



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

Thiago Goulart Rosa

**Desenvolvimento de micropartículas teragnósticas de Dacarbazina como dispositivo para liberação local e controlada para melanoma metastático**

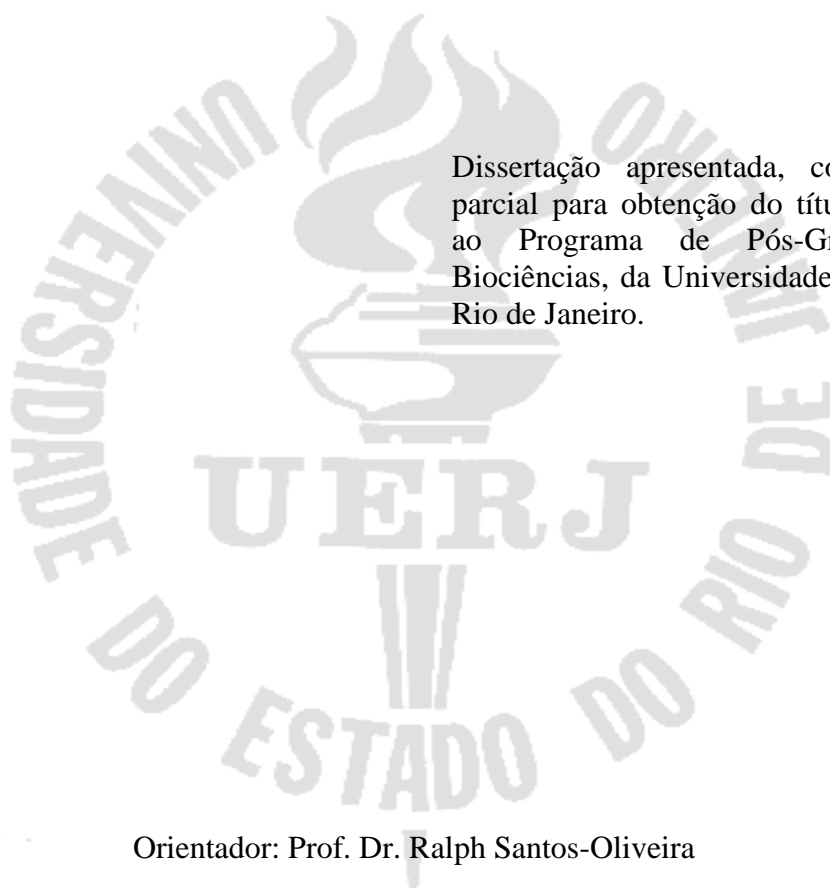
Rio de Janeiro

2017

Thiago Goulart Rosa

**Desenvolvimento de micropartículas teragnósticas de Dacarbazina como dispositivo  
para liberação local e controlada para melanoma metastático**

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

2017

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

R788 Rosa, Thiago Goulart.

Desenvolvimento de micropartículas teragnósticas de Dacarbazina como dispositivo para liberação local e controlada para melanoma metastático / Thiago Goulart Rosa. – 2017.  
106 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. Medicina nuclear - Teses. 2. Câncer – Imagens – Teses. 3. Melanoma - Teses. 4. Metástase - Teses. 5. Neoplasias. I. Oliveira, Ralph Santos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

CDU 615.849.1

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

Thiago Goulart Rosa

**Desenvolvimento de micropartículas teragnósticas de Dacarbazina como dispositivo para liberação local e controlada para melanoma metastático**

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.

Aprovada em 12 de dezembro de 2017.

Orientador: Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes– UERJ

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. André Luiz Mencilha

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes– UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Sotiris Missailidis

Fundação Oswaldo Cruz

\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Zaida Maria Faria de Freitas

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2017

Dedico este trabalho à minha avó Maria, onde quer que ela esteja, sempre  
estará comigo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Doutor Ralph Oliveira-Santos, por toda a ajuda e demonstração de força de vontade, pela excelente orientação e amizade demonstrada nesses anos.

À minha família, por todo apoio e paciência nessa jornada. Mãe, seu cuidado e dedicação foram o que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir.

Aos professores, pelos ensinamentos, dentro e fora da sala de aula, durante a época da graduação e agora do mestrado.

Aos meus colegas de mestrado, Marta e Fagner pelo companheirismo e pelo inegável apoio quando necessário.

A UERJ, porque sem ela não poderia ter realizado este sonho de conquista.

A todos aqueles, que embora não citados nominalmente, contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

## RESUMO

ROSA, Thiago Goulart. **Desenvolvimento de micropartículas teragnósticas de Dacarbazina como dispositivo para liberação local e controlada para melanoma metastático**. 2017. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

O Melanoma Metastático (MM) é um tipo de câncer agressivo, de difícil tratamento e mortal. Embora sua incidência seja baixa, o número está aumentando a cada ano. O tratamento para este melanoma possui limitações, além de longo e um arsenal terapêutico reduzido. Entretanto, os medicamentos utilizados costumam ter um índice de sucesso baixo devido às características desse tumor. O diagnóstico desse câncer é sempre feito através de uma metodologia invasiva, normalmente biopsia. Nesse contexto, foi desenvolvido uma micropartícula de dacarbazina que podem ser marcadas com  $^{99m}\text{Tc}$  ou  $^{223}\text{Ra}$  para ambos usos: diagnóstico e terapia. O processo de radiomarcção consiste na incubação das micropartículas em cloreto estânico, a seguir, adição de radionuclídeo e nova incubação. Os resultados demonstraram que as micropartículas possuem um tamanho médio de 559nm e foram obtidos com formato esférico. Os resultados em animais (camundongos) induzidos com melanoma metastático demonstraram que a micropartícula conseguiu atingir o tumor com altas taxas (20%). Também identificou-se que as micropartículas tiveram um baixo reconhecimento sistema mononuclear fagocitário e uma alta afinidade pelas proteínas sanguíneas, elevando o tempo de circulação. Também, foi possível observar a depuração renal. A citotoxicidade demonstrou um uso seguro. Todos estes dados comprovam o uso como um agente teragnóstico para imagem (diagnóstico) e terapia de MM. A possibilidade do desenvolvimento de uma imagem é de extrema importância porque pode substituir futuramente o exame de biopsia.

Palavra chaves: Câncer, Medicina Nuclear, Micropartículas, Radiofármaco.

## ABSTRACT

ROSA, Thiago Goulart. **Development of theragnosis microparticles of Dacarbazine as a device for local and controlled release for metastatic melanoma**. 2017. 106 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Metastatic melanoma (MM) is an aggressive, difficult treatment and deadly type of cancer. Although its incidence is low, the number is increasing year after year. The treatment of metastatic melanoma has limitations beyond it's a long and a low therapeutic arsenal. Besides, the drugs used to have a rate of humble success due the characteristics of this tumor. Nevertheless, the diagnosing of this cancer is always made by an invasive methodology, mostly biopsy. In this direction we developed and dacarbazine microparticle that may be labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  and  $^{223}\text{Ra}$  for both use: diagnostic and therapy. The results showed that a 559nm microparticle were obtained with a spherical shape. The results in animals (mice) inducted with metastatic melanoma demonstrated that the microparticle were able to reach the tumor with a high rate (20%). Also demonstrated that the microparticles had a low recognition by the Mononuclear Phagocytic System and a high affinity by the blood proteins, increasing the circulating time. Also, was possible to observe the renal clearance. The cytotoxicity demonstrated the safe use. All this data corroborates the use as a theragnostic agent for imaging (diagnosing) and therapy of MM. The imaging possibility is of great importance because it can replace the biopsy examination.

Key words: Cancer, Nuclear Medicine, Microparticles, Radiopharmaceuticals.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária (BRASIL, 2016) .....	22
Figura 2	Esquema de ativação dos Proto-Oncogenes .....	25
Figura 3	Etapas da carcinogênese.....	27
Figura 4	Ativação de várias vias e receptores com suas interações em conjunto com suas funções celulares.....	28
Figura 5	Via intrínseca e extrínseca do processo de apoptose.....	29
Figura 6	Estrutura da pele. Visão tridimensional da pele e do tecido subcutâneo subjacente. As camadas dérmicas e epidérmicas e seus anexos.....	34
Figura 7	Carcinomas de células basais normalmente vemos o brilho perolado e finos vasos de sangue, chamados de telangiectasia.....	37
Figura 8	Demonstração do CEC: Lesão nodular avermelhada em formato de ulceração à direita e lesão à esquerda se apresenta como uma grande nodulação vegetante.....	39
Figura 9	Doença de Bowen: placa eritematosa e descamativa, que se confunde com outras doenças de pele.....	40
Figura 10	Critérios ABCDE para o diagnóstico de melanoma .....	42
Figura 11	Subtipos de melanomas.....	43
Figura 12	Vias de sinalização no melanoma. A sinalização MAPK promove o crescimento e a sobrevivência celular e é constitutivamente ativa na maioria dos melanomas. Os membros da família RAS são ativados por RTKs e sinalizam através de proteínas efetoras incluindo PI3K, RAF cinases e Ral-GEFs.....	45
Figura 13	Patogênese do melanoma mediadas P16 e P14 mutações.....	47
Figura 14	Estrutura química da Dacarbazina.....	49

Figura 15	Via de metabolização de DTIC por P450.....	50
Figura 16	Demonstração do processo de metilação na guanina nas posições O-6 e N-7.....	51
Figura 17	Demonstração do efeito EPR.....	56
Figura 18	Representação de micropartícula (microcápsula e microesfera).....	58
Figura 19	Distância de penetração da Radioatividade.....	61
Figura 20	Esquema de decaimento do $^{99}\text{Mo}$ .....	62
Figura 21	Mecanismo de ação do Rádio-223.....	64
Figura 22	Processo de marcação das MP-DTIC.....	69
Figura 23	Esquema simplificado da reação do $^{226}\text{Ra}$ sob irradiação de nêutrons .....	70
Figura 24	Demonstração do resultado da aplicação do tumor no flanco direito.....	73
Figura 25	Demonstração da aplicação retro-orbital.....	74
Figura 26	Tamanho médio e distribuição das MP-DTIC.....	77
Figura 27	Imagem de MEV mostrando os diferentes tamanhos MP-DTIC formadas durante a microencapsulação .....	78
Figura 28	Imagem de MEV mostrando as MP-DTIC formadas após a microencapsulação com o tamanho mais frequente de 540nm .....	78
Figura 29	Fórmula do volume da circunferência.....	79
Tabela 1	Eficácia do processo de rotulagem com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ de Dacarbazina livre, micropartículas vazias e MP-DTIC .....	77
Gráfico 1	A biodistribuição das MP-DTIC, micropartículas vazias e fármaco livre em camundongos saudáveis. Todos marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .....	81
Gráfico 2	Perfil de biodistribuição em camundongos induzidos com as MP-DTIC.....	83
Figura 30	Imagem SPECT do camundongo.....	84
Gráfico 3	Resultado da citotoxicidade das micropartículas em células MV3, demonstrando a segurança das MP-DTIC para o uso em diagnóstico .....	85

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^{223}\text{RA}$	Rádio-223
$^{99}\text{MO}$	Molibdênio 99
$^{99\text{m}}\text{TC}$	Tecnécio 99 Metaestável
A	Partícula Alfa
A-MSH	A-Melanócitos
AIC	5-Aminoimidazol-4-Carboxamida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CBC	Carcinomas De Células Basais
CDK	Cyclin-Depent Kinase
CEC	Carcinomas de Células Epidermoides
CRPC	Castration-Resistant Prostate cancer
DATASUS	Sistema Informatizado Do Sistema Único De Saúde
DLS	Dynamic Light Scattering
DTIC	Dacarbazina
EPR	Enhanced Permeability And Retention
FDA	<i>Food And Drug Administration</i>
GI	Gastrointestinal
HIL-2	Interleucina-2
HMMTIC	Carbinolamina
IARC	<i>International Agency for Researchon Cancer</i>
IEN	Instituto de Engenharia Nuclear
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEK	Quinase Ativadora da Map Kinase
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MITF	Microftalmia
MM	Câncer de pele tipo Melanoma
MP	Micropartículas
MP-DTIC	Micropartículas PLA-Dacarbazina
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium

NA <sup>99M</sup> TCO4	Pertecnetato de Sódio
NMSC	Câncer de pele não Melanoma
NP	Nanopartículas
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDI	Índice de polidispersão
PI3K	Fosfoinositida-3-Quinase
PLA	Poli(Ácido Lático)
PVA	Poli(Álcool Vinílico)
RHC	Registros Hospitalares de Câncer
RTK	Tirosina Quinase
SIM	Sistema De Informação Sobre Mortalidade
SPECT	Single-Photon Emission Computed Tomography
UERJ	Universidade Estadual Do Rio De Janeiro
USP	Universidade São Paulo
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	20
1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	20
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
2.1	<b>Epidemiologia</b> .....	21
2.2	<b>Carcinogênese</b> .....	23
2.3	<b>Morfologia do sistema tegumentar</b> .....	31
2.4	<b>Câncer: melanoma (MM) e o não melanoma (NMSC)</b> .....	34
2.4.1	<u>Carcinomas de células basais (CBC)</u> .....	36
2.4.2	<u>Carcinoma epidermóides (CEC)</u> .....	38
2.4.3	<u>Melanoma maligno cutâneo</u> .....	40
2.4.3.1	Melanoma: critérios para o diagnóstico.....	41
2.4.3.2	Melanoma: vias, alterações genéticas e fatores de riscos comuns.....	43
2.4.3.3	Melanoma: tratamentos.....	47
2.4.3.4	Melanoma: dacarbazina.....	48
2.5	<b>Sistema de liberação controlada de fármacos</b> .....	52
2.6	<b>Radiofármacos</b> .....	59
2.7	<b>Terapia associada aos radiofármacos: rádio-223 (<sup>223</sup>Ra)</b> .....	62
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	66
3.1	<b>Materiais</b> .....	66
3.2	<b>Desenvolvimento das micropartículas de dacarbazina</b> .....	67
3.3	<b>Caracterização das micropartículas</b> .....	68
3.3.1	<u>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</u> .....	68
3.3.2	<u>Determinação do tamanho por DLS</u> .....	68
3.4	<b>Marcação da MP-DTIC com tecnécio-99m (<sup>99m</sup>Tc)</b> .....	69
3.5	<b>Processo de marcação com o rádio-223 (<sup>223</sup>Ra)</b> .....	70
3.5.1	<u>Preparação da solução-mãe de <sup>223</sup>Ra</u> .....	70
3.5.2	<u>Preparação de micropartículas de dacarbazina com <sup>223</sup>Ra</u> .....	71
3.6	<b>Análise in vivo</b> .....	72

3.6.1	<u>Modelos de xenoenxerto do tumor e protocolo cultivo SKMEL-37</u> .....	72
3.6.2	<u>Estudos de biodistribuição</u> .....	73
3.6.3	<u>Ensaio de citotoxicidade</u> .....	74
4.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	76
4.1	<b>Avaliação do tamanho médio das micropartículas de dacarbazina</b> .....	76
4.2	<b>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....	77
4.3	<b>Processo de marcação com o <sup>99m</sup>Tc</b> .....	79
4.4	<b>Processo de marcação com Rádio-223</b> .....	80
4.5	<b>Biodistribuição das MP-DTIC com Tecnécio-99</b> .....	80
4.6	<b>Citotoxicidade</b> .....	84
	<b>CONCLUSÃO</b> .....	86
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87
	<b>APÊNDICE - Microradiopharmaceutical for Metastatic Melanoma</b> (Artigo publicado) .....	97
	<b>ANEXO - Carta de aprovação do Comitê de ética (CEUA-UEZO)</b> .....	105

## INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças mais devastadoras no mundo e vem ao longo do tempo se tornando um epidemia global. A ausência de tratamento efetivo para a maioria dos tumores, em especial os metastáticos e inoperáveis, eleva a classificação de risco e agravos à saúde (POLLOCK et al., 2006; LO e FISHER, 2014; PARZEN et al., 2016; NASSIRIPOUR et al. 2016). É importante lembrar que câncer é uma doença caracterizada pelo desenvolvimento de anormalidades celulares, causando divisão celular, crescimento rápido e descontrolado de uma massa tumoral muitas vezes devido à processos mutagênicos. Alguns processos mutagenicos podem promover nessas células um fenótipo mais agressivo, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas. Além disso, sua origem se dá por condições multifatoriais. Esses fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover o câncer (DEVITA et al., 2005; WEINBERG, 2008; LO e FISHER, 2014; DUNGA et al., 2015; NEAGU et al., 2016).

A carcinogênese é um processo de múltiplos passos envolvendo mutações e seleção de células que apresentam capacidade aumentada para proliferação, sobrevivência, invasão e metástase (WEINBERG, 2008; LO e FISHER, 2014; NEAGU et al., 2016; SCHNEIDE et al., 2017). A carcinogênese inicia-se com uma alteração genética que muitas vezes acomete genes que são responsáveis pelo controle da proliferação celular assim, essas mutações levam à proliferação anormal de uma única célula. As células que compõem a massa tumoral tornam-se cada vez mais heterogêneas pois mutações adicionais somam-se à primeira (RANG et al., 2004; WEINBERG, 2008; NEAGU et al., 2016; SCHNEIDE et al., 2017). Essas mutações podem iniciar-se de forma espontânea ou induzida pela ação de agentes carcinogênicos. O acúmulo de anormalidades genéticas tem sido descrito como um fator responsável pelo desenvolvimento e progressão neoplásica (WEINBERG, 2008; LO e FISHER, 2014; NEAGU et al., 2016; SCHNEIDE et al., 2017).

O câncer é responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo, com uma taxa anual de óbito de mais de 7 milhões de pessoas (STEWART, 2014; SIEGEL, 2015). A expectativa de vida mundial tem se elevado gradativamente e, associado à transformação nas relações entre as pessoas e seu ambiente, trouxe uma alteração importante no perfil de morbimortalidade, diminuindo a ocorrência das doenças infectocontagiosas e colocando as doenças crônico-degenerativas como novo centro da atenção (DEVITA et al., 2005; STEWART, 2014; SIEGEL, 2015).

As neoplasias relacionadas à pele são as mais comuns no Brasil e representam uma parcela importante nos diagnósticos de câncer segundo o INCA. Ainda de acordo com o INCA, são estimados 181.430 novos casos no Brasil em 2016. Embora o câncer de pele seja o tipo de câncer mais frequente, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados, quando detectado precocemente este tipo de câncer apresenta altos índices de cura. Porém, os tipos de cânceres de pele não melanoma apresentam uma letalidade considerada baixa. Em alguns casos, devido ao diagnóstico tardio, o câncer de pele pode levar a ulcerações e deformidades físicas graves, metástases e ao óbito (LO e FISHER, 2014; BRASIL, 2016, NASSIRIPOUR et al. 2016; KEMP et al., 2017).

São dois tipos conhecidos de câncer de pele, os não-melanoma que são constituídos pelos carcinomas de células basais e carcinomas de células escamosas, e os melanomas, que possuem origem nos melanócitos (DEVITA et al., 2005, POLLOCK et al., 2006; FRANSEN et al.; 2012; LO e FISHER, 2014; BISWAS, et al., 2015; NASSIRIPOUR et al. 2016).

Atualmente, o melanoma maligno cutâneo está sendo descrito como uma das neoplasias mais agressivas e letais, e sua incidência é crescente (POLLOCK et al., 2006; SOYER et al., 2012; LO e FISHER, 2014; BISWAS, et al., 2015). Trata-se de uma forma grave de câncer cutâneo caracterizada como uma neoplasia invasiva devido aos elevados índices de metástases, com poucos tratamentos efetivos para os pacientes portadores dessa doença (DEVITA et al., 2005; LIN e FISHER, 2007; LO e FISHER, 2014).

Existem poucas alternativas terapêuticas para o tratamento do melanoma cutâneo e os únicos fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento do melanoma avançado eram a

Dacarbazina (DTIC) e altas doses de interleucina-2 (IL-2), ambos com taxas de resposta entre 10-20%. Até recentemente, nenhum dos agentes usados para o tratamento do melanoma demonstraram um aumento na sobrevida global, salientando a necessidade de novos agentes (KIRKWOOD et al. 1997; DEVITA et al., 2005; LANG et al, 2005 POLLOCK et al., 2006; LO e FISHER, 2014; XIN et al., 2016).

O principal e mais ativo quimioterápico no tratamento do melanoma é representado pela Dacarbazina. Descrita quimicamente como 5-(3,3-dimetil-1-triazeno)-imidazol-4-carboxamida, a DTIC é considerada o agente mais efetivo em regimes de monoterapia no tratamento do melanoma metastático. Por muitos anos, a DTIC vem sido utilizada como uma das poucas formas de terapia contra o melanoma. Trata-se de um agente alquilante, triazeno, que tem como principal alvo o ciclo celular (DEVITA et al., 2005; CHABNER et al. 2006; POLLOCK et al., 2006; LO e FISHER, 2014; XIN et al., 2016).

A terapia antineoplásica apresenta limitações severa e muitas das vezes incapacitante de continuidade do tratamento. Dentre essas limitações e incapacidades, destacam-se os efeitos adversos. No caso da Dacarbazina, observa-se mielossupressão, náuseas e vômitos, os quais limitam o uso do quimioterápico, com mais de 90% dos pacientes sendo afetados com algum desses sintomas em esquema inicial de uso (POLLOCK et al., 2006; ANVISA, 2011; HERSH et al., 2015; WILSON e SCHUCHTER, 2016). Outros efeitos adversos se destacam, tais como a leucopenia; uma forma severa de mielossupressão, que representa um grave risco ao paciente predispondo-o às infecções, devido a diminuição da imunidade celular e humoral (DEVITA et al., 2005; POLLOCK et al., 2006; CHABNER et al. 2006; LECCIA et al., 2013; HERSH et al., 2015; WILSON e SCHUCHTER, 2016).

Nos últimos anos a eficiência da terapia antineoplásica se tornou questionável em algumas situações, porém a nanobiotecnologia iniciou uma nova era, por meio de algumas conquistas animadoras. As nanopartículas se sedimentaram como sistemas de liberação de fármacos e ferramentas para obtenção de imagens que fornecem novos caminhos para o diagnóstico e tratamento do câncer (LIU et al. 2007; OLIVEIRA, 2012; MAFFIOL et al., 2015; TIAN et al, 2017).

A nanotecnologia pode ser usada com o objetivo de minimizar os efeitos adversos relacionados aos fármacos, assim como aumentar a seletividade e a eficácia dos mesmos na terapia. Diversos sistemas de distribuição de fármacos têm sido desenvolvidos com essa finalidade, tais como: micropartículas poliméricas, micelas, nanopartículas magnéticas entre outros. (YUN et al., 2004; CHO et al., 2008; SANTOS-OLIVEIRA, 2011; MELO et al., 2012; OLIVEIRA, 2012; MAFFIOL et al., 2015; TIAN et al., 2017).

As atividades utilizando nanopartículas ou micropartículas radiomarcadas podem ser denominadas "radionanomedicina" (SANTOS-OLIVEIRA, 2010; GIJS et al., 2016; TIAN et al., 2017). O foco desta área tem sido o desenvolvimento de nanoplataformas multifuncionais para melhorar a eficiência da terapia ou diagnóstico (SANTOS-OLIVEIRA, 2010; HOBBS et al., 2012; PARKER et al., 2013; SGOUROS; HOBBS; ABOU, 2014; GIJS et al., 2016). Tais compostos multifuncionais podem fornecer múltiplos ligantes para o câncer (melhorando a especificidade do alvo), radionuclídeos terapêuticos ou medicamentos terapêuticos (para terapia) e radionuclídeos diagnósticos simultaneamente (SANTOS-OLIVEIRA, 2010; VALLABHAJOSULA, 2010; HOBBS; ABOU, 2014; GIJS et al., 2016; TIAN et al., 2017).

A utilização de radiofármacos para processos de imagem para diagnóstico permite o mapeamento tecidual, em função da fisiologia e da atividade metabólica. Sendo assim, é possível reunir informações mais específicas sobre a fisiologia do órgão e possíveis disfunções. As baixas doses utilizadas do radiofármaco garantem imagens da morfologia funcional do órgão de uma maneira não invasiva e de altíssima sensibilidade. Por isso, esse tipo de procedimento possui um papel importante no diagnóstico de diversas doenças, com especial enfoque para doenças oncológicas, neurológicas ou cardíacas (SANTOS-OLIVEIRA, 2010; VALLABHAJOSULA, 2010; JOSEFSEN e BOYLE, 2012; TIAN et al., 2017). Além disso, os radiofármacos podem ser utilizados na terapia dos tumores, por intermédio do acoplamento de radionuclídeos emissores *alfa* ( $\alpha$ ) e *beta* ( $\beta$ ), que são conhecidas formas de decaimento radioativo. As emissões *alfas* ocorrem quando um núcleo atômico instável emite uma partícula *alfa*

transformando-se em outro no seu processo de decaimento. No caso dos emissores *beta*, ocorre de forma diferente, são elétrons de alta energia ou pósitrons emitidos de núcleos atômicos emitidos durante seu decaimento (ERCAN e CAGLAR, 2000; HOBBS et al., 2012; MAFFIOL et al., 2015).

Recentemente, uma nova classe de medicamentos vem associando diagnóstico à terapia, os chamados teragnósticos. Nesse segmento, os radiofármacos se destacam devido às suas características singulares, possuem a capacidade de serem conjugados à diversos radionuclídeos para as mais variadas funções e alvos terapêuticos (SANTOS-OLIVEIRA, 2010; HOBBS et al., 2012; JOSEFSEN e BOYLE, 2012; MAFFIOL et al., 2015; TIAN et al., 2017). Para diagnosticar patologias utiliza-se na composição dos radiofármacos, radionuclídeos emissores de radiação gama. Devido ao seu alto poder de penetrabilidade nos tecidos e baixo poder de ionização quando comparada às radiações particuladas *alfa* ( $\alpha$ ) e *beta* ( $\beta$ ). Radionuclídeos emissores de radiação gama, tais como o tecnécio-99m, iodo-123, galio-67 e o tálio-201, são utilizados na composição de radiofármacos para diagnóstico.

Em relação a finalidade terapêutica, os efeitos nocivos da radiação são utilizados para destruir células tumorais (HOBBS et al., 2012; PARKER et al., 2013; SGOUROS; HOBBS; ABOU, 2014; GIJS et al., 2016; TIAN et al., 2017). Nesse caso, os radiofármacos são compostos por radionuclídeos emissores de radiação  $\alpha$  ou  $\beta^-$ , que possuem pequeno poder de penetração mas são altamente energéticas, ionizando o meio que atravessam e causando uma série de efeitos que resultam na destruição celular do tecido (PARKER et al., 2013; PANDIT-TASKAR; LARSON; CARRASQUILLO, 2013; GIJS et al., 2016 TIAN et al., 2017). Podem ser utilizados radionuclídeos para terapia, tais como: Iodo-131, Ítrio-90, Lutécio-177, Rênio-188, Rádio-223, Estrôncio-90 e o Samário-153, entre outros, sendo o Rádio-223 o emissor alfa de maior aceitação e praticidade de uso (PARKER et al., 2013; PANDIT-TASKAR; LARSON; CARRASQUILLO, 2013; TIAN et al., 2017).

Em 2004, Cao et al usaram  $^{188}\text{Re}$  na sua superfície de nanopartículas de magnetita revestida com sílica imobilizadas com histidina. Em 2007, Cai et al, marcaram quantum dot (QD) com Cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ) com conjugação de peptídeos DOTA e RGD. O conjugado  $^{64}\text{Cu}$ -DOTA-QD-RGD demonstrou um

melhor direcionamento ao tumor do que o conjugado sem os peptídeos. Em 2011, Zhang et al desenvolveu uma partícula revestida com polietileno glicol assim como micelas poliméricas reticuladas, conjugadas com Anexina A5 marcada com  $^{111}\text{In}$  para SPECT e NIRF.

Diante de tal cenário, torna-se clara a necessidade de estudos que busquem o desenvolvimento de novas opções de tratamentos mais eficazes do combate ao câncer de pele do tipo melanoma, baseados no uso da combinação de drogas existentes às micropartículas e radiofármacos. Uma alternativa promissora para redução dos problemas causados pela terapia antineoplásica é a utilização radioisótopos acoplados à micropartículas, denominados de microrradiofármacos (RAWAT, 2006; OLIVEIRA et al., 2006; SANTOS-OLIVEIRA, 2011; AKHTER et al., 2013; MAFFIOL et al., 2015).

## **1 OBJETIVOS**

### **1.1 Objetivo geral**

Desenvolver, caracterizar e avaliar a aplicação de uma microesfera de PLA conjugada com Dacarbazina, marcados com Tecnécio-99m e Rádio-223, como dispositivo para liberação local e controlada de fármacos para o câncer de pele.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Obtenção de microesferas de PLA contendo Dacarbazina através do método de dupla emulsificação;
- Caracterização das microesferas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espalhamento Dinâmico de Luz (DLS);
- Desenvolvimento de processo de radiomarcção das partículas com desenvolvidas com tecnécio-99m;
- Desenvolvimento de processo de radiomarcção das partículas com desenvolvidas com Rádio-223;
- Avaliação do perfil de biodistribuição do radiofármaco em animais sadios e induzidos com melanoma através de um estudo in vivo;
- Avaliação da citotoxicidade do radiofármaco através do ensaio de MTT;
- Avaliação da qualidade de marcação pelo processo de cromatografia em papel;

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Epidemiologia

A Organização Mundial da Saúde (OMS) através da *International Agency for Researchon Cancer* (IARC) elaborou o documento conhecido como *World Cancer Report 2014*, e com base nele é inquestionável que o câncer seja visto como um problema de saúde pública mundial, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado mais de 20 milhões de casos novos dessas doenças para 2025 (FERLAY, 2012; STEWART, 2014).

A OMS apontou ainda, que, dos 14 milhões de casos novos estimado para 2020, mais de 60% ocorrerão em países em desenvolvimento. Para a mortalidade, a situação agrava-se quando se constata que dos 8 milhões de óbitos previstos; mais de 70% ocorrerão nesses mesmos países (FERLAY, 2012; SIEGEL, 2015; MEHTA e DUTT, 2016).

A incidência do câncer continuará em crescimento nos países em desenvolvimento (FERLAY, 2012; BRASIL, 2014; SIEGEL, 2015), levando a necessidade de se programar medidas preventivas de forma ampla e contumaz, de modo a coibir o surgimento de novos casos (POLLOCK et al., 2006; BRASIL, 2014; SIEGEL, 2015). Nas últimas três décadas, houve um crescimento acentuado nos casos de câncer pelo mundo, com a duplicação do número de casos. Não obstante, as estimativas de incidência e prevalência para as próximas duas décadas preocupam especialistas (WHO, 2008). Assim, nos últimos anos, esse tema ganhou uma dimensão drástica, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública, despertando o interesse urgente na pesquisa para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral.

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA) a estimativa para o ano de 2016, que será válida também para o ano de 2017, aponta para a ocorrência de aproximadamente 600 mil casos novos de câncer (BRASIL, 2016). Estimativas demonstram ainda que em 2030, a carga global será de aproximadamente 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da

população (BRASIL, 2016). O contínuo crescimento populacional, a elevação na expectativa de vida mundial, juntamente com aumento da sobrevivência de pacientes resultaram no incremento na carga global. Esse impacto recaiu principalmente sobre os países economicamente emergentes (BRASIL, 2011; STEWART, 2014. SINGEL et al., 2015).

Figura 1 Estimativas para o ano de 2016 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	61.200	61,82	13.940	64,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.960	56,20	18.990	79,37
Colo do Útero	-	-	-	-	16.340	15,85	4.550	19,07
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	17,49	4.430	20,59	10.890	10,54	3.230	13,49
Cólon e Reto	16.660	16,84	5.560	25,80	17.620	17,10	6.210	25,95
Estômago	12.920	13,04	3.130	14,54	7.600	7,37	2.180	9,07
Cavidade Oral	11.140	11,27	2.780	12,95	4.350	4,21	1.230	5,04
Laringe	6.360	6,43	1.600	7,50	990	0,94	320	0,97
Bexiga	7.200	7,26	2.110	9,79	2.470	2,39	830	3,21
Esôfago	7.950	8,04	1.460	6,75	2.860	2,76	610	2,27
Ovário	-	-	-	-	6.150	5,95	2.170	8,92
Linfoma de Hodgkin	1.460	1,46	450	1,74	1.010	0,93	400	1,33
Linfoma não Hodgkin	5.210	5,27	1.550	7,15	5.030	4,88	1.670	7,02
Glândula Tireoide	1.090	1,08	350	1,27	5.870	5,70	1.800	7,46
Sistema Nervoso Central	5.440	5,50	1.290	5,86	4.830	4,68	1.250	5,20
Leucemias	5.540	5,63	1.370	6,38	4.530	4,38	1.180	4,88
Corpo do Útero	-	-	-	-	6.950	6,74	2.530	10,47
Pele Melanoma	3.000	3,03	840	3,86	2.670	2,59	740	2,96
Outras Localizações	51.850	52,38	11.890	55,45	47.840	46,36	11.820	49,33
Subtotal	214.350	216,48	52.750	245,63	205.960	199,57	61.710	257,55
Pele não Melanoma	80.850	81,66	17.370	80,90	94.910	91,98	21.910	91,65
Todas as Neoplasias	295.200	298,13	70.120	326,51	300.870	291,54	83.620	348,99

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: BRASIL, 2016.

No Brasil, o câncer de pele não melanoma continua sendo o tumor mais incidente em ambos os sexos, correspondendo a cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados no país. Esse tipo de tumor apresenta altos percentuais de cura, se for detectado precocemente e conseqüentemente, apresenta uma baixa mortalidade (BRASIL, 2016).

De acordo com o INCA, uma estimativa de 175.760, sendo 80.850 homens e 94.910 mulheres serão acometidos por câncer de pele. Infelizmente, mesmo possuindo uma baixa letalidade de acordo com o Sistema de Informação Sobre Mortalidade (SIM) estima-se pelo menos 1.769 óbitos, sendo 1.000 homens e 769 mulheres (BRASIL, 2016). Porém, é provável que exista um sub-registro dessa neoplasia em função do subdiagnóstico, podendo assim subestimar as taxas de incidência e os números esperados de casos novos (POLLOCK et al., 2006; STEWART, 2014; BRASIL, 2016).

O câncer de pele é mais comum em pessoas com mais de 40 anos, sendo relativamente raro em crianças e negros, com exceção daqueles que são portadores de doenças cutâneas prévias (POLLOCK et al., 2006; SIEGEL, 2015; BRASIL, 2016).

Embora o câncer de pele seja o tipo de câncer mais frequente no Brasil, o melanoma representa apenas 5% das neoplasias malignas (BRASIL, 2016). As estimativas do INCA são de 5.670 novos casos, sendo 3.000 homens e 2.670 mulheres (BRASIL, 2016). Apesar de ser o mais grave devido à sua alta possibilidade de metástase, o prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom, se detectado nos estágios iniciais (precocemente) (SIEGEL, 2015; BRASIL 2016). Nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com melanoma, principalmente devido à detecção precoce do tumor.

## 2.2 Carcinogênese

A atividade normal da célula depende da perfeita harmonia citológica, histológica e funcional (DEVITA et al., 2005; WEINBERG, 2008; WU e ZHAO, 2013; NEAGU et al., 2016; WALCZAK et al. 2017). Porém, são conhecidas falhas nos mecanismos que regulam esses processos, gerando anormalidades celulares e genéticas, que podem ser responsáveis pelo surgimento do tumor (WEINBERG, 2008; QUEIROZ, 2016).

A proliferação celular é dependente de necessidades fisiológicas específicas, tratando-se de um processo meticulosamente regulado

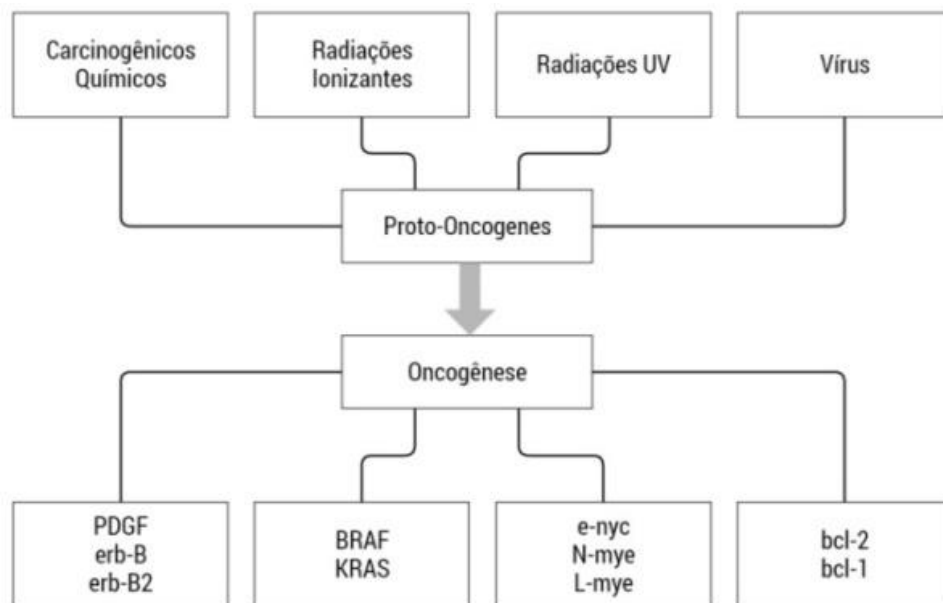
(WEINBERG, 2008, WU e ZHAO, 2013; TRETAKOVA e GROEHLER, 2015; WALCZAK et al. 2017). Essa proliferação envolve o aumento da massa celular, duplicação do ácido desoxirribonucléico (ADN) e a divisão física da célula em duas células filhas com o mesmo material genético (DEVITA et al., 2005; WEINBERG, 2008; WU e ZHAO, 2013; NEAGU et al., 2016; WALCZAK et al. 2017). As restrições ao processo de mitose são impostas por estímulos reguladores que agem diretamente sobre a superfície celular, os quais podem resultar no aumento ou redução da disponibilidade de certos fatores de crescimento, que juntamente aos hormônios ou neurotransmissores mantêm o controle do ciclo celular (DEVITA et al., 2005; WEINBERG, 2008; WU e ZHAO, 2013; TRETAKOVA e GROEHLER, 2015; WALCZAK et al. 2017).

Fatores externos podem colaborar para o desenvolvimento do processo de carcinogênese, com a exposição crescente dos indivíduos a agentes químicos, físicos e biológicos que, dependendo de suas características, podem ser potencialmente carcinogênicos. Outras variantes são os fatores intrínsecos, tais como mutações hereditárias, alterações hormonais ou condições imunológicas, refletindo em uma parcela importante, no algoritmo da carcinogênese (DEVITA et al., 2005; WEINBERG, 2008; WU e ZHAO, 2013; WALCZAK et al. 2017; CARDIS e BHAWAN, 2017). Todos esses fatores podem agir em conjunto ou isoladamente para o desenvolvimento do câncer (WEINBERG, 2008; WU e ZHAO, 2013; NOHMI et al., 2017).

Os proto-oncogenes são genes relacionados com o crescimento, diferenciação e proliferação celular normal. Codificam fatores de crescimento, receptores de membrana e proteínas de ligação do DNA. Os oncogenes são proto-oncogenes ativados. Sua ativação é desencadeada através de alterações genéticas, tais como: i) Translocações e inversões, ii) Deleções iii) Amplificações iv) Mutações puntiformes e v) Inserção de DNA viral (WEINBERG, 2008; WU e ZHAO, 2013; QUEIROZ, 2016; WALCZAK et al. 2017). Uma vez alterado o proto-oncogene, se transforma em oncogene, amplificando a produção de proteínas que estimulam a divisão celular, inibem a diferenciação e a morte celular, e originam células cancerosas imortalizadas. (WEINBERG, 2008; KUMAR, 2010; WU e ZHAO, 2013; QUEIROZ, 2016; NOHMI et al., 2017).

A expressão descontrolada subverte a conservada capacidade de estabilidade genômica, e a esse processo chamamos de Carcinogênese ou Oncogênese. Esse processo ocorre de forma gradual podendo levar anos para a formação do tumor de forma visível (CASSALI et al., 2004; DEVITA et al., 2005; WEINBERG, 2008; NEAGU et al., 2016; WALCZAK et al., 2017).

Figura 2 - Esquema de ativação dos Proto-Oncogenes



Fonte: O Autor, 2017.

A carcinogênese é um processo lento e complexo que ocorre fundamentalmente em três etapas: iniciação, promoção e progressão (DEVITA et al., 2005; WEINBERG, 2008; KUMAR, 2010; QUEIROZ, 2016, WALCZAK et al. 2017).

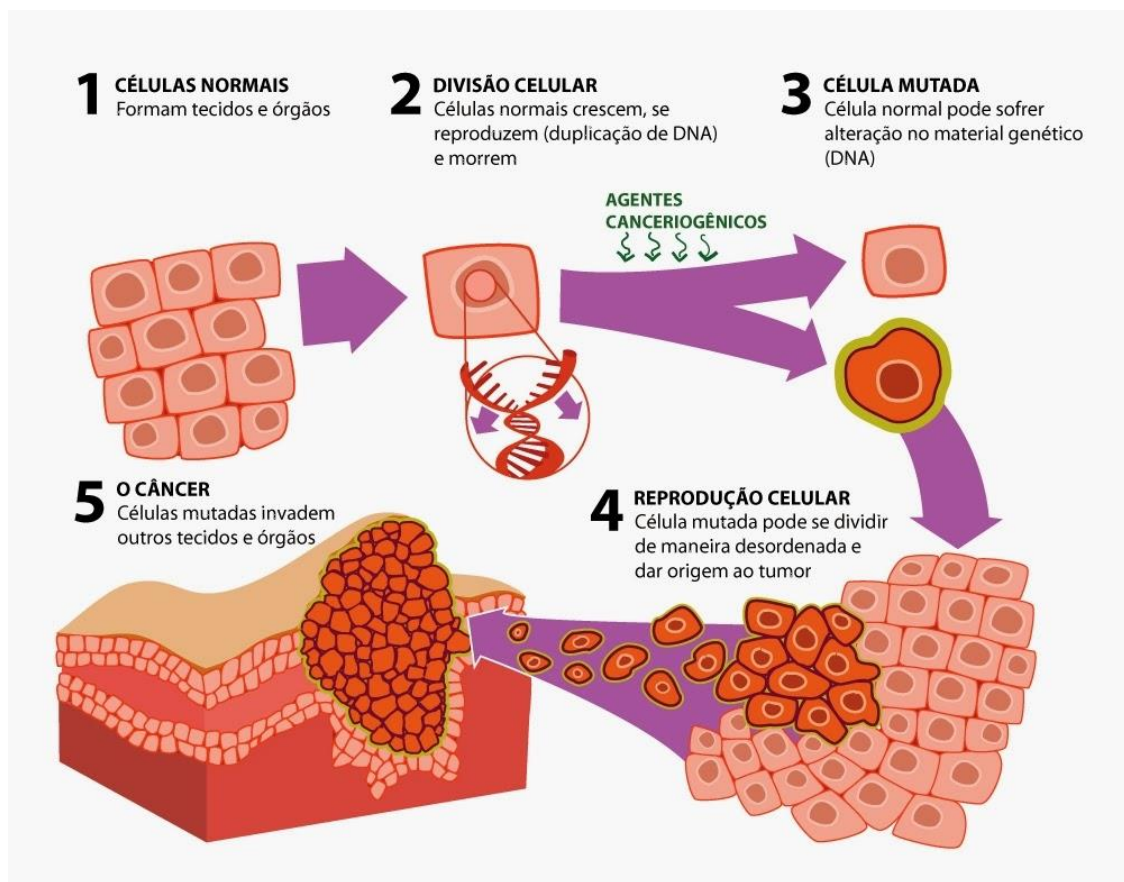
O estágio inicial é caracterizado por uma série de mutações cumulativas no material genético, que predispõe células normais à evolução maligna e imortalidade. É o primeiro estágio onde acontece o dano na estrutura genética de forma irreversível. Nesta fase as células se encontram, geneticamente alteradas, porém ainda não é possível se detectar um tumor, clinicamente. As alterações podem ser decorrentes de uma lesão genética não letal, que pode ocorrer espontaneamente ou pela exposição a agentes ambientais, como

agentes químicos, físicos ou biológicos (DEVITA et al., 2005; WEINBERG, 2008; WU e ZHAO, 2013; WALCZAK et al. 2017; NOHMI et al., 2017).

A promoção, segunda etapa da carcinogênese, é marcada pela proliferação da célula mutada, bem como o aumento do processo clonal (WEINBERG, 2008; WU e ZHAO, 2013; QUEIROZ, 2016; WALCZAK et al. 2017). Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato com agentes promotores muitas vezes interrompe o processo nesse estágio. Alguns componentes da alimentação e a exposição excessiva ou prolongada a hormônios, são exemplos de fatores que promovem a transformação de células iniciadas, em malignas. A tendência é que existam proliferações, muitas vezes, associadas a alterações que bloqueiam a morte celular, permitindo que as células normais circundantes morram e as células tumorais sobrevivam, iniciando um processo de neovascularização, por meio do VEGF (DEVITA et al., 2005; WEINBERG, 2008; WU e ZHAO, 2013; QUEIROZ, 2016; WALCZAK et al. 2017).

A progressão, por sua vez, é conhecida como o terceiro e último estágio, e se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. Nesse estágio o câncer já está instalado, evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (WEINBERG, 2008; WU e ZHAO, 2013; QUEIROZ, 2016). Durante esse processo, outras alterações no genoma podem ocorrer, incluindo a ativação de oncogênese e a perda funcional completa dos genes supressores de tumores (DEVITA et al., 2005; WEINBERG, 2008, QUEIROZ, 2016; WALCZAK et al. 2017; NOHMI et al., 2017). É nesse momento que as células tumorais fazem a invasão, iniciando pelo tecido conjuntivo envolvente e depois os vasos, com possibilidade de metástase (WU e ZHAO, 2013; QUEIROZ, 2016; WALCZAK et al. 2017).

Figura 3 - Etapas da carcinogênese



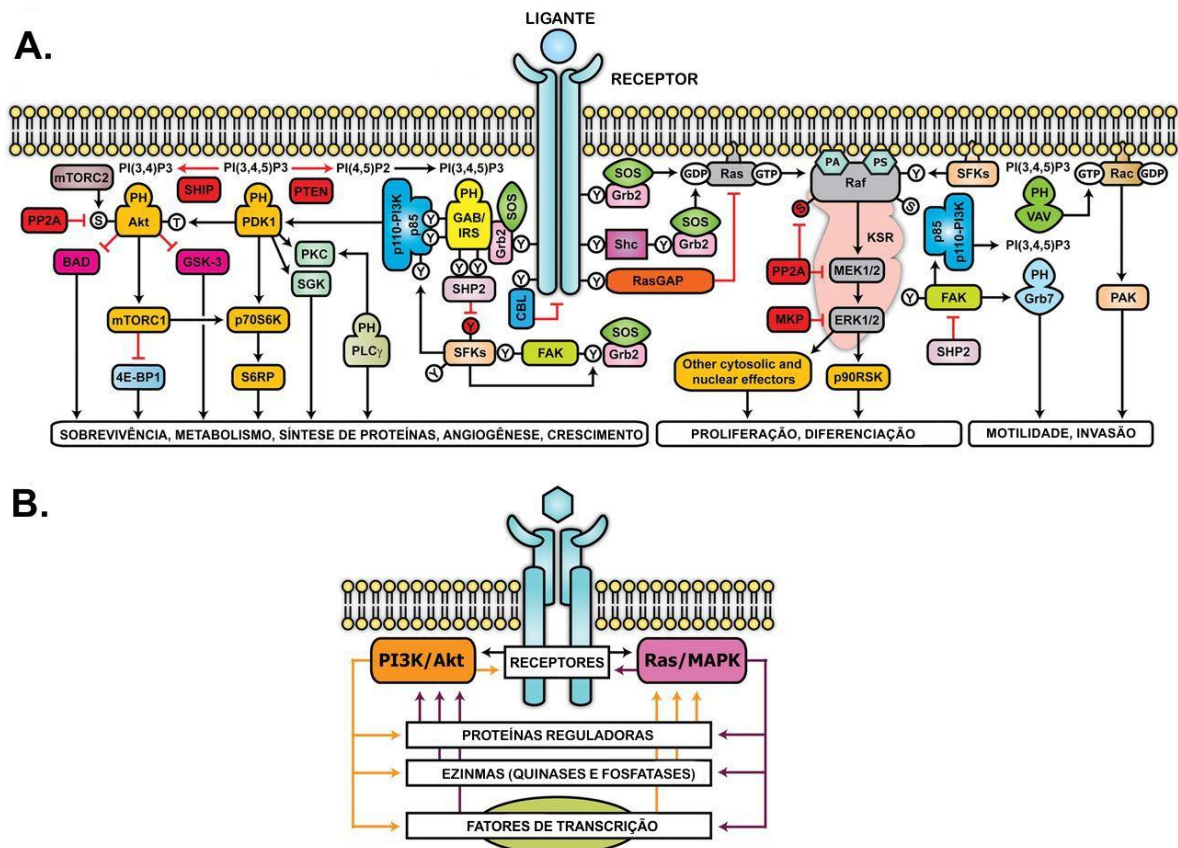
Fonte: QUEIROZ, 2016.

Os mecanismos que regulam o contato e a permanência, bem como os de controle do seu crescimento, são de extrema importância para a manutenção celular e impedimento do crescimento celular. Contudo, falhas nesse processo, impedem esse controle. Dentre os controles para o impedimento do crescimento tumoral, destaca-se a apoptose, como sendo um dos principais mecanismos responsáveis pelo controle da carcinogênese (WEINBERG, 2008; KUMAR, 2010; WU e ZHAO, 2013; NOHMI et al., 2017; WALCZAK et al. 2017).

Um comportamento anormal das vias de sinalização, podem afetar a progressão do ciclo celular e controle da apoptose. Fatores de crescimento e mitógenos usam a cascata de sinalização RAS / RAF / MEK / ERK para transmitir sinais de seus receptores, para regular a expressão gênica e

prevenir a apoptose. Falhas nesses mecanismos, eventualmente, contribuem para o desenvolvimento de diversos tipos de neoplasias (WEINBERG, 2008; WALCZAK et al. 2017; SAIDAK et al., 2017; SCHREUER et al., 2017; FRANKEL et al., 2017). As mutações também ocorrem em genes que codificam receptores como EGFR e FLT-3 ou em translocações cromossômicas, que transmitem os seus sinais através destas cascatas. Assim, mesmo na ausência de mutações genéticas, estas vias têm sido relatadas como ativas em diversos tipos de neoplasias. As vias RAS / RAF / MEK / ERK e RAS / PI3K / PTEN / AKT interagem entre si para regular o crescimento e, em alguns casos, a tumorigênese (WEINBERG, 2008; KUMAR, 2010; QUEIROZ, 2016, WALCZAK et al. 2017 SAIDAK et al., 2017; SCHREUER et al., 2017; FRANKEL et al., 2017).

Figura 4 - Ativação de várias vias e receptores com suas interações em conjunto com suas funções celulares

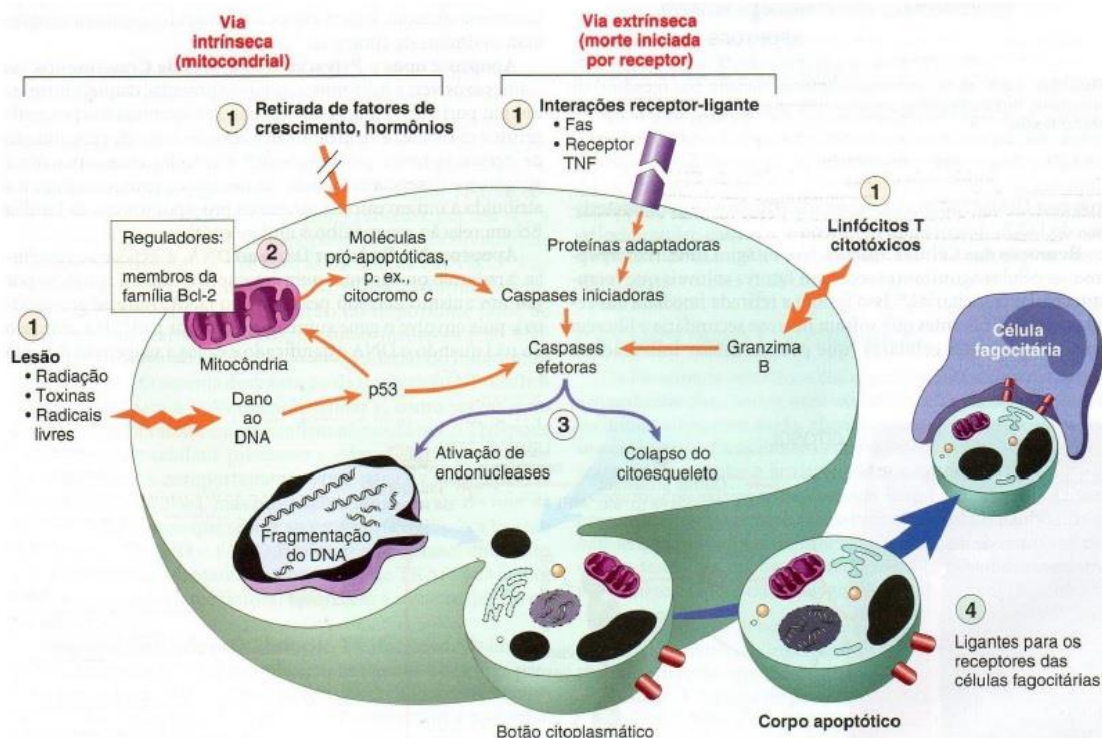


Legenda: (A). Esquemático da via PI3K / AKT e sinalização celulares vias RAS / MAPK. (B). As vias de sinalização PI3K / AKT e RAS / MAPK podem se influenciar mutuamente.

Fonte: AKSAMITIENE, KIYATKIN E KHOLODENKO, 2012.

Embora, todos os mecanismos envolvidos no processo de apoptose não tenham sido elucidados, vários sensores de anormalidades celulares foram localizados, os quais desempenham um papel chave na inicialização do tumor (TIWARI et al., 2015; QUEIROZ, 2016, SAIDAK et al., 2017 NOHMI et al., 2017; FRANKEL et al., 2017). Um dos sensores de danos no ADN que funcionam através da expressão do gene supressor de tumor é conhecido como TP53 que responde às quebras no ADN e outras anormalidades cromossômicas, induzindo um desencadeamento da expressão de proteínas Puma-BH3, responsáveis pelo início da apoptose (KUMAR, 2010; WU e ZHAO, 2013; QUEIROZ, 2016, SAIDAK et al., 2017; NOHMI et al., 2017; WALCZAK et al. 2017).

Figura 5 - Via intrínseca e extrínseca da apoptose



Fonte: QUEIROZ, 2016.

A TP53 possui muitos mecanismos e funções anticancerígena, desempenhando um papel fundamental na apoptose, na estabilidade do

genoma e na inibição da angiogênese (WU e ZHAO, 2013; TRETAKOVA e GROEHLER, 2015; TIWARI et al., 2015; QUEIROZ, 2016, SAIDAK et al., 2017; SCHREUER et al., 2017). Dentre suas funções, destaca-se a verificação eventual na ocorrência de alguma mutação na sequência do ADN, com posterior formação de mitose e conseguinte divisão celular (WU e ZHAO, 2013; QUEIROZ, 2016; FRANKEL et al., 2017; SUCHÁNKOVÁ et al., 2017). Não obstante a TP53 atua ainda, induzindo o processo de apoptose por meio do processo conhecido como senescência celular (WEINBERG, 2008; QUEIROZ, 2016; SUCHÁNKOVÁ et al., 2017).

As células tumorais aplicam uma variedade de estratégias para neutralizar o mecanismo de apoptose, o mais comum é a perda da função supressora de tumores do gene TP53 (LASITHIOTAKI et al., 2013; QUEIROZ, 2016; SUCHÁNKOVÁ et al., 2017). Os tumores de forma intermitente, podem aumentar a expressão de reguladores anti-apoptóticos como as proteínas Bcl-2 e/ou Bcl-xL, ou enviando sinais de sobrevivência através da IGF-1, ou reduzindo a expressão de fatores pró-apoptóticos como Bax, Bim Puma (LASITHIOTAKI et al., 2013; KEMP et al., 2017). Acredita-se que a variedade de mecanismos para evitar a apoptose reflita a diversidade de sinais indutores de apoptose que as populações de células cancerígenas encontram durante a sua evolução para o estado maligno (WEINBERG, 2008; TIWARI et al., 2015 QUEIROZ, 2016; NOHMI et al., 2017; WALCZAK et al. 2017).

Um número crescente de genes tem sido identificado como capazes de induzir positivamente ou negativamente o processo de apoptose. Entre eles destaca-se a família das proteínas Bcl-2, que desempenha papel fundamental na regulação do processo em condições fisiológicas (LASITHIOTAKI et al., 2013; TIWARI et al., 2015; KEMP et al., 2017). Os principais antagonistas da apoptose dessa família são as Bcl-2 e Bcl-XL, presentes nas membranas mitocôndrias. Tanto o Bcl-2 como Bcl-XL atuam inibindo a apoptose, uma vez que previnem a liberação do citocromo C (GRIVICICH et al., 2007; LASITHIOTAKI et al., 2013; TIWARI et al., 2015; FRANKEL et al., 2017). Recentemente, demonstrou-se que a Bcl-2 bloqueia a penetração nuclear de granzima (LASITHIOTAKI et al., 2013; TIWARI et al., 2015; NOHMI et al., 2017; WALCZAK et al. 2017).

Os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 são normalmente encontrados no citosol e quando ativados, deslocam-se para a mitocôndria, alterando a permeabilidade da membrana da organela, permitindo o extravasamento de proteínas pró-apoptóticas, tais como: DNase, pró-caspases, citocromo-C e/ou os fatores indutores de apoptose (WEINBERG, 2008; WU e ZHAO, 2013; LASITHIOTAKI et al., 2013; TIWARI et al., 2015; WALCZAK et al. 2017).

### **2.3 Morfologia do sistema tegumentar**

A pele é o revestimento externo do corpo sendo o maior órgão do corpo humano. Funciona como um órgão de revestimento corporal que exerce o papel de barreira, entre o organismo e o ambiente, portanto, funciona como interface entre o organismo e o ambiente. Esse papel exige do órgão funções de transições complexas e específicas, e está sujeito aos mais variados tipos de lesões, provocadas por agentes externos de origens variadas, tais como, agentes químicos, físicos ou mecânicos (SBD, 2009, DIEPGEN et al, 2012; STEWART; AJAO; IHUNWO, 2013).

O tecido epitelial, considerado órgão integrante do sistema tegumentar, tem como funções principais a proteção dos tecidos subjacentes, regulação da temperatura somática, reserva de nutrientes e ainda, conter terminações nervosas sensitivas, desempenhando a função inclusive de proteção contra o calor, a luz e aos agentes infecciosos (SBD, 2009, DIEPGEN et al, 2012; SIRE; DONOGHUE; VICKARYOUS, 2009).

O sistema tegumentar é formado três camadas bem unidas: i) epiderme; ii) derme e iii) hipoderme. Todas são importantes para o corpo, e cada uma tem características e funções bem distintas. A epiderme tem como principal função formar uma barreira protetora do corpo, protegendo contra danos externos, consistindo basicamente em um epitélio pavimentoso estratificado e queratinizado, de origem ectodérmica. As células basais da epiderme dão origem aos queratinócitos, também chamadas células escamosas, que produzem queratina, onde se encontram ainda os melanócitos, responsáveis

pela produção da melanina; o pigmento que dá cor à pele e cuja função é proteger as camadas mais profundas da pele contra os efeitos nocivos da radiação solar (POLLOCK et al., 2006; SBD, 2009; DIEPGEN et al, 2012; STEWART; AJAO; IHUNWO, 2013).

A derme é a camada intermediária da pele, localizada logo abaixo da epiderme, sendo responsável por sua sustentação. Essa camada também é a responsável pela resistência e elasticidade da pele; as substâncias como o colagênio e a elastina, que conferem caráter elástico à pele, estão aqui localizadas (HIERONYMUS et al., 2009; DIEPGEN et al, 2012; STEWART; AJAO; IHUNWO, 2013). É constituída por elementos fibrilares e outros elementos da matriz extracelular tais como: proteínas estruturais, glicosaminoglicanos, íons e água de solvatação. A derme pode ser fragmentada em outras duas camadas: a camada papilar, em contato com a epiderme, formada por tecido conjuntivo frouxo, e logo abaixo dela a camada reticular, constituída de tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam as fibras colagenosas. É na derme que se localizam os vasos sanguíneos, que nutrem a epiderme, vasos linfáticos e também os nervos e os órgãos sensoriais a eles associados conhecidos como mecanorreceptores (DIEPGEN et al, 2012; STEWART; AJAO; IHUNWO, 2013). Dentre os macanorreceptores, destacam-se os corpúsculos de Pacini, Meissner e Krause.

O corpúsculo de Pacini ou também corpúsculo lamelar, se encontra no tecido conjuntivo, tanto na derme, como nas vísceras e nas articulações. Estes receptores respondem à deformação nas suas camadas de proteção, causadas por uma pressão sobre o órgão onde estão localizados, capazes de detectar vibrações nas faixas de 30 – 800 Hz (HIRST; SAFINYA, 2004; DIEPGEN et al, 2012; STEWART; AJAO; IHUNWO, 2013)

O corpúsculo de Meissner também é um sensor tátil, mas especificamente ao contato. Encontram-se distribuídos pela pele, mas se concentram em áreas particularmente sensíveis a toques leves, como nas pontas dos dedos, nas palmas das mãos, nas solas dos pés, nos lábios, na língua, na face, nos mamilos e na pele externa dos genitais masculinos e femininos (HIERONYMUS et al., 2009; RINN et al., 2008; DIEPGEN et al, 2012; STEWART; AJAO; IHUNWO, 2013).

Os corpúsculos de Krause são sensores em formato de lâmpadas, encapsulados, cuja principal função é identificar a sensação de frio. A sensibilidade é variável de acordo com a região da pele sob consideração (HIRST e SAFINYA, 2004; HIERONYMUS et al., 2009; RINN et al., 2008; DIEPGEN et al, 2012; STEWART; AJAO; IHUNWO, 2013).

Nas regiões da pele providas de pelo, existem terminações nervosas específicas nos folículos capilares e outras, chamadas terminais de Ruffini ou receptores de Ruffini (HIRST e SAFINYA, 2004; HIERONYMUS et al., 2009; DIEPGEN et al, 2012; STEWART; AJAO; IHUNWO, 2013). As primeiras, formadas por axônios que envolvem o folículo piloso, captam as forças mecânicas aplicadas contra o pelo. Os terminais de Ruffini, com sua forma ramificada, são receptores térmicos de calor (HIERONYMUS et al., 2009; DIEPGEN et al, 2012; STEWART; AJAO; IHUNWO, 2013).

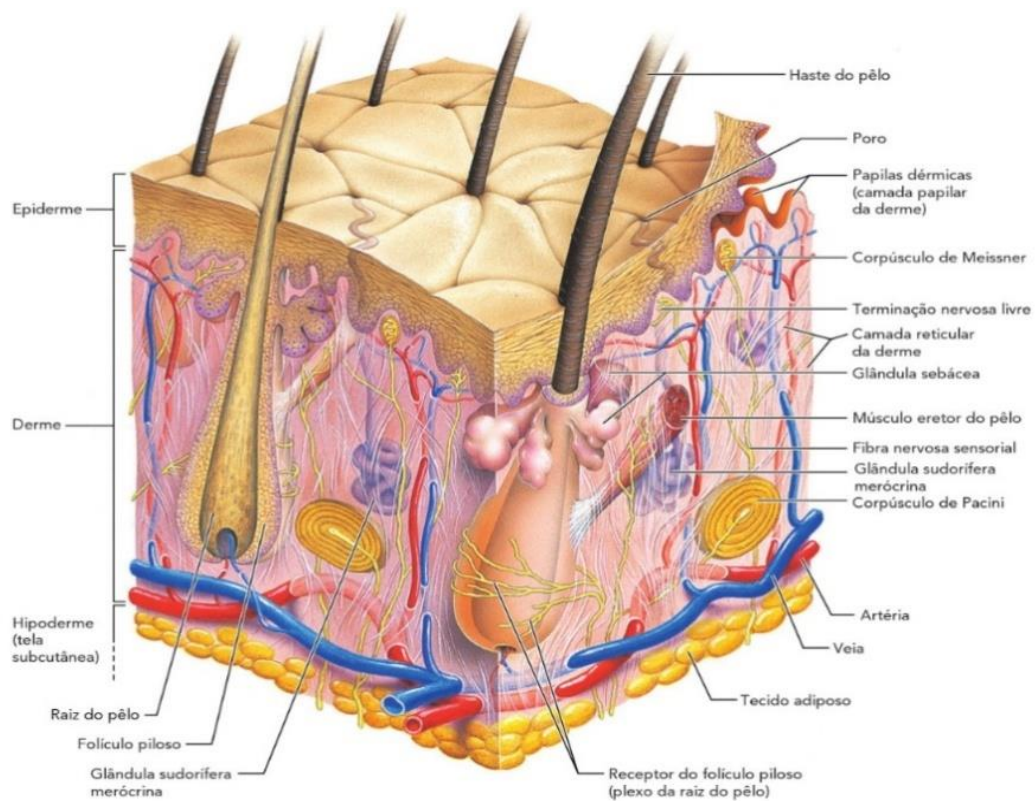
As células de Merkel localizam-se no epitélio bucal e na camada basal da epiderme. A função desses grânulos ainda não foi elucidada. Porém, através das células de Merkel e das terminações nervosas livres, presentes na epiderme, a pele recebe informações do meio ambiente e as envia para o sistema nervoso central. Há hipóteses que sugerem que este complexo, atue como um receptor para o toque e pressão, pois tem características de um mecanorreceptor de baixo ajuste (HIERONYMUS et al., 2009; RINN et al., 2008; DIEPGEN et al, 2012; STEWART; AJAO; IHUNWO, 2013).

A hipoderme ou tecido celular subcutâneo é uma camada de tecido conjuntivo localizado abaixo da derme, porém tecnicamente não faz parte da pele, unindo-a de maneira pouco firme aos órgãos adjacentes. É um tecido conjuntivo frouxo ou adiposo que faz conexão entre a derme e a fáscia muscular, e tem como suas funções prioritárias: reservatório energético, isolante térmico, absorção de choque e fixação dos órgãos (HOEHN e MARIEB, 2009; WU; WILLIAMS; NATHANS, 2012; DIEPGEN et al, 2012; STEWART; AJAO; IHUNWO, 2013).

Sabe-se que as camadas da pele são avasculares, com isso, a única forma de nutrição é feita por difusão através dos microvasos capilares da derme, que se apresenta bem vascularizado (WU; WILLIAMS; NATHANS, 2012). Na camada basal, ocorre uma constante renovação celular, com intensa atividade mitótica. Essas células sofrem diferenciação, sendo empurradas para

a camada espinhosa e lúcida até chegarem à epiderme. Tais células formam de quatro a seis camadas sobrepostas de queratinócitos, conferindo a resistência mecânica à epiderme (HOEHN e MARIEB, 2009; WU; WILLIAMS; NATHANS, 2012; DIEPGEN et al, 2012; STEWART; AJAO; IHUNWO, 2013).

Figura 6 - Estrutura da pele. Visão tridimensional da pele e do tecido subcutâneo subjacente. As camadas dérmicas e epidérmicas e seus anexos



Fonte: HOEHN e MARIEB, 2009.

#### 2.4 Câncer: Melanoma (MM) e o não Melanoma (NMSC)

São dois os tipos conhecidos de câncer de pele, os não melanoma (NMSC) que é constituído pelos carcinomas de células basais e carcinomas de células escamosas, e os melanomas maligno (MM), que possuem origem nos

melanócitos (BROETTO et al., 2012; KHOSRAVI; SCHMIDT; HUANG, 2015; LO e FISHER, 2016). O câncer de pele representa a neoplasia mais comum em caucasianos (SOYER et al.; 2012; FERLAY, 2012; KHOSRAVI; SCHMIDT; HUANG, 2015; LO e FISHER, 2016). O número estimado de novos casos de melanoma cutâneo em 2016 é de 76.380, o que representa 4,5% de todos os novos casos de câncer no mundo (FERLAY, 2012; SIEGEL, 2015; MEHTA e DUTT, 2016). Existem desvios nas taxas de incidência relatadas e são atribuídos a diferentes fatores de risco entre diferentes populações, bem como discrepâncias nos sistemas nacionais de registro (FERLAY, 2012; SIEGEL, 2015). Os aumentos observados nas taxas de câncer de pele estão associados a vários fatores como a transição para populações significativamente mais velhas, que por sua vez, está associada a um maior risco de NMSC (KHOSRAVI; SCHMIDT; HUANG, 2015; LO e FISHER, 2016). No entanto, estudos revelaram um papel significativo no aumento da exposição ocupacional e recreativa à exposição a luz UV (BROETTO et al., 2012; KHOSRAVI; SCHMIDT; HUANG, 2015; LO e FISHER, 2016).

O câncer de pele é o tipo de câncer mais comum no Brasil e representa uma parcela importante nos diagnósticos de câncer segundo o INCA. Ainda de acordo com o INCA, são estimados 181.430 novos casos no Brasil em 2016. Embora o câncer de pele seja o tipo de câncer mais frequente, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados no Brasil, quando detectado precocemente este tipo de câncer apresenta altos índices de cura. Porém, mesmo com sua letalidade considerada baixa, em alguns casos onde há demora no diagnóstico esse câncer pode levar a ulcerações e deformidades físicas graves (BROETTO et al., 2012; BRASIL, 2014). Além disso, o câncer de pele do tipo melanoma é considerado o mais agressivo e que apresenta maior resistência ao tratamento entre todos os tipos de cânceres conhecidos (POLLOCK et al., 2006; DIEPGEN et al., 2012; LO e FISHER, 2016).

Segundo o INCA, o carcinoma de células basais é responsável por aproximadamente 70% dos casos de câncer de pele no Brasil (BRASIL, 2014). É o mais comum e menos grave, raramente disseminando para outros órgãos; entretanto, pode destruir os tecidos a sua volta, atingindo cartilagens e ossos. Os carcinomas de células escamosas aparecem como o segundo tipo de câncer de pele mais comum, responsável por aproximadamente 25% dos casos, possui

maior facilidade para disseminar, levando o risco de metástases. Já o melanoma maligno, o mais agressivo dos tumores de pele, tem a capacidade de invadir qualquer órgão e se espalhar pelo corpo, mesmo que sua incidência seja bem inferior aos outros tipos de câncer de pele, aproximadamente 4-5%, é o mais agressivo, e responsável por 75% de todas as mortes causadas por neoplasias de pele. Dados atuais apontam que sua incidência está aumentando no mundo inteiro, (DIEPGEN et al., 2012; BROETTO et al., 2012, FERLAY, 2012; STEWART, 2014)

O principal fator de risco para o câncer de pele, tanto para melanoma quanto para o não melanoma, é a exposição excessiva à radiação solar (SBD, 2013, NCI, 2016). Para o tipo não melanoma, a incidência aumenta com a idade, sendo mais frequente na população masculina do que na feminina. Em geral, o carcinoma de células epidermoides está associado ao acúmulo das doses de exposição ao sol, enquanto o carcinoma basocelular está mais associado a uma exposição intermitente em alta doses de radiação solar (WETZIG,2009; SBD, 2013). As populações de pele clara naturalmente possuem um risco aumentado para o desenvolvimento do câncer de pele não melanoma, (SBD, 2013; STEWART, 2014; SINGEL et al., 2015; NCI, 2017).

#### 2.4.1 Carcinomas de células basais (CBC)

O CBC é descrito como uma neoplasia epitelial maligna de células basaloides, com núcleos volumosos em relação ao citoplasma e perda de pontes intercelulares, porém, com raras figuras de mitoses (RUBIN AI, 2005; WETZIG,2009; BROETTO et al., 2012). A característica mais sugestiva para o diagnóstico do CBC consiste na presença de grupamentos de células dispostas em formato cilíndrico, periféricamente, sendo comum uma fenda entre o estroma e o parênquima tumoral (RUBIN AI, 2005; MANTESE et al., 2006; WETZIG,2009; BROETTO et al., 2012).

Figura 7- Carcinomas de células basais normalmente vemos o brilho perolado e finos vasos de sangue, chamados de telangiectasia.



Fonte: Disponível em <http://www.myskincancercentre.com.au/question/b/basal-cell-cancer-look-like/>

Os CBCs são uma variação comum do câncer de pele que afetam, aproximadamente, um milhão de habitantes dos Estados Unidos anualmente (STEWART, 2014; SINGEL et al., 2015). Na verdade, o CBC é o mais comum entre todos os tipos de câncer, principalmente no Brasil onde existe uma alta exposição à luz solar (ROEWERT-HUBER et al., 2007; SBD, 2013; STEWART, 2014; BRASIL, 2016; CARDIS et al., 2017). Contudo, raramente o CBC sai dos seus sítios primários, apresentando assim baixa possibilidade de metástase. Por esta razão, o CBC é considerado um tumor maligno de baixo risco e pouca agressividade (MANTESE et al., 2006; WETZIG et al., 2009; CARDIS et al., 2017).

É um tipo de câncer considerado multifatorial, porém, é descrito na literatura que a causa principal da formação do CBC é exposição ao sol acumulada ao longo da vida (WEINBERG, 2008; WETZIG et al., 2009; DIEPGEN et al., 2012). Os tumores surgem com maior frequência nas áreas expostas do corpo, especialmente na face, nas orelhas, no pescoço, no couro cabeludo, nos ombros e no dorso. Em raras ocasiões, no entanto, esses tumores se desenvolvem em áreas não expostas (RUBIN et al., 2005; POLLOCK et al., 2006; DIEPGEN et al., 2012). Em alguns casos, o contato com arsênico, a exposição à radiação, a existência de lesões abertas que não

cicatrizam, a existência de doenças de pele inflamatórias crônicas, bem como complicações decorrentes de cicatrizes, queimaduras, infecções, vacinas e até mesmo de tatuagens são outros fatores que contribuem para o desenvolvimento da doença (RUBIN AI, 2005; WETZIG,2009).

Os carcinomas de células basais em estágios iniciais são facilmente tratáveis, com grandes chances de cura na fase inicial de tratamento (WETZIG,2009; BROETTO et al., 2012). Embora esse tipo de câncer, raramente, desenvolva metástase, em algumas situações pode danificar o tecido adjacente causando, às vezes, uma destruição acentuada do tecido lateral (RUBIN AI, 2005; WETZIG,2009; BROETTO et al., 2012).

#### 2.4.2 Carcinoma epidermóides (CEC)

É descrito como o segundo tipo mais comum de câncer de pele, sendo superado somente pelo carcinoma basocelular. Ocorre normalmente em áreas expostas ao sol e está relacionado ao dano solar crônico, ou seja, ao acúmulo de dano pela radiação ultravioleta na pele ao longo da vida (DEDIVITIS et al.; 2004; MANTESE, 2006; BROETTO et al., 2012; MARACY et al., 2016).

O CEC não é uma neoplasia exclusiva da pele, acometendo também mucosas, como: garganta, boca, colo do útero, vagina e pênis. Seu comportamento é mais agressivo nas mucosas, principalmente em boca e garganta, com maior risco de metástases e evolução para óbito. Diferente do que ocorre com o carcinoma basocelular, o CEC pode gerar metástases, porém o risco não é tão grande quanto no melanoma. De uma forma simplificada o carcinoma espinocelular é mais perigoso que o basocelular, mas menos perigoso que o melanoma. (MOTLEY et al., 2002; MANTESE, 2006; BROETTO et al., 2012; MARACY et al., 2016)

As lesões atingem principalmente a face e a parte externa dos membros superiores. Iniciam-se pequenas, endurecidas e tem crescimento rápido, podendo chegar a alguns centímetros em poucos meses (BROETTO et al., 2012). Crescem, infiltrando-se nos tecidos subjacentes, e também para cima, formando lesões elevadas ou vegetantes. Frequentemente possuem ulcerações,

causando sangramentos com frequência (MOTLEY et al., 2002; DEDIVITIS et al.; 2004). O carcinoma epidermoide pode produzir metástases, portanto, fundamental o diagnóstico e tratamento precoce para evitar o comprometimento de outros órgãos (CARVALHO et al., 2001. MOTLEY et al., 2002. MARACY et al., 2016).

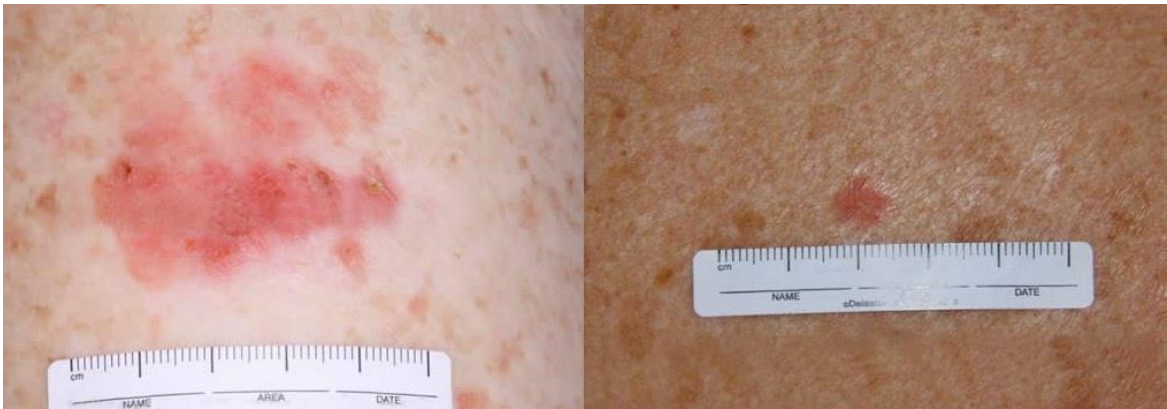
Figura 8 - Demonstração do CEC: Lesão nodular avermelhada em formato de ulceração à direita e lesão à esquerda se apresenta como uma grande nodulação vegetante.



Fonte: Disponível em <http://medifoco.com.br/fotos-de-carcinoma-epidermoide-epinocelular/>

Existem lesões precursoras do CEC, sendo a presença de queratose actínicaum precursor para esse tipo de câncer (MOTLEY et al., 2002; DEDIVITIS et al.; 2004; SOYER et al.; 2012). Estudos recentes vem considerando outros fatores como determinantes para o CEC, dentre eles destaca-se a doença de Bowen que atualmente já é considerada uma CEC (BROETTO et al., 2012; IDRIS; MISRI; BÖER-AUER, 2015 MARACY et al., 2016).

Figura 9 - Doença de Bowen: placa eritematosa e descamativa, que se confunde com outras doenças de pele.



Fonte: Disponível em <http://www.dermis.net/dermisroot/en/52775/image.htm>

#### 2.4.3 Melanoma maligno cutâneo

Atualmente, o Melanoma maligno está sendo descrito como uma das neoplasias mais agressivas, resistentes ao tratamento e sua incidência é crescente. Em 2014, estimou-se que 76.100 novos casos e 9.710 mortes ocorreram nos Estados Unidos (STEWART, 2014; SINGEL et al., 2015). A última estimativa mundial revelou que, em 2014, 232 mil casos novos de melanoma foram diagnosticados em todo o mundo. Já para a mortalidade, foram estimados 55 mil óbitos globais, representando mais de 80% dos diagnósticos de melanomas (FERLAY, 2012; STEWART, 2014). No Brasil, esse quadro é semelhante. Dados recentes indicam que houve aproximadamente 1.769 óbitos relacionados ao melanoma maligno no Brasil no ano de 2014 (BRASIL, 2016).

Conhecida como uma neoplasia de pele originada da transformação maligna dos melanócitos, localizados na camada basal da epiderme, é uma forma grave de câncer cutâneo, invasiva e com elevados níveis de metástases. Trate-se de uma neoplasia com baixa taxa de sucesso terapêutico e com um arsenal bastante reduzido, com poucos tratamentos efetivos para os pacientes portadores dessa doença (WEINLICH, 2008; DEVITA et al., 2005; SCHREUER et al., 2017). Na maioria das vezes se origina na pele,

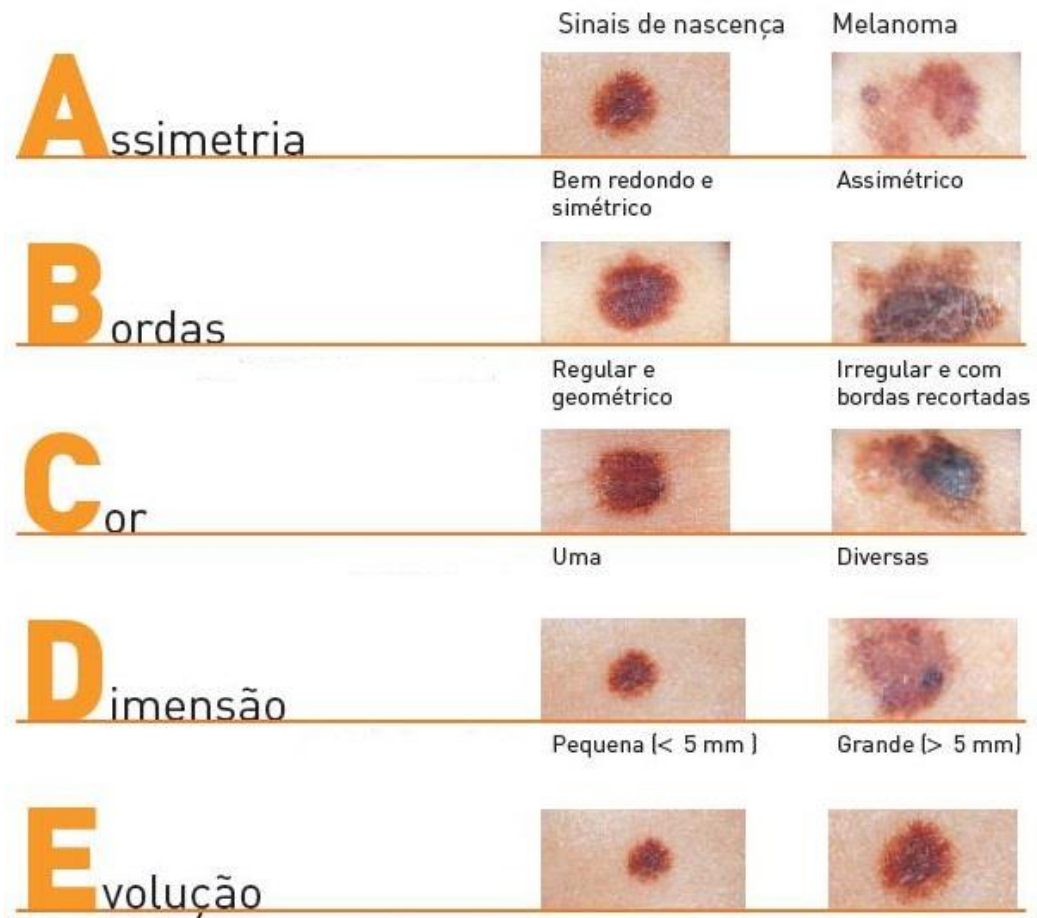
embora possa surgir a partir de mucosas ou em outros locais, tais como: olhos, epitélios da mucosa e meninges ou para outros locais para os quais migram as células da crista neural, tais como: neurônios craniais, cartilagem e tecidos conectivos (WEINBERG, 2008; LIN; FISHER, 2007; LI, 2014; YAMAGUCHI; HEARING, 2014; DEVITA et al., 2005; WEINBERG, 2008; LIN; FISHER, 2007; YAMAGUCHI; HEARING, 2014).

#### 2.4.3.1 Melanoma: critérios para o diagnóstico

O fator mais importante para o sucesso no tratamento do Melanoma é o diagnóstico precoce. A maioria dos melanomas pode ser diagnosticado, clinicamente, um exame cuidadoso e detalhado (YAMAGUCHI; HEARING, 2014; LI, 2014; ABBAS; MILLER; BHAWAN, 2014). A maioria das alterações sugestivas de uma lesão suspeita são apresentados em um período de meses, quando essas mudanças ocorrem em dias ou semanas indicam condições inflamatórias graves. As mudanças iniciais, normalmente, observadas são: o aumento do tamanho da lesão, alterações de cor que ocorre em 70% dos pacientes, prurido e a presença de ulceração ou hemorragia, (DEVITA et al., 2005; WEINBERG, 2008; LI, 2014; ABBAS; MILLER; BHAWAN, 2014). Também pode ocorrer descoloração em torno das lesões, que é chamado de halo de regressão e deve ser levado em conta na avaliação (DEVITA et al., 2005; YAMAGUCHI e HEARING, 2014; ABBAS; MILLER; BHAWAN, 2014).

Para o diagnóstico clínico vem sendo implementado desde 1985, o sistema de melanoma ABCDE (Figura 10). Deve-se ter especial atenção aos melanomas amelanóticos, pois esses podem ser confundidos com carcinomas basocelulares, de células escamosas ou outras lesões (ABBAS; MILLER; BHAWAN, 2014; HARRINGTON et al., 2017).

Figura 10 - Critérios ABCDE para o diagnóstico de melanoma.



Fonte: Disponível em [http://www.aille.com.br/portfolio\\_page/pintas/](http://www.aille.com.br/portfolio_page/pintas/)

Vários subtipos comuns de melanoma são mostrados na Figura 8. Os melanócitos são derivados de progenitores da crista neural e seu desenvolvimento é modulado pelo receptor tirosina quinase (RTK) c-KIT e pelo fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) (LI, 2014; NEAGU et al., 2016; HARRINGTON et al., 2017).

Figura 11 - Subtipos de melanomas



Fonte: Disponível em <http://cancerdepelebrasil.com.br/CancerdePele/50/Diferentes-tipos-de-Melanoma>

Legenda: Melanoma superficiais (A), melanomas amelanótico (B) e melanomas nodulares.

#### 2.4.3.2 Melanoma: Vias, alterações genéticas e fatores de riscos comuns

Os fatores de risco para o melanoma são: história familiar, pele clara, imunossupressão, radiação UV e presença de nevo melanocítico prévio (LI, 2014; IDRIS, 2015; NEAGU et al., 2016; HARRINGTON et al., 2017). Estudos epidemiológicos têm implicado intensa exposição à radiação UV intermitente e queimaduras solares severas durante a infância, como um maior risco ao desenvolvimento do tumor (LI, 2014; NEAGU et al., 2016). A radiação UV tem múltiplos efeitos na pele, incluindo alterações genéticas, indução de espécies reativas de oxigênio (ROS), alterações na função imunológica cutânea e produção de fatores de crescimento (WU e ZHAO, 2012; NEAGU et al., 2016; HARRINGTON et al., 2017).

Os melanócitos produzem dois tipos principais de pigmento: eumelanina (cor preta e marrom) e foveomelanina (cor avermelhada). A eumelanina é o pigmento fotoprotetor que proporciona a atenuação da radiação ultravioleta. A síntese de pigmento é estimulada pela ligação do hormônio estimulante da  $\alpha$ -melanócitos ( $\alpha$ -MSH) ao receptor de melanocortina1 (MC1R) (WU e ZHAO, 2012; LI, 2014; IDRIS, 2015; NEAGU et al., 2016, LI, 2014; YAMAGUCHI e HEARING, 2014; ABBAS; MILLER; BHAWAN, 2014).

Um estudo recente demonstrou que a síntese de feomelanina contribui para a melanomagenese através de um mecanismo independente da radiação UV, acredita-se envolver altos níveis de ROS (MITRAL et al., 2012; LI, 2014; ABBAS; MILLER; BHAWAN, 2014; HARRINGTON et al., 2017). Assim, a elevada suscetibilidade ao desenvolvimento de melanomas em indivíduos com fenótipos ruivos e/ou pele clara é provavelmente atribuível aos efeitos cancerígenos intrínsecos da síntese de feomelanina, bem como a radiação UV (WU e ZHAO, 2012; LI, 2014; YAMAGUCHI e HEARING, 2014).

As mutações específicas em BRAF foram descritas como possuindo altas incidências em melanomas. A maioria das mutações oncogênicas de BRAF causam substituições no codão 600 (V600E) ativando, por sua vez, a via das quinases (ABBAS; MILLER; BHAWAN, 2014; SCHREUER et al., 2017; FRANKEL et al., 2017; OBAID; BEDARD; HUANG, 2017).

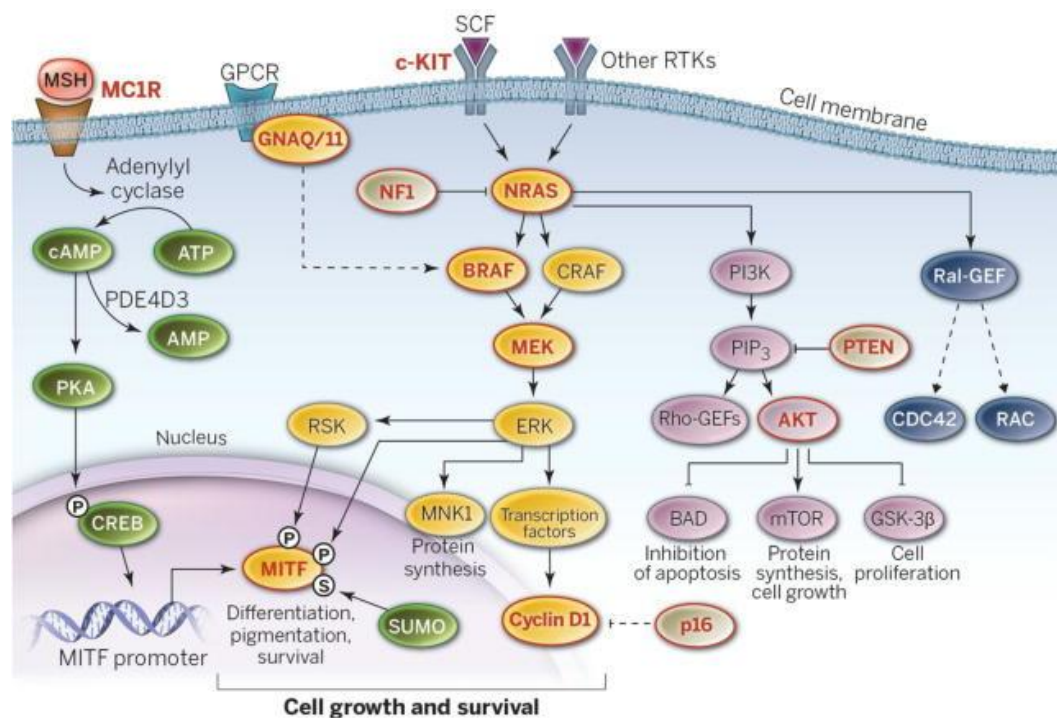
A heterogeneidade molecular e mutacional apresentam grandes desafios na análise do genomas do melanoma. As taxas de mutação da base somática no melanoma estão entre as mais altas. Esta taxa de mutação reduz o poder de detecção das verdadeiras mutações indutoras do melanoma (WU e ZHAO, 2012; ABBAS; MILLER; BHAWAN, 2014; FRANKEL et al., 2017). As altas taxas de mutações no melanoma, é, em grande parte, atribuída aos efeitos mutagênicos da radiação UV e são perceptíveis na terminação C>T na base 3'da pirimidina (WU e ZHAO, 2012; NEAGU et al., 2016; SCHREUER et al., 2017; FRANKEL et al., 2017; OBAID; BEDARD; HUANG, 2017). Embora as mutações de assinatura de UVB dominem as mutações no melanoma, é importante lembrar a contribuição de processos independentes de UVB, como a associada a UVA na base G>T resultante de danos oxidativos e lesões no ADN (NEAGU et al., 2016; FRANKEL et al., 2017; WU; ZHAO, 2012; NEAGU et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2017).

A mutação mais comum no melanoma, o BRAF V600E, está fortemente associada a uma idade mais avançada e danos crônicos ao sol, contribuindo para a sustentar a hipótese da mutação ser ocasionada por exposição à radiação UVB (WU e ZHAO, 2012; NEAGU et al., 2016; SCHREUER et al., 2017; FRANKEL et al., 2017; OBAID; BEDARD; HUANG, 2017;

SCHNEIDER et al., 2017; FRANKEL et al., 2017; OBAID; BEDARD; HUANG, 2017)

As mutações mais comumente observadas são as do BRAF e das NRAS, com hiperativação da via MAPK (LO e FISH, 2014; NEAGU et al., 2016; SCHREUER et al., 2017). Contudo, outras alterações genéticas recorrentes também podem ser identificadas, tais como aumento da codificação feita pelo gene AKT3 e perda da proteína PTEN por supressão (WU e ZHAO, 2012; LO e FISH, 2014; NEAGU et al., 2016).

Figura 12- Vias de sinalização no melanoma. A sinalização MAPK promove o crescimento e a sobrevivência celular e é constitutivamente ativa na maioria dos melanomas. Os membros da família RAS são ativados por RTKs e sinalizam através de proteínas efetoras incluindo PI3K, RAF cinases e Ral-GEFs

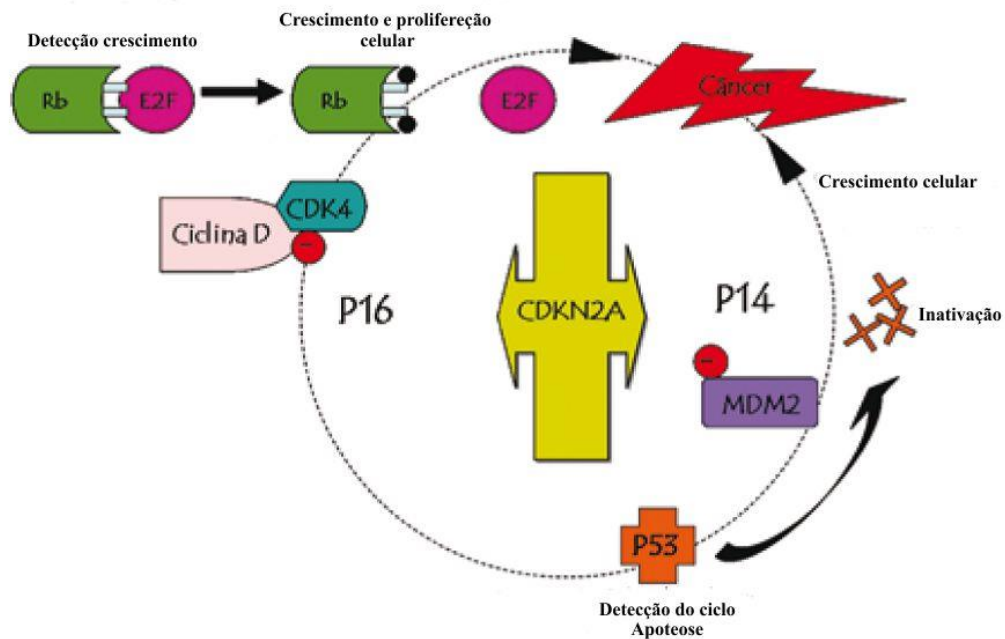


Fonte: LO e FISH, 2014.

O esquema acima sintetiza os principais fatores relativos à alterações mutacionais e genéticas que podem dar origem ao melanoma, e consiste na representação esquemática de diferenciação de melanócitos através do eixo de MITF/ ARN /BRAFF que são ativadas pelo receptor c-KIT. A expressão do fator de transcrição é regulada por MITF,  $\alpha$ -MSH e MC1R. Os ARN, BRAFF e KIT são oncogenes conhecidos na promoção do melanoma (LO e FISH, 2014; NEAGU et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2017). A via de sinalização de EGFR é ativada por uma dimerização do receptor EGFR, isso leva a ativação das vias RAS e PI3K. Quando ocorre a ativação em RAS há a ativação da cascata MEK, ERK e p38; PI3K e AKT via PIP3 também ocorre (LO e FISH, 2014; NEAGU et al., 2016). Ambas as vias de regulação das funções celulares, como metástase e apoptose, que são vitais para a progressão do melanoma são ativadas e promovidas. As mutações no EGFR, RAS, RAF, PTEN e PI3K ativam o surgimento do melanoma (LO e FISH, 2014; NEAGU et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2017).

O CDKN2A é um regulador do ciclo celular que codifica dois supressores tumorais, p14 ARF e p16 INK4a, que regulam as vias p53. A p16INK4a e P15 são inibidores de CDK4 e CDK6, atuando na fosforilação do pRB, conduzindo a progressão da fase G1 para a fase S. A p14ARF atua como um inibidor de HDM2 que regula p53. A perda do ponto de controle do ciclo celular p53 e da via apoptóticas no melanoma pode resultar de supressão ou mutações em p14 ou TP53. A supressão da p16INK4a é o evento mais comum relatado em melanoma (WU e ZHAO, 2012; LO e FISH, 2014; NEAGU et al., 2016).

Figura 13 - Patogênese do melanoma mediadas P16 e P14 mutações



Fonte: ACOSTA, 2009.

#### 2.4.3.3 Melanoma: tratamentos

O tratamento primário é a excisão cirúrgica do melanoma, sendo a única abordagem com potencial curativo para melanomas malignos em estágios iniciais. Mister se faz ressaltar que a biópsia é essencial, tanto para dar o dermatopatologistas segurança no diagnóstico e permitir a avaliação das margens de excisão para um provável tumor residual, como para avaliar sua malignidade (BROETTO et al., 2012; BISWAS et al., 2015; LECCIA et al., 2014; HARRINGTON et al., 2017).

No melanoma cutâneo, em estágio inicial, um dos fatores mais importantes de prognósticos são: i) a espessura tumoral e ii) a presença ou a ausência de ulceração. De modo geral, à medida que a espessura aumenta, pior é o prognóstico, bem quando da existência de ulcerações (BROETTO et al., 2012; COCHRAN et al., 2014; LECCIA et al., 2014; BISWAS et al.,

2015; HARRINGTON et al., 2017). A escala de Clark<sup>1</sup> poderá também ter implicações em termos prognósticos nos melanomas superficiais, embora a sua importância tenha vindo a diminuir à medida que novos fatores, em especial o genético e molecular, estão sendo estudados (BROETTO et al., 2012; COCHRAN et al., 2014; HARRINGTON et al., 2017).

O tratamento do melanoma podem incluir então, cirurgia, radioterapia com feixe externo e quimioterapia. Todos, sem exceção apresentam efeitos secundários. (BROETTO et al., 2012; COCHRAN et al., 2014; LECCIA et al., 2014; GOYAL et al., 2015; HARRINGTON et al., 2017; OBAID; BEDARD; HUANG, 2017).

#### 2.4.3.4 Melanoma: dacarbazina

Existem poucas alternativas terapêuticas para o tratamento do melanoma cutâneo em estágios avançados, e os únicos fármacos aprovados pela FDA são: a Dacarbazina (DTIC); e/ou altas doses de interleucina-2(HIL-2), ambos com taxas de resposta entre 10-20%. Importante ressaltar que nenhum dos fármacos usados para o tratamento do melanoma demonstraram um aumento na sobrevida global, salientando a necessidade de novos fármacos ou a urgência na detecção precoce (KIRKWOOD et al. 1997; DEVITA et al., 2005; POLLOCK et al., 2006; HERSH et al., 2015; WILSON; SCHUCHTER, 2015; XIN et al., 2016). Recentemente, com o advento da tecnologia dos anticorpos monoclonais, alguns estão sendo usados para o tratamento do melanoma avançado, porém, é conhecido como um grupo de medicamentos que possui efeitos colaterais bastante agressivos, com alto custo e mínima diferença global de sobrevida (WILSON; SCHUCHTER, 2015; HERSH et al., 2015; XIN et al., 2016; AL-BADR; ALODHAIB, 2016).

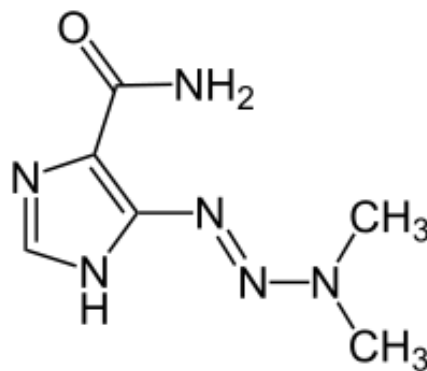
Dentre as opções mais baratas e com taxa de sucesso terapêutico comparada, destaca-se a dacarbazina (DTIC), também conhecida como

---

<sup>1</sup> A escala de Clark corresponde ao grau de invasão tumoral e divide-se em 5 níveis sendo o nível I quando a lesão se encontra confinada à epiderme e seus anexos, nível II quando se limita à derme papilar, III na transição entre a derme papilar e a reticular, nível IV quando atinge a derme reticular, até ao nível V que corresponde à invasão tumoral do pânículo adiposo.

imidazole carboxamida. Ela foi desenvolvido por Y. Fulmer Shealy na década de 70. O fármaco foi inicialmente comercializado pela Bayer (HERSH et al., 2015; XIN et al., 2016; AL-BADR; ALODHAIB, 2016). Desde sua aprovação a dacarbazina está na Lista de Medicamentos Essenciais da Organização Mundial de Saúde, como um dos medicamentos mais eficazes e seguros para o melanoma.

Figura 14 - Estrutura química da Dacarbazina.



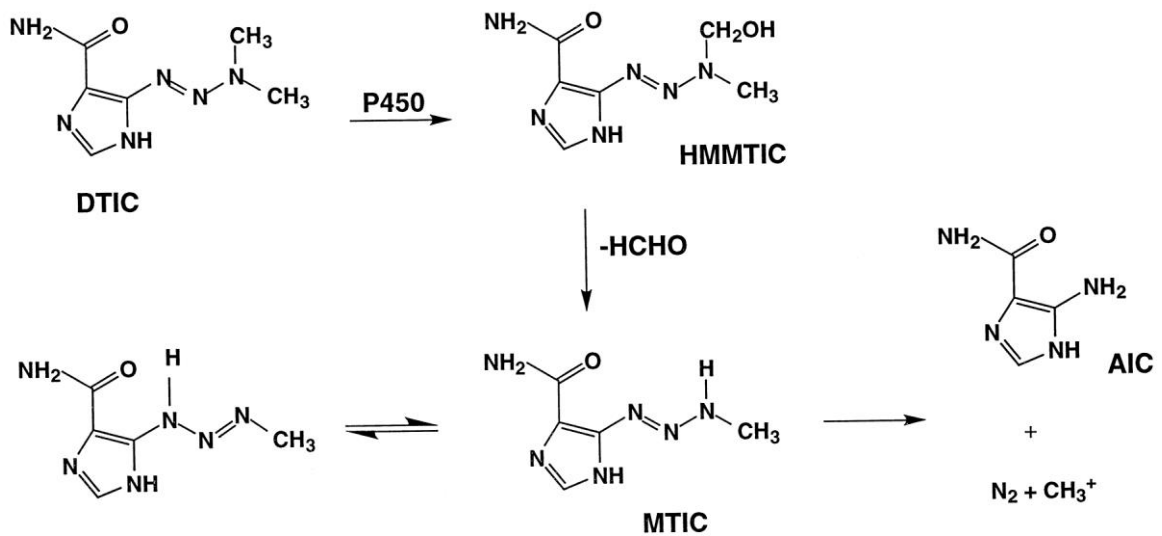
Fonte: Disponível em <http://www.medicinalive.com/deticene-aventis-pharma-dacarbazina/>

Os quimioterápicos são amplamente utilizados no tratamento de vários tipos de câncer, como leucemia, linfomas, tumores de cabeça e pescoço, doença de Hodgkin entre outros devido ao seu grande espectro de atuação (WILSON; SCHUCHTER, 2015. XIN et al., 2016; AL-BADR; ALODHAIB, 2016). Em meados de 2006, a dacarbazina passou a ser comumente usada como único agente no tratamento de melanoma metastático, e como parte do regime de quimioterapia ABVD (Doxorubicina, Bleomicina, Vimblastina e Dacarbazina) para tratar o linfoma de Hodgkin, e no regime de MAID (Mesna, Doxorubicina, Ifosfamida e Dacarbazina) para sarcoma (DEVITA et al., 2005; CHABNER et al. 2006; WILSON; SCHUCHTER, 2015; XIN et al., 2016; PARZEN et al., 2016).

Trata-se de um agente alquilantetriaeno, que tem como principal alvo o ciclo celular, interrompendo ou conturbando etapas importantes da proliferação celular, e por consequência, levando as células em duplicação, à morte. Os fármacos alquilantes formam ligações cruzadas com os filamentos

de ADN impedindo sua replicação, e, com isso, destruindo as células em repouso ou em processo de divisão ativa. A metilação do ADN produzida pela dacarbazina é dependente da N-desmetilação oxidativa por P450 (CHABNER et al. 2006; WILSON; SCHUCHTER, 2015; AL-BADR; ALODHAIB, 2016).

Figura 3 - Via de metabolização de DTIC por P450.



Fonte: Adaptado ALMEIDA, 2005

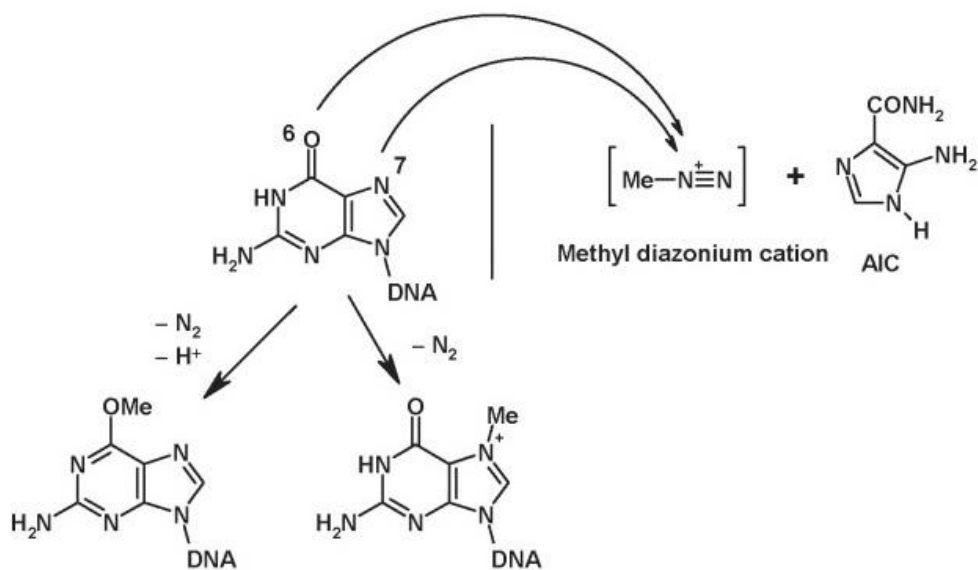
São formados 5-aminoimidazol-4-carboxamida (AIC) e formaldeído como produtos da N-desmetilação de DTIC por microsomas hepáticas (DEVITA et al., 2005; CHABNER et al. 2006; POLLOCK et al., 2006; LO e FISHER, 2014; AL-BADR; ALODHAIB, 2016).

A cascata de metabolismo da DTIC e a formação da molécula de metila reativa está ilustrada na Figura 14. O produto inicial da oxidação catalisada por P450, a carbinolamina (HMMTIC), produz MTIC após a eliminação de formaldeído. A rápida decomposição do MTIC produz AIC, o principal metabólito no plasma e na urina (CHABNER et al. 2006; AL-BADR; ALODHAIB, 2016; XIN et al., 2016).

A dacarbazina funciona metilando a guanina nas posições O-6 e N-7. A guanina é um dos quatro nucleótidos que compõem o ADN. As cadeias de ADN alquiladas ficam juntas, de modo que a divisão celular torna-se

impossível. Isso afeta as células cancerosas mais do que as células saudáveis, pelo fato das células tumorais se dividirem mais rapidamente. No entanto, algumas das células saudáveis ainda serão danificadas (CHABNER et al. 2006; AL-BADR; ALODHAIB, 2016; XIN et al., 2016;).

Figura 4 - Demonstração do processo de metilação na guanina nas posições O-6 e N-7



Fonte: Adaptado ALMEIDA, 2005

A ligação destes compostos ao ADN é considerada essencial para a sua atividade antitumoral, pois provoca a distorção na estrutura desta molécula, incluindo alterações nos processos de condensação da dupla hélice, que impede a replicação e a transcrição, resultando no aumento do processo de apoptose e no bloqueio do ciclo celular na fase G2. Os alquilantes afetam as células em todas as fases do ciclo celular de modo inespecífico (CHABNER et al. 2006; HERSH et al., 2015 AL-BADR; ALODHAIB, 2016; XIN et al., 2016;).

Após administração intravenosa de dacarbazina, em concentrações terapêuticas, a dacarbazina não se liga, em quantidade considerável, às

proteínas plasmáticas e sua metabolização ocorre predominante por via hepática, seguida de excreção renal (CHABNER et al. 2006; AL-BADR; ALODHAIB, 2016; HERSH et al., 2015). O tempo de excreção médio da dacarbazina é 6 horas (correspondendo à 40% da dose inicial administrada). A dacarbazina está mais sujeita à secreção tubular renal do que à filtração glomerular (CHABNER et al. 2006; DUMMER et al., 2016; AL-BADR; ALODHAIB, 2016).

Apesar dos efeitos colaterais, os agentes alquilantes ainda são os fármacos de escolha no tratamento quimioterápico devido a relação custo/benefício (CHABNER et al. 2006; LO e FISHER, 2014; AL-BADR; ALODHAIB, 2016). É importante observar que estudos recentes vem alertando para o risco de tumores secundários resultantes do tratamento com estes agentes, devido aos efeitos mutagênicos nas células normais (LO e FISHER, 2014; NEAGU et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2017). Dentre os principais sintomas adversos observados com a administração da dacarbazina, destacam-se a mielossupressão, a náusea e os vômitos, os quais limitam o uso do quimioterápico. De modo geral, mais de 90% dos pacientes são afetados com algum sintoma com doses iniciais da Dacarbazina (CHABNER et al. 2006; DUMMER et al., 2016;). Outros efeitos colaterais podem incluir graves problemas hepáticos e reações alérgicas, assim como leucopenia, com forte diminuição da imunidade celular e humoral, tornando o paciente suscetível à infecções graves. (POLLOCK et al., 2006; CHABNER et al. 2006; DUMMER et al., 2016;).

## **2.5 Sistema de liberação controlada de fármacos**

Atualmente, o desenvolvimento tecnológico de fármacos para oncologia tem como visão, o aumento da eficácia dos tratamentos quimioterápicos e a redução dos efeitos colaterais que limitam a utilização dos fármacos antineoplásicos (POLLOCK et al., 2006; CHABNER et al. 2006; LO e FISHER, 2014; DUMMER et al., 2016).

As pesquisas tecnológicas em fármacos, têm buscado desenvolver: i) novas formas de administração e absorção; ii) meios de aumentar seu tempo de ação, fazendo com que a eficácia do medicamento seja maximizada; iii) redução nos efeitos colaterais (GRANADA, 2009; COIMBRA, 2010; LO e FISHER, 2014; TIAN et al., 2017). Uma estratégia de grande relevância para atingir esses objetivos consiste no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada para fármacos (GRANADA, 2009; COIMBRA, 2010; BRUXEL et al., 2012; OLIVEIRA, 2014; SUN et al., 2017). Sabe-se que quando um fármaco é administrado, apenas uma pequena fração da dose atinge o tecido alvo, sendo que a maior parte é “extraviada”, devido à sua distribuição por outros tecidos e/ou devido à sua metabolização ou excreção acelerada, antes mesmo de atingir o local de ação (LASSALLE; FERREIRA, 2007. COIMBRA, 2010; BRUXEL et al., 2012; OLIVEIRA, 2014; SUN et al., 2017).

A liberação controlada de fármacos tem como objetivo principal, suprimir o “extravio” do princípio ativo, assim como aumentar o controle e o direcionamento do produto, para que o benefício clínico da administração seja maximizado e os efeitos adversos minimizados (GRANADA, 2009; OLIVEIRA, 2014; SUN et al., 2017). Esses sistemas podem incluir conjugados de fármacos-polímeros solúveis, micelas poliméricas, micro ou nanopartículas, lipossomas, entre outros (LASSALLE; FERREIRA, 2007; GRANADA, 2009; COIMBRA, 2010; BRUXEL et al., 2012).

A liberação controlada demanda a associação, química e/ou física, dos fármacos com materiais biocompatíveis em sistemas que, tenham a capacidade de: i) controlar, de forma pré-determinada, a taxa de liberação do fármaco in vivo; e/ou ii) conduzir o fármaco até ao sítio ativo específico onde esse deve atuar (LASSALLE; FERREIRA, 2007. GRANADA, 2009; COIMBRA, 2010; BRUXEL et al., 2012; OLIVEIRA, 2014; SUN et al., 2017).

Embora a eficiência na terapia do câncer seja ainda um problema, nos últimos anos, a nanobiotecnologia, desenvolveu-se muito rapidamente, com algumas conquistas animadoras, em particular, com o uso de micro e nanopartículas como sistemas de liberação de fármacos para terapia, imagem e/ou a conjugação de ambos, os teragnósticos (LASSALLE; FERREIRA, 2007; COIMBRA, 2010; JOSEFSEN & BOYLE, 2012).

A nanotecnologia se refere à fabricação de novos materiais com dimensões em escala nanométrica, entre 1 e 1000 nanômetros(nm). Essa tecnologia vem revolucionando o desenvolvimento de materiais e componentes de diversas áreas, tais como: a medicina, eletrônica, ciência da computação, física, química, biologia e engenharia dos materiais. O princípio básico da nanotecnologia é a construção de estruturas e novos materiais utilizando-se a interação em escala atômica (LASSALLE; FERREIRA, 2007; BRUXEL et al., 2012). Na farmacologia, a nanotecnologia vem sendo usada com o objetivo de minimizar os efeitos adversos relacionados aos fármacos, assim como aumentar a seletividade e a eficácia dos mesmos (COIMBRA, 2010; BRUXEL et al., 2012).

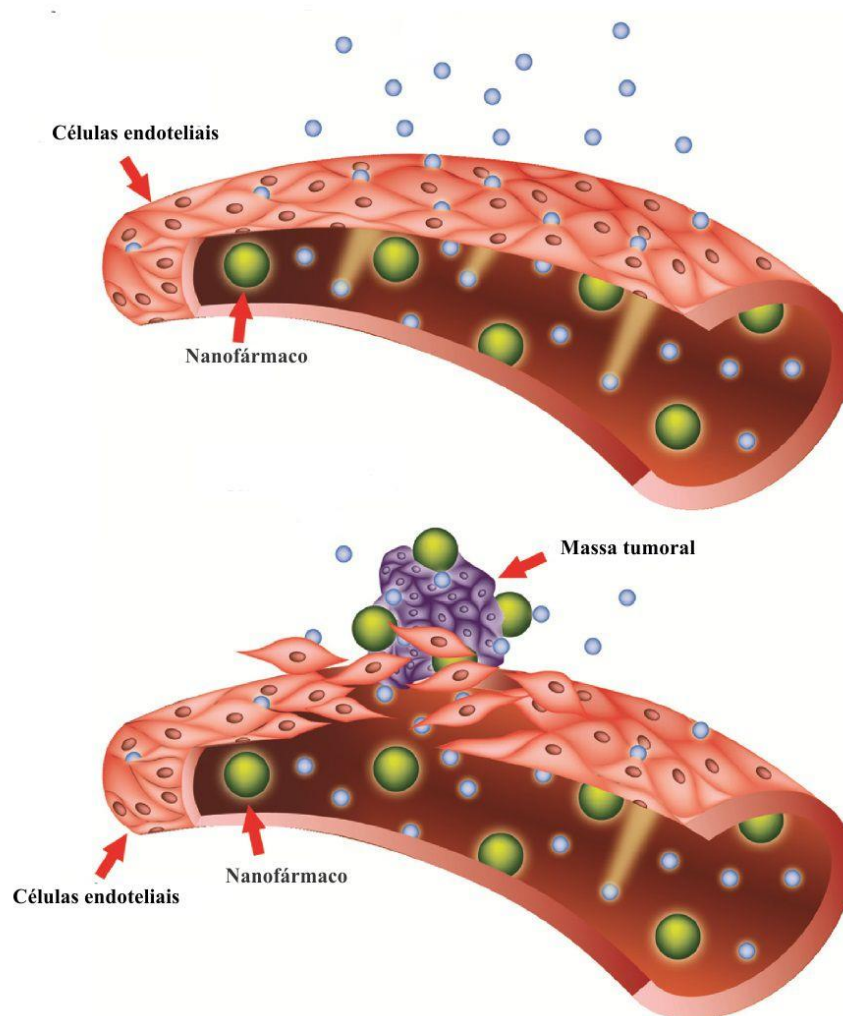
Os sistemas de liberação de micro e/ou nanofármacos tornam-se cada vez mais importantes no tratamento e diagnóstico de diversas neoplasias (COIMBRA, 2010; BRUXEL et al., 2012; OLIVEIRA, 2014). O principal atributo desses sistemas é seu potencial para aumentar a acumulação de agentes anticancerígenos no tumor e nas células cancerígenas, e a sustentação da liberação do princípio ativo (LASSALLE; FERREIRA, 2007; BRUXEL et al., 2012). Dessa forma, aumentando o índice terapêutico e melhorando o balanço entre eficácia e toxicidade destes fármacos (LASSALLE; FERREIRA, 2007; BRUXEL et al., 2012; COIMBRA, 2010; OLIVEIRA, 2014).

Nanocarreadores, tais como as nanopartículas, são promissores para solucionar os problemas relacionados à perda de especificidade dos quimioterápicos convencionais e seu efeito reduzido, em detrimento do microambiente tumoral (LASSALLE; FERREIRA, 2007, GREISH, 2010; OLIVEIRA, 2014). O aumento da especificidade reduz a toxicidade, contribuindo, para uma diminuição significativa dos efeitos colaterais e o aumento na adesão ao tratamento e qualidade de vida aos indivíduos (LASSALLE; FERREIRA, 2007; COIMBRA, 2010; OLIVEIRA, 2014).

As micro e nanopartículas, podem melhorar a efetividade do tratamento do câncer, em especial por aumentar/favorecer o efeito de permeação e retenção vascular, efeito esse chamado de efeito EPR (sigla em inglês para *enhanced permeability and retention (EPR) effect*) encontrado nos tecidos tumorais sólidos (GREISH, 2010). Esse efeito pode ser definido como a propriedade através da qual as moléculas de determinados tamanhos

(tipicamente, lipossomas, nanopartículas, e drogas macromoleculares) tendem a acumular-se no tecido tumoral muito mais do que em tecidos normais. A explicação geral que é dada para este fenômeno é que, para que as células tumorais cresçam rapidamente, elas devem estimular a produção de vasos sanguíneos, através do VEGF e outros fatores de crescimento envolvidos na angiogênese do câncer. Assim, pequenos agregados de células tumorais começam a tornar-se dependentes do suprimento de nutrientes realizado pela neovasculatura para seu fornecimento nutricional e oxigênio (GREISH, 2010). Estes vasos tumorais recém-formados são geralmente com arquitetura anormal. São células endoteliais defeituosas mal alinhadas com fenestrações largas, e receptores funcionais prejudicados para angiotensina II. Além disso, os tecidos tumorais geralmente não têm drenagem linfática eficaz, que filtra tais partículas em condições normais ao redor do tumor. Todos esses fatores levam à dinâmica anormal de transporte molecular, especialmente para fármacos macromoleculares (GREISH, 2010; YAMASAKI et al., 2012).

Figura 5 - Demonstração do efeito EPR



Fonte: GREISH, 2010.

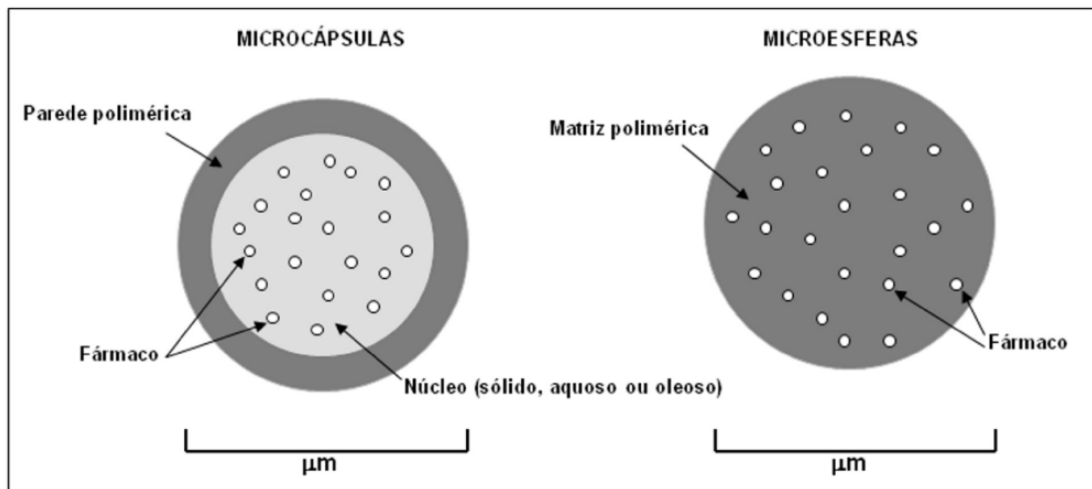
Partículas nanométricas tendem a acumular-se, preferencialmente, nos tumores sólidos por transporte convectivo passivo (LASSALLE; FERREIRA, 2007; GREISH, 2010; BRUXEL et al., 2012; YAMASAKI et al., 2012; OLIVEIRA, 2014). A transporte convectivo ocorre quando moléculas são transportadas pelo fluxo de fluido. A força para este tipo de transporte é gradiente de pressão, que faz com que o fluido se desloque para regiões de baixas pressões. O transporte convectivo pode ser mais rápido do que a difusão passiva ou transporte ativo (OLIVEIRA et al., 2006; LASSALLE; FERREIRA, 2007; BRUXEL et al., 2012).

Devido à sua exposição aos fatores de crescimento endotelial e de permeabilidade vascular, a angiogênese ocorre de forma bastante desordenada. Esse desordenamento neoangiogênico permite a formação de fenestrações mais largas (com tamanho variando entre e 60-70nm) nos vasos e capilares sanguíneos recém-criados, acarretando assim o influxo maior de micro e nanopartículas para o interior desses tecidos (GREISH, 2010; COIMBRA, 2010 MELO et al., 2012, GRANADA, 2012). Assim, devido a suas dimensões reduzidas, estes sistemas de liberação de fármacos, podem acumular-se passivamente no interior da massa tumoral através da rede microvascular tumoral, presente no epitélio (GREISH, 2010; COIMBRA, 2010 MELO et al., 2012, GRANADA, 2012; OLIVEIRA, 2014; FROUNCHI; SHAMSHIRI, 2014).

Dentre as estratégias conhecidas para o controle da liberação fármacos, a microencapsulação de princípios ativos, utilizando polímeros biodegradáveis e bio compatíveis, tem apresentado resultados promissores, uma vez que, permiti a proteção de fármacos sensíveis às condições ambientais, aumento da seletividade e o direcionamento, assim como propicia maior estabilidade físico-química, tanto nos fluidos biológicos quanto durante a armazenagem (COIMBRA, 2010; OLIVEIRA, 2014; FROUNCHI; SHAMSHIRI, 2014). Não obstante, permite ainda a incorporação de componentes incompatíveis entre si, e auxiliam, sobremaneira, nos parâmetros biofarmacêuticos, aumentando a solubilidade e a permeabilidade desses compostos microestruturados (COIMBRA, 2010 MELO et al., 2012, GRANADA, 2012; OLIVEIRA, 2014).

As micropartículas poliméricas são partículas esféricas com diâmetro entre 1 e 250 $\mu$ m, que oferecem flexibilidade: na dosagem, na cinética de liberação e na marcação de receptores para aplicações como liberação de fármacos (YUN et al., 2004; 2010 MELO et al., 2012, GRANADA, 2012). Podem ser classificadas em duas categorias, microcápsulas e microesferas, sendo que as microcápsulas são sistemas poliméricos similares à reservatório, enquanto as microesferas são sistemas matriciais (AKAGI et al., 2011, COIMBRA, 2010 MELO et al., 2012, GRANADA, 2012; FROUNCHI; SHAMSHIRI, 2014; OLIVEIRA, 2014).

Figura 18 - Representação de micropartícula (microcápsula e microesfera)



Fonte: MELO et al, 2012.

As micropartículas são constituídas, principalmente, por polímeros biodegradáveis, que geralmente não possuem toxicidade e apresentam fácil eliminação do organismo (COIMBRA, 2010; MELO et al., 2012, GRANADA, 2012; FROUNCHI; SHAMSHIRI, 2014; OLIVEIRA, 2014). Diversos polímeros biodegradáveis são utilizados na confecção de micropartículas, tais como: poliésteres, polianidridos, poliortoésteres e polissacarídeos (COIMBRA, 2010; MELO et al., 2012, GRANADA, 2012; FROUNCHI; SHAMSHIRI, 2014).

Entre esses, o copolímero biodegradável conhecido como o ácido poli (D,L-lático) (PLA), um poliéster alifático, tem sido usado no desenvolvimento de sistemas para liberação prolongada de fármacos (COIMBRA, 2010; FROUNCHI; SHAMSHIRI, 2014; OLIVEIRA, 2014). O PLA é um polímero amplamente empregado na preparação de micro e nanopartículas devido às suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, em especial sua degradação *in vivo*, no qual o PLA sofre hidrólise, liberando ácido lático, que é eliminado do organismo, na forma de dióxido de carbono e água (COIMBRA, 2010; GRANADA, 2012; FROUNCHI; SHAMSHIRI, 2014; OLIVEIRA, 2014).

O emprego de micropartículas como carreadores para antineoplásicos, além de permitir a manutenção da forma ativa da molécula, aumenta o seu tempo de permanência na circulação sistêmica, fazendo com que uma maior concentração atingisse os tecidos tumorais, se infiltrando nos mesmos com mais eficiência (COIMBRA, 2010; FROUNCHI; SHAMSHIRI, 2014; OLIVEIRA, 2014).

## 2.6 Radiofármacos

Em 2009, a ANVISA lançou a primeira resolução (RDC N° 63/2009) sobre radiofármacos, definindo que:

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

São medicamentos, compostos por dois componentes principais: carreador (partícula) e radionuclídeos ou radioisótopos (elemento radioativo), emissores de radiação e são utilizados para radioterapia e para exames de diagnóstico por imagem, na Medicina Nuclear. Após administração no organismo, possuem uma biodistribuição específica ou uma afinidade pelo órgão ou função em estudo, com finalidades de diagnóstico, terapia ou monitoramento de doenças. A qualidade da imagem obtida e eficácia dos radiofármacos estão diretamente relacionadas à escolha, tanto do carreador a ser empregado, como do radioisótopo acoplado. (SANTOS-OLIVEIRA, 2011; HOBBS et al., 2012; TIAN et al., 2017).

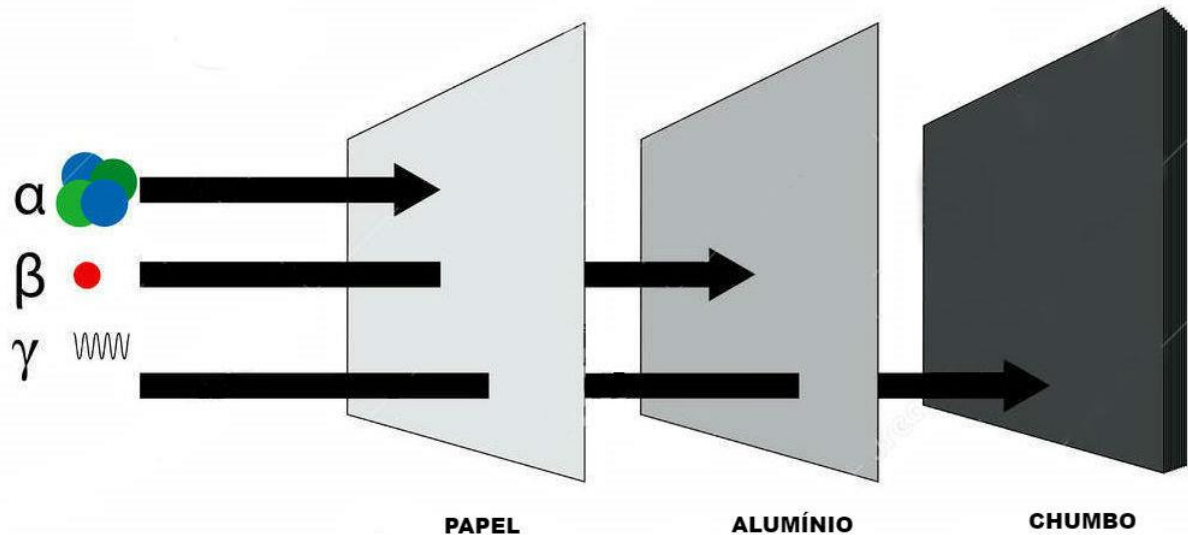
O radiofármaco ideal é aquele que pode atingir o tecido tumoral sem que a radiação atinja o tecido normal (HOBBS et al., 2012; PARKER et al., 2013; GIJS et al., 2016). Além disso, um radiofármaco deve ser capaz de permanecer no organismo por um período de tempo curto o bastante para evitar a exposição desnecessária do indivíduo à radiação, porém, tempo

suficiente para permitir a aquisição e processamento de imagens, assim como desenvolver sua ação terapêutica (ERCAN; CAGLAR, 2000; HOBBS et al., 2012; PARKER et al., 2013; SGOUROS; HOBBS; ABOU, 2014; GIJS et al., 2016; TIAN et al., 2017). Isso é determinado pela meia-vida efetiva do radiofármaco, que, por sua vez, depende do decaimento físico do radionuclídeo e do tempo de meia-vida biológico do carreador acoplado ao radioisótopo (OLIVEIRA *et al.*, 2006; SANTOS-OLIVEIRA, 2011; HOBBS et al., 2012; GIJS et al., 2016).

O sucesso de um radiofármaco geralmente é determinado pela seletividade ao tecido tumoral (OLIVEIRA *et al.*, 2006; SANTOS-OLIVEIRA, 2011; TIAN et al., 2017). De um modo geral, os tumores possuem diferenças no fluxo sanguíneo, no pH, no metabolismo, de modo que os radiofármacos podem fazer uso dessas particularidades para se concentrar seletivamente nos tecidos malignos (BORDIM *et al.*, 2013; PANDIT-TASKAR; LARSON; CARRASQUILLO, 2013; ALBERNAZ *et al.*, 2014; GIJS et al., 2016).

A radiação gama é uma onda eletromagnética e, portanto, apresenta grande penetrabilidade nos tecidos e baixo poder de ionização quando comparada às demais radiações: alfa e beta (OLIVEIRA *et al.*, 2006; SANTOS-OLIVEIRA, 2011; ALBERNAZ *et al.*, 2014; GIJS et al., 2016). Radionuclídeos emissores de radiação gama, tais como o tecnécio-99m, iodo-123, índio-111, galio-67 e o tálio-201, entre outros, são utilizados na composição de radiofármacos para diagnóstico (ERCAN; CAGLAR, 2000; SANTOS-OLIVEIRA, 2011; TIAN et al., 2017).

Figura 19 - Distância de penetração da Radioatividade.



Fonte: Disponível em <http://alunosonline.uol.com.br/quimica/calculo-particulas-alfa-beta.html>

Atualmente, o radionuclídeo mais importante para a preparação de radiofármacos com finalidade diagnóstica é o tecnécio-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ). O pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ) é um radionuclídeo que apresenta características físicas ideais para utilização em Medicina Nuclear, com especial uso para o diagnóstico, pois apresenta: i) emissão gama de baixa energia (140 keV); ii) tempo de meia-vida físico adequado (6,02 h) a realização do exame; iii) não emite radiação do tipo particulada alfa ou beta. Essas características físicas, em conjunto, possibilitam a aquisição de imagens cintilográficas com excelente resolução (SANTOS-OLIVEIRA, 2011; SU et al., 2013; ALBERNAZ *et al.*, 2014; SHENG et al., 2017).

O  $^{99m}\text{Tc}$  é produto do decaimento radioativo do molibdênio-99 ( $^{99}\text{Mo}$ ). Aproximadamente 87,5% dos átomos de  $^{99}\text{Mo}$  desintegram-se por emissão de radiação  $\beta^-$  e origina átomos de  $^{99m}\text{Tc}$  que, por sua vez, desintegram-se por emissão de radiação gama para originar o  $^{99}\text{Tc}$ , o qual se desintegra a  $^{99}\text{Ru}$  (Figura 20) (SAHA, 1998; SANTOS-OLIVEIRA, 2011; SU et al., 2013; ALBERNAZ *et al.*, 2014; SHENG et al., 2017).

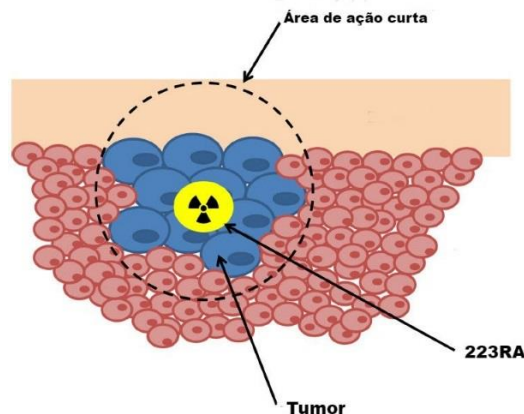


metástase (PANDIT-TASKAR; LARSON; CARRASQUILLO, 2013; YOSHIDA et al., 2016). Como o elemento fica depositado bem próximo às células metastáticas, as partículas alfas emitidas quebram as moléculas de ADN dessas células. Não obstante, devido a ser uma partícula muito volumosa, consegue disseminar uma quantidade expressiva de energia, ocasionando importante danos às células metastáticas, porém, sem penetração significava no tecido, apresentando assim, baixa toxicidade medular, diferentemente do samário-153, empregado no passado nesse cenário (PANDIT-TASKAR; LARSON; CARRASQUILLO, 2013; NILSSON, 2015; SARTOR et al., 2016). Atualmente, vem sendo utilizado no câncer de próstata conjugado ao PSMA (*Prostate-Specific Membrane Antigen*) (NILSSON, 2015; SARTOR et al., 2016) e estudo de sua aplicação em outras neoplasias se tornaram uma obsessão pelos pesquisadores mundiais.

Embora o rádio-223 seja um emissor alfa, os produtos formados através do seu decaimento, emitem radiação beta e gama. Contudo, mais de 95% da energia de decaimento está na forma de radiação alfa (PANDIT-TASKAR; LARSON; CARRASQUILLO, 2013; TURNER; O'SULLIVAN, 2014; SARTOR et al., 2016; YOSHIDA et al., 2016).

A radiação alfa tem baixa penetrabilidade e por tanto reduzidos danos aos tecidos saudáveis circunvizinhos a lesão tumoral, produzindo um efeito ainda mais localizado do que o emissor beta estrôncio-89 ou Samário-153, ambos usados na terapia do câncer (PANDIT-TASKAR; LARSON; CARRASQUILLO, 2013, SARTOR et al., 2016). Uma que o alvo capture o Ra-223, estima-se que o mesmo dê às células uma dose de radiação pelo menos, 8 vezes superior, à dos outros tecidos não-alvo (YOSHIDA et al., 2016; SARTOR et al., 2016).

Figura 21 - Mecanismo de ação do Rádio-223



Fonte: Adaptado MUKHERJI et al., 2014

O rádio-223 é rapidamente eliminado do sangue após administração intravenosa. Sua farmacocinética e biodistribuição apresentam mais de 60% da radioatividade presente no tumor, em um período aproximado de 4 horas (NILSSON, 2015. YOSHIDA et al., 2016; SARTOR et al., 2016). O rádio-223 não é metabolizado pelo organismo, então sua excreção é predominantemente fecal, com excreção renal sendo inferior a 5% (YOSHIDA et al., 2016. SARTOR et al., 2016).

Em 2013, um estudo global de fase III Alsympca, recrutando 921 homens pacientes com câncer de próstata resistente à castração com metástases ósseas (CRPC), demonstrou que o tratamento com rádio-223 aumentou a sobrevida global, com redução de 30% do risco de morte em comparação com o placebo, e elevou a qualidade de vida em uma porcentagem significativa dos pacientes (NILSSON, 2015. YOSHIDA et al., 2016; SARTOR et al., 2016).

Ainda em 2013, o Rádio-223 recebeu aprovação de comercialização pela FDA como tratamento para CRPC (sigla em inglês para Castration-resistant prostate cancer) com metástases ósseas sem doença visceral conhecida (NILSSON, 2015; YOSHIDA et al., 2016; SARTOR et al., 2016).

Os pacientes tratados com o Rádio-223 tiveram uma baixa incidência de efeitos colaterais e alta tolerabilidade. Não obstante, o tratamento com Ra-223 demonstrou mínima mielotoxicidade. Entre as principais queixas dos usuários da terapia com Ra-223 estão: anemia, queda de plaquetas, diarreia,

náusea e fadiga (TURNER; O’SULLIVAN, 2014; NILSSON, 2015; YOSHIDA et al., 2016; SARTOR et al., 2016).

Assim, a utilização de uma micropartícula de dacarbazina, duplamente marcada com  $^{99m}\text{Tc}$  e  $^{223}\text{Ra}$  representa não somente esperança, mas o que há de mais moderno na terapia do câncer de pele do tipo melanoma metastático, com real possibilidade de aplicação imediata na terapia primária ou neoadjuvante. E foi o foco dessa dissertação.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais:

Para realização deste trabalho foram utilizados os materiais descritos a seguir:

- Fauldacar® (Dacarbazina) comercializado pela Libbs®, na forma de pó liofilizado injetável.
- Linhagem celular: MV3 para Melanoma humano;
- SnCl<sub>2</sub> (Cloreto Estanoso) adquirido da Sigma Aldrich®;
- Poli(ácido láctico) (PLA) adquirido da Sigma Aldrich®, utilizado na forma de pó, com peso molecular de 40–100 kDa e viscosidade 0,15-0,25;
- Poli(álcool vinílico) (PVA) adquirido da Sigma Aldrich®, utilizado na forma de pó, como grau de hidrólise de aproximadamente 85%;
- Diclorometano adquirido da VETEC®, grau de pureza P.A.;
- <sup>99m</sup>Tc (Tecnécio-99 metaestável) IPEN/CNEN, fornecido pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ);
- Acetona adquirido da Merck, grau de pureza P.A.;
- Álcool etílico adquirido da Merck, grau de pureza P.A.;
- Papel de Whatman nº 1;
- Camundongo balb-c adquiridos do biotério da USP;
- Cetamina 10 g/100 mL, comercializado pela Syntec®;
- Xilazina 2 g/100 mL, comercializado pela Syntec®.

### 3.2 Desenvolvimento das Micropartículas de Dacarbazina

As micropartículas de PLA com e sem o quimioterápico foram produzidas pelo método de dupla emulsificação seguida da evaporação do solvente. Para a preparação, 5 mg de dacarbazina (que representa 10% da massa de polímero a ser adicionada à micropartícula) foi solubilizada em 1 mL de PVA a 0,1%.

Em seguida, foi adicionado 1mL da solução anteriormente descrita com dacarbazina, em 3mL de diclorometano, no qual 50 mg de PLA (com uma massa molar de 60.000 g/mol) foram previamente solubilizado. A mistura foi processada durante 2 minutos a 17418,2G (12.000 rpm utilizando o ultra-turrax - T18, IKA) para produzir uma emulsão água em óleo (A/O). Em seguida, uma nova emulsão foi preparada com 6 mL de solução de PVA a 1% e novamente aplicada no ultra-turrax por 2 min para produzir uma emulsão final do tipo água/óleo/água (A/O/A).

As micropartículas de PLA sem fármaco foram preparadas aplicando-se a mesma metodologia sem a utilização do fármaco, para comparação do perfil de biodistribuição nos animais.

O diclorometano foi evaporado sob pressão reduzida durante 1 hora a 25 °C. As micropartículas PLA-Dacarbazina (MP-DITC) foram recuperadas por centrifugação durante 20 minutos a 48383,9G (20.000 rpm utilizando a Ultracentrífuga – Avanti J 25, Beckman Coulte) e lavadas duas vezes com água destilada para remover o excesso de PVA não houve centrifugação entre as lavagens.

### 3.3 Caracterização das Micropartículas

#### 3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise morfológica das micropartículas de PLA-Dacarbazina (MP-DITC) foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura modelo TM 3000(Hitachi) com tensão de 10kV. Uma quantidade de 10  $\mu$ L das micropartículas foi adicionada em uma fita de carbono para análise. As análises de MEV foram realizadas no Instituto de Engenharia Nuclear (IEN).

#### 3.3.2 Determinação do tamanho por DLS

A técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) (do inglês, Dynamic Light Scattering), também chamada de Espectroscopia de Correlação de Fótons (Photon Correlation Spectroscopy, PCS), é amplamente utilizada para a avaliação das dimensões de partículas em suspensão assim como para avaliar seu perfil hidrodinâmico.

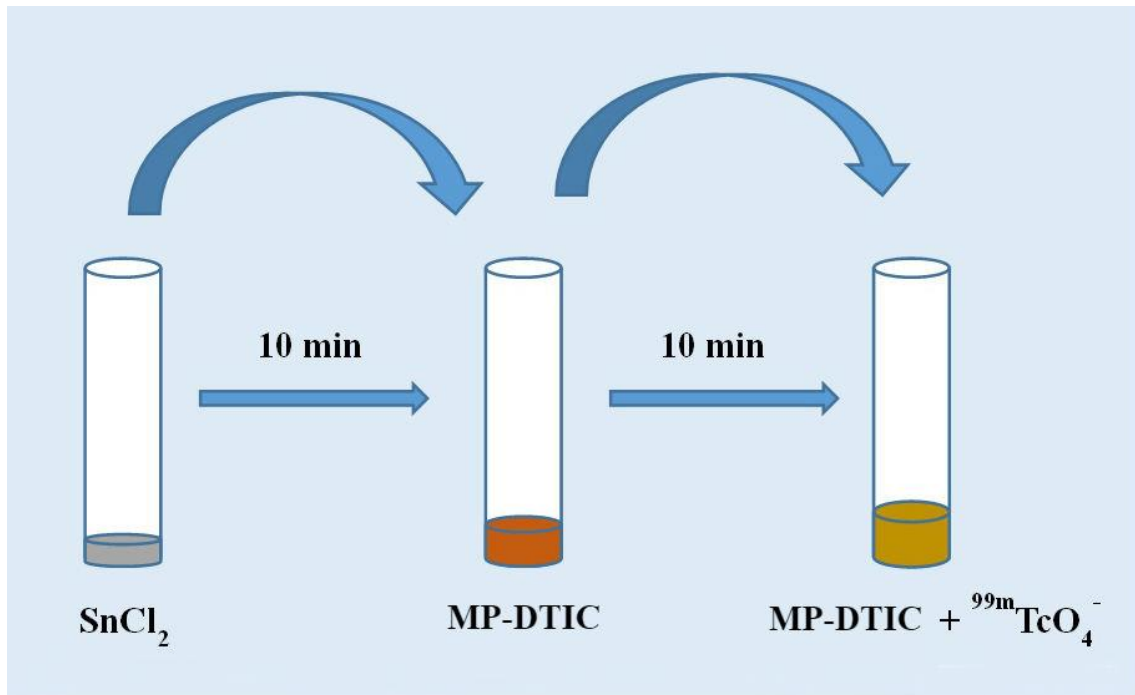
A distribuição de tamanhos das micropartículas, foram determinadas por DLS no equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido). As medições foram em triplicada a 25°C e o ângulo de incidência do laser em relação à amostra foi de 173° utilizando uma cubeta de quartzo de 12 mm<sup>2</sup>. A média  $\pm$  padrão Desvio (DP) foi avaliado.

### 3.4 Marcação da MP-DTIC com Tecnécio-99m (99mTc)

Para a radiomarcagem com 99mTc foi utilizado o cloreto estanoso (SnCl<sub>2</sub>), como agente redutor na concentração de 30  $\mu$ g/mL. Assim, 600 $\mu$ Ci (22,2 MBq) de pertecnetato de sódio (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) foram incubados com uma solução de 30  $\mu$ g/mL de cloreto estanoso por 10 minutos. Em seguida, a essa

solução foram adicionados 150  $\mu\text{L}$  de suspensão a 20% de MP-DTIC e realizada incubação por mais 10 minutos para finalizar o processo de marcação (SÁ et al., 2012, ALBERNAZ et al., 2014;) (Figura 22).

Figura 22- Processo de marcação das MP-DTIC



Fonte: O Autor, 2017.

A qualidade da marcação foi avaliada por meio da cromatografia em papel. O sistema utilizado foi: para fase estacionária foi utilizado o papel Whatman nº 1 (em tiras de 14 cm de comprimento por 1 cm de largura) e para fase móvel foi utilizado a acetona pura. Após a corrida cromatográfica, as tiras foram cortadas ao meio para separar o topo da origem e foi realizada a leitura das mesmas no contador Gama (Perkin Elmer modelo Wizard® 2470). Finalizando, foi calculada a porcentagem de atividade em cada uma das partes das fitas para avaliar o processo de marcação assim como seu intervalo de confiança (ALBERNAZ; SANTOS-OLIVEIRA, 2013).

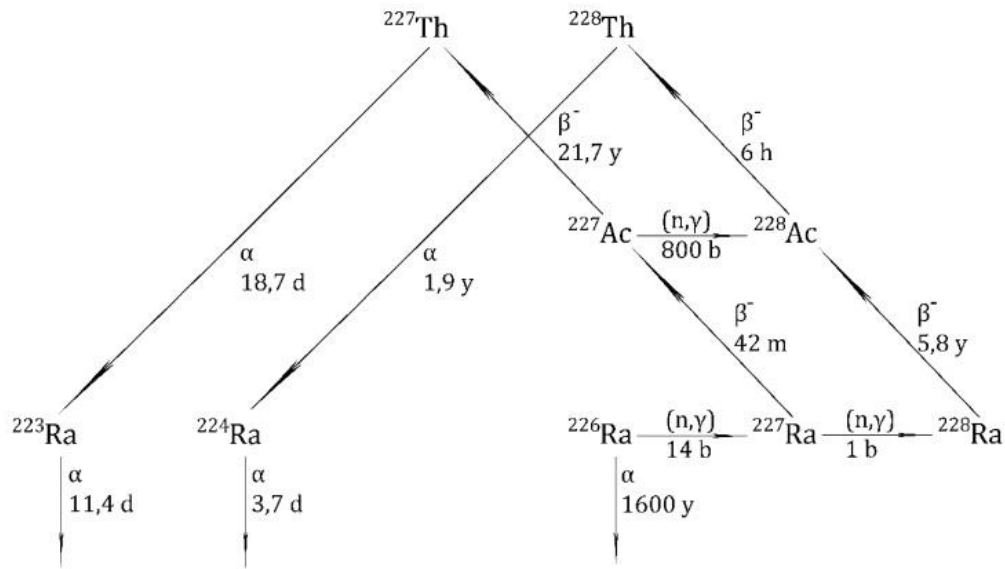
### 3.5 Processo de marcação com o Radio-223 ( $^{223}\text{Ra}$ )

#### 3.5.1 Preparação da solução mãe de $^{223}\text{Ra}$

Embora o  $^{223}\text{Ra}$  seja formado naturalmente pelo decaimento do  $^{235}\text{U}$ , por razões práticas, as preparações envolvendo a irradiação de nêutrons do  $^{226}\text{Ra}$  são mais utilizadas. O método mais conveniente é o uso de um gerador  $^{227}\text{Ac}$  (Actinium-227) /  $^{227}\text{Th}$  (Thorium-227) /  $^{223}\text{Ra}$  (Radio-223) (Figura 23).

A solução mãe de Ra-223 foi preparada utilizando-se uma fonte envelhecida de Ac-227 (Amersham, UK), no qual o equilíbrio com seus produtos de decaimento havia sido obtido por meio de separação em cromatografia de resina, utilizando a resina Dowex-198 (Sigma-Aldrich, Czech Republic) (Kozempel et al, 2015). Assim, um tubo com Ac-227 seco e em pó, foi lavado com 600 $\mu\text{L}$  de uma solução 1M de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ). A essa solução foi adicionado 3,4 mL de metanol. A solução final foi vertida em uma coluna de separação de vidro de 10 cm, preenchida com 2g de Dowex-198. Posteriormente, essa coluna foi eluída com uma mistura (2:8) de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) e 0,7M e metanol. O eluato obtido foi evaporado até secar sob baixa pressão e o pó resultante foi reconstituído em 1mL de uma solução de ácido nítrico 1M. A solução final de Ra-223 apresentou uma atividade aproximada de 1MBq.

Figura 23 - Esquema simplificado da reação do  $^{226}\text{Ra}$  sob irradiação de nêutrons



Fonte: Kozempel et al, 2015.

### 3.5.2 Preparação de Micropartículas de Dacarbazina com $^{223}\text{Ra}$

Aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  da  $^{223}\text{Ra}$  (pH ajustado para 10 com uma solução tampão de amônia 1M) e 300  $\mu\text{L}$  de micropartículas de dacarbazina foram misturadas por vórtex durante 1h em temperatura ambiente. As MP-DTIC- $^{223}\text{Ra}$  foram centrifugadas (20 min a 5000 rpm de velocidade) e o sobrenadante foi removido. As micropartículas foram lavadas novamente com água ultrapura e finalmente deixada em 500  $\mu\text{L}$  de suspensão aquosa.

### 3.6 Análise *in vivo*

#### 3.6.1 Modelos de xenoenxerto do tumor e protocolo cultivo SKMEL-37

As células Skmel-37 foram estabelecidas no Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, N. Y., USA. Estas células foram cultivadas em meio RPMI (Gibco, Life technologies, MD, USA) e suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Gibco, Life technologies, MD, USA) e 50µg/mL de gentamicina (Gibco, Life technologies, MD, USA). As células foram mantidas em estufa umidificada a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. A contaminação por micoplasma foi excluída utilizando o kit de detecção de micoplasma da Lonza. O crescimento das células em monocamada foi realizado em garrafas T75 e o crescimento celular foi observado diariamente através de um microscópio de fase invertida. Para perpetuação da linhagem celular, quando uma subconfluência de aproximadamente 70% foi atingida, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas por 2 vezes com PBS (5mL) e retiradas da garrafa T75 pela ação da tripsina (2mL), durante 5min a 37°C (tripsinização). A inativação da tripsina foi realizada pela adição de 4ml de meio de cultura (RPMI/SFB). As células foram subcultivadas na proporção de 1:10. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias com 10 mL de meio novo. A alteração da coloração do meio de cultura, que indica atividade metabólica celular e alteração de pH, foi controlada diariamente.

Os tumores foram estabelecidos por injeção subcutânea de  $1 \times 10^5$  SK-MEL-37 no flanco direito dos camundongos Balb/c fêmeas com oito semanas de idade. O tamanho do tumor foi monitorado durante mais três semanas e medido. Os camundongos foram observados três vezes por semana para avaliação de paralisia, ascite ou perda de peso.

Figura 24 - Demonstração do resultado da aplicação do tumor no flanco direito.



Fonte: O Autor, 2017.

### 3.6.2 Estudos de biodistribuição

As avaliações da biodistribuição das micropartículas foram feitas em 03 grupos utilizando camundongos balb/c saudáveis divididos em: a) Grupo Controle, utilizando micropartículas vazias (n=6); b) Grupo intervenção utilizando micropartículas carregadas com dacarbazina (n=6) e c) Grupo Controle Positivo usando dacarbazina pura (n=6).

De modo a avaliar sua eficácia foram realizados testes de biodistribuição em camundongos induzidos, da seguinte forma: a) Micropartícula carregada com Dacarbazina (n=4).

Os camundongos foram anestesiados com uma mistura de ketamina a 10% e 2% de xilazina em volume de 15 $\mu$ L e administrada intramuscularmente (coxa).

Os compostos (3,7 MBq em volume de 0,2 mL) foram administrados por via retro-orbital (Figura 25). Após duas horas, os camundongos foram eutanasiados, em câmara de gás de dióxido de carbono, e dissecados para 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). Os resultados foram expressos em dose por órgão e dose por grama de tecido. Foram avaliados: cérebro, pulmão direito, pulmão esquerdo, estômago, baço, intestino delgado, intestino grosso, coração, rim direito, rim esquerdo, fígado, sangue e a lesão (Tumor induzido).

Figura 25 - Demonstração da aplicação retro-orbital.



Fonte: O Autor, 2017.

### 3.6.3 Ensaio de citotoxicidade

As células de melanoma humano, MV3, obtidas do Dr. C. Marcienkewicz (Centro Universitário de Neurovirologia e Biologia do Câncer, EUA), foram cultivadas em DMEM (Meio Dulbecco MEM), foram enriquecidas com FBS (soro fetal bovino) a 10%, bicarbonato de sódio a 3,7 g/L, 5,2 g/L HEPES, 0,5 U/mL de penicilina e 0,5 mg/mL de estreptomicina a 37 °C em 5% de CO<sub>2</sub>.

Após a junção, as células foram separadas por um breve tratamento com Tripsina 0,1% e EDTA 0,01%. Em seguida foram recolhidas por

centrifugação e ressuspensas em solução à 10% de FBS e cultivadas em DMEM ( $10^4$  células/poço) em placas de 96 poços. Depois disso, as células foram tratadas com micropartículas carregadas com Dacarbazina (0,1-10 g/mL) em FBS a 1% fresco e DMEM, a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. Após 72 horas, o ensaio de MTT foi realizado como anteriormente descrito Ribeiro-Pereira em 2014. As células foram incubadas com MTT (1 mg/mL), novamente em 1% de FBS e cultivadas em DMEM, no escuro a 37 °C, durante 2 h, permitindo que MTT seja reduzido a Formazan pelas células viáveis. Os cristais de formazan formados foram dissolvidos em isopropanol durante 30 min e a densitometria óptica foi obtida utilizando um leitor de microplacas (BIO-RAD) com filtro de 570nm. Para o cálculo, uma curva foi construída usando concentrações crescentes das células de MV3 ( $10^3$ - $5 \times 10^4$  células/poço) que foram cultivadas durante a noite a 37 °C em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, para realizar o ensaio MTT como descrito. Os resultados são apresentados como duas experiências independentes e realizadas em triplicada.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

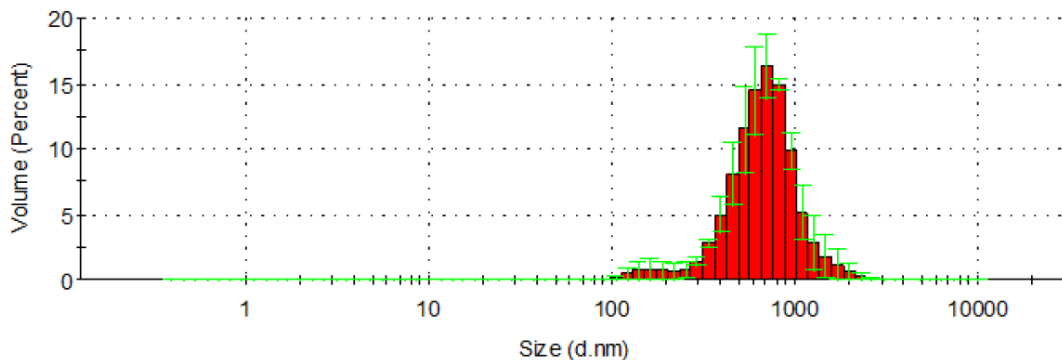
### 4.1 Avaliação do tamanho médio das micropartículas de Dacarbazina

A técnica de espalhamento de luz é usualmente empregada para determinação do diâmetro médio das micropartículas poliméricas, assim como para avaliar seu comportamento hidrodinâmico. Esse método está baseado na propriedade das partículas em suspensão se difundirem por todas as direções e estarem em movimento permanente, espalhando o feixe de luz quando este incide sobre elas, determinando assim, o raio hidrodinâmico das partículas em suspensão.

As MP-DTIC apresentaram um tamanho médio de  $559 \pm 11,5$  nm, com um índice de polidispersão (PDI) de  $0,18 \pm 0,04$  mostrando um tamanho homogêneo para as micropartículas. O valor de polidispersão deve ser, preferencialmente, inferior a 0,20, para amostras homogêneas, ou seja com baixa variação de tamanho. Nesse caso ele foi 0,18 e portanto, corrobora a homogeneidade da amostra. O uso de micropartículas poliméricas como uma ferramenta para transporte de fármacos foi baseado na propriedade de microencapsulação, presentes nessas partículas que possuem uma ação similar a um recipiente, induzindo à liberação mais lenta do fármaco e aumentando assim a eficácia do tratamento.

A escolha do polímero também é um passo importante, pois o polímero deve apresentar alta biodegradabilidade e biocompatibilidade. Nesse caso, a escolha do PLA se motivou por esse motivo, além do mesmo apresentar também pouca imunogenicidade, importante fator para o desenvolvimento de nanoestruturas.

Figura 26 - Tamanho médio e distribuição das MP-DTIC.



Fonte: O Autor, 2017.

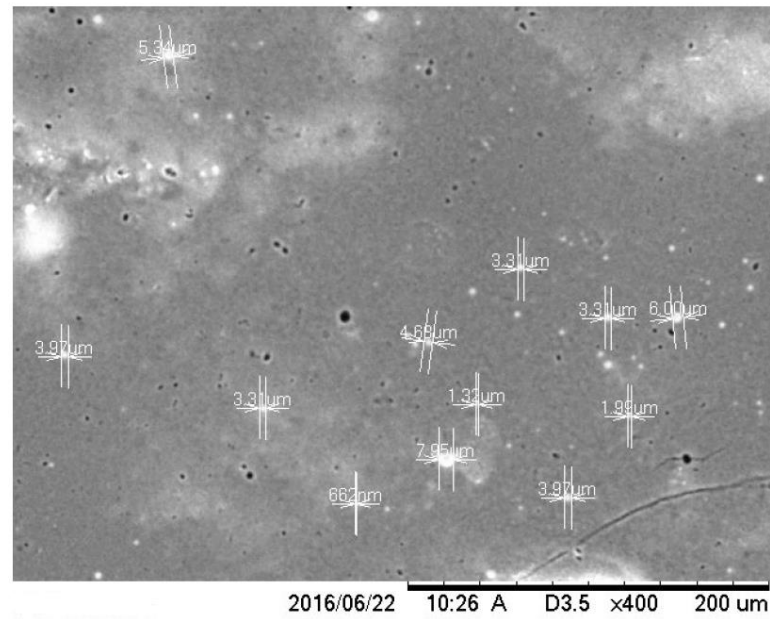
#### 4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Com o objetivo de obter informações relativas à forma das micropartículas, foi realizada em microscópio eletrônico de varredura (MEV). Esta técnica de caracterização possui importância na análise de microesferas obtidas a partir de matrizes poliméricas, pois fornecem informações acerca da morfologia e do tamanho de tais dispositivos.

A análise MEV corroborou com os achados do DLS e confirmou a morfologia das micropartículas, que é esférica. As imagens obtidas pelo MEV (figura 24) demonstraram que as microesferas de PLA com o fármaco Dacarbazina apresentaram uma morfologia esférica, tamanho em escala micrométrica, e uma distribuição de diâmetros uniforme, e ausência de agregação ou adesão.

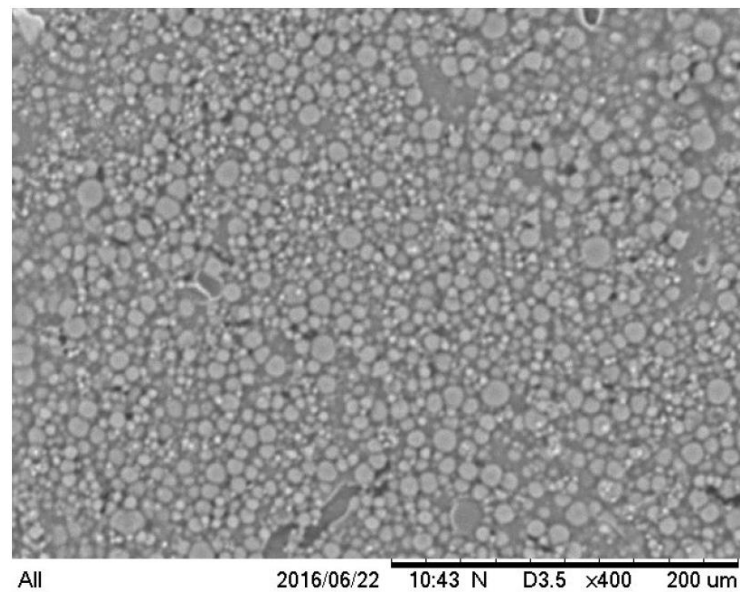
A técnica de microencapsulação, seguida da evaporação do solvente, utilizadas neste trabalho, possibilitou a formação de microesferas com diâmetros médios de 559nm, o que permite que as micropartículas de PLA, possam ser utilizadas em diferentes vias de administração.

Figura 27 - Imagem de MEV mostrando os diferentes tamanhos MP-DTIC formadas durante a microencapsulação.



Fonte: O Autor, 2017.

Figura 28 - Imagem de MEV mostrando as MP-DTIC formadas após a microencapsulação com o tamanho mais frequente de 540nm.

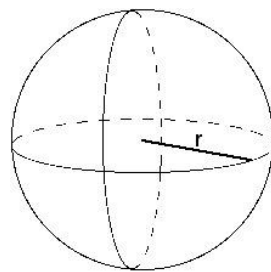


Fonte: O Autor, 2017.

A confirmação da morfologia da micropartícula de dacarbazina possibilita algumas inferências analíticas importantes, em especial quando o uso pretendido é o farmacêutico. Assim, considerando o diâmetro médio das partículas de (559nm), obtidos tanto pelo DLS e confirmados pelo MEV, foi calculado o volume médio da amostra.

O volume médio da amostra foi calculado utilizando-se geometria espacial da circunferência, nesse caso, a fórmula

Figura 29 – Fórmula do volume da circunferência das partículas



$$\text{Volume} = \frac{4}{3}\pi r^3$$

V= volume

$\Pi$ = Constante PI

R= Raio da circunferência

No nosso caso:

$$V = 4/3\pi \times 279,5^3$$

$$V = 0,0351\mu\text{m}^3$$

Fonte: O Autor, 2017.

Assim, considerando o volume da nossa circunferência média, e a densidade do PLA ( $1.430 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) foi estimado que o peso de uma única partícula fosse em torno de  $50 \times 10^{-15} \text{ g}$ . Assim, podemos presumir que 1 mg da solução com MP-DTIC contém  $10^{12}$  micropartículas de dacarbazina.

#### 4.3 Processo de marcação com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$

Todos os compostos (dacarbazina livre, micropartícula vazia e MP-DTIC) foram marcadas com sucesso com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . A média da eficácia da marcação foi superior a 99% em todos os casos (tabela 1).

Tabela 1 - Eficácia do processo de rotulagem com  $^{99m}\text{Tc}$  de Dacarbazina livre, micropartículas vazias e MP-DTIC

Composto	Eficácia marcação em até 6 horas
Dacarbazina livre	99,54 $\pm$ 0,5
Micropartícula vazia	99,85 $\pm$ 0,7
MP-DTIC	99,76 $\pm$ 0,9

Fonte: O Autor, 2017.

#### 4.4 Processo de marcação com o Rádio-223

O rendimento da marcação com  $^{223}\text{Ra}$  foi de 70%. Embora este não seja um valor alto, ele indica a possibilidade de marcação com este radionuclídeo para uso terapêutico. Acredita-se que a facilidade de desconexão entre o radionuclídeo e a micropartícula exija o uso de uma química mais fina, que será usada em trabalhos posteriores.

O rádio-223 é um emissor alfa almejado por ter como característica particular a emissão de partículas alfa de alta energia e curto alcance (<100 $\mu\text{m}$ ) (NILSSON, 2015; YOSHIDA et al., 2016; SARTOR et al., 2016). A radiação de partículas alfas induz principalmente rupturas de DNA da cadeia dupla que resultam em um efeito citotóxico potente e altamente localizado nas áreas afetadas. A pequena área de ação das partículas alfa também propicia uma redução nos efeitos tóxicos e mínima agressão aos tecidos saudáveis (NILSSON, 2015; YOSHIDA et al., 2016; SARTOR et al., 2016).

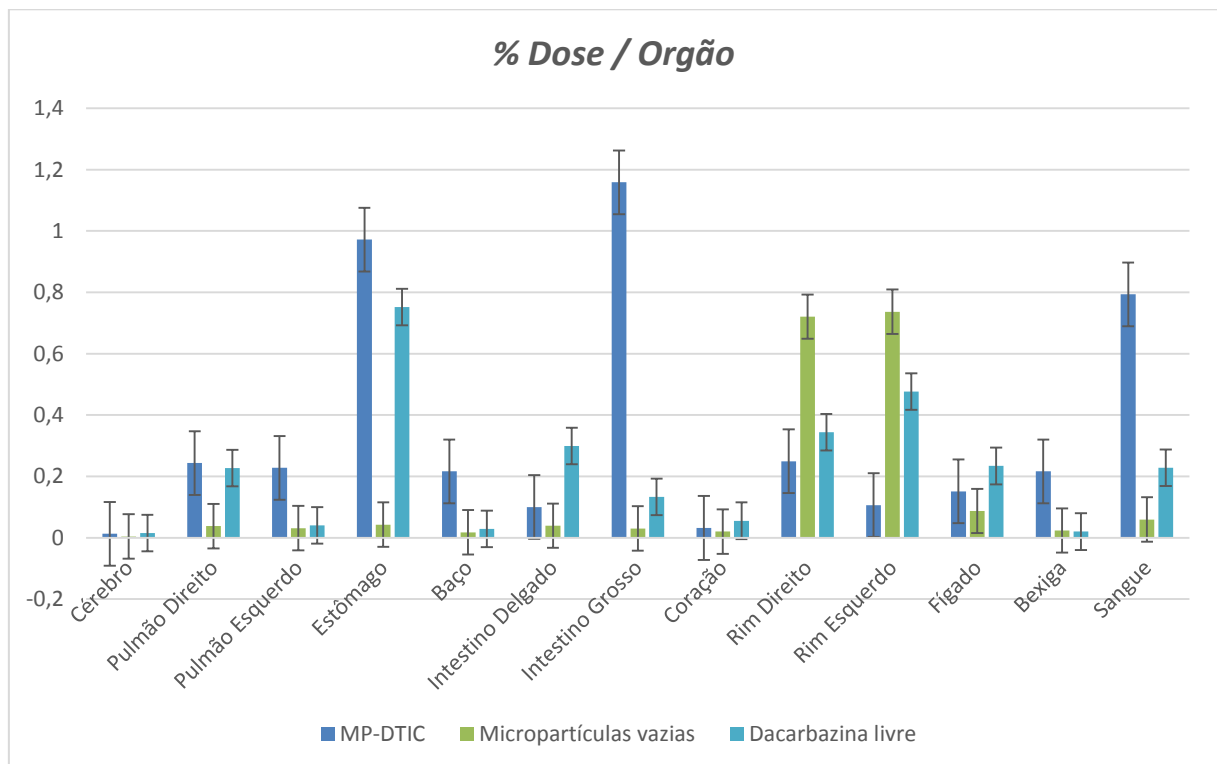
#### 4.5 Biodistribuição das MP-DTIC com tecnécio-99

O estudo de biodistribuição de fármacos é fundamental para definir a aplicação do potencial de novos sistemas de distribuição, como as micropartículas. Quando administradas por via retro-orbital, nosso objeto é

visualizar a interação com os fluidos corporais, tecidos, depuração e se atingem o alvo desejado.

No nosso experimento a biodistribuição em camundongos saudáveis é demonstrada no gráfico 1. Para comparar e compreender o comportamento das micropartículas de dacarbazina em um sistema biológico, foram executados testes de biodistribuição também em camundongos saudáveis com as micropartículas vazias e o fármaco livre (apenas dacarbazina). Todos sofreram o processo de marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ .

Gráfico 1 - A biodistribuição das MP-DTIC, micropartículas vazias e fármaco livre em camundongos saudáveis. Todos marcados com  $^{99m}\text{Tc}$



Legenda: MP-DTIC (Azul Escuro), micropartículas vazias (Verde) e fármaco livre (Azul Claro).

Fonte: O Autor, 2017.

Em todos os casos, a porcentagem de absorção no cérebro foi insignificante. As micropartículas vazias apresentaram uma absorção muito baixa pelo estômago, porém a captação do fármaco carregado e o fármaco livre foram muito elevados, isto ocorre devido ao fato dacarbazina ser um

fármaco citotóxico, classificado como um agente alquilante, agindo de forma mais eficaz na eliminação de células que estão se dividindo rapidamente. Infelizmente, a quimioterapia não sabe diferenciar entre as células cancerosas e as células normais de crescimento acelerado, tais como: as células sanguíneas, células da boca, do estômago, gastrointestinais, intestino e os folículos pilosos. Isso explica a alta presença no estômago e intestino das MP-DTIC, como a dacarbazina livre e a quantidade quase desprezível de micropartículas.

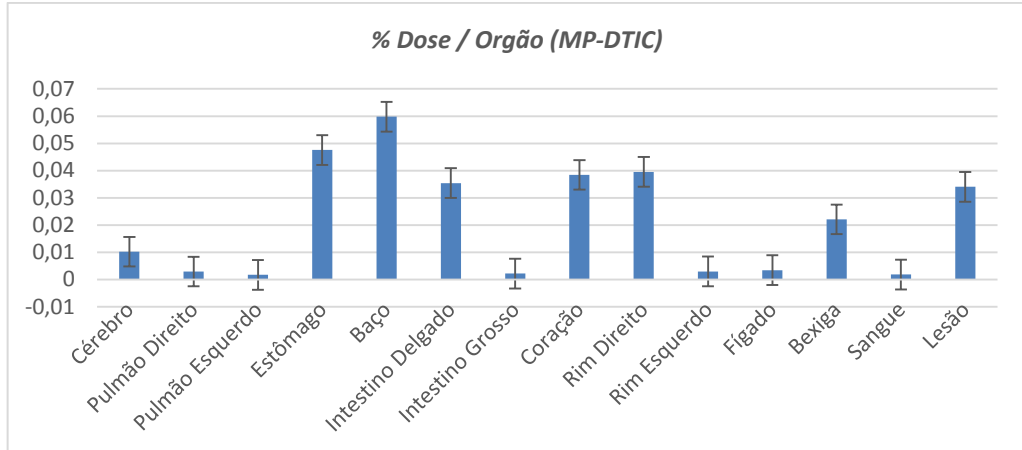
Outro dado importante é a elevada captação da MP-DTIC no intestino grosso. De acordo com Gavhane e Yadav (2012) o local ideal para a absorção do fármaco é através das vilosidades da região proximal ao intestino delgado, de modo geral a alta presença no intestino é uma evolução deste fármaco, quando comparado ao medicamento tradicional (dacarbazina livre). É importante notar que a presença de polímero não interfere neste resultado, uma vez que a absorção da micropartícula vazia é muito baixa no intestino. Outro ponto crucial é a captação pelos rins. Onde é possível observar que as MP-DTIC mostraram uma baixa captação pelos rins quando comparando com a dacarbazina livre e as micropartículas vazias. Isso significa que a micropartículas carregadas (com dacarbazina) possui uma depuração renal, contudo com uma taxa mais baixa do que a fármaco livre.

Este resultado é corroborado pelos dados encontrados no sangue, onde as micropartículas de dacarbazina apresentaram uma alta captação, demonstrando que o sistema de administração de fármacos (micropartículas de dacarbazina) tem uma afinidade por proteínas do sangue, provavelmente a albumina, elevando o tempo de transição pelo sistema, e sucessivamente uma depuração renal reduzida. Está é uma característica adquirida desejável, uma vez que um dos principais objetivos para o uso das micropartículas é o desenvolvimento de um sistema de distribuição sustentável ou longa duração. Também é importante notar que a dacarbazina identificada no fígado e baço foi bem reduzida, conseqüentemente, a eliminação pelo sistema fagocítico mononuclear foi evitada, característica está também desejável em um sistema de administração de fármacos baseado em nanotecnologia.

A biodistribuição em animais induzidos (Gráfico 2) mostrou que as micropartículas são capazes de atingir o tumor (lesão) com uma dose total de  $\Sigma 0,019\text{uCi}$  (20%) do total administrado. Está é uma dose mais do que necessária para o SPECT (tomografia computadorizada de emissão de fóton único) por se tratar de uma técnica não invasiva, poderá ser usado como um método alternativo para o diagnóstico de melanoma metastático. Os resultados confirmaram a alta captação pelo intestino (delgado e grosso) e estômago. Nesse caso, diferentemente dos camundongos saudáveis, acreditamos que ocorreu devido ao fato de que metástase para o gastrointestinal (GI) é um das mais comuns malignidades relacionadas ao melanoma maligno metastático para (Lianget al, 2006). Assim, a presença tanto no intestino como no estômago é justificada.

A captação realizada pelo foi ligeiramente superior ao dos camundongos saudáveis, também explicado pelo fato do fígado ser outro sítio de ação primária das metástases, a explicação da presença de um tumor de atividade hepática é totalmente plausível, como consequência, o aumento da captação no órgão. Novamente, a baixa captação pelo baço confirma o não reconhecido pelo sistema fagocítico mononuclear das micropartículas. A alta presença de captação no sangue corrobora novamente que as micropartículas devem ter uma elevada afinidade pela albumina, aumentando o tempo de circulação. Podemos observar também, que a absorção realizada pelo cérebro permanece insignificante e o eliminação foi a mesmo que nos animais saudáveis.

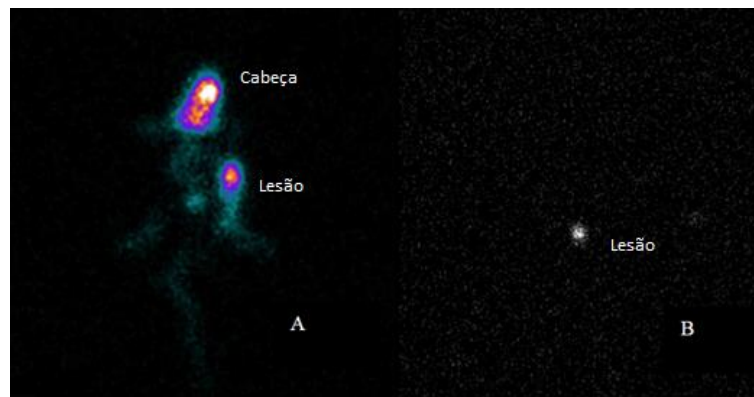
Gráfico 2 - Perfil de biodistribuição em camundongos induzidos com as MP-DTIC.



Fonte: O Autor, 2017.

Os dados da imagem SPECT (figura 30) demonstraram o uso potencial da partícula para imagens em animais induzidos com melanoma. Mesmo em doses relativamente baixas (3,7 MBq) foi possível a identificação da lesão em imagem.

Figura 30 – Imagem SPECT do camundongo



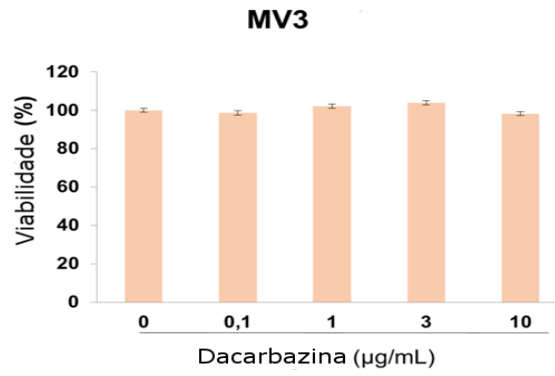
Legenda: (A) Imagem planar de todo o corpo do animal e (B) Imagem plana somente da lesão com tumor induzido.

Fonte: O Autor, 2017.

#### 4.6 Citotoxicidade

Os resultados da citotoxicidade (Gráfico 3) mostraram que as MP-DTIC não teve efeito citotóxico, as células MV3 apresentaram índices de sobrevivência próximos ao de 100%. Esse resultado era esperado, porque a quantidade de dacarbazina utilizada para a produção de micropartículas foi bem reduzida do que em relação ao usado no tratamento convencional. Também é um resultado desejável, uma vez que esta micropartícula possui fins de uma ferramenta diagnóstica.

Gráfico 3 - Resultado da citotoxicidade das micropartículas em células MV3, demonstrando a segurança das MP-DTIC para o uso em diagnóstico.



Fonte: O Autor, 2017.

## CONCLUSÃO

Nos últimos anos o desenvolvimento de novas abordagens, tanto terapêuticas como diagnósticas, tem se intensificado com o objetivo de um diagnóstico precoce e um tratamento mais específico às células cancerígenas e menores danos as células normais. Portanto, torna-se extremamente importante o desenvolvimento de uma tecnologia específica, sensível e confiável que permita a realização do diagnóstico precoce e preciso. Neste perfil, encontram-se a nanotecnologia como uma ferramenta significativa no arsenal terapêutico no combate ao câncer.

A técnica de dupla emulsão, utilizada neste trabalho, possibilitou a obtenção de micropartículas de PLA com alta eficiência de encapsulação do quimioterápico dacarbazina. A análise das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), demonstra que as micropartículas apresentaram morfologia esférica, tamanho em escala micrométrica e baixa distribuição de diâmetros. Esta apresentação de microesferas pode ser utilizada em estudos *in vivo*, visando aplicações em diferentes rotas de administração.

Houve sucesso nos resultados da biodistribuição, com a marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ , demonstraram que as micropartículas de dacarbazina podem ser utilizadas associadas ao SPECT como um radiofármaco para o diagnóstico de melanoma metastático, futuramente poderá ser usada como uma técnica alternativa não invasiva. Porém, resultados confirmaram a alta captação pelo intestino e estômago, para outros estudos, testar outros polímeros, a fim de tentar reduzir a absorção pelo trato gastrointestinal.

Os resultados com rádio-223 também foram bem promissores, demonstraram o uso com seguro do radiofármaco para uso em terapia. Porém, devemos reforçar que estudos futuros são necessários para aprofundar quanto os efeitos toxicológicos e para confirmar a segurança e adequação do deste complexo para terapia.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, Ossama; MILLER, Daniel D.; BHAWAN, Jag. Cutaneous Malignant Melanoma. **The American Journal of Dermatopathology**, [s.l.], v. 36, n. 5, p.363-379, maio 2014.

ACOSTA, Álvaro Enrique et al. Melanoma: patogénesis, clínica e histopatología. **Rev Asoc Col Dermatol, Bogotá**, v. 2, n. 17, p.87-109, 2009.

AKAGI T, SHIMA F, AKASHI M. Intracellular degradation and distribution of protein-encapsulated amphiphilic poly(amino-acid) nanoparticles. **Biomaterials**. 2011;32(21):4959-67.

AKHTER, ET AL. Nanomedicines as Cancer Therapeutics: Current Status. **Current Cancer Drug Targets**, [s.l.], v. 13, n. 4, p.362-378, 1 maio 2013.

AKSAMITIENE, Edita; KIYATKIN, Anatoly; KHOLODENKO, Boris n.. Cross-talk between mitogenic Ras/MAPK and survival PI3K/Akt pathways: a fine balance. **Biochemical Society Transactions**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.139-146, 1 fev. 2012.

AL-BADR, Abdullah A.; ALODHAIB, Mansour M. Dacarbazine. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, [s.l.], p.323-377, 2016.

ALMEIDA, Vera Lúcia de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.118-129, fev. 2005.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2011, "FAULDACAR"- Dacarbazine – Bula aprovada pela ANVISA em 12/01/2011". Disponível em: <http://paclimed.com.br/wp-content/uploads/2014/12/Fauldacar -Dacarbazine.pdf>. Acessado em 12/12/2015.

AZEVEDO, G. e SILVA MENDONÇA. Risco crescente de melanoma de pele no Brasil. **Revista de Saúde Pública** (SciELO), vol. 26, n. 04. São Paulo, 1992.

AZEVEDO, M.M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos. Monografia. LQES- Laboratório de Química do Estado Sólido. Instituto de Química, Unicamp, 2002.

BALLINGER, James R. Pitfalls and Limitations of SPECT, PET, and Therapeutic Radiopharmaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**, [s.l.], v. 45, n. 5, p.470-478, set. 2015.

BHATTACHARYA, Saveri; SOCINSKI, Mark A.; BURNS, Timothy F. KRAS mutant lung cancer: progress thus far on an elusive therapeutic target. **Clinical And Translational Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.4-35, dez. 2015.

BISWAS, Tithi et al. Primary squamous cell carcinoma of the prostate: a case report of a rare clinical entity. **Future Science Oa**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.1-3, nov. 2015.

BLESSING K & MC LAREN. Histological regression in primary cutaneous melanoma: recognition, prevalence and significance. **Histopathology** 1992; 20:315-22

BRASIL, Ministério da Saúde. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2016. 25p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fisiopatologia do câncer. Ações de enfermagem no controle do câncer. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2002. p. 55-81.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de informações sobre mortalidade (SIM). Brasília, 2013. Disponível em: <<http://www.datasus.gov.br>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

BROETTO, Júlia et al. Tratamento cirúrgico dos carcinomas basocelular e espinocelular: experiência dos Serviços de Cirurgia Plástica do Hospital Ipiranga. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, [s.l.], v. 27, n. 4, p.527-530, dez. 2012.

BRUXEL, Fernanda et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, [s.l.], v. 35, n. 9, p.1827-1840, 2012.

CARDIS, Michael A.; NI, Jonathan; BHAWAN, Jag. Granular cell differentiation: A review of the published work. **The Journal Of Dermatology**, [s.l.], v. 44, n. 3, p.251-258, mar. 2017.

CARVALHO MB, ET AL. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. **Rev Assoc Med Bras** 2001 jul./set.; 47(3).

CASSALI, G. D.; SILVA, A. E.; SERAKIDES, R. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, n. 2, p. 625-633, 2004.

CHABNER, B. A. ET AL. Agentes Antineoplásicos. In: Goodman LS, Gilman A. As Bases farmacológicas de terapêutica. 11 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2006

COCHRAN, Abigail Maciolek et al. Subungual Melanoma. **Plastic And Reconstructive Surgery**, [s.l.], v. 134, n. 2, p.259-273, ago. 2014.

COIMBRA, Patrícia Manuela Almeida. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural**. 2010. 268 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

Cristiane da Silva Melo; Armando da Silva Cunha Junior; Sílvia Ligório Fialho. Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. **Ver Ciênc Farm Básica Apl.**, 2012;33(4):469-477

DEDIVITIS RA, ET AL. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Ver Bras Otorrinolaringol**, 2004 jan/fev. 70(1): 35-40.

DEVITA V.T.; LAWRENCE T.S.; ROSENBERG S.A. DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and Practice of Oncology. 7 ed. Philadelphia, Pa: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.2898 p.

DIEPGEN TL, FARTASCH M, DREXLER H, SCHIMITT J. Occupational skin cancer induced by ultraviolet radiation and its prevention. **J Dermatol**. 2012 Aug;167:76-84. 2.

DUMMER, R et al. The updated Swiss guidelines 2016 for the treatment and follow-up of cutaneous melanoma. **Swiss Medical Weekly**, [s.l.], p.1-10, 22 fev. 2016.

ERCAN, Meral Tayan; CAGLAR, Meltem. Therapeutic Radiopharmaceuticals. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 6, n. 11, p.1085-1121, 1 jul. 2000.

FERLAY, J. ET AL. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, Genève, v. 136, n. 5, p. 359-386, 2015.

FERREIRA FR, NASCIMENTO LFC, ROTTA O. Fatores de risco para câncer da pele não melanoma em Taubaté, SP: um estudo caso-controle. **Rev Assoc Med Bras**. 2011;57(4):431-7.

FRANKEL, Arthur E. Et al. Digoxin Plus Trametinib Therapy Achieves Disease Control in BRAF Wild-Type Metastatic Melanoma Patients. **Neoplasia**, [s.l.], v. 19, n. 4, p.255-260, abr. 2017.

FROUNCHI, Masoud; SHAMSHIRI, Soodeh. Magnetic nanoparticles-loaded PLA/PEG microspheres as drug carriers. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, [s.l.], v. 103, n. 5, p.1893-1898, 30 set. 2014.

GIJS, Marlies et al. Aptamers as radiopharmaceuticals for nuclear imaging and therapy. **Nuclear Medicine and Biology**, [s.l.], v. 43, n. 4, p.253-271, abr. 2016.

GOYAL, Sharad et al. Clinical Management of Multiple Melanoma Brain Metastases. **Jama Oncology**, [s.l.], v. 1, n. 5, p.668-670, 1 ago. 2015.

GRANADA, A., NEMEN, D., DORA, C., NECKEL, G., & LEMOS-SENNA, E. (2009). **O emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados.** *Revista De Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 28(2).

GREISH, Khaled. Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect for Anticancer Nanomedicine Drug Targeting. **Methods in Molecular Biology**, [s.l.], p.25-37, 2010.

HARRINGTON, Emma et al. Diagnosing malignant melanoma in ambulatory care: a systematic review of clinical prediction rules. **Bmj Open**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.014096-14098, mar. 2017.

HERSH, E. M. et al. A randomized, controlled phase III trial of nab-Paclitaxel versus dacarbazine in chemotherapy-naïve patients with metastatic melanoma. **Annals of Oncology**, [s.l.], v. 26, n. 11, p.2267-2274, 26 set. 2015.

HIERONYMUS, Tobin L. et al. The Facial Integument of Centrosaurine Ceratopsids: Morphological and Histological Correlates of Novel Skin Structures. **The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 292, n. 9, p.1370-1396, set. 2009.

HIRST, L. S.; SAFINYA, C. R. Skin Layer at the Actin-Gel Surface: Quenched Protein Membranes form Flat, Crumpled, and Tubular Morphologies. **Physical Review Letters**, [s.l.], v. 93, n. 1, p.1-7, 28 jun. 2004

HOBBS, Robert F et al. A bone marrow toxicity model for <sup>223</sup>Ra alpha-emitter radiopharmaceutical therapy. **Physics in Medicine and Biology**, [s.l.], v. 57, n. 10, p.3207-3222, 1 maio 2012.

HRUSTANOVIC, Gorjan; BIVONA, Trevor G. RAS-MAPK in ALK targeted therapy resistance. **Cell Cycle**, [s.l.], v. 14, n. 23, p.3661-3662, 2 dez. 2015.

HYNES, Nancy E.; LANE, Heidi A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, [s.l.], v. 5, n. 5, p.341-354, maio 2005

IDRISS, Munir H.; MISRI, Rachita; BÖER-AUER, Almut. Orthokeratotic Bowen disease: a histopathologic, immunohistochemical and molecular study. **Journal Of Cutaneous Pathology**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.24-31, 18 set. 2015.

JABR-MILANE, L. S.; VAN VLERKEN, L. E.; YADAV, S.; AMIJI, M. M. Multifunctional nanocarriers to overcome tumor drug resistance. **Cancer Treatment. Reviews.**, v.34, p. 592-602, 2008.

JAIN, A. R. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v.21, n.23, p. 2475-2490, 2000.

JOSEFSEN, Leanne B.; BOYLE, Ross W. Unique Diagnostic and Therapeutic Roles of Porphyrins and Phthalocyanines in Photodynamic Therapy, Imaging and Theranostics. **Theranostics**, [s.l.], v. 2, n. 9, p.916-966, 2012.

KEMP, Michael; SPANDAU, Dan; TRAVERS, Jeffrey. Impact of Age and Insulin-Like Growth Factor-1 on DNA Damage Responses in UV-Irradiated Human Skin. **Molecules**, [s.l.], v. 22, n. 3, p.356-360, 26 fev. 2017.

KHOSRAVI, Hasan; SCHMIDT, Birgitta; HUANG, Jennifer T. Characteristics and outcomes of nonmelanoma skin cancer (NMSC) in children and young adults. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [s.l.], v. 73, n. 5, p.785-790, nov. 2015.

KIRKWOOD JM, ET AL. Advances in the diagnosis and treatment of malignant melanoma. **Semin Oncol** 1997;24 (suppl 4): p.1-48, 1997.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editores. Robbins e Cotran - Patologia: Bases patológicas das Doenças. 7 eds. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p. 1283-133

KUMAR, Rajesh; KAUR, Maninder; SILAKARI, Om. Physiological Modulation Approaches to Improve Cancer Chemotherapy: A Review. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 14, n. 5, p.713-749, 31 maio 2014.

LANG, J.; MACKIE, R.M. Prevalence of Exon 15 BRAF Mutations in Primary Melanoma of the Superficial Spreading, Nodular, Acral, and Lentigo MalignaSubtypes. **J. Invest. Dermatol.**, n.125, p.575-579,2005.

LASITHIOTAKI, I. et al. The presence of Merkel cell polyomavirus is associated with deregulated expression of BRAF and Bcl-2 genes in non-small cell lung cancer. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 133, n. 3, p.604-611, 27 fev. 2013.

LASSALLE, Verónica; FERREIRA, María Luján. PLA Nano- and Microparticles for Drug Delivery: An Overview of the Methods of Preparation. **Macromolecular Bioscience**, [s.l.], v. 7, n. 6, p.767-783, 7 jun. 2007.

LECCIA, M. et al. Prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un mélanome cutané métastatique: recommandations nationales françaises. **Annales de Dermatologie Et de Vénérologie**, [s.l.], v. 141, n. 2, p.111-121, fev. 2014.

LEE, K.Y. & YUK, S. H. Polymeric protein delivery systems. **Progress in Polymer Science**. v. 32, p. 669-697, 2007.

LI, A. The biology of melanocyte and melanocyte stem cell. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, [s.l.], v. 46, n. 4, p.255-260, 20 jan. 2014.

LIN, Jennifer Y.; FISHER, David E. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**, [s.l.], v. 445, n. 7130, p.843-850, 22 fev. 2007.

LO, J. A.; FISHER, D. E. The melanoma revolution: From UV carcinogenesis to a new era in therapeutics. **Science**, [s.l.], v. 346, n. 6212, p.945-949, 20 nov. 2014.

MANTESE SAO, BERBERT ALCV, GOMIDES MDA, ROCHA A. Carcinoma basocelular - Análise de 300 casos observados em Uberlândia - **MG. An Bras Dermatol**. 2006; 81:136-42.

MARACY, Mohammadreza et al. Cost-effectiveness of surgical excision versus Mohs micrographic surgery for nonmelanoma skin cancer: A retrospective cohort study. **Journal of Research in Medical Sciences**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.91-93, 2016.

MARTINEZ-GUTIERREZ, Juan Carlos et al. Diagnosis and management of craniopharyngiomas in the era of genomics and targeted therapy. **Neurosurgical Focus**, [s.l.], v. 41, n. 6, p.2-3, dez. 2016. *Journal of*

MITRA, Devarati et al. An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. **Nature**, [s.l.], v. 491, n. 7424, p.449-453, 31 out. 2012. Springer Nature.

MOTLEY R, KERSEY P, LAWRENCE C. Multiprofessional guidelines for the management of the patient with primary cutaneous squamous cell carcinoma. **Br J Dermatol**.2002; 146:18-25.

MUKHERJI, Deborah et al. Evolving treatment approaches for the management of metastatic castration-resistant prostate cancer – role of radium-223. **Therapeutics And Clinical Risk Management**, [s.l.], p.373-380, maio 2014. Dove Medical Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2147/tcrm.s45667>

NATHANSON L. Spontaneous regression of malignant melanoma: a review of the literature on incidence, clinical features, and possible mechanisms. **Natl Cancer Inst Monogr** 1976; 44:67-76.

NEAGU, Monica et al. Chemically induced skin carcinogenesis: Updates in experimental models (Review). **Oncology Reports**, [s.l.], p.2516-2528, 17 mar. 2016.

NILSSON, Sten. Radium-223 dichloride for the treatment of bone metastatic castration-resistant prostate cancer: an evaluation of its safety. **Expert Opinion on Drug Safety**, [s.l.], v. 14, n. 7, p.1127-1136, 28 maio 2015.

NOHMI, Takehiko; MASUMURA, Kenichi; TOYODA-HOKAIWADO, Naomi. Transgenic rat models for mutagenesis and carcinogenesis. **Genesa and Environment**, [s.l.], v. 39, n. 1, p.5-10, 1 fev. 2017.

OBAID, Nourah; BEDARD, Karen; HUANG, Weei-yuarn. Strategies for Overcoming Resistance in Tumours Harboring BRAF

Mutations. **International Journal of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 18, n. 3, p.585-590, 8 mar. 2017.

OLIVEIRA, L. C. et al. Aplicações das Nanopartículas Lipídicas no Tratamento de Tumores Sólidos: Revisão de Literatura”, **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 695-701, maio 2012.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações Radiofarmacêuticas e suas aplicações. **RBCF**, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.

OLIVEIRA, Rita et al. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.151-165, jun. 2006.

OLIVEIRA, Samantha Sant’ Anna Marotta de. **Nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo tamoxifeno: preparação, caracterização e avaliação in vitro e in vivo**. 2014. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

PANDIT-TASKAR, N.; LARSON, S. M.; CARRASQUILLO, J. A. Bone-Seeking Radiopharmaceuticals for Treatment of Osseous Metastases, Part 1: Therapy with <sup>223</sup>Ra-Dichloride. **Journal of Nuclear Medicine**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.268-274, 16 dez. 2013.

PARKER, C. et al. Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 369, n. 3, p.213-223, 18 jul. 2013.

PARZEN, Jacob S. Et al. Survival after subsequent non-Hodgkin’s lymphoma and non-small cell lung cancer in patients with malignant thymoma. **Journal Of Thoracic Disease**, [s.l.], v. 8, n. 12, p.3605-3613, dez. 2016.

POLLOCK R.; ET. AL. *UICC Manual de oncologia clínica* 8.ed. São Paulo: Fundação Oncocentro, p. 919 2006.

QUEIROZ, E. F. ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL, *IN VITRO*, DE COMPOSTO DERIVADO DE SELÊNIO. Dissertação para a obtenção do título de Mestre. UFRPE, 2016

RAWAT, M., SINGH, D., SARAF, S. Nanocarriers: Promising vehicles for bioactive drugs. **Biol. Pharm. Bull**, v.29, p. 1970-1978, 2006.

STEWART, Eranée; AJAO, Moyosore Salihu; IHUNWO, Amadi Ogonda. Histology and Ultrastructure of Transitional Changes in Skin Morphology in the Juvenile and Adult Four-Striped Mouse (*Rhabdomys pumilio*). **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2013, p.1-11, 2013.

RINN, John L. et al. A Systems Biology Approach to Anatomic Diversity of Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, [s.l.], v. 128, n. 4, p.776-782, abr. 2008.

ROEWERT-HUBER J, LANGE-ASSCHENFELDT B, STOCKFLETH E, KERL H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2007; 157:47-51. 5.

RUBIN AI, CHEN EH, RATNER D. Basal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2005; 353:2262-9. 4.

SAIDAK, Zuzana et al. Mathematical modelling unveils the essential role of cellular phosphatases in the inhibition of RAF-MEK-ERK signalling by sorafenib in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters*, [s.l.], v. 392, p.1-8, abr. 2017.

SANTOS-OLIVEIRA, R. et al. Survey on Radiopharmaceuticals in Brazil: Trends and Analysis. *Current Radiopharmaceuticals*, v. 3, n. 4, p. 304-307, 2010.

SANTOS-OLIVEIRA, R. Nanoradiopharmaceuticals: is that the future for nuclear medicine. *Current Radiopharmaceuticals*, v. 4, n. 2, p. 140-143, apr. 2011.

SARTOR, Oliver et al. Chemotherapy following radium-223 dichloride treatment in ALSYMPCA. *The Prostate*, [s.l.], v. 76, n. 10, p.905-916, 23 mar. 2016.

SBD, Sociedade Brasileira de Dermatologia. Consenso Brasileiro de Fotoproteção(2013). Disponível em: <http://www.sbd.org.br/publicacao/consenso-brasileiro-de-fotoprotecao>, Acesso: em 25/10/16.

SCHNEIDER, Günter et al. Tissue-specific tumorigenesis: context matters. *Nature Reviews Cancer*, [s.l.], v. 17, n. 4, p.239-253, 3 mar. 2017.

SCHREUER, Max et al. Combination of dabrafenib plus trametinib for BRAF and MEK inhibitor pretreated patients with advanced BRAF V600 -mutant melanoma: an open-label, single arm, dual-centre, phase 2 clinical trial. *The Lancet Oncology*, [s.l.], v. 18, n. 4, p.464-472, abr. 2017.

SGOUROS, George; HOBBS, Robert F.; ABOU, Diane S.. The Role of Preclinical Models in Radiopharmaceutical Therapy. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*, [s.l.], v. 34, p.121-125, 2014.

SHENG, Daopeng et al. Efficient and Selective Uptake of TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> by a Cationic Metal–Organic Framework Material with Open Ag<sup>+</sup> Sites. *Environmental Science & Technology*, [s.l.], v. 51, n. 6, p.3471-3479, 3 mar. 2017.

SIEGEL, L. ET AL. Cancer Statistics, 2015. CA, New York, v. 65, n. 1, 2015. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21254/pdf>>. Acesso em: 27 fev. 2017.

SILVA, Bárbara V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Química Nova*, [s.l.], v. 32, n. 2, p.453-462, 2009.

SIRE, Jean-yves; DONOGHUE, Philip C. j.; VICKARYOUS, Matthews K.. Origin and evolution of the integumentary skeleton in non-tetrapod vertebrates. **Journal of Anatomy**, [s.l.], v. 214, n. 4, p.409-440, abr. 2009.

STEWART, B. W.; WILD, C. P. (Ed.). World Cancer Report: 2014. Lyon: IARC, 2014.

SU, Jing et al. Theoretical Studies on the Photoelectron and Absorption Spectra of MnO<sub>4</sub><sup>-</sup> and TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>. **Inorganic Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 17, p.9867-9874, 3 set. 2013.

SUCHÁNKOVÁ, Jana et al. Mutations in the TP53 gene affected recruitment of 53BP1 protein to DNA lesions, but level of 53BP1 was stable after  $\gamma$ -irradiation that depleted MDC1 protein in specific TP53 mutants. **Histochemistry And Cell Biology**, [s.l.], p.1-7, 10 abr. 2017.

SUN, Shuyang et al. Targeting and Regulating of an Oncogene via Nanovector Delivery of MicroRNA using Patient-Derived Xenografts. **Theranostics**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.677-693, 2017.

TIAN, Longlong et al. Radionuclide I-131 Labeled Albumin-Paclitaxel Nanoparticles for Synergistic Combined Chemo-radioisotope Therapy of Cancer. **Theranostics**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.614-623, 2017. Ivyspring International Publisher.

TIWARI, Meenakshi et al. Apoptosis in mammalian oocytes: a review. **Apoptosis**, [s.l.], v. 20, n. 8, p.1019-1025, 10 maio 2015.

TRETYAKOVA, Natalia Y.; GROEHLER, Arnold; JI, Shaofei. DNA-Protein Cross-Links: Formation, Structural Identities, and Biological Outcomes. **Accounts of Chemical Research**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.1631-1644, 16 jun. 2015.

TURNER, Philip Geoffrey; O'SULLIVAN, Joe. Radium-223 dichloride for the treatment of metastatic prostate cancer. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 15, n. 14, p.2105-2111, 4 set. 2014.

VALLABHAJOSULA, S. Molecular Imaging: Radiopharmaceuticals for PET and SPECT. **The Journal of Nuclear Medicine**, v.51, n.4, p. 660-661, abr. 2010.

WALCZAK, Katarzyna; MARCINIAK, Sebastian; RAJTAR, Grażyna. Cancer chemoprevention - selected molecular mechanisms. **Higieny I Medycyny Doswiadczalnej**, Polônia, v. 0, n. 71, p.149-161, mar. 2017.

WEINBERG, R. A. A biologia do câncer. Porto Alegre : Artmed, 2008. 844 p.

WETZIG T, MASCHKE J, KENDLER M, SIMON JC. Treatment of basal cell carcinoma. **JDtsch Dermatol Ges**. 2009.

WILSON, Melissa A.; SCHUCHTER, Lynn M. Chemotherapy for Melanoma. **Melanoma**, [s.l.], p.209-229, 25 nov. 2015.

WU, Hao; WILLIAMS, John; NATHANS, Jeremy. Morphologic diversity of cutaneous sensory afferents revealed by genetically directed sparse labeling. **Elife**, [s.l.], v. 1, p.1-5, 18 dez. 2012.

WU, W.; ZHAO, S. Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.18-26, 20 dez. 2012.

XIN, Yong et al. Meta-Analysis of the Safety and Efficacy of Interferon Combined With Dacarbazine Versus Dacarbazine Alone in Cutaneous Malignant Melanoma. **Medicine**, [s.l.], v. 95, n. 16, p.3406-3410, abr. 2016.

YAMAGUCHI, Y.; HEARING, V. J. Melanocytes and Their Diseases. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.17046-17046, 1 maio 2014.

YAMASAKI, Toshinari et al. Tumor microvasculature with endothelial fenestrations in VHLnull clear cell renal cell carcinomas as a potent target of anti-angiogenic therapy. **Cancer Science**, [s.l.], v. 103, n. 11, p.2027-2037, 10 out. 2012.

YOSHIDA, Keisuke et al. Pharmacokinetics of single dose radium-223 dichloride (BAY 88-8223) in Japanese patients with castration-resistant prostate cancer and bone metastases. **Annals of Nuclear Medicine**, [s.l.], v. 30, n. 7, p.453-460, 7 jun. 2016.

YOSHIDA, Keisuke et al. Pharmacokinetics of single dose radium-223 dichloride (BAY 88-8223) in Japanese patients with castration-resistant prostate cancer and bone metastases. **Annals of Nuclear Medicine**, [s.l.], v. 30, n. 7, p.453-460, 7 jun. 2016.

YUN, Y.H.; GOETZ, D.J.; YELLEN, P.; CHEN, W. Hyaluronan microspheres for sustained gene delivery and site-specific targeting. **Biomaterials**, v.25, p. 147-157, 2004.

## APÊNDICE - Microradiopharmaceutical for Metastatic Melanoma (Artigo publicado)

Pharm Res (2017) 34:2922–2930  
<https://doi.org/10.1007/s11095-017-2275-3>



RESEARCH PAPER

## Microradiopharmaceutical for Metastatic Melanoma

Thiago Goulart Rosa<sup>1</sup> · Sofia Nascimento dos Santos<sup>1</sup> · Terezina de Jesus Andreoli Pinto<sup>2</sup> · Daniele Dal Molim Ghisleri<sup>2</sup> · Thereza Christina Barja-Fidalgo<sup>3</sup> · Eduardo Ricci-Junior<sup>4</sup> · Mohammed Al-Qahtani<sup>5</sup> · Jan Kozempel<sup>6</sup> · Emerson Soares Bernardes<sup>7</sup> · Ralph Santos-Oliveira<sup>1</sup>

Received: 26 August 2017 / Accepted: 1 October 2017 / Published online: 23 October 2017  
 © Springer Science+Business Media, LLC 2017

### ABSTRACT

**Purpose** The purpose of this article was to develop, characterize and test (*in vivo*) dacarbazine microparticles that may be labeled with <sup>99m</sup>Tc and Ra-223 for both use: diagnostic and therapy of metastatic melanoma.

**Methods** We developed by double emulsion solvent evaporation methodology the microparticle. The characterization has been done using, Dynamic Light Scattering (DLS) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The labeling with <sup>99m</sup>Tc and Ra-223 has been done by the direct labeling process. Also the formulation has been tested pre-clinically using Balb/c mice inducted with melanoma, performing the the biodistribution and planar imaging. Cytotoxicity evaluation was also done in M3 V cell line. In order to understand the safety aspects of the microparticles, microbiological study (endotoxin and sterility) has been done. Finally, planar imaging was performed to evaluate the diagnosing aspect.

**Results** The results showed that a 559 nm microparticles was obtained with a spherical shape. The labeling process with <sup>99m</sup>Tc reached over 90% of efficacy. On the other hand, the labeling process with Ra-223 showed a 70% efficacy. The results in inducted animals demonstrated that the microparticles were able to reach the tumor with a high rate (20%). Also demonstrated a low recognition by the Mononuclear Phagocytic System. The cytotoxicity and the microbiological control, corroborates the safety aspect of these microparticles.

**Conclusion** The planar image and the possible labeling with Ra-223, corroborates the use as a therapeutic agent for imaging and therapy of Metastatic Melanoma.

**KEY WORDS** cancer · nuclear medicine · microparticles · radiopharmaceuticals

### ABBREVIATIONS

<sup>99m</sup> Tc	Technetium 99 metastable
Ac-227	Actinium 227
ALM	Acral Lentiginous Melanoma
G	Curie
DLS	Dynamic Light Scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTIC	Dacarbazine
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
FBS	Fetal Bovine Serum
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
IL-2	interleukin-2
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
LMM	Lentigo Malignant Melanoma
MBq	Mega Becquerel
MM	Metastatic melanoma

✉ Ralph Santos-Oliveira  
[presidenciairadiofarmacia@gmail.com](mailto:presidenciairadiofarmacia@gmail.com)

<sup>1</sup> Brazilian Nuclear Energy Commission Nuclear Engineering Institute  
 Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo  
 São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Molecular and Cellular Pharmacology; Department of Cell Biology, Institute of Biology Roberto Alcântara Gomes, Biomedical Center State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>4</sup> Faculty of Pharmacy Federal University of Rio de Janeiro  
 Rio de Janeiro, Brazil

<sup>5</sup> Cyclotron and Radiopharmaceuticals Department  
 King Faisal Specialist Hospital and Research Center  
 Riyadh, Saudi Arabia

<sup>6</sup> Katedra jaderné chemie FJRI ČVUT v Praze  
 Prague, Czech Republic

<sup>7</sup> Centro de Radiofarmácia  
 Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares  
 São Paulo, Brazil

microparticle, loaded microparticle with dacarbazine and free dacarbazine), were incubated with the  $^{99m}\text{Tc}$  reduced solution for another 10 min.

### Quality Control of the Labeling Process

In order to characterize the labeled compounds (empty microparticle, loaded microparticle with dacarbazine and free dacarbazine), paper chromatography was made using Whatman paper n° 1. The paper chromatography was performed using 2  $\mu\text{L}$  of the labeled-compound, and acetone (Sigma-Aldrich) as mobile phase. The radioactivity of the strips was verified in a gamma counter (Perkin Elmer Wizard® 2470, Shelton, CT City, State).

### Stability

In order to characterize the stability of the labeled microparticle loaded with dacarbazine, paper chromatography was made using Whatman paper n° 1 in 5 different times (0,1,2,4 and 6 h). Before each performance of paper chromatography the labeled microparticle were left in a solution of NaCl (0,9%) by the time expressed above. The paper chromatography was performed using 2  $\mu\text{L}$  of the labeled-microparticle and acetone (Sigma-Aldrich) as mobile phase. The radioactivity of the strips was verified in a gamma counter (Perkin Elmer Wizard® 2470, Shelton, CT City, State).

### Labeling with Radium 223

#### Preparation of $^{223}\text{Ra}$ Stock Solution

Aged  $^{227}\text{Ac}$  source in equilibrium with its decay products was used for the preparation of  $^{223}\text{Ra}$  stock (Amersham, UK), using the Dowex-1 98 resin (Sigma-Aldrich, Czech Republic) (24). Shortly, the vial with dry  $^{227}\text{Ac}$  source was washed with 600  $\mu\text{L}$  of 1 M  $\text{HNO}_3$  and the obtained 116 solution was mixed with 3.4 mL of methanol and loaded on a 10 cm glass disposable column (Sigma-Aldrich, Czech republic) loaded with approx. 2 g (wet weight) of Dowex-1 98 resin. The gravitational force elution of  $^{223}\text{Ra}$  was performed with a mixture of 0.7 M  $\text{HNO}_3$  and 80% methanol. The collected eluate was evaporated to dryness on a rotary vacuum evaporator and reconstituted in 1 mL of 1 M  $\text{HNO}_3$ . The  $^{227}\text{Ac}/^{223}\text{Ra}$  generator was milked every 2 weeks. The final  $^{223}\text{Ra}$  stock solution activity was approximately 1 MBq ( $aV\ 126 = 1\ \text{MBq/mL}$ ).

#### Preparation of $\text{Ra-223}$ Labeled Dacarbazine Microparticles

Approximately 300  $\mu\text{L}$   $\text{Ra-223}$  stock solution (pH adjusted to 10 with aqueous ammonia) was added to 300  $\mu\text{L}$  of dacarbazine microparticles and reaction mixtures were

vortex-shaken during 1 h at laboratory temperature.  $^{223}\text{Ra}$ -dacarbazine microparticles were centrifuged (20 min at 5000 rpm speed) and the supernatant was removed.  $^{223}\text{Ra}$ - dacarbazine microparticle were washed again with ultrapure water and finally left in 500  $\mu\text{L}$  water suspension.

### In Vivo Analysis

#### Tumor Xenograft Models

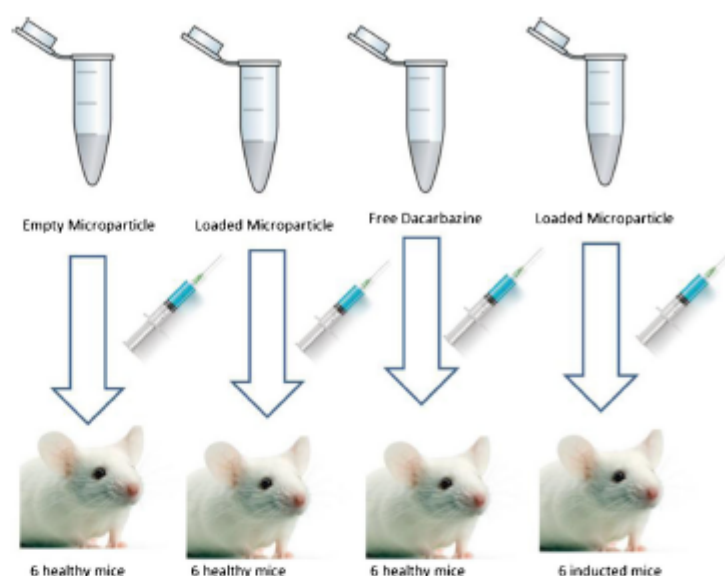
SK-MEL-37 cells (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, N. Y., USA) were cultured in RPMI (Gibco, Life technologies, MD, USA) supplemented with 10% of fetal bovine serum (Gibco, Life technologies, MD, USA) and 50  $\mu\text{g/mL}$  of gentamicin (Gibco, Life technologies, MD, USA). Mycoplasma contamination in cultured cells was excluded using Lonza Mycoplasma Detection Kit.

Tumors were established by subcutaneous (sc) injection of  $1 \times 10^5$  SK-MEL-37 cells at the right flank of eight-week-old female Balb/c nude mice. 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 Studies

Evaluation of the biodistribution (Fig. 1) was made with 3 groups using healthy mice: a) Control Group using empty microparticles ( $n = 6$ ), b) Intervention Group using loaded microparticles with dacarbazine ( $n = 6$ ) and c) Positive Control Group using free dacarbazine ( $n = 6$ ), and 1 group using induced mice with metastatic melanoma: a) Microparticle Loaded with Dacarbazine as described in Fig. 1. All labeled with  $^{99m}\text{Tc}$ . Mice were anesthetized with mix solution of 10% Ketamine and 2% Xylazine in volume of 15  $\mu\text{L}$  and administered intramuscularly (thigh). The 4 compounds (3.7 MBq in volume of 0.2 mL) were administered by retro-orbital via. All the groups were sacrificed by asphyxiation using a carbon dioxide gas chamber after two hours (120 min) of radio-compound administration. Organs (brain, lungs, kidneys, stomach, small and large intestine, bladder, heart, blood pool and tumor) were removed, weighted and the activity in each organ and blood was counted by a gamma counter (Perkin Elmer Wizard® 2470). The results were expressed as  $\mu\text{Ci/g}$  organ. This study and the animal procedures were approved by the University of Pernambuco Ethics Committee, under the number: 23,076,020,578,201,327. All animal experiments were done in accordance with the regulations and guidelines

**Fig. 1** Schematic Experimental Design



of Brazilian Law for animal experiments (Law number 11.794/2008 and Decree 6.899/2009).

#### Planar Imaging

Planar images were obtained 90 min after retro-orbital injection of the  $^{99m}\text{Tc}$ -Dacarbazine microparticles (2.7 MBq in 0.3 mL) in one mice, integrating for 5 min radiation counts centered at 140 KeV, with a Millennium Gamma Camera (GE Healthcare, Cleveland, USA), using a 15% window.

#### Cytotoxicity Assay

MV3 human melanoma cells, obtained from Dr. C. Marcenikewicz (Temple University Center for Neurovirology and Cancer Biology, PA, USA), were cultured in DMEM, enriched with 10% FBS, 3.7 g/L sodium bicarbonate, 5.2 g/L HEPES, 0.5 U/mL penicillin, and 0.5 mg/mL streptomycin at 37°C/5% CO<sub>2</sub>. After reaching confluence, cells were detached by a brief treatment with 0.1%/0.01% trypsin/EDTA, collected by centrifugation, re-suspended in fresh 10% FBS medium DMEM and cultured (104 cells/well) on 96-well flat plates, overnight. After that, cells were treated with microparticles loaded with Dacarbazine (0.1–10 µg/mL) in fresh 1% FBS medium DMEM, at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub>. After 72 h, MTT assay was performed as previously described (25). Briefly, cells were incubated with MTT (1 mg/ml) in 1% FBS DMEM, in the dark at 37°C, for 2 h, allowing MTT be reduced to formazan crystals by viable cells. The formazan crystals formed were dissolved in isopropanol for 30 min and the optical densitometry obtained using a microplate reader (BIO-RAD) with 570 nm filter. For calculation, a standard curve was built using increasing

concentrations of adhered MV3 cells (103–5 × 10<sup>4</sup> cells/well) cultured overnight at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, to perform The MTT assay as described. Results are shown as percentage of control, of two independent experiments performed in triplicate.

#### Bacterial Endotoxins Test

Water for injection; *Escherichia coli* standard endotoxin (Endosafe TM, lot N0: EX 64062); disposable polypropylene pipet tips; LAL reagent (Limulus Amebocyte Lysate) (Endosafe TM, lot N0: H1901L); pyrogen-free test tubes (10 mm x 75 mm; 18 mm x 150 mm); graduated pipettes; automatic pipette (Brand®, Transferpette); Minishaker (Ika-Works®); drying oven (Nova Ética); heated ultrasonic bath (Ultrasonic Cleaner, Unique).

All materials used were submitted to dry heat (250°C). The LAL reagent and the endotoxin standard lyophilized were stored in cold temperatures between 2 and 8°C, according the label before use. The LAL reagent was solubilized in water for injection, according to the manufacturer's specifications. Serial dilutions prior to use confirmed a LAL dot sensitivity of 0.125 EU/mL. Standard endotoxin solution was prepared according with the specifications in the label preparation, using water for injection as a diluent.

Samples of dacarbazine microparticles were prepared in water for injectable and serial dilutions have been carried out using the same solvent to obtain 0.52 EU/mL.

The gel Clot LAL test was conducted in duplicate in accordance to the General Chapter <85> Bacterial Endotoxins Test of the United States Pharmacopeia (USP 39).

### Sterility Test

Trypticase soy broth (TSB) (Difco™); trypticase soy agar (TSA) (Difco™); trypticase soy agar (Difco™); thioglycollate medium (Oxoid™); petri dishes (Interlab™); laminar flow cabinet (Veco do Brasil Ind. Com. Equipamentos Ltda®; Biosafe Plus Classe II Tipo B2); autoclave (Sercon®; HSI 0101); pH-meter (Micronal®, B474); colony counter (Phoenix®, CP600 Plus); automatic pipette (MLA®); laboratory incubator (Fanem®; 347-CD); semi-analytical balance (Gehaka®; BG 1000).

Direct inoculation method described in the United States Pharmacopeia, General Chapter <71> Sterility tests, was applied. The dacarbazine microparticle samples were directly transferred aseptically into media to assess presence of any viable organism. The test was performed in duplicate.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Dacarbazine Microparticle Mean Size Assessment

Dacarbazine MPs presented a mean size of  $559 \pm 11.5$  nm, with a PDI of  $0.18 \pm 0.04$  showing homogeneous size for the microparticle (Fig. 2). The use of polymer microparticle as a tool for drug delivery was based in the property of acting as depots, leading to the slow release of the drug and thereby enhancing the efficacy of the treatment. It is also important that the polymer biodegradability and biocompatibility with the body, avoiding cytotoxicity was planned. The low value of PDI corroborates the homogeneity of the microparticles.

### Scanning Electron Microscopy (SEM)

The SEM analysis corroborated the DLS findings and confirmed the morphology of the microparticles, as spherical. Considering the average diameter of the microparticles (559 nm) which corresponds to a volume of  $0,035 \mu\text{m}^3$ , assuming the spherical shape of the microparticle, the circumference eq.  $(4/3\pi r^3)$  and the density of the PLA ( $1.430 \text{ g cm}^{-3}$ ), we estimated that the weight of one single microparticle was about  $50.10^{-15}$  g. Hence, we assumed that in 1 mg of

the solution of the dacarbazine microparticles, we have  $10^{12-13}$  dacarbazine microparticles (Figs. 3 and 4).

### Labelling with $^{99m}\text{Tc}$

All the compounds (free dacarbazine, empty microparticle and loaded microparticles with dacarbazine) were successfully labeled with  $^{99m}\text{Tc}$ . The average of labeling efficacy was over 99% in all cases (Table 1).

### Stability

The stability of the labeling process from the dacarbazine microparticle with the  $^{99m}\text{Tc}$  was checked and the values are expressed in Table 2.

Is possible to observe that after 6 h the  $^{99m}\text{Tc}$  is still labeled with the dacarbazine microparticle, corroborating its stability.

### Labeling with $^{223}\text{Ra}$

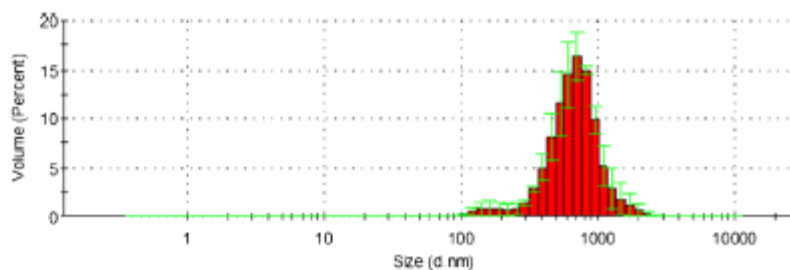
Although the results obtained from Ra-223 showed the possibility of labeling with this radionuclide for therapy (70% yield radiolabeling), the low stability of this labeling process (after 3 washes the radiocomplex reduced this value to almost 50%) suggesting that structural modifications of the dacarbazine-microparticles would be needed for stable therapeutically nuclide labeling. But is a promising field that will be exploited in future studies.

### Biodistribution

The biodistribution in healthy mice is showed in Fig. 5. In order to compare and understand the behavior of the dacarbazine microparticles in a biological system, was also made the biodistribution in healthy mice of the empty microparticles and the free drug (dacarbazine solely), all labeled with  $^{99m}\text{Tc}$ .

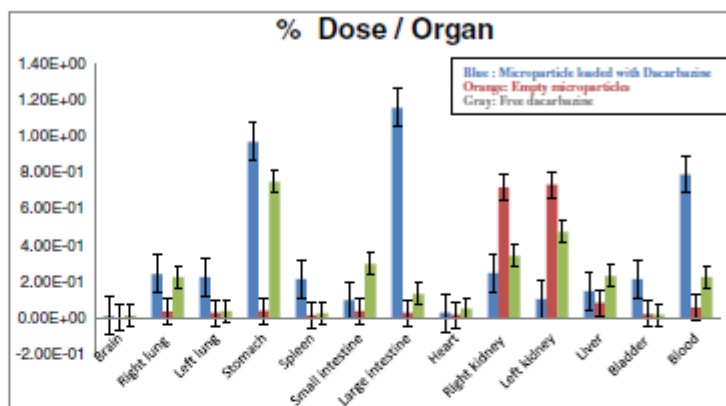
In all the cases the percentage uptakes in brain were negligible. The empty microparticles showed a very low uptake by the stomach, however the uptake of the loaded and the free drug were very high, this occur due the fact that dacarbazine is

**Fig. 2** Dacarbazine MPs mean size and size distribution





**Fig. 5** Biodistribution of the compounds in healthy mice in order to compare with the induced mice and better understand the biological behavior. In blue is the biodistribution of the dacarbazine microparticle, in red the empty microparticle and in green the free dacarbazine



total amount of loaded microparticles that reached the metastatic melanoma confirms that loaded microparticles labeled with Ra-223 may be used as therapeutic carrier for alpha-radiotherapy using microradiopharmaceutical.

The results confirmed the high uptake by the intestine (small and large) and stomach. In this case, the possible explanation is the excretion via and the cell-cycle non-specific mechanism (both explained above). Another explanation may be given by Liang *et al.* (28). According to the authors, differently of the healthy mice in the induced mice with malignant melanoma early and palpable metastases into the gastrointestinal (GI) tract may be the responsible for the uptake, considering that GI tract is the most common site for metastases. The uptake by the liver was slightly higher than in the healthy mice. This is explained by the fact that during a cancer disease all the hepatic function is highly activated and as a consequence the uptake may be also very high. Nevertheless the size of the microparticles also facilitates its uptake by the liver. However, the low uptake by the spleen confirms the non recognition by the MPS (mononuclear phagocytic system). The high presence of microparticles in

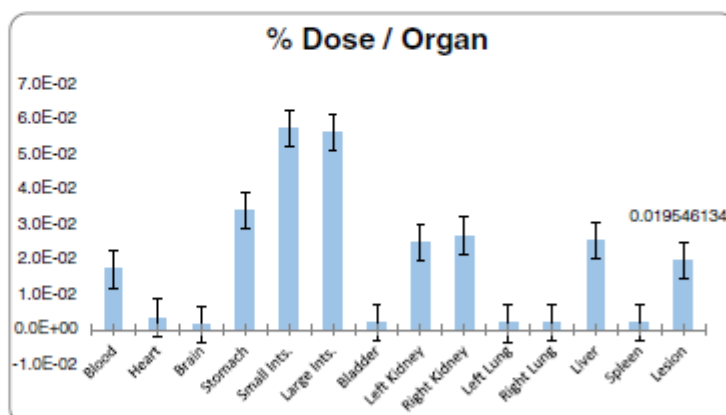
blood corroborates that the microparticles must have a high affinity by the albumin, increasing the circulating time. It is also important to notice that the uptake by the brain remains negligible and the renal clearance was the same as in the healthy animals corroborating that due the size these microparticles should have enterohepatic excretion.

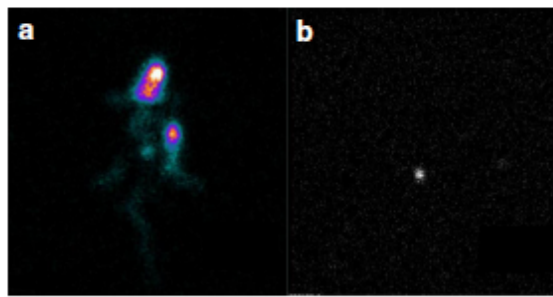
The data from planar image (Fig. 7) demonstrated the potential use of the microparticles for imaging melanoma in induced animals.

### Cytotoxicity

The results of the cytotoxicity in M3 V cells (Fig. 7) showed that the Microparticle loaded with Dacarbazine have non-cytotoxicity effect. This result was expected since the amount of dacarbazine used for the production of microparticle was much lower (less than 10% of the therapeutic dose). So, the observed effect will be exclusively due to the microparticle-associated radionuclides and not due the microparticle itself (Fig. 8).

**Fig. 6** The biodistribution in induced mice of the microparticles loaded with dacarbazine





**Fig. 7** a Picture of the induced mice showing the tumor growth in the mouse right thigh muscle. b Planar image of the whole body of the mice and c planar image of the excised lesion showing the regular uptake of the labeled microparticles.

**Bacterial Endotoxins Test**

After the incubation time, no growth was observed, as expressed in Fig. 9.

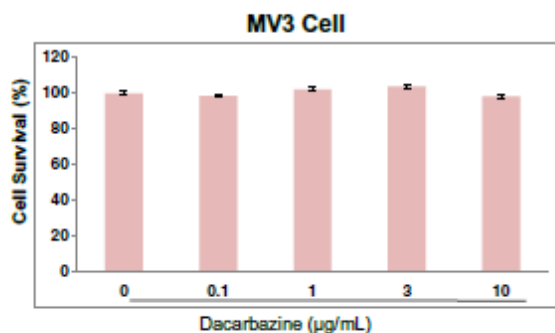
**Sterility Test**

The result was negative for bacterial growth as expressed in Fig. 10.

In both cases the production under pharmaceutical conditions and the labeling process did not contaminate the formulation. These results confirm the possibility of use this methodology to produce microradiopharmaceutical as kit for in house labeling at radiopharmacies.

**Conclusion**

The results showed that the dacarbazine microparticles may be used as SPECT microradiopharmaceutical labeled with <sup>99m</sup>Tc for diagnosing metastatic melanoma as an alternative, noninvasive technique. Also showed the possibility to label with Ra-223, endowing this microparticles of therapeutic properties, especially for alpha-therapy. The safety of this



**Fig. 8** Cytotoxicity result of the microparticles loaded with dacarbazine, showing the safety for use

	λ (0.125 EU/mL)	
	0 EU/mL	0.52 EU/ml
Dacarbazine Microparticle	Green	Green
Positive Control	Red	Red
Negative Control	Green	Green

Positive control was microbiological solution with *E. coli*

Negative Control: sterile water

Legend: Green: no clot formation and Red: clot formation

**Fig. 9** Limulus Amebocyte Lysate result from the Dacarbazine microparticle. Positive control was microbiological solution with *E. coli*. Negative Control: sterile water. Legend: Green: no clot formation and Red: dot formation

microradiopharmaceutical was corroborated by the cytotoxicity and the microbiological test. In the view of all data collected in this study we believe that this microparticle is a promising therapeutic agent for metastatic melanoma.

**ACKNOWLEDGEMENTS AND DISCLOSURE**

The author(s) declare no competing financial interests. The authors would like to thank the National Scientific and Technological Research Council (CNPQ) and the Rio de Janeiro State Research Foundation (FAPERJ) for funding. All animal experiments were done in accordance with the regulations and guidelines of Brazilian Law for animal experiments (Law number 11.794/2008 and Decree 6.899/2009). No applicable.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Ralph Santos-Oliveira: Conceptualization, methodology, validation, investigation, supervision, and resources. Thiago Goulart Rosa, Sofia Nascimento dos Santos: writing-original draft, writing-review and editing, visualization. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, Daniele Molim Ghisleni, Thereza Christina Barja-Fidalgo and Eduardo Ricci, Mohamed Al-Qhatani, Jan Kozempel and Emerson Soares Bernardes: methodology, investigation, resources, writing-review and



**Fig. 10** Sterility test image showing no growth of bacteria

editing, and project administration and data curation.

## REFERENCES

- Stewart BW, Wild CP, editors. World cancer report: 2014. Lyon: IARC; 2014.
- Siegel L, et al. Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(1):5–29.
- Erdei E, Torres SMA. New understanding in the epidemiology of melanoma. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010;10(11):1811–23.
- Ferlay J, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J cancer Genève*. 2015;136(5):359–86.
- Rutkowski P, Kozak K. News from the melanoma sessions of the European cancer congress 2017. *BMC Med*. 2017;15(1):57.
- Roewert-Huber J, Lange-Aschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2007;157(Suppl 2):47–51.
- Moan J, et al. UVA, UVB and incidence of cutaneous malignant melanoma in Norway and Sweden. *Photochem Photobiol Sci*. 2012;11(1):191–8.
- Hazarika M, et al. U.S. FDA approval summary: nivolumab for treatment of unresectable or metastatic melanoma following progression on ipilimumab. *Clin Cancer Res*. 2017;23(14):3484–8.
- Simon A, Kourie HR, Kerger JL. There still a role for cytotoxic chemotherapy after targeted therapy and immunotherapy in metastatic melanoma? A case report and literature review. *Chin J Cancer*. 2017;36(1):10.
- Hussein MR. Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *J Clin Pathol*. 2004;57:797–801.
- Kim SY, Yun SJ. Cutaneous melanoma in Asians. *Chonnam Med J*. 2016;52(3):185–93.
- Mesbah Ardakani N, et al. Clinical and therapeutic implications of BRAF mutation heterogeneity in metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016 <https://doi.org/10.1111/pcmr.12569>.
- Powell CA. Pulmonary infiltrates in a patient with advanced melanoma. *J Clin Oncol*. 2017;35(7):705–708. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.69.9793>.
- Paolino G, et al. Serum tryptase levels in melanoma patients: case-control study and review of the literature. *G Ital Dermatol Venereol*. 2017; 10.23736/S0392-0488.17.05524-9.
- Weide B, Neri D, Elia G. Intralesional treatment of metastatic melanoma: a review of therapeutic options. *Cancer Immunol Immunother*. 2017; <https://doi.org/10.1007/s00262-016-1952-0>.
- Ernst DS, et al. Burden of illness for metastatic melanoma in Canada, 2011–2013. *Curr Oncol*. 2016;23(6):e563–e570.
- Force J, Salama AK. First-line treatment of metastatic melanoma: role of nivolumab. *Immunotargets Ther*. 2017;6:1–10.
- Bilir SP, et al. Economic burden of toxicities associated with treating metastatic melanoma in the United States. *Am Health Drug Benefits*. 2016;9(4):208–13.
- Xin Y, et al. Meta-analysis of the safety and efficacy of interferon combined with dacarbazine versus dacarbazine alone in cutaneous malignant melanoma. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(16):e3406.
- Atkinson V. Medical management of malignant melanoma. *Aust Prescr*. 2015;38(3):74–8.
- Mundra V, Li W, Mahato RI. Nanoparticle-mediated drug delivery for treating melanoma. *Nanomedicine (London)*. 2015;10(16):2613–33.
- Nieweg OE, Gallegos-Hernández JF. Cutaneous malignant melanoma and the new drugs. *Cir Cir*. 2015;83(2):175–80.
- Pinto SR, et al. In Vivo studies: comparing the administration via and the impact on the biodistribution of radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol*. 2014;41(9):772–4.
- Kozempel J, Vlk M, Málková E, et al. *J Radioanal Nucl Chem*. 2015;304:443.
- Ribeiro-Pereira C, Moraes JA, Souza Mde J, Laurindo FR, Arruda MA, Barja-Fidalgo C. Redox modulation of FAK controls melanoma survival: role of NOX4. *PLoS One*. 2014;9(6):e99481.
- Steinbacher JL, et al. Gd-labeled microparticles in MRI: in vivo imaging of microparticle after intraperitoneal injection. *Small*. 2010;6(23):2678–82.
- Gavhane Y, Yadav AV. Loss of orally administered drugs in GI tract. *Saudi Pharm J*. 2012;20(4):331–44.
- Liang KV, Sanderson SO, Nowakowski GS, Arora AS. Metastatic malignant melanoma of the gastrointestinal tract. *Mayo Clin Proc*. 2006;81(4):511–6.

## ANEXO - Carta de aprovação do Comitê de ética (CEUA-UEZO)



Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste – UEZO  
Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEZO)



Parecer n° 001

Pesquisador Responsável: Prof. Ralph Santos Oliveira

Tipo de Pesquisa: Pesquisa.

Instituição onde será desenvolvido: UEZO

Prazo do Projeto: 01/09/2013 até 01/12/2015

Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: “**Desenvolvimento de nanorradiofarmacos**”, considero que o projeto se encontra adequado e satisfatório de acordo com as exigências das Resoluções que regem esta Comissão.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável a realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Norma de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste.

Rio de Janeiro, 05 de novembro de 2013

Prof. Michel Alexandre Villani Gantus

Coordenador da CEUA-UEZO