

DESENVOLVIMENTO DE MICELAS, CONTENDO PACLITAXEL, RADIOMARCADAS COM TECNÉCIO-99M E ESTUDOS EM ANIMAIS COM TUMOR

Sued E. M. Miranda¹, Caroline M. R Oda², Valbert N. Cardoso¹, Ricardo L. Alves³, Elaine A. Leite², Mônica C. de Oliveira², Renata S. Fernandes², Sávila C. A. Lopes², André L. B. de Barros¹.

1. Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG
2. Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG
3. Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG

Resumo:

O emprego de nanossistemas para o transporte de fármacos antitumorais tem sido uma estratégia promissora para o diagnóstico e tratamento do câncer. Nesse sentido o objetivo deste trabalho foi desenvolver micelas contendo paclitaxel (PTX), radiomarcadas com tecnécio-99m (^{99m}Tc) e avaliar seu potencial como agente terapêutico.

As micelas de DSPE-PEG2000 e DSPE-PEG2000-DTPA, contendo PTX, foram preparadas por hidratação do filme lipídico e avaliadas quanto ao diâmetro médio, potencial Zeta e teor de encapsulação. As micelas foram, ainda, radiomarcadas com ^{99m}Tc e estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas foram realizadas em camundongos BALB/c portadores de tumor 4T1.

As micelas apresentaram propriedades físico-químicas, teor de encapsulação e pureza radioquímica compatíveis com administração endovenosa. Além disso, as micelas apresentaram prolongado tempo de circulação e acúmulo significativo no tecido tumoral, indicando o potencial terapêutico desse sistema.

Autorização legal: Trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da UFMG com número de protocolo 205/2013.

Palavras-chave: Micelas Poliméricas, Radiomarcagem, terapêutico.

Apoio financeiro: CNPQ, FAPEMIG, CAPES

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: PRPQ-FMG

Introdução:

O Paclitaxel (PTX) é um antineoplásico amplamente utilizado em protocolos de tratamento de vários tipos de câncer, porém apresenta baixa biodisponibilidade e alta toxicidade. Nesse sentido, vê-se a necessidade de utilizar sistemas de entrega de fármacos capazes de promover maior solubilidade e diminuir a toxicidade dos fármacos. Dentre os sistemas utilizados para esse fim as micelas poliméricas (MP), estruturas coloidais esféricas formadas espontaneamente, apresentam propriedades interessantes relacionadas ao tamanho e composição que permitem o direcionamento de substâncias terapêuticas e diagnósticas para tumores sólidos.

O principal isótopo utilizado na medicina nuclear é o tecnécio-99m (^{99m}Tc), pois possui características físicas adequadas como decaimento por emissão de radiação gama, meia vida física de seis horas, emissão de fótons de 140 KeV. Nesse sentido o objetivo deste trabalho foi desenvolver micelas contendo paclitaxel (PTX), radiomarcadas com tecnécio-99m (^{99m}Tc) e avaliar seu potencial como agente terapêutico.

Metodologia:

Para o preparo das MP, soluções clorofórmicas de DSPE-PEG2000 e DSPE-PEG2000-DTPA foram transferidas para um balão de fundo redondo e o solvente foi evaporado. Posteriormente, o filme formado foi hidratado com solução salina 0,9% (p/v) para formação das MP. Para o preparo das MP contendo PTX, solução de PTX em clorofórmio foi transferida para o balão, juntamente com o DSPE-PEG2000.

O teor de PTX encapsulado (TE) foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência. As micelas foram, ainda, caracterizadas quanto ao diâmetro médio (DM) e potencial zeta, determinados pela técnica de espalhamento dinâmico da luz.

As micelas compostas de DSPE-PEG2000:DSPE-PEG2000-DTPA (95:5) foram submetidas à marcação com o isótopo

radioativo ^{99m}Tc . Para isso, 250 μL de MP foram adicionadas a um frasco juntamente com 100 μL de solução de cloreto estânico (SnCl_2). O pH foi ajustado para 7,0–8,0, o frasco foi lacrado e realizou-se vácuo. Em seguida, foram adicionados 3,7 MBq de pertecnetato de sódio. A mistura foi agitada e mantida sob vácuo durante 15 minutos. Ao final, o rendimento da marcação foi determinado pela quantificação das impurezas radioquímicas $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$. Para isso, foi utilizada cromatografia em camada delgada para a determinação da primeira, utilizando como fase móvel a acetona e, a segunda foi quantificada e eliminada por um processo de filtração em 0,22 μm .

A radiomarcagem teve sua estabilidade *in vitro* avaliada em solução salina e em plasma de camundongo. Em solução salina, o frasco contendo as MP marcadas foi mantido à temperatura ambiente e, nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 8 horas, alíquotas foram retiradas para a quantificação de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Em plasma, foi utilizada uma proporção de cerca de 100 μL de MP radiomarcadas para cada 1,1 mL de plasma de camundongo. A mistura foi incubada sob agitação à 37°C e, nos tempos 1, 2, 4, 6 e 8 horas, o teor de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ foi quantificado.

Para a depuração sanguínea injetou-se uma alíquota de 3,7 MBq de ^{99m}Tc -DTPA-PM na veia da cauda de camundongos saudáveis ($n = 6$) e recolheu-se amostras de sangue a 1, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120, 240, 360, 480 e 1440 min após a administração. Uma pequena incisão foi feita na cauda distal para facilitar a coleta rápida e confiável do sangue. A percentagem de dose injetada por grama (% ID / g) de sangue foi determinada e os dados expressos em função do tempo.

As células 4T1 foram cultivadas em meio DMEM contendo 10% (v / v) de soro bovino fetal, 100 UI / mL de penicilina e 100 mg / mL de estreptomicina. As células foram mantidas numa incubadora humidificada com atmosfera de CO_2 a 5% a 37 ° C. As células foram cultivadas até à confluência e depois, colhidas com tripsina a 0,25%. Após centrifugação a 500 g durante 5 min, as células foram ressuspensas em DMEM para inoculação em camundongos Balb/c. Para a implantação de tumor, uma alíquota (100 μL) contendo $2,5 \times 10^6$ células 4T1 foi injetada subcutaneamente no flanco direito de camundongos Balb/c fêmeas. Os tumores foram deixados crescer até atingir um volume de 100 mm^3 e depois foram utilizados para estudos de biodistribuição e imagens cintilográficas.

Na biodistribuição uma alíquota de 3,7 MBq de

^{99m}Tc -DTPA-PM foi injetada intravenosamente em cada animal ($n = 6$). Após 1, 4, 8 e 24 h, os animais foram anestesiados com uma mistura de xilazina (10 mg/kg) e cetamina (80 mg/kg). O coração, os rins, o sangue, o estômago, o baço, o fígado, a tireóide, os pulmões, o músculo e o tumor foram removidos. A radioatividade foi medida utilizando um aparelho de cintilação automática, os resultados foram expressos como % ID / g de tecido.

Alíquotas de 37 MBq de ^{99m}Tc -DTPA-PM foram injetadas por via intravenosa em camundongos portadores de tumores ($n = 6$). Os animais foram anestesiados e colocados horizontalmente sob o colimador de uma câmara gama (Mediso, Hungria), empregando um colimador de baixa energia de alta resolução. As imagens foram adquiridas em 1, 4, 8 e 24 h após a injeção. Utilizando um tamanho de matriz de 256x256 16 com uma janela de energia de 20% ajustada a 140 keV durante um período de 300s.

Resultados e Discussão:

As MP preparadas apresentaram valor de potencial zeta igual a $-2,7 \pm 1,1$ mV e $-3,3 \pm 0,3$ mV, e DM de $10,0 \pm 0,2$ nm e $10,2 \pm 0,9$ nm, para MP brancas e contendo PTX, respectivamente. Quanto à a concentração de PTX, o teor de encapsulação foi igual a $91,3 \pm 5,8\%$.

O processo de radiomarcagem demonstrou um rendimento de $93,8 \pm 2,1\%$, com um teor de impurezas igual a $2,0 \pm 1,5\%$ de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $4,3 \pm 0,7\%$ de $^{99m}\text{TcO}_2$. Na avaliação da estabilidade de radiomarcagem, observou-se que esta foi estável, com pureza superior a 90%, durante as 8 horas avaliadas.

O perfil de depuração sanguínea de ^{99m}Tc -DTPA-PM após administração intravenosa em camundongos fêmeas Balb/c saudáveis indica uma decaimento bifásico com uma meia-vida de distribuição e eliminação igual a 65,5 min e 456,3 min, respectivamente. Estudos de biodistribuição e imagens de cintilografia foram realizados em camundongos portadores de tumores 4T1. Foi detectada uma captação significativamente elevada de rim, fígado e baço, sugerindo possíveis vias de eliminação das micelas. Por outro lado, não houve captação significativa no estômago ou na tireóide, demonstrando a pureza da marcação. Calculou-se a razão tumor/músculo, indicando um acúmulo preferencial no tumor e não nos tecidos normais.

Conclusões:

Portanto, conclui-se que foram preparadas MP por um método simples e rápido, com uma boa

capacidade de incorporar o PTX e sem diferenças físico-químicas, sugerindo que a incorporação do PTX não altera a estrutura micelar. E ainda, a adição do conjugado DSPE-PEG2000-DTPA como modificação da superfície, possibilitou a marcação das micelas com ^{99m}Tc , com elevadas pureza e estabilidade radioquímicas. Os estudos in vivo mostraram um longo tempo de circulação e um direcionamento preferencial para o tumor, indicando capacidade para ser potencial teranóstico

Referências bibliográficas

A.L.B. de Barros, A. Tsourkas, B. Saboury, V.N. Cardoso, A. Alavi, Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique, *EJNMMI Res.* 2 (2012) 1–15.

A.L.B. de Barros, V.N. Cardoso, L.G. Mota, R.J. Alves, Synthesis and biodistribution studies of carbohydrate derivatives radiolabeled with technetium-99m, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 315–317.

C. Oerlemans, W. Bult, M. Bos, G. Storm, J.F.W. Nijssen, W.E. Hennink, Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting: imaging and triggered release, *Pharm. Res.* 27 (2010) 2569–2589.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. *Radiologia Brasileira*, v. 34, n. 4, p. 233–239, 2001.

LI, H. *et al.* Regulated pH-Responsive Polymeric Micelles for Doxorubicin Delivery to the Nucleus of Liver Cancer Cells. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 12, n. 6, p. 1258–1269, 1 jun. 2016. Disponível em:

<<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1550-7033&volume=12&issue=6&spage=1258>>.

MENG, Z. *et al.* Prodrug Strategies for Paclitaxel. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 5, p. 796, 23 maio 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/17/5/796>>.

ODA, C. M. R. Desenvolvimento de micelas poliméricas carreadoras de paclitaxel radiomarcadas com tecnécio-99m para aplicação no tratamento e diagnóstico de câncer. 2015. 119 f. UFMG, 2015.

CNEN, P. Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica. **Comissão Nacional de Energia Nuclear**, v. 05, n. 27, p. 1–24, 2005.

BRASIL, M. DA S. Farmacopéia Brasileira. **Diário Oficial da União**, v. 1, p. 546, 2010.

SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. New York, NY: Springer New York, 2010. v. 9

Y. Aldenhoff, M.J.P.G. van Kroonenburgh, L.H. Koole, Preparation: characterization and radiolabeling of a new amphiphilic derivative of DTPA, *Nucl. Med. Biol.* 23 (1996) 653–656.