluated in the MTT assay.

Results: The results showed that an 189nm sized nanoparticle were formed with a PDI of 0,097, corroborating the monodispersive behavior. These nanoparticles were successfully radiolabeled with ^{99m}Tc as showed a great uptake by the inducted tumor. The MTT assay corroborated the safety of the nanosystem for the cells.

Conclusion: The results support the use of this nanosystem (^{99m}Tc -PLA/PVA octreotide nanoparticles) as imaging agent for PPoma.

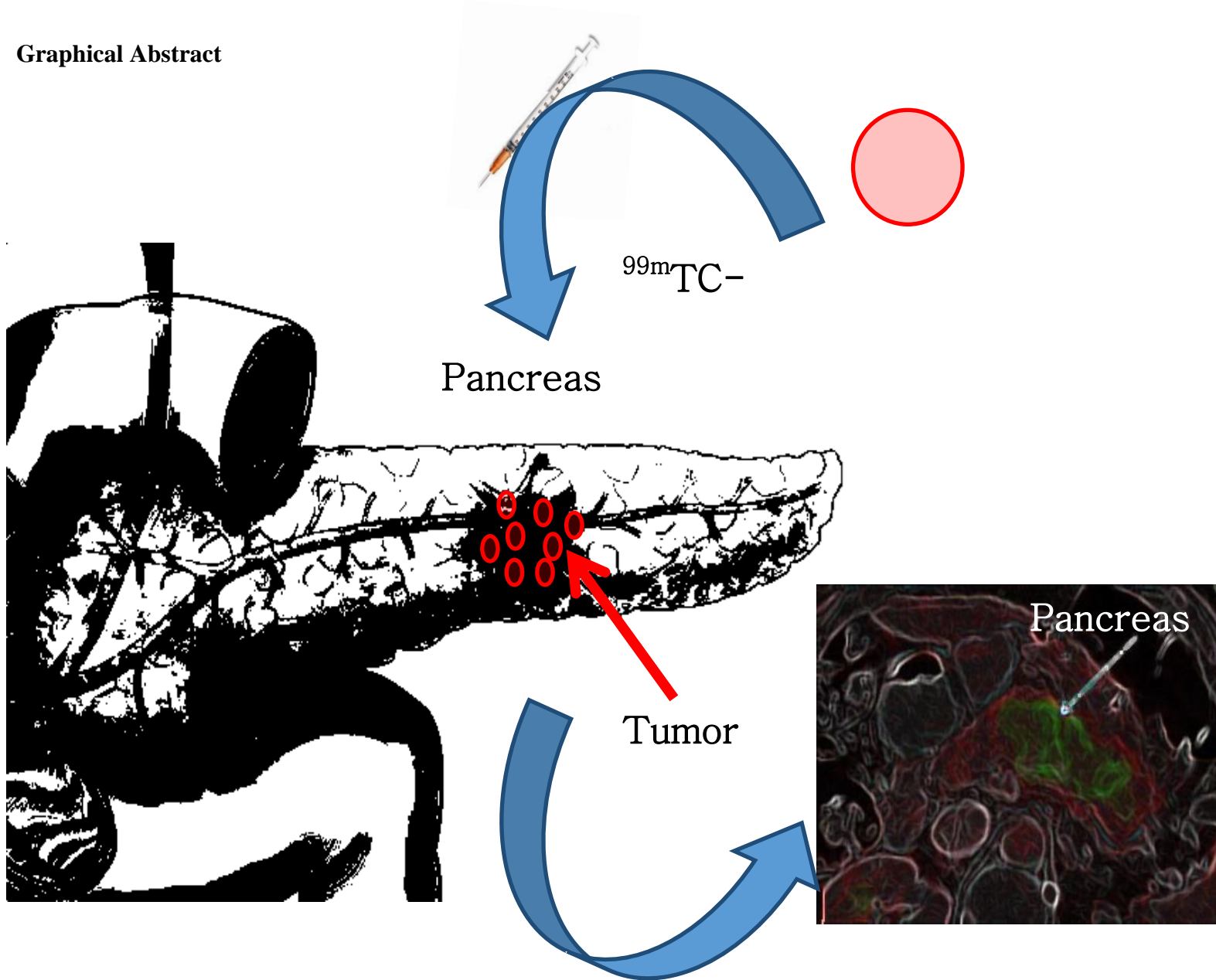
Keywords: PPoma, Octreotide, nanoradiopharmaceuticals, radiopharmacy, imaging agent

Abbreviations

AFM	Atomic Force Microscopy
CO ₂	Carbon Dioxide
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Dulbecco ModifiedEagle'sMinimalEssentialMedium
EDTA	Ethylenediaminetetraaceticacid
EE	Entrapment Efficiency
EPR	Enhanced Permeability and Retention
FBS	Fetal BovineSerum
HEPES	N-2 Hydroxyethyl Piperazine-N'-2 Sulfonic Acid Ethane
ID/organ	Dose per Organ
IPEN/CNEN	<i>Instituto de PesquisasEnergéticas e Nucleares/Comissão Nacional de Energia Nuclear</i> _Institute of Energy and Nuclear Research/National Nuclear Energy Commission
μCi	Microcurie
MBq	Megabecquerel
MIA PACA-2	Cells from human pancreas carcinoma
MPS	Mononuclear Phagocytic System
MTT	3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaHCO ₃	Sodium Bicarbonate
NET	Neuroendocrine Tumor
PDI	Polydispersity Index
PLA	Polylactic Acid
PP	Pancreatic Polypeptide
PPoma	Pancreatic Polypeptide-secreting tumor of the distal pancreas
PVA	Poly(Vinyl Alcohol)

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SC	Subcutaneous
SD	Standard Deviation
SnCl ₂	Stannous Chloride
SSTR 2	Somatostatin Receptor Subtype 2
^{99m} Tc	Technetium-99 metastable
UT	Untreated cells
W/O	water/organic emulsion
W/O/W	water/organic solvent/water emulsion

Graphical Abstract



INTRODUCTION

The Pancreatic Polypeptide-secreting tumor of the distal pancreas (PPoma) is classified as a neuroendocrine tumor (NET) not functioning that overexpresses SSTR 2 (somatostatin receptor subtype 2). This type of cancer affects the right side of the organ (the head) where 90% of the PP cells (responsible to produce the pancreatic polypeptide hormone) are found (1-4). The PPoma is considered a rare tumor more prevalent in individuals between the 5th and 6th decade of life (2,5-9).

The PPoma cancer overexpresses the pancreatic polypeptide (PP), which is composed of 36 amino acid peptide produced and secreted by PP cells primarily located in the Islets of Langerhans. It is important to notice that this pancreatic peptide is biologically inactive, being considered a clinically silent tumor. This fact, leads to a difficult diagnosis, which often occurs accidentally (2,5-11). Also the PPoma are generally unresectable and in 90% of the cases they are metastatic, with a survival rate of 5-year in only 10% of all cases (12). The high malignant potential of PPoma (90%) is mainly due to its slow and silent growth, reaching large dimensions at the time of diagnosis (5.9 cm) (2,9,13,14). The main risk factors related to PPoma are: high saturated fat intake; malignancy - associated impairment in glucose metabolism; thyroid dysfunction; alcohol consumption; smoking; medical conditions such as diabetes mellitus and environmental factors such as radiation. It is known that the risk for developing pancreatic cancer is 1 in 67 (2,3,15,16).

Octreotide is an octapeptide, developed as a drug, who acts as a potent octapeptide analog of somatostatin. The various actions of somatostatin are mediated through specific membrane receptors, especially the octreotide binds with high affinity to somatostatin receptor subtype 2 and subtype 5 and with moderate affinity to subtype 3. In the case of PPoma the most abundant receptor is the SSTR 2 (11,17,18).

Thus, considering that the PPoma is an aggressive and incurable tumor with a high lethal rate and without any specific tumor test, we developed, characterized and pre-clinically tested a ^{99m}Tc -PLA/PVA/Octreotide nanoparticles as a new nano-radiopharmaceutical for early and differential diagnosis of PPoma.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis of Octreotide Nanoparticle

Nanoparticles were prepared by the double emulsification with solvent evaporation method, according to the protocol described by Patricio *et al.* (19). A aqueous solution of 0.6 mL of poly(vinyl alcohol) (PVA, 0.1% w/v, 85% hydrolysed; Sigma-Aldrich, USA) and 0.4 mL Octreotide (4% w/v; Norvatis) was prepared. This solution was poured into 50 mg of polylactic acid (PLA, 40–100kDa, 0.15–0.25 viscosity, Sigma-Aldrich, USA) in 4 mL of dichloromethane and then emulsified by sonication (ultrasonic processor UP100H, 100W, 30kHz, Hielscher Ultrasonics, Teltow, Germany) for 2 min (55W), producing a water/organic solvent (W/O) emulsion. This solution was then emulsified with 10 mL of PVA (1% w/v) solution by sonication for 2.5 min (55W), producing a water/organic solvent/water (W/O/W) emulsion. Then, the organic solvent was removed by evaporation under a vacuum (1.5 h) (Rotavapor Water bath B-480, Büchi Labortechnik AG, CH, Switzerland) at 25°C at 60 rpm. The particles were recovered by centrifugation (Avanti™ J-25 High Performance Centrifuge, Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA) at 20,000 rpm for 20 min at 20°C to remove the excess PVA. This procedure resulted in PLA/PVA/Octreotide nanoparticles.

Dynamic Light Scattering

Size distribution, mean size and polydispersity index (PDI) of the PLA/PVA/Octreotide nanoparticles were determined by dynamic light scattering (DLS) using the equipment Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Measurements were performed in triplicate at 25°C and the laser incidence angle in relation to the sample was 173° using a 12 mm² quartz cuvette. The mean \pm standard deviation (SD) was assessed.

Atomic Force Microscopy

The morphology and dimensions of the PLA/PVA/Octreotide nanoparticles were analyzed by atomic force microscopy (AFM) using a Multimode 8 (Bruker, Santa Barbara, CA, USA) coupled with software NanoScope Analysis 1.50 (Bruker, Santa Barbara, CA, USA), in tapping mode (intermittent contact) for acquisition of topographic and phase images to investigate diameter, height and phase composition of particles. All the experiments were performed with cantilevers spring constant of 0.24 N/m and nominal tip radius of 2 nm. Particles solutions were diluted in a concentration of approximately 10^9 to 10^{10} particles per cm^3 . Solution was dropped in fresh cleaved mica and rest to dry in vacuum chamber protected from contamination. The experiment was performed with scan resolution of 512 x 512 lines and frequency of 0.5 Hz. For indentation experiments, cantilevers of 0.57 N/m were used and maps of nano mechanical properties (Young's modulus, adhesion, energy dissipation and deformation) of particles. These maps were acquired simultaneously with particles topography using PeakForce QNM (Bruker, Santa Barbara, CA, USA).

Entrapment Efficacy (EE)

The calculation of the entrapment efficiency (EE) was made using an indirect analysis by UV visible spectrophotometer (Shimadzu model UV-2550) with λ max value of 279 nm, where it is part of the initial value of the Octreotide incorporated in the nanoparticle and free Octreotide in the supernatant using the Equation 1: Encapsulation efficiency (%) = $[1 - (\text{Drug in supernatant liquid} / \text{Total drug added})] \times 100$.

Cytotoxicity

Tumor Cells Cultures

Briefly, cells from human pancreas carcinoma (MIA Paca-2) that express SSRT 2 (somatostatin receptor subtype 2) and can mimicking the PPoma behavior (20,21). Were obtained from Cell Bank of Rio de Janeiro (Rio de Janeiro, Brazil). The cells were routinely maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, NaHCO₃ (3.7 g/L), HEPES (5.2 g/L), penicillin (0.5 U/mL) and streptomycin (0.5 mg/mL). Cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Cells were grown to confluence culture flasks. Cells were detached by brief treatment with trypsin (0.1%)/EDTA (0.01%) (22).

MTT assay

Thereafter, the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution was removed and added 200 µL of absolute isopropanol to lyse the cells and solubilize the MTT crystals in all conditions. The absorbance of the extract was read at 570 nm in a reader ELISA plates.

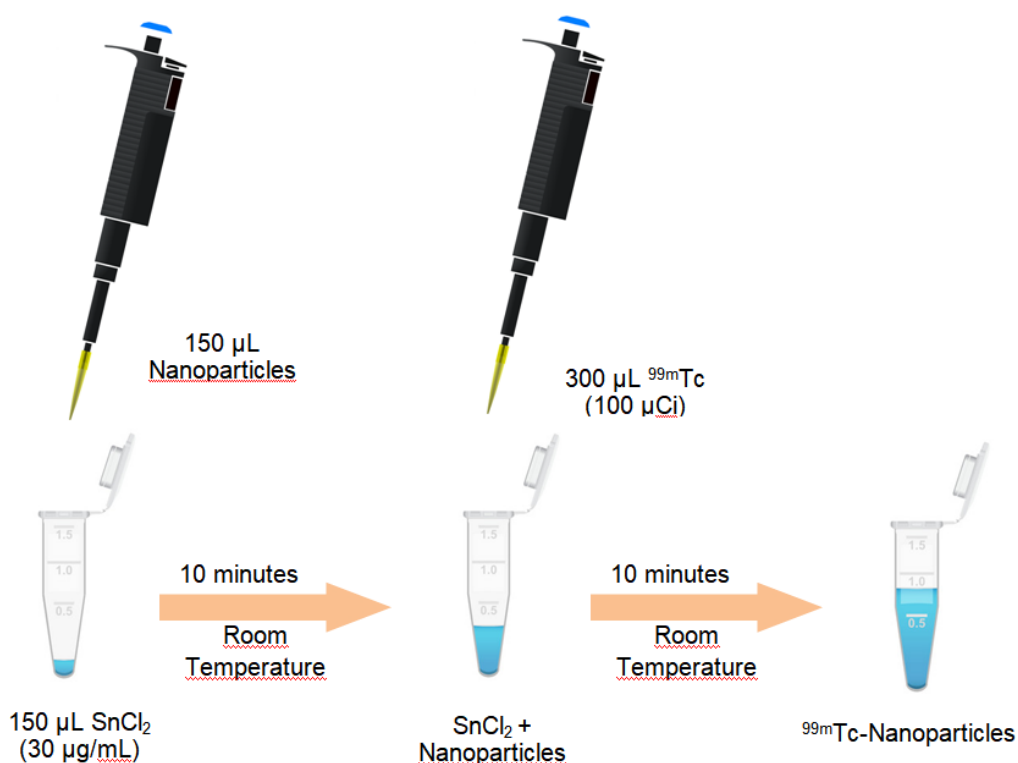
MTT assay using PLA/PVA/Octreotide nanoparticles at concentration of 1, 5, 10, 20, 50 and 100 µM, at the times of 24, 48 and 72 hours. The MTT assay was performed and optical density was obtained at 570 nm. The graphs represent the mean ± standard deviation (SD) from three independent experiments. UT: Untreated cells. Statistical significance was analyzed by the one-way ANOVA test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$) (23).

Labeling Process with Technetium-99m (^{99m}Tc)

The labeling process was done by the direct radiolabeling process described by Portilho *et al.* (24) and Sousa-Batista *et al.* (25). In this methodology we used 150 µL of each

sample: i) loaded nanoparticle with Octreotide (PLA/PVA/Octreotide nanoparticles) and ii) unloaded (empty) nanoparticle, incubated with 150 μL of stannous chloride (SnCl_2) solutions (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (Sigma-Aldrich) for 10 minutes at room temperature. Then this solution was incubated with 100 μCi (3.7 MBq) (approximately 300 μL) of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (IPEN/CNEN) for 10 minutes in order to label their structures, as schematically demonstrated in Figure 1.

Figure 1 – Schematic labeling process of nanoparticles with Technetium-99m by the direct method.



Quality Control of the Labeling Process with $^{99\text{m}}\text{Tc}$

In order to confirm the efficacy of the nanoparticles labeling process, paper chromatography was done using Whatman paper n° 1 using 2 μL of sample I – loaded nanoparticle with Octreotide (PLA/PVA/Octreotide nanoparticles); II – unloaded (empty) nanoparticle and acetone (Sigma-Aldrich) as mobile phase. The radioactivity of the strips was verified in a γ -counter (Perkin Elmer Wizard[®] 2470, Shelton, CT City, State).

Labeling Stability Test

To confirm the stability of the nanoparticles labeling process, paper chromatography was done using Whatman paper n° 1, 2 μL of sample I – loaded nanoparticle with Octreotide (PLA/PVA/Octreotide nanoparticles); II – unloaded (empty) nanoparticle and acetone (Sigma-Aldrich) as mobile phase in the following period of time: 0, 30', 1h, 2h, 4 h, 6 h and 24 h. The radioactivity of the strips was verified in a γ -counter (Perkin Elmer Wizard[®] 2470, Shelton, CT City, State) (26-28).

***In vivo* Analysis**

Tumoxenografted models – PPoma Animal Model

Human pancreas carcinoma (MIA Paca-2) (Cell Bank of Rio de Janeiro, Brazil) were cultured in RPMI (Gibco, Life technologies, MD, USA) supplemented with 10% of fetal bovine serum (Gibco, Life technologies, MD, USA) and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of gentamicin (Gibco, Life technologies, MD, USA). Mycoplasma contamination in cultured cells was excluded using Lonza Mycoplasma Detection Kit.

Is important to state that we used the MIA Paca-2 cell line since this cell line express great amounts of SSRT 2 (somatostatin receptor type 2), which is the most prominent somatostatin receptor presented in the PPoma, once the PP (pancreatic polypeptide) cannot be used as original biomarker because his expression is marginally recognized (2,11,29-31).

Tumors were established by subcutaneous (SC) injection of 1×10^6 MIA Paca-2 cells at the right flank of eight-week-old male Balb/c nude mice (n=6). Tumor size was monitored for 3 weeks and measured by a caliper. Mice were observed three times per week for evidence of distress, ascites, paralysis or excessive weight loss.

Biodistribution

For the biodistribution studies, 3.7MBq/0.01mL of each sample: sample I – loaded nanoparticle with Octreotide (PLA/PVA/Octreotide nanoparticles) and II – unloaded (empty PLA/PVA nanoparticle) nanoparticle were injected by retro-orbital via as described by De Jesus Felismino *et al.* (32) and Salviet *al.* (33). Briefly, male Balb/c nude mice (n=6 per group) were anesthetized intramuscularly with a solution mix of 10% Ketamine and 2% Xylazine and then, ^{99m}Tc-PLA/PVA/Octreotide nanoparticles as PLA/PVA nanoparticle were administered by retro-orbital injection. Two hours after administration male mice were sacrificed by asphyxiation (CO₂ chamber) and organs of interest (heart, brain, stomach, intestine, kidney, lung, liver, spleen, lesion (tumor) and blood were immediately dissected out and weighed for quantitative estimation of gamma counts using a gamma counter (Perkin Elmer, Wizard[®] 2470). Results were expressed as percentage of injected dose per organ (%ID/organ).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Origin Pro 8 (OriginLab, USA) software. Results are shown as means ± standard deviation (SD). P-values less than 0.05 were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSIN

Nanoparticle Fabrication

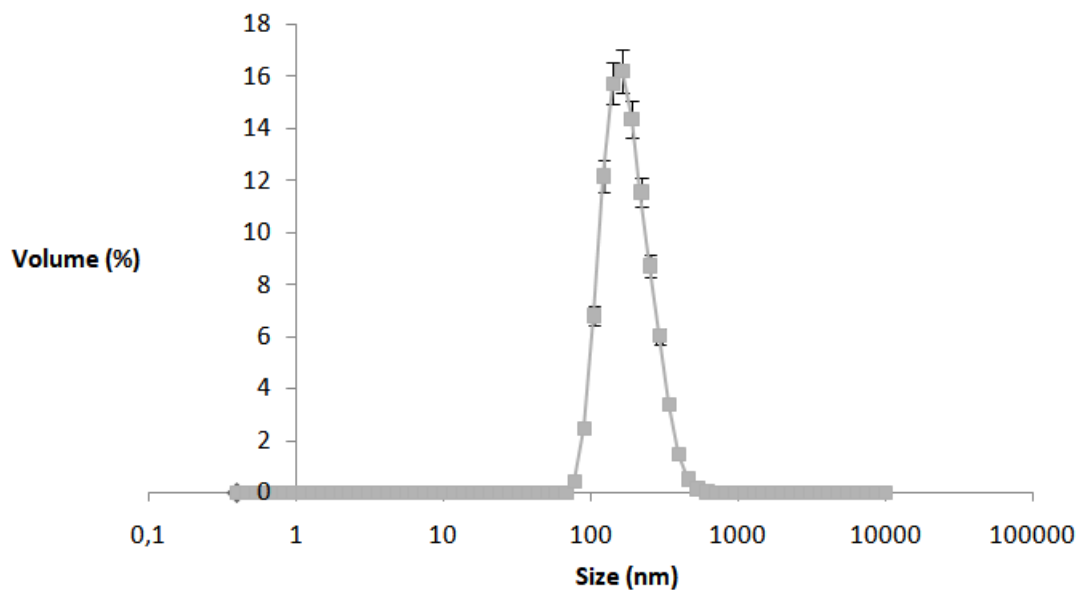
The double emulsion followed by solvent evaporation method showed to be an inefficient methodology for the encapsulation of hydrophilic molecules and proteins such as

Octreotide (34,35). The results from DLS and AFM corroborated this efficacy, as shown below.

Dynamic Light Scattering

The PLA/PVA/Octreotide nanoparticle showed a mean size of 189 ± 1 nm with a polydispersity index (PDI) of $0.097 \pm 0,022$ (Figure 2), corroborating the monodispersive behavior (36-38).

Figure 2 – PLA/PVA/Octreotide nanoparticle size distribution and mean size. Analyses were performed at 25°C after preparation. Error bars indicate SD for the triplicates.

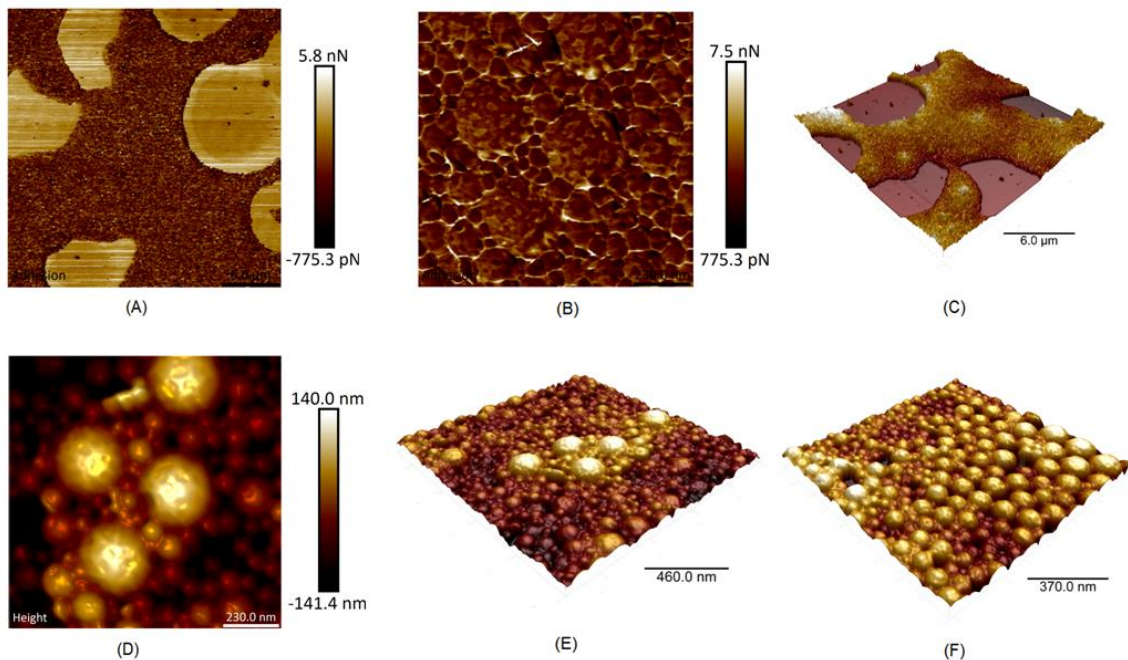


The acquired size (189 nm) is suitable for a higher EPR effect (Enhanced Permeability and Retention) in tumor cells, specifically in solid tumors, as PPoma, since with this size the PLA/PVA/Octreotide nanoparticle can reach the broader fenestrations of the neo-vessels, but cannot enter the narrow endothelial fenestrations of normal tissues (36,39-43). In this direction is expected a higher accumulation (uptake) in the tumor with low accumulation (uptake) in normal tissues (44).

Atomic Force Microscopy (AFM)

In topographical AFM images (Figure 3), PLA/PVA/Octreotide nanoparticles showed high homogeneity in shape (spherical) and a narrow size distribution in the middle area of 180 to 200nm, corroborating the DLS analysis.

Figure 3 – Topographic image of nanoparticles obtained by atomic force microscopy showing their size and the spherical shape. (A) Film adhesion; (B) Adhesion; (C) Film 3D; (D) Height; (E) and (F) Uniformity of structures.



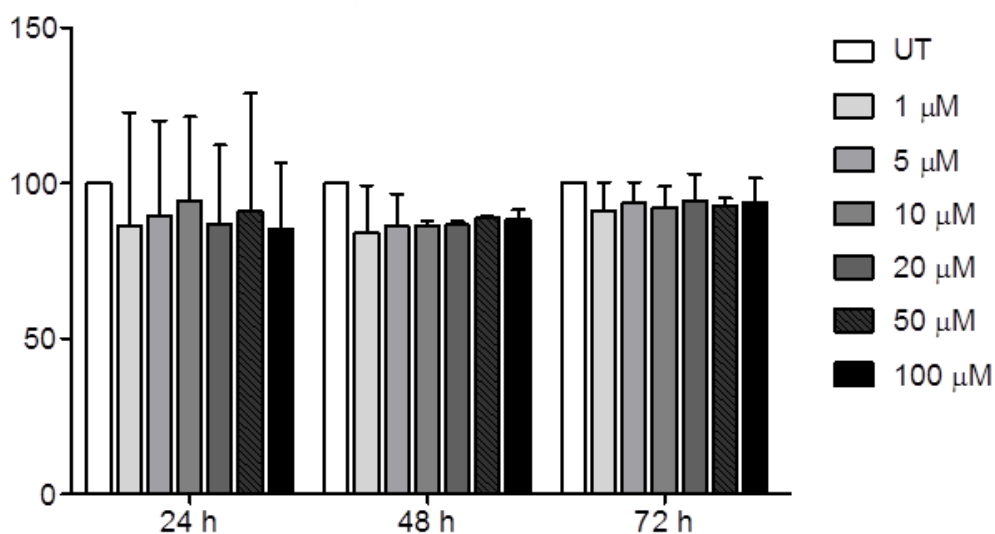
Entrapment Efficacy (EE%)

The result from EE% was also consistent and showed that 60% of the Octreotide were incorporated into the nanoparticles, corroborating the double-emulsion methodology as a good technique to produce high-loaded nanoparticles of Octreotide.

Cytotoxicity

The results from the MTT assay are expressed in Figure 4. The results corroborate the safety aspect of the nanoparticle. Also, confirmed that the amount of Octreotide used was not enough to kill the cells (MIAPaca-2). This is quite desirable especially when developing contrast/imaging agent as is the case of this nanosystem(26,27).

Figure 4 – MTT assay using PLA/PVA/Octreotide nanoparticles at concentration of 1, 5, 10, 20, 50 and 100 μM , at the times of 24, 48 and 72 hours. The MTT assay was performed and optical density was obtained at 570 nm. The graphs represent the mean \pm standard deviation from three independent experiments. UT: Untreated cells. Statistical significance was analyzed by the one-way ANOVA test ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$).



The results corroborates itself the safety and harmless of these nanoparticles and it use as imaging agent (24).

Labeling Process

The PLA/PVA/Octreotide nanoparticles were successfully labeled (>90%). The use of acetone as the mobile phase provided efficient separation from free ^{99m}Tc and labeled nanoparticles, as shown in table 1.

Table 1 – Percentage of labeled PLA/PVA/Octreotide nanoparticles observed over time, after ascending chromatograms of ^{99m}Tc compared with free pertechnetate ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$).

Time (h)	Labeling (%)
0	99.8 ± 0.2
0.5	99.7 ± 0.3
1	98.8 ± 0.6
2	99.7 ± 0.5
4	98.6 ± 0.9
6	98.7 ± 0.6
24	98.3 ± 0.8

This result is in agreement with the literature, which says that the amount of sample must be sufficient to bind at least 90% of the ^{99m}Tc , thus obtaining an image with few artifacts (45-47). Similar results were found for empty nanoparticles as shown in table 2.

Table 2 – Percentage of labeled empty nanoparticles observed over time, after ascending chromatograms of ^{99m}Tc compared with free pertechnetate ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$).

Time (h)	Labeling (%)
0	99.9 ± 0.4
0.5	99.8 ± 0.2
1	99.8 ± 0.6
2	99.7 ± 0.4
4	99.6 ± 0.7
6	98.2 ± 0.5
24	98.0 ± 0.2

Biodistribution

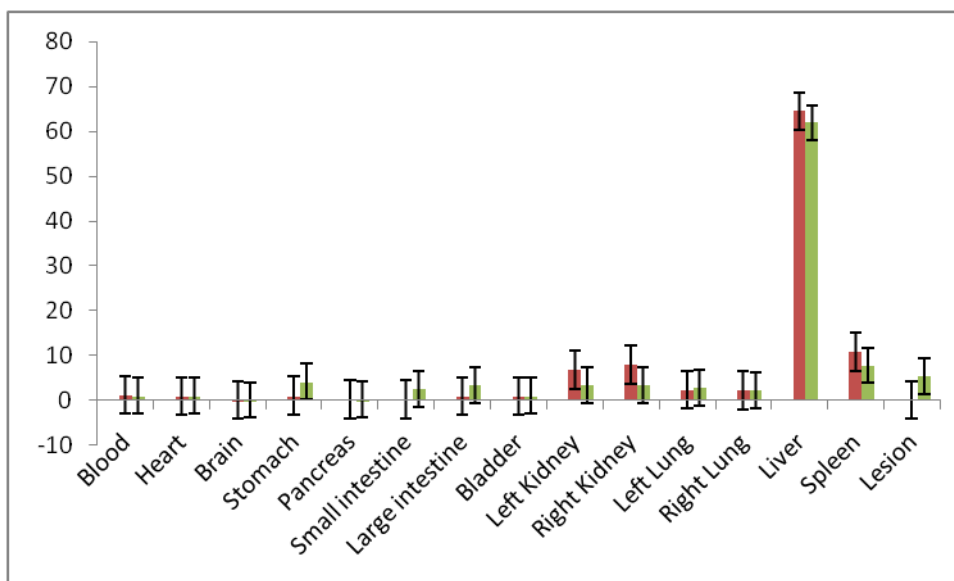
The biodistribution (Figure 5) of both nanosystem (^{99m}Tc -PLA/PVA/Octreotide and ^{99m}Tc -PLA/PVA, respectively loaded and empty nanoparticles/nanosystems) is quite different in induced animals and changed the behavior of the loaded nanoparticles when compared with empty nanoparticles (Figure 5). The uptake by the liver (64.51% and 61.86%, respectively empty and load nanoparticle) were very similar and may be explained by the fact that nanoparticles are recognized by the mononuclear phagocytic system (MPS) (48-51). This theory is corroborated by the high uptake by the spleen (10.79% and 7.8%, respectively loaded and empty nanoparticles) in both cases.

A high uptake in stomach was observed in the intervention group (treated with ^{99m}Tc -PLA/PVA/Octreotide nanoparticles), which can be explained by the fact that stomach express somatostatin receptor (21). The uptake in large and small intestine in the same group was also observed and can be explained due the high amount of SSRT 2 receptor in intestines too (21,52). In both cases a negligible uptake were observed in brain (0.06% and 0.05%, respectively empty and loaded nanoparticles) corroborating the safety aspect in terms of radioactive imaging agent.

In both groups were observed the renal uptake (Σ = 14.7% and Σ =6.8%, respectively empty and loaded nanoparticles), but with imperceptible amount in bladder (0.9% and 1%) respectively empty and loaded nanoparticles, which suggest that the both nanosystems were reabsorbed in the luminal space instead of been excreted (53).

The uptake by the lungs (Σ = 4.5% and Σ =5.1%, respectively empty and loaded nanoparticles) can be explained by the administration route (33,54). Finally, the uptake in lesion (tumor) by the loaded nanosystem (5.3%) in contrast with the empty nanosystem (0.01%) corroborated the targeting of the nanosystem as it use as a nano-imaging agent for PPoma.

Figure 5 – Biodistribution of the ^{99m}Tc -PLA/PVA/Octreotide nanoparticles compared with the biodistribution of the ^{99m}Tc -PLA/PVA nanoparticles both with similar size in xenografted mice (n=12, 6 animal per group) using MIA Paca-2 cell to mimic the PPomamicro environment, with expression of somatostatin subtype 2 receptor (SSRT 2). The red group is control group (empty nanoparticles/ ^{99m}Tc -PLA/PVA nanoparticles) and the green group is the intervention group (loaded nanoparticles/ ^{99m}Tc -PLA/PVA/Octreotide).



CONCLUSION

Although PPoma is being considered a rare type of tumor, the aggressiveness as the very low rate of treatment's success makes this cancer a challenge. Most of the issues related to PPoma rely in the difficult to early detect, since no great metabolic or physiological changes are observed in the first stages of the tumor. In this direction, the developed ^{99m}Tc -PLA/PVA/Octreotide nanoagent showed to be a precise and efficient agent capable to correctly targeting and identify this tumor. Further studies are necessary, especially in orthotopic cancer model, in which the biology of the cancer is more preserved. Also, imaging studies using Micro PET/SPECT are required to undoubtedly proof the concept.

REFERENCES

1. Brereton MF, Vergari E, Zhang Q, Clark A. Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? *J HistochemCytochem.* 2015;63(8):575-591.
2. Vinik A, Feliberti Z, Perry RR. Pancreatic Polypeptide (ppoma). In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al. Editors. *Source Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): mdtext.com, 2017, Jun 12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279067/>
3. American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2019.* Atlanta: American Cancer Society; 2019.
4. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Dados de incidência e mortalidade. Available from: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas>.
5. Jensen RT. Endocrine tumors of the gastrointestinal tract and pancreas. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, et al. *Harrison's principles of internal medicine.* New York: mcgraw-Hill Medical Publishing Division; 2008. p. 2347-2358.
6. Mullan MH, Gauger PG, Thompson NW. Endocrine tumours of the pancreas: review and recent advances. *ANZ J Surg*, 2001;71(8):475-482.
7. Oberg K, Eriksson B. Endocrine tumours of the pancreas. *Best Pract Res ClinGastroenterol.* 2005;19(5):753-781.
8. Alexakis N, Neoptolemos JP. Pancreatic neuroendocrine tumours. *Best Pract Res ClinGastroenterol.* 2008;22(1):183-205.
9. Maxwell JE, O'Dorisio TM, Howe JR. Biochemical Diagnosis and Preoperative Imaging of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *SurgOncolClin N Am.* 2016;25(1):171-194.
- 10 Santos AP. Tumores neuroendócrinos: requisitos mínimos para o diagnóstico clínico. *Rev Port Cir.* 2011;16(2):28-34
11. PRRNT. *Practical Guidance on Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRNT) for neuroendocrinetumours.* Vienna: IAEA; 2013.
12. Ligiero Braga T, Santos-Oliveira R. Ppoma Review: Epidemiology, Aetiopathogenesis, Prognosis and Treatment. *Diseases.* 2018;6(8):20p.
13. Barakat MT, Meeran K, Bloom SR. Neuroendocrine tumours. *EndocrRelat Cancer.* 2004;11:1-18.
14. Metz DC, Jensen RT. Gastrointestinal neuroendocrine tumors: pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology.* 2008;135(5):1469-1492.

15. Yao JC, Hoff PM, Hoff AO. Neuroendocrine Tumors; New York: Humana Press; 2011. p. 221-243.
16. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2019. CA Cancer J Clin. 2019; 69(1):7-34.
17. Paragliola RM, Salvatori R. Novel Somatostatin Receptor Ligands Therapies for Acromegaly. Front Endocrinol (Lausanne). 2018;9(78):8p.
18. Papanagnou P, Papadopoulos GE, Stivarou T, et al. Toward fully exploiting the therapeutic potential of marketed pharmaceuticals: the use of octreotide and chloroquine in oncology. OncoTargetsTher. 2018;12:319-339.
19. Patricio BFC, Albernaz MS, Sarcinelli MA, et al. Development of Novel Nanoparticle for Bone Cancer. J BiomedNanotechnol, 2014;10(7):1242-1248.
20. Gradiz R, Silva HC, Carvalho L, et al. MIA paca-2 and PANC-1 – pancreas ductal adenocarcinoma cell lines with neuroendocrine differentiation and somatostatin receptors. Sci Rep. 2016;6(21648):14p.
21. Moatassim-Billah S, Duluc C, Samain R, et al. Anti-metastatic potential of somatostatin analog SOM230: Indirect pharmacological targeting of pancreatic cancer-associated fibroblasts. Oncotarget. 2016;7(27):41584-41598.
22. Pinto SR, Helal-Neto E, Paumgarten F, et al. Cytotoxicity, genotoxicity, transplacental transfer and tissue disposition in pregnant rats mediated by nanoparticles: the case of magnetic core mesoporous silica nanoparticles. Artif Cells NanomedBiotechnol. 2018;46(sup2):527-538.
- 23 De Souza Albernaz M, Toma SH, Clanton J, et al. Decorated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles with Monoclonal Antibody and Diethylene-Triamine-Pentaacetic Acid Labeled with Technetium-99m and Gallium-68 for Breast Cancer Imaging. Pharm Res. 2018;35(1):24.
24. Portilho FL, Pinto SR, de Barros AODS, et al. *In loco* retention effect of magnetic core mesoporous silica nanoparticles doped with trastuzumab as intralesionalnanodrug for breast cancer. ArtifCellsNanomedBiotechnol. 2018;46(sup3):S725-S733.
25. Sousa-Batista AJ, Cerqueira-Coutinho C, do Carmo FS, et al. Polycaprolactone Antimony Nanoparticles as Drug Delivery System for Leishmaniasis. Am J Ther. 2019;26(1):e12-e17.
26. Rosa TG, Dos Santos SN, de Jesus Andreoli Pinto T, et al. Microradiopharmaceutical for Metastatic Melanoma. Pharm Res. 2017;34(12):2922-2930.

27. Pascual L, Cerqueira-Coutinho C, García-Fernández A, et al. MUC1 aptamer-capped mesoporous silica nanoparticles for controlled drug delivery and radio-imaging applications. *Nanomedicine*. 2017;13(8):2495-2505.
28. Ricci-Junior E, de Oliveira de Siqueira LB, Rodrigues RAS, et al. Nanocarriers as phototherapeutic drug delivery system: Appraisal of three different nanosystems in an in vivo and in vitro exploratory study. *PhotodiagnosisPhotodynTher*. 2018;21:43-49.
29. Oberg K, Kvols L, Caplin M, et al. Consensus report on the use of somatostatin analogs for the management of neuroendocrine tumors of the gastroenteropancreatic system. *Ann Oncol*. 2004;15(6):966-973.
30. Volante M, Brizzi MP, Faggiano A, et al. Somatostatin receptor type 2A immunohistochemistry in neuroendocrine tumors: a proposal of scoring system correlated with somatostatin receptor scintigraphy. *Mod Pathol*. 2007;20(11):1172-1182.
31. Ito T, Igarashi H, Jensen RT. Pancreatic neuroendocrine tumors: clinical features, diagnosis and medical treatment: advances. *Best Pract Res ClinGastroenterol*. 2012;26(6):737-753.
32. de Jesus Felismino C, Helal-Neto E, Portilho FL, et al. Effect of obesity on biodistribution of nanoparticles. *J Control Release*. 2018;281:11-18.
33. Salvi R, Cerqueira-Coutinho C, Ricci-Junior E, et al. Diagnosing lung cancer using etoposidemicroparticles labeled with ^{99m}Tc. *Artif Cells NanomedBiotechnol*. 2018;46(2):341-345.
34. Benna-Zayani M, Kbir-Ariguib N, Trabelsi-Ayadi M, et al. Stabilisation of W/O/W double emulsion by polysaccharides as weak gels. *Colloids Surf A PhysicochemEng Asp*. 2008;316(1-3):46-54.
35. Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery *Int J Pharm*. 2010;385(1-2):113-142.
36. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of lipidicnanocarrier Systems. *Pharmaceutics*. 2018;10(57):17p.
37. Schaffazick SR, Guterres SS. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricosnanoparticulados para administração de fármacos. *Quim Nova*. 2003;26(5):726-737.
38. Gaumet M, Vargas A, Gurny R, et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biopharm*. 2008;69(1):1-9.

39. Alexis F, Rhee JW, Richie JP, et al. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment. *UrolOncol*. 2008;26(1):74-85.
40. Cho K, Wang X, Nie S, et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1310-1316.
41. Acharya S, Sahoo SK. PLGA nanoparticles containing various anticancer agents and tumour delivery by EPR effect. *AdvDrugDeliv Rev*. 201;63(3):170-183.
42. Oliveira LC, Taveira EJJ, Souza LG, et al. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. *Rev Bras Cancerol*. 2012;58(4):695-701.
43. Mirakabad FST, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(2):517-535.
44. Liechty WB; Peppas NA. Expert Opinion: Responsive Polymer Nanoparticles in Cancer Therapy. *Eur J Pharm Biopharm*. 2012;80(2):241-246.
45. SAHA GB. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. New York: Springer Verlag; 2018.
46. Guimarães TT, Bordim A, Albernaz MS, et al. Quality Control of Radiopharmaceutical ^{99m}Tc -MAG3. *Latin Am J Pharm* 2011;30(7):1437-1439.
47. Almeida RS, Guimaraes TT, Albernaz MS, et al. Can Quality Control of Radiopharmaceuticals be Done Using Water and Ethanol? *AdvSciLett*. 2012;10(1):140-142.
48. Alvarez-Lorenzo C, Concheiro A. *Smart Materials for Drug Delivery*. United Kingdom: Royal Society of Chemistry; 2013.
49. Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat Biotechnol*. 2015;33(9):941-951.
50. Gustafson HH, Holt-Casper D, Grainger DW, et al. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem. *Nano Today*. 2015;10(4):487-510.
51. Hoshyar N, Gray S, Han H, et al. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine (Lond.)*. 2016;11(6):673-692.
52. Li M, Li W, Kim HJ, et al. Characterization of somatostatin receptor expression in human pancreatic cancer using real-time RT-PCR. *J Surg Res*. 2004;119(2):130-137.
53. Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H. Clearance Properties of Nano-sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats. *Nanomedicine (Lond)*. 2008;3(5):703-717.
54. Pinto SR, Sarcinelle MA, de Souza Albernaz M, et al. In vivo studies: comparing the administration via and the impact on the biodistribution of radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol*. 2014;41(9):772-774.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A grande vantagem da nanomedicina é a possibilidade de fornecer ao paciente um atendimento cada vez mais personalizado e individualizado, através do aperfeiçoamento tanto dos métodos de diagnóstico quanto das terapias. Além disso, os estudos na área da nanomedicina fornecem uma maior compreensão do mecanismo da doença ao nível molecular, fato essencial na integração do diagnóstico e da terapia. Devido a estas características, a nanomedicina possui um vasto leque de aplicações clínicas.

Atrelado a isto, pesquisas sobre o Tumor Secretor de Polipeptídeo Pancreático (PPoma) devem ser incentivadas. Por ser um tipo tumoral altamente agressivo e fatal com poucas alternativas para reversão deste quadro. O ponto de partida pode ser dado com o desenvolvimento de um agente diagnóstico. Assim utilizando as informações da área da nanotecnologia, problemas no direcionamento para essas células tumorais, podem ser superados pela produção e adesão do nanoradiofármaco no órgão alvo, pâncreas.

Neste contexto, o presente trabalho demonstrou que a metodologia de dupla emulsificação para a obtenção de nanopartículas (NPs) poliméricas de ácido polilático (PLA) carregado com Octreotida foi eficaz. As mesmas foram caracterizadas pelas técnicas de Microscopia de Força Atômica (AFM) e Dispersão Dinâmica de Luz (DLS). Os resultados obtidos demonstram uma distribuição de tamanho em torno de 189 nm e monodispersa com Índice de Polidispersão (PDI) de 0,097, sendo ideal para a penetração em células tumorais através, principalmente, do efeito de EPR (Efeito Permeabilidade e Retenção Aumentadas). A eficiência de encapsulamento da Octreotida pelo espectrofotômetro UV-VIS, de forma indireta, obteve-se uma eficiência de 60%, sendo aceitável pelas características de dificuldade de adsorção do fármaco hidrossolúvel.

Um ponto importante a ser avaliado no desenvolvimento de um nanoradiofármaco como agente de imagem é a sua citotoxicidade. Essa foi avaliada pelo ensaio de MTT frente às células do carcinoma do pâncreas humano (MIA Paca-2) que expressa SSTR 2. Observou-se que mesmo aumentando a concentração das nanopartículas de PLA/PVA/Octreotida, não houve alteração significativa na viabilidade celular, corroborando com o uso seguro das mesmas.

A marcação pelo método direto com tecnécio-99 metaestável (^{99m}Tc) apresentou alto rendimento, maior que 98%, que persistiu por 24 horas. Isto possibilita o estudo de biodistribuição em camundongos machos de Balb/c induzidos pelo xenoinxerto de MIA

Paca-2 com as NPs de PLA/PVA (grupo controle) e NPs de PLA/PVA/Octreotida (grupo de intervenção) radiomarcada com ^{99m}Tc para prever seu comportamento biológico. Os resultados obtidos de alto valor do percentual de captação no fígado nos dois grupos, sugerem reconhecimentos das NPs pelo sistema fagocitário mononuclear (MPS), que corroboram com o percentual encontrado no baço. Por fim, o nanorradiofármaco de ^{99m}Tc -PLA/PVA/Octreotida apresentou significativa diferença na captação pela lesão que o nanorradiofármaco de ^{99m}Tc -PLA/PVA sem a Octreotida. Sugerindo que este sistema poderá servir como agente de imagem para o PPoma.

Portanto, o estudo da biodistribuição associada a técnicas de caracterização das NPs por DLS e AFM e estudos citotxicológicos, fornecem uma visão mais ampla do comportamento das nanopartículas *in vivo*. Isto tudo é essencial para os estudos pré-clínicos de novos nanorradiofármacos com o intuito de utilização clínica futura, no caso, para o diagnóstico do PPoma.

Sugestões para trabalhos futuros

Sugerimos como continuidade deste trabalho um estudo detalhado do processo de viabilidade celular, ensaios *in vitro*, para determinação da ocorrência ou não da toxicidade sobre outras linhagens tumorais, testadas para fins exclusivamente diagnósticos.

Propostas que avaliem o perfil de concentração plasmática das soluções farmacológicas de NPs utilizadas no modelo animal também são desejadas.

Estudos de imagens cintilográficas dos animais sadios e induzidos para avaliar melhor a biodistribuição das nanopartículas e possibilitar o estudo dosimétrico dos órgãos. Assim como estudos que extrapolem o tempo de geração de imagens SPECT no modelo animal resultando em ótima qualidade de análise.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 9 ed. Rio de Janeiro:Elsevier, 2019. 576p. 2019
- ABDELLATIF, A. A. H. et al. Targeting of somatostatin receptors expressed in blood cells using quantum dots coated with vapreotide. *Saudi. Pharm. J.*, v. 26, p. 1162-1169, Dec.2018.
- ALBERNAZ, M. S. et al. Radiolabelled nanohydroxyapatite with ^{99m}Tc: perspectives to nanoradiopharmaceuticals construction. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, v. 42, n. 2, p. 88-91, Apr. 2014.
- ALAM, F. et al. Unique roles of nanotechnology in medicine and cancer. *Indian J. Cancer*, v. 51, n. 4, p. 506-510, Oct.-Dec. 2014.
- ALEXAKIS, N.; NEOPTOLEMOS, J. P. Pancreatic neuroendocrine tumours. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, v. 22, n. 1, p. 183-205, Feb. 2008.
- ALURI, V.; DILLON, J. S. Biochemical Testing in Neuroendocrine Tumors. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, v. 46, n. 3, p. 669-677, Sep. 2017.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. *Cancer Facts & Figures 2019*. Atlanta: American Cancer Society; 2019, 76p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Resolução nº 38, de 04 de Junho de 2008, "Dispõe sobre a instalação e o funcionamento de Serviços de Medicina Nuclear "in vivo" "*. Brasília: ANVISA; 2008. 11p.
- _____. *Consulta no site da Anvisa sobre a situação regular do Sandostatin® (Acetato de Octreotida) e indicações de uso*. Disponível em: <<https://consultas.anvisa.gov.br/#/medicamentos/250000132179210/?nomeProduto=sandostat in>>. Acessado em: 04 Mar. 2019.
- ASSIS, L. M. et al. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Braz. J. Food Technol.*, v. 15, n. 2, p. 99-109, Jun. 2012.
- BANIK, B. L.; FATTAHI, P.; BROWN, J. L. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.*, v. 8, n. 2, p. 271-299, Mar.-Apr. 2016.
- BEHLING, F. et al. High Expression of Somatostatin Receptors 2A, 3, and 5 in Corticotroph Pituitary Adenoma. *Int. J. Endocrinol.*, n. 1763735, 12 p., Dec. 2018.
- BERTRAND, N. et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv. Drug Deliv. Rev.* v. 66, p. 2-25, Feb. 2014.
- BHATIA, S. Nanoparticles Types, Classification, Characterization, Fabrication Methods and Drug Delivery Applications. In: *Natural Polymer Drug Delivery Systems*. Springer: Cham., p. 33-93, 2016.

- BIASSONI, L.; EASTY, M. Paediatric nuclear medicine imaging. *Br. Med. Bull.*, v. 123, n. 1, p. 127-148, Sep. 2017.
- BLANCO, E.; SHEN, H.; FERRARI, M. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery. *Nat. Biotechnol.*, v. 33, n. 9, p. 941-951, Sep. 2015.
- BODMER, D. et al. Pasireotide prevents nuclear factor of activated T cells nuclear translocation and acts as a protective agent in aminoglycoside- induced auditory hair cell loss. *J. Neurochem.*, v. 139, n. 6, p. 1113-1123, Dec. 2016.
- BOENO, N.; NABINGER, P. M.; SCHMITT, V. M. *Revisão comparativa dos Ga-DOTA-peptídeos*. 2014. Trabalho apresentado no 24º Congresso da Asociación Latinoamericana de Sociedades de Biología y Medicina Nuclear, Cancún, 2014.
- BRERETON, M.F. et al. Alpha-, Delta- and PP-cells: Are They the Architectural Cornerstones of Islet Structure and Co-ordination? *J. Histochem. Cytochem.*, v. 63, n. 8, p. 575-591, Aug. 2015.
- BRUNTON, L. L.; HILAL-DANDAN, R.; KNOLLMANN, B. C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman*. 13.ed. Porto Alegre: Artmed, 2018.1760 p.
- CALZONI, E. et al. Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies. *J. Funct. Biomater.*, v. 10, n. 1, 15p. Jan. 2019.
- CHAKRAVARTY, R.; HONG, H.; CAI, W. Positron Emission Tomography Image-Guided Drug Delivery: Current Status and Future Perspectives. *Mol. Pharm.*, v. 11, n. 11, p. 3777-3797, Nov. 2014.
- _____. et al. Radiolabeled inorganic nanoparticles for positron emission tomography imaging of cancer: an overview. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, v. 61, n. 2, p. 181-204, Jun. 2017.
- CHOI, Y. E.; KWAK, J. W.; PARK, J. W. Nanotechnology for early cancer detection. *Sensors*, n. 10, v. 1, p. 428-455, Jan. 2010.
- CIAPPELLANO, S. G. et al. *In vitro* toxicity assessment of oral nanocarriers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 106, p. 381-401, Nov. 2016.
- COLLISSON, E. A. et al. Molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 2019, Feb. 2019. disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41575-019-0109-y>>. Acesso em: 07 Feb. 2019.
- CONNROT, J. et al. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Front. Chem.*, v. 2, n. 105, 27p., Nov. 2014.
- DANAEL, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of lipidic nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, v. 10, n. 57, 17p. May 2018.
- DAVIES, K.; CONLON, K. C. Neuroendocrine tumors of the pancreas. *Curr. Gastroenterol. Rep.*, v. 11, n. 2, p. 119-127, Apr. 2009.

DE JESUS FELISMINO, C. et al. Effect of obesity on biodistribution of nanoparticles. *J. Control. Release*, v. 281, p. 11-18, Jul. 2018.

DEBBAGE, P.; JASCHKE, W. Molecular imaging with nanoparticles: giant roles for dwarfactors. *Histochem. Cell. Biol.*, v. 130, n. 5, p. 845-875, Nov. 2008.

DELGADO, J. M. F. *Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa*. 2013. 117f. Dissertação (Mestre em Tecnologia Biomédica) - Escola Superior de Tecnologia e Gestão, Instituto Politécnico de Bragança, Goiás, 2013.

DÍAZ, M. R., VIVAS-MEJIA, P. E. Nanoparticles as Drug Delivery Systems in Cancer Medicine: Emphasis on RNAi-Containing Nanoliposomes. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 11, p. 1361-1380, Nov. 2013.

DING, C. et al. Recent advances in stimuli-responsive release function drug delivery systems for tumor treatment. *Molecules*, v. 21, n. 12, 30p., Dec. 2016.

FAHEY, F. H. et al. Dose Estimation in Pediatric Nuclear Medicine. *Semin. Nucl. Med.*, v. 47, n. 2, p. 118-125, Mar. 2017.

FDA. *Aprovação Sandostatin (Acetato de Octreotida)*. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/98/021008a_clinphrm.pdf. Acesso em: 04 Fev. 2019.

FELIPPI, C. C. *Nanopartículas contendo isotretinoína: Preparação, caracterização físico-química, estudo de estabilidade e avaliação da penetração cutânea*. 2008. 136f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

GENDELMAN, H. E. et al. Nanoneuromedicines for degenerative, inflammatory, and infectious nervous system diseases. *Nanomedicine*, v. 11, n. 3, p. 751-767, Apr. 2015.

GHOREISHI, S. M. et al. Technetium-99m chelator-free radiolabeling of specific glutamine tumor imaging nanoprobe: in vitro and in vivo evaluations. *Int. J. Nanomedicine*, v. 13, p. 4671-4683, Aug. 2018.

GIORDANI, C. F. A. *Nanocápsulas e nanoesferas de disseleneto de difenila: síntese e distribuição biológica*. 2012. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

GOEL, S. et al. Positron emission tomography and nanotechnology: A dynamic duo for cancer theranostics. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, v. 113, p. 157-176, Apr. 2017.

GULUMIAN, M.; ANDRAOS, C. In Search of a Converging Cellular Mechanism in Nanotoxicology and Nanomedicine in the Treatment of Cancer. *Toxicol. Pathol.*, v. 46, n. 1, p. 4-13, Jan. 2018.

GUTFILEN, B.; VALENTINI, G. Radiopharmaceuticals in nuclear medicine: recent developments for SPECT and PET studies. *Biomed. Res. Int.*, v. 2014, 3p., 2014.

HALFDANARSON, T. R. et al. Pancreatic neuroendocrine tumors (PNETs): Incidence, prognosis and recent trend toward improved survival. *Ann. Oncol.* v.19, n. 10, p. 1727-1733, Oct. 2008.

HAUGVIK, S. P. et al. Diabetes, smoking, alcohol use, and family history of cancer as risk factors for pancreatic neuroendocrine tumors: a systematic review and meta-analysis. *Neuroendocrinology*, v. 101, n. 2, p. 133-142, Jan. 2015.

HERRERA-MARTÍNEZ, A. D. et al. Targeted Systemic Treatment of Neuroendocrine Tumors: Current Options and Future Perspectives. *Drugs*, v.79, n. 1, p. 21-42, Jan. 2019.

HIRONAKA, F. H. et al. *Medicina Nuclear: Princípios e Aplicações*, São Paulo: Atheneu, 2012. 497 p.

HOSHYAR, N. et al. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction. *Nanomedicine*, v. 11, n. 6, p. 673-692, Mar. 2016.

HUANG, W.; ZHANG, C. Tuning the Size of Poly(lactic-co-glycolic Acid) (PLGA) Nanoparticles Fabricated by Nanoprecipitation. *Biotechnol. J.* v. 13, n. 1, 19 p. Jan. 2018.

ILIC, M.; ILIC, I. Epidemiology of pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.*, v. 22, n.44, p. 9694-9705, Nov. 2016.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. *Dados de incidência e mortalidade*. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pancreas>>. Acessado em: 03 Mar 2019.

JENSEN, R. T. Endocrine tumors of the gastrointestinal tract and pancreas. In: KASPER, D. et al. (Ed.). *Harrison's principles of internal medicine*. 17^a ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division; 2008. p.2347-2358.

KANNAN, R. M. et al. Emerging concepts in dendrimer-based nanomedicine: from design principles to clinical applications. *J. Intern. Med.*, v. 276, n. 6, p. 579-617, Dec. 2014.

KETTLER, K. et al. Cellular uptake of nanoparticles as determined by particle properties, experimental conditions, and cell type. *Environ. Toxicol. Chem.*, v. 33, n. 3, p. 481-492, Mar. 2014.

KIM, S. et al. Engineered Polymers for Advanced Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, n. 3, v. 71, p. 420-430, Mar. 2009.

KOOPAEI, N. N.; ABDOLLAHI, M. Opportunities and obstacles to the development of nanopharmaceuticals for human use. *Daru.*, v. 24, n. 1, 6p., Nov. 2016.

KRULICH, L.; DHARIWAL, P. S.; MCCANN, S. M. Stimulatory and inhibitory effects of purified hypothalamic extracts on growth hormone release from rat pituitary *in vitro*. *Endocrinology*, v. 83, n. 4, p. 783-790, Oct. 1968.

KUŁAKOWSKI, A. The contribution of Marie Skłodowska-Curie to the development of modern oncology. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 400, n. 6, p.1583-1586, Jun. 2011.

KUO, S. C. et al. Sporadic pancreatic polypeptide secreting tumors (PPomas) of the pancreas. *World J. Surg.* v. 32, n. 8, p. 1815-1822, Aug. 2008.

KWEKKEBOOM, D. J. et al. Somatostatin receptor-based imaging and therapy of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Endocr. Relat. Cancer*, v. 17, n. 1, p. R53-73, Jan. 2010.

LI, A. et al. An efficient and long-acting local anesthetic: ropivacaine-loaded lipid-polymer hybrid nanoparticles for the control of pain. *Int. J. Nanomedicine*, v. 14, p. 913-920, Jan. 2019.

LIECHTY, W. B.; PEPPAS, N. A. Expert opinion: responsive polymer nanoparticles in cancer therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 80, n. 2, p. 241-246, Feb. 2012.

LUCAS, A. T. et al. Complex effects of tumor microenvironment on the tumor disposition of carrier-mediated agents. *Nanomedicine*, v. 12, n. 16, p. 2021-2042, Aug. 2017.

ŁUKOMSKA, A. et al. Somatostatin receptors in the brain. *Postępy. Biochemii.*, v. 64, n. 3, p. 213-221, Oct. 2018.

MARTÍN-GAGO, P. et al. Peptide aromatic interactions modulated by fluorinated residues: Synthesis, structure and biological activity of Somatostatin analogs containing 3-(3',5'difluorophenyl)- alanine. *Sci. Rep.*, v. 6, n. 27285, 9p., Jun. 2016.

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.*, v. 46, n. 12, p. 6387-6392, Dec. 1986.

MAXWELL, J.E.; O'DORISIO, T.M.; HOWE, J.R. Biochemical Diagnosis and Preoperative Imaging of Gastroenteropancreatic Neuroendocrine Tumors. *Surg. Oncol. Clin.N. Am.*, v. 25, n.1, p. 171-194, Jan. 2016.

MELO, I. B. *Preparo do reagente liofilizado HYNIC-[Tyr3]-octreotato e estudo de marcação com tecnécio-99m*. 2008. 105f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.

METZ, D. C.; JENSEN, R. T. Gastrointestinal neuroendocrine tumors: pancreatic endocrine tumors. *Gastroenterology*, v. 135, n. 5, p. 1469-1492, Nov. 2008.

MIAO, L.; HUANG, L. Exploring the Tumor Microenvironment with Nanoparticles. *Cancer Treat. Res.*, v. 166, p. 193-226, 2015.

MIKOŁAJCZAK, R.; MAECKE, H. R. Radiopharmaceuticals for somatostatin receptor imaging. *Nucl. Med. Ver. Cent. East. Eur.*, v. 19, n. 2, p. 126-132, 2016.

- MIRAKABAD, F. S. T. et al. PLGA-Based Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, v. 15, n. 2, p. 517-535, 2014.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, n. 1-2, v. 385, p. 113-142, 2010.
- MOREIRA, J. R. L. *A Nanotecnologia na liberação controlada de fármacos no Tratamento do Câncer de Mama*. 2013. 38p. Monografia (Conclusão de Curso de Farmácia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.
- MORITZ, M.; GESZKE-MORITZ, M. Recent Developments in the Application of Polymeric Nanoparticles as Drug Carriers. *Adv. Clin. Exp. Med.*, v. 24, n. 5, p. 749-758, Sep.-Oct. 2015.
- MULLAN, M. H.; GAUGER, P. G.; THOMPSON, N. W. Endocrine tumours of the pancreas: review and recent advances. *ANZ J. Surg.*, v. 8, n. 71, p. 475-482, Aug. 2001.
- MUSUMECI, T.; BONACCORSO, A.; PUGLISI, G. Epilepsy Disease and Nose-to-Brain Delivery of Polymeric Nanoparticles: An Overview. *Pharmaceutics*, v. 11, n. 3, 21p., Mar. 2019.
- NAOUM, G. E. et al. Role of nanotechnology and gene delivery systems in TRAIL-based therapies. *Ecancermedicalscience*, v. 10, n. 660, 17p., Aug. 2016.
- NOVARTIS. *Bula profissional Sandostatin® (Acetato de Octreotida)*. Aprovada pela ANVISA em 2017. Disponível em: <<https://portal.novartis.com.br/UPLOAD/ImgConteudos/2742.pdf>>. Acessado em: 30 Mai. 2019.
- ODA, C. M. R. et al. Synthesis, characterization and radiolabeling of polymeric nano-micelles as a platform for tumor delivering. *Biomed. Pharmacother.*, v. 89, p. 268-275, May 2017.
- OJHA, S.; KUMAR, B. A review on nanotechnology based innovations in diagnosis and treatment of multiple sclerosis. *Journal of Cellular Immunotherapy*, v. 4, p. 56-64, Dec. 2018.
- OJER, P. et al. Toxicity evaluation of nanocarriers for the oral delivery of macromolecular drugs. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, v. 97, p. 206-217, Nov. 2015.
- OLIVEIRA, L. C., et al. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura. *Rev. Bras. Cancerol.*, v. 58, n. 4, p. 695-701, May 2012.
- OVALLES, M.A.; VERA, L.; OLIVIERI, M.B. Diagnóstico y tratamiento de tumores neuroendocrinos productores de acth. *Rev. Venez. Endocrinol. Metab.* v.12, n. 2, p. 89-101, 2014.
- PAN, J. et al. Polymeric Co-Delivery Systems in Cancer Treatment: An Overview on Component Drugs' Dosage Ratio Effect. *Molecules*, v.24, n. 6, 32p., Mar. 2019.
- PANCREATIC CANCER TREATMENT (PDQ®). *Health Professional Version*. PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US); 2002-. 2019 Jan 29. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65957/>>. Acessado em: 26 Fev. 2019.

PARAGLIOLA, R. M.; SALVATORI, R. Novel Somatostatin Receptor Ligands Therapies for Acromegaly. *Front. Endocrinol.*, v. 9, n. 78, 18p. Mar 2018.

PATEL, S. P.; PATEL, P. B.; PAREKH, B. B. Application of nanotechnology in cancers prevention, early detection and treatment. *J Cancer Res Ther.* v. 10, n. 3, p. 479-486, Jul-Sep. 2014.

PATRÍCIO, B. F. C. *Desenvolvimento de nanorradiofármacos de EDTMP para o tratamento da síndrome incurável da metástase óssea.* 2012. 127f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Riode Janeiro, 2012.

PATRICIO, B. F. C. et al. Development of Novel Nanoparticle for Bone Cancer. *J. Biomed. Nanotechnol.*, v. 7, n. 10, p. 1242-1248, Jul. 2014.

PAUWELS, E. et al. Somatostatin receptor PET ligands - the next generation for clinical practice. *Am. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, v. 8, n. 5, p. 311-331, Oct. 2018.

PELAZ, B. et al. Diverse Applications of Nanomedicine. *ACS Nano.*, v. 11, n. 3, p. 2313-2381, Mar. 2017.

PINTO, S. R. et al. Cytotoxicity, genotoxicity, transplacental transfer and tissue disposition in pregnant rats mediated by nanoparticles: the case of magnetic core mesoporous silica nanoparticles. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, v. 46, n. 2, p. 527-538, Apr. 2018.

PORTILHO, F. L. et al. *In loco* retention effect of magnetic core mesoporous silica nanoparticles doped with trastuzumab as intralesional nanodrug for breast cancer. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, v. 46, n. 3, p. S725-S733, Nov. 2018.

PRRNT. *Practical Guidance on Peptide Receptor Radionuclide Therapy (PRRNT) for Neuendocrine Tumours.* IAEA, 2013:140p.

RAHIB, L. et al. Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res.*, v. 74, n. 11, p. 2913-21, Jun. 2014.

RAI U, et al. Therapeutic uses of somatostatin and its analogues: Current view and potential applications. *Pharmacol. Ther.*, v. 52, p. 98-110, Aug 2015.

RAMAGE, J. NARAEV, B. G.; HALFDANARSON, T. R. Peptide receptor radionuclide therapy for patients with advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *Semin. Oncol.*, v. 45, n. 4, p. 236-248, Aug. 2018.

RADOMSKA, A.; LESZCZYSZYN, J.; RADOMSKI, M. W. The Nanopharmacology and Nanotoxicology of Nanomaterials: New Opportunities and Challenges. *Adv. Clin. Exp. Med.*, v. 25, n. 1, p. 151-62, Jan-Feb. 2016.

RAUDSZUS, B.; MULAC, D.; LANGER, K. A new preparation strategy for surface modified PLA nanoparticles to enhance uptake by endothelial cells. *Int. J. Pharm.*, v. 536, n. 1, p. 211-221, Jan. 2018.

- RORSMAN, P.; HUISING, M. O. The somatostatin-secreting pancreatic δ -cell in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.*, v. 14, n. 7, p. 404-414, Jul. 2018.
- SAAD, M. Z. H.; JAHAN, R.; BAGUL, U. Nanopharmaceuticals: a New perspective of drug delivery system. *Asian J. Biomed. Pharm. Sci.*, v. 2, n. 14, p. 11-20, Dec. 2012.
- SAGER, S. et al. Clinical value of technetium-99m-labeled octreotide scintigraphy in local recurrent or metastatic medullary thyroid cancers: a comparison of lesions with ^{18}F -FDG-PET and MIBI images. *Nucl. Med. Commun.*, v. 34, n. 12, p. 1190-1195, Dec. 2013.
- SAHA, G. B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 7 ed. Nova Iorque: Springer Verlag, 2018. 428p.
- SALVI, R. et al. Diagnosing lung cancer using etoposidemicroparticles labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$. *Artif. Cells. Nanomed. Biotechnol.*, v. 46, n. 2, p. 341-345, Mar. 2018.
- SANTOS, A. P. Tumores Neuroendócrinos: Requisitos Mínimos para o Diagnóstico Clínico. *Revista Portuguesa de Cirurgia*, v. 2, n. 16, p.28-34, Mar. 2011.
- SANTOS-OLIVEIRA, R. *Comparação das diversas tecnologias de imagem disponíveis atualmente no mundo e em uso em medicina*. Rio de Janeiro: Instituto de Engenharia Nuclear, 2016. Notas de aula.
- SANTOS-OLIVEIRA, R; Stabin MG. Dose calculation of radioactive nanoparticles: first considerations for the Design of Theranostic Agents. *Biomed Microdevices*. 2018 Oct 29;20(4):93.
- SARCINELLI, M. A. *Desenvolvimento de Nanopartícula de Poli(Ácido Láctico) contendo Anticorpo Monoclonal marcada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para o Diagnóstico Precoce e Tratamento Eficaz do Câncer de Mama*. 2014. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências, em Ciência e Tecnologia de Polímeros) - Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano, Rio de Janeiro, 2014.
- SARCINELLI, M. A. et al. Nanoradiopharmaceuticals for breast cancer imaging: development, characterization, and imaging in induced animals. *Onco. Targets Ther.*, v. 23, n. 9, p. 5847-5854, Sep. 2016.
- SCHEINBERG, D. A. et al. Advances in the clinical translation of nanotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.*, v. 46, p. 66-73, Aug. 2017.
- SHARMA, D. et al. Formulation and optimization of polymeric nanoparticles for intranasal delivery of lorazepam using Box-Behnken design: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Biomed. Res. Int.*, v. 2014, n.156010, 14 p., Jul. 2014.
- SHI, S. et al. Chelator-Free Radiolabeling of Nanographene: Breaking the Stereotype of Chelation. *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, v. 56, n. 11, p. 2889-2892, Mar. 2017.
- SIEGEL, R.L. et al. Deaths Due to Cigarette Smoking for 12 Smoking-Related Cancers in the United States. *JAMA Intern. Med.*, v. 175, n. 9, p. 1574-1576, Sep. 2015.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.*, v. 69, n. 1, p. 7-34, Jan. 2019.

SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE AND MOLECULAR IMAGING. *Historical timeline: important moments in the history of nuclear medicine*. Disponível em: <<http://www.snmmi.org/AboutSNMMI/Content.aspx?ItemNumber=4175>>. Acessado em: 06 Mar. 2019.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A. Preparação de Nanopartículas Poliméricas a partir de Polímeros Pré-formados – Parte II. *Polímeros*, v. 22, n. 1, p. 101-106, Jan. 2012.

STROBEL, O. et al. Optimizing the outcomes of pancreatic cancer surgery. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, v. 16, n. 1, p. 11-26, Jan. 2019.

SUN, L.; COY, D. H. Somatostatin and its Analogs. *Current Drug Targets*, v. 17, n. 5, p. 529-537, 2016.

SUN, Q. et al. Enhancing Tumor Penetration of Nanomedicines. *Biomacromolecules*, v. 18, n. 5, p. 1449-1459, May 2017.

SUTRADHAR K. B.; AMIN, L. Nanotechnology in Cancer Drug Delivery and Selective Targeting. *ISRN Nanotechnology*, v. 2014, n. 939378, 12 p., Jan. 2014.

TAO, J.; CHOW, S. F.; ZHENG, Y. Application of flash nanoprecipitation to fabricate poorly water-soluble drug nanoparticles. *Acta Pharm. Sin. B.*, v. 9, n. 1, p. 4-18, Jan. 2019.

TING, G. et al. Nanotargeted radionuclides for cancer nuclear imaging and internal radiotherapy. *J. Biomed. Biotechnol.*, v. 2010, n. 953537, 17 p., Aug. 2010.

VINIK, A.; FELIBERTI, Z.; PERRY, R. R. Pancreatic Polypeptide (PPoma). In: FEINGOLD, K.R. et al. SourceEndotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Jun. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279067/>>. Acessado em: 02 Mar 2019.

WANG, Y. et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications. *Nanomedicine*, v. 11, n. 2, p. 313-327, Feb. 2015.

WILLIAMS, W. H. et al. Case report on intravenous octreotide for the treatment of intraoperative vasoplegia following thymoma resection. *SAGE Open Med. Case Rep.*, v. 7, p. 1-4, Feb. 2019.

WONG, K. H. et al. Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 20, n. 2, 26p., Jan. 2019.

YAO, J.C.; HOFF, P.M.; HOFF, A.O. Neuroendocrine Tumors. 1. ed. New York: Humana Press, 2011.

YAU, H. et al. Octreotide long-acting repeatable in the treatment of neuroendocrine tumors: patient selection and perspectives. *Biologics*, v. 11, p. 115-122, Dec. 2017.

YORDANOVA, A. et al. Theranostics in nuclear medicine practice. *Onco. Targets Ther.*, v. 10, p. 4821-4828, Oct. 2017.

ZDROJEWICZ, Z. et al. Medical applications of nanotechnology. *Postepy Hig. Med. Dosw.*, v. 69, p. 1196-1204, Oct. 2015.

ZHANG, L. et al. Properties and applications of nanoparticle/microparticle conveyors with adjuvant characteristics suitable for oral vaccination. *Int. J. Nanomedicine*, v. 13, p. 2973-2987, May 2018.

ZHAO, L. et al. Radiolabeled Dendrimers for Nuclear Medicine Applications. *Molecules*, v. 22, n. 9, Aug. 2017.

ZHOU, B. Early detection of pancreatic cancer: Where are we now and where are we going? *Int. J. Cancer*, v. 141, n. 2, p. 231-241, Jul. 2017.

ZHU, H. Z. et al. Identification and imaging of miR-155 in the early screening of lung cancer by targeted delivery of octreotide-conjugated chitosan-molecular beacon nanoparticles. *Drug Deliv.*, v. 25, n. 1, p. 1974-1983, Nov. 2018.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética para uso de Animais (CEUA)



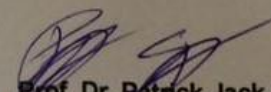
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **“DESENVOLVIMENTO DE NANORRADIOFARMACOS”**, registrada com o nº 181/17 sob a responsabilidade de **EMERSON SOARES BERNARDES** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DA (CEUA/IPEN) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN–CNEN/SP), em reunião de 19/01/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Fevereiro/2017 a Dezembro/2019
Espécie/linhagem/raça	<i>Mus musculus</i> /BALB/c Nude
Nº de animais	300 camundongos
Peso/Idade	8 a 10 semanas
Sexo	150 Machos 150 Fêmeas
Origem	Biotério IPEN

São Paulo, 19 de Janeiro de 2017.


Prof. Dr. Patrick Jack Spencer
 Vice coordenador da CEUA-IPEN

IPEN-CNEN/SP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
 Av Prof Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP 05508-000 - São Paulo - SP
 Telefone: (011) 3133-9696 - Fax (011) 3133-9709
 E-mail: ceuaipen@ipen.br

ANEXO B - Produção de Nanopartículas Poliméricas

No trabalho, o método utilizado para a preparação das nanopartículas (NPs) foi o de dupla emulsificação seguido pela evaporação do solvente, segundo adaptação do protocolo descrito por Patricio e colaboradores (2014). Este método pode ser dividido em 4 etapas:

- a) 1ª Etapa: Preparação da Emulsão Água/Óleo (a/o);
- b) 2ª Etapa: Preparação da Emulsão Água/Óleo/Água (a/o/a);
- c) 3ª Etapa: Evaporação do Solvente Orgânico;
- d) 4ª Etapa: Retirada do Excesso de resíduos.

Foram preparados dois tipos de NPs: a primeira vazia (sem Octreotida) e a segunda com o Octreotida.

1. Obtenção das nanopartículas vazias de PLA/PVA

- a) 1ª Etapa: Preparação da Emulsão Água/Óleo (a/o):

Em 4 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) foram dissolvidos 50 mg de ácido polilático (PLA) e levado para a ultrassonicação a 55 W (100% da potência) por 2 minutos (Ultrasonic Processor - UP100H). Durante este processo foi vertida sob gotejamento 1mL da solução de álcool polivinílico (PVA) a 0,1%. No final desse processo obteve-se uma emulsão a/o (Figura 1).

- b) 2ª Etapa: Preparação da Emulsão Água/Óleo/Água (a/o/a):

Em seguida, 10 mL de uma solução aquosa de PVA a 1% foi gotejada sobre a primeira emulsão obtida na etapa anterior sob a ultrassonicação a 55 W (100% potência) por 2 minutos e 30 segundos (Ultrasonic Processor -UP100H), obtendo-se por fim, uma emulsão a/o/a (Figura 1).

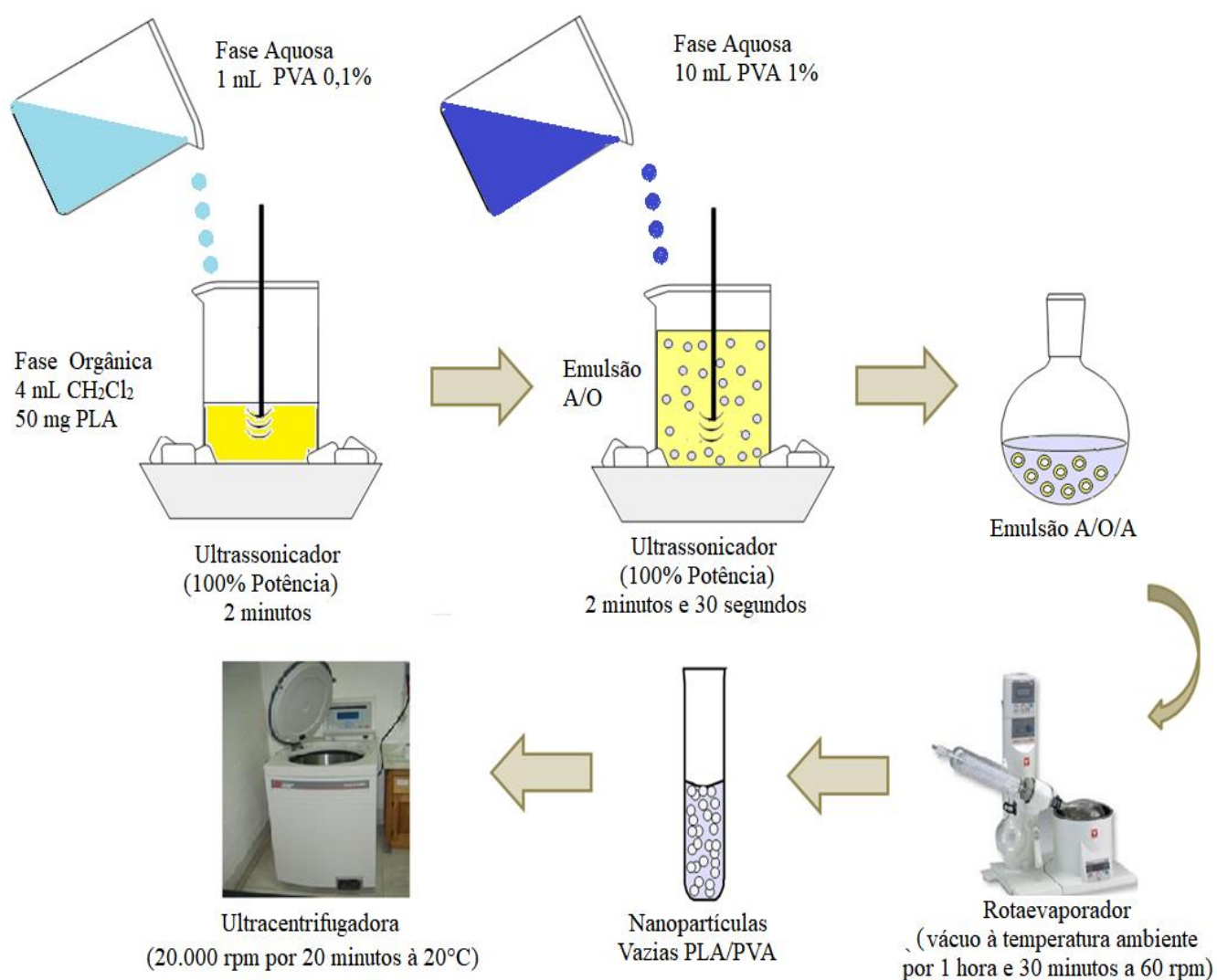
- c) 3ª Etapa: Evaporação do Solvente Orgânico:

A emulsão final foi colocada no rotaevaporador (Büchi Waterbath B-480) sob vácuo à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante 1 hora e 30 minutos a 60 rpm para eliminação do excesso de diclorometano, obtendo as nanopartículas vazias de PLA/PVA (Figura 1).

d) 4ª Etapa: Retirada do Excesso de resíduos:

O conteúdo final foi então centrifugado (Beckman Avanti® J-25) a 20.000 rpm a 20°C por 20 minutos obtendo-se nanopartículas vazias PLA/PVA purificadas (Figura 1). Nesta etapa o sobrenadante é separado para posterior análise da eficiência de encapsulação.

Figura 1– Esquema de formação das nanopartículas poliméricas sem o Octreotida. Uma fase orgânica (representada em amarelo) contendo o PLA dissolvido em Diclorometano (CH_2Cl_2) foi colocada no ultrassonicador sobre a qual foi vertida fase aquosa (representada em tom mais claro de azul) contendo o PVA a 0,1%, formando uma emulsão a/o. Em seguida, verteu-se outra solução aquosa (representada em tom mais escuro de azul) contendo PVA a 1% sobre a emulsão previamente formada, originando a emulsão a/o/a após outro processo de ultrassonificação. O solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida formando as nanopartículas vazias de PLA/PVA. Por fim, as nanopartículas foram purificadas na ultracentrifugadora.



Fonte: Adaptação de SARCINELLI, 2014.

2. Obtenção das nanopartículas de PLA/PVA/Octreotida

a) 1ª Etapa: Preparação da Emulsão Água/Óleo (a/o):

Em 4 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) foram dissolvidos 50 mg de ácido polilático (PLA) e levado para a ultrassonicação a 55 W (100% da potência) por 2 minutos (Ultrasonic Processor - UP100H). Durante este processo foi vertida sob gotejamento 1mL da solução aquosa a 4% de Acetato de Octreotida (Sandostatin[®]) e 0,1% de álcool polivinílico (PVA). No final desse processo obteve-se uma emulsão a/o (Figura 2).

b) 2ª Etapa: Preparação da Emulsão Água/Óleo/Água (a/o/a):

Em seguida, 10 mL de uma solução aquosa de PVA a 1% foi gotejada sobre a primeira emulsão obtida na etapa anterior sob a ultrassonicação a 55 W (100% potência) por 2 minutos e 30 segundos (Ultrasonic Processor -UP100H), obtendo-se por fim, uma emulsão a/o/a (Figura 2).

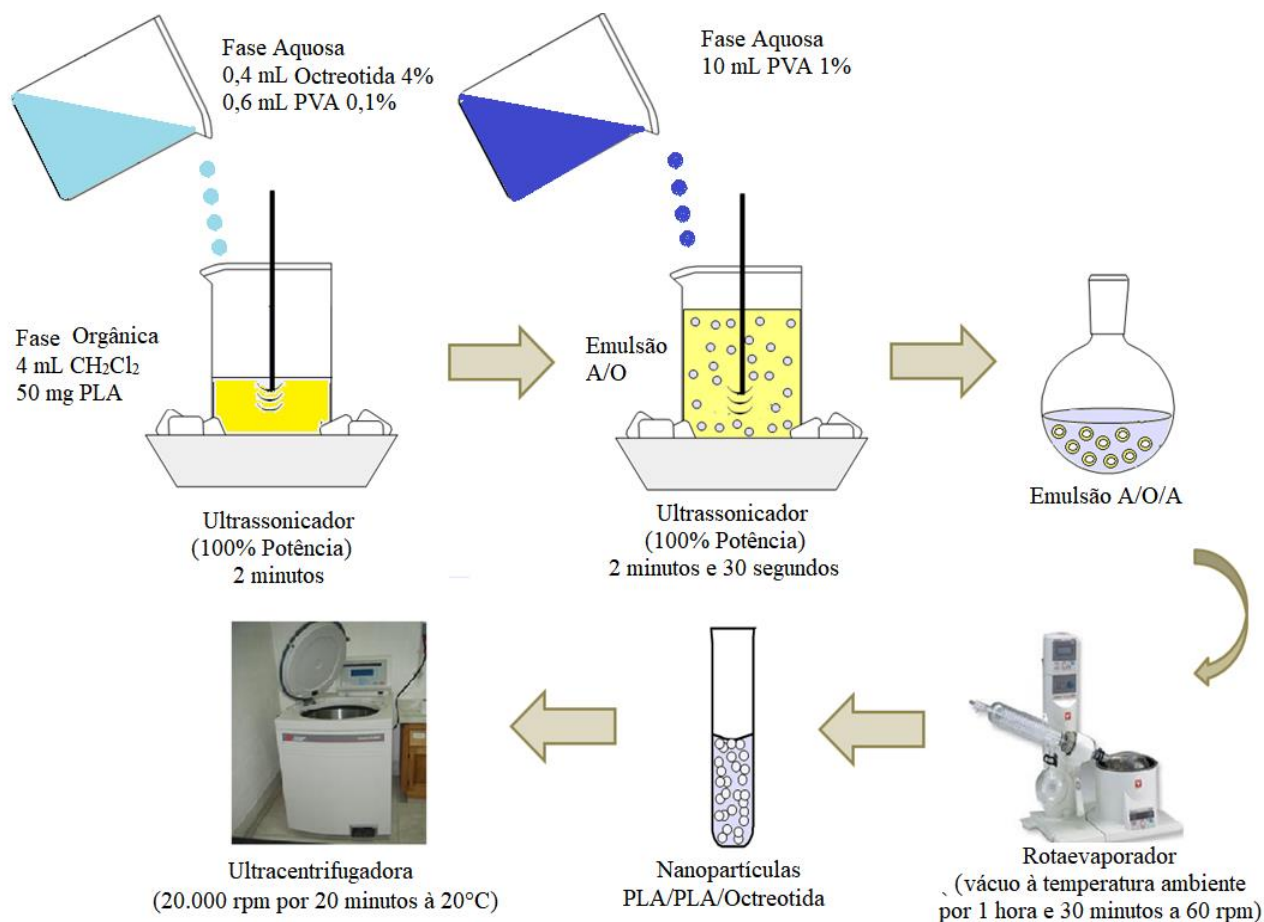
c) 3ª Etapa: Evaporação do Solvente Orgânico:

A emulsão final foi colocada no rotaevaporador (Büchi Waterbath B-480) sob vácuo à temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) durante 1 hora e 30 minutos a 60 rpm para eliminação do excesso de diclorometano, obtendo as nanopartículas de PLA/PVA/Octreotida (Figura 2).

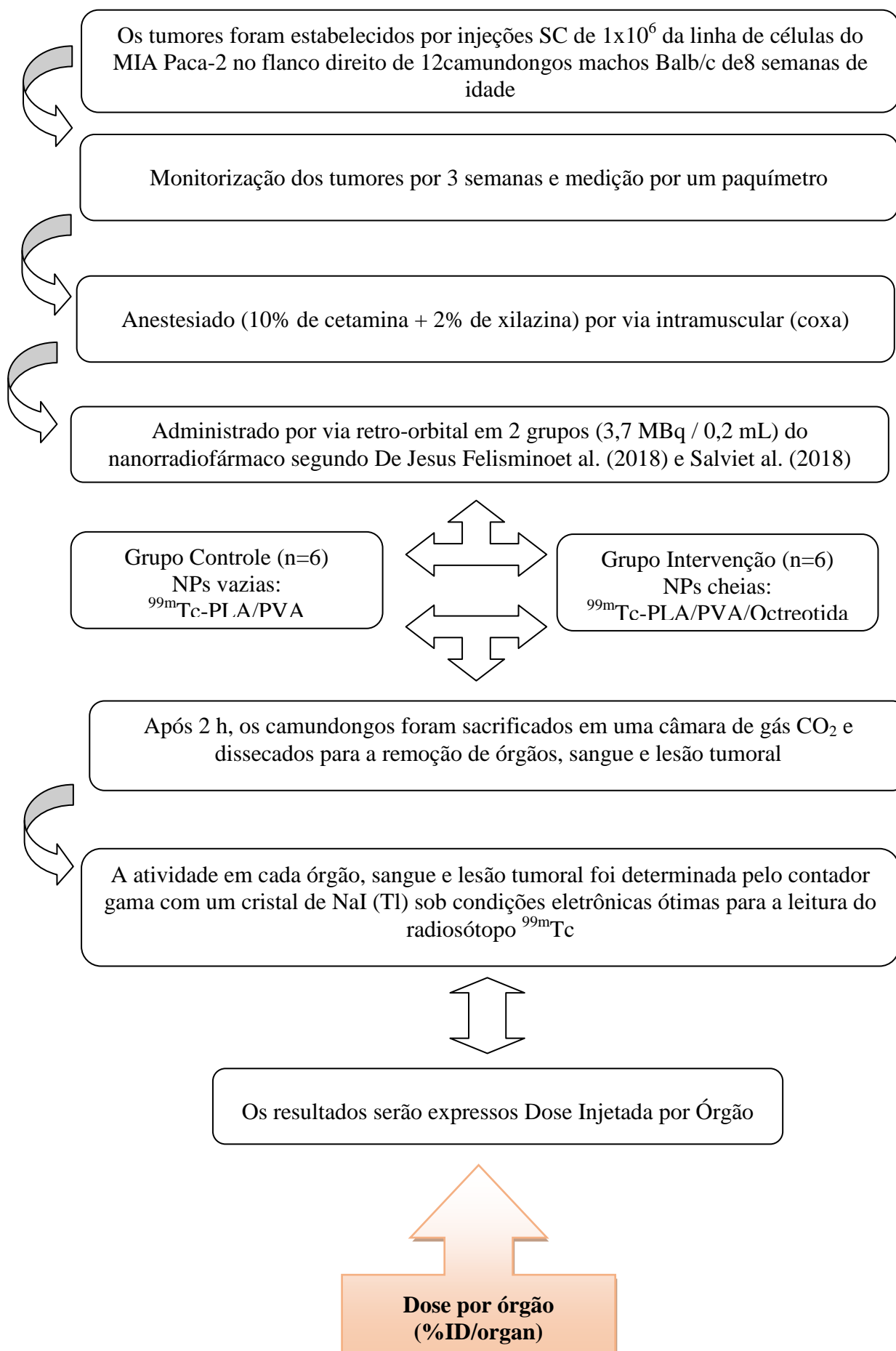
d) 4ª Etapa: Retirada do Excesso de resíduos:

O conteúdo final foi então centrifugado (Beckman Avanti® J-25) a 20.000 rpm a 20°C por 20 minutos obtendo-se nanopartículas de PLA/PVA/Octreotida purificadas (Figura 11). Nesta etapa o sobrenadante é separado para posterior análise da eficiência de encapsulação.

Figura 2 – Esquema de formação das nanopartículas poliméricas com o Octreotida. Uma fase orgânica (representada em amarelo) contendo o PLA dissolvido em Diclorometano (CH_2Cl_2) foi colocada no ultrassonicador sobre a qual foi vertida fase aquosa (representada em tom mais claro de azul) contendo o PVA a 0,1% e Octreotida a 4%, formando uma emulsão a/o. Em seguida, verteu-se outra solução aquosa (representada em tom mais escuro de azul) contendo PVA a 1% sobre a emulsão previamente formada, originando a emulsão a/o/a após outro processo de ultrassonificação. O solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida formando as nanopartículas de PLA/PVA/Octreotida. Por fim, as nanopartículas foram purificadas na ultracentrifugadora



Fonte: Adaptação de SARCINELLI, 2014.

ANEXO C - Diagrama do Estudo de Biodistribuição no modelo animal induzido

ANEXO D - Comprovação de submissão do 2^o artigo científico

----- Forwarded message -----

From: **Pharmaceutical Research**<em@editorialmanager.com>
Date: dom, 17 de mar de 2019 às 11:57
Subject: PHAM-D-19-00162 - Submission Confirmation
To: Ralph Santos-Oliveira <presidenciaradiofarmacia@gmail.com>

Dear Dr Santos-Oliveira,

Thank you for submitting your manuscript,

"Octreotide Nanoparticles showed affinity for in vivo MIA Paca-2 Induced Pancreas Ductal Adenocarcinoma mimicking Pancreatic Polypeptide-secreting Tumor of the Distal Pancreas (PPoma)", to Pharmaceutical Research

The submission id is: PHAM-D-19-00162

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript.

Please log in as author at the Editorial Manager (EM) system:

Your username is: roliveira

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at <https://www.editorialmanager.com/pham/>.

If you have any questions, please contact us.

With kind regards,

Springer Journals Editorial Office
Pharmaceutical Research

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/pham/login.asp?a=r>) Please contact the publication office if you have any questions.

--

Dr. Ralph Santos-Oliveira
Presidente
Associação Brasileira de Radiofarmácia
www.abrf.com.br

President
Brazilian Association of Radiopharmacy
www.abrf.com.br