

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

Julio Cezar de Almeida Junior

**Desenvolvimento de nanopartícula 5-fluorouracil radiomarcada
com tecnécio-99 metaestável para diagnóstico por imagem de
câncer**

Rio de Janeiro
2018

Julio Cezar de Almeida Junior

Desenvolvimento de nanopartícula 5-fluorouracil radiomarcada com tecnécio-99 metaestável para diagnóstico por imagem de câncer

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos Oliveira

Rio de Janeiro

2018

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

A448 Almeida Junior, Julio Cesar

Desenvolvimento de nanopartícula 5-fluorouracil radiomarcada com tecnécio-99 metaestável para diagnóstico por imagem de câncer / Julio Cesar Almeida Junior. 2018.
57 f.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos Oliveira

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

1. Câncer – Teses. 2. Nanotecnologia. 3. Diagnósticos por imagem. 4. Adenocarcinoma – Teses. 5. Fluoruracila. I. Oliveira, Ralph Santos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616-006.6

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira. CRB7/5302

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

Assinatura

Data

Julio Cezar de Almeida Junior

Desenvolvimento de nanopartícula 5-fluorouracil radiomarcada com tecnécio-99 metaestável para diagnóstico por imagem de câncer

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Aprovado em 22 de março de 2018

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos Oliveira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Riccio Junior
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Tatiana, de Almeida Simão
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Luiza Rosária de Sousa Dias
Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que ajudaram-me, minha família e noiva que em nenhum momento deixaram de me apoiar com todo suporte necessário.

“... Nunca é tarde para ser o que poderia ter sido...”

Winston Churchill

AGRADECIMENTOS

À Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pelo ensino de qualidade que me proporcionou, bem como aos professores que auxiliaram nesta trajetória direta e/ou indiretamente para a formação acadêmica.

Ao Laboratório de nanorradiofármacos e o Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG), da Faculdade de Farmácia, na UFRJ. Onde foram realizados grande parte deste trabalho, assim como infraestrutura utilizada, paciência e apoio.

A agencia de fomento CNPq, pelo suporte financeiro que permitiu a realização do trabalho.

À minha família, pelo amparo incondicional.

À Fiammeta Nigro e Raphaela Schwenk pela colaboração na produção das nanopartículas.

Ao meu orientador, Ralph Santos Oliveira, pela dedicação e paciência.

RESUMO

ALMEIDA JUNIOR, Julio Cezar. **Desenvolvimento de nanopartícula 5-fluorouracil radiomarcada com tecnécio-99 metaestável para diagnóstico por imagem de câncer.** 57 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O desenvolvimento de novos nanorradiofármacos é uma atividade essencial ao aperfeiçoamento da medicina nuclear e fundamental para o diagnóstico precoce e eficaz das doenças oncológicas, assim como para o avanço da radiofarmácia. Dentre todas as opções de tratamento e diagnóstico do câncer, o desenvolvimento de nanorradiofármacos figura entre as técnicas mais promissoras na detecção precoce de tumores. Os avanços da nanotecnologia, nas últimas décadas, apresentaram importantes contribuições para a melhoria dos processos diagnósticos e terapêuticos, em especial a superação de diversas barreiras moleculares, possibilitando, assim, o melhor direcionamento, bem como aumentando as chances de diagnóstico precoce e tratamento eficiente. Este trabalho teve como objetivo a produção, caracterização e avaliação *in vivo* da biodistribuição de nanopartículas poliméricas de 5-Fluorouracil marcadas com Tecnécio-99m para a detecção de adenocarcinoma. Os resultados corroboraram as expectativas, em particular o direcionamento e o imageamento tumoral.

Palavras-chaves: Adenocarcinoma. Câncer. Nanotecnologia. Tecnécio 99m. Radiofármaco. Marcação de moléculas.

ABSTRACT

ALMEIDA JUNIOR, Julio Cezar. *Development of radiolabeled 5-fluorouracil nanoparticle with technetium-99 metastable for diagnostic imaging of cancer.* 57 f
Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara
Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018

The development of new nanoradiopharmaceuticals is an essential activity for the improvement of nuclear medicine and is essential for the early and effective diagnosis of oncological diseases, as well as for the advancement of radiopharmacy. Among all cancer treatment and diagnosis options, the development of nanoradiopharmaceuticals is among the most promising techniques for the early detection of tumors. The advances of nanotechnology in the last decades have presented important contributions to the improvement of the diagnostic and therapeutic processes, in particular the overcoming of several molecular barriers, thus enabling better targeting, as well as increasing the chances of early diagnosis and efficient treatment. This work aimed at the production, characterization and in vivo evaluation of the biodistribution of polymeric nanoparticles of 5-Fluorouracil labeled with Technetium-99m for the detection of adenocarcinoma. The results corroborated expectations, in particular tumor targeting and imaging.

Keywords: Adenocarcinoma. Cancer. Nanotechnology. Technetium 99m.
Radiopharmaceutical. Labeling process.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Multiestágio da carcinogêneses.....	15
Figura 2	Imagem tomográfica.....	18
Figura 3	Moléculas de 5Fu.....	20
Figura 4	Biotransformação do 5FU	21
Figura 5	Barreiras de transportes para fornecimento da nanodroga tumoral em um microambiente tumoral, incluindo fraca perfusa de sangue, MEB denso e um grande número de células estromais	26
Figura 6	Controle de qualidade do processo de radiomarcção do 5FU- ^{99m} Tc	29
Figura 7	Contador gama (Perkin Elmer modelo Wizard® 2470) utilizado na determinação da contagem radioativa nos estudos cromatográficos e de biodistribuição	30
Figura 8	Esquema representativo das partículas em solução, para elucidação das medidas de diâmetro	34
Figura 9	Metodologia da técnica da injeção da nanopartícula	35
Figura 10	Imagem da nanopartículas de PLGA/PVA/5FU no aumento de 100.000 vezes no MEV	38
Figura 11	Caracterização de espalhamento de luz dinâmico	39
Gráfico 1	Relação de dose nos órgãos (%) considerando a absorção em fígado e baço, das nanopartículas de PVA/PLGA/5FU- ^{99m} Tc após 2 horas de administração caudal em relação a dose injetado em cada órgão.....	41
Gráfico 2	Relação de dose nos órgãos (%) não considerando a absorção em fígado e baço das nanopartículas de PVA/PLGA/5FU- ^{99m} Tc após 2 horas de administração caudal em relação a dose injetado em cada órgão	42
Figura 12	Curva de calibração obtida através de dados da espectrofotometria colocados em função da reta mostrando a variação da concentração do 5-FU	44

Figura 13	Imagem por Tomografia Computadorizada de Rato Induzido com Adenocarcinoma, a fim de identificar corretamente a localização do tumor.....	45
Figura 14	Imagem tomográfica mostrando a ligação das nanopartículas no tumor e ligação no fígado após 2 horas da administração	46

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5FU	5 Fluorouracil
^{99m} Tc	Tecnécio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CGS	Câncer de glândulas salivares
CS	Quitosana
DLS	Espalhamento do Diâmetro hidrodinâmico.
EPR	Efeito de Permeabilidade e Retenção
FdUDP	Difosfato de fluorouridina
FdUMP	Monofosfato de fluorodeoxiuridina
FdUTP	Trifosfato de fluorodeoxiuridina
FUMP	Monofosfato de fluorouridina
FUR	Via fluorouridina
FUTP	Trifosfato de fluorouridina
IPEN	Instituto de Pesquisa em Energia Nuclear
MAE	Matriz Extracelular Abundante
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NPS	Nanopartículas Poliméricas
OPRT	Orotato de fosforibosiltransferase
PDI	Índice de polidispersividade
PLA	ácido polilático
PLC	Policaprolactona
PLGA	ácido polilático co-glicólico
PRPP	Pirofosfato de fosforibosilo
QD	Quantum Dots
SCC	Compartimentos Conectados a Superfície
SPECT-CT	Tomografia por emissão de pósitrons
TC	Tomografia Computadorizada
WHS	<i>World Health System</i>

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1 Câncer e carcinogênese	15
1.1.1 <u>Processo de carcinogênese</u>	16
1.2 Adenocarcinoma.....	17
1.2.1 <u>Diagnóstico</u>	17
1.3 Fármaco 5- Fluorouracil	19
1.3.1 <u>Biotransformação do 5 Fluoracil</u>	20
1.4 Radiofármacos	22
1.5 Nanotecnologia e nanopartículas	23
1.6 Farmacocinética das nanopartículas.	24
1.7 Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentado (EPR)	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 MÉTODOS	28
3.1 Obtenção das nanopartículas	28
3.2 Radiomarcção	29
3.2.1 Controle de qualidade do processo de marcação de nanopartículas com tecnécio-99m (^{99m} Tc)	29
3.3 Modelo de Xenoenxerto de Tumor	30
3.4 Estudo de biodistribuição.	31
3.5 Eficiência de Encapsulamento (EE).....	32
3.6 Caracterização morfológica e dimensional das nanopartículas	33
3.6.1 <u>Espalhamento de luz dinâmico e potência Zeta</u>	33
3.7 Tomografia computadorizada por emissão de feixe único.....	35
3.7.1 Análise estatística	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 Obtenção das nanopartículas.....	37
4.2 Marcação das nanopartículas com Tecnécio-99m (^{99m} Tc)	40

4.2.1	<u>Controle de qualidade do processo de marcação das nanopartículas com Tecnécio-99m (^{99m}Tc)</u>	40
4.3	Biodistribuição da nanopartícula	40
4.4	Tomografia computadorizada por emissão de feixe único	45
	CONCLUSÃO	47
	REFERÊNCIAS	48
	ANEXO - Carta de aprovação do comitê de ética no uso dos animais - CEUA-UFPE	57

INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma é um tumor raro, representando apenas 5% dos cânceres. A incidência mundial anual é em torno 0,5 a 2% para cada 100.000 habitantes. (Lagha, et al., 2012, Eskander, et al., 2014). Contudo, seu tratamento tem complicações e limitações importantes. O adenocarcinoma apresentam diversas variações histológicas e são classificadas pelo *World Health System* (WHS), em 24 subtipos (1) ; (2). Dentre suas características mais marcantes, destacam-se o crescimento lento, multiplicação local e em diversas situações ocorre metástase à distancia (1); (3)

Os tratamento para o adenocarcinoma incluem ressecção cirurgica primária em estágio inicial, radioterapia primária e quimioterapia adjuvante (7). A quimioterapia ainda é controversa (8), podendo-se utilizar diversos quimioterápicos como Mitoxantrone, Ciclofosfamida e, 5-Fluorouracil (1). Por se tratar de uma doença indolente o desenvolvimento da metástase, ao evoluir à óbito em período inferior a 5 anos (9); (10)

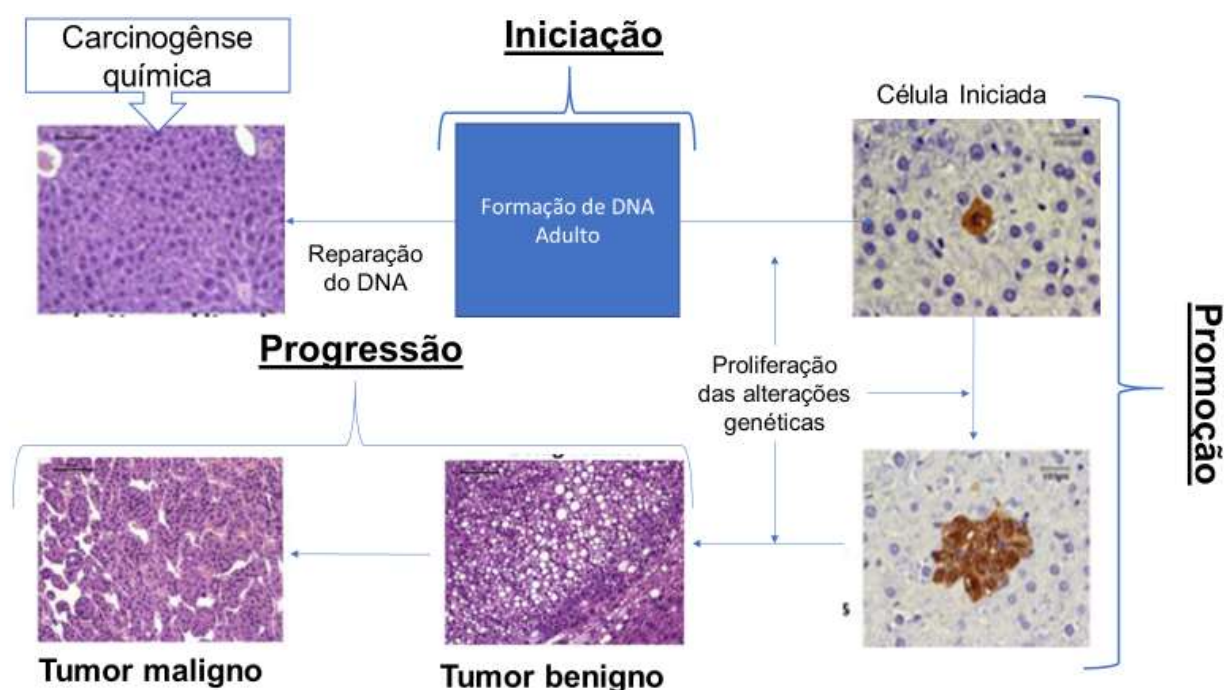
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Câncer e Carcinogênese

O câncer é um problema de saúde pública global, ocupando a segunda colocação em casos de morte (14). De acordo, com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que o envelhecimento contribuirá para o aumento de 45% na incidência do câncer até 2030, levando a sua ascensão, como a principal causa de morte em todo o mundo, superando as doenças cardíacas (15),(14).

O câncer apresenta seis aptidões biológicas chamadas de “marcas do câncer” (16); (17). A carcinogênese envolve um processo multiestágio e que envolve diversos eventos moleculares e celulares que levam a transformação de células saudias em células tumorais. Foi evidenciado pelo menos três etapas no processo de carcinogênese: iniciação, promoção e progressão (Figura 2) (18)

Figura 1 - Multiestágio da carcinogênese



Fonte: adaptado de (18)

1.1.1. Processo de carcinogênese

O processo de formação do câncer é chamado de carcinogênese e ocorre lentamente podendo levar anos para a formação do tumor de forma visível (19). O processo de carcinogênese é um processo complexo que ocorre em diferentes níveis_(19)_

A iniciação é um fenômeno rápido e irreversivelmente transmitida as células filhas no processo do ciclo celular. Para essa fase, é imprescindível a proliferação celular, sendo um traço fundamental das células cancerígenas, que envolve a capacidade de sustentação da proliferação crônica (20), (21). Um vez havendo dano ao DNA, o mesmo DNA pode ainda ser reparado por mecanismo enzimáticos, no entanto, as células iniciadas que estão proliferando podem escapar a esse reparo e podem crescer de forma autônoma e clonal (18), (22).

A promoção do tumor envolve a expansão clonal seletiva de células geneticamente modificadas. Estas células são não mutagênicas, necessitando de um ativador metabólico (oncopromotores) para mediar seus efeitos biológicos (23), (22).

Nem todas as células expostas a um estimulador tumoral passam pela a etapa de estimulação e apenas células que são estimuladas a dividir-se e escapar da apoptose avançam para o próximo estágio, conhecido como progressão (23), (22).

A promoção do tumor contribui para o processo de carcinogênese pela expansão de uma população de células iniciadas. A conversão de uma fração destas células à malignidade será acelerada em proporção com a taxa de divisão celular e a quantidade de células que estejam em divisão no tumor benigno ou lesão pré-neoplásica. Alguns componentes da alimentação e a exposição excessiva e prolongada a hormônios são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas em malignas (23), (22).

A progressão compreende a expressão do fenótipo maligno e a tendência de células malignas a adquirir características mais agressivas ao longo do tempo. Além disso, engloba o processo de metástase. Nesse estágio o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (24).

Durante este processo, outras alterações genéticas podem ocorrer, incluindo a ativação de oncogenes e a perda funcional de genes supressores de tumores (23); (25). Em relação aos CGSs, um importante desafio, é a elucidação da carcinogênese, dada sua baixa incidência, acarretando poucos estudos. Recentemente, foi descoberta a participação no processo de carcinogênese da translocação entre cromossomos 6q e 9p e a fusão MYB-NFIB (6).

1.2. Adenocarcinoma

Dentre os cânceres, o carcinoma possui uma incidência rara, de crescimento lento. Os tumores de glândulas salivares são descritos em literatura, com um padrão de crescimento, com estruturas cribiformes, tubulares, trabeculares, fasciculares e sólidas (26) (27) (28).

Histologicamente o adenocarcinoma pode apresentar um diagnóstico desafiador, devido à sua diversidade morfológica, uniformidade citológica e padrão de crescimento infiltrativo (29). Não obstante, sua patogênese é mal compreendida, com apenas poucos relatos em citogenética e genética molecular descritos em literatura. Dentre esses, destacam-se a monossomia do cromossomo 22 e a translocação envolvendo o cromossomo 12 com pontos de quebra em 12q13, 12q22 e 12p12 (29).

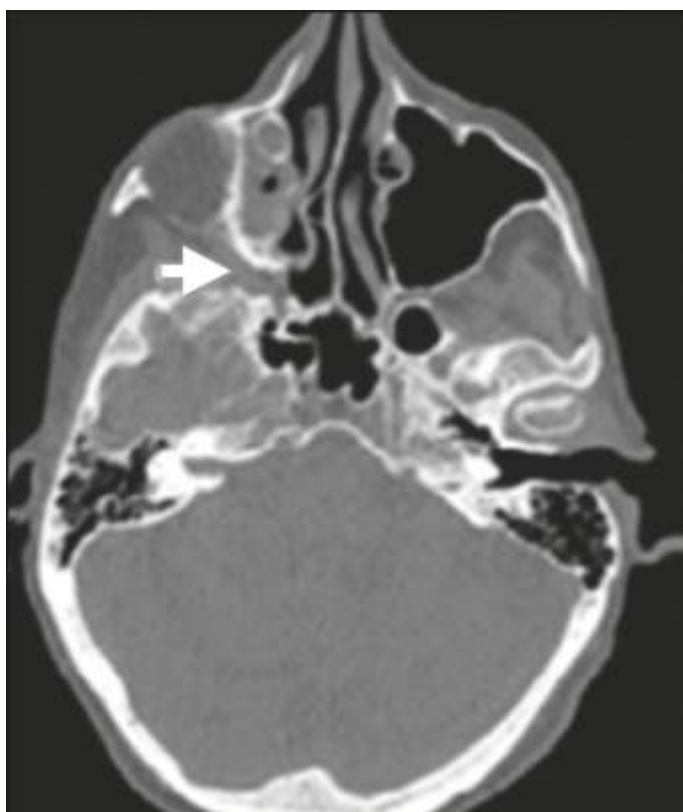
1.2.1. Diagnóstico

No início da década de 1950, Wrenn e colaboradores propuseram o uso de técnicas de coincidências para a imagem de radionuclídeos emissores de pósitron para estudar ^{64}Cu em tumores cerebrais, usando a posição dos detectores de iodo de sódio. No início da década de 70, uma progressão importante neste campo ocorreu com a introdução da tomografia. A introdução da tecnologia do ciclotron e PET (Tomografia por Emissão de Pósitrons, *sigla em inglês*) na medicina nuclear melhorou muito o manejo de pacientes com câncer e outras doenças, o

desenvolvimento de imagens combinadas com SPET/CT (Tomografia Computadorizada de um Único Póstron, *sigla em inglês*) melhorou substancialmente a eficácia desta modalidade (30), (31).

O PET é uma técnica de medicina nuclear que produz uma imagem tridimensional ou um mapa de processos funcionais no corpo. O sistema detecta pares de raios gama emitidos indiretamente por um radioisótopo emissor de póstron, que é introduzido no corpo em uma molécula metabolicamente ativa. As câmeras do PET detectam fótons de 511 KeV (30) (32). Os avanços recentes na tomografia computadorizada de alta resolução (CT-HR) e aplicação generalizada da tomografia computadorizada (CT) melhoraram a descoberta do câncer, em particular os CGSs. Estes muitas vezes contêm um componente não solido que se apresenta como vidro moído opaco (VMO) na CT (Figura 3) (31) (32).

Figura 2 – Imagem tomográfica



Legenda: Imagem de tomografia computadorizada, com a seta, evidenciando um tumor de glândula salivar

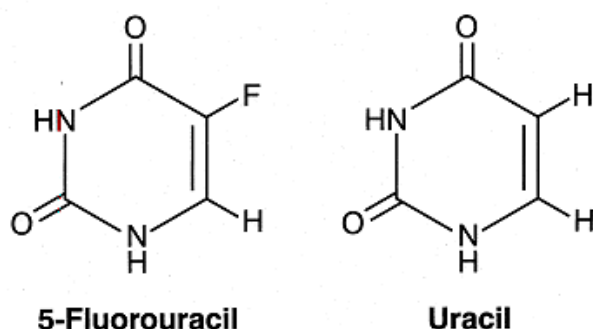
Fonte: (32)

A imagem de diagnóstico utilizada para apoiar a tomada de decisões médicas experimentou um crescimento explosivo na segunda metade do século XX (33). Recentemente, o uso da CT para triagem e classificação do estadiamento do câncer aumentaram, com isso auxiliou a identificação dos nódulos persistentes com aspecto opaco, com característica de vidro moído, que apresentam alto risco de malignidade (34), (35). O PET em combinação aos agentes de imagem direcionados, permite o diagnóstico específico e não invasivo do tumor, com uma delimitação precisa dos tumores e metástase, bem como, o estadiamento da doença (36) (35) O SPECT-CT possibilitou a expansão do diagnóstico, particularmente, onde haviam restrições anatômicas, como a área de cabeça e pescoço. A técnica de imagem do SPECT-CT envolve um sistema de tomografia computadorizada de baixa dose e uma câmara gama, havendo, portanto, a formação de uma imagem híbrida anatomo-funcional (35). A medicina nuclear oferece diversas técnicas de imagem molecular estudando a distribuição do corpo de fármaco (emissores de radiação gama e pósitron) administrados ao paciente e visualizados pela tomografia computadorizada SPECT ou PET (37)

1.3. Fármaco 5- Fluorouracil

Os agentes quimioterápicos utilizados na prática clínica atual desempenham um papel significativo na redução da mortalidade/morbidade e no aumento da qualidade de vida dos pacientes (17); (38). O 5- fluorouracil (5-FU) é um análogo do uracil com um átomo de flúor na posição C-5 no lugar do hidrogênio (Figura 4) (39); (38); (17).

Figura 3 – Estrutura química do 5Fu e do uracil.



Legenda: Moléculas químicas do 5-Flourouracil e uracil.

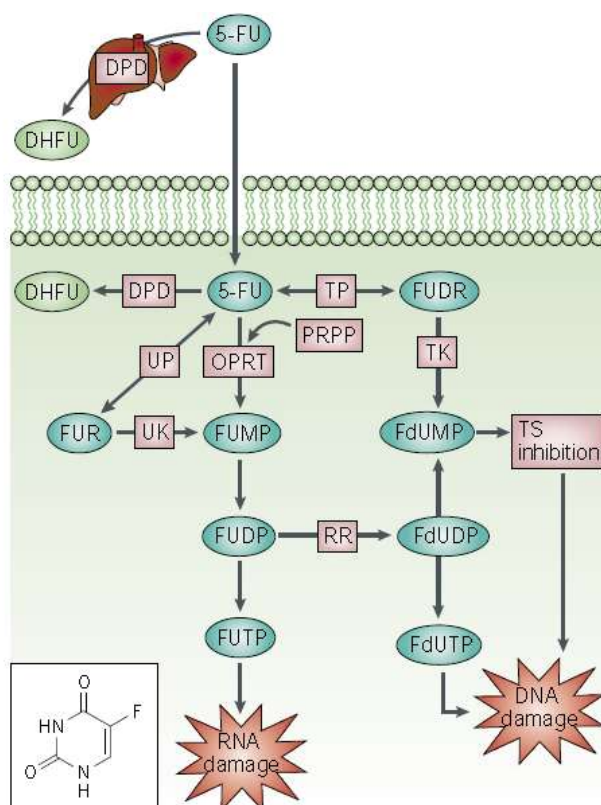
Fonte: (40)

1.3.1 Biotransformação do 5-Fluoracil

O 5-FU interfere na síntese de DNA, atuando principalmente como um inibidor da Timidilato sintase. No entanto a meia-vida curta, ampla distribuição e vários efeitos colaterais limitam sua aplicabilidade médica (38).

O 5-Fluorouracil é convertido em três principais metabolitos ativos: monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP). O mecanismo principal de ativação de 5-FU é a conversão para monofosfato de fluorouridina (FUMP), diretamente por orotato de fosforibosiltransferase (OPRT) com Pirofosfato de fosforibosilo (PRPP) como cofator, ou indiretamente via fluorouridina (FUR) através da ação sequencial da uridina fosforilase (UP) e uridina quinase (K). A FUMP é então fosforilada para difosfato de fluorouridina (FUDP), que pode ser novamente fosforilado para o metabolito ativo fluoroueidina trifosfato (FUTP), ou convertido em difosfato de fluorodeoxiuridina (FdUDP) por ribonucleótido redutase (RR). Por sua vez, FdUDP pode ser fosforilado ou desfosforilado para gerar os metabolitos ativos FdUTP e FdUMP, respectivamente (figura 6) (38); (17); (39)

Figura 4 – Biotransformação do 5-FU



Legenda: O 5-Fluorouracil é convertido em três principais metabólitos ativos: monofosfato de fluorodeoxiuridina (FdUMP), trifosfato de fluorodeoxiuridina (FdUTP) e trifosfato de fluorouridina (FUTP). O mecanismo principal de ativação de 5-FU é a conversão para monofosfato de fluorouridina (FUMP), diretamente por orotato de fosforibosiltransferase (OPRT) com Pirofosfato de fosforibosilo (PRPP) como cofator, ou indiretamente via fluorouridina (FUR) através da ação sequencial da uridina fosforilase (UP) e uridina quinase (K). A FUMP é então fosforilada para difosfato de fluorouridina (FUDP), que pode ser novamente fosforilada para o metabólito ativo fluorouridina trifosfato (FUTP), ou convertida em difosfato de fluorodeoxiuridina (FdUDP) por ribonucleótido redutase (RR). Por sua vez, FdUDP pode ser fosforilado ou desfosforilado para gerar os metabólitos ativos FdUTP e FdUMP, respectivamente

Fonte: adaptado de (39)

Uma via de ativação alternativa envolve a conversão catalisada por timidina fosforilase de 5-FU para fluorodeoxiuridina (FUDR), que é então fosforilada por timidina quinase (TK) para FdUMP (38); (17); (39) .

O 5-FU apresenta diversos efeitos colaterais, dentre eles destacam-se: anemia, leucopenia, trombocitopenia, náuseas, vômitos, diarreia, mucosite, síndrome mão-pé (Efeito colateral de alguns tipos de quimioterápicos, que provoca vermelhidão, inchaço e dor nas palmas das mãos ou na região plantar dos pés) (41).

1.4 Radiofármacos

O prêmio Nobel de química, conquistado por George de Hevesy em 1943, desenvolveu um prólogo que hoje seria utilizado como um rastreador na medicina nuclear, sendo a produção mais significativa do século XX (30). Um radiofármaco (radiotraçador) é um medicamento radioativo usado para o diagnóstico e terapia de algumas doenças, como o câncer. É composto por duas partes: um radionuclídeo, que é um isótopo radioativo que pode ser injetado de forma segura no corpo, e uma outra parte, que pode ser um fármaco, que atua como uma molécula transportadora que entrega o isótopo radioativo na área desejada a receber o tratamento ou a ser examinada. Para que um radiofármaco seja usado com segurança em seres humanos, tanto para diagnóstico como terapêutico, o radiofármaco deve possuir diversas características essenciais como pureza química e radioquímica, esterilidade e ausência de pirógeno. (30)

Em 2009, a ANVISA (2009) lançou a primeira resolução (RDC Nº 63/2009) sobre radiofármacos, promulgando os mesmos como:

“Radiofármacos são preparações farmacêuticas com finalidade de diagnóstico ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos”.

Os radionuclídeos (isótopos radioativos) são átomos com um núcleo instável em que ocorrem a desintegração espontânea com a emissão de partículas β^- (beta), β^+ (pósitron), α , Raios X, e partículas gama. (42) (43)

Recentemente diversos radiofármacos foram desenvolvidos, porém, os que são a base de Tecnécio-99m são os principais no uso de diagnóstico de diversas doenças, correspondendo a mais de 80% dos radiofármacos em uso no mundo (42) ; (44); (45).

1.5 Nanotecnologia e nanopartículas

O conceito de nanotecnologia foi concebido pela primeira vez por Richard Feynmann na famosa palestra “Há muito espaço no fundo”, ocorrida em 1959 (46); (47). A nanotecnologia é subdividida em três ramos principais: nanomateriais, nanotecnologia molecular e biotecnologia e nanomedicina (48) (49).

A nanomedicina é, sem dúvida, uma das principais áreas de interesse de estudos nanotecnológicos, principalmente devido ao fato de que a nanociência pode levar a avanços há muito tempo aguardados na luta contra diversos tipos de doenças, como por exemplo, na cancerígenas (48); (49). As propriedades dos nanofármacos são singulares e apresentam maior efetividade na terapia quando comparado com a terapia tradicional (50). Não obstante os nanofármacos, apresentam idiosincrasias tais como: comportamento farmacocinético diferenciado, biodisponibilidade, solubilidade de tempo de retenção, redução dos efeitos adversos e *targeting* melhorado, que juntos contribuem para sua aplicação clínica superior (50); (49).

Os radiofármacos são moléculas ligadas a elementos radioativos emissores de radiação, utilizados na medicina nuclear, em exames de diagnósticos, bem como, tratamento. Os radiofármacos são compostos por dois componentes: o radionuclídeo e o carreador (partículas responsável pela emissão de radiação), sendo sua aplicação diretamente ligado ao radioisótopo (44).

No caso dos radiofármacos a premissa permanece. As pesquisas em nanotecnologia melhoraram o desempenho dos radiofármacos, principalmente na penetrabilidade, direcionamento específico, e diminuição da dose absorvida tornando esse novo campo de aplicação fundamental para a medicina moderna (51)

Uma variedade de nanoestruturas, utilizando-se de polímeros sintéticos biodegradáveis, como quitosana (CS), policaprolactona (PCL) , ácido polilático (PLA) e ácido polilático co-glicólico (PLGA), lipídios (lipossomas, nanoniosomas, nanopartículas lipídicas sólidas), sílica mesoporosa nanopartículas (MSNs), micelas, pontos quânticos (QDs), nanotubos de carbono (CNTs) e nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (MNPs) vêm sendo estudados como potenciais veículos nanométricos de fármacos assim como eficazes carreadores de radioisótopos para imagem (52); (51).

As nanopartículas poliméricas (NP) são definidas como uma estrutura esférica, coloidal, sólida, insolúvel, formando um tipo de matriz polimérica. As partículas aprisionadas tem tamanho variando de 10 a 1000 nm (53).

Devido ao seu tamanho pequeno, as NPs podem ser convenientemente administradas através de diferentes vias, dentre as quais intravenosa, intra-arterial, subcutânea, intraperitoneal, oral entre outros. O tamanho, associado a sua forma em esferas, favorecem a solubilização e a liberação do fármaco em comparação com outros arranjos geométricos e transportadores maiores. Além disso, as NPs têm a capacidade de passar pela barreira gastrointestinal por meio de captação celular ativa (53)

1.6 Farmacocinética de nanopartículas.

A capacidade terapêutica de um fármaco ocorre pelo acúmulo destes em um órgão ou tecido de forma seletiva e quantitativa, independente do sítio e dos métodos de administração. Os medicamentos, em particular os quimioterápicos, são, convencionalmente, administrados sistematicamente, assim o fármaco é distribuída dentro do corpo e devem atravessar barreiras biológicas até atingir o alvo-específico. Dessa forma, devido ao volume de distribuição, grandes quantidades de fármacos devem ser administradas para atingir a concentração terapêutica em um determinado órgão ou tecido, aumentando, invariavelmente, as chances dos efeitos colaterais (54); (55).

No caso de tumores, o microambiente tumoral possui diversos mecanismos de defesa, como pH baixo e alta pressão intersticial, assim como sistemas enzimáticos superexpressos, aumentando o efluxo de drogas e a redução da absorção em nível celular, restringindo a ação do quimioterápico, levando a resistência (9) (55) (56).

Não obstante, o crescimento tumoral é acompanhado de angiogênese que possui características singulares, tais como: anormalidade da membrana basal e deficiência do alinhamento das células endoteliais. A angiogênese produz uma vasculatura tumoral caracterizada por neovasos, com tamanhos entre 100 nm e 780 nm, dependendo do fenótipo tumoral. Os neovasos tumorais tem como característica

uma pressão intersticial maior no centro do tumor que na sua periferia, sendo constituído por fibras de colágeno e fluidos semelhantes a géis, além disso os tumores, de forma geral, apresentam, fluxo sanguíneo fraco, matriz extracelular abundante (MEA) e células tumorais abundantes, todos fatores incapacitantes de permeação adequada (55) (57) (58)). Não obstante, a falta de um sistema linfático bem definido, potencializa a pressão hidrostática. (9)

Nesse sentido, a aplicação de nanofármacos/nanomedicamentos, proporciona melhor superação das barreiras biológicas, assim como aumenta sua solubilidade e seu tempo de circulação sanguínea, diminuindo sua distribuição não específica, sua toxicidade, e conseqüentemente, causando menos efeitos adversos potencializando assim a terapia (27); (27); (56)

1.7 Efeito de Permeabilidade e Retenção Aumentado (EPR)

As vantagens dos nanomedicamentos em relação aos medicamentos tradicionais, baseia-se, prioritariamente, no efeito EPR (*Enhanced Permeability and Retention*). As características fundamentais da fisiologia do EPR são os vasos tumorais altamente permeáveis que permitem o aumento da permeabilidade das nanopartículas, evitando a depuração renal (56); (57); (58).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de nanofármacos, em particular em oncologia, vem crescendo exponencialmente (58).

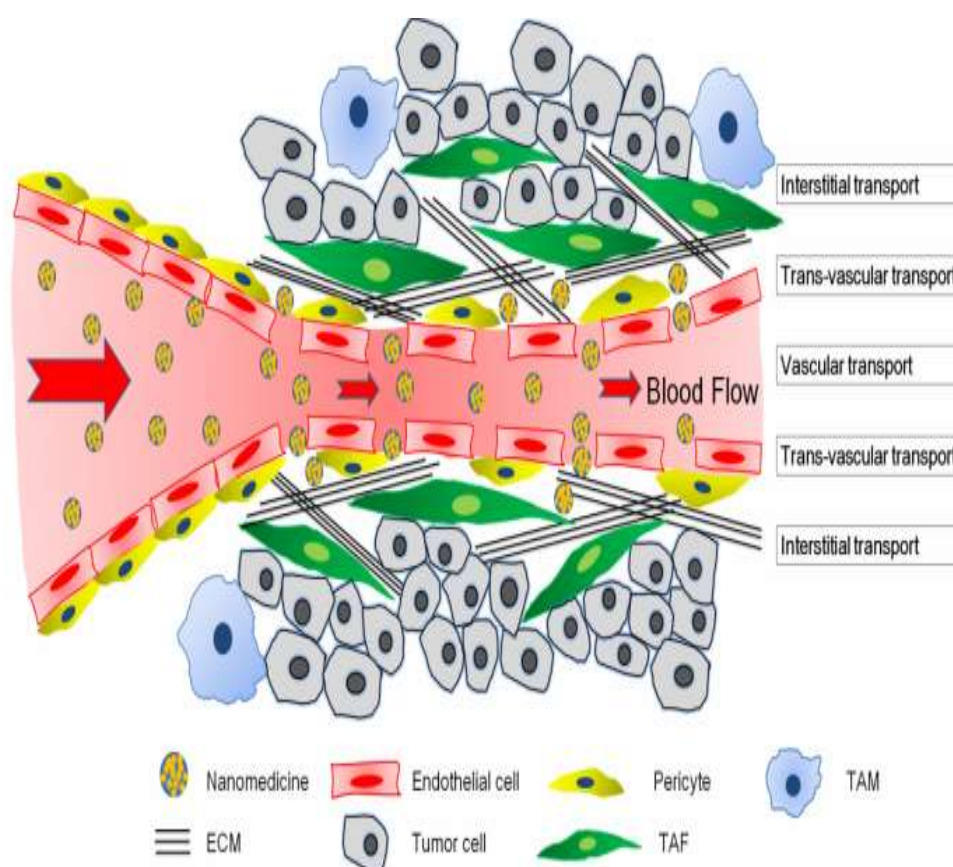
Os nanomedicamentos administrados sistematicamente, precisam ser submetidos a um processo de três passos para atingirem a região tumoral, de modo a desenvolver seus efeitos terapêuticos: i) transporte vascular para diferentes áreas do tumor; ii) transporte trans-vascular, por meio da parede vascular; iii) transporte intersticial para atingir as células tumorais, conforme demonstrado na figura 7 (57); (58).

Nos tecidos normais, existe um balanço entre as estruturas pró-angiogênicas, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, *single inglês*) e moléculas antiangiogênicas endógenas, como sVEGFR1 e trombospondina. Por sua vez, nos tecidos tumorais, o efeito para o-angiogênico é anormal, resultando em uma estrutura vascular desorganizada (55); (58). Os vasos

do tumor recém formados, são tortuosos e fenestrados, permitindo a entrada e retenção do nanomedicamento no microambiente tumoral. Não obstante o aumento da pressão do fluido intersticial (PFI), evita o fluxo sanguíneo e o transporte vascular, potencializando seu efeito de retenção (9); (55); (58).

A junção desses fatores, determinam a escolha do nanomedicamento e suas características (tamanho, forma, tensão superficial, potencial hidrodinâmico, entre outros) e proporcionam um efeito prolongado e mais efetivo, quando comparado aos medicamentos tradicionais (não-nanoestruturados) (55); (58).

Figura 5 – Barreiras de transporte para fornecimento da nanofármaco tumoral em um microambiente tumoral, incluindo fraca perfusão de sangue, Matriz Extracelular Abundante (MEA) denso e um grande número de células estromais.



Fonte: (51)

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolver um nanorradiofármaco para diagnóstico preciso e confirmatório de câncer de glândulas salivares com nanopartículas de 5-Fluorouracil marcado com tecnécio metaestável (^{99m}Tc) para diagnóstico de câncer de glândulas salivares (CGSs).

2.2. Objetivos Específicos

- Obter nanopartículas poliméricas de PLGA utilizando 5-fluoracil como fármaco primário

- Caracterizar nanopartículas, avaliar a estabilidade de radiomarcção com Tecnécio-99m (^{99m}Tc)

- Avaliar *in vitro* e *in vivo* as nanopartículas de 5-Fluorouracil marcadas com ^{99m}Tc .

3. MÉTODOS

3.1. Obtenção das nanopartículas

O método utilizado no presente estudo, para a preparação das nanopartículas foi a técnica da dupla emulsificação seguido pela evaporação do solvente (59) (60). Esse método é caracterizado por 4 etapas.

1ª Etapa: Preparação da emulsão água/óleo (a/o):

Inicialmente, o poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA, *sigla em inglês*) que é um copolímero, dissolvido em diclorometano à temperatura ambiente. Esta solução foi vertida rapidamente em uma solução aquosa contendo PVA 0,2% e 20 mg (0,4 mL) de 5-FU (relação de 1:5) e emulsificada por sonicação durante 1 minutos a 55 W de potência.

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

A emulsificação resultante (a/o), foi emulsificada novamente, adicionando-se 20 mL de uma solução de PVA (o que é) 2% por sonicação durante 5 minutos (potência de 55W), resultando em uma dupla emulsão de água/óleo/água (a/o/a).

3ª Etapa: Evaporação do Solvente Orgânico:

O solvente orgânico foi rapidamente eliminado por evaporação à vácuo a 37° C no rotaevaporador sob vácuo à temperatura ambiente durante 40 minutos à 30 rpm para eliminação do excesso do diclorometano.

4ª Etapa: Retirada do Excesso de resíduos:

As partículas foram então recuperadas por ultracentrifugação por 30 minutos a 20.000 rpm. Ao final as nanopartículas foram suspensas em água purificada (2 vezes), obtendo assim as nanopartículas de PLGA/PVA/5-FU.

3.2. Radiomarcção

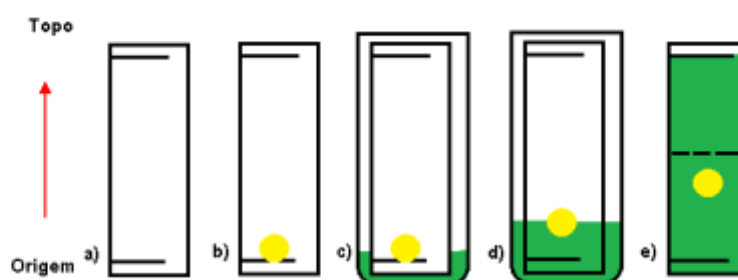
A marcação das nanopartículas de PLGA/PVA/5-FU, foi feita utilizando a técnica de marcação direta e adotando o cloreto estanoso (SnCl_2) com agente redutor (61) (62)

O cloreto estanoso, foi utilizado como agente redutor na concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$, para isso, foi realizada a incubação, de 150 μL das nanopartículas de PLA/PVA/5FU em um tubo de ensaio com 150 μL da solução do agente redutor, por 10 minutos. Em seguida foi acrescentado 100 μCi de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) e houve a incubação por mais de 10 minutos para a finalização do processo da marcação. (45) (63) (64)

3.2.1. Controle de qualidade do processo de marcação de nanopartículas com tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)

Com o intuito de validar e comprovar a qualidade da marcação supracitada, foi realizada a cromatografia em papel (figura 8), utilizando como fase estacionária o papel *Whatman* n° 1 (o tamanho do papel utilizado foi de 14 cm de comprimento por 1 cm de largura), e como fase móvel a acetona (Sigma Aldrich). O papel *Whatman* foi cortado em duas partes, afim de separar o topo da origem, assim a leitura foi feita no contador gama (Perkin Elmer modelo Wizard® 2470).

Figura 6 – Fases (a-e) da cromatografia em papel, utilizada no controle de qualidade do processo de radiomarcção do 5FU- $^{99\text{m}}\text{Tc}$.



Legenda: Ilustração da corrida do cromatográfica em camada.

Fonte: (45)

Figura 7 – Contador gama (Perkin Elmer modelo Wizard® 2470) utilizado na determinação da contagem radioativa nos estudos cromatográficos e de biodistribuição.



Fonte: (45)

O cálculo do fator de retenção (R_f , *sigla inglês*) foi realizado com a medição da distância que a substância se moveu ao longo da fita, em relação ao ponto de partida (onde foi depositada a solução), dividida pela distância deslocada pela massa do solvente. A leitura da radioatividade absorvida em cada parte da fita, proporciona a concentração (%) radioquímica (51); (65); (66); (67).

Para $R_f=0$,

$$\Sigma \frac{\text{contagem por minuto do segmento da origem da fita}}{\text{contagem por minuto de toda a fita}},$$

E para $R_f=1$

$$\Sigma \frac{\text{contagem por minuto do segmento da frente da fita}}{\text{contagem por minuto de toda a fita}}$$

3.3. Modelo de Xenoenxerto de Tumor

As células Caco-2 (adenocarcinoma) são extraídas do adenocarcinoma de cólon humano, a escolha desta linhagem em particular deve-se a sua alta

agressividade e semelhança com os tumores de glândulas salivares (*American Type Culture Collection, Manassas, VALLC*) foram cultivadas em RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco, Life Technologies, MD, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, Life Technologies, MD, USA)(Gibco, Life technologies, MD, EUA). A contaminação por micoplasma em células cultivadas foi monitorizada usando kit de detecção Lonza Mycoplasma

Os tumores de glândulas salivares foram implantados por injeção subcutânea de 2×10^6 de células Caco-2 no flanco direito de camundongos Balb/c nude (machos) com seis semanas de idade. O tamanho do tumor foi monitorado durante 3 semanas e medido com paquímetro. Os camundongos Balb/c nude foram criados nas instalações para animais do Instituto de Pesquisa em Energia Nuclear (IPEN) e todas as experiências obedeceram às leis relevantes e foram aprovadas pelos comitês locais de ética animal (anexo A). Os camundongos foram observados três vezes por semana para evidência de sofrimento, ascite, paralisia ou perda de peso excessivo.

3.4. Estudo de biodistribuição.

O estudo de biodistribuição é a etapa primordial para confirmação do local onde o radiotraçador é captado. A característica da distribuição dos radiofármacos *in vivo* é caracterizada por suas propriedades fisiológicas nos tecidos onde são captados (68) (69). O intuito de acompanhar a rota da biodistribuição *in vivo* do nanorradiofármaco marcado, é poder visualizar, por imagem, a captação individual em cada órgão (45) (51) (68)

As nanoestruturas possuem biocompatibilidade com células e tecidos, devido a composição química. Não obstante, a inserção de ligantes específicos na superfície da nanopartícula, como moléculas bioativas, dotam o sistema de direcionamento facilitado. (70) (42) (68)

As nanopartículas ao adentrarem a corrente sanguínea sofrem diversas biotransformações pelo organismo, tais como, recobrimento por proteínas plasmáticas, opsonização e a ligação a células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos) (71). Órgãos como fígado, nódulos linfáticos e baço, possuem uma

quantidade expressiva de fagócitos mononucleares, assim as nanopartículas ficam em média, mais retidas nesses órgãos. (71) (72) (68).

Nanopartículas com cargas negativas possuem tempo de depuração menor comparado a nanopartículas positivas ou neutras, da mesma forma, nanopartículas com copolímeros hidrofílicos, diminuem o reconhecimento do sistema imunológico, permitindo circulação das nanopartículas no plasma num intervalo de tempo maior. (72) (68) (45) (51)

A avaliação da biodistribuição das PLGA/PVA/5FU^{99m}Tc, foi realizada em camundongos Balb/c nude machos, em 2 grupos: controle, utilizando camundongos saudáveis (n=6), e induzidos, utilizando camundongos com tumor xenoinxertado (n=6).

As nanopartículas de PLGA/PVA/5FU^{99m}Tc foram injetadas pela rota retroorbital, de modo a aproveitar-se do plexo orbital e do sistema cava para distribuição ubiqüitária do fármaco, em ambos os grupos em análise (73)

Após duas horas, os camundongos foram eutanasiados em câmara de gás de dióxido de carbono e dissecados para a retirada dos órgãos, de acordo com protocolo aprovado pelo comitê de ética de estudo em animais (ANEXO A). A atividade de cada órgão e no sangue foi determinada pelo contador gama (Perkin Elmer modelo Wizard® 2470), em condições eletrônicas ótimas para a leitura do radioisótopo ^{99m}Tc. Os resultados foram expressos em dose por órgão. Foram avaliados: cérebro, pulmão direito, pulmão esquerdo, estômago, baço, intestino delgado, intestino grosso, coração, rim direito, rim esquerdo, fígado, sangue e a lesão (tumor xenoinxertado).

3.5. Eficiência de Encapsulamento (EE).

A quantificação de fármacos associado a um sistema de nanopartículas traz dificuldade por seu tamanho reduzido. De acordo com SCHAFFAZICK e colaboradores (2003) a técnica mais utilizada é a ultracentrifugação, nela o fármaco livre presente na suspensão é determinada pela concentração no sobrenadante após a centrifugação, por um sistema de diferença. (74) (75)

A eficiência de encapsulamento pode ser influenciada por diversos fatores, como características físico-químicas do fármaco, pH do meio, a natureza do polímero e as características da superfície das partículas. (75)

Para determinação da quantidade efetiva de 5FU encapsulado, as amostras foram analisadas por espectrofotometria, utilizando o espectrofotômetro UV-VIS da marca JASCO® modelo V-630.

A calibração foi feita com a amostra, foi utilizado 2,5 mL de PVA 2% adicionado 7,5 mL de água destilada como amostra branco. Em seguida, uma solução estoque foi preparada com 20 µL da amostra (500 mg/10 mL) de 5FU diluído em 10 mL de água destilada. A partir da solução mãe, foram diluídas para a obtenção de soluções nas concentrações de 40 µL, 60 µL, 80 µL, 100 µL e 120 µL, de modo a se realizar a curva de calibração. A concentração de 5FU livre foi determinada pela equação da reta, por meio de uma curva padrão de concentração conhecidas (59). O cálculo da eficiência de encapsulamento foi feito seguindo a equação abaixo:

Formula 1 – Equação da reta.

$$y = 0,0823x - 0,0246 \quad (1)$$

3.6. Caracterização morfológica e dimensional das nanopartículas

Entre os diversos métodos para a caracterização das nanopartículas, a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), é a técnica de caracterização microestrutural mais completa, devido a sua versatilidade. (76) (77). As amostras foram analisadas no MEV (marca HITACHI, modelo TM3000). Obtendo-se micrografias com o aumento de 100.000 vezes, que forneceram informações sobre a morfologia do tamanho e superfície das nanopartículas.

3.6.1. Espalhamento de luz dinâmico e potência Zeta.

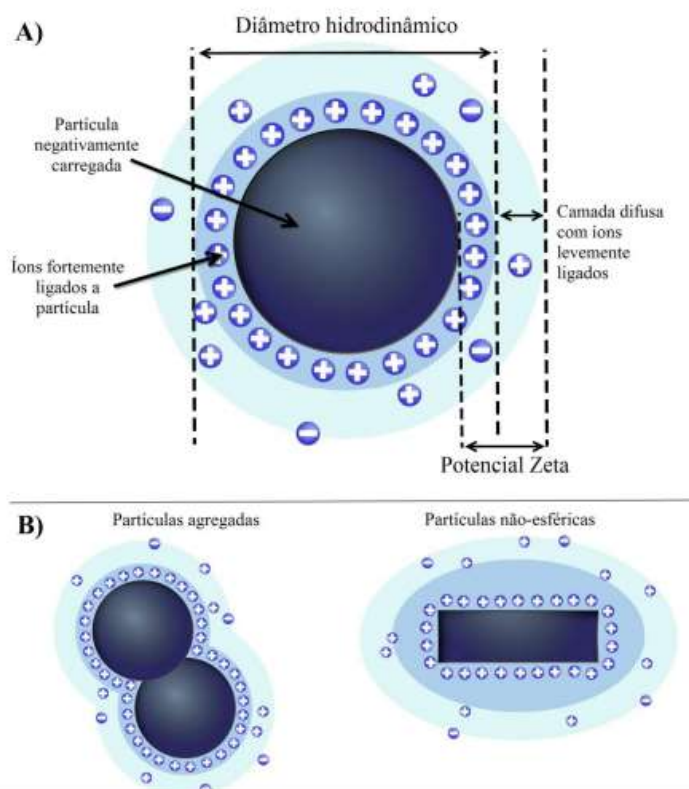
A detecção de dispersão de luz da matéria é uma técnica útil com aplicações em inúmeras áreas científicas. A amostra é exposta a uma onda de luz monocromática e um detector apropriado para detectar o sinal. O método de espalhamento de luz dinâmico (DLS) permite a determinação do diâmetro

hidrodinâmico (DH) das partículas em suspensão pelo espalhamento de luz em decorrência do movimento Browniano das partículas. Quando a partícula é dispersa em um meio líquido uma camada de solvatação é produzida na superfície (Figura 10). O DH inclui essa camada de solvatação o que faz com que esse dado possa ser comparado com a técnica de microscopia, que mede o diâmetro das partículas secas. (78).

Este método oferece também informações sobre a distribuição das populações de tamanhos das partículas analisadas pela técnica do índice de polidispersividade (Pdl), que demonstra o tamanho da amostra relativo à sua distribuição por intensidade. O valor de referência tem uma variação de 0 a 1, inversamente proporcional, quanto menor o valor, maior a monodispersão e consequentemente, menor a heterogeneidade da amostra (79) (78).

As medidas foram realizadas no instrumento ZetaSizer Nano ZS no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LADEG), da Faculdade de Farmácia, na UFRJ.

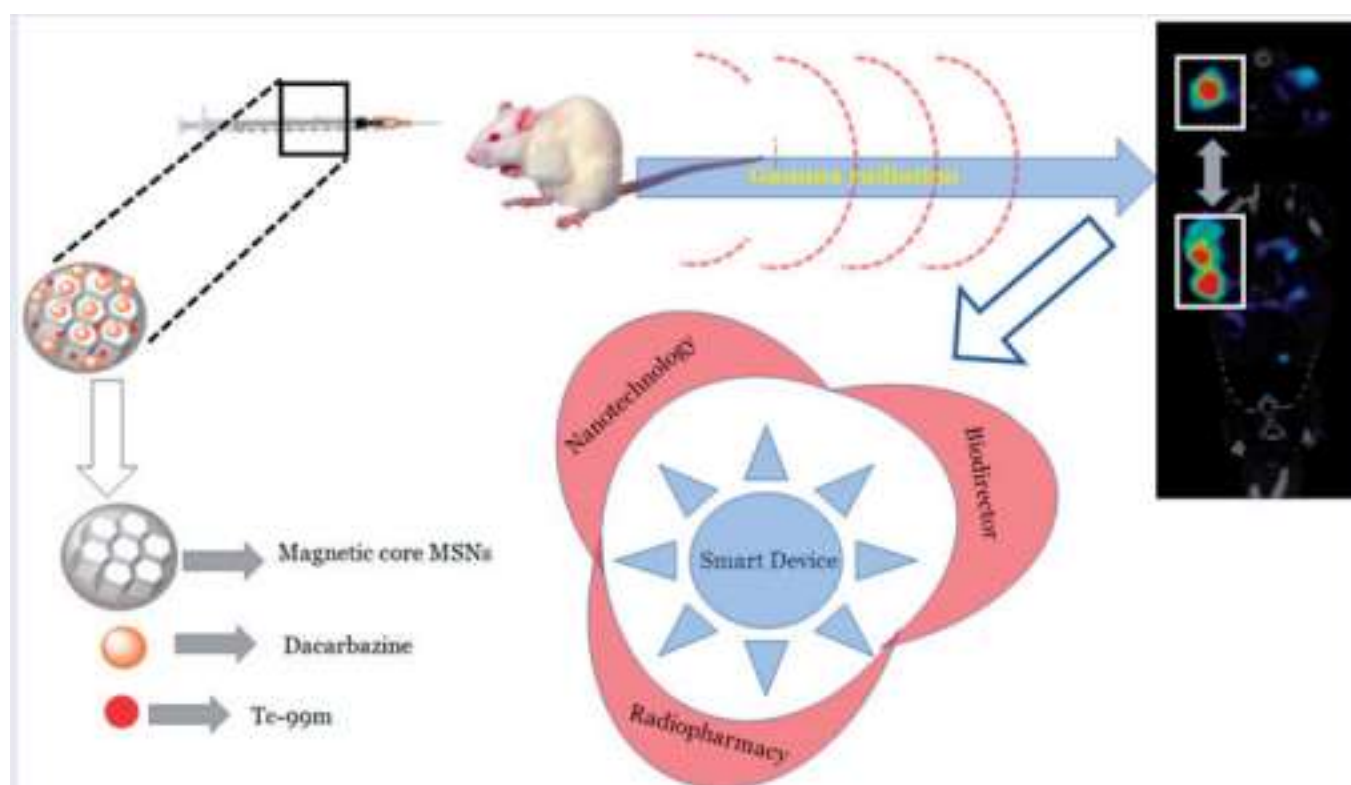
Figura 8 – Esquema representativo das partículas em solução, para elucidação das medidas de diâmetro.



3.7. Tomografia computadorizada por emissão de feixe único

Aproximadamente 4 semanas após a inoculação, os tumores atingiram um volume de 0,3-0,6 cm³. No dia do experimento, foram injetados 37 MBq de nanopartículas de 5-FU-^{99m}Tc pela veia lateral caudal. Após 2 horas, foi realizada a experiência de imagem pós-injeção em um sistema de imagem Albira Micro SPECT/TC (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, EUA). As imagens microSPECT/CT foram adquiridas sob anestesia geral (isoflurano/O₂) e aquecimento a 37° C. os dados da tomografia computadorizada de emissão de foto único (SPECT) para cada rato foram gravados através de varreduras estáticas (uma varredura SPECT de 40 min (FOV 80 mm), seguida de TC 10 min (FOV 80 mm, 35 kV, 400 µA). As varreduras microSPECT/TC foram reconstruídas com o software Albira (Bruker Biospin Corporation, Woodbridge, CT, EUA) com algoritmo de maximização de expectativa de subconjuntos (OSEM) e algoritmos de projeção filtrada (FBP), para SPECT e CT, respectivamente, e as imagens foram processadas com o software PMOD (PMOD Technologies, Zurich, CH).

Figura 9 – Metodologia da técnica da injeção da nanopartícula.



Legenda: Ilustração da técnica da metodologia da injeção das nanopartículas
Fonte: Adaptado (40)

3.7.1. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizada usando o software Origin Pro 8 (OriginLab, EUA), e os resultados são apresentados como médias \pm desvio padrão (SD). P-valores inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção das nanoparticulas

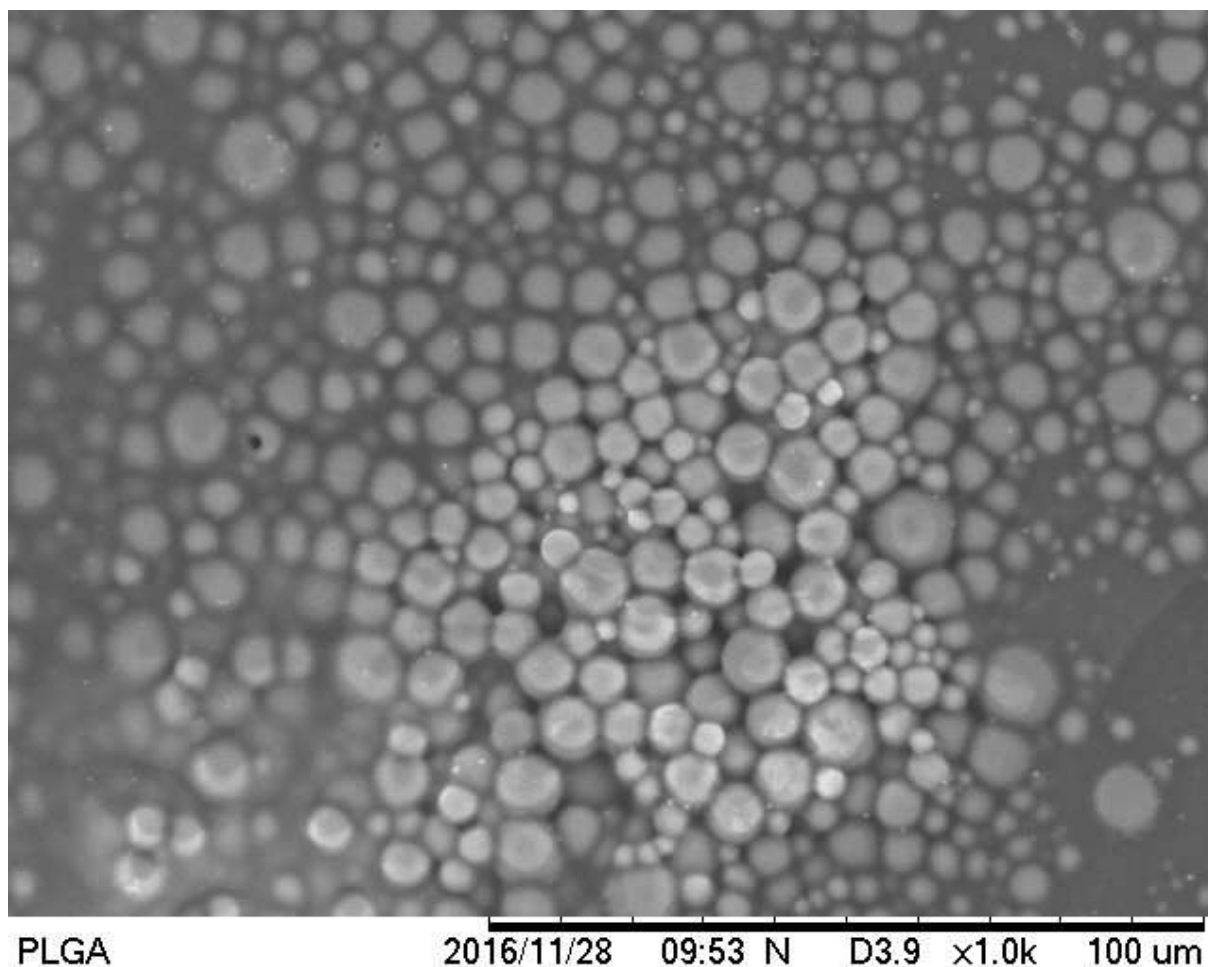
As nanoparticulas de PLGA/PVA/5-FU foram obtidas de modo efetivo pelo método de dupla emulsificação seguido de evaporação do solvente, na análise de biodistribuição de fármacos, as características morfológicas, tais como tamanho, forma, estrutura e integridade são fundamentais por estarem diretamente relacionadas com sua eficácia *in vivo* e *in vitro*, sendo essenciais a serem avaliadas.

O tamanho de 208-320 nm é de interesse, para atravessar as fenestrações tumorais de glândulas salivares, que fenestrações apresentam maiores de 200 nm. (80) (56). Assim, a nanopartícula tem tamanho ideal para o efeito EPR, concentrando-se em um nível mais superficial.

As imagens topográficas do MEV das nanopartículas de PLGA/PVA/5FU mostraram alto grau de homogeneidade na forma esférica e distribuição do tamanho médio na faixa de 208 – 320 nm (Figura 11), comprovando que a técnica utilizada no presente estudo para a produção das nanoparticulas de 5FU por dupla emulsificação conseguiu resultados eficientes.

O tamanho adquirido é vantajoso para que ocorra o efeito EPR nas células tumorais, em especial em tumores sólidos, como no caso supracitado no presente estudo (9) (55) (81). As nanopartículas foram produzidas com esse tamanho, afim de se ligarem as células tumorais das glândulas salivares, que são mais superficiais quando comparadas as células dos tecidos saudáveis.

Figura 10 – Imagem da nanopartículas de PLGA/PVA/5FU no aumento de 100.000 vezes no MEV.



Legenda: A imagem mostra as imagens de nanopartículas com uma conformação ideal.

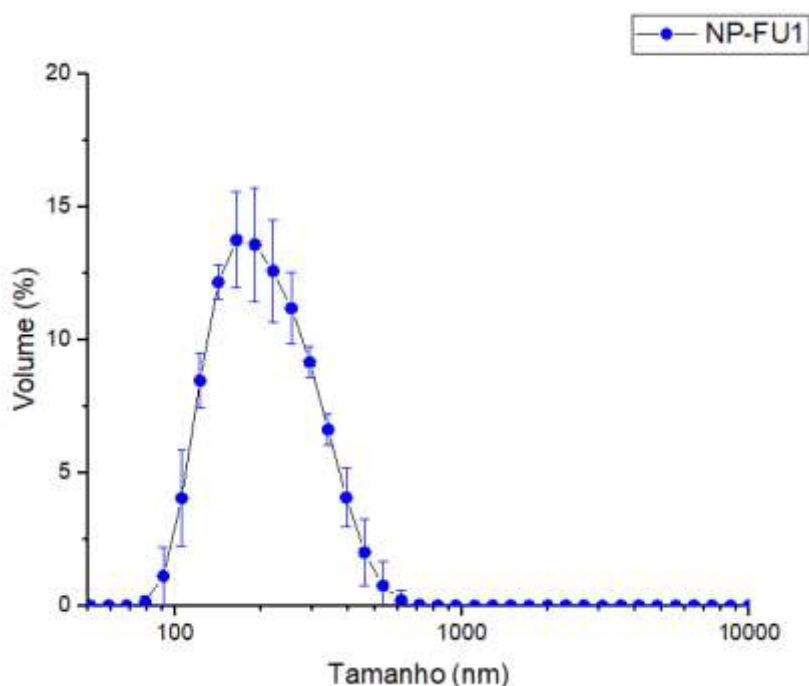
Fonte: Laboratório de nanorradiofármacos em parceria com Laboratório de Desenvolvimento Galênico

Essa faixa de tamanho das nanopartículas proporciona uma maior impregnação focos tumorais, em especial nas regiões apicais. Sendo assim, as nanopartículas conseguem, após se acumularem, adentrar pelas fenestrações mais largas dos neovasos dos tumores sólidos, por uma diferença de gradiente (movimento passivo) e uma vez no interior das fenestrações as mesmas ficam retidas, visto que o movimento inverso é dificultado pelo desarranjo estrutural dos neovasos. Logo, o resultado esperado é um acúmulo das nanopartículas no tumor com pouco ou nenhum acúmulo nos tecidos saudáveis. (42)

Não obstante não foi verificado a formação de aglomerados, que podem ser prejudiciais pois, com a formação de aglomerados, o seu tamanho fica aumentado havendo a retenção de nanopartículas em órgãos excretores como o fígado. A dispersão dos aglomerados impede a formação de Compartimentos Conectados a Superfície (SCC, *sigla em inglês*), podendo assim ser prejudicial em relação a absorção da nanopartícula (82).

Utilizando a metodologia de Patrício e colaboradores 2012, (figura 12), os valores obtidos do diâmetro médio (DLS) das nanopartículas foram de $208 \text{ nm} \pm 1,7$ e um índice de polidispersão $< 0,1$, corroborando a monodispersão, caracterizado pela distribuição de tamanho em uma faixa homogênea e com perfil hidrodinâmico compatível com a rota de aplicação (Figura 13). Esse valor de PDI, associado a forma do nanosistema desenvolvido, contribuem para sua aplicação clínica facilitada.

Figura 11 - Caracterização de espalhamento de luz dinâmico (DLS)



Legenda: Curva de relação do tamanho em relação ao volume.

Fonte: Laboratório de nanorradiofármacos em parceria com o Laboratório de Desenvolvimento Galênico

4.2. Marcação das nanopartículas com Tecnécio-99m (^{99m}Tc)

4.2.1. Controle de qualidade do processo de marcação das nanopartículas com Tecnécio-99m (^{99m}Tc)

Os dados mostrados na Tabela 1, demonstram que as nanopartículas de PLGA/PGA/5FU foram marcadas com ^{99m}Tc com um rendimento de 96,80 %. A literatura preconiza que uma boa radiomarcagem deve apresentar rendimento superior a 90% (MAIOLI, LUCINIANI, *et al.*, 2017; RASHEED, NAQVI, *et al.*, 2017). Assim, o processo aqui descrito encontra-se alinhado com os parâmetros internacionais de qualidade de marcação utilizando o ^{99m}Tc .

Tabela 1 – Contagem dos pedaços da fita no contador gama com as respectivas porcentagens em cada pedaço.

Parte da fita	1ª Rota	2ª Rota	3ª Rota	4ª Rota
	10 minutos	60 minutos	120 minutos	240 minutos
Topo	3,99	2,68	1,53	4,59
Origem	96,01	97,32	98,47	95,41
Total	100	100	100	100

4.3. Biodistribuição da Nanopartícula.

O estudo de biositribuição das nanopartículas de PVA/PLGA/5FU- ^{99m}Tc , foi realizado pelo a técnica de dissecação animal e extração dos órgãos para contagem da radiação em contador gama. Assim determinou-se a porcentagem de dose absorvida por cada órgão, gerando gráficos Dose X Órgão para os diferentes órgãos e inferindo-se a sua captação (45).

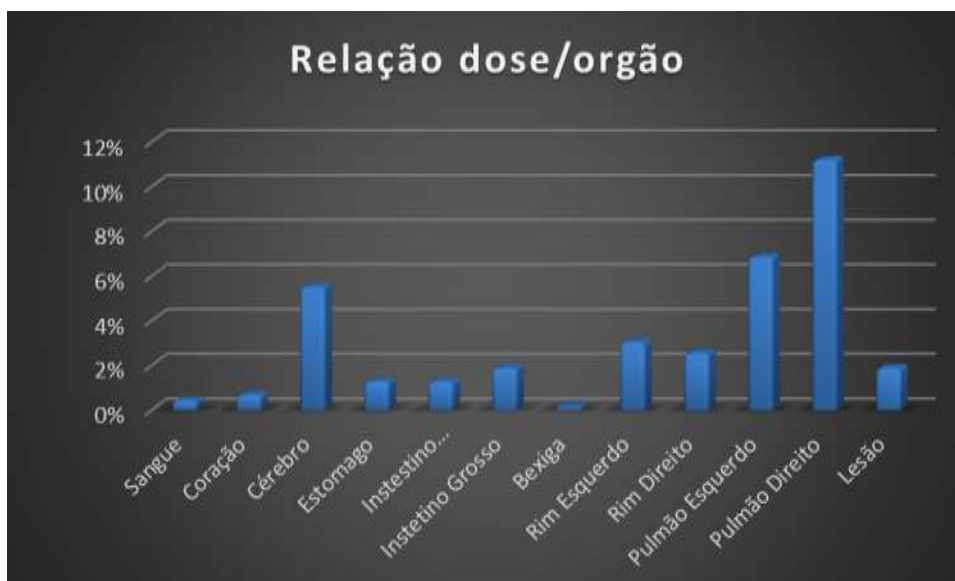
Gráfico 1 – Relação de dose nos órgãos (%) considerando a absorção em fígado e baço, das nanopartículas de PVA/PLGA/5FU-^{99m}Tc após 2 horas de administração caudal em relação a dose injetado em cada órgão.



Fonte: Experimento realizado no laboratório LABNAN.

Os valores referentes para a fígado 93% e baço 10,78% são consistentes com a literatura sobre o tema, em especial o seu alto reconhecimento por esses dois órgãos. De fato a captação tanto pelo fígado quanto pelo baço são problemas que afligem a comunidade que atua na área de nanomedicina, por representar muitas vezes um grande limitador da sua aplicação prática (83). Esta captação ocorre devido ao sistema fagocitário mononuclear que por meio das células de de Kúpffer no fígado e macrófagos no baço reconhecem as nanopartículas como corpos estranhos e as retiram de circulação, levando-as para esses órgãos (84).

Gráfico 2 – Relação de dose nos órgãos (%) não considerando a absorção em fígado e baço das nanopartículas de PVA/PLGA/5FU-^{99m}Tc após 2 horas de administração caudal em relação a dose injetado em cada órgão.



Fonte: Experimento realizado no laboratório LABNAN.

A nanopartícula PVA/PLGA/5FU-^{99m}Tc apresentou uma baixa captação no tecido cardíaco 0,11%, representando uma grande vantagem, visto que o fármaco tradicional, ou seja, o 5-fluoracil não encapsulado apresenta cardiotoxicidade. Essa cardiotoxicidade se apresenta por meio de vasospasmo coronariano, trombose coronariana, cardiomiopatia, ataque cardíaco súbito e morte cardíaca, em uma proporção de 11/1000 em pacientes sem história de cardiopatia. A cardiotoxicidade é mediada pelo efeito direto de proteína quinase C na camada muscular do vaso, assim como pela interferência dos mecanismos do óxido nítrico (85). Desse modo, uma baixa captação pelo tecido cardíaco representa importante aspecto farmacodinâmico e uma melhora farmacológica no sistema PVA/PLGA/5FU-^{99m}Tc frente ao fármaco tradicional, o que por si só já justifica seu uso.

Foi observado que o cérebro apresentou uma baixa captação do sistema PVA/PLGA/5FU-^{99m}Tc 0,94%, estando de acordo com medicamentos radioativos devem apresentar baixa captação cerebral (<60Gy) (86), assim como baixa perfusão pela barreira hematoencefálica, de modo a proteger o tecido cerebral do excesso de radiação. No caso em tela, o nanorradiofármaco obtido apresentou uma taxa de dose muito inferior a 60 Gy, sendo considerado seguro para uso. Um outro ponto importante, referente a captação cerebral observado pelo sistema

PVA/PLGA/5FU-^{99m}Tc é que embora tenha apresentado uma baixa captação, houve, ainda que discreta, uma permeação pela barreira hematoencefálica. Esse fato por si só, representa importante avanço tecno-farmacológico do sistema, pois o principal sítio metastático dos tumores de glândulas salivares, é na região perineural e baso-cranial (31). Assim, o sistema já apresenta um dupla funcionalização podendo ser pensado no uso, como adjuvante, na terapia em caso de metástase.

O rim é órgão responsável pela filtração sanguínea (sangue circulante) e representa importante órgão responsável pelos aspectos de segurança no uso de nanopartículas. Assim, todo sistema nanoestruturado deve ser planejado, de modo a permitir sua excreção renal. As nanopartículas, após passar pelo endotélio fenestrado (com poros de 70-100 nm), devem passar através da membrana basal glomerular, uma camada grossa de matriz extracelular que fica entre o endotélio capilar e os podócitos, que permitem a depuração de partículas de 2-8 nm (87). De acordo com os dados de captação nos rins de 0,52% no rim direito e 1,17% no rim esquerdo, é possível inferir que o sistema PVA/PLGA/5FU-^{99m}Tc apresenta liberação renal. Embora tenha um tamanho superior a 100nm, o sistema PVA/PLGA/5FU-^{99m}Tc possui tamanho médio entre 208-320nm, sua captação renal é prognóstico de liberação renal, sendo tal fato é explicado pela passagem longitudinal das nanopartículas pelas fenestrações capilares do endotélio renal, que permitem passagem de estruturas entre 100-500nm (88). Assim, a captação renal representa importante aspecto de segurança e demonstra que o sistema possui um alto clearance renal (88).

A captação pelos pulmões de 1,17% e 1,91%, no direito e esquerdo, respectivamente não pode ser negligenciada. O epitélio alveolar é constituído por dois tipos de células epiteliais: alveolares do tipo II cuboidal (ATII) e alveolares do tipo I achatadas (ATI). Embora as células ATII superem em número as células ATI em uma proporção 2: 1, as células ATI cobrem mais de 95% da superfície alveolar (89). Partículas nanométricas podem não ser reconhecidas pelos macrófagos e, em vez disso, podem ser internalizadas pelo epitélio alveolar (25). Uma vez depositadas, as partículas interagem com surfactantes pulmonares e são deslocadas por forças molhantes na hipófase aquosa, onde ocorre a interação com células pulmonares. Em seguida, as partículas podem ser eliminadas através de fagocitose por macrófagos ou através da depuração mucociliar dentro das vias aéreas condutoras ou por meio de translocação através da barreira do tecido ar-

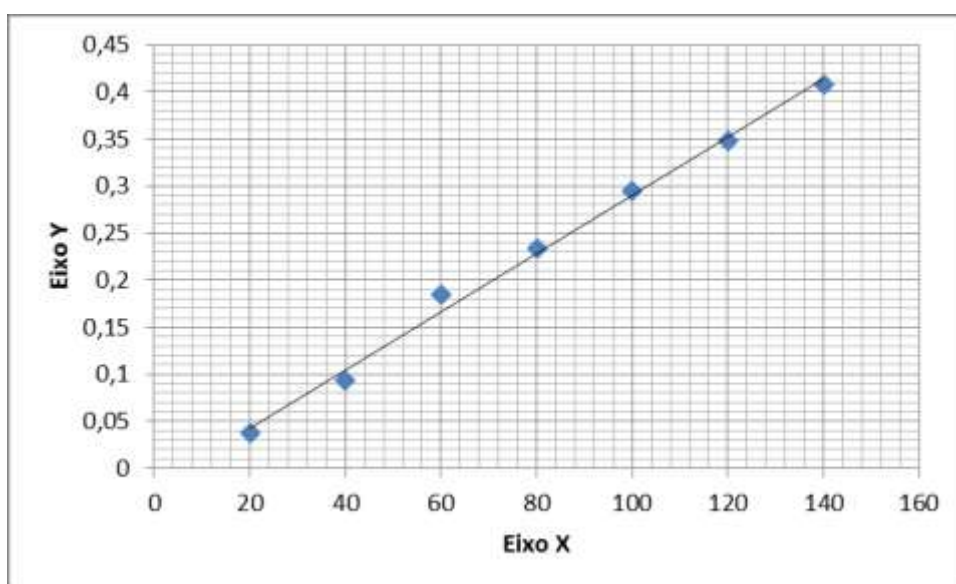
sangue nas regiões mais periféricas (90) (91) (92) . Assim, por ter sido usado na formulação um concentração considerável de surfactante, acredita-se que a presença do mesmo pode ter facilitado a interação com as forças de hipofase e assim auxiliado na captação pulmonar.

Eficiência de Encapsulamento

A eficiência de encapsulamento foi determinada de acordo com os dados da espectrofotometria, ou seja, após a centrifugação da solução das nanopartículas, descrito no item supracitado, foi adicionado na solução inicial 20 μL até que fossem obtidos 7 pontos, para a formação da curva de calibração das concentrações conhecidas (40 μL , 60 μL , 80 μL , 100 μL e 120 μL) de 5-FU (Figura 14).

O valor obtido foi de 87,6% de encapsulamento, a média da curvas analíticas de 5FU, pode ser visualizada na figura 14. O coeficientes de correlação (r) das curvas apresentaram valor acima de 0,99. Demonstrando a boa relação entre os pontos com poucas divergências analíticas.

Figura 12 – Curva de calibração obtida através de dados da espectrofotometria colocados em função da reta mostrando a variação da concentração do 5-FU.

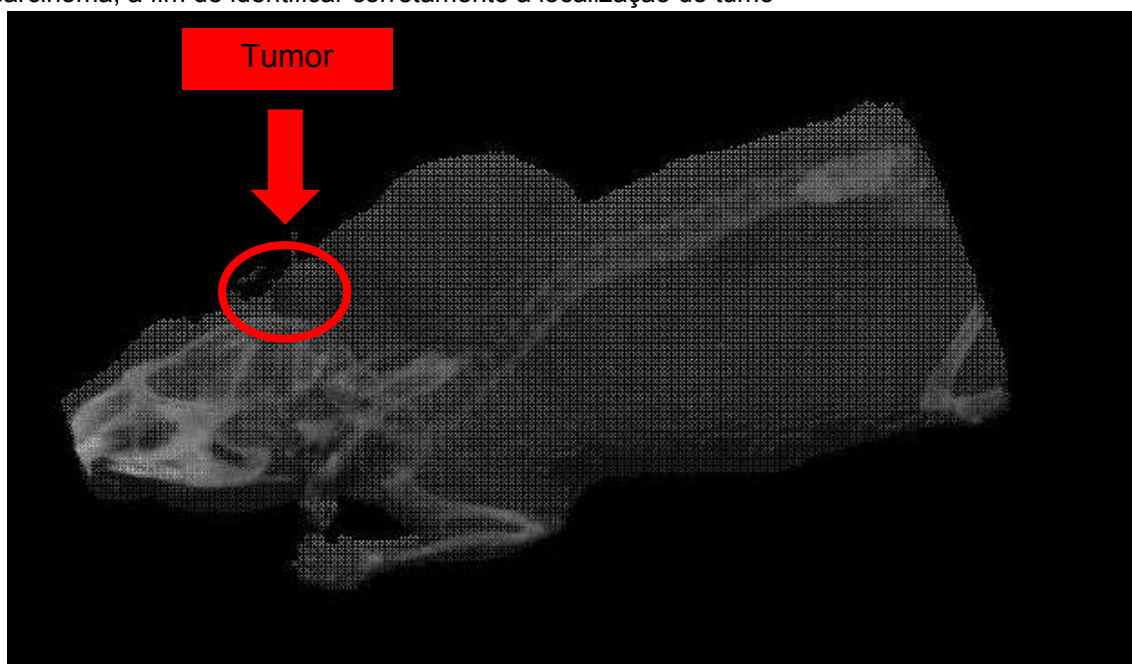


Fonte: Experimento realizado no laboratório LABNAN.

4.4. Tomografia computadorizada por emissão de feixe único

A figura 14 evidencia a presença da patologia, evidenciando o tumor após a inoculação conforme descrito na parte de métodos.

Figura 13 - Imagem por Tomografia Computadorizada de Rato Induzido com Adenocarcinoma, a fim de identificar corretamente a localização do tumor

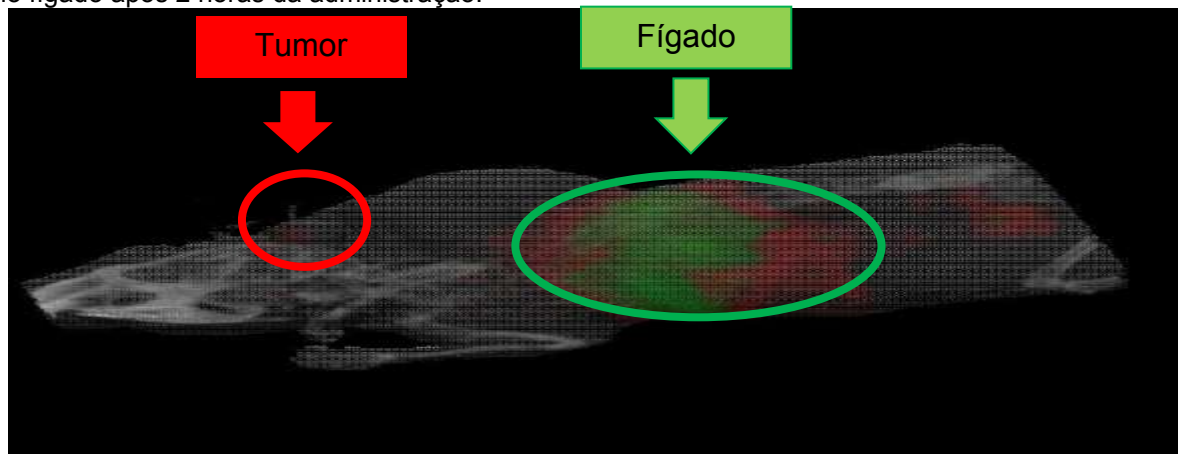


Legenda – Imagem evidenciando a localização do câncer de glândula salivar induzido por via caudal, notificado pela seta.

Fonte: Experimento realizado no laboratório LABNAN.

A figura 13 é possível observar que, após um período de injeção de 2 horas do sistema PVA/PLGA/5FU-^{99m}Tc ocorreu um alto acúmulo na região alvo (tumor xenoenxertado), confirmado que as nanopartículas podem ser usadas como agente de imagem para câncer de glândula salivar, inclusive de de glândulas salivares (93). É possível observar ainda o alto acúmulo hepático, conforme descrito no item da biodistribuição.

A figura 14 – Imagem tomográfica mostrando a ligação das nanopartículas no tumor e ligação no fígado após 2 horas da administração.



Legenda: Imagem por Tomografia por Emissão de Foton Único, juntamente com Tomografia Computadorizada de Rato Induzido com tumor de glândula salivar utilizando nanopartículas de 5 fluoracil marcadas com 99mTc após 2 horas de injeção.

Fonte: Experimento realizado no laboratório LABNAN.

CONCLUSÃO

A nanomedicina desponta como uma grande utilidade, devido a capacidade de proporcionar um atendimento cada vez mais personalizado e individualizado, através da evolução da técnica de diagnóstico molecular para a detecção precoce da doença, no que diz respeito ao controle e terapia pós diagnóstico. Em relação isso, com o uso de biomoléculas marcadas com alta especificidade por um órgão ou receptor específico, possibilitam a obtenção de imagens de diagnósticos excelentes dos sítios que expressam os receptores com especificidade para a biomolécula, diminuindo a captação e exposição de outros órgãos. Nessa conjuntura, o presente trabalho demonstrou que o método utilizada de dupla emulsificação utilizado para a produção das nanopartículas foi extremamente eficaz. Foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), demonstrando uma dispersão de tamanho na faixa de 180 a 220 nm, sendo uma faixa ideal para a penetração no microambiente tumoral, através do Efeito de Permeabilidade e Retenção (EPR). A marcação, utilizam o método direto com ^{99m}Tc , apresentou rendimento superior a 90%, possibilitando o estudo de biodistribuição em ratos saudáveis com nanopartículas de PLGA/PVA/5FU- ^{99m}Tc para prognóstico do comportamento biológico. Portanto, a biodistribuição associada com a microscopia eletrônica de varredura e estudos toxicológicos, fornece uma visão promissora e ampliada do comportamento da nanopartículas *in vivo*. Em outras palavras, o estudo foi essencial para pesquisa pré-clínica de novos nanorradiofármacos com o desejo de utilização clínica futuramente, para o diagnóstico do câncer de glândulas salivares.

REFERÊNCIAS

1. Lagha A, Chraiet N, Ayadi M, Krimi S, Allani B, Rifi H, et al. Systemic therapy in the management of metastatic or advanced salivary gland cancers. *Head e Neck Oncology*. 2012 May; 4(19): p. 1-12.
2. Eskander A, Irish J, Freeman J, Gullane P, Gilbert R, Groome PA, et al. Overview of major salivary gland cancer surgery in Ontario (2003–2010). *Journal of Otolaryngology - Head e Neck Surgery*. 2014;: p. 1-8.
3. Yarbrough WG, Panaccione A, Chang MT, Ivanov SV. Clinical and Molecular Insights Into Adenoid Cystic Carcinoma: Neural Crest-Like Stemness as a Target. *Laryngoscope investigative otolaryngology*. 2016;: p. 60-77.
4. Wilson TC, Ma D, Tilak A, Tesdahl B, Robinson RA. Next-Generation Sequencing in Salivary Gland Basal Cell Adenocarcinoma and Basal Cell Adenoma. *Head and Neck Pathology*. 2016 Maio;(10): p. 494-500.
5. Volpato LER, Caldas LF, Castro PHdS. Rehabilitation of an Advanced Case of Adenoid Cystic Carcinoma. Hindawi Publishing Corporation. 2015 Janeiro;: p. 01-04.
6. Wysocki PT, Izumchenko E, Meir J, Ha PK, Sidransky D, Brait M. Adenoid cystic carcinoma: emerging role of translocations and gene fusions. *Oncotarget*. 2016 Junho; 7(40): p. 66239-66255.
7. Liu LZ, Zhang YM, Chen Y, Li L. Spreading patterns, prognostic factors and treatment outcomes of nasopharyngeal papillary adenocarcinoma and salivary gland-type carcinomas. *Clinical Otolaryngology*. 2016 Junho; 41(2): p. 160-168.
8. Mathai M, Sherubin JE, Agnihotri P, Sangeetha G. Adenoid Cystic Carcinoma of Child: A Rare Case. *Adenoid Cystic Carcinoma of Child: A Rare Case*. 2014: p. 206-208.
9. Chen S, Yang K, Tuguntaev RG, Mozhi A, Zhang J. Targeting tumor microenvironment with PEG-based amphiphilic nanoparticles to overcome chemoresistance. *Nanomedicine*. 2016;: p. 269-286.
10. Dillon PM, Chakraborty S, Moskaluk CA, Joshi PJ, Thomas CY. Adenoid cystic carcinoma: A review of recent advances, molecular targets, and clinical trials. *Adenoid cystic carcinoma: A review of recent advances, molecular targets, and clinical trials*. 2014 Deembro 3.
11. I M. Introduction to salivary glands: structure, function and embryonic development. *Frontiers of oral biology*. 2010 abril; 14: p. 1-20.
12. Holmberg KV, Hoffman MP. Anatomy, biogenesis, and regeneration of salivary

- . glands. Monographs in oral science. 2014 Naio;: p. 1-13.
- 13 Amano O, Mizobe K, Bando Y, Sakiyama K. Anatomy and histology of rodent and human major salivary gland. *Acta histochemica et cytochemica*. 2012 Outubro; 45(5): p. 241-250.
- 14 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics 2018. *Cancer Journal for Clinicians*. 2018; 18(68): p. 7-30.
- 15 Cancer IAFRo. Global Cancer facts e figures 2nd edition. Atlanta: World Health Organization; 2011.
- 16 Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert AJ. Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 2014 Janeiro; 10(1): p. 19-34.
- 17 Glasgow MDK, Chougule MB. Recent Developments in Active Tumor Targeted Multifunctional Nanoparticles for Combination Chemotherapy in Cancer Treatment and Imaging. *Journal of biomedical nanotechnology*. 2016 Março; 11(11): p. 1859-1898.
- 18 Tanaka T, Shimizu M, Kochi T, Moriwaki H. Chemical-induced Carcinogenesis. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2013 Dezembro; 5(6): p. 203-209.
- 19 Cho H, Lai TC, Tomoda K, Kwon GS. Polymeric Micelles for Multi-Drug Delivery in Cancer. *Polymeric Micelles for Multi-Drug Delivery in Cancer*. 2015 Fevereiro; 1(16): p. 10-20.
- 20 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Leading Edge*. 2011 Março; 144(5): p. 646-674.
- 21 Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*. 2013 Junho; 13(7): p. 511-518.
- 22 Mertz TM, Harcy V, Roberts SA. Risks at the DNA Replication Fork: Effects upon Carcinogenesis and Tumor Heterogeneity. *Genes*. 2017 Janeiro; 8(1): p. 1-21.
- 23 Barcellos-Hoff MH, Lyden D, Wang TC. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. *Nature*. 2013 Junho; 13(11).
- 24 Weston A, Harris CC. Chemical Carcinogenesis. In Holland JF, Frei E. *Cancer Medicine*. Ontário: Wiley Blackwell; 2003.
- 25 Takenaka S, Karg E, Kreyling WG, Lentner B, Moller W. Distribution Pattern of Inhaled Ultrafine Gold Particles in the Rat Lung. *Inhalation Toxicology*. 2006 Março; 18(10): p. 734-740.
- 26 Madhura M, Kumar BV, Suma S, Sarita Y. Cribriform adenocarcinoma of minor

- . salivary gland: A mimic of polymorphous low-grade adenocarcinoma. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2016 Setembro - Dezembro; 20(3): p. 536-539.
- 27 Chae Yk, Chung SY, Davis AA, Carneiro BA, Chandra S, Kaplan J, et al. Adenoid . Cystic carcinoma: current therapy and potential therapeutic advances on genomic profiling. *Oncotarget*. 2015 Novembro; 6(35): p. 117-134.
- 28 Pagano A, Dennis K. Cribriform Adenocarcinoma of the Minor Salivary Gland . Arising in the Tonsil with Metastasis to a Cervical Lymph Node:A Case Report with Description of Fine Needle Aspiration Cytology. *Diagnostic Cytopathology*. 2017.
- 29 Persson F, Fehr A, Sundelin K, SCHULTE B, LÖNING T, STENMAN G. Studies . of genomic imbalances and the MYB-NFIB gene fusion in polymorphous low-grade adenocarcinoma of the head and neck. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*. 2011 Julho; 40: p. 80-84.
- 30 Kasbollah A, Eu P, Cowell S, Deb P. Review on production of 89Zr in a medical . cyclotron for PET radiopharmaceuticals. *Journal of nuclear medicine technology*. 2013 Março; 41(1): p. 35-41.
- 31 Tsutani Y, Miyata Y, Nakayama H, Okumura S, Adachi S, Yoshimura M, et al. . Prognostic significance of using solid versus whole tumor size on high-resolution computed tomography for predicting pathologic malignant grade of tumors in clinical stage IA lung adenocarcinoma:A multicenter study. *American Association for Thoracic Surgery*. 2012 Março; 143(3): p. 607-612.
- 32 Sharma P, RK, Alavi A. PET/Computed Tomography Using New . Radiopharmaceuticals in Targeted Therapy. Elsevier. 2015 Outubro; 10(4): p. 495-505.
- 33 Drozdovitch V, Brill AB, Callahan RJ, Clanton JA, DePietro A. USE OF . RADIOPHARMACEUTICALS IN DIAGNOSTIC NUCLEAR MEDICINE IN THE UNITED STATES: 1960–2010. *Health physics*. 2015 Maio; 108(5): p. 520-537.
- 34 Moon Y, Lee KY, Park JK. The prognosis of invasive adenocarcinoma presenting . as groundglass opacity on chest computed tomography after sublobar resection. *Journal of thoracic disease*. 2017 Outubro; 9(10): p. 3782-3792.
- 35 Russo P, Larobina M, Lillo FD, Vecchio SD. Combined SPECT/CT and PET/CT . for breast imaging. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*. 2016 Fevereiro; 809(11): p. 58-66.
- 36 Velikyan I. 68Ga-Based Radiopharmaceuticals: Production and Application . Relationship. *Molecules : a journal of synthetic chemistry and natural product chemistry*. 2015 Julho; 20(7): p. 12913-12943.
- 37 Palumbo B, Buresta T, Nuvoli S, Spanu A, Schillaci O. SPECT and PET Serve as

- . Molecular Imaging Techniques and in Vivo Biomarkers for Brain Metastases. International Journal of Molecular Sciences. 2014 Junho; 15(6): p. 9878-9893.
- 38 Borro M, Botticelli A, Mazzuca F, Onesti EC, Gentile G, Romiti A, et al. Pre-treatment assay of 5-fluorouracil degradation rate (5-FUDR) to improve prediction of 5-fluorouracil toxicity in gastro-esophageal cancer. Oncotarget. 2016 Agosto.
- 39 Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nature Reviews Cancer. 2003 Maio; III: p. 330-338.
- 40 Blanke CD, Teng M, Choy H. Cancer Network. [Online].; 2017 [cited 2017 agosto 03]. Available from: HYPERLINK "<http://www.cancernetwork.com/review-article/role-uft-combined-modality-therapy>" <http://www.cancernetwork.com/review-article/role-uft-combined-modality-therapy> .
- 41 Liu GC, Yan JP, He Q, An X, Pan ZZ, Ding PR. Effect of Neoadjuvant Chemoradiotherapy with Capecitabine versus Fluorouracil for Locally Advanced Rectal Cancer: A Meta-Analysis. Gastroenterology Research and Practice. 2016 Junho; 2016: p. 1-10.
- 42 BRAGA TL. DESENVOLVIMENTO DE NANORRADIOFÁRMACO À BASE DE BEVACIZUMABE MARCADO COM TECNÉCIO-99m PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DO TUMOR ESTROMAL GASTROINTESTINAL. Rio de Janeiro: Instituto de Radioproteção e Dosimetria; 2015.
- 43 Novales PS, Mansanet P, Cars CM, Monforte RS. Medicina nuclear y radiofármacos. Radiología. 2015 Outubro; 56(51): p. 29-37.
- 44 BRAGA TL. AVALIAÇÃO DE DUAS FORMULAÇÕES PARA O DIAGNÓSTICO POR. 2015 Novembro..
- 45 Albernaz MdS, Ospina CA, Rossi AM, Santos-Oliveira R. Radiolabelled nanohydroxyapatite with 99mTc: perspectives to nanoradiopharmaceuticals construction. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology An International Journal. 2014 Abril; 42(II): p. 88-91.
- 46 Bassi M, Santinello I, Bevilacqua A. Nanotecnologie: una grande rivoluzione che parte dal piccolo. Urologia Journal. 2013 Setembro; I(80): p. 46-55.
- 47 Hulla J, Sahu S, Hayes A. Nanotechnology: History and future. Human & experimental toxicology. 2015 Dezembro; XII(34): p. 1318-1321.
- 48 Zdrojewicz Z, Waracki M, Bugaj B, Pypno D, Cabała K. Medical applications of nanotechnology. Postepy Hig Med Dosw. 2015 Outubro; 69: p. 1196-1204.
- 49 Alam F, Naim M, Aziz M, Yadav N. Unique roles of nanotechnology in medicine and cancer-II. Indian Journal Cancer. 2015 Janeiro - Março; 52(1): p. 1-9.
- 50 Lakshmanan VK. Therapeutic efficacy of nanomedicines for prostate cancer: An

- . update. Investigative and clinical urology. 2016 Janeiro; 57(1): p. 21-29.
- 51 Carvalho Bpd, Albernaz MdS, Santos-Oliveira R. Development of
. Nanoradiopharmaceuticals by Labeling Polymer Nanoparticles with Tc-99m.
World Journal of Nuclear Medicine. 2013 Junho; 12(1): p. 24-26.
- 52 Piktel E, KN, Wątek M, Wollny T, Deptuła P, Bucki R. Recent insights
. in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-
cancer therapy. Journal of Nanobiotechnology. ;: p. 1-23.
- 53 Talevi A, Gantner ME, Ruiz ME. Applications of Nanosystems to Anticancer Drug
. Therapy (Part I. Nanogels, gels, Nanospheres, Nanocapsules). Anti-Cancer Drug
Discovery. 2014 Novembro; 9(1): p. 83-98.
- 54 Zacchè MM, Srikrishna S, Cardozo L. Novel targeted bladder drug-delivery
. systems: a review. Research and Reports in Urology. 2015;; p. 169-178.
- 55 Zhang B, Shi W, Jiang T, Wang L, Mei H, Lu H, et al. Optimization of the tumor
. microenvironment and nanomedicine properties simultaneously to improve tumor
therapy. Oncotarget. 2016 Agosto; 38(7): p. 62607-62618.
- 56 Zhang B, Hu Y, Pang Z. Modulating the Tumor Microenvironment to Enhance
. Tumor Nanomedicine Delivery. Frontiers in pharmacology. 2017 Dezembro;
22(8).
- 57 W Nicholasa J, Han Bae Y. EPR: Evidence and fallacy. Journal of Controlled
. Release. 2014 Setembro; 190(28): p. 451-464.
- 58 Mannancherril V, Therrien B. Strategies toward the Enhanced Permeability and
. Retention Effect by Increasing the Molecular Weight of Arene Ruthenium
Metallaassemblies. Strategies toward the Enhanced Permeability and Retention
Effect by Increasing the Molecular Weight of Arene Ruthenium
Metallaassemblies. 2017 Dezembro 22: p. A-H.
- 59 Mattos ACd, CA, Tominaga TT, Khali NM, Mainardes RM. Polymeric
. nanoparticles for oral delivery of 5-fluorouracil: Formulation optimization,
cytotoxicity assay and pre-clinical pharmacokinetics study. European Journal of
Pharmaceutical Sciences. 2016 Setembro; 84(10): p. 83-91.
- 60 Patricio BFdC, Albernaz MdS, Sarcinelli M, Weissmüller G. Development of Novel
. Nanoparticle for Bone Cancer. Journal of Biomedical Nanotechnology. 2014
Julho; 10(7): p. 1242-1248.
- 61 Machado DE, Perini JA, Orlando MMC, Santos-Oliveira R. Developing a
Noninvasive Procedure Using Labeled Monoclonal Antibody Anti-VEGF

- . (Bevacizumab) for Detection of Endometriosis. Developing a Noninvasive Procedure Using Labeled Monoclonal Antibody Anti-VEGF (Bevacizumab) for Detection of Endometriosis. 2015 Setembro 26: p. 1-4.
- 62 Helal-Netoa E, Cabezasb SS, Sancenónb F, Martínez-Máñezb R, Santos-Oliveira R. Indirect calculation of monoclonal antibodies in nanoparticles using the radiolabeling process with Technetium 99 metastable as primary factor: alternative methodology for the entrapment efficiency. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2018 Fevereiro.
- 63 Sa LTM, Albernaza MdS, Patricio BFdC, FalcãoJunior MV, Coelho BF, Bordim A, et al. Biodistribution of nanoparticles: initial considerations. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2012 Novembro; 70: p. 602-604.
- 64 Ricci-Junior E, Siqueira LBdOd, Rodrigues RAS, Sancenón F, Martínez-Máñez R, oraes JAdM, et al. Nanocarriers as Phototherapeutic Drug Delivery System: Appraisal of Three Different Nanosystems in an In vivo and In vitro Exploratory Study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2018 Março ; 21: p. 43-49.
- 65 Maioli C, Luciniani G, Strinchini A, Tagliabue L, Sole AD. Quality control on radiochemical purity in Technetium-99m radiopharmaceuticals labelling: three years of experience on 2280 procedures. *Acta bio-medica : Atenei Parmensis*. 2017 Abril; 88(1): p. 49-56.
- 66 Bokhari TH, Roohi S, Hina S, Akbar MU, Sohaib M, Iqbal M. Synthesis, quality control, and bio-evaluation of 99m Tc-cyclophosphamide. *Chemical Biology & Drug Design*. 2018 fevereiro; 91(2): p. 456-462.
- 67 Raa JP, Geckeler KE. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. *Progress in Polymer Science*. 2011 Janeiro; 36(7): p. 887-913.
- 68 Silva FMRd. DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANO-HIDROXIAPATITA DOPADA COM HOLMIO-166 PARA TERAPIA DO CÂNCER ÓSSEO. Rio de Janeiro: Instituto de Engenharia Nuclear; 2015.
- 69 SARCINELLI MA. DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULA DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) CONTENDO ANTICORPO MONOCLONAL MARCADA COM 99mTc PARA O DIAGNÓSTICO PRECOCE E TRATAMENTO EFICAZ DO CÂNCER DE MAMA. Rio de Janeiro: Instituto de Macromoléculas; 2014.
- 70 Smyth T, Kullberg M, Malik N, Smith-Jones P, Graner MW. Biodistribution and Delivery Efficiency of Unmodified Tumor-Derived Exosomes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2016 Dezembro; : p. 145-155.
- 71 Muñoz-Mármol M, Crespo J, Fritts MJ, Maojo V. Towards the taxonomic categorization and recognition of nanoparticle shapes. *Nanomedicine* :

- nanotechnology, biology, and medicine. 2015 Fevereiro; 11(2): p. 457-465.
- 72 Blanco E, Shen H, Ferrari M. Principles of nanoparticle design for overcoming . biological barriers to drug delivery. *Nature biotechnology*. 2015 Setembro; 33(9): p. 941-951.
- 73 Pintoa SR, Sarcinelle MA, Albernaz MS, Silva FMR, Seabra SH, Nascimento . PAd, et al. In vivo studies: comparing the administration via and the impact on the biodistribution of radiopharmaceuticals. *Nuclear Medicine and Biology*. 2014 Outubro; 41(9): p. 772-774.
- 74 CAMPOS IMF. PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE . PLGA PARA LIBERAÇÃO DE ACETATO DE DEXAMETASONA. Minas Gerais: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS; 2013.
- 75 Costa AP, Xu X, Burgess DJ. Freeze-anneal-thaw cycling of unilamellar . liposomes: effect on encapsulation efficiency. *Pharmaceutical Research*. 2014 Janeiro; 31(1): p. 97-103.
- 76 Suárez-Peña B, Negral L, Castrillón L, Fernández-Nava Y. Imaging Techniques . and Scanning Electron Microscopy as Tools for Characterizing a Si-Based Material Used in Air Monitoring Applications. *Materials*. 2016 Fevereiro; 9-2: p. 1-14.
- 77 Narayan K, Danielson CM, Lagarec K, Lowekamp BC, Coffman P, Laquerre A, et . al. Multi-resolution correlative focused ion beam scanning electron microscopy: applications to cell biology. *Journal of ultrastructure and molecular structure research*. 2014 Dezembro; 185(III): p. 278-284.
- 78 Stetefeld J, McKenna SA, Patel TR. Dynamic light scattering: a practical guide . and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews*. 2016; 8: p. 409-427.
- 79 Malvern. Malvern. [Online]. Available from: [HYPERLINK](http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf) . "http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf" http://www.biophysics.bioc.cam.ac.uk/files/Zetasizer_Nano_user_manual_Man0317-1.1.pdf .
- 80 Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: . Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticas*. 2015 Junho; 93: p. 52-79.
- 81 Mirakabad FST, Nejati-Koshk K, Yamchii MR, Milan M. PLGA-Based . Nanoparticles as Cancer Drug Delivery Systems. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2015 feveiro; 15(2): p. 517-535.
- 82 Müller K, Motskin M, Philpott A, Routh A. The effect of particle agglomeration on . the formation of a surface-connected compartment induced by hydroxyapatite

- nanoparticles in human monocyte-derived macrophages. *Biomaterials*. 2014 Janeiro; 35(3): p. 1074-1088.
- 83 Santos SNd, Reis SRRD, Pires LP, Helal-Neto E, Sancenón F, Barja-Fidalgo TC, et al. Avoiding the mononuclear phagocyte system using human albumin for mesoporous silica nanoparticle system. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2017 Outubro; 251: p. 181-189.
- 84 hang YN, Poon W, J.Tavares A, D.McGilvray I, C.W.Chanabef W. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. *Journal of Controlled Release*. 2016 Outubro; 240: p. 332-348.
- 85 Alter P, Herzum M, Soufi M, Schaefer JR, Maisch. B. Cardiotoxicity of 5-fluorouracil. *Cardiovascular & hematological agents in medicinal chemistry*. 2006 Janeiro; 4(1): p. 1-5.
- 86 Marks LB, Yorke ED, Jackson A, Haken RKT. Use of normal tissue complication probability models in the clinic. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2014 Junho; 76(30): p. 10-19.
- 87 Roemeling Cv, Jiang W, Chan CK, Weissman IL, Kim BYS, Kim BYS. Breaking Down the Barriers to Precision Cancer Nanomedicine. *Trends in biotechnology*. 2017 Fevereiro; 35(2): p. 159-171.
- 88 Choi HS, Liu W, Misra P, Tanaka E, Zimmer JP, Ipe BI, et al. Renal Clearance of Nanoparticles. *Nature biotechnology*. 2007 Setembro; 10: p. 1165-1170.
- 89 Thorley AJ, Ruenraroengsak P, Potter TE, Tetley TD. Critical Determinants of Uptake and Translocation of Nanoparticles by the Human Pulmonary Alveolar Epithelium. *ACS Nano*. 2014 Novembro; 8(11): p. 11778-11789.
- 90 Schürch's S, Gehr P, Hof VI, Green F. Surfactant displaces particles toward the epithelium in airways and alveoli. *Respiration Physiology*. 1990 Abril; 80(1): p. 17-32.
- 91 GEHR P, SCHÜRCH S, BERTHIAUME Y, HOF VI, GEISER M. Particle Retention in Airways by Surfactant. *Journal of Aerosol Medicine*. 2009 Março; 3(1).
- 92 Semmler-Behnke M, Takenaka S, Fertsch S, Wenk A, Seitz J, Mayer P, et al. Efficient Elimination of Inhaled Nanoparticles from the Alveolar Region: Evidence for Interstitial Uptake and Subsequent Reentrainment onto Airways Epithelium. *Environmental health perspectives*. 2007 Maio; 115(6): p. 728-733.
- 93 Portilho FL, Helal-Neto E, Cabezas SS, Pinto SR, Santos SNd, Pozzo L, et al. Magnetic core mesoporous silica nanoparticles doped with dacarbazine and

. labelled with ^{99m}Tc for early and differential detection of metastatic melanoma by single photon emission computed tomography. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. 2017 Dezembro.

ANEXO - Carta de aprovação do comitê de ética no uso dos animais - CEUA-UFPE

Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Ciências Biológicas
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 fone: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
 fax: (55 81) 2126 8350
 www.ccb.ufpe.br



Recife, 02 de agosto de 2013.

Ofício nº 606/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof Ralph Santos Oliveira**
 Faculdade de Farmácia
 Centro Universitário Estadual da Zona Oeste
 Processo nº 23076.020578/2013-27

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Desenvolvimento de Nanorradiofármacos.**"

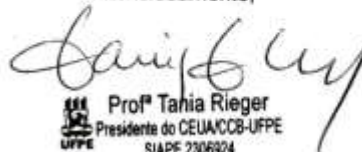
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério; Animais: ratos; Linhagem: Wistar; Idade: 10 semanas; Peso: 180-300 dias; Sexo: machos e fêmeas; Nº total de animais: 30.

Atenciosamente,


 Profª Tahia Rieger
 Presidente do CEUA/CCB-UFPE
 SIAPE 2306924