

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR  
INSTITUTO DE ENGENHARIA NUCLEAR  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA NUCLEARES

FAGNER SANTOS DO CARMO

**RADIOMARCAÇÃO DO APTÂMERO ANTI-MUC 1  
COM  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$  PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DE  
CÂNCER DE PRÓSTATA**

RIO DE JANEIRO  
2015

FAGNER SANTOS DO CARMO

**RADIOMARCAÇÃO DO APTÂMERO ANTI-MUC 1  
COM  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$  PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DE  
CÂNCER DE PRÓSTATA**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação Stricto  
sensu em Ciência e Tecnologia  
Nucleares da Comissão Nacional de  
Energia Nuclear como parte dos  
requisitos necessários para a  
obtenção do Grau de Mestre em  
Ciência e Tecnologia Nucleares

Orientador:  
PhD. Ralph Santos-Oliveira

Co-orientador:  
PhD. Mohammed Al-Qahtani

RIO DE JANEIRO  
2015

CARM Carmo, Fagner Santos do.

Radiomarcção do Aptâmero Anti-MUC 1 com  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$  para diagnóstico precoce de Câncer de Próstata/ Fagner Santos do Carmo – Rio de Janeiro: CNEN/ IEN, 2015.  
xvii, 103 f. 29,7 cm: il., graf., tab

Orientadora: Dr. Ralph Santos-Oliveira

Co-orientador: Dr. Mohammed Al-Qahtani

Referências bibliográficas: f. (62-81)

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Nucleares) – Instituto de Engenharia Nuclear, PPGIEN, 2015.

1. Aptâmero; 2. Oligonucleotídeo; 3. SELEX; 4. Aplicação diagnóstica; 5. Aplicação terapêutica; 6. Radiofármacos; 7. Câncer de próstata.

RADIOMARCAÇÃO DO APTÂMERO ANTI-MUC1 COM  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$   
PARA DIAGNÓSTICO PRECOCE DE CÂNCER DE PRÓSTATA

FAGNER SANTOS DO CARMO

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
STRICTO SENSU EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA NUCLEARES DO  
INSTITUTO DE ENGENHARIA NUCLEAR COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA NUCLEARES.

Aprovada por:

---

Dr. Ralph Santos-Oliveira, Ph.D.  
Instituto de Engenharia Nuclear – IEN,  
Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN, D.Sc.

---

Dr. Celso Marcelo Franklin Lapa,  
Instituto de Engenharia Nuclear – IEN,  
Comissão Nacional de Energia Nuclear – CNEN, D.Sc.

---

Dr. Glaucio Diré Feliciano  
Universidade Estadual da Zona Oeste – UEZO, D.Sc

RIO DE JANEIRO – RJ, BRASIL  
JUNHO DE 2015

*Dedico este trabalho a minha família, em especial a minha mãe, Marly dos Santos do Carmo, que sempre me apoiou em minhas decisões, concedendo-me muita força a nunca desistir dos meus sonhos.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelas grandes oportunidades concedidas e a capacidade para dar cada passo nesta longa caminhada que é viver.

A minha família por todo o amor.

A minha noiva Débora Couto Alves Toledo por ter vencido comigo mais uma etapa da minha vida e pela ajuda prestada nas formatações deste trabalho.

Aos meus amigos pelos merecidos momentos de distração e os bons conselhos.

Ao Dr. PhD Ralph Santos-Oliveira, pela orientação, apoio e confiança em minha pessoa como estudante e profissional.

Ao Dr. PhD Mohammed Al-Qahtani, pela co-orientação prestada, por sua corroboração a retificar informações desta dissertação, por guiar minhas práticas elementares com o  $\text{Ga}^{68}$  e  $^{22}\text{Na}$ .

À Sra. Marta de Souza Albernaz pelo grande apoio, toda colaboração fornecida através de boas sugestões durante a dissertação e pelas oportunidades concedidas para o meu desenvolvimento profissional e acadêmico.

Ao Dr. Sotiris Missailidis pela gentileza em ceder o aptâmero anti-MUC1, base do desenvolvimento do meu trabalho.

A disponibilidade de uso do Laboratório de Radiofarmácia e Nanorradiofármacos da Universidade Estadual da Zona Oeste e as alunas de iniciação científica, Suyene Rocha Pinto e Sara Rhaissa Rezende dos Reis pela ajuda no desenvolvimento da parte experimental deste trabalho.

Ao Centro de Medicina Nuclear do Hospital Universitário Pedro Ernesto da Universidade do Estado do Rio de Janeiro na pessoa da Dra Margarida Camões pela disponibilização do material radioativo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  usado nas práticas de biodistribuição deste trabalho.

Ao Departamento Radiofarmacêutico e do Cíclotron do Centro de Pesquisa e Especialidade Hospitalar de King Faisal-SA, na pessoa do Dr. Mohammed Al-Qahtani, por me receber tão fraternalmente e possibilitar a realização de meus experimentos com os radionuclídeos  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$ .

*“O futuro não é uma fatalidade cega; pelo contrário, está entregue à nossa responsabilidade. Temos o poder de analisar os fatos e aplicar racionalmente as consequências práticas dos nossos ideais”*

(L. J. Lebreton)

## RESUMO

O câncer de próstata é o segundo tipo mais prevalente em homens no mundo inteiro, originando milhares de mortes todos os anos e apresentando elevadas taxas de incidência futura de novos acometimentos. Comparada as técnicas diagnósticas disponíveis, a conjugação de aptâmeros a radionuclídeos, mostra-se eficaz na entrega de drogas a processos tumorais, onde há a capacidade de rastreamento da rota fisiológica percorrida pelo radiomarcado e da mensuração do concentrado em regiões anatômicas específicas através da PET/CT. A afinidade e a especificidade dos aptâmeros promovem o direcionamento seletivo do radioisótopo a tecidos e órgãos MUC1positivos. Dessa forma, este trabalho objetivou a radiomarkação do anti-MUC1 aos radioisótopos  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$  como agente de imagiologia molecular *in vivo* para o diagnóstico precoce e preciso do processo carcinogênico em próstata. A radiomarkação do aptâmero anti-MUC1 com o  $^{68}\text{Ga}$  e o  $^{22}\text{Na}$  foi avaliada com a incubação do oligonucleotídeo diretamente a soluções individuais dos radioisótopos em diferentes tempos e temperatura. Apresentando-se eficiente em todos os processos independentemente das variações aplicadas. Corridas cromatográficas em CCD foram aplicadas obtendo marcação de um composto com pureza radioquímica média de 89,07% ( $89,07 \pm 7,79$ ) para o  $^{68}\text{Ga}$  e 90,37% ( $90,37 \pm 13,61$ ) para o  $^{22}\text{Na}$ , valores superiores ao fator de aceitação para a implementação clínica. Para confrontar os resultados da CCD, a solução radiomarcada também foi sujeita a análises em CLAE, onde foi confirmada a radiomarkação do aptâmero anti-MUC1 com o  $^{68}\text{Ga}$  no tempo de retenção médio de 4,842 minutos ( $4,842 \pm 0,03$ ) e 3,679 ( $3,679 \pm 0,51$ ) para o  $^{22}\text{Na}$ . No intuito de avaliar o comportamento do oligonucleotídeo radiomarcado *in vivo*, o anti-MUC1 foi conjugado ao  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e administrado a ratos *Wistar* sadios, revelando rápido clareamento sanguíneo ( $0,10 \pm 0,06$ ), alta captação do material radioativo no rins (esquerdo  $0,94 \pm 0,11$  e direito  $1,01 \pm 0,32$ ) devido a excreção preferencial ser renal. A baixa captação em fígado ( $0,19 \pm 0,09$ ) evidenciou a estabilidade do composto radiomarcado e insignificativas captações de órgãos abdominais mostraram a tendência da minimização dos efeitos da radiação de fundo. Não foi possível detectar a captação cerebral, portanto o complexo não atravessa a barreira hematoencefálica e todos os outros órgãos obtiveram captação em faixa muito baixa ou não detectável. Os resultados de marcação e biodistribuição descritos neste estudo determinaram o potencial do aptâmero anti-MUC1 radiomarcado aos radioisótopos emissores de próton  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$  a atuar como agente de imagiologia molecular na área da medicina nuclear.

**Palavras-chave:** Aptâmero; Oligonucleotídeo; SELEX; Aplicação diagnóstica; Aplicação terapêutica; Radiofármacos; Câncer de próstata.

## ABSTRACT

Prostate cancer is the second most prevalent type in men worldwide, causing thousands of deaths each year and featuring high rates of future incidence of new bouts. Compared the diagnostic techniques available, the conjugation of aptamers to radionuclides, proves effective in drug delivery to tumor processes, where there is the tracking ability of the physiological route traveled by the radiolabeled and measurement concentrated in specific anatomical regions by PET / CT. The affinity and specificity of aptamers promote the selective targeting of the radioisotope to MUC1positivos tissues and organs. Thus, this study aimed radiolabeling of anti-MUC1 to  $^{68}\text{Ga}$  radioisotope  $^{22}\text{Na}$  and how molecular imaging agent in vivo for early and accurate diagnosis of the carcinogenic process in prostate. The radiolabeling the aptamer anti-MUC1 with  $^{68}\text{Ga}$  and  $^{22}\text{Na}$  was evaluated by incubating the oligonucleotide directly to individual solutions of the radioisotope at different times and temperature. Presenting efficient in all cases regardless of the applied variations. TLC chromatographic runs were applied marking obtaining a compound with an average radiochemical purity of 89.07% ( $89.07 \pm 7.79$ ) for the  $^{68}\text{Ga}$  and 90.37% ( $90.37 \pm 13.61$ ) for  $^{22}\text{Na}$ , values exceeding the acceptance factor for the clinical implementation. To compare the results of the TLC, the radiolabelled solution was also subjected to HPLC analysis, which confirmed the anti-MUC1 radiolabeling the aptamer with  $^{68}\text{Ga}$  in the average retention time of 4.842 minutes ( $4.842 \pm 0.03$ ) and 3.679 ( $3.679 \pm 0.51$ ) for  $^{22}\text{Na}$ . In order to evaluate the in vivo radiolabeled oligonucleotide behavior, anti-MUC1 was conjugated with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  and administered to healthy *Wistar* rats, revealing rapid blood clearance ( $0.10 \pm 0.06$ ), high uptake of the radioactive material in the kidneys (left  $0.94 \pm 0.11$  and  $0.32 \pm 0.01$  right) due to preferential excretion is renal. The low uptake in liver ( $0.19 \pm 0.09$ ) showed the stability of radiolabeled compound and insignificant funding of abdominal organs showed the trend of minimizing the effects of background radiation. It was not possible to detect the brain uptake, therefore the complex does not cross the blood brain barrier and all other organs obtained in capturing very low or not detectable range. The results of marking and biodistribution in this study determined the potential of anti-MUC1 aptamer radiolabeled issuers prósiton  $^{68}\text{Ga}$  radioisotope  $^{22}\text{Na}$  and to act as molecular imaging agent in the field of nuclear medicine.

**Keywords:** Aptamer; Oligonucleotide; SELEX; Diagnostic application; Therapeutic application; Radiopharmaceuticals; Prostate cancer.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Localização da Próstata (CHO, 2011).....	05
Figura 2:	Processo de carcinogênese (INCA, 2012).....	07
Figura 3:	Tipos de crescimento celular (INCA).....	07
Figura 4:	Os cânceres mais comuns diagnosticados pelo Índice de Desenvolvimento Humano (HDI) (IARC, 2014).....	09
Figura 5:	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 em homens, exceto pele não melanoma* (INCA, 2014).....	11
Figura 6:	Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da próstata) (INCA, 2014).....	12
Figura 7:	Novos métodos desenvolvidos de SELEX para identificar aptâmeros contra biomarcadores da superfície celular segundo a linha do tempo (AGNES et al., 2011).....	17
Figura 8:	Possibilidades de modificações químicas de uma base nucleotídica para aumentar a resistência a endonuclease ou outras modificações funcionais. (KHAN & MISSAILIDIS S, 2008).....	19
Figura 9:	Arquetípico aptâmero (HICKE & STEPHENS, 2000).....	20
Figura 10:	Descrição do processo Selex (Adaptado de CALIL, 2011).....	22
Figura 11:	Representação do princípio geral da Evolução Sistemática de Ligandos por Enriquecimento Exponencial (SELEX) para um biomarcador de superfície celular (XIAOYU PEI et al., 2014).....	23
Figura 12:	Estruturas do Aptâmero (RADOM et al., 2013).....	24
Figura 13:	Glicosilação do MUC1 em células normais (SINGH, BANDYOPADHYAY, 2007).....	26
Figura 14:	Glicosilação do MUC1 em células neoplásicas (SINGH, BANDYOPADHYAY, 2007).....	26
Figura 15:	Esquema do decaimento da radiação $\beta$ , a aniquilação do pósitron com o elétron e a formação do par de fótons de 511 KeV cada, em direções opostas (Adaptado de ROBILOTTA, 2006).....	28

Figura 16:	Ilustração da técnica PET/CT.....	29
Figura 17:	Imagem de corpo inteiro em corte coronal de camundongo Nude atímico masculino portador de tumor xenográfico originado de células de adenocarcinoma prostático humano de lesão metastática realizada em microPET (SCHÄFER et al., 2012).....	30
Figura 18:	Decaimento Radioativo do $^{22}\text{Na}$ .....	34
Figura 19:	Decaimento Radioativo do $^{68}\text{Ge}$ .....	34
Figura 20:	Geradores comerciais de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ (Technical Information Bulletin, 2013; IDB HOLLAND bv. iThemba LABS, 2010; ITG, 2011).....	36
Figura 21:	Controle de qualidade do processo de radiomarkação do aptâmero Anti-MUC1 em CCD.....	41
Figura 22:	Contador gama (Perkin Elmer modelo Wizard® 2470) utilizado na determinação da contagem radioativa nos estudos cromatográficos e de biodistribuição.....	41
Figura 23:	Método Direto de Marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .....	44
Figura 24:	Controle de Qualidade do Processo de Marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .....	44
Figura 25:	Administração de 100 $\mu\text{L}$ da amostra de aptâmero anti-MUC1 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ por via intraocular no rato do tipo <i>Wistar</i> anestesiado.....	45
Figura 26:	Rato dissecado após sacrifício em câmara de gás de Dióxido de Carbono para retirada dos órgãos.....	45
Figura 27:	Perfis cromatográficos do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com $^{68}\text{Ga}$ em CCD.....	48
Figura 28:	Perfil cromatográfico da solução de aptâmero anti-MUC1, analisado em CLAE utilizando detector UV.....	49
Figura 29:	Perfil cromatográfico da solução de aptâmero anti-MUC1- $^{68}\text{Ga}$ comparado ao $^{68}\text{Ga}$ , analisado em CLAE utilizando detector UV e de condutividade, respectivamente.....	50
Figura 30:	Perfis cromatográficos do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com $^{68}\text{Ga}$ analisados em CLAE em diferentes condições, utilizando detectores de condutividade e radioatividade.....	51
Figura 31:	Perfis cromatográficos do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com $^{22}\text{Na}$ em CCD.....	54
Figura 32:	Perfil cromatográfico comparativo dos três picos da radiomarkação do aptâmero anti-MUC1 com $^{22}\text{Na}$ em CCD.....	55

Figura 33:	Valores encontrados no perfil cromatográfico do $^{22}\text{Na}$ livre, analisado em CLAE utilizando detector de radioatividade.....	56
Figura 34:	Perfis cromatográficos do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com $^{22}\text{Na}$ analisados em CLAE em diferentes condições, utilizando detectores de condutividade e radioatividade.....	59
Figura 35:	Biodistribuição da solução de aptâmero anti-MUC 1 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ após 2 h da administração intraocular em relação à dose injetada em cada órgão e no sangue (média dos dois ratos).....	59
Figura 36:	Biodistribuição do aptâmero anti-MUC 1 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ após 2 h da administração intraocular em relação à dose injetada em cada grama de tecido dos órgãos avaliados e no sangue (média dos dois ratos).....	59

## LISTA DE QUADRO

Quadro 1:	Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer em homens de acordo com sua localização primária.....	13
Quadro 2:	Características dos Radioisótopos mais utilizados (XING, ZHAO, CONTI & CHEN K, 2014).....	32
Quadro 3:	Sistemas de geradores de radionuclídeos.....	35
Quadro 4:	Uso anteriores de aptâmeros radiomarcados .....	36
Quadro 5:	Valores encontrados no controle de qualidade do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com $^{68}\text{Ga}$ em diferentes condições, analisados em CCD .....	47
Quadro 6:	Valores encontrados nos perfis cromatográficos do processo de marcação do aptâmero anti-MUC1 com $^{68}\text{Ga}$ em diferentes condições, analisadas em CLAE utilizando detector de condutividade e radioatividade.....	51
Quadro 7:	Valores encontrados no controle de qualidade do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com $^{22}\text{Na}$ em diferentes condições, analisados em CCD.....	53
Quadro 8:	Comparativo dos três picos da radiomarcação do aptâmero anti-MUC1 com $^{22}\text{Na}$ em CCD.....	54
Quadro 9:	Valores encontrados nos perfis cromatográficos do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com $^{22}\text{Na}$ em diferentes condições, analisadas em CLAE utilizando detector de radioatividade.....	56
Quadro 10:	Contagem dos pedaços da fita no contador gama com as respectivas porcentagens em cada pedaço.....	56
Quadro 11:	Biodistribuição do radiofármaco aptâmero anti-MUC1- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em ratos <i>Wistar</i> após administração intraocular (porcentagem da média e desvio padrão da atividade injetada/órgão e atividade injetada/grama de órgão - N= 2 animais).....	58

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMD	<i>Age Related Macular Degeneration</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AR	Receptor Andrógeno
ATP	Adenosina Trifosfato
$^{11}\text{C}$	Carbono-11
cAMP	Adenosina Monofosfato Cíclico
CaP	<i>Prostate Cancer</i> – Câncer de Próstata
cm	Centímetro
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CT	<i>Tomography Computer</i> – Tomografia Computadorizada
$^{64}\text{Cu}$	Cobre-64
DHT	5 $\alpha$ - dihidrotestosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DRE	<i>Examination Rectal Digital</i> – Exame de Toque Retal
dsDNA	DNA fita dupla
DST	Doença Sexualmente Transmissível
$^{166}\text{Dy}$	Disprósio-166
e	Elétron
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – Teste Imunoenzimático
EUA	Estados Unidos da América
F	Flúor
FAD	Dinucleótido de flavina e adenina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FSH	Hormônio folículo-estimulante
g	Gramma
$^{67}\text{Ga}$	Gálio-67

$^{68}\text{Ga}$	Gálio-68
$^{68}\text{Ga}$	Gálio-71
$^{66}\text{Ge}$	Germânio-66
$^{68}\text{Ge}$	Germânio-68
GnRH	Gonadotrofina
h	Hora
$\text{H}_2\text{O}$	Água
HCl	Ácido Clorídrico
HDI	<i>Human Development Index</i> – Índice de Desenvolvimento Humano
HEGL	Hexaetilenoglicol
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
HPLC	<i>High Performance/Pressure Liquide Chromatography</i> – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
$^{131}\text{I}$	Iodo
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i> – Agência Internacional de Energia Atômica
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares
Kd	Constante de dissociação
KDa	Kilo-Dalton
KeV	Kilo-elétron-volt
LH	Hormônio Luteinizante
M	Molar
mAbs	<i>Monoclonal Antibodies</i> – Anticorpos monoclonais
MAG <sub>2</sub>	<i>2-Mercaptoacetylglycylglycyl</i>
MBq	Megabecquerel
$\mu\text{Ci}$	Microcurie
MeCN	Acetonitrila ou cianeto de metila
MeOH	Metanol

$\mu\text{g}$	Micrograma
min	Minuto
ml	Mililitro
$\mu\text{l}$	Microlitro
mm	Milímetro
$^{99}\text{Mo}$	Molibidênio-99
MRI	<i>Magnetic Resonance Imaging</i> – Imagem de Ressonância Magnética
MUC	Mucina
N	Número
$^{13}\text{N}$	Nitrogênio-13
$^{22}\text{Na}$	Sódio-22
NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
nM	Nanomolar
$\text{NaTcO}_4^-$	Pertecnetato de Sódio
NaI	Iodeto de Sódio
$^{22}\text{Ne}$	Neônio
$\text{NH}_2$	Amina
$\text{Ni}^{+2}$	Níquel
nm	Nanômetro
$^{15}\text{O}$	Oxigênio-15
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
PEG	<i>Polyethylene glycol</i> – Polietilenoglicol
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> – Tomografia por Emissão de Pósitrons
PSA	<i>Prostate Specific Antigen</i> – Antígeno Específico da Próstata
pH	Potencial Hidrogeniônico
$^{81}\text{Rb}$	Rubídio-81
Rf	Fator de Retenção
RNA	Ácido Ribonucléico

RTU	Ressecção Transuretral
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SELEX	<i>Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment</i> – Evolução Sistemática de Ligandos por Enriquecimento Exponencial
SnCl <sub>2</sub>	Cloreto Estanoso
SPECT	<i>Single Photon Emission Computer Tomography</i> – Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único
<sup>82</sup> Sr	Estrôncio-82
<sup>90</sup> Sr	Estrôncio-90
ssDNA	DNA fita simples
ssRNA	RNA fita simples
t <sub>1/2</sub>	Tempo de meia-vida
T4	Tiroxina
TAC	<i>Transit-amplifying cells</i> - Células de Amplificação Transitória
<sup>201</sup> Tl	Tálio-201
<sup>99m</sup> Tc	Tecnécio-99 metaestável
TcO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Óxido de Tecnécio
<sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Pertecnetato = Tecnécio livre
Tecnécio-99m	Tecnécio-99 metaestável
TFA	Ácido Trifluoroacético
TLC	<i>Thin layer chromatograph</i> – Cromatografia em Camada Delgada
TR	Tempo de Retenção
TRUST	<i>Transrectal Ultrasound</i> – Ultrassonografia Transretal
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro
UEZO	Universidade Estadual da Zona Oeste
USPSTF	<i>Preventive Service Task Force of United State</i>
UV	Ultravioleta

$^{188}\text{W}$	Tungstênio-188
WHO	<i>World Health Organization</i> – Organização Mundial de Saúde
$^{86}\text{Y}$	Ítrio-86
$\text{Zn}^{+2}$	Zinco
$^{62}\text{Zn}$	Zinco-62
$^{68}\text{Zn}$	Zinco-68
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
$\mu$	Micro
$\upsilon$	Úpsilon
$\pm$	Aproximadamente
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
%	Porcentagem
%ID	Porcentagem de Dose Injetada
$\Sigma$	Somatório

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	OBJETIVO.....	3
1.1.1	Objetivos Específicos.....	3
2	DESENVOLVIMENTO.....	4
2.1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	5
2.1.1	Glândula Prostática.....	5
2.1.2	Câncer: Epidemiologia e Etiologia.....	8
2.1.3	Câncer de Próstata.....	10
2.1.4	Métodos de Detecção Clínica.....	
2.1.5	Aptâmeros e suas propriedades.....	12
2.1.5.1	A Técnica SELEX.....	21
2.1.5.2	Mucinas (MUC).....	24
2.1.6	Medicina Nuclear.....	26
2.1.6.1	Imagiologia.....	26
2.1.6.2	Radiofármacos.....	30
2.1.6.3	Radionuclídeos.....	31
2.1.6.4	Geradores de Ga-68.....	34
2.1.7	Aptâmero Radiomarcado.....	35
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.2.1	Materiais.....	38
2.2.2	Equipamentos.....	38
2.2.3	Métodos.....	39
2.2.4	Processo de Marcação do Aptâmero anti MUC 1 com Gálio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ )....	39
2.2.5	Controle de Qualidade do Processo de Marcação do Aptâmero com o Gálio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ).....	40
2.2.5.1	Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método Cromatográfico em Camada Delgada (CCD) .....	40
2.2.5.2	Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	42
2.2.6	Processo de Marcação do Aptâmero anti MUC 1 com o Sódio-22 ( $^{22}\text{Na}$ )....	42

2.2.7	Controle de Qualidade do Processo de Marcação do Aptâmero com o Sódio-22 ( $^{22}\text{Na}$ ).....	42
2.2.7.1	Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método Cromatográfico em Camada Delgada (CCD) .....	42
2.2.7.1	Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	43
2.2.8	Estudos de Biodistribuição.....	43
2.2.9	Processo de Marcação do Aptâmero anti MUC 1 pelo Método Direto com Tecnécio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) .....	43
2.3.0	Controle de Qualidade do Processo de Marcação do Aptâmero com o Tecnécio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) .....	44
2.4.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
2.4.1	Processo de Marcação do Aptâmero anti MUC 1 com Gálio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ )....	47
2.4.2	Controle de Qualidade do Processo de Marcação do Aptâmero com o Gálio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ).....	47
2.4.2.1	Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método Cromatográfico em Camada Delgada (CCD) .....	47
2.4.2.2	Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	48
2.4.3	Processo de Marcação do Aptâmero anti MUC 1 com o Sódio-22 ( $^{22}\text{Na}$ )....	52
2.4.4	Controle de Qualidade do Processo de Marcação do Aptâmero com o Sódio-22 ( $^{22}\text{Na}$ ).....	52
2.4.4.1	Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método Cromatográfico em Camada Delgada (CCD) .....	52
2.4.4.2	Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	55
2.5	Estudos de Biodistribuição.....	56
2.5.1	Processo de Marcação do Aptâmero anti MUC 1 pelo Método Direto com Tecnécio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ).....	57
2.5.2	Controle de Qualidade do Processo de Marcação do Aptâmero com o Tecnécio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ).....	58
2.5.3	Análise Estatística.....	59

3	CONCLUSÃO.....	60
	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
	ANEXO A: Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEZO).....	82

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento carcinogênico é mediado por processos bioquímicos complexos, onde o crescimento celular descontrolado marca a fisiologia patológica (INCA, 2011; TING et al., 2010). As alterações de genes responsáveis pelo controle do crescimento celular e a formação de novos vasos podem viabilizar a invasão de tecidos e órgãos não afetados primariamente, apresentando-se como fatores críticos para o desenvolvimento de tumores malignos e metástases (LOURO, 2000 apud SILVA, 2004).

As características do processo de evolução tumoral e a detecção tardia tornam o câncer umas das principais causas de morte entre adultos mundialmente (INCA, 2014). No Brasil, entre 2010 e 2011, causou cerca de 489.270 mortes e no mundo o número registrado foi de 8,2 milhões (INCA, 2014). É estimado para 2030, 27 milhões de novos casos de câncer e 17 milhões de mortes por câncer (INCA, 2011; 2014).

Quanto ao tipo de câncer, o de próstata é o segundo mais recorrente em homens e ocupa a quinta posição no *ranking* mundial de incidência mais frequente (KLEIN et al., 2007; HAAS, 1997; INCA, 2014). Para as próximas quatro décadas, há uma tendência expressiva e esperada no número de novos casos de homens com câncer prostático (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2003). No território brasileiro, a configuração dos altos índices de acometimento por câncer de próstata nas diferentes regiões do país são completamente consideráveis, sobressaindo-se as elevadas taxas das regiões sudeste, centro-oeste e sul (INCA, 2014).

A etiologia da neoplasia maligna de próstata é difusa, podendo se manifestar de forma rápida ou lenta, agressiva ou indolor (GIMBA et al., 2003). Conduto, sabe-se que a progressão da doença é proporcional ao envelhecimento e se sincroniza a variáveis como estilo de vida, fatores ambientais, dietéticos, étnicos, hormonais, entre outros (KLEIN et al., 2007; SHIMIZU et al., 1991; WHITTEMORE, 1995; COOK et al., 1999). Frequentemente, em mais da metade dos casos, o tumor se origina na zona periférica (SIMONE & VILAMAIOR, 2009).

Atualmente uma gama de recursos têm sido investidos na abordagem ao tratamento e diagnóstico precoces do câncer (HAMOUDEH et al., 2008), pois se tem conhecimento que apesar de permanecerem silenciosamente (assintomáticos), os estágios iniciais do processo de carcinogênese são mais sensíveis a interferências medicamentosas, o que possibilita o sucesso terapêutico (CHOI, KWAK & PARK, 2010; GIANINI, 2004; INCA, 2006). Dessa forma, pesquisas que visem o desenvolvimento de novos métodos preventivos, diagnósticos e terapêuticos que sejam suficientemente sensíveis, eficazes e rápidos na detecção do câncer de

próstata (CaP), excepcionalmente os assintomáticos são prioritários, de modo a minimizar os números de mortalidade pela patologia tumoral e elevar o prognóstico dos pacientes oncológicos (CHOI et al., 2010; GIANINI, 2004; BRASIL, 2014).

Neste intuito, a utilização de radiofármacos em conjunto a câmaras PET/CT (Tomografia por Emissão de Pósitrons/Tomografia Computadorizada) possibilita formar pareceres diagnósticos através da avaliação fisiológica e estrutural de sistemas e tecidos, sendo capazes de identificar específicas alterações neoplásicas precocemente através de estudos não-invasivos (HAMOUDEH et al., 2008; ROBILOTTA, 2006; TONIN, 2011). O aperfeiçoamento do método é proposto por estudos que associam aptâmeros a radionuclídeos para imagem *in vivo* (TAVITIAN et al., 1998; ZHANG, 2000), devido ao reconhecendo de seus alvos serem semelhantes aos encontrados em interações antígeno-anticorpo, com elevada afinidade e especificidade (XIAOYU PEI, JUN ZHANG & JIE LIU, 2014).

A determinação do radionuclídeo a ser utilizado está sujeita as singularidades físicas e químicas do próprio radioisótopo (THRALL, ZIESSMAN, 2003; MITRA et al., 2006), convergente a técnica escolhida para captação radioativa. Para tanto, a PET/CT se mostra um método diagnóstico eficaz para estudos de imagens, capaz de localização espacial específica e caracterização de doenças pelas distinções biológicas (CAMARGO, 2005; SOARES JUNIOR et al., 2010).

Dentre outros biomarcadores expressos em lesão neoplásica, a mucina 1 (MUC 1) foi identificada sendo superexpressa em tumor de próstata e processos metastáticos (HO et al., 1993; GENDLER and SPICER, 1995; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999). Sendo assim, considerada antígeno de potencial uso diagnóstico (FENG et al., 2002; TOGAMI et al., 2010).

Os radioisótopos emissores de pósitrons ( $\beta^+$ ),  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$ , possuem boas características físicas de decaimento e tempo de meia-vida física adequado a geração de imagens nucleares (SHLEIEN, 1992; DELACOIX et al., 2002; ZHERNOSEKOV, 2006). Neste contexto, foi gerado um agente de imagiologia molecular à base de aptâmero anti-MUC 1, conjugado aos radioisótopos  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$ , com excelentes propriedades de serviços de entrega de drogas diagnósticas *in vivo* para pesquisa precoce de processo carcinogênico em próstata.

## 1.1 OBJETIVO

Radiomarcador o aptâmero anti-MUC 1 com  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$  para diagnóstico precoce de câncer de próstata.

### 1.1.1 Objetivos Específicos

- ❖ Marcar aptâmero anti MUC 1 com  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$  e avaliar a ligação deste com as células prostáticas;
- ❖ Investigar a estabilidade dos aptâmeros marcados com  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$ ;
- ❖ Avaliar, em ensaios *in vitro*, a ligação dos aptâmeros marcados com  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$ ;
- ❖ Verificar a biodistribuição dos aptâmeros marcados com  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$  em ratos *Wistar*;

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 2.1.1 GLÂNDULA PROSTÁTICA

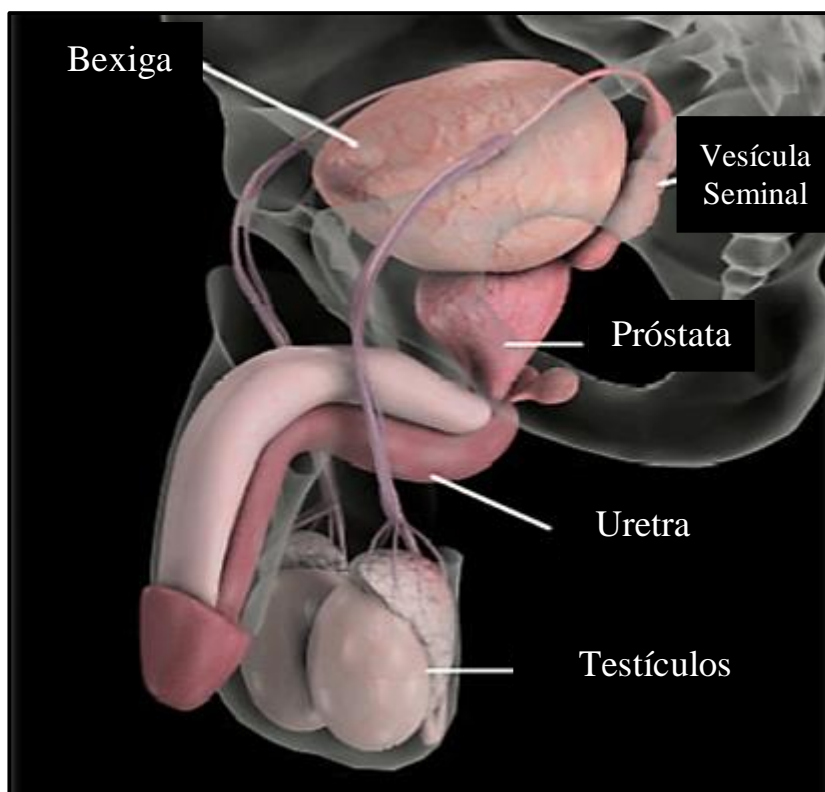
A próstata é um órgão fibromuscular e glandular que faz parte do aparelho geniturinário masculino. Tem formato circular e se localiza na frente do reto e abaixo da bexiga urinária, possuindo tamanho variado de acordo com a idade (GUYTON & HALL, 2011) (Figura 1). Possui funções acessórias ao sistema genital com a secreção de produtos do líquido seminal e seu armazenamento (VILAMAIOR et al., 2000).

A anatomia da próstata é dividida em zona fibromuscular anterior, formada em quase toda a sua totalidade por músculo liso<sup>1</sup> (JARMULOWICZ, 1999); zona central, onde 25% do tecido glandular está localizado nesta porção; zona periférica, ponto originário multifocal de 70% dos cânceres de próstata (CaP) (SIMONE & VILAMAIOR, 2009); zona pré-prostática (tem funcionalidade análoga ao esfíncter durante a ejaculação para evitar retorno do líquido seminal para a bexiga) e a zona de transição, que dispõe de valores menores que 5% da massa glandular normal, contudo, sua significância é vinculada ao fato de ser local originário da hiperplasia prostática benigna e, cânceres denominados incidentais, quando removidos por ressecção transuretral (RTU) (JARMULOWICZ, 1999; COFFEY, 1992).

O epitélio secretor da próstata, mantido suas características originais, é formado por uma diversidade de tipos celulares relacionados entre si: células-tronco, células basais, células de amplificação transitória ou “*transit-amplifying cells*” (TAC), células intermediárias, células neuroendócrinas e células lumbais secretoras (CORRADI et al., 2009).

A diferenciação das células epiteliais prostáticas segue um processo ordenado de divisão celular das células-tronco e do alistamento de células-filhas em direção às células ascendentes intermediárias. A diferenciação das células epiteliais prostáticas segue um processo ordenado de divisão celular das células-tronco e do alistamento de células-filhas em direção às células ascendentes intermediárias. Tratando-se da próstata, estas equivalem às células basais, às TAC e às células intermediárias. As TACs são reproduzidas e transportadas, proporcionalmente, rumo a parte luminal e modificam sucessivamente a representação de expressão gênica em direção às células lumbais terminalmente alteradas (SCHALKEN, 2005). Esses tipos celulares

diferem quanto a localização, a capacidade de dar origem a novas células, a morfologia, padrão de expressão gênica e a resposta a estímulos fisiológicos (CORRADI et al., 2009).



**Figura 1:** Localização da Próstata (CHO, 2011).

As funções sexuais masculinas têm início pelo hipotálamo com a secreção de gonadotrofina (GnRH), sensibilizador da hipófise para que haja liberação do hormônio luteinizante (LH) e folículo-estimulante (FSH). O LH é o responsável pela estimulação das células intersticiais de *Leydig* que secretam o hormônio masculino. O FSH, por sua vez, atua na espermatogênese (GUYTON & HALL, 2011; GRIFFITHS & MORTON, 1999). A testosterona livre na corrente sanguínea entra nas células prostáticas por difusão passiva e é convertida em 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT) pela enzima 5 $\alpha$ -redutase no citoplasma (GRIFFITHS & MORTON, 1999). A DHT se liga ao receptor de andrógeno (AR) e é levada ao núcleo celular onde auxilia na produção de síntese de RNA (SROUGI, 1998). Vale ressaltar que os andrógenos participam da evolução da hiperplasia e do câncer de próstata nos homens, visto o fato de ambos apresentarem células dotadas de receptores para andrógenos e que a orquiectomia impossibilita o avanço tumoral (COTRAN et al., 2000). Evidências sugerem que

a atuação do estrógeno, prolactina, testosterona e diidrotestosterona iniciam e incentivam o câncer de próstata (HENDERSON et al., 1982; CHAN et al., 1998). O estrógeno em concentrações normais eleva a quantidade de receptores para os andrógenos e em altas concentrações inibe a testosterona (HENDERSON et al., 1991), a prolactina atua conjuntamente com o hormônio luteinizante, limitando a secreção de testosterona e com os andrógenos, promovendo o crescimento da próstata (HENDERSON et al., 1982). Estudos mostram que as concentrações altas de diidrotestosterona resultam em hiperplasia prostática e posteriormente em neoplasia (HENDERSON & ROSS, 1996). No homem, a hiperplasia prostática não é fator precedente a neoplasia de próstata (COTRAN et al., 2000).

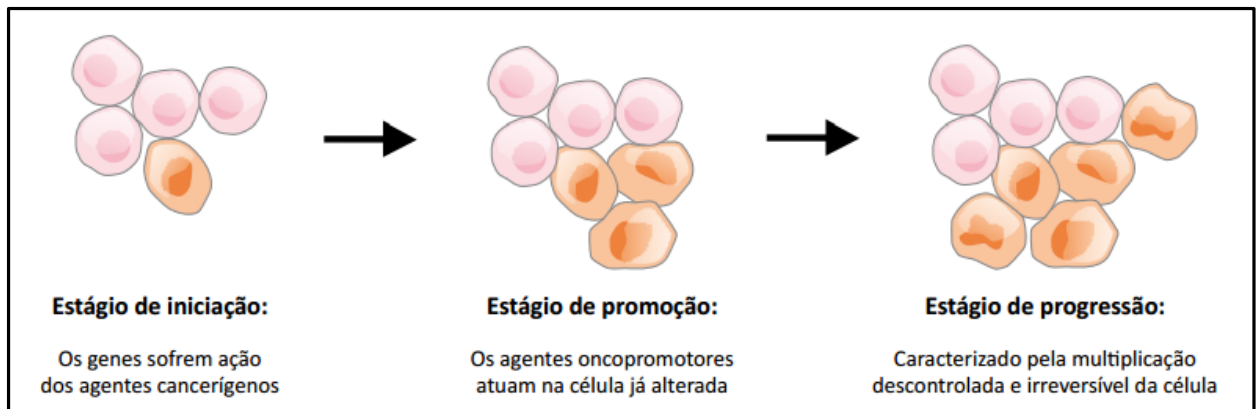
Histologicamente, a composição da próstata consiste de unidades secretora túbulo-acinares, cercadas por um estroma abundante em células musculares lisas (SCHALKEN, 2005). O tecido prostático apresenta frequentes alterações durante todo o envelhecimento biológico, tal fato sujeita o mesmo ao crescimento disfuncional, como é o caso da hiperplasia prostática benigna (HPB) e a alta incidência de tumores malignos, como o CaP (SIMONE et al., 2009). O câncer gera aumento anatômico da próstata e sintomas similares aos causados pela hiperplasia benigna, porém a célula maligna transpõe seus limites normais de crescimento e acomete outros órgãos, como consequência de prejuízos sofridos na competência de aderência entre elas, resultando em metástase (LOPES, 2001).

As doenças da próstata culminam na perda da qualidade de vida e tumores malignos já são a segunda causa de morte em alguns países ocidentais (SIMONE et al., 2009).

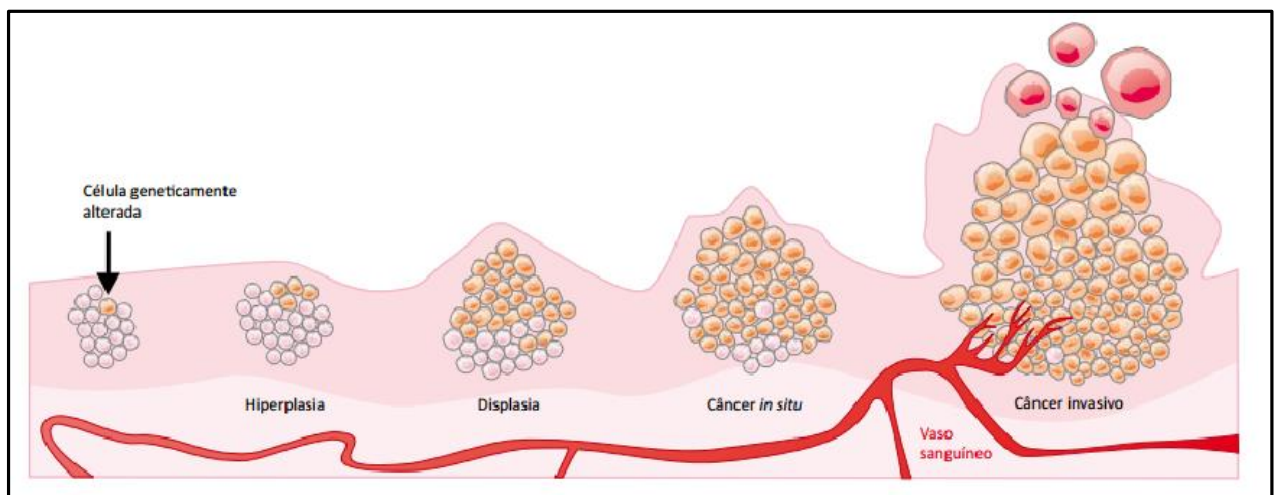
### **2.1.2 CÂNCER: EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA**

A palavra “câncer” se refere a um grupo de mais de 100 doenças distintas, caracterizada pela multiplicação celular desordenada, resultado das alterações em genes do crescimento, e, pela diferenciação e interação das células com o meio extracelular (COTRAN et al., 2000; SILVA, 2004) (Figura 2), podendo ser influenciada por fatores externos, socioambientais e fatores gênicos (TONIN, 2011). A partir desta variação, pode ocorrer disseminação metastática das células anormais e alocação em outras regiões do corpo como tecidos e órgãos (INCA, 2011; TING et al., 2010; LOURO, 2000; SILVA, 2004). O estágio da doença caracteriza a gravidade ou extensão do acometimento sofrido. Os estágios iniciais, onde existe

a instalação de pequeno tumor maligno, tendem a ter melhores prognósticos, enquanto os avançados são caracterizados pela presença de focos tumorais de grande volumes, apresentam prognóstico difícil com alta resistência ao tratamento. (INCA, 2005) (Figura 3).



**Figura 2:** Processo de carcinogênese (INCA, 2011).



**Figura 3:** Tipos de crescimento celular (INCA, 2011).

Devido ao crescimento e envelhecimento populacional, o impacto global do câncer dobrou nas últimas décadas de acordo com trabalhos da Agência Internacional para Pesquisa

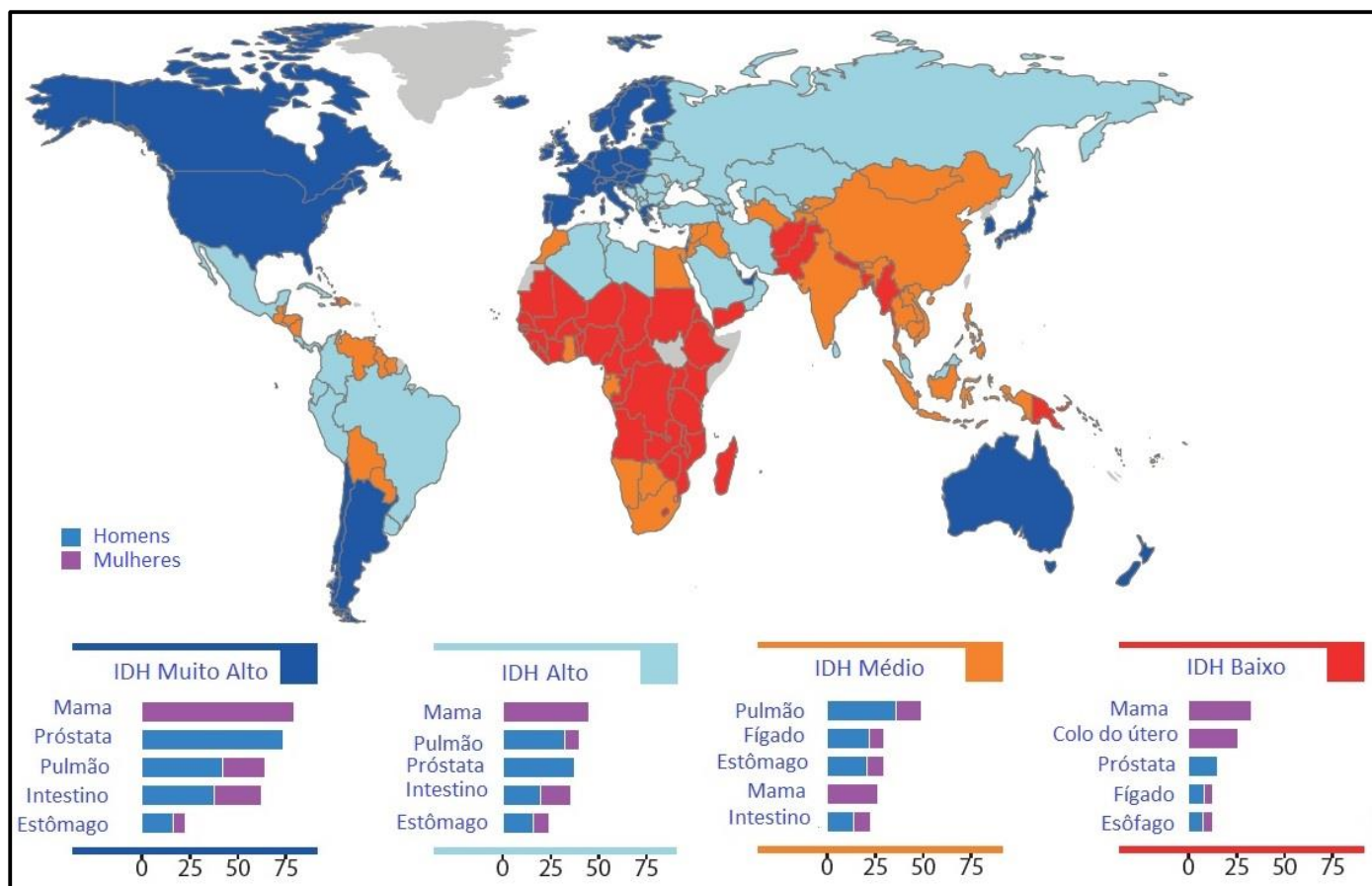
em Câncer IARC/OMS. Segundo Cazap et al. (2010) é considerada uma das principais causas de morte entre adultos em todo o mundo.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece o câncer como um grave problema de saúde pública mundial. Entre os anos de 2010 e 2011, no Brasil, o câncer foi responsável pela morte de cerca de 489.270 pessoas, representando 15% do total de mortes nesses anos. Em 2012, ocorreram 14,1 milhões de novos casos (INCA, 2011; TORRES et al., 2007). No mundo, o número registrado foi de 8,2 milhões de mortes (INCA, 2014). Segundo Torres et al.(2007), a previsão de novos casos é de aumento em 50% na América Latina e no Caribe. No mundo a previsão para 2030 é de 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas com a doença (INCA, 2011; INCA 2014).

Por ser um problema de saúde pública com características epidemiológicas bem expressivas, o “tema câncer”, tem sido parte integrante da agenda em todas as esferas governamentais, de modo a estabelecer prioridades e disponibilizar recursos direcionados a suprir as necessidades do cenário atual (INCA, 2014). No território brasileiro, a distribuição demográfica se configura com altos índices de acometimento por câncer nas regiões Sul e Sudeste, baixas nas regiões Norte e Nordeste e taxas intermediárias nas regiões Centro-Oeste. Os tipos mais prevalentes são respectivamente os de pele não melanoma, tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero (INCA, 2014).

### **2.1.3 CÂNCER DE PRÓSTATA**

O primeiro caso de câncer de próstata foi notificado em 1853 por J. Adams através de exame histológico, sendo considerado um quadro de “doença muito rara” (ADAMS, 1853). Após mais de cem anos, o câncer de próstata se tornou um grave problema de saúde que afeta milhares de homens em todo mundo. É o segundo tipo de câncer que mais acomete homens (899.000 novos casos, 13,6% do total) e o quinto mais comum no mundo, sendo a incidência clínica e a mortalidade por este tipo de câncer comumente associada a diversificação das regiões geográficas mundiais, com taxas reduzidas na Ásia e mais elevadas na Austrália, Nova Zelândia, Europa Ocidental, Norte da Europa, América do Norte e Escandinávia (KLEIN et al., 2007; HAAS, 1997; INCA, 2014) (Figura 4). Em todo o mundo, 62% dos casos de câncer da próstata identificados, afetam homens com idade de 65 anos ou superior (INCA, 2014).



Novos casos por 100.000 habitantes, idade padronizada.

**Figura 4:** Os cânceres mais comuns diagnosticados pelo Índice de Desenvolvimento Humano (HDI) (IARC, 2014).

Nos Estados Unidos, cerca de 180.000 novos casos e de 31.000 mortes ocorreram anualmente devido ao Câncer de Próstata, sendo a segunda principal causa de morte por câncer entre os homens (GREENLEE et al., 2001, SROUGI, 2003; JERNAL et al., 2003 AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011; SIEGEL et al., 2012). Entre os anos de 2000 e 2050 é esperado um aumento significativo no número de novos casos, com uma elevação de 12,4% para 19,6% (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2011).

A etiologia da neoplasia maligna de próstata não é bem esclarecida e suas diferenciações tumorais não obedecem um padrão, podendo ser indolores, de lento desenvolvimento ou agressivos, com rápidas taxas de evolução (GIMBA et al., 2003). Comparado a outros tipos de câncer, a progressão de casos de CaP aumenta diretamente com o avanço da idade biológica e, de alguma forma, relacionam-se o estilo de vida, ambiental e dietéticos a evolução tumoral,

sem mencionar fatores genéticos, étnicos e hormonais (andrógenos) (KLEIN et al., 2007; SHIMIZU et al., 1991; WHITTEMORE, 1995; COOK et al., 1999).

Alguns trabalhos que associam o risco de câncer de próstata com fatores dietéticos apontam indícios favoráveis a manifestação da doença quando correlacionado a ingestão de gordura saturada (principalmente a animal), pouca fibra, carnes vermelhas, produtos lácteos (GIOVANNUCCI, 1993; WHITTEMORE, 1995; VEIEROD, 1997; FAGUNDES et al., 2002), cálcio e embutidos (INCA, 2014). Por outro lado, uma alimentação rica em vegetais, vitaminas D e E, licopeno e Ômega-3 são fatores de prevenção (INCA, 2014).

Estudos epidemiológicos associam o risco de desenvolvimento de doença sexualmente transmissível (DST) a inflamação da etiologia do CaP, visto que células produzem óxido nítrico e algumas classes de oxigênio reativo são potencialmente causadores de dano celular ou genômico na próstata (PAGANO et al., 2004). Trabalhos recentes relatam que o entendimento sobre os distúrbios causados por agentes infecciosos, como bactérias e vírus são úteis na compreensão de como os processos celulares basais resultam no câncer (DENNIS & DAWSON, 2002; HAYES et al., 2000; PAGANO et al., 2004). Sobretudo, a ocorrência de câncer de próstata é 1,6 vezes mais comum em homens negros que nos de pele caucasiana (INCA, 2014).

A epidemiologia dessa doença demonstra que homens com histórico familiar positivo identificam as anormalidades mais precocemente, de 6 a 7 anos antes dos que não possuem parentesco afetado pela doença neoplásica (BRATT, 2002). Assim, estudos comprovam que levando em conta a herança genética familiar, o risco de desenvolvimento de câncer de próstata dobra para homens que possuem apenas um familiar próximo como pai ou irmão afetado pela doença, quadruplica quando possui dois parentes de primeiro grau e se torna dez vezes maior quando há três familiares que apresentam a doença (CARTER et al., 1992; STEINBERG et al., 1990; SROUGI, 2005).

No ano de 2014, foram estimados 68.800 casos novos de câncer de próstata para o Brasil, correspondentes a um risco estimado de 70,42 casos novos a cada 100 mil homens (Figura 5 e Figura 6). Excluindo os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata é o que mais acomete os homens em todas as regiões do país (INCA, 2014) (Quadro 1).

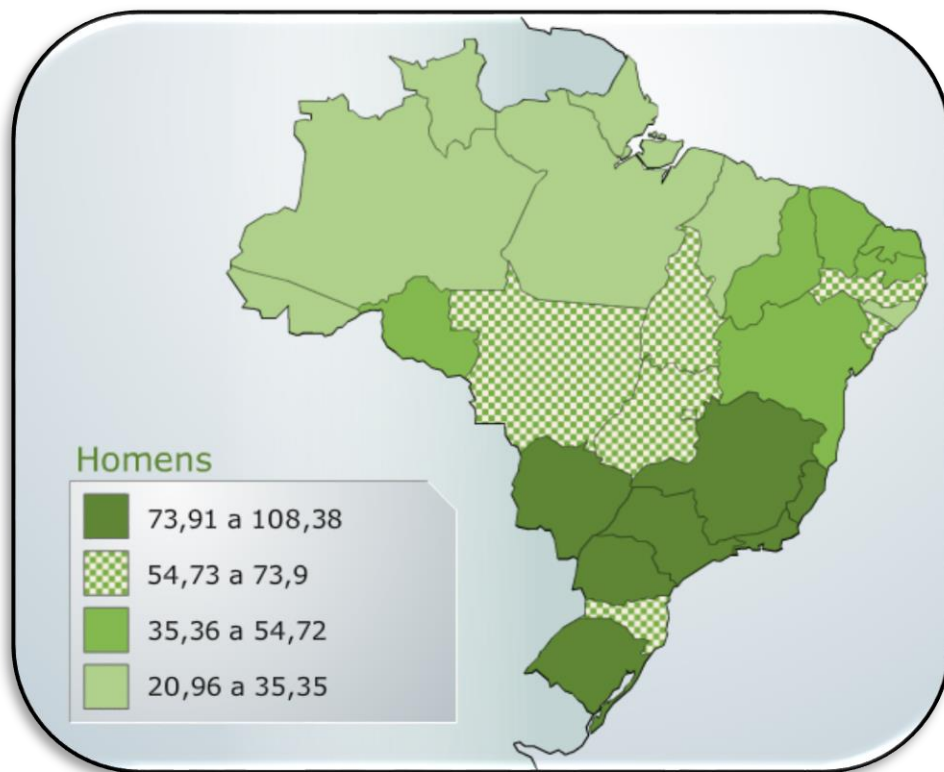
O adenocarcinoma é um tipo de neoplasia maligna anátomo-patológico com ocorrência estimada em 95% das que afetam a glândula prostática (MATTOS & FONSECA, 1998; ALMEIDA, 2001; LOPES, 2001), sendo a testosterona o maior estimulador de seu desenvolvimento (GIANINI, 2004).

Localização primária	casos novos	%	Homens 
Próstata	68.800	22,8%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%	
Cólon e Reto	15.070	5,0%	
Estômago	12.870	4,3%	
Cavidade Oral	11.280	3,7%	
Esôfago	8.010	2,6%	
Laringe	6.870	2,3%	
Bexiga	6.750	2,2%	
Leucemias	5.050	1,7%	
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%	

\* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

**Figura 5:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 em homens, exceto pele não melanoma\* (INCA, 2014).

Disseminado por meio de difusão de vasos sanguíneos e linfáticos, a metástase óssea ocorre na maioria dos pacientes acometidos por malignidade primária em próstata, causando injúria na coluna, fêmur, bacia, costela, crânio, fígado, glândulas adrenais e prevalentemente no pulmão (MATTOS & FONSECA, 1998; ALMEIDA, 2001). Os resultados terapêuticos para combate ao câncer de próstata estão intimamente ligados ao estadiamento e a proporção atingida da neoplasia. Em estágios de infiltração de gordura periprostática, vesículas seminais, linfonodos pélvicos ou quando há processo metastático, o tratamento se torna mais dificultoso, instituindo mal prognóstico. Diferentemente quando há identificação prematura da malignidade, onde o tratamento tem chances quase absolutas de efetividade (GIANINI, 2004). A dificuldade encontrada na patologia está ligada ao crescimento desordenado e ágil das células que, apesar da vascularização ativa presente, o abastecimento sanguíneo para o tecido cancerígeno também se mostra desorganizado e deficiente, inviabilizando a acessibilidade de agentes terapêuticos, sendo necessário o aumento da dose medicamentosa administrada, o que resulta em níveis de toxicidade (BUSTAMANTE et al., 2009). Técnicas como remoção cirúrgica tumoral, quimioterapia e radioterapia baseadas segundo o tipo histológico, estadiamento, localização tumoral e prognóstico do paciente são utilizadas no tratamento contra o câncer (GIANINI, 2004).



**Figura 6:** Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da próstata) (INCA, 2014).

#### 2.1.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO CLÍNICA

Denominado carcinogênese ou oncogênese, o desenvolvimento do câncer geralmente acontece de forma lenta e progressiva, por vezes havendo a necessidade de anos para ser possível a identificação de um tumor visível (INCA, 2006). As mutações genéticas causadas por carcinógenos (agentes químicos, ambientais, radioativos, entre outros) são fatores determinantes para este processo de formação (COTRAN et al., 2000; SILVA, 2004). A Sociedade Americana de Câncer, em comunhão com a Associação Americana de Urologia recomenda o exame anual através do antígeno específico da próstata (PSA – *Prostate Specific Antigen*) e o exame de toque retal (DRE – *Examination Rectal Digital*) para todos os homens com idade a partir de 50 anos e com expectativa de vida  $\geq 10$  anos (SMITH et al., 2003).

**Quadro 1:** Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer em homens de acordo com sua localização primária\*

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Homens			
	Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93
Mama Feminina	-	-	-	-
Colo do Útero	-	-	-	-
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76
Ovário	-	-	-	-
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78
Corpo do Útero	-	-	-	-
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86
<b>Subtotal</b>	<b>203.930</b>	<b>208,77</b>	<b>51.100</b>	<b>241,30</b>
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72
<b>Todas as Neoplasias</b>	<b>302.350</b>	<b>309,53</b>	<b>70.750</b>	<b>334,08</b>

\* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: INCA, 2014.

Homens que possuem parente de primeiro grau afetado pela doença podem ser rastreados a partir dos 45 anos e os que possuem múltiplos, podem iniciar a pesquisa mais precocemente aos 40 anos de idade (CARROLL et al., 2001; DAVID, 2003).

Todas as doenças de próstata tendem a resultar no aumento dos níveis séricos de PSA, incluindo o câncer de próstata (STAMEY et al., 1987; CATALONA et al., 1991). Entretanto, o mesmo apresenta pouca sensibilidade e especificidade (WILSON & JUNGNER, 1968). Roobol et al. (2009) apresentaram diversos dados que relatam a ineficácia do teste de PSA como

teste padrão. As desvantagens relacionadas ao rastreamento e exames de confirmação diagnóstica são razoavelmente frequentes mostrando resultados falso-positivos, o que gera sobrediagnóstico e sobretratamento (ILIC, 2013; THOMPSON et al., 2004). Em uma revisão realizada pela *U.S. Preventive Service Task Force* (USPSTF), no ano de 2012 foi desencorajado a realização rotineira do exame PSA sanguíneo. E o mesmo ocorreu na Inglaterra (MOYER, 2012).

Apesar de indolor e praticada mundialmente, outro método utilizado para a identificação de anormalidades da próstata é o toque retal. Contudo, o preconceito gerou uma resistência, não conquistando muitos adeptos (FREIRE, 2003). Um outro meio diagnóstico é a biópsia, para a análise histológica de fragmentos de tecido da próstata. Contudo, estudos identificaram que uma grande quantidade de homens são submetidos a biópsia prostática e, permanecem com níveis séricos de PSA elevados, gerando uma contínua inquietação de um possível câncer de próstata não detectado devido a imperfeições na exatidão dos métodos de biópsias TRUS (*Transrectal Ultrasound*) e PSA (CLARKE, 2010).

A evolução do câncer em seus estágios mais iniciais se apresenta assintomática, desta forma, a detecção é difícil e normalmente só ocorre em fases mais avançadas, quando estão em grande volume ou metastáticos. A detecção precoce da doença incide diretamente na sobrevivência do paciente. Assim, é requerido um processo sensível, eficaz e rápido para a detecção do CaP, em especial, os assintomáticos (CHOI et al., 2010; GIANINI, 2004).

É indispensável o avanço tecnológico na área diagnóstica, em especial quanto aos métodos de detecção, para que sejam mais específicos, sensíveis e confiáveis, permitindo um diagnóstico precoce ainda em níveis elementares da carcinogênese (CHOI et al., 2010).

Nesse sentido, estudos no campo da nanotecnologia e de biomarcadores tumorais, tem sido tema de intensa investigação mundial, onde, o uso de nanoradiofármacos, aptâmeros e anticorpos monoclonais são considerados o que há de mais avançado em termos de detecção precoce do câncer (CHOI et al., 2010).

### **2.1.5 APTÂMEROS E SUAS PROPRIEDADES**

Oriunda do Latin “*aptus*”, a palavra aptâmeros significa ligar/encaixar (ELLINGTON, 1990), referência direta a habilidade de se ligarem em complexos com estruturas terciárias

reconhecendo seus alvos com elevada afinidade e especificidade, semelhante a encontrada em interações antígeno-anticorpo (XIAOYU PEI et al., 2014). Foi durante as décadas do ano de 1990 que grupos independentes desenvolveram a seleção *in vitro* e a amplificação para a isolamento de sequências de RNA oligonucleotídeos pela randomização de oito nucleotídeos de RNA em “*stemloop*”, estudados pela união à polimerase T4 dos bacteriófagos, que resultou após a seleção em elevação da afinidade (ELLINGTON & SZOSTAK, 1990; TUEK & GOLD, 1990). Robertson & Joyce (1990) mostraram a capacidade de um RNA *in vitro* clivar uma sequência de ssDNA específica e a possibilidade de escolha criteriosa e fundamentada de RNAs com atividade catalítica para a seleção *in vitro*, as chamadas aptazimas (HESSELBERTH et al., 2003). Outros trabalhos também abordaram os aptâmeros de base de DNA (ELLINGTON, 1992) e bases modificadas (FERREIRA & MISSAILIDIS, 2007). A partir de então, as primeiras experiências com as técnicas de seleção *in vitro* foram introduzidas e passou a se utilizar a palavra aptâmeros como o grande benefício deste processo, evidenciando as potencialidades que seu uso envolve e as diversas aplicações possíveis (BUNKA, PLATONOVA & STOCKLEY, 2010).

A capacidade biossensorial dos aptâmeros tem sido discutida com bastante frequência (HAN, LIANG & ZHOU, 2010) devido as suas qualidades de aplicação e síntese. Os aptâmeros são sequências curtas de ácidos nucleicos sintéticos (ssDNA ou ssRNA) (HASEGAWA et al., 2008; CHIU and HUANG, 2009; HAN et al., 2010; HUA et al., 2010) com extensão de 15-40 nucleotídeos e conformação tridimensional (BELLUZO et al., 2008; ZHU H et al., 2012; CHIU and HUANG, 2009). Habitualmente selecionados *in vitro* a partir de uma extensa biblioteca de combinações com trilhões de diferentes sequências por processo de Evolução Sistemática de Ligantes por Enriquecimento Exponencial (SELEX – *Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment*) (CHIU & HUANG, 2009; MAEHASHI & MATSUMOTO, 2009; MAIRHOFER et al., 2009; HUA et al., 2010).

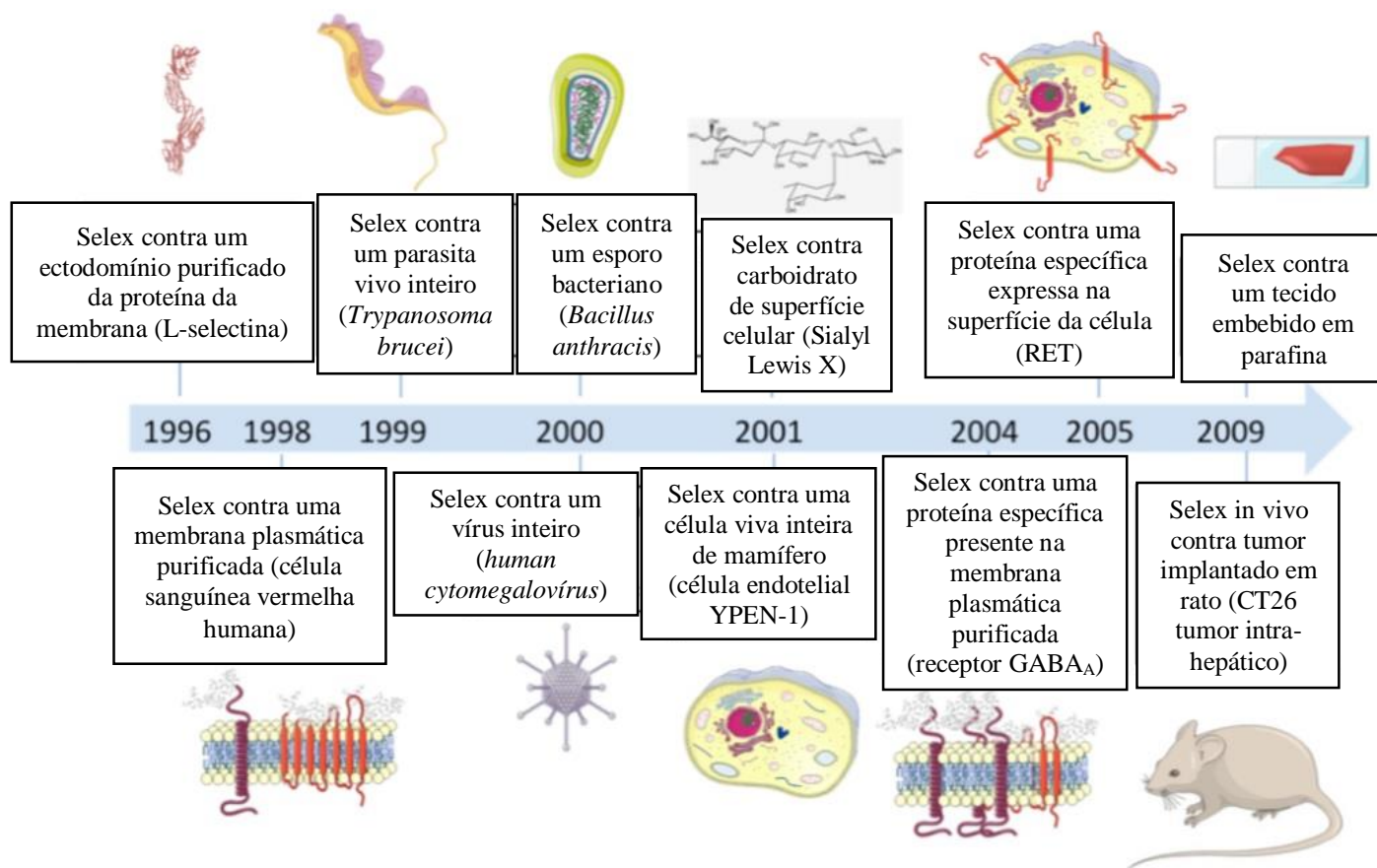
Os oligonucleotídeos são tipicamente comparáveis aos anticorpos monoclonais (mAbs) quando se trata de afinidade e especificidade de suas moléculas marcadas (GOLD, 1995; FAMULOK & JENNE, 1999), porém demonstram maiores tolerâncias a mudanças químicas e térmicas, não exibindo dissociação muito influenciada pela condição fisiológica. Há outras singularidades no uso dos aptâmeros frente aos anticorpos: eles são de tamanho reduzido e menos complexos, com baixa imunogenicidade; facilmente sintetizados e modificados *in vitro*; com baixo custo de reprodutibilidade e não variação entre lotes (KA-TO et al., 2013). Possuem alta afinidade e especificidade por seus alvos; sua estrutura é flexível alcançando epítomos que

os anticorpos não atingem (MAJUMDER et al., 1998) e mostram alta estabilidade havendo possibilidade de armazenamento antes de seu uso (MISSAILIDIS & PERKINS, 2007; YAO et al., 2010).

Gerados a partir de regiões específicas do alvo (WILLNER & ZAYATS, 2007), a afinidade dos aptâmeros supera as apresentadas pelos anticorpos monoclonais (MISSAILIDIS & PERKINS, 2007) e a marcação com grupos conhecidos não modifica sua conformação e afinidade de ligação (SHANGGUAN et al., 2006). Já as ligações de anticorpos com aminas de superfície ocorrem indiretamente, podendo ocasionar a perda funcional da interação antígeno-anticorpo esperada pelo mesmo (JAYASENA, 1999; MAIRAL et al., 2008). As fitas simples de DNA ou RNA oligonucleotídeos são capazes de reconhecer diminutas alterações estruturais em moléculas alvos, como grupos metil (BRIDONNEAU et al., 1999), hidroxil (MANNIRONI et al., 1997), D- ou L-enantiômeros (GEIGER et al., 1996) e mantém o reconhecimento específico de seu alvo dependente da compatibilidade estrutural, ligações de hidrogênio, interações eletrostática, Van de Waals, hidrofóbicas e empilhamento de anéis aromáticos (ELLINGTON & SZOSTAK, 1990; STOLTENBURG et al., 2005; SONG et al., 2008; XIAOYU PEI et al., 2014).

Stoltenburg et al. (2007) demonstraram a identificação específica de uma grande diversidade de alvos orgânicos e inorgânicos (YOU et al., 2003), como íons metálicos  $Zn^{+2}$  e  $Ni^{+2}$  (CIESIOLKA, 1996; HOFMANN et al., 1997; RAJENDRAN AND ELLINGTON, 2008), corantes orgânicos e dopamina (ELLINGTON & SZOSTAK, 1990; MANNIRONI et al., 1997; CONNELL, ILLANGESEKARE & YARUS, 1993; MANNIRONI, 2000; HARADA & FRANKEL, 1995), aminoácidos como L-arginina, L- citrulina, L-valina (GEIGER et al., 1996; FAMULOK, 1994; MAJERFELD & YARUS, 1994), carboidratos como a celobiose (YANG et al., 1998), antibióticos como canamicina A, estreptomicina, neomicina, tetraciclina, cloranfenicol (LATO et al., 1995; WALLACE & SCHROEDER, 1998; WALLIS et al., 1995; BERENS et al. 2001; BURKE et al., 1997), células (SHANGGUAN, 2006; TANG et al., 2007; CHEN et al., 2008; SEFAH, 2009), organismos inteiros (LORGER, 2003), vírus (TANG et al., 2009), cofatores como cianocolabamina, riboflavina, coenzima A, FAD, NAD (LORSCH & SZOSTAK, 1994; LAUHON & SZOSTAK, 1995; SARAND et al., 2003; BURGSTALLER & FAMULOK, 1994; LAUHON & SZOSTAK, 1995), estruturas complexas esporoladas de anthrax (BRUNO & KIEL, 1999), nucleotídeos e derivados como adenina, ATP e cAMP (MELI et al., 2002; SASSANFAR & SZOSTAK, 1993; SAZANI et al. 2004; KOIZUMI & BREAKER, 2000), peptídeos e proteínas de diferentes tamanhos e funções como a T4 DNA

polimerase,  $\alpha$ -trombina, interferon- $\gamma$ , VEGF, HIV-1 RT, vasopressina, L-selectina e o marcador tumoral MUC 1 (TUERK & GOLD, 1990; BOCK et al., 1992; KUBIK et al., 1997; JELLINEK et al., 1994; TUERK et al., 1992; WILLIAMS et al., 1997; NIEUWLANDT, 1995; FERREIRA et al., 2006; HICKE et al., 1996; ELLINGTON, 1990; MALLIKARATCHY et al., 1997; DAVIS, 1998) (Figura 7).



**Figure 7.** Novos métodos desenvolvidos de SELEX para identificar aptâmeros contra biomarcadores da superfície celular segundo a linha do tempo (AGNES, DUPONT & DUCONGÉ, 2011).

A diversificação de alvos gerados através da técnica SELEX torna possível sua aplicação em muitas áreas de estudo. Porém, para que um alvo seja sintetizado com elevada afinidade e especificidade se faz necessária a concentração considerável e alta pureza das moléculas do alvo para aumentar a especificação de seleção. De acordo com os grupos químicos presentes nos alvos há uma variação na sua aptidão no momento da seleção, facilitando as seleções que apresentam grupos carregados positivamente como é o caso do grupo amino ou

em casos em que há a presença de grupos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio e grupos planares como os grupos aromáticos (STOLTENBURG et al., 2007).

Quando os alvos apresentam moléculas caracteristicamente hidrofóbicas e grupos carregados negativamente (ex: grupo fosfato), de maneira geral, prevalece uma condição de maior dificuldade no processo de seleção (STOLTENBURG et al., 2007).

A constante de dissociação é baseada no preenchimento de 50% dos receptores livres da superfície celular por ligantes. Receptores com alta afinidade tem uma constante de dissociação reduzida e receptores com baixa afinidade tem elevada constante de dissociação (MOYES C. & SCULTE, 2010). A constante de dissociação no equilíbrio (kd) dos aptâmeros alterna entre uma pequena quantidade de picomoles por litro até o limite de alguns nanomoles por litro (MISSAILIDIS & PERKINS, 2007).

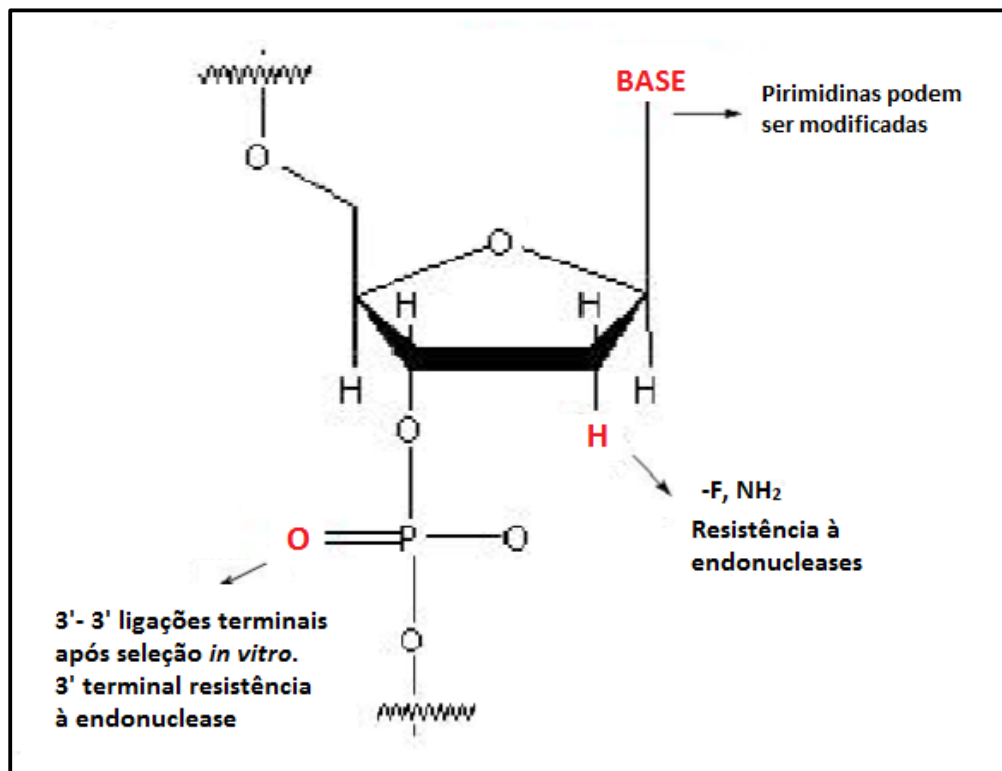
Aptâmeros para ácidos nucleicos tem conformidade com a faixa de nanomolar como ocorre com o aptâmero para a transcriptase reversa que mostra afinidade na faixa de 0,3-20 nM e o aptâmero para a integrase retroviral que possui afinidade na faixa de 10-800 nM (JAMES, 2000). Em sumo, os mAbs possuem Kd na faixa de mili/micromolar. A constante de dissociação (kd) aptâmero/alvo é comparável à constante anticorpo/antígeno, na ordem de picomolar a micromolar (CHIU; HUANG, 2009).

Diversos estudos vêm relatando a sustentabilidade do uso de aptâmeros para imagem *in vivo*, assim como, têm-se proposto o esclarecimento das propriedades da biodistribuição dos oligonucleotídeos (TAVITIAN et al., 1998; ZHANG, 2000).

Uma desvantagem no uso de aptâmeros é a degradação por nucleases de oligonucleotídeos. Contudo essa limitação vem sendo contornada pelo uso de diversas técnicas, dentre elas alterações nas extremidades estruturais 3' e/ou 5' dos aptâmeros, garantindo resistência as nucleases através da inserção de bases modificadas, e dessa forma mudando a meia-vida de minutos para horas, fornecendo fixação para enzimas ou uma gama de reagentes, e assim, obtendo seu efeito ideal (KHAN & MISSAILIDIS, 2008; MAKWANA et al., 2008; KUANCAN LIU, et al. 2013); troca da amina (NH<sub>2</sub>) ou flúor (F) na posição 2' da ribose ou desoxirribose (FERREIRA & MISSAILIDIS, 2007). Há também a possibilidade de ligar o aptâmero com molécula de PEG, nanopartícula de ouro, *quantum dots* ou nanotubos de carbono, aumentando assim sua meia-vida biológica (PIEVE et al., 2012; LEE et al., 2010) (Figura 8).

Com o processo SELEX é possível produzir ligantes inovadores, com alta potencialidade na aplicação diagnóstica e terapêutica (MAJUMDER, 2009). Ao contrário da

obtenção dos anticorpos, estabelecida por meio do sistema imunológico animal, o processo SELEX permite a síntese de aptâmeros não imunogênicos e atóxicos (ELLINGTON, 1992).

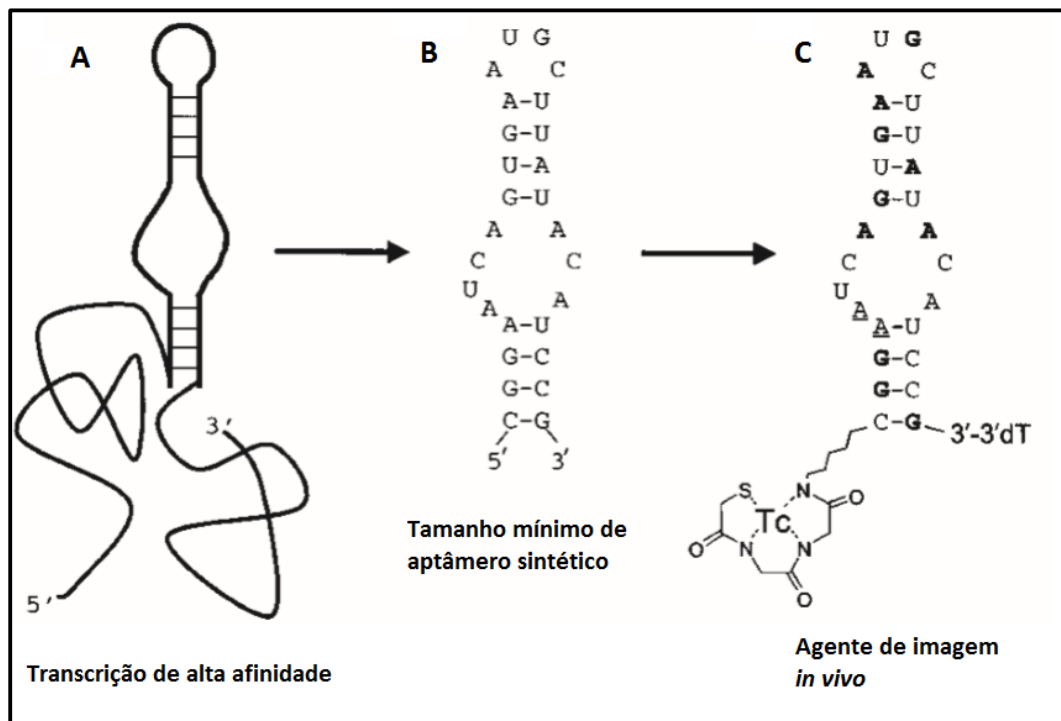


**Figura 8.** Possibilidades de modificações químicas de uma base nucleotídica para aumentar a resistência a endonuclease ou outras modificações funcionais. (KHAN & MISSAILIDIS, 2008).

Além de possuírem custos mais baixos de síntese devido aplicação metodológica baseada em manipulação e repetição de seleção *in vitro*, os aptâmeros também são dotados de demasiada precisão e reprodutibilidade entre os lotes produzidos, o que os torna mais viáveis e vantajosos que os mAbs para comercialização (MISSAILIDIS & PERKINS, 2007; YOU et al., 2003). O custo da técnica pode ter valor agregado aumentado se forem aplicados enantiômeros (*spiegelmers*) no intuito de aumentar a estabilidade das moléculas selecionadas (KLUSMANN et al., 1996) uma vez que há modificação dos quatro ribonucleotídeos (MARANGONI, 2011).

O pequeno tamanho (10-15 kDa) e a natureza polianiônica dos aptâmeros favorecem a rápida depuração sanguínea, a absorção tecidual, a incorporação celular e uma maior proporção de acumulação no alvo, o que propulsiona seu uso com fins diagnóstico e terapêutico devido à baixa da residência no fígado e nos rins (HICKE and STEPHENS, 2000; CERCHIA et al.,

2002; GUHLKE, FAMULOK & BIRSACK, 2003; WHITE et al., 2000; KA-TO et al., 2013) (Figura 9).



(A) Um aptâmero de alta afinidade é identificado pelo processo SELEX. 2'-F pirimidinas são incorporados durante as seleções. (B) O aptâmero é truncado para o tamanho mínimo e é agora uma molécula sintética. (C) O aptâmero como um agente de diagnóstico in vivo.

**Figura 9.** Arquetípico aptâmero (HICKE & STEPHENS, 2000).

Aptâmeros são sujeitos a expressão intracelular, denominando-se itrâmero, com propriedades relacionadas ao alcance de proteínas associadas à regulação de vias intracelulares e transdução de sinal (FAMULOK et al., 2001) ou realizando trabalhos como sensores, “aptasensores” (MINUNNI et al., 2004).

Os aptâmeros utilizados como ferramenta diagnóstica podem ser usado em técnicas de citometria de fluxo, arranjos (*arrays*), imunofluorescência, testes fluorescentes e testes em placas de Elisa (MAJUMDER et al., 2005; ULRICH et al., 2006).

Uma aplicação que vem ganhando repercussão internacional é a conjugação com radioisótopos, nesses casos, os aptâmeros possuem características aptas a sinalizar e quantificar moléculas de alta relevância para o progresso dos radiofármacos usados em exames cintilográficos. Sua farmacocinética favorável mostra a utilidade em outra modalidade de exames da medicina nuclear, a Tomografia por Emissão de Pósitrons (PET) (ROBERTA,

2014). A aplicação dos aptâmeros combinada com nanopartículas é o que se tem de mais novo entre os pesquisadores, tornado-se um tema com alta propensão para estudos prospectivos (KUANCAN et al., 2013).

#### 2.1.5.1 A TÉCNICA SELEX

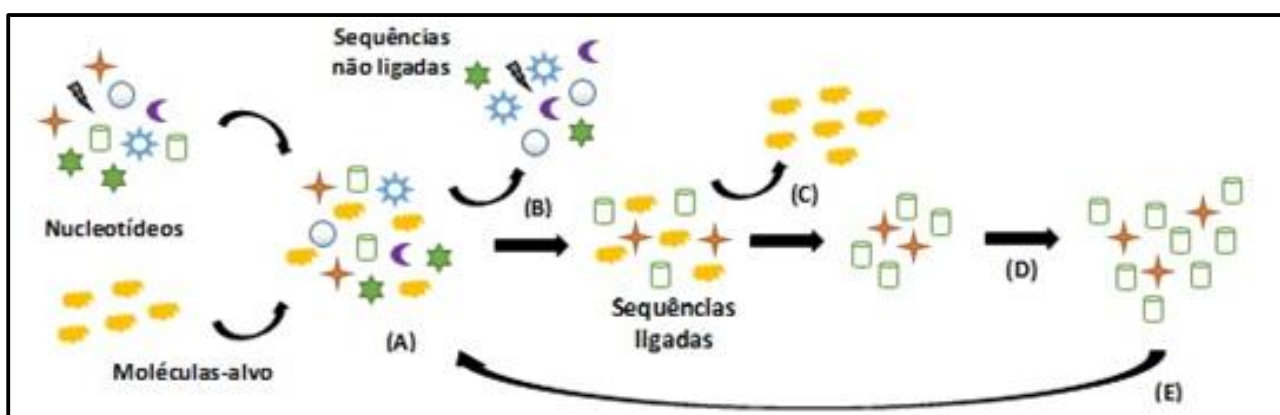
A SELEX se fundamenta em ciclos repetitivos que envolvem a incubação do ácido nucléico e o alvo; a separação do limite de moléculas não ligadas e a amplificação das moléculas ligadas (LOU et al., 2009). A geração bem sucedida de aptâmeros e suas características particulares estão ligadas ao tipo de separação ou divisão sujeitos no processo *in vitro*, SELEX (GOPINATH, 2007). Apesar do processo iterativo de desnaturação e renaturação ao longo do processo SELEX, os aptâmeros são muito estáveis (LEE, 2008; CHIU and HUANG, 2009; CITARTAN M et al., 2012).

O modelo segue um rigoroso processo de evolução constante que envolve uma biblioteca combinatória de sequências de ácidos nucléicos aleatórios, com variações estruturais moleculares estimadas entre  $10^{14}$  e  $10^{15}$  diferenciações, acompanhadas por uma região conservadora que permite a ligação de indutores específicos para a reação da cadeia de polimerase reversa (do inglês “*Polimerase Chain Reaction*” - PCR) garantida a uma outra porção do oligonucleotídeo aleatória (HAMULA et al., 2006; STOLTENBURG et al., 2007; BANERJEE and NILSEN-HAMILTON, 2013).

Assim em resumo, a técnica consiste na colocação da molécula alvo de interesse juntamente com o *pool* de oligonucleotídeos, onde incubados, pequenos fragmentos se unem a molécula alvo e são isoladas da ínfima biblioteca posteriormente por método padrão de separação física, seja por centrifugação (RHIE et al., 2003; HOMANN & GORINGER, 1999), eletroforese capilar (MENDONSA & BOWSER, 2004; TANG et al., 2007), citometria de fluxo (DAVIS et al., 1997), cromatografia de afinidade com a imobilização do alvo em sepharose ou agarose (LIU & STORMO, 2005; TOMBELLI et al., 2005) ou mesmo pela ultrafiltração com filtros de nitrocelulose (BIANCHINI et al., 2001, TUEK & GOLD, 1990). Uma vez isolados, o alvo é desagregado do aptâmero por diferentes possibilidades metodológicas, tais como, calor (STOLTENBURG et al., 2005), eluição com ligantes competidores (BRIDONNEAU et al., 1999) ou adição de uréia, SDS ou EDTA (BIANCHINI et al., 2001; THEIS et al. 2004; WEISS et al., 1997). A quantidade de oligonucleotídeos enriquecidos é estabelecida por isótopos

radioativos (ELLINGTON & SZOSTAK, 1990; SHI et al., 2002) ou marcadores fluorescentes (STOLTENBURG et al., 2005; RHIE et al., 2003) (Figura 10).

As sequências de oligonucleotídeos conectadas ao alvo são novamente isoladas e amplificadas para que possam formar uma outra biblioteca enriquecida com sequências mais aptas a efetuar ligação na molécula de interesse TUEK & GOLD, 1990; HAMULA et al., 2006; MISSAILIDIS & PERKINS 2007; VESTERGAARD et al., 2007).



Os nucleotídeos são incubados com as moléculas-alvo (A), as sequências ligadas são separadas das não ligadas (B) e são dissociadas da molécula-alvo (C). Realiza-se amplificação por PCR (D) e o ciclo é reiniciado (E).

**Figura 10** - Descrição do processo Selex (Adaptado de CALIL, 2011).

Em seguida, o *pool* enriquecido, ainda na forma de DNA fita dupla (dsDNA), é tratado com a RNA polimerase T7 para a transcrição do dsDNA em RNA. No caso da necessidade de formação DNA, utiliza-se métodos de estreptavidina/biotina, ou, o método *primes* (STOLTENBURG et al., 2007).

Em seguida, submete-se a molécula ao alvo com o *pool* enriquecido a sucessivas séries de seleção e amplificação, em média, ocorrem de 8 a 15 repetições de modo a obter, por meio de uma ligação competitiva, uma sequência de aptâmeros com alta especificidade e afinidade para o substrato selecionado. Os aptâmeros são replicados em vetores bacterianos e seguidamente para a posterior caracterização e exposição das sequências de ligação (TUEK & GOLD, 1990; HAMULA et al., 2006; MISSAILIDIS & PERKINS 2007; VESTERGAARD et al., 2007; CHIU and HUANG, 2009) (Figura 11).

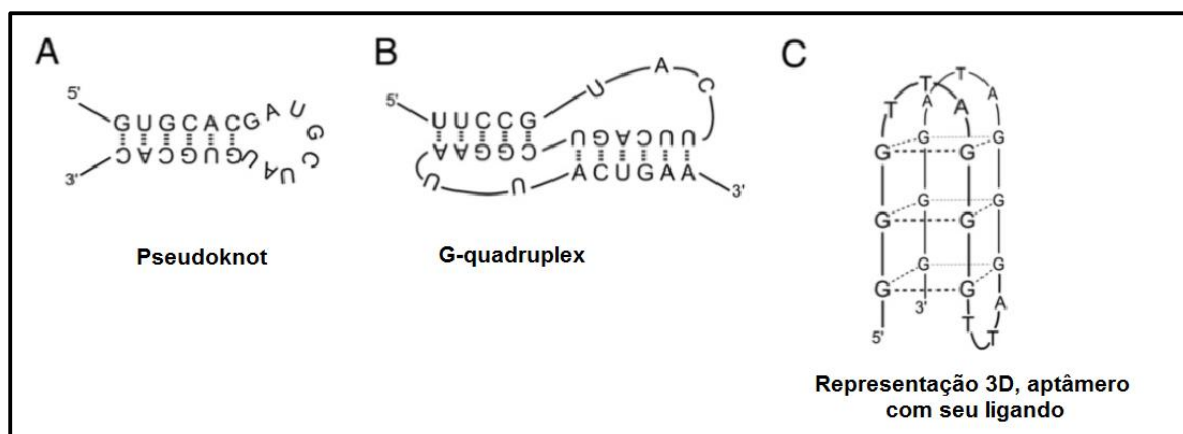


**Figura 11.** Representação do princípio geral da Evolução Sistemática de Ligandos por Enriquecimento Exponencial (SELEX) para um biomarcador de superfície celular (XIAOYU PEI et al., 2014).

Reconhecida a sequência conveniente, ela é sintetizada quimicamente e analisada por estudos de ligação para demarcar a especificidade e afinidade do aptâmero e definir o  $K_d$  (constante de dissociação) (ROBERTA, 2014). A estringência aumenta de acordo com as circunstâncias, podendo resultar em ascendência com a conformidade dos oligonucleotídeos para com seus alvos, diminuindo a concentração do alvo nos ciclos finais ou alterando as características de ligação e lavagem (disposição do tampão, volume e tempo de incubação).

A estrutura obtida dos aptâmeros podem ser em 3D, em forma de lopps, grampos (do inglês *hairpins*), triplexos, G-quadrupelxos, pseudoknots, caules (do inglês *stems*), protuberâncias (do inglês *bulges*) (Figura 12).

O único aptâmero aceito pela FDA e o primeiro a ser posto a venda comercial foi o Macugen (pepaptanib da Eyetech), para tratamento de doença macular degenerativa (AMD - *Age Related Macular Degeneration*), oferecendo tratamento coroidal de neovascularização e melhora da acuidade visual. O aptâmero impossibilita o receptor VEGF, regulador positivo de angiogênese, influente na redução do crescimento tumoral e sua revascularização (GREEN, BELL & JANJIC, 2001; GRAGOUDAS et al., 2004; ADAMIS et al., 2006; NG et al., 2006).



**Figura 12.** Estruturas do Aptâmero (RADOM et al., 2013).

#### 2.1.5.2 MUCINAS (MUC)

A Mucina 1 (MUC 1) pertence a família de genes que codifica glicoproteínas transmembranares de tipo I com alto peso molecular (GENDLER and SPICER, 1995; GENDLER, 2001). Está presente de forma ubiquitária na superfície apical de células epiteliais glandulares, incluindo os sistemas gastrointestinal, respiratório, urinário e trato reprodutivo (GENDLER, 2001). Apresenta como característica comum a repetição de domínios ligados a O-glicossacarídeos e resíduos de serina ou tronina (GENDLER et al., 1990). Embora suas especificações não sejam muito bem conhecidas, a partir do pesado domínio extracelular glicosilado, tem-se relacionado às funções de lubrificação e hidratação do epitélio, assim como, quanto a proteção contra o ataque microbiano (GENDLER et al., 1990; YAMAMOTO et al., 1997). Além disso, demonstram proteção contra alterações de pH e osmolaridade no estômago (secreção ácida), bexiga (urina) e glândulas epiteliais, sudoríparas e lactentes (GENDLER et al., 1990).

A MUC 1 possui grande extensão (1000-2200 aminoácidos) com domínio extracelular composto por uma série de 20 a 25 repetições de aminoácidos, uma subunidade que contém um C-terminal citoplasmático de 72 aminoácidos, seguido por um domínio transmembranar de 31 aminoácidos e uma pequena sequência transmembranar, a qual não é ligada de forma covalente as unidades extracelulares maiores (APOSTOLOPOULOS & MCKENZIE, 1994; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999; HANISCH & MULLER, 2000). A molécula MUC

1 é tão longa que se estende 200-500 nm acima da superfície da célula (HILKENS et al., 1992). O grande domínio extracelular da proteína MUC 1 também desempenha funções adesiva e anti-adesiva e contribui para a amenização da resposta imune. A MUC 1 devido á cauda citoplasmática altamente conservada tem sido relacionada a transdução de sinal (PANDEY et al., 1995; YAMAMOTO et al., 1997; LI et al., 1998). A molécula também exibe uma sequência de polimorfismo e é caracterizada pela diferenciação dependente de perfis de glicano, os quais controlam a antigenicidade e imunogenicidade da mucina (HANISCH & MULLER, 2000).

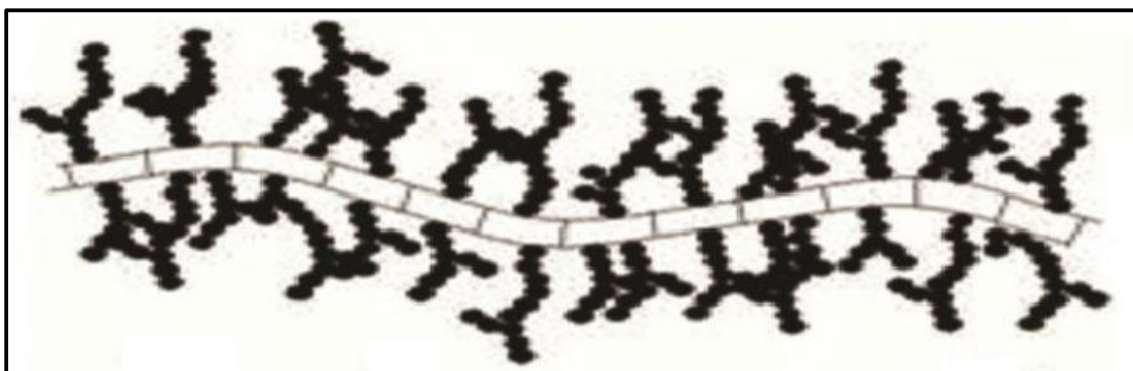
As mucinas podem ser diferenciadas em grupos segundo sua localização subnuclear. Assim, as MUC 1, MUC 3, MUC 4, MUC 12-17 2 MUC 20 são comuns por serem relacionadas a membrana e as MUC 2, MUC 5AC, MUC 5B, MUC 6-8 e MUC 19 são proteínas secretadas. Essas moléculas são grandes e de extensa estrutura por conta dos resíduos de prolina e grau de glicosilação aumentado (FLOREA, CRISTEA & SÂNDULESCU, 2014). Suas diferentes isoformas da proteína MUC, MUC1/TM, MUC1/SEC, MUC1/Y, MUC1/X e MUC1/Z demonstram a diversificação das propriedades das proteínas e suas funcionalidades em meio fisiológico e patológico (BARUCH et al., 1999; LEVITIN, 2005).

A MUC 1 foi identificada como um marcador de lesão neoplásica, sendo superexpressa em diversos tumores como mama, ovário, cólon, pulmão, gástrico, pancreático, próstata e processos metastáticos (GIRLING et al., 1989; HO et al., 1993; GENDLER and SPICER, 1995; ZHANG et al., 1998; TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999; VLAD et al., 2006). Sendo assim, considerado antígeno de potencial uso diagnóstico (FENG et al., 2011; TOGAMI et al., 2010).

O tecido normal e o tumoral possuem a sequência de aminoácidos idênticas, sendo distinguível, dentre outros fatores pela expressão exagerada de mucina pelas células cancerosas (TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999).

Quando comparada a expressão de MUC 1 na superfície celular do epitélio normal e do tecido neoplásico, importantes diferenças são apresentadas. Em adenocarcinomas, há perda da arquitetura ordenada da glândula, não limitando-se a superfície celular epitelial apical e basolateral, sendo assim, expressa em todos os lados da superfície celular (TAYLOR-PAPADIMITRIOU et al., 1999). Ainda, esta presente positivamente em grande quantidade nos tumores, onde sofre modificação na glicosilação e distribuição, resultando na exposição do núcleo da proteína em regiões de repetições conjugadas. A hiperexpressão é desenvolvida de acordo com a influência sofrida do comportamento biológico das células tumorais durante a

evolução e progressão do processo tumoral, apontando ser importante para a manutenção ou geração do tumor (JULIAN and CARSON, 2002).



**Figura 13.** Glicosilação do MUC 1 em células normais (SINGH & BANDYOPADHYAY, 2007).



**Figura 14.** Glicosilação do MUC 1 em células neoplásicas (SINGH & BANDYOPADHYAY, 2007).

## 2.1.6 MEDICINA NUCLEAR

### 2.1.6.1 IMAGIOLOGIA

A medicina nuclear é uma especialidade médica que utiliza os radiofármacos (radionuclídeos isolados ou conjugados a carreadores) para pareceres diagnósticos e/ou terapias de diversas enfermidades, permitindo a avaliação fisiológica e estrutural de sistemas e tecidos, sendo eles sadios ou não, e a identificação específica de alterações neoplásicas precocemente através de estudos não-invasivos por sinalização molecular através da radiação nuclear captada externamente por aparelhos específicos (HAMOUDEH et al., 2008; ROBILOTTA, 2006;

TONIN, 2011). Os exames cintilográficos e mais recente tomográficos positrônico, com ou sem acoplamento a técnicas tomográficas são verdadeiros recursos imagiológicos que antecipam o tratamento, acompanham o desenvolvimento da enfermidade ou alteram a conduta clínica de forma sensível (SAPIENZA, MARONE & CHIATTONE, 2001).

A imagem é gerada a partir da detecção das radiações ionizantes emitidas pelos órgãos ou sistemas que absorvem o radiofármaco e possibilita obter informações sobre o seu funcionamento. Normalmente, é utilizada a radiação gama ( $\gamma$ ) para diagnósticos e as partículas beta ( $\beta$ ) e alfa ( $\alpha$ ) para terapias (THRALL e ZIESSMAN, 2003). O radiodiagnóstico através de estudos de imagens cintilográficas tem sido aplicado com bastante notoriedade como um modelo de elevada precisão para a correta identificação de irregularidades fisiológicas e morfológicas (TONIN, 2011), sendo considerada a área mais explorada da medicina nuclear (ARAÚJO et al., 2008).

Os diferentes tipos de imagem em medicina nuclear abrangem as técnicas SPECT (*Single Photon Emission Computer Tomography*) e a PET (*Positron Emission Tomography*) (OLIVEIRA et al., 2006; ARAÚJO et al., 2008), ambas com sensibilidade na ordem de  $10^{-15}$ , sensíveis o suficiente para a identificação precoce de processos oncogênicos e a determinação da porção tecidual comprometida (CUTLER, 1999).

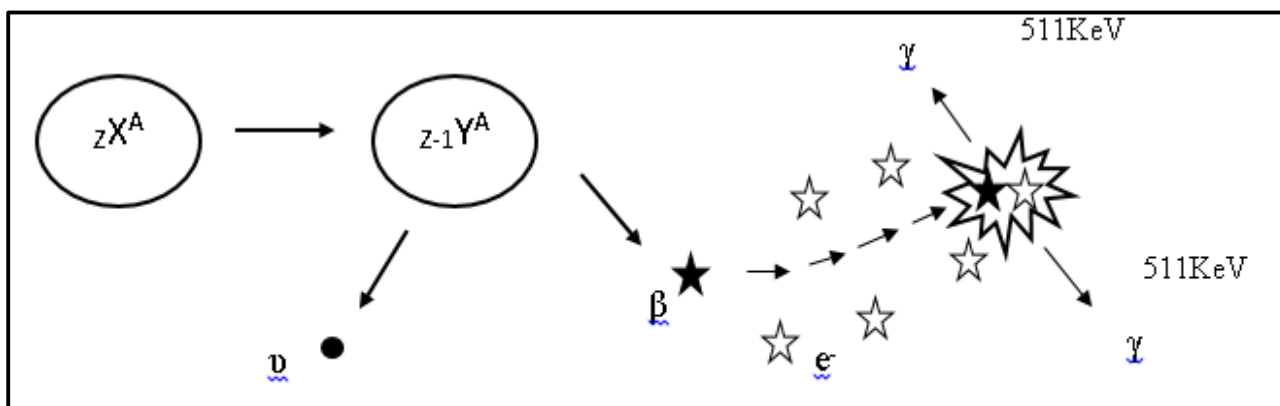
Na SPECT, os radiofármacos são emissores de radiação  $\gamma$ , também podendo utilizar  $\beta^-$ , e sua variação de energia está compreendida entre 75 e 360 KeV, aproximadamente. Já para a PET, os radiotraçadores emitem pósitrons (OLIVEIRA et al., 2006; ARAÚJO et al., 2008), com energia estável de 511KeV.

O aprimoramento dos padrões de eficiência, a confiabilidade do material empregado e da técnica utilizada garantem a qualidade das imagens expressas por novos métodos, proporcionando imagens ideais, livres de erros e artefatos (IAEA, 1991; 2009), fundamental para o fechamento de laudos diagnósticos com o uso mínimo de radiação para minimizar a exposição do paciente submetido ao exame (MATUSIAK et al., 2008).

O desenvolvimento tecnológico sofrido na área clínica nuclear nos últimos anos, somando-se as técnicas de tomografia as imagens nucleares, aumentou a precisão na sinalização molecular pelos radiofármacos emissores de pósitrons ( $\beta^+$ ) e no acompanhamento da carcinogênese (TONIN, 2011).

O decaimento por emissão de partícula  $\beta^+$  é representado pela fórmula  ${}^A_ZX \rightarrow {}^A_{Z-1}Y + {}^0_{+1}e + \nu$ , onde o radionuclídeo pai  ${}^A_ZX$  dá origem ao radionuclídeo filho  ${}^A_{Z-1}Y$  (diminuído de 1 unidade no número atômico que é transferido ao pósitron) e emite o pósitron ( $\beta^+$ ) e um neutrino

( $\nu$ ). Os pósitrons possuem as mesmas características físicas dos elétrons, diferenciando-se após a transferência da energia ao meio de interação pela captura de um elétron, formando o positrônio<sup>1</sup> que se aniquila e gera um par de fótons com energia de 511KeV cada em sentidos opostos (ROBILOTTA, 2006; TAUHATA et al., 2014) (Figura 15).



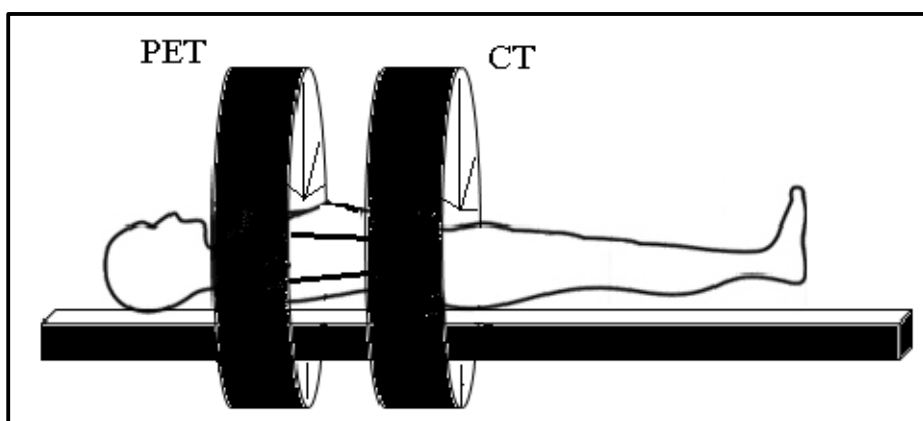
**Figura 15.** Esquema do decaimento da radiação  $\beta$ , a aniquilação do pósitron com o elétron e a formação do par de fótons de 511 keV cada, em direções opostas (Adaptado de ROBILOTTA, 2006).

A utilização dos aptâmeros neste campo de conhecimento possibilitou sua atuação como biossensores devido sua capacidade de reconhecimento do alvo e sua conjugação a múltiplas moléculas que agregam valor a técnica (KHAN & MISSAILIDIS, 2008).

Estão em estudo as combinações de técnicas de imagem, denominadas "imagem multimodalidade", no intuito de aproveitar os pontos fortes de cada modalidade e fornecer informação biológica abrangente, assim minimizando suas limitações (CHERRY, 2009; PATEL et al., 2010). Os sistemas híbridos, os quais combinam duas ou mais modalidades de imagem são comercialmente disponível e amplamente estudados, PET/CT, SPECT/CT, e PET/MRI (EVEN-SAPIR et al., 2003; CATANA et al., 2006; BEYER et al., 2000).

Conhecidos como equipamentos híbridos, estes conseguem sobrepor as imagens anatômicas do paciente pela Tomografia Computadorizada (CT) e as fisiológicas provenientes da biodistribuição do material radioativo administrado pela Tomografia por Emissão de Pósitron (PET), assim, apresentam-se como um método diagnóstico eficaz para estudos de imagens, onde há a capacidade de localização específica e caracterização de doenças pelas distinções biológicas observáveis (CAMARGO, 2005; SOARES, et al., 2010).

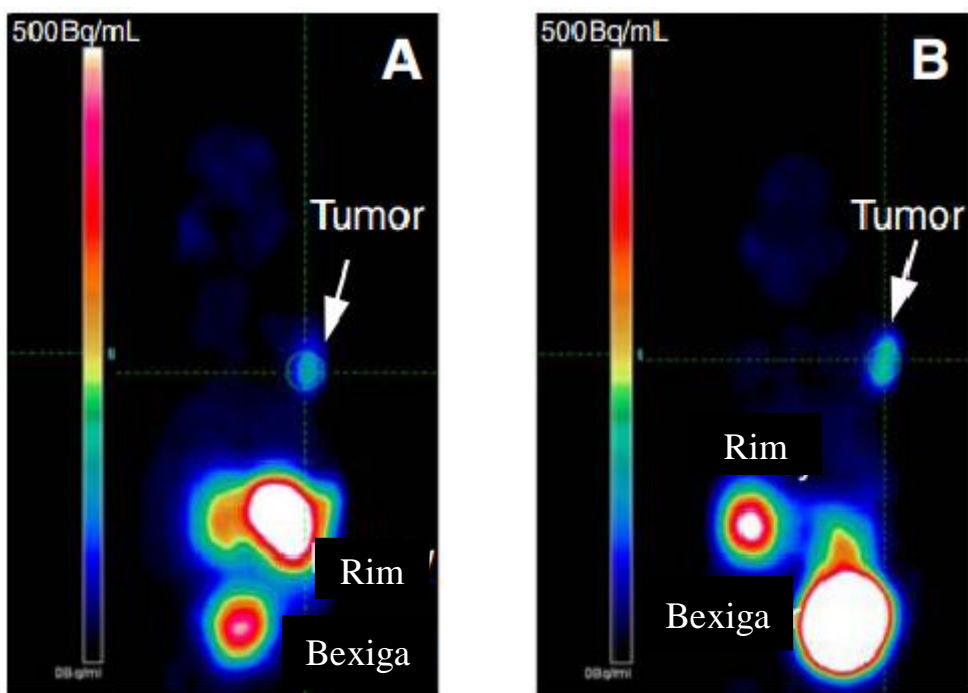
Associados a uma engenharia eletrônica complexa, as câmaras PET permitem a captação da radiação emitida através de inúmeros cristais sensíveis dispostos em anéis, onde somente os fótons de 511KeV de sentido opostos oriundos da aniquilação do pósitron e do elétron que colidem simultaneamente e diametralmente opostos aos cristais ( $180^\circ$ ) do anel do detector são captados. Colisões não simultâneas ou não opostas são descartadas (MARTINS et al., 2008) (Figura 16).



**Figura 16.** Ilustração da técnica PET/CT.

Como ilustrativo a imagens cintilográficas PET, foram dispostas imagens que retratam a utilização do  $^{68}\text{Ga}$  em estudos que objetivavam a melhora das imagens de câncer de próstata direcionadas ao PSA. O estudo foi realizado por SCHÄFER e colaboradores (2012), comparando a utilização do dímero  $^{68}\text{Ga}$ 7 e do monômero  $^{68}\text{Ga}$ 6, onde foi possível concluir a maior afinidade ao PSA, maior absorção e prolongação na superfície celular do complexo do dímero  $^{68}\text{Ga}$ 7, argumentando a capacidade da implementação clínica deste radiomarcado na pesquisa de câncer de próstata (Figura 17).

É notável que o composto monomérico  $^{68}\text{Ga}$  6 e o composto dimérico  $^{68}\text{Ga}$  7 foram clareados rapidamente da circulação e dos tecidos que são PSA negativos, sendo captados fortemente pelo tumor, nos rins e bexiga, devido a excreção do radiomarcado ser renal, onde a captação mais acentuada foi do  $^{68}\text{Ga}$  7.



A) Monômero [ $^{68}\text{Ga}$ ] 6.

B) Dímero [ $^{68}\text{Ga}$ ] 7.

**Figura 17.** Imagem de corpo inteiro em corte coronal de camundongo Nude atímico masculino portador de tumor xenográfico originado de células de adenocarcinoma prostático humano de lesão metastática realizada em microPET (SCHÄFER et al., 2012).

#### 2.1.6.2 RADIOFÁRMACOS

O primeiro uso de radiofármacos em humanos data de 1927, aplicados para avaliação circulatória com solução salina expostas ao radônio (BLUMGART and YENS, 1926). E os primeiros estudos com o  $\text{I}^{131}$ , orientados a funcionalidade tireoidiana aconteceram em 1938, iniciando o uso de radioisótopos com finalidades em áreas médicas e biológicas (HERTZ, ROBERT & EVANS, 1938; OLIVEIRA e CARNEIRO-LEÃO, 2008).

Por definição, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) radiofármacos são “preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos” (ANVISA, RDC N° 63, 2009), sem influenciar na avaliação da função do órgão, do processo fisiológico normal ou do modificado patologicamente (THRALL, ZIESSMAN, 2003).

Os radiofármacos são administrados, normalmente por via endovenosa, e têm por finalidade sinalizar anormalidades morfológicas e disfunções fisiológicas (THRALL,

ZIESSMAN, 2003). Tendo seu uso expandido para o acompanhamento do estadiamento tumoral e resposta terapêutica (SCOTT et al., 2007; LIU & EDWARDS, 1999).

Os radiofármacos podem ser divididos em uma porção radioativa, responsável pela sinalização molecular com detecção externa de uma zona alvo e uma porção não radioativa, que possui funções carreadoras, encaminhando o radionuclídeo até o órgão específico ou processo patológico a ser diagnosticado (ARAÚJO et al., 2008; THRALL, ZIESSMAN, 2003).

O radiofármaco ideal deve possuir características tais como: i) a quantidade de emissão de energia das partículas ou radiação eletromagnética capaz de exceder os limites do corpo humano e alcançar os detetores, ii) distribuição adequada, iii) ausência de toxicidade ou efeitos secundários, iv) não devem sofrer dissociação, v) devem ser acessíveis economicamente e vi) devem possuir processo de marcação radioativa simples (THRALL, ZIESSMAN, 2003).

A efetividade de um radiofármaco normalmente é determinada pela seletividade ao tecido alvo cancerígeno em relação aos tecidos saudáveis. De um modo geral, pelas diferenças no fluxo sanguíneo, no pH e no aumento do metabolismo dos processos tumorais, os radiofármacos tendem a se concentrar seletivamente nos tecidos malignos (CUTLER, 1999).

### 2.1.6.3 RADIONUCLÍDEOS

Os radionuclídeos possuem origens artificiais distintas, podendo ser obtidos por meio de produção em ciclotrons, reatores nucleares e geradores de radionuclídeos, (OLIVEIRA, 2006).

O radionuclídeo é um núcleo radioativo excitado que busca espontaneamente por estados de maior estabilidade e para isso, elimina o excesso de energia através da emissão de partículas ( $\alpha$ ,  $\beta^-$ ,  $\beta^+$ ) e/ ou radiação eletromagnética (raios  $\gamma$  ou x) (OLIVEIRA et al., 2006).

A determinação do radionuclídeo a ser utilizado está sujeita às singularidades físicas e químicas do radioisótopo como o tipo de emissão, tempo de meia vida, taxa de radiação penetrante e não penetrante, viabilidade, custo do radioisótopo, localização e as características do tumor, tamanho e morfologia (THRALL, ZIESSMAN, 2003; MITRA et al., 2006).

Comumente, os radionuclídeos mais aplicados na medicina nuclear são: o tecnécio metass estável ( $^{99m}\text{Tc}$ ), o tálio ( $^{201}\text{Tl}$ ), o gálio ( $^{67}\text{Ga}$ ) e o flúor ( $^{18}\text{F}$ ) (SAHA, 2006; ARAÚJO, 2005) (Quadro 2). O iodo ( $^{131}\text{I}$ ) é rotineiramente utilizado na terapia da tireóide. Nos equipamentos cintilográficos SPECT, o  $^{99m}\text{Tc}$  é o mais utilizado (em mais de 50% de todos os

procedimentos mundiais) para geração de imagens morfológicas e visualização de diversos processos fisiológicos em medicina nuclear (MEASE; LAMBERT, 2001; SAHA, 2006; TNAP, 2007).

**Quadro 2.** Características dos Radioisótopos mais utilizados.

PET				SPECT			
Radioisótopos	Meia-Vida	Emissão	Energia (KeV)	Radioisótopos	Meia-Vida	Emissão	Energia (KeV)
$^{18}\text{F}$	109,8 min	$\beta^+$	634	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6,02 h	$\gamma$	141
$^{64}\text{Cu}$	12,7 h	$\beta^-, \beta^+$	579, 653	$^{111}\text{In}$	2,8 dias	$\gamma$ , Elétrons Auger	172, 245
$^{68}\text{Ga}$	67,7 min	$\beta^+$	770, 1890	$^{67}\text{Ga}$	3,3 dias	$\gamma$	93, 185, 296
$^{124}\text{I}$	4, 18 dias	$\beta^+, \gamma$	820, 1543, 2146				

Fonte: XING, ZHAO, CONTI & CHEN K, 2014.

O Tc-99m foi descoberto em 1937 por Carlo Perrie e Emilio Gino Segrè. Seu nome é de origem grega, *technetos*, e significa artificial, ideia direcionada por ter sido o primeiro elemento químico obtido artificialmente (ARAÚJO et al., 2008).

Os radionuclídeos emissores de partículas do tipo  $\beta^-$  são os mais utilizados rotineiramente em terapia, pois possuem energia capaz de gerar depleção celular, particularmente, por meio de geração de radicais livres e promovendo a morte de células malignas por danos ao seu DNA (HONG et al., 2009). Por possuírem alta energia e de curto alcance, o dano ocasionado às células tendem a se concentrar apenas nas tumorais, poupando as sadias adjacentes da irradiação (ARAUJO, 2005; ARAÚJO et al., 2008).

No diagnóstico via câmaras PET, usa-se com frequência os radionuclídeos  $^{18}\text{F}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{86}\text{Y}$  e o  $^{64}\text{Cu}$  (HAMOUDEH et al., 2008; HOFMAN et al., 2012). Dentre eles,

o  $^{18}\text{F}$  é o mais proeminente devido as suas característica físico-químicas (HAMOUEH et al., 2008).

Três radioisótopos do gálio são aplicáveis em medicina nuclear, o  $^{66}\text{Ga}$  ( $\beta^+$ ,  $t_{1/2} = 9,5$  horas) e o  $^{68}\text{Ga}$  ( $\beta^+$ ,  $t_{1/2} = 68$  minutos) em exames de PET e o  $^{67}\text{Ga}$  (C.E. e emissor  $\gamma$ ,  $t_{1/2} = 78$  horas) para aquisições de imagens em SPECT (VELIKYAN, 2005).

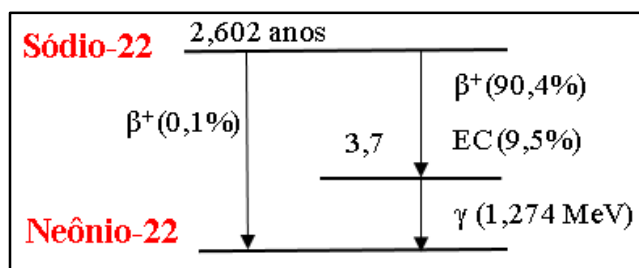
O gálio é um elemento do grupo III da Tabela Periódica e possui o  $^{69}\text{Ga}$  com abundância de 60,1% e o  $^{71}\text{Ga}$  prevalente 39,9% como isótopos naturais (LEDERER, HOLLANDER & PERLMAN, 1967; VELIKYAN, 2005).

A independência de processos complexos de síntese confere ao  $^{68}\text{Ga}$  grande vantagem de uso, em especial por meio do uso em geradores de radionuclídeos (HOFMAN et al., 2012). O gerador de Ge-68/Ga-68 possui vida útil, aproximada, de 6 meses (BREEMAN et al., 2011). O  $^{68}\text{Ga}$  possui meia-vida de 68 minutos, decai através da emissão de pósitrons (89%) e através de captura eletrônica (11%). Os pósitrons emitidos são partículas  $\beta^+$  com energia de 1.022 MeV, quando o pósitron se aniquila, emite dois fótons gama, em direções opostas (ângulo de 180 graus) com energia de 511 KeV cada (VELIKYAN et al., 2008).

Assim como o  $^{68}\text{Ga}$ , o radioisótopo  $^{22}\text{Na}$  também é um emissor de pósitrons, possuindo rendimento relativamente elevado (em torno de 90,4%) e energia máxima de 0.545 MeV, porém tem algumas vantagens particulares. A presença de um  $\gamma$ -quântico de 1,27 MeV quase simultâneo aos pósitrons permite a medição dos pósitrons por um tempo de vida “start-stop”<sup>2</sup> coincidente ao g-espectômetro. Apesar de ser produzido em cícltron tendo como alvo inicial o magnésio, seu processo é relativamente simples, devido a fácil manipulação de diferentes sais de sódio em solução aquosa (SHLEIEN, 1992; DELACOIX et al., 2002; UNB, 2015).

A meia-vida física do  $^{22}\text{Na}$  é de 2,6 anos, no entanto, sua vida biológica não ultrapassa 11 dias (podendo ser alterada), o que faz com que a aplicação clínica deste radioisótopo seja frequentemente estudada (SHLEIEN, 1992; DELACOIX et al., 2002; UNB, 2015). O decaimento radioativo do  $^{22}\text{Na}$  se configura através da fórmula  $\text{Na}^{22} \rightarrow \text{Ne}^{22} + \beta^+ + \nu_e + \gamma$ , onde acontece a emissão de pósitrons e de um neutrino do elétron e raios gama para o estado excitado do  $^{22}\text{Ne}$ , sendo o estado fundamental atingido após a emissão de um g-quântico de 3,7 (SHLEIEN, 1992; TAKÁCS, TÁRKÁNYI & QAIM, 1996; DELACOIX et al., 2002; UNB, 2015) (Figura 18).

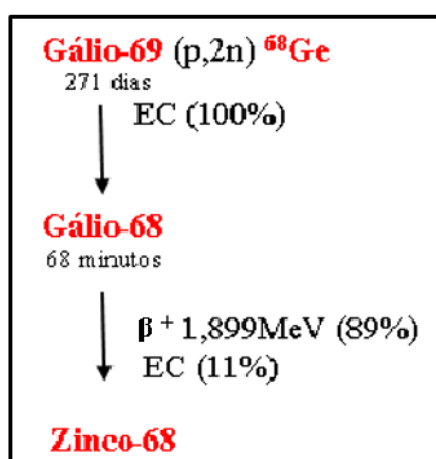
<sup>2</sup> “Aceleração/Desaceleração”



**Figura 18.** Decaimento do  $^{22}\text{Na}$ .

#### 2.1.6.4 GERADORES DE Ga-68

O gerador de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  (Germânio-68/Gálio-68) tem demonstrado grande utilidade em centros e clínicas que utilizam o diagnóstico através da PET (FERREIRA e MARQUES, 2012), ao ponto de ter sido realizado pela Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA – International Atomic Energy Agency) um paralelo positivo do impacto destes geradores nos diagnósticos por PET assim como os de  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  para os procedimento por SPECT (IAEA, 2010). O proveito em sintetizar o radioisótopo  $^{68}\text{Ga}$  se dá as boas características físicas de decaimento,  $t_{1/2}$  física adequado a geração de imagens ( $t_{1/2} = 68$  minutos), emissão de pósitron ( $\beta^+ = 89\%$ ,  $E_{\beta^+\text{max}} = 1.022 \text{ MeV}$ ), baixa emissão de fótons (1077 keV, 3,2%) e decaimento para elemento estável, o Zinco-68 ( $^{68}\text{Zn}$ ) (ZHERNOSEKOV, 2006).



**Figura 19** – Decaimento Radioativo do  $^{68}\text{Ga}$ .

O  $^{68}\text{Ge}$  é sintetizado por ciclotron e decai por captura eletrônica, originando o  $^{68}\text{Ga}$ , caracteristicamente, o gerador de  $^{68}\text{Ga}$  possui ótimas qualidades: custo-benefício, fácil eluição precedente ao momento do uso, elevada atividade específica do radionuclídeo, ausência de contaminantes e a não necessidade de proximidade da radiofarmácia ao centro de produção de radioisótopos (ROESCH and FILOSOFOV, 2010; LE, 2013) (Quadro 3).

**Quadro 3.** Sistemas de geradores de radionuclídeos.

Tipo de Equilíbrio	Radionuclídeo Pai	Tempo de Meia-vida ( $T_{1/2}$ )	Radionuclídeo Filho	Tempo de Meia-vida ( $T_{1/2}$ )	Radiação de Decaimento do Filho
<b>Secular</b>	$^{90}\text{Sr}$	28,6 anos	$^{90}\text{Y}$	64,1 horas	$\beta^-$
	$^{68}\text{Ge}$	271 dias	$^{68}\text{Ga}$	68 minutos	$\beta^+$
	$^{188}\text{W}$	69 dias	$^{188}\text{Re}$	16,9 horas	$\beta^-$
	$^{82}\text{Sr}$	25,6 d	$^{82}\text{Rb}$	1,27 minutos	$\beta^+$
	$^{62}\text{Zn}$	9,19 horas	$^{62}\text{Cu}$	9,74 minutos	$\beta^+$
	$^{81}\text{Rb}$	4,58 horas	$^{81\text{m}}\text{Kr}$	13 segundos	$\gamma$
<b>Transiente</b>	$^{99}\text{Mo}$	2,75 dias	$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6 horas	$\gamma$
	$^{166}\text{Dy}$	3,4 dias	$^{166}\text{Ho}$	1,11 dias	$\beta^-$

Fonte: IAEA, 1991 *apud* DE PAULA, 2013.

Os tipos de geradores comercialmente disponíveis, possuem diferentes metodologias para a extração do eluato de  $^{68}\text{Ga}$ , apresentando modificações quanto a composição da matriz da coluna, concentração do eluente (HCl), % da eluição do  $^{68}\text{Ga}$ , % de contaminações químicas de  $^{68}\text{Ge}$  e tempo de vida útil (TECHNICAL INFORMATION BULLETIN, 2013; IDB HOLLAND bv. iThemba LABS, 2010; ITG, 2011) (Figura 20).

### 2.1.7 APTÂMERO RADIOMARCADO

O diagnóstico com o uso de aptâmeros tem sido amplamente desenvolvido para à detecção de uma grande variedade de moléculas (WANG and FAROKHZAD, 2014). Os agentes de imagiologia molecular à base de aptâmero, possuem meia-vida biológica reduzida,

quando comparados por exemplo, a agentes de imagiologia baseados em anticorpos, os quais podem permanecer no organismo por dias, ou até mesmo, semanas (LEE, STOVALL & ELLINGTON, 2006). Enquanto que os aptâmeros ficam somente horas.

Os aptâmeros têm ótimo potencial nos serviços de entrega de drogas para diagnóstico e terapia (HICKE & STEPHENS, 2000), ligando-se a seus alvos pela combinação de complementaridade, interações de emparelhamento entre compostos aromáticos e as bases dos aptâmeros, interações eletrostáticas entre grupos carregados ou ligações de hidrogênio, entre outros (HERMANN & PATEL, 2000).



**Figura 20.** Geradores comerciais de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  (TECHNICAL INFORMATION BULLETIN, 2013; IDB HOLLAND bv. iThemba LABS, 2010; ITG, 2011).

**Quadro 4.** Uso anteriores de aptâmeros radiomarcados.

Autores	Ano	Aptâmero marcado com qual radioisótopo	Avaliação de qual enfermidade	Associação a outros compostos	Resultados
<b>CHARLTO, SENNELLO and SMITH</b>	1997	99mTc	Processo de inflamação	MAG2	Direcionamento específico de um sítio inflamatório não atingido
<b>HICKE et al.</b>	2006	99mTc	Tumor xenográfico de mama e gioblastoma	TTA1 e a tenascina-C	Durável tempo de retenção tumoral, rápida depuração sanguínea e meia-vida reduzida

**Quadro 4.** Uso anteriores de aptâmeros radiomarcados.

(continuação)

<b>PIEVE, PERKINS and MISSAILIDI S</b>	2012	Tecnécio- 99m	Modelo xenográfico em ratos de MCF7	MAG2 e PEGs	Alta concentração do radiomarcado no tecido tumoral e baixa atividade residual
<b>DOUGAN et al.</b>	2003	Iodo-125	Imagens de Trombos	$\alpha$ -trombina	O radiofármaco foi sensível a trombina em testes <i>in vitro</i>
<b>WU X, LIANG H, TAN Y, YUAN C, LI S, et al.</b>	2014	Rênio-188	Glioblastoma	_____	Re-188 eficaz no diagnóstico de células EGFRvIII positivas

(conclusão)

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 Materiais

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

- ❖ Aptâmetro Anti-MUC 1 fornecido pelo professor Dr. Sotiris Missailidis;
- ❖  $\text{SnCl}_2$  (Cloreto Estanoso) adquirido da Sigma Aldrich<sup>®</sup>;
- ❖ Acetona adquirido da Merck, grau de pureza P.A.;
- ❖  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (Tecnécio 99 metaestável) IPEN/CNEN, fornecido pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ);
- ❖ Papel de *Whatmam* nº 1 (Whatmam, EUA);
- ❖ Ratos *Wistar* adquiridos do Biotério da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO);
- ❖ Cetamina 10 g / 100 mL, comercializado pela Syntec<sup>®</sup>, Lote: 005/14, Validade: 06/2016;
- ❖ Xilazina 2 g / 100 mL, comercializado pela Syntec<sup>®</sup>, Lote: 003/14, Validade: 04/2016.
- ❖  $^{68}\text{Ga}$  (Gálio-68), fornecido pelo Departamento Radiofarmacêutico e do Cíclotron do Centro de Pesquisa e Especialidade Hospitalar de King Faisal-SA, na pessoa do Dr. Mohammed Al-Qahtani.
- ❖  $^{22}\text{Na}$  (Sódio-22), fornecido pelo Departamento Radiofarmacêutico e do Cíclotron do Centro de Pesquisa e Especialidade Hospitalar de King Faisal-SA, na pessoa do Dr. Mohammed Al-Qahtani.
- ❖ Medidor de pH (Tecnocon, Brasil);
- ❖ MeOH - Metanol (Merck, Alemanha);
- ❖ Cloreto de sódio (Merck, Alemanha);
- ❖ MeCN - Acetonitrila ou cianeto de metila
- ❖ TFA - ácido trifluoroacético (Merck);
- ❖ TLC de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Alemanha)

- ❖ Placa de Vidro Sílica Gel RP- 18
- ❖ Medidor de pH (Tecnopon, Brasil)
- ❖ Vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e provetas.
- ❖ Cloreto de sódio (Merck, Alemanha)
- ❖ Material plástico descartável em geral, tais como ponteiros, seringas, tubos cônicos com tampa para reação tipo eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon, criotubos e placas de cultura;
- ❖ Papel cromatográfico Whatmann nº 1 (Whatmann, Reino Unido);
- ❖ Pipetas automáticas (Brand, Alemanha; Socorex, Suíça e Eppendorf, EUA);
- ❖ Vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e provetas.

### 2.2.2 Equipamentos

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos:

- ❖ Balança Ay220, Shimadzu;
- ❖ Calibrador de dose CRC<sup>®</sup> 25R, Capintec;
- ❖ Contador gama Perkin Elmer modelo Wizard<sup>®</sup> 2470.
- ❖ Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (L6200 A; Merck-Hitachi, Darmstadt, Germany)

### 2.2.3 Métodos

#### 2.2.4 Processo de Marcação do Aptâmero anti MUC 1 com Gálio-68 (<sup>68</sup>Ga)

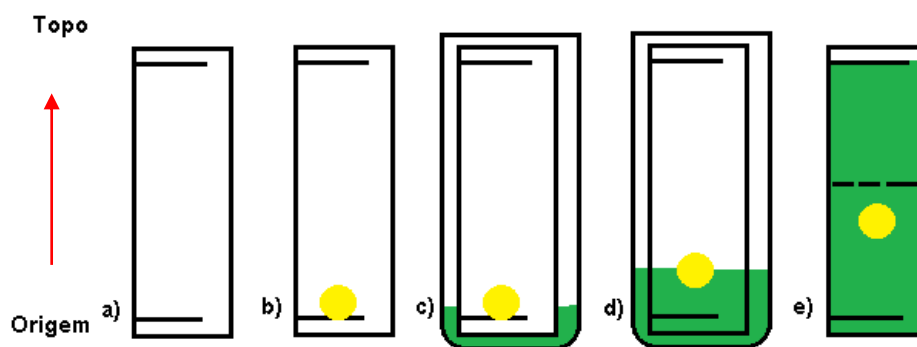
100-150 µCi de solução de <sup>68</sup>Ga foi adicionada a 50 µl do aptâmero anti MUC 1 (solubilizado em água) e posteriormente foram acrescentados 100 µl de acetato de sódio

com 1,25M (pH= 5), permanecendo incubados em diferentes tempos e temperaturas: (i) à temperatura ambiente por 7 minutos; (ii) à 80°C por 30 minutos e (iii) à 80°C por 60 minutos. Em seguida a solução final foi avaliada por Cromatografia em camada delgada (CCD) (do inglês, *Thin Layer Chromatography*, TLC) e por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (do inglês, *High Performance/Pressure Liquide Chromatography*- HPLC).

## **2.2.5 Controle de Qualidade do Processo de Marcação do Aptâmero com o Gálio-68 (<sup>68</sup>Ga)**

### **2.2.5.1 Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método Cromatográfico em Camada Delgada (CCD)**

Como forma de verificar o rendimento radioquímico da marcação foi realizada Cromatografia em Placa de Vidro Sílica Gel RP- 18 como fase estacionária, cortadas em 13,5 cm de comprimento por 1,5 cm de largura e fase móvel o metanol, sendo feita triplicata de todas as cromatografias. Uma alíquota da solução marcada de anti MUC1-<sup>68</sup>Ga foi plicada com auxílio de capilar a 1,5 cm da margem inferior do suporte cromatográfico (fita cromatográfica). Este foi colocado em cuba de vidro saturada com a fase móvel, conforme anteriormente, e o solvente percorreu 10,0 cm considerados a partir do ponto de aplicação, até atingir a marca superior, localizada a 2,0 cm da margem superior da fita. Após a “corrida cromatográfica”, as tiras foram retiradas do aparato e colocadas para secar. Secas, algumas sofreram cortes ao meio para separar o topo da origem e outras em dez porções para melhor avaliação, assim foram levadas para que fosse possível realizar a leitura das mesmas no contador gama (Perkin Elmer modelo Wizard® 2470) (Figura 22). Por fim, o quantitativo radioativo foi calculado por porcentagem em cada uma das partes das fitas para avaliar o processo de marcação (ALMEIDA et al., 2012, PATRÍCIO, 2013) (Figura 21).



**Figura 21.** Controle de qualidade do processo de radiomarcção do aptâmero Anti-MUC1 em CCD.



**Figura 22.** Contador gama (Perkin Elmer modelo Wizard® 2470) utilizado na determinação da contagem radioativa nos estudos cromatográficos e de biodistribuição.

O cálculo do  $R_f$  é realizado medindo-se a distância que a substância se deslocou a partir do ponto em que foi aliquoteada a solução a ser avaliada, dividida pela distância percorrida pela massa de solvente. A porcentagem de pureza radioquímica foi determinada a partir das contagens para cada fita, considerando-se as seguintes fórmulas:

Para  $R_f=0$ , tem-se:

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

E para  $R_f=1$ ,

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

### **2.2.5.2 Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

Na análise em HPL, a pureza radioquímica foi determinada por gradiente de radio-CLAE. Uma coluna de fase reversa C-18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 250 mm foi utilizada como fase estacionária, empregando detectores de UV (220 nm) e de radioatividade, fluxo de 1 mL/minuto. A técnica de gradiente de eluição foi realizada utilizando como solvente o ácido trifluoroacético, acetonitrila e água, na proporção de (0.1% TFA MeCN:H<sub>2</sub>O; [95:05]).

### **2.2.6 Processo de Marcação do Aptâmero anti MUC 1 com o Sódio-22 (<sup>22</sup>Na)**

A radiomarcagem deste radioisótopo aconteceu da seguinte maneira: Uma solução de 45 $\mu\text{Ci}$  de <sup>22</sup>Na foi adicionada a 25  $\mu\text{l}$  do aptâmero anti MUC 1 solubilizado em água e posteriormente foram acrescentados 25 $\mu\text{l}$  de acetato de amônia com 0,1M (pH= 5), permanecendo incubados por 7 min à temperatura ambiente e por 30 min à 80°C.

### **2.2.7 Controle de Qualidade do Processo de Marcação do Aptâmero com o Sódio-22 (<sup>22</sup>Na)**

#### **2.2.7.1 Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método Cromatográfico em Camada Delgada (CCD)**

O mesmo protocolo de CCD descrito para o radioisótopo <sup>68</sup>Ga foi realizado com o <sup>22</sup>Na, diferenciando a fase móvel, pois para este estudo foram utilizados acetonitrila e ácido clorídrico como solventes, na proporção [MeCN:0.1 HCl (9-1)].

### **2.2.7.2 Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

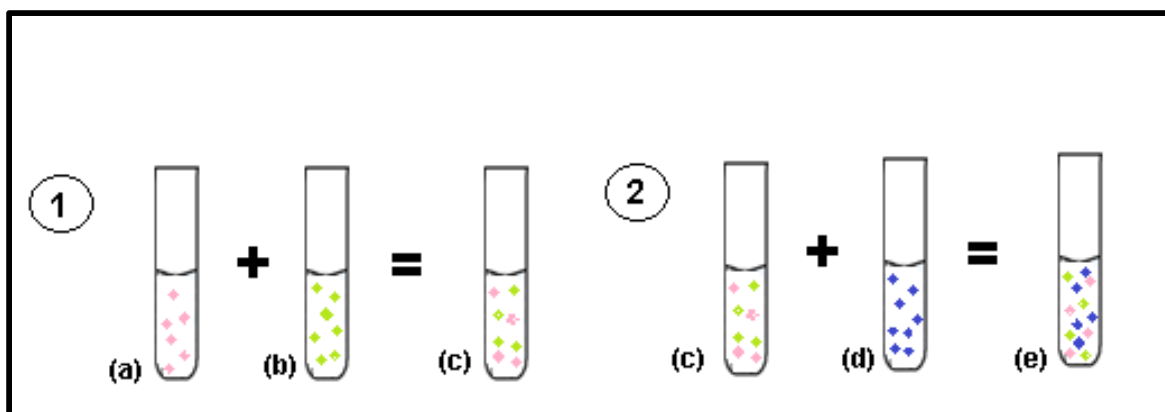
Na análise em CLAE, a pureza radioquímica foi determinada por gradiente de radio-CLAE. Uma coluna de fase reversa C-18, 5  $\mu\text{m}$ , 4,6 mm x 250 mm foi utilizada como fase estacionária, empregando detectores de UV (220 nm) e de radioatividade, fluxo de 1 mL/minuto. A técnica de gradiente de eluição foi realizada utilizando como solvente o ácido trifluoroacético, acetonitrila e água, na proporção de (0.1% TFA MeCN:H<sub>2</sub>O; [95:05]).

### **2.2.8 ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO**

A avaliação da biodistribuição *in vivo* de ambos os radioisótopos emissores de pósitrons (<sup>68</sup>Ga e <sup>22</sup>Na) conjugados ao aptâmero anti-MUC 1 foi projetada utilizando como referência os dados da radiomarcagem e biodistribuição do <sup>99m</sup>Tc. Vale ressaltar, que os radioisótopos envolvidos neste trabalho não possuem especificidade intrínseca por nenhum órgão quando não associados a partícula que os direciona.

### **2.2.9 Processo de Marcação do Aptâmero anti MUC 1 pelo Método Direto com Tecnécio-99m (<sup>99m</sup>Tc)**

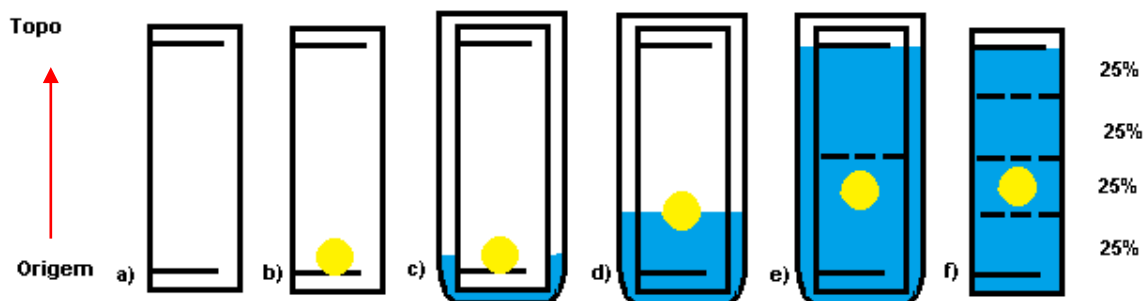
O processo de marcação do aptâmero anti MUC 1 foi viabilizado pelo método direto do oligonucleotídeo com o radionuclídeo <sup>99m</sup>Tc, sendo necessária a incubação de 30  $\mu\text{g/mL}$  do agente redutor, cloreto estanoso (SnCl<sub>2</sub>) (**a**), por 10 minutos com 150  $\mu\text{L}$  da solução de aptâmero anti MUC 1 em um tubo de ensaio (**b**) para que se possa reduzir o <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> (**c**). Posteriormente foi acrescentado 100  $\mu\text{Ci}$  de pertecnetato de sódio (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>) (**d**) e realizada uma nova incubação de 10 minutos para finalizar o processo e obter o aptâmero radiomarcado (**e**) (SA et al., 2012, ALBERNAZ et al., 2014) (Figura 23).



**Figura 23.** Método Direto de Marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ .

### 2.3.0 Controle de Qualidade do Processo de Marcação do Aptâmero com o Tecnécio- $^{99m}\text{Tc}$

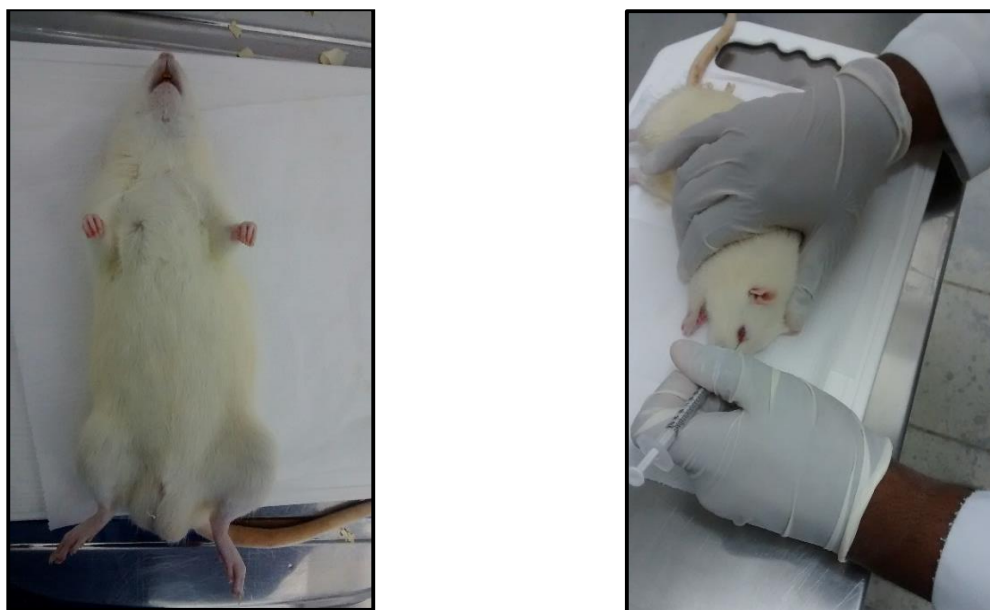
No intuito de avaliar a qualidade da marcação empregada através do método direto, utilizou-se o processo analítico da cromatografia em papel para separar as substâncias estudadas. Papel *Whatman* nº 1 cortado em fitas longitudinais de 14 cm de comprimento por 1 cm de largura representam a fase fixa ou estacionária e a acetona é aplicada como a fase móvel. Após o processo da cromatografia, 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). Por fim, foi calculada a porcentagem de atividade em cada uma das partes das fitas para avaliar o processo de marcação (ALMEIDA et al., 2012, PATRICIO, 2013) (Figura24).



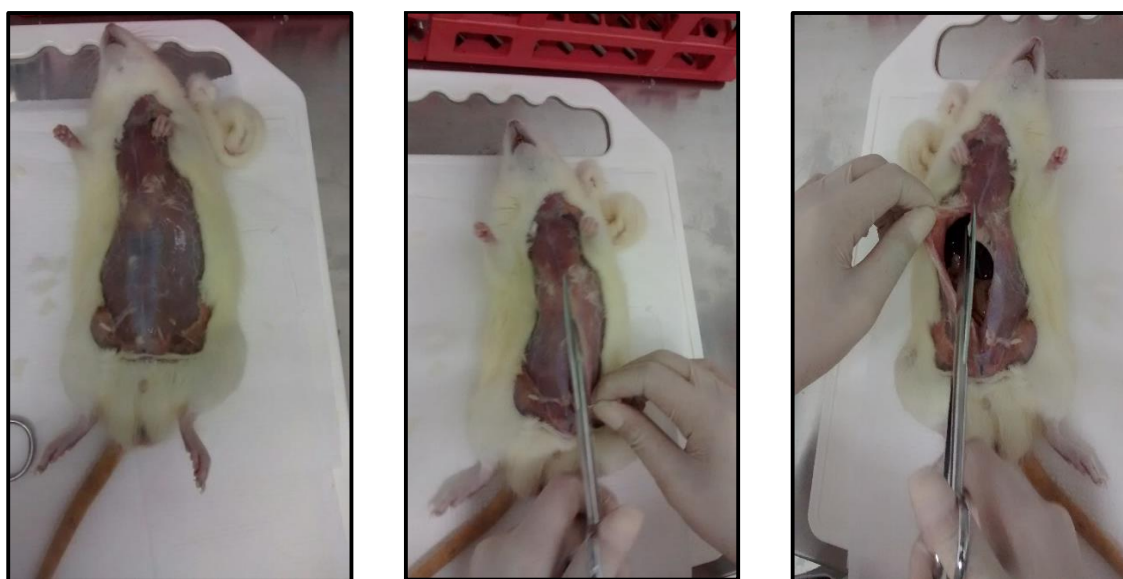
**Figura 24.** Controle de Qualidade do Processo de Marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ .

A avaliação da biodistribuição do aptâmero anti-MUC1 $^{99m}\text{Tc}$ , foi realizada em dois ratos do tipo *Wistar*, saudáveis, com peso variando entre 350 a 435 g, anestesiados com uma

solução a 10% de Cetamina e 2% Xilazina em 50  $\mu$ L administrada por via intramuscular (coxa). Os nanorradiofármacos (3,7 MBq / 0,1 mL) foram administrados por via intraocular (PINTO et al., 2014) (Figura 25). Após duas horas, os ratos foram eutanasiados em câmara de gás de dióxido de carbono e dessecados para a retirada dos órgãos, de acordo com protocolo aprovado pelo comitê de ética de estudo em animais (ANEXO A) (Figura 26).



**Figura 25:** Administração de 100  $\mu$ L da amostra de aptâmero anti-MUC1<sup>99m</sup>Tc por via intraocular no rato do tipo *Wistar* anestesiado.



**Figura 26:** Rato dissecado após sacrifício em câmara de gás de Dióxido de Carbono para retirada dos órgãos.

A atividade de cada órgão e no sangue foi determinada pelo contador gama (Perkin Elmer modelo Wizard® 2470), com um cristal de NaI(Tl) de 5 cm x 5 cm em condições eletrônicas ótimas para a leitura do radioisótopo  $^{99m}\text{Tc}$ . Os resultados foram expressos em dose por órgão (%ID / órgão) e dose por grama de tecido (%ID / g) (SA et al., 2012). Os órgãos avaliados foram: cérebro, pulmão direito, pulmão esquerdo, estômago, baço, intestino delgado, intestino grosso, coração, rim direito, rim esquerdo, fígado e próstata. Baseado na comparação do tamanho dos aptâmeros (8-15 kDa) e dos anticorpos (150kDa), observa-se as excelentes características dos oligonucleotídeos como agentes de contraste pela penetração rápida em tecidos e depuração no sangue (DE FRANCISCIS, RIENZO & CERCHIA, 2012).

## 2.4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.4.1. Processo de Marcação do Aptâmero anti MUC 1 com Gálio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ )

Os resultados da contagem das fitas mostram a radiomarcagem do aptâmero anti-MUC1 ao radionuclídeo  $^{68}\text{Ga}$  em todas as circunstâncias empregadas (Quadro 4), independentemente das variações de temperatura e tempo.

### 2.4.2 Controle de Qualidade do Processo de Marcação do Aptâmero com Gálio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ )

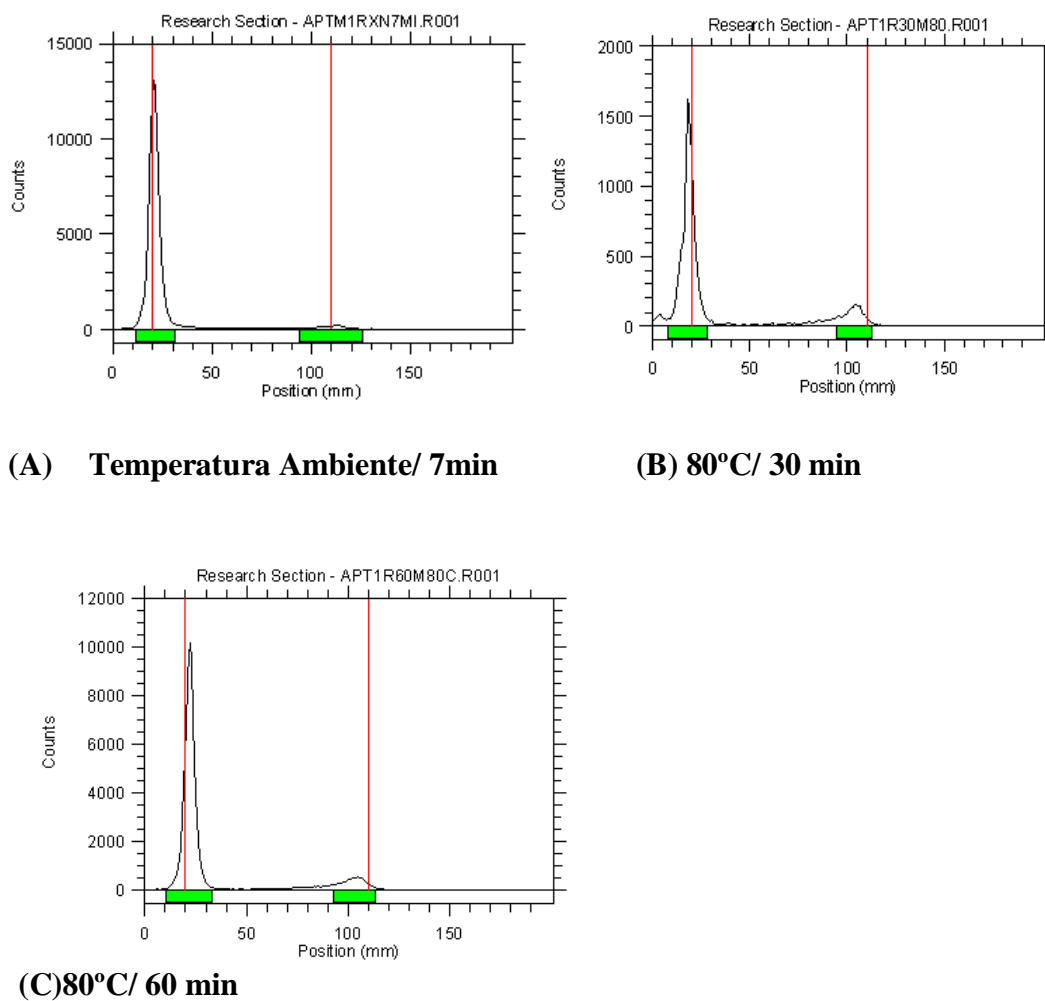
#### 2.4.2.1 Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método Cromatográfico em Camada Delgada (CCD)

A análise em CCD demonstrou que a variação na temperatura e no tempo de aquecimento não influencia o processo de radiomarcagem do aptâmero anti-MUC1 ao  $^{68}\text{Ga}$  em períodos de até 1 hora de aquecimento à 80°C. Obtiveram-se compostos com pureza radioquímica média de 89,07 ( $89,07 \pm 7,79$ ), onde o melhor resultado apresentado foi de 96,31 com a solução incubada à temperatura ambiente por 7 minutos, porém todos os valores encontrados são superiores ao fator de aceitação para a implementação clínica *in vivo* (Quadro 5).

**Quadro 05.** Valores encontrados no controle de qualidade do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com  $^{68}\text{Ga}$  em diferentes condições, analisados em CCD.

Condições da Marcação do Aptâmero Anti-MUC1 com $^{68}\text{Ga}$	Rf da Origem	OF ROI	Rf da frente	OF ROI
Temperatura Ambiente/ 7min	0,00%	96,31	0,9%	3,69
À 80°C/ 30 min	0,00%	80,74	0,9%	19,26
À 80°C/ 60 min	0,00%	89,07	0,9%	10,93

Fonte: Próprio autor



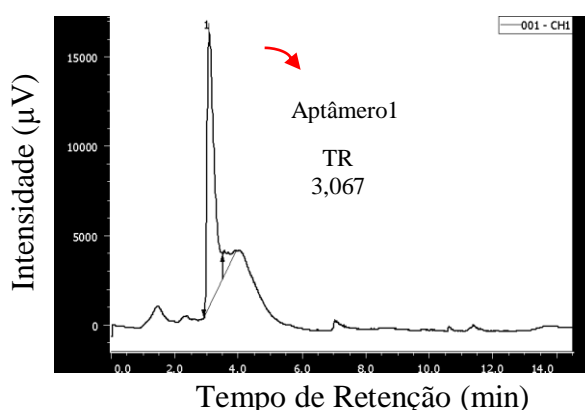
**Figura 27.** Perfis cromatográficos do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com  $^{68}\text{Ga}$  em CCD.

Com este método foi possível mostrar uma marcação quase que absoluta do aptâmero anti MUC1 com o  $^{68}\text{Ga}$ . Concomitantemente um experimento adicional foi realizado através da CLAE para que houvesse certificação da eficiência da marcação empregada

#### 2.4.2.2 Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

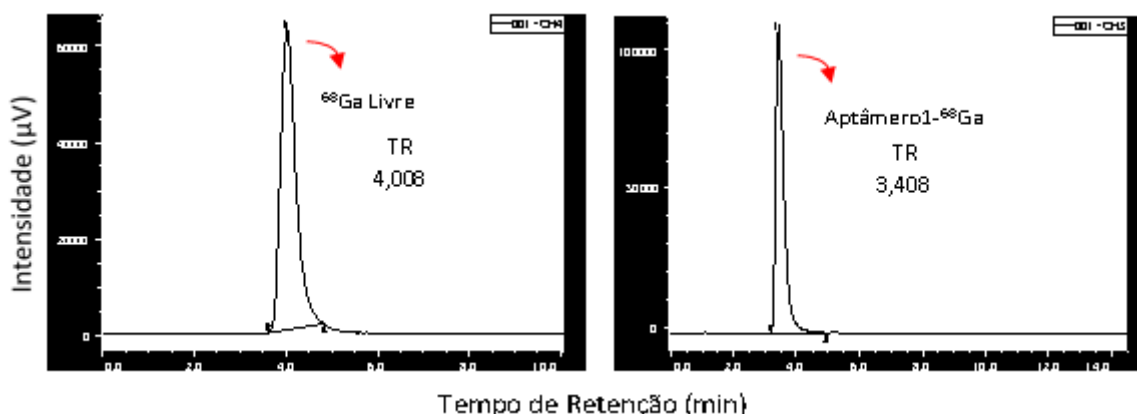
A CLAE possui maior potencial de resolução e por isto foi utilizado para o confronto dos resultados encontrados na CCD quanto a efetividade da radiomarcação analisada.

O perfil cromatográfico abaixo correspondente a solução de aptâmero anti-MUC1 não radiomarcado utilizando sistema de detecção UV a 220 nm, o qual mostra o menor tempo de retenção (TR= 3,067) e também revela a existência de algumas interferências não conhecidas, podendo ser relacionada a presença de produtos de degradação do aptâmero (Figura 28).



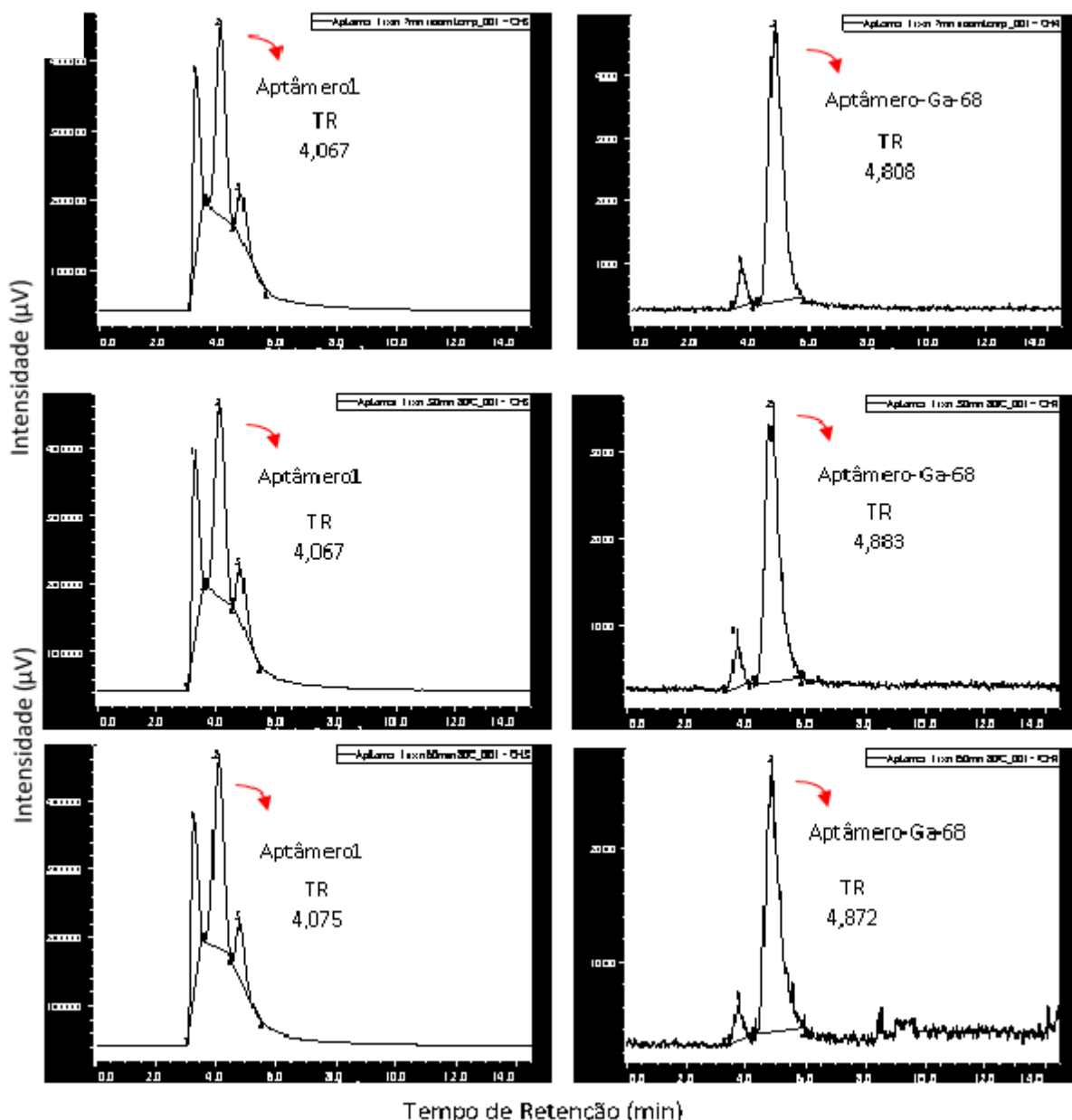
**Figura 28.** Perfil cromatográfico da solução de aptâmero anti-MUC1, analisado em CLAE utilizando detector UV.

O perfil cromatográfico do gálio-68 livre apresenta um único pico, com valor de retenção superior (RT= 4,008) ao produto do aptâmero anti-MUC1-<sup>68</sup>Ga (TR= 3,408), sendo assim, a partir de então, considerados como perfis padrões para a comparação aos demais que serão ilustrados após a conjugação do aptâmero anti-MUC1 ao <sup>68</sup>Ga em diferentes condições de temperatura e tempo. O sistema escolhido possibilitou a separação das espécies radioquímicas presentes na mistura de marcação, pois apresentaram tempo de retenção distintos (Figura 29).



**Figura 29.** Perfil cromatográfico da solução de aptâmero anti-MUC1-<sup>68</sup>Ga comparado ao <sup>68</sup>Ga, analisado em CLAE utilizando detector UV e de condutividade, respectivamente.

No detector de condutividade é notado que o aptâmero tem um pico bem alto, com um tempo de retenção (TR) de aproximadamente 4,067 minutos, porém vem acompanhado de outros dois picos que não são conhecidos, podendo ser associados a degradação de uma cadeia específica de DNA ou a qualquer outra manifestação desconhecida que resulte na alteração da leitura ideal (Figura 30).



**Figura 30.** Perfis cromatográficos do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com  $^{68}\text{Ga}$  analisados em CLAE em diferentes condições, utilizando detectores de condutividade e radioatividade.

Para confrontar os dados do gráfico anterior, foi medida a atividade dos picos apresentados no calibrador de dose, mostrando que há atividade superior a 90% no pico2 (“produto radiomarcado”) com tempo de retenção  $\pm 4,8$  minutos, o que sugere ser o anti-MUC1- $^{68}\text{Ga}$ . Em seguida, foi feita CCD para o outro pico, onde a atividade estava muito baixa, resumindo-se na origem o produto radiomarcado e no topo o  $^{68}\text{Ga}$  livre. Sendo assim, somente no pico 2 foi verificado o produto radiomarcado, quase em sua totalidade (Quadro 6).

**Quadro 6:** Valores encontrados nos perfis cromatográficos do processo de marcação do aptâmero anti-MUC1 com  $^{68}\text{Ga}$  em diferentes condições, analisadas em CLAE utilizando detector de condutividade e radioatividade.

Condições da Radiomarcção do Aptâmero	Detector	Nome do Pico	TR	Area	Altura	Area%	Altura%
Temperatura Ambiente/ 7 min	Condutividade	Desconhecido	3.292	3987218	250929	34.308	43.034
		<b>Aptâmero1</b>	4.067	6332860	267119	54.491	45.810
		Desconhecido	4.767	1301823	65051	11.201	11.156
	Radioatividade	$^{68}\text{Ga}$ Livre	3.675	11799	660	8.001	13.217
		<b>Produto Radiomarcado</b>	4.808	135669	4333	91.999	86.783
À 80° C/ 30 min	Condutividade	Desconhecido	3.292	3987218	250929	34.308	43.034
		<b>Aptâmero1</b>	4.067	6332860	267119	54.491	45.810
		Desconhecido	4.767	1301823	65051	11.201	11.156
	Radioatividade	$^{68}\text{Ga}$ Livre	3.683	9330	561	8.610	4
		<b>Produto Radiomarcado</b>	4.883	99033	3127	91.390	4
À 80°C/ 60 min	Condutividade	Desconhecido	3.292	4085333	248265	33.578	41.185
		<b>Aptâmero1</b>	4.075	6400345	274637	52.605	45.559
		Desconhecido	4.783	1681196	79909	13.818	13.256
	Radioatividade	$^{68}\text{Ga}$ Livre	3.742	5827	336	6.978	12.437
		<b>Produto Radiomarcado</b>	4.842	77679	2363	93.022	87.563

Fonte: Próprio autor

A radiomarcção média no condutor de radioatividade foi com o tempo de retenção de 4,8 minutos ( $4,842 \pm 0,03$ ) e no de radioatividade foi de 4,8 minutos ( $4,067 \pm 0,00$ ).

Os dados dos cromatogramas da CLAE utilizando detector de radioatividade mostram que apesar da radiomarcção não ser alterada pela variação de temperatura durante o tempo empregado, foi observado que o aptâmero 1 difere dos outros por produzir um tipo de  $^{68}\text{Ga}$  livre e um produto radiomarcado em dois picos de todos os analisados.

A similiaridade das boas qualidades de marcação apresentadas no processo à temperatura ambiente por 7 minutos foram mantidas nas outras condições aplicadas, sendo observada a presença do anti-MUC1 radiomarcado no tempo de retenção aproximado de 4,84 min (primeiro pico) e do  $^{68}\text{Ga}$  livre no tempo de retenção aproximado de 3,74 min (segundopico).

#### **2.4.3 Processo de Marcação do Aptâmero anti MUC 1 com o Sódio-22 ( $^{22}\text{Na}$ )**

#### **2.4.4 Controle de Qualidade do Processo de Marcação do Aptâmero com o Sódio-22 ( $^{22}\text{Na}$ )**

Os resultados da contagem das fitas mostram a radiomarcção do aptâmero anti-MUC1 ao radionuclídeo  $^{22}\text{Na}$  nas duas condições empregadas (Quadro 4), independentemente das variações de temperatura e tempo.

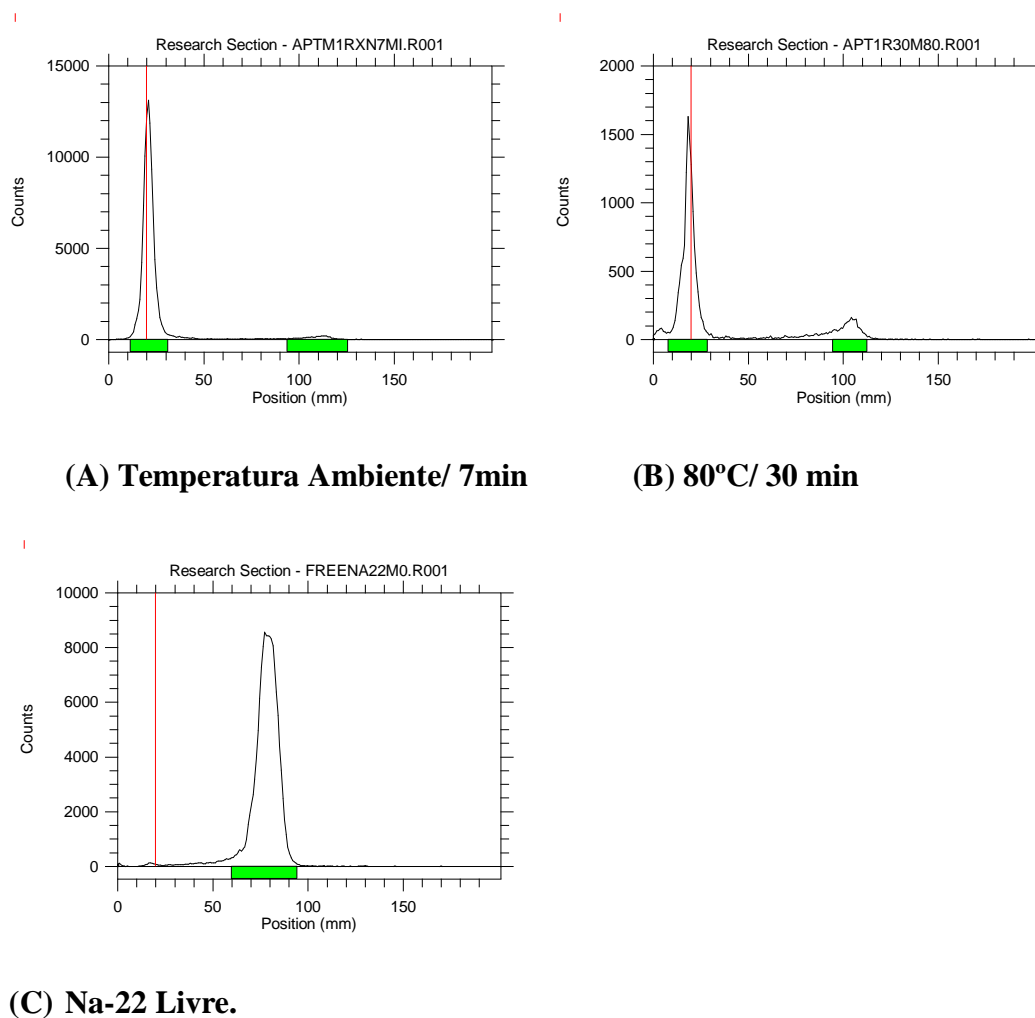
##### **2.4.4.1 Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método Cromatográfico em Camada Delgada (CCD)**

A análise em CCD demonstrou que a variação na temperatura e no tempo de aquecimento também não influencia o processo de radiomarcção do aptâmero anti-MUC1 ao  $^{22}\text{Na}$  em períodos de até 30 minutos de aquecimento à 80°C. Obtiveram-se compostos com pureza radioquímica média de 90,37 ( $90,37 \pm 13,61$ ), onde o melhor resultado apresentado foi de 96,31 com a solução incubada à temperatura ambiente por 7 minutos, porém o outro valor encontrado também é maior que o fator de aceitação para a aplicação clínica *in vivo* do complexo (Quadro 4).

**Quadro 7.** Valores encontrados no controle de qualidade do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com  $^{22}\text{Na}$  em diferentes condições, analisados em CCD.

Condições da Marcação do Aptâmero Anti-MUC1 com $^{68}\text{Ga}$	Rf da Origem	OF ROI	Rf da frente	OF ROI
<b>Sódio22 Livre</b>	0.64 %	100	0,64	3,69
<b>Radiomarcado coletado da CLAE</b>	0,00%	80,74	0,9%	0,56

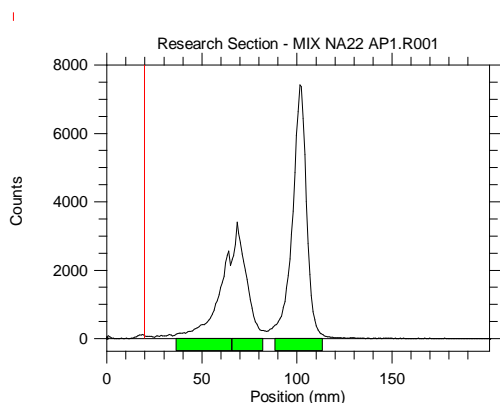
Fonte: Próprio autor



**Figura 31.** Perfis cromatográficos do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com  $^{22}\text{Na}$  em CCD.

Verifica-se que o pico do  $^{22}\text{Na}$  livre forma um “cubo” (Figura 31B).

Uma gota da solução radiomarcada foi misturada a uma gota do  $^{22}\text{Na}$  livre para verificar se há  $^{22}\text{Na}$  livre que não reagiu na separação por CCD (Figura 32).



**Figura 32.** Perfil cromatográfico comparativo dos três picos da radiomarcagem do aptâmero anti-MUC1 com  $^{22}\text{Na}$  em CCD.

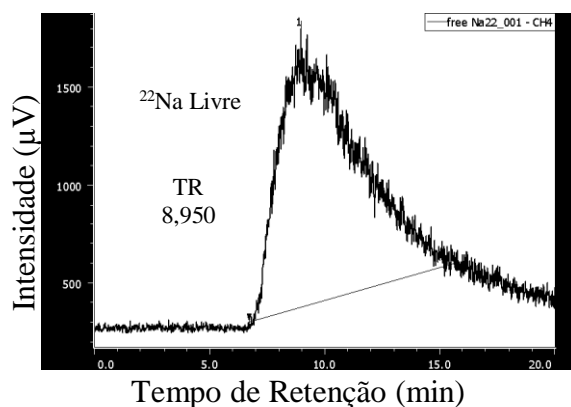
**Quadro 8.** Comparativo dos três picos da radiomarcagem do aptâmero anti-MUC1 com  $^{22}\text{Na}$  em CCD.

Valores de Rf	Produto Radiomarcado	OF ROI
Rf <sub>1</sub> da frente	0,42	19.85 %
Rf <sub>2</sub> da frente	0,56	23.92 %
Rf <sub>3</sub> da frente	0,89	56.23%

Fonte: Próprio autor.

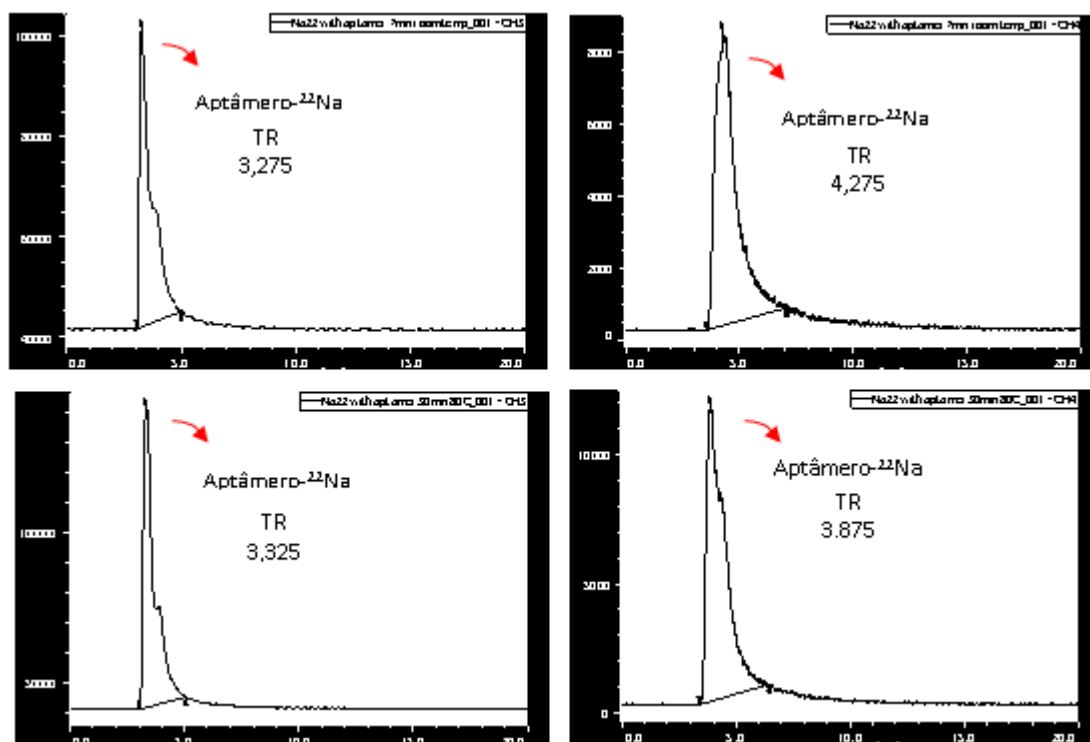
A CCD mostra que os valores de Rf são ligeiramente diferente do  $^{22}\text{Na}$  livre, movendo-se para a frente do solvente. Porém é muito claro através da CLAE que a radiomarcagem aconteceu muito rápido e se completou a temperatura ambiente (Quadro 8).

### 2.4.4.2 Controle de qualidade de pureza radioquímica pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)



**Figura 33.** Valores encontrados no perfil cromatográfico do  $^{22}\text{Na}$  livre, analisado em CLAE utilizando detector de radioatividade.

O perfil do  $^{22}\text{Na}$  Livre possui valor de retenção de 8.950 min e mostra um aumento das bordas para o centro e diminuem do centro para as bordas de assimetricamente (Figura 33).



**Figura 34.** Perfis cromatográficos do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com  $^{22}\text{Na}$  analisados em CLAE em diferentes condições, utilizando detectores de condutividade e radioatividade.

A figura 34 mostra a eficiente radiomarcção com tempo de retenção bem reduzido (Quadro 9).

**Quadro 9.** Valores encontrados nos perfis cromatográficos do processo de marcação do aptâmero Anti-MUC1 com  $^{22}\text{Na}$  em diferentes condições, analisadas em CLAE utilizando detector de radioatividade

Condições de Marcação	Condutor	Nome do Pico	TR	Area	Altura	Area%	Alturat%
Temperatura Ambiente/ 7 min	Condutividade	Aptâmero 1	3.275	2152822	59401	100.000	100.000
	Radioatividade	<b>Produto Radiomarcado</b>	4.275	530781	8102	100.000	100.000
Á 80°C / 30 min	Condutividade	Aptâmero 1	3.292	3987218	250929	34.308	43.034
	Radioatividade	<b>Produto Radiomarcado</b>	4.067	6332860	267119	54.491	45.810

Fonte: Próprio autor

## 2.5 ESTUDOS DE BIODISTRIBUIÇÃO

**Quadro 10:** Contagem dos pedaços da fita no contador gama com as respectivas porcentagens em cada pedaço.

Os resultados estão expressos no quadro abaixo:

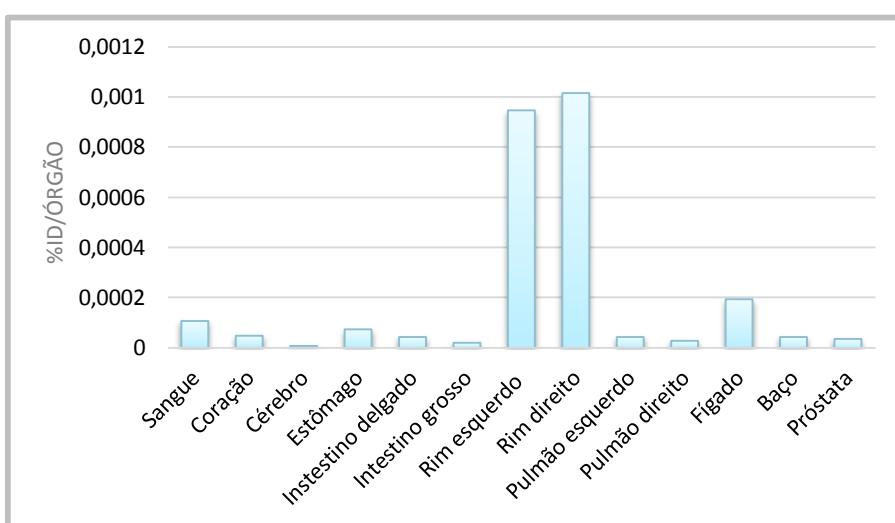
Aptâmero				
1ª Fita			Rendimento de Marcação em triplicata da Aptâmero	
Pedaços da Fita	CPM 99m-Tc	Porcentagem	99,35	
<b>Origem 1</b>	1773800,88	98,83		
<b>Origem 2</b>	5818,11	0,32		
<b>Topo 1</b>	3931,59	0,22		
<b>Topo 2</b>	11329,03	0,63		
<b>Total</b>	1794879,61	100,00		
2ª Fita			3ª Fita	
Pedaços da Fita	CPM 99m-Tc	Porcentagem	CPM99m-Tc	Porcentagem
<b>Origem</b>	1743656,92	99,46	3070920,89	99,42
<b>Topo</b>	9455,59	0,54	17764,74	0,58
<b>Total</b>	1753112,51	100,00	3088685,63	100,00

CPM: Contagem por Minuto.

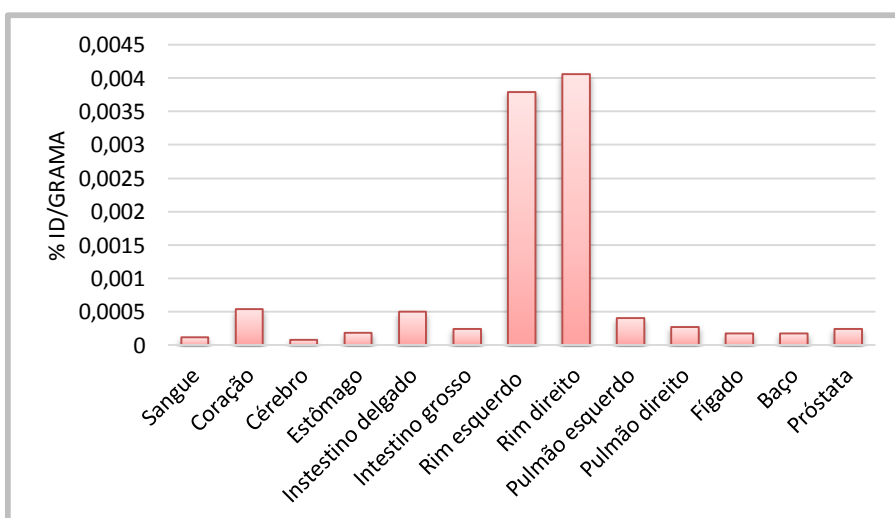
Fonte: Próprio autor.

### 2.5.1 Processo de Marcação do Aptâmero anti MUC 1 pelo Método Direto com Tecnécio-<sup>99m</sup>Tc

Nos testes realizados foi demonstrada a elevada pureza radioquímica do aptâmero anti-MUC1 conjugado ao <sup>68</sup>Ga, fato este que é utilizado como um dos fatores de aceitação para a aplicação clínica, mostrando a baixa proporção de material radioativo livre (THRALL et al., 2003). Além do mais, a ausência de impurezas no radiofármaco contribui na aquisição de imagens com boa qualidade devido a minimização de ruídos oriundos da radiação de fundo e a baixa das irradiações de órgãos adjacentes sadios (Figura 35 e 36; Quadro 11).



**Figura 35:** Biodistribuição da solução de aptâmero anti-MUC 1 <sup>99m</sup>Tc após 2 h da administração intraocular em relação à dose injetada em cada órgão e no sangue (média dos dois ratos).



**Figura 36:** Biodistribuição do aptâmero anti-MUC 1 <sup>99m</sup>Tc após 2 h da administração intraocular em relação à dose injetada em cada grama de tecido dos órgãos avaliados e no sangue (média dos dois ratos).

**Quadro 11.** Biodistribuição do radiofármaco aptâmero anti-MUC1-<sup>99m</sup>Tc em ratos *Wistar* após administração intraocular (porcentagem da média e desvio padrão da atividade injetada/órgão e atividade injetada/grama de órgão - N= 2 animais).

ÓRGÃO	%ATIVIDADE/ÓRGÃO	%ATIVIDADE/TECIDO
Sangue	0,10±0,06	0,01±0,00
Coração	0,04±0,00	0,05±0,01
Cérebro	0,00±0,00	0,00±0,00
Estômago	0,07±0,01	0,01±0,00
Intestino delgado	0,04±0,02	0,05±0,02
Intestino grosso	0,01±0,00	0,02±0,00
Rim esquerdo	0,94±0,11	0,37±0,09
Rim direito	1,01±0,32	0,40±0,12
Pulmão esquerdo	0,04±0,01	0,04±0,01
Pulmão direito	0,02±0,00	0,02±0,00
Fígado	0,19±0,09	0,01±0,00
Baço	0,04±0,02	0,01±0,00
Próstata	0,03±0,00	0,02±0,00

Fonte: Próprio autor.

Os resultados dos estudos de biodistribuição mostraram o rápido clareamento sanguíneo (0,10±0,06) do aptâmero radiomarcado. Pela via de excreção preferencial ser a renal, os rins apresentaram destaque quanto a captação do material radioativo (rim esquerdo 0,94±0,11 e rim direito 1,01±0,32), o que seria esperado.

A sutil captação em fígado (0,19±0,09) mostra a estabilidade do composto radiomarcado, podendo ser sugestionado o baixo clareamento hepatobiliar ou a presença de <sup>99m</sup>TcO<sub>2</sub> (colóide – óxido de tecnécio). A captação de fígado conjunta as captações insignificativas dos órgãos abdominais como estômago (0,07±0,01) e intestino (delgado 0,04±0,02 e grosso 0,01±0,00) induzem a minimização dos efeitos prejudiciais na geração de uma imagem com má qualidade devido a radiação de fundo.

O aptâmero anti-MUC1 radiomarcado não atravessa a barreira hematoencefálica, portanto não é possível detectar a captação cerebral e todos os outros órgãos tiveram captação baixa.

### **2.5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram expressos como Média + Desvio Padrão. A análise estatística foi realizada através do programa estatístico PRISMA 5.0, utilizando o teste t de Student com distribuição bicaudal para comparação de pares e análise de variância ANOVA para comparação de grupos. Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05.

### 3 CONCLUSÃO

A metodologia utilizada no controle de qualidade por CCD para determinação da pureza radioquímica da marcação é simples, de fácil manipulação, com baixo custo agregado, tornando este método viável.

Os estudos por CCD foram aplicados suficientemente para os radioisótopos emissores de energia  $\beta^+$  ( $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$ ).

Os método analítico desenvolvido e validado por CLAE, mostrou-se sensível, linear, preciso e exato para quantificação de  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{22}\text{Na}$  conjugado ao aptâmero anti-MUC1. Apesar de algumas interferências desconhecidas em alguns perfis, os cromatogramas confirmaram suficientemente a radiomarkação verificada anteriormente por CCD.

Os valores de tempo de retenção das soluções analisadas na CLAE possuem média superior ao previsto para aplicação clínica dos compostos radiomarcados.

Apesar da associação de radioisótopos a aptâmeros ser um procedimento que exige o cumprimento de etapas que devem ser cuidadosamente seguidas, foi possível desenvolver um protocolo de fácil execução e que se mostrou reprodutível.

O aptâmero radiomarcado apresentou excreção primariamente renal, com alta atividade nos rins, porém nos demais órgãos a captação da atividade foi baixa ou desprezível.

Com os ratos *Wistar* controle foi provado que não existe direcionamento do complexo a tecidos que apresentam tecidos MUC1 negativos.

Por fim, pode-se concluir que o objetivo principal do trabalho de radiomarcado o aptâmero anti-MUC1 com os radioisótopos emissores de partículas  $\beta$  foi realizado suficientemente. No entanto, outros testes auxiliares são necessários para que haja discriminação minuciosa das propriedades químico-biológicas deste complexo como agente de imagiologia molecular e aplicação *in vivo*.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ❖ Estudos de variação de massa, atividade, pH e volume da radiomarcção;
- ❖ Ensaio de ligação às proteínas plasmáticas do aptâmero radiomarcado;
- ❖ Avaliação da estabilidade da radiomarcção em diferentes condições de armazenamento;
- ❖ Estudos farmacocinéticos;
- ❖ Estudo toxicológico do produto final radiomarcado;
- ❖ Comparação da biodistribuição e farmacocinética do aptâmero conjugado em diferentes razões molares;
- ❖ Ensaio de ligação específica dos compostos conjugados e radiomarcados às células tumorais;
- ❖ Estudo de biodistribuição em ratos com processo tumoral em próstata induzido;
- ❖ Estudo de corpo inteiro e de imagem cintilográfica em gama-câmara;
- ❖ Nova radiomarcção com diferentes radioisótopos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS J. The case of scirrhus of the prostate gland with corresponding affliction of the lymphatic glands in the lumbar region and in the pelvis. *Lancet*, v1, p.393, 1,1:393, 1853.

AGNES CIBIEL A., DUPONT D. M. & DUCONGÉ F. Methods To Identify Aptamers against Cell Surface Biomarkers. *Pharmaceuticals*, 4, 1216-1235, 2011.

ALBERNAZ, M. S., OSPINA, C. A., ROSSI, A. M., et al. “Radiolabelled nanohydroxyapatite with  $^{99m}\text{Tc}$ : perspectives to nanoradiopharmaceuticals construction”, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, v. 42, n. 2, p. 88-91, abr, 2014.

ALMEIDA J. C. E Srougi M. Câncer de próstata. Sinopse de Urologia. Ano 5 - nº 2 – 2001.

ALMEIDA, R. S., GUIMARAES, T. T., ALBERNAZ, M. S., et al. “Can Quality Control of Radiopharmaceuticals be Done Using Water and Ethanol?”, *Advanced Science Letters*, v. 10, n. 1, p. 140-142, maio, 2012.

AMERICAN CANCER SOCIETY: Cancer Facts & Figures. Atlanta, GA: American Cancer Society, 2011.

APOSTOLOPOULOS V., MCKENZIE I. F. Cellular mucins: targets for immunotherapy. *Crit Rev Immunol*, 14(3-4):293-309, 1994.

ARAÚJO, E. B. A Utilização do elemento tecnécio- $^{99m}$  no diagnóstico de patologias e disfunções dos seres vivos. *Cadernos Temáticos de Química Nova*, 2005. Disponível em <<http://qnesc.sbq.org.br/online/cadernos/06/a08.pdf>>. Acessado em 22 de março de 2015.

ARAÚJO, E. B.; LAVINAS, T.; COLTURATO, M. T.; MENGATTI, J. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. Vol.44, n.1, 2008.

BANERJEE J. and NILSEN- HAMILTON M. Aptamers: multifunctional molecules for biomedical research. *J Mol Med*, v. 91, p.1333–1342, 2013.

BARUCH, A., HARTMANN, M., YOELI, M. et al. The breast cancer-associated MUC1 gene generates both a receptor and its cognate binding protein. *Cancer Res.* 59, 1552–1561, 1999.

BELLUZO, M. S.; RIBONE, M. E.; LAGIER, C. M. Assembling Amperometric Biosensors for Clinical Diagnostics. *Sensors*, v.8, p.1366-1399, 2008.

BERENS, C., THAIN, A., SCHROEDER, R. A tetracycline-binding RNA aptamer. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 9, p. 2549–2556, 2001.

BEYER T, TOWNSEND DW, BRUN T, KINAHAN PE, CHARRON M, RODDY R, et al. A combined PET/CT scanner for clinical oncology. *J Nucl Med*, 41: 1369-79, 2000.

BIANCHINI M., RADRIZZANI M., BROCARDO M.G., REYES G.B., GONZALEZ S.C., SANTA-COLOMA T.A. Specific oligobodies against ERK-2 that recognize both the native and the denatured state of the protein. *J. Immunol. Methods*, v. 252, p. 191–197, 2001.

BLUMGART, H. L. and YENS, O. C. Studies on the velocity of blood flow: I. The method utilized. *J. Clin. Invest.* v. 4, n.1, p.1-13, 1926.

BOCK L.C., GRIFFIN L.C., LATHAM J.A., VERMAAS E.H., TOOLE J.J. Selection of single-stranded DNA molecules that bind and inhibit human thrombin. *Nature*, v. 355, p. 564–566, 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2012: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ, INCA, 2014.

BRATT O: Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol* 168: 906–913, 2002.

BREEMAN WAP, BLOIS E, CHAN HS et al. 68Ga-labeled DOTA-Peptides and 68Ga-labeled Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography: Current status of research, clinical applications, and future perspectives. *Semin Nucl Med*, 4:314-21, 2011.

BRIDONNEAU P., CHANG Y-F, BUVOLI V-B, O'CONNELL D., PARMA D. Site-directed selection of oligonucleotide antagonists by competitive elution. *Antisense Nucleic Acids Drug Dev*, v. 9, p.1–11, 1999.

BRUNO J.G., KIEL J.L. *In vitro* selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosens. Bioelectron*, v. 14, p. 457–464, 1999.

BUNKA DH, PLATONOVA O, STOCKLEY PG. Development of aptamer therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*, 10(5):557-62, 2010.

BURGSTALLER P., FAMULOK, M. Isolamento de aptâmeros de RNA para cofatores biológicos por seleção *in vitro*. *Angew. Chem.*, v. 106, p. 1163–1166, 1994.

BURKE D.H., HOFFMAN D.C., BROWN A., HANSEN M., PARDI A., GOLD L. RNA aptamers to the peptidyl transferase inhibitor chloramphenicol. *Chem. Biol.*, v. 4, p. 833–843, 1997.

BUSTAMANTE, F. L. S. et al. Complexos ativados por hipóxia : uma estratégia para o combate ao câncer. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 2, p. 138–148, 2009.

CALIL, SIMONE SAAD; SILVA, PAULO ROBERTO QUEIROZ DA. Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. Disponível em: <<http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>>. Acessado em 08 de abril. 2015.

CAMARGO, E. E. Experiência Inicial com PET/CT. Radiol. Bras, São Paulo, v.38, n.1, 2005.

CARROLL P, COLEY C, MC LEOD D, et al.: Prostate-specific antigen best practice policy. Part I: early detection and diagnosis of prostate cancer. *Urology* 57: 217–224, 2001.

CARTER BS, BEATY TH, STEINBERG GD, et al.: Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 3367–3371, 1992.

CATALONA, W. J., SMITH D. S., RATLIFF T. L. et al.: Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *N Engl J Med*, 324: 1156, 1991.

CATANA C, WU Y, JUDENHOFER MS, QI J, PICHLER BJ, CHERRY SR. Simultaneous acquisition of multislice PET and MR images: initial results with a MR-compatible PET scanner. *J Nucl Med*, 47: 1968-76, 2006.

CAZAP, E., BUZAID A., GARBINO C., DE LA GARZA J., ORLANDI F., SCHWARTSMANN G., VALLEJOS C., GUERCOVICH A., and BREITBART G. Breast cancer in Latin America: Experts perceptions compared with medical care standards: The Breast, v. 19, p. 50-54, 2010.

CERCHIA, L., HAMM, J., LIBRI, D., TAVITIAN, B., DE FRANCISCIS, V. Nucleic acid aptamers in cancer medicine. *FEBS Lett*, 528, 12-16, 2002.

CHAN, J.M.; STAMPFER, M.J.; GIOVANNUCCI, E.L. What causes prostate cancer: a brief summary of the epidemiology. *Cancer Biol*, v.8, p.263-273, 1998.

CHARLTON J, SENNELLO J, SMITH D. In vivo imaging of inflammation using an aptamer inhibitor of human neutrophil elastase. *Chem. Biol*, 4:809–816, 1997.

CHEN HW, MEDLEY CD, SEFAH K, et al.: Molecular recognition of small-cell lung cancer cells using aptamers. *ChemMedChem* 3: 991-1001, 2008.

CHERRY SR. Multimodality imaging: beyond PET/CT and SPECT/CT. *Semin Nucl Med*, 39: 348-53, 2009.

CHIU, TAI-CHIA and HUANG, CHIH-CHING. Aptamer-Functionalized Nano-Biosensors. *Sensors*, v.9, p.10356-10388, dez 2009.

CHO, WCS. Grand challenges and opportunities in deciphering the role of non-coding RNAs in human diseases. *Frontiers in Genetics*, 2:1-3, 2011.

CHOI, Y.-E.; KWAK, J.W & PARK, J. W. Nanotechnology for early cancer detection. *Sensors* (Basel, Switzerland), v. 10, n. 1, p. 428–55, 2010.

CIESIOLKA J and YARUS M: Small RNA-divalent domains. *RNA* 2: 785-793, 1996.

CITARTAN, M., GOPINATH, S.C.B., TOMINAGA, J., TAN, S.-C., TANG, T.-H., *Biosens. Bioelectron.* 34, 1–11, 2012.

CLARKE R. A., SCHIRRA H. J., CATTO J. W., LAVIN M. F., GARDINER RA. Markers for Detection of Prostate Cancer. *Cancers*. 2(2):1125-1154, 2010.

COFFEY, D. S. The molecular biology endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: *Campbell's Urology*. pp. 226-227, 1992.

CONNELL G. J., ILLANGESEKARE M. & YARUS M. Three small ribooligonucleotides with specific arginine sites. *Biochemistry* 32: 5497-5502, 1993.

COOK L. S., GOLDOFT M., SCHWARTZ S. M., et al. Incidence of adenocarcinoma of the prostate in Asian immigrants to the United States and their descendants. *J Urol* 161: 152–155, 1999.

CORRADI, L. S., et al. Long-term inhibition of 5-alpha reductase and aromatase changes the celular and extracelular compartments in gerbil ventral prostate at diferente postnatal ages. In: *Int J Exp Pathol*. 90(1), pp.79-94, 2009.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. *Patologia estrutural e funcional*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1400p.

CUTLER, C. Utilization of metabolic, transport and receptor-mediated processes to deliver agents for cancer diagnosis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 37, n. 1-3, p. 189–211, 5 abr. 1999.

DAVID E. C. Epidemiology of Prostate Cancer. *Urology* 62 (Supplement 6A), December 22, 2003.

DAVIS K.A., ABRAMS B., LIN Y., JAYASENA S.D. Use of a high affinity DNA ligand in flow cytometry (Reprinted from *Nucleic Acids Research*). *J. Clin. Ligand Assay*, v. 20, p. 90–97, 1997.

\_\_\_\_\_. Staining of cell surface human CD4 with 2'-F-pyrimidine-containing RNA aptamers for flow cytometry. *Nucleic Acids Res* 26: 3915-3924, 1998.

DELACOIX et al. *Radiation Protection Dosimetry – Radionuclide and Radiation Protection Data Handbook* 2002.

DENNIS, L. K. & DAWSON, D. V. Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer. In: *Epidemiology*. 13 (1), pp. 72–79, 2002.

DOUGAN, H., WEITZ, J. I., STAFFORD, A. R., GILLESPIE, K. D., KLEMENT, P., HOBBS, J. B., LYSTER, D. M. Evaluation of DNA aptamers directed to thrombin as potential thrombus imaging agents. *Nucl Med Biol.*, 30, 61-72, 2003.

ELLINGTON A. D., SZOSTAK J. W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*, v. 346, p. 818-822, 1990.

ELLINGTON A. D., SZOSTAK, *Nature* (London) 355 (1992) 850.

EVEN-SAPIR E, LERMAN H, LIEVSHITZ G, KHAFIF A, FLISS DM, SCHWARTZ A, et al. Lymphoscintigraphy for sentinel node mapping using a hybrid SPECT/CT system. *J Nucl Med*, 44: 1413-20, 2003.

FAGUNDES LA, FAGUNDES MA, MARIANO M, BRITO CS, FAGUNDES HM. *Câncer de próstata: novos caminhos para a cura*. Porto Alegre: AGFE Editora; 2002.

FAMULOK M & JENNE A. Catalysis Based on Nucleic Acid Structures. 202:101 – 131, 1999.

FAMULOK, M. Molecular recognition of amino acids by RNA–aptamers-an L- citrulline binding RNA motif and its evolution into an L-arginine binder. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 116, p. 1698–1706, 1994.

FAMULOK, M; BLIND, M.; MAYER, G. Intramers as promising new tools in functional proteomics. In: *Chem Biol.* 8 (10), pp. 931-939, 2001.

FENG H., GHAZIZADEH M., KONISHI H & ARAKI T. Expression of MUC1 and MUC2 Mucin Gene Products in Human Ovarian Carcinomas, *J Clin Oncol*, 32(12):525-529. 29, 2002.

FENG L., CHEN Y., REN J., QU X.A. A graphene functionalized electrochemical aptasensor for selective label-free detection of cancer cells. *Biomaterials*, 32:2930–2937, 2011.

FERREIRA C.S.M., MATTHEWS C.S., MISSAILIDIS S. DNA aptamers that bind to MUC1 tumour marker: design and characterization of MUC1-binding single-stranded DNA aptamers. *Tumor Biol.*, v. 27, p. 289–301, 2006.

FERREIRA, C. S. and MISSAILIDIS S. Aptamer-based Therapeutics and their potencial in radiopharmaceutical Design. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 50, p. 63-76, 2007.

FERREIRA, R. M. e MARQUES, F. L. N. Radiofarmácia. In: HIRONAKA, F. H.; SAPIENZA, M. T.; ONO, C. R.; LIMA, M. S.; BUCHPIGUEL, C. A. (Ed.) *Medicina Nuclear - Princípios e Aplicações*. São Paulo, SP: Editora Atheneu, p. 55- 66, 2012.

FLOREA A., CRISTEA C., SÂNDULESCU R. Muc1 marker for the detection of ovarian cancer. A review. *Farmácia*, v. 62, 1, 2014.

FRANCISCIS V. D, RIENZO A. & CERCHIA L. Nucleic Acid Aptamers for In Vivo Molecular Imaging, *Molecular Imaging*. Book edited by Bernhard Schaller, Chapter 5, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/molecular-imaging/nucleic-acid-aptamers-for-in-vivo-molecular-imaging>>. Acessado em 27 de março de 2015.

FREIRE GC. Conheça a sua próstata. São Paulo: Bioética, 2003.

GEIGER A., BURGSTALLER P., VON DER ELTZ H., ROEDER A., FAMULOK M. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity. *Nucleic Acids Res*, v. 24, p.1029–36, 1996.

GENDLER S. J., LANCASTER C. A., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., DUHIG T., PEAT N., BURCHELL J., PEMBERTON L., LALANI E.-N., WILSON D. Molecular cloning and expression of human tumour-associated polymorphic epithelial mucin, *J. Biol. Chem.* 265:15286-15293, 1990.

GENDLER SJ and SPICER AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol.* 57: 607–634, 1995.

GENDLER SJ: MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6(3): 339-353, 2001.

GIANINI, M. M. S. Câncer e Gênero: Enfrentamento da doença. Dissertação (Mestrado em Psicologia Clínica): Pontífica Universidade Católica de São Paulo, 2004.

GIMBA, ERP et al. Molecular aspects of prostate cancer: implications for future directions. In: *Int. braz j urol.* 29 (5), pp. 401- 411, 2003.

GIOVANNUCCI E, RIMM E B, COLDITZ G A, et al.: A prospective study of dietary fat and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 85: 1571–1579, 1993.

GIRLING A, BARTKOVA J, BURCHELL J, GENDLER S. J., GILLET C., TAYLOR-PAPADIMITRIOU J. A core protein epitope of the PEM mucin detected by the monoclonal antibody SM-3 is selectively exposed in a range of primary carcinomas, *Int. J. Cancer* 43:1072-1076, 1989.

GOLD L. Oligonucleotides as research, diagnostic, and therapeutic agents. *J Biol Chem*, Jun 9;270(23):13581-4, 1995.

GOPINATH, S. C. B. Antiviral aptamers. *Arch Virol*, 152: 2137–2157, 2007.

GRAGOUDAS, E. S. et al. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med*, v. 351, p. 2805–2816, 2004.

GREEN LS, BELL C & JANJIC N. Aptamers as reagents for high-throughput screening. *Biotechniques*, (5):1094-6, 1098, 1100 passim, 2001.

GREENLEE, R. T., HILL-HARMON, M. B., MURRAY, T. & THUN, M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J. Clin*, 51:15–36, 2001.

GRIFFITHS, K. & MORTON, M. S. Aspects of the cell biology of prostate cancer. In: *Textbook of prostate cancer: Pathology Diagnosis and Treatment*. 6a ed., pp. 51-47, 1999.

GUHLKE S., FAMULOK M. & BIRSACK H. J. Aptamers: a novel class of radiopharmaceutical with diagnostic and therapeutic potential. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30:1441–1443, 2003.

GUYTON A.C. & HALL J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

HAAS G. P. & SAKR W. Epidemiology of prostate cancer. *CA Cancer J Clin* 47: 273–287, 1997.

HAMOUEH, M. et al. Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Advanced drug delivery reviews*, v. 60, n. 12, p. 1329–46, 2008.

HAMULA, C. L. A.; GUTHRIE, J. W.; ZHANG, H.; LI, X. F.; LE, X. C. Selection and analytical applications of aptamers. *Trac-Trends Anal Chem*, 25, 681–691, 2006.

HAN, K.; LIANG, Z. & ZHOU, N. Design Strategies for Aptamer-Based Biosensors. *Sensors*, v.10, p.4541-4557, 2010.

HANISCH F. G. & MULLER S. MUC1: The polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*, 10:439-49, 2000.

HARADA K. & FRANKEL A. D. Identification of two novel arginine binding DNAs. *EMBO J* 14: 5798-5811, 1995.

HASEGAWA H. et al. Improvement of Aptamer Affinity by Dimerization. *Sensors*, v.8, p.1090-1098, 2008.

HAYES, R. B. et al. Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer. In: *Br. J.* 82 (3), pp. 718–725, 2000.

HENDERSON, B. E. et al. Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res*, v.42, p.3232-3239, 1982.

HENDERSON, B. E & ROSS, R. K. Prevention of hormone- related cancers: a delicate balance. *Helix, Amgen's Magaz of Biotech*, v.1, p.5-11, 1996.

HENDERSON, B. E.; ROSS, R. K.; PIKE, M. C. Toward the primary prevention of cancer. *Science*, v.252, p.1131-1138, 1991.

HERMANN, T. & PATEL, D. J. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science*, v.287, p.820–825, 2000.

HERTZ, S.; ROBERT, A. & EVANS, R. D. Radioactive iodine as an indicator in the study of thyroid physiology. *Proc. Soc. Exptl. Biol.Med.*, v.38, p.510-513, 1938.

HESELBERTH, J.R., ROBERTSON, M.P., KNUDSEN, S.M.& ELLINGTON, A.D. 2003. Simultaneous detection of diverse analytes with an aptazyme ligase array. *Anal. Biochem.* 312:106–112.

HICKE B. J. & STEPHENS A. W. Escort aptamers: a delivery service for diagnosis and therapy. *Nucleic acid therapeutics. The Journal of Clinical Investigation.* v. 106, n.8, 2000.

HICKE B. J.; STEPHENS A. W.; GOULD TY et al. Tumor Targeting by an Aptamer. *The Journal of Nuclear Medicine*, v. 47, 4,2006.

HICKE B.J., WATSON S.R., KOENIG A., LYNOTT C.K., BARGATZE R. F., CHANG Y.F., et al. DNA aptamers block L-selectin function in vivo. Inhibition of human lymphocyte trafficking in SCID mice. *J. Clin. Invest.*, v. 98, p. 2688–2692, 1996.

HILKENS J., LIGTENBERG M. J. L., VOS H. L., LITVINOV S. V. The structure of cell-associated mucin-like molecules and their adhesion modulating property. *Trends Biochem Sci*, 17:359-63, 1992.

HO S. B. et al. Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res*, 53: 641–651, 1993.

HOFMAN M. S., KONG G., NEELS O. C. et al. High management impact of Ga-68 DOTATATE (GaTate) PET/CT for imaging neuroendocrine and other somatostatin expressing tumours. *J Med Imag Rad Oncol*, 56:40-7, 2012.

HOFMANN H. P., LIMMER S., HORNING V. & SPRINZL M. Ni<sup>2+</sup>-binding RNA motifs with an asymmetric purine-rich internal loop and a G-A base pair. *RNA* 3: 1289-1300, 1997.

HOMANN M. & GORINGER H.U. Combinatorial selection of high affinity RNA ligands to live African trypanosomes. *Nucleic Acids Res.*, v. 27, p. 2006–2014, 1999.

HONG, H. et al. Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. *Nano today*, v. 4, n. 5, p. 399–413, 1 out. 2009.

HUA, M. et al. Label-free Electrochemical Cocaine Aptasensor Based on a Target-inducing Aptamer Switching Conformation. *Analytical Sciences*, v.26, p.1265-1270, 2010.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. Production of Long Lived Parent Radionuclides for Generators:  $^{68}\text{Ge}$ ,  $^{82}\text{Sr}$ ,  $^{90}\text{Sr}$  and  $^{188}\text{W}$ . IAEA Radioisotopes and radiopharmaceuticals series nº 2, 2010.

\_\_\_\_\_. Quality assurance for SPECT systems. Vienna, 2009.

\_\_\_\_\_. Quality control of nuclear medicine instruments. Vienna, 1991. (IAEA-TECDOC-602) apud DE PAULA, A. T. Estudos de Materiais Adsorvedores para o Preparo de Geradores de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  (Tese de Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Autarquia Associada a Universidade de São Paulo. 2013.

IARC. World cancer factsheet. Cancer Research UK. January, 2014.

IDB HOLLAND bv. iThemba LABS, África do Sul.  $^{68}\text{Ga}$  generator. Disponível em: <[http://www.idb-holland.com/products/7/15\\_product\\_details\\_gallium-68\\_generator.html](http://www.idb-holland.com/products/7/15_product_details_gallium-68_generator.html)>. Acesso em: 10 de jan. 2015.

ILIC D, NEUBERGER MM, DJULBEGOVIC M, DAHM P. Screening for prostate cancer (Review). Cochrane Library, Issue 1, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro:Inca, 2011.

\_\_\_\_\_. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005.

\_\_\_\_\_. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância, Rio de Janeiro, Inca, 2014.

ITG. The ITG  $^{68}\text{Ga}$  Labelling Package:  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  Generator & Synthesis Module. ITG isotope technologies Garching GmbH. Disponível em: <<http://www.itg-garching.de/index.php/products/generators/itg-ge-68-ga-68-generator>>. Acessado em: 18 de maio de 2015.

JAMES WILLIAM. Aptamers. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Wiley, p. 4848-4871, 2000.

JARMULOWICZ, M. R. The role of pathology in biopsy, diagnosis and amangement of prostate cancer. In: Textbook of prostate cancer: Pathology, Diagnosis and Treatment. pp.16-33, 1999.

JAYASENA S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. Clin Chem, 45(9):1628-50, 1999.

JELLINEK D., GREEN L.S., BELL C., JANJIC N. Inhibition of receptor binding by high-affinity RNA ligands to vascular endothelial growth factor. Biochemistry, v. 33, p. 10450–10456, 1994.

JERNAL A, MURRAY T, SAMUELS A, et al.: Cancer statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 53:5-26, 2003.

JULIAN J. & CARSON D. D. Formation of MUC1 metabolic complex is conserved in tumor-derived and normal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 293:1183-90, 2002.

KA-TO SHUM, JIEHUA ZHOU, JOHN J. ROSS. Nucleic Acid Aptamers as Potential Therapeutic and Diagnostic Agents for Lymphoma. *Journal of Cancer Therapy*, 4, 872-890, 2013.

KHAN, H. & MISSAILIDIS, S. Aptamers in oncology: A diagnostic perspective. *Gene Ther Mol Biol.*, 12, 111-128, 2008.

KLEIN, E. A. et al. (2007): Epidemiology, etiology, and prevention of prostate cancer. In: *Urology*. 9th ed., pp. 2854-2867.

KLUSSMANN, S. et al. (1996): Mirror-image RNA that binds D-adenosine. In: *Nat Biotechnol*. 14 (9), 1112-1115.

KOIZUMI M. & BREAKER R.R. Molecular recognition of cAMP by an RNA aptamer. *Biochemistry*, v. 39, p. 8983–8992, 2000.

KUANCAN LIU, BAOSHUN LIN, & XIAOPENG LAN. Aptamers: A Promising Tool for Cancer Imaging, Diagnosis, and Therapy. *Journal of Cellular Biochemistry* 114:250–255 (2013).

KUBIK M. F., BELL C., FITZWATER T., WATSON S. R., TASSET D.M. Isolation and characterization of 20-fluoro-, 20-amino-, and 20 fluoro/amino-modified RNA ligands to human IFN-gamma that inhibit receptor binding. *J. Immunol.*, v. 159, p. 259–267, 1997.

LATO S. M., BOLES A. R., ELLINGTON A. D. In-vitro selection of RNA lectins—using combinatorial chemistry to interpret ribozyme evolution. *Chem. Biol.*, v. 2, p. 291–303, 1995.

LAUHON C.T., SZOSTAK J.W. RNA aptamers that bind flavin and nicotinamide redox cofactors. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 117, p. 1246–1257, 1995.

LE V. S. 68Ga Generator Integrated System: Elution–Purification–Concentration–Integration. In: Baum R, Rosch F (Eds.). *Theranostics, Gallium-68, and other radionuclides: A pathway to personalized diagnosis and treatment*. Berlin: Springer, p. 43-73, 2013.

LEDERER, C. M.; HOLLANDER, J. M. & PERLMAN, L. *Table of isotopes*. New York; Willey, 6<sup>a</sup> ed, 1967.

LEE J. F., STOVALL G. M., ELLINGTON A. D. Aptamer therapeutics advance. *Curr Opin Chem Biol*, 10(3):282–9, 2006.

LEE, J. H., YIGIT, M. V., MAZUMDAR, D., & LU, Y. Molecular diagnostic and drug delivery agents based on aptamer-nanomaterial conjugates. *Advanced drug delivery reviews*, 62(6), 592–605, 2010.

LEE, JEONG-O et al. Aptamers as Molecular Recognition Elements for Electrical Nanobiosensors. *Anal Bioanal Chem*, v.390, p.1023-1032, 2008.

LEVITIN F, BARUCH A, WEISS M, STIEGMAN K, HARTMANN ML, YOELI-LERNER M, ZIV R, ZRIHAN-LICHT S, SHINA S, GAT A, LIFSCHITZ B, SIMHA M, STADLER Y, CHOLOSTOY A, GIL B, GREAVES D, KEYDAR I, ZARETSKY J, SMORODINSKY N, WRESCHNER DH: A novel protein derived from the MUC1 gene by alternative splicing and frameshifting. *J Biol Chem*, 280(11):10655-10663, 2005.

LI Yet al. Interaction of glycogen synthase kinase 3b with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and b-catenin. *Mol Cell Biol*, 18: 7216–7224, 1998.

LIU J. & STORMO G.D. Combining SELEX with quantitative assays to rapidly obtain accurate models of protein–DNA interactions. *Nucleic Acids Res.*, v. 33, p.141, 2005.

LIU, S. & EDWARDS, D.S. “<sup>99m</sup>Tc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals”, *Chemical Reviews*, v. 99, n. 9, pp. 2235-2268, 1999.

LOPES, A. Câncer: A doença, o paciente, a terapêutica, o médico e o hospital. Disponível em: <<http://www.hcanc.org.br/canc1-html>>. Acesso em 03 de fevereiro de 2015.

LORSCH J. R., SZOSTAK J.W. In vitro selection of RNA aptamers specific for cyanocobalamin. *Biochemistry*, v. 33, p. 973–982, 1994.

LOU, X. et al. Micromagnetic Selection of Aptamers in Microfluidic Channels. *PNAS*, v.106, n.9, p.2989-2994, 2009.

LOURO, I. D. Oncogenética. *Rev Soc Bras Canc*, n.11, p.36-42, 2000 apud SILVA, A. E, SERAKIDES R., CASSALI, G. D. Carcinigênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Revista Ciência Rural*, v.34, n.2, p. 625-633, 2004.

MAEHASHI, K.; MATSUMOTO, K. Label-Free Electrical Detection Using Carbon Nanotube-Based Biosensors. *Sensors*, v.9, p.5368-5378, 2009.

MAIRAL, T., O´ZALP, V.C., Lozano SA´NCHEZ, P., MIR, M., KATAKIS, I. & O’SULLIVAN, C.K. Aptamers: molecular tools for analytical applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 989–1007, 2008.

MAIRHOFER J., ROPPERT K & ERTL P. Microfluidic Systems for Pathogen Sensing: A Review. *Sensors*, v.9, p. 4804-4823, 2009.

MAJERFELD I. & YARUS M. An RNA pocket for an aliphatic hydrophobe. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, v. 1, p. 287–292, 1994.

MAJUMDAR A., KHORLIN A, DYATKINA N, LIN FL, POWELL J, LIU J, FEI Z, KHRIPINE Y, WATANABE KA, GEORGE J, GLAZER PM, SEIDMAN MM. Targeted gene knockout mediated by triple helix forming oligonucleotides. *Nat Genet*, 20(2):212-4, 1998.

MAJUMDER P., GOMES K. N. & ULRICH H. Aptamers: from bench side research towards patented molecules with therapeutic applications. *Expert Opin Ther Pat* 19: 1603-1613, 2009.

MAJUMDER, P. et al. Targeting DNA associated processes for cancer therapy by the use of SELEX and anti-gene approaches – When selection meets rational design. In: *Medicinal Chemistry Reviews On Line*. 2 (3), pp. 257- 264, 2005.

MAKWANA, V.; SIMMONS, S.; MISSAILIDIS, S. "Aptamers as Anticancer Agents". In: *Anticancer Therapeutics*, Missailidis S (editor). Wiley and Sons Ltd, United Kingdom, 2008.

MANNIRONI C, SCERCH C, FRUSCOLONI P and TOCCHINI-VALENTINI GP: Molecular recognition of amino acids by RNA aptamers: the evolution into an L-tyrosine binder of a dopamine-binding RNA motif. *RNA* 6: 520-527, 2000.

MANNIRONI C., NARDO A. D., FRUSCOLONI P., TOCCHINI-VALENTINI G. P. In vitro selection of dopamine RNA ligands. *Biochemistry*, v. 36, p.9726–34, 1997.

MARANGONI K. Desenvolvimento e caracterização de aptâmeros ligantes específicos ao gene PCA3 e implicações na modulação da expressão gênica de células tumorais transfectadas. TESE (Doutorado em Genética e Bioquímica): Universidade Federal de Uberlândia. Instituto de Genética e Bioquímica, 2011.

MARTINS, R C et al. Valor do FDG[<sup>18</sup>F]-PET/CT como preditor de câncer em nódulo pulmonar solitário. *J. Bras. Pneumol*. São Paulo, v. 34, n. 7, 2008.

MATTOS JR, D. & FONSECA, L. L. Atlas Ilustrado: Diagnóstico e Estadiamento. Lemos Editora, São Paulo, 1998.

MATUSIAK K., RADWANSKA M. W. & STEPIEN, A. Dynamic heart phantom for the quality control of SPECT equipment. *Physica Medica*. Vol. 24, p. 112-116, 2008.

MEASE, R. C., LAMBERT, C. Newer methods of labeling diagnostic agents with Tc-99m, *Seminars in Nuclear Medicine*, v. 31, n. 4 (Oct), pp. 278-285, 2001.

MELI M., VERGNE J., DECOUT J.L., MAUREL M.C. Adenine-aptamer complexes—A bipartite RNA site that binds the adenine nucleic base. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 2104-2111, 2002.

MENDONSA S. D. & BOWSER M.T. In vitro selection of high-affinity DNA ligands for human IgE using capillary electrophoresis. *Anal. Chem*, v. 76, p. 5387–5392, 2004.

MINUNNI, M et al. Development of biosensors with aptamers as bio- recognition element: the case of HIV-1 Tat protein. In: *Biosens Bioelectron*, 20 (6), pp. 1149-1156, 2004.

MISSAILIDIS S. & PERKINS A. Aptamers as Novel Radiopharmaceuticals: Their Applications and Future Prospects in Diagnosis and Therapy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, v. 22, número 4, 2007.

MITRA, A. et al. Nanocarriers for nuclear imaging and radiotherapy of cancer. *Current pharmaceutical design*, v. 12, n. 36, p. 4729–49, jan. 2006.

MOYER VA; U.S. PREVENTIVE SERVICES TASK FORCE. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. *Ann Intern Med*, Jul 17;157(2):120-34, 2012.

NG, EW et al. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease. In: *Nat Rev Drug Discov*. 5 (2), pp. 123-132, 2006.

NIEUWLANDT D, WECKER M and GOLD L: *In vitro* selection of RNA ligands to substance P. *Biochemistry* 34: 5651-5659, 1995.

OLIVEIRA, R. S. & CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. História da radiofarmácia e as implicações da Emenda Constitucional N. 49. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, vol. 44, 2008.

OLIVEIRA R., SANTOS D., FERREIRA D., COELHO P., VEIGA F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42:2, p. 151-165, 2006.

PAGANO, JS et al. Infectious agents and cancer: criteria for a causal relation. In: *Semin. Cancer Biol*. 14 (6), pp. 453-447, 2004.

PANDEY P., KHARBANDA S. & KUFE D. Association of the DF3/MUC1 breast cancer antigen with Grb2 and the Sos/Ras exchange protein. *Cancer Res*, 55: 4000–4003, 1995.

PATEL CN, GOLDSTONE AR, CHOWDHURY FU, SCARSBROOK AF. FDG PET/CT in oncology: "raising the bar". *Clin Radiol*, 65: 522-35, 2010.

PATRICIO B. F. C., ALBERNAZ M. S., SANTOS-OLIVEIRA, R. Development of Nanoradiopharmaceuticals by Labeling Polymer Nanoparticles with Tc-99m., *World Journal of Nuclear Medicine*, v. 12, n. 1 (Jan/Mar), pp. 24-26, 2013.

PIEVE C., BLACKSHA E., MISSAILIDIS S., PERKINS A. PEGylation and Biodistribution of an anti-MUC1 Aptamer in MCF-7 Tumor-Bearing Mice. *Bioconjugate Chem.*, v. 23, p. 1377–1381, 2012.

PINTO, S. R., SARCINELLE, M. A., DE SOUZA, M. A., et al. In vivo studies: comparing the administration via and the impact on the biodistribution of radiopharmaceuticals. *Nuclear Medicine and Biology*, v.41, n. 9 (Oct), pp. 772-774, 2014.

RADOM F., JUREK M., MAZUREK M., OTLEWSKI J., JELEN F. Aptamers: Molecules of great potential. *Biotechnology Advances* 31,1260-1274, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.007>; 2013.

RAJENDRAN M and ELLINGTON AD: Selection of fluorescent aptamer beacons that light up in the presence of zinc. *Anal Bioanal Chem* 390: 1067-1075, 2008.

RHIE A., KIRBY L., SAYER N., WELLESLEY R., DISTERER P., SYLVESTER I., GILL A., HOPE J., JAMES W., TAHIRI-ALAOUI A. Characterization of 20-fluoro- RNA aptamers that bind preferentially to disease-associated conformations of prion protein and inhibit conversion. *J. Biol. Chem*, v. 278, p. 39697–39705, 2003.

ROBERTA, S.S. Avaliação de aptâmeros marcados com 99mTc para identificação de focos infecciosos de *Staphylococcus aureus*. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais): Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, 2014.

ROBERTSON D. L. & JOYCE G. F. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature*, v. 344, p. 467-468, 1990.

ROBILOTTA, CECIL C. A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. *Ver Panam Salud Publica*. V. 20, n. 2/3, 2006. Disponível em <<http://journal.paho.org/uploads/1162234592.pdf>>. Acesso em 05 de janeiro de 2015.

ROESCH, F.; FILOSOFOV, D.V. Production, Radiochemical Processing and Quality Evaluation of 68Ge. IAEA. 2008.

ROOBOL, M.J.; SCHRÖDER, F.H.; CRAWFORD, E.D.; FREEDLAND, S.J.; SARTOR, A.O.; FLESHNER, N.; ANDRIOLE, G.L. A framework for the identification of men at increased risk for prostate cancer. *J. Urol*. 182, 2112–2120, 2009.

- SA, L. T. M., ALBERNAZ, M. S., PATRICIO, B. F. C., et al. "Biodistribution of nanoparticles: Initial considerations". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. v. 70, pp. 602-604, 2012.
- SAHA, G. B., *Physics and radiobiology of nuclear medicine*. New York: Springer, 3a Ed, 2006.
- SAPIENZA, M.T.; MARONE M.M.S. & CHIATTONE, C.S. Contribuição da medicina nuclear para avaliação dos linfomas. *Rev Bras. Hematol. Hemoter.*, São José do Rio Preto, v. 23, n. 2, 2001.
- SARAN D., FRANK J., BURKE D.H. The tyranny of adenosine recognition among RNA aptamers to coenzyme A. *BMC Evol. Biol.*, v. 3, 2003.
- SASSANFAR M., SZOSTAK J.W. An RNA motif that binds ATP. *Nature*, v. 364, p. 550–553, 1993.
- SAZANI P.L., LARRALDE R., SZOSTAK J.W. A small aptamer with strong and specific recognition of the triphosphate of ATP. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 126, p. 8370–8371, 2004.
- SCHÄFER M, BAUDER-WÜST U, LEOTTA K, ZOLLER F, MIER W, HABERKORN U, EISENHUT M, EDER M. A dimerized urea-based inhibitor of the prostate-specific membrane antigen for 68Ga-PET imaging of prostate cancer. *EJNMMI Res.*6;2(1):23, 2012.
- SCHALKEN, J. Androgen receptor mediated growth of prostate cancer. In: *European Urology Supplements*. 4 (8), pp. 4-11, 2005.
- SCOTT, A. M., LEE, F. T., TEBBUTT, N., et al. "A Phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptor", *The National Academy of Sciences of the USA*, v. 104, n. 10 (Mar), pp. 4071-4076, 2007.
- SHANGGUAN D, LI Y, TANG Z, et al.: Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 11838-11843, 2006.
- SHI H., FAN X.C., NI Z.Y., LIS J.T. Evolutionary dynamics and population control during in vitro selection and amplification with multiple targets. *RNA-A*, v. 8, p.1461–1470, 2002.
- SHIMIZU H, ROSS RK, BERNSTEIN L, et al.: Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 63: 963–966, 1991.
- SHLEIEN B (revised by). *The Health Physics and Radiological Health Handbook*, revised edition. Scinta, Inc. 2421 Homestead Dr., Silver Spring Md. 20902. 1992.
- SIEGEL R, NAISHADHAM D, JERNAL A: Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 62:10-29, 2012.

- SIMONE, P. & VILAMAIOR, L. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural. In: *Biologia*. 53 (8), pp. 946-955, 2009.
- SMITH RA, COKKINIDES V, EYRE HJ, et al.: American Cancer Society guidelines for the early detection of cancer, 2003. *CA Cancer J Clin*, 53: 27–43, 2003.
- SINGH R. and BANDYOPADHYAY D. “MUC-1: A Target Molecule for Cancer Therapy,” *Cancer Biology and Therapy*, Vol. 6, No. 4, p. 481-486, 2007.
- SOARES, J. J. et al. Lista de recomendações do exame PET/CT com  $^{18}\text{F}$ -FDG em oncologia: Consenso entre a Sociedade Brasileira de Cancerologia e a Sociedade Brasileira de Biologia, Medicina Nuclear e Imagem, *Radiol Bras*, São Paulo, v 43, n.4, ago, 2010.
- SONG, S., WANG, L., LI, J., ZHAO, J. & FAN, C. Aptamer based biosensors. *Trends Anal Chem*, 27, 108–117, 2008.
- SROUGI, M. Câncer de Próstata. In: *Nefrologia, Urologia, Clínica*. p. 510, 1998.
- STAMEY T. A., YANG N., HAY A. R., et al.: Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *N Engl J Med*, 317: 909, 1987.
- STEINBERG GD, CATER BS, BEATY TH, et al.: Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate*, 17: 337–347, 1990.
- STOLTENBURG R., REINEMANN C., STREHLITZ B. FluMag-SELEX as an advantageous method for DNA aptamer selection. *Anal. Bioanal. Chem*, v. 383, p. 83–91, 2005.
- STOLTENBURG R., REINEMANN C., STREHLITZ B. SELEX—A (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomolecular Engineering*, v. 24, p. 381–403, 2007.
- TAKÁCS, S., TÁRKÁNYI, F. & QAIM, S.M., Excitation function of  $^{22}\text{Ne}(p, n)^{22}\text{Na}$  reaction: Possibility of production of  $^{22}\text{Na}$  at a small cyclotron, *Appl. Radiat. Isot*, 47, 303–307, 1996.
- TANG Z, SHANGGUAN D, WANG K, et al.: Selection of aptamers for molecular recognition and characterization of cancer cells. *Anal Chem*, 79: 4900-4907, 2007.
- TAUHATA L., SALATI I. P. A., PRINZIO, R. DI, PRINZIO, M. A. R. R. DI. Radioproteção e Dosimetria: Fundamentos – 5ª Ed, agos/2003 – Rio de Janeiro – IRD/CNEN.
- TAVITIAN B, TERRAZZINO S, KUHNAST B, et al. In vivo imaging of oligonucleotides with positron emission tomography. *Nat Med*, 4:467–471, 1998.
- TAYLOR-PAPADIMITRIOU J et al. MUC1 and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1455: 301–313, 1999.

- TECHNICAL INFORMATION BULLETIN. 68Ge/68Ga Generator Comparison. Disponível em: [http://www.ezag.com/fileadmin/ezag/user-uploads/radiopharma/radiopharma/7131-0037\\_Ga68\\_GeneratorInformation\\_Bulletin\\_customers.pdf](http://www.ezag.com/fileadmin/ezag/user-uploads/radiopharma/radiopharma/7131-0037_Ga68_GeneratorInformation_Bulletin_customers.pdf). Acessado em: 26 mar. 2015.
- THEIS MG, KNORRE A, KELLERSCH B, MOELLEKEN J, WIELAND F, KOLANUS W, FAMULOK M. Discriminatory aptamer reveals serum response element transcription regulated by cytohesin-2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Aug 3;101(31):11221-6, 2004.
- THOMPSON, I.M.; PAULER, D.K.; GOODMAN, P.J.; TANGEN, C.M.; LUCIA, M.S.; PARNES, H.L.; MINASIAN, L.M.; FORD, L.G.; LIPPMAN, S.M.; CRAWFORD, E.D.; CROWLEY, J.J.; COLTMAN, C.A., JR. Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level  $\leq$  4.0 ng per milliliter. *N Engl J Med*, 350, 2239–2246, 2004.
- THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. *Medicina Nuclear*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.
- TING, G. et al. Nanotargeted radionuclides for cancer nuclear imaging and internal radiotherapy. *Journal of biomedicine & biotechnology*, v. 2010, 2010.
- TNAP-THE NATIONAL ACADEMIES PRESS. Advancing nuclear medicine through innovation. Committee on State of the Science of Nuclear Medicine. Washington, 2007.
- TOGAMI, NOMOTO M., HIGASHI M., GOTO M., YONEZAWA S., TSUJI T., BATRA S.K., DOUCHI T., Expression of mucin antigens (MUC1 and MUC16) as a prognostic factor for mucinous adenocarcinoma of the uterine cervix. *J Obstet Gynaecol Res*, 36(3):588-597, 2010.
- TOMBELLI S., MINUNNI A., MASCINI A. Analytical applications of aptamers. *Biosens. Bioelectron*, v. 20, p. 2424–2434, 2005.
- TONIN, R. S. *Cintilografia e PET/CT nas neoplasias malignas*, UFRS, Porto Alegre 2011.
- TORRES VIGIL, ADAY I. L. A., DE LIMA L., AND CLEELAND C. S. What Predicts the Quality of Advanced Cancer Care in Latin America? A Look at Five Countries: Argentina, Brazil, Cuba, Mexico, and Peru: *Journal of Pain and Symptom Management*, v. 34, p. 315- 327, 2007.
- TUERK C., GOLD L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, v. 249, p.505-510, 1990.
- TUERK C., MACDOUGAL S., GOLD L. RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency- virus type-1 reverse-transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci.U. S. A.*, v. 89, p. 6988–6992, 1992.

- ULRICH, H et al. In vitro selection of RNA molecules that displace cocaine from the membrane-bound nicotinic acetylcholine receptor. In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, p. 14051-14056, 1998.
- UNB – University of Nebraska Lincoln. Safety Protocol: Na-22. Environmental Health and Safety · (402) 472-4925. Disponível em [http://ehs.unl.edu/sop/SP\\_SOP\\_Na-22.pdf](http://ehs.unl.edu/sop/SP_SOP_Na-22.pdf). Acessado em 10 de abril de 2015.
- VEIEROD MB, LAAKE P, and THELLE DS: Dietary fat intake and risk of prostate cancer: a prospective study of 25,708 Norwegian men. *Int J Cancer* 73: 634–638, 1997.
- VELIKYAN I, BEYER GJ, BERGSTRÖM-PETTERMANN E et al. The importance of high specific radioactivity in the performance of <sup>68</sup>Ga-labeled peptide. *Nucl Med Biol*, 35:529-36., 2008.
- VELIKYAN, I. Synthesis, characterization and application of <sup>68</sup>Ga-labelled macromolecules. 2005. Tese (Doutorado) – Uppsala University, Suécia.
- VESTERGAARD, M.; KERMAN, K.; TAMIYA, E. An Overview of Label-free Electrochemical Protein Sensors. *Sensors*, v.7, p.3442-3458, 2007.
- VILAMAIOR, PSL et al. Collagen fiber reorganization in the rat ventral prostate following androgen deprivation: a possible role for smooth muscle cells. In: *Prostate*. 45 (3), p. 235-238, 2000.
- VLAD A.M., DIACONU I., GANTT K.R., MUC1 in endometriosis and ovarian cancer. *Immunol Res*, 36:229–236, 2006.
- WALLACE S. T., SCHROEDER R. In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibiotics. *RNA*; v. 4, p.112–23, 1998.
- WALLIS M.G., VON AHSEN U., SCHROEDER R., FAMULOK M. A novel RNA motif for neomycin recognition. *Chem. Biol.*, v. 2, p. 543–552, 1995.
- WANG A. Z. and FAROKHZA O. C. Current Progress of Aptamer-Based Molecular Imaging. *J Nucl Med*, March; 55(3): 353–356, 2014.
- WEISS S., PROSKE D., NEUMANN M., GROSCHUP M.H., KRETZSCHMAR H.A., FAMULOK M., WINNACKER E.L. RNA aptamers specifically interact with the prion protein PrP. *J. Virol*, 71:8790–8797, 1997.
- WHITE R., RUSCONI C., SCARDINO E., WOLBERG A., LAWSON J., HOFFMAN M., SULLENGER B. Generation of species cross-reactive aptamers using “toggle” SELEX. *Mol. Ther*, 4:567–573, 2001.

- WHITTEMORE AS, KOLONEL LN, WU AH, et al. Prostate cancer in relation to diet, physical activity, and body size in blacks, whites, and Asians in the United States and Canada. *J Natl Cancer Inst* 87: 652–661, 1995.
- WILLIAMS K. P., LIU X. H., SCHUMACHER T. N., LIN H. Y., AUSIELLO D. A., KIM P. S., BARTEL D. P. Bioactive and nuclease-resistant L-DNA ligand of vasopressin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 94, p. 11285–11290, 1997.
- WILLNER I. & ZAYATS M. Electronic aptamer-based sensors. *Angew Chem Int Ed Engl*, 46(34):6408-18, 2007.
- WILSON, J.M. & JUNGNER, Y.G. Principles and practice of mass screening for disease. *Bol. Oficina Sanit. Panam*, 65, 281–393, 1968.
- WU X, LIANG H, TAN Y, YUAN C, LI S, LI X, LI G, SHI Y, ZHANG X. Cell-SELEX aptamer for highly specific radionuclide molecular imaging of glioblastoma in vivo. *PLoS One*, Mar 6;9(6):e90752, 2014.
- XIAOYU PEI, JUN ZHANG and JIE LIU, Clinical applications of nucleic acid aptamers in cancer (Review). *Molecular and Clinical Oncology* 2: 341-348, 2014.
- XING Y, ZHAO J, CONTI P. S., CHEN K. Radiolabeled Nanoparticles for Multimodality Tumor Imaging. *Theranostics*, 4(3):290-306, 2014.
- YAMAMOTO M, BHARTI A, LI Y & KUFE D: Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta- catenin in cell adhesion. *J Biol Chem* 272(19): 12492-12494, 1997.
- YANG Q., GOLDSTEIN I.J., MEI H.Y., ENGELKE D.R. DNA ligands that bind tightly and selectively to cellobiose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 95, p. 5462– 5467, 1998.
- YOU K. M., LEE S. H., LEE B. S. Aptamers as Funcional Nucleic Acids: In vitro Selection and Biotechnological Applications. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 8, p. 64-75, 2003.
- ZHANG S., ZHANG HS, REUTER VE, et al. Expression of potential target antigens for immunotherapy on primary and metastatic prostate cancers. *Clin Cancer Res*, 4(2):295–302, 1998.
- ZHANG YM, LIU N, ZHU ZH, RUSCKOWSKI M, HNATOWICH DJ. Influence of different chelators (HYNIC, MAG3 and DTPA) on tumor cell accumulation and mouse biodistribution of technetium-99m labeled antisense DNA. *Eur J Nucl Med*, 27:1700–1707, 2000.

- ZHERNOSEKOV, K.P. Radiochemical Aspects of Production and Processing of Radiometals for Preparation of Metalloradiopharmaceuticals. 2006. (Tese Doutorado) - Johannes Gutenberg Universität, Mainz, Alemanha.
- ZHU G, YE M., DONOVAN M. J., SONG E., ZHAO Z AND TAN W. "Nucleic Acid Aptamers: An Emerging Frontier in Cancer Therapy," Chemical Communications (Camb), Vol. 48, No. 85, pp. 10472-10480, 2012.

## ANEXO A

### CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DOS ANIMAIS



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



Parecer nº 001

Pesquisador Responsável: Prof. Ralph Santos Oliveira

Tipo de Pesquisa: Pesquisa.

Instituição onde será desenvolvido: UEGO

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-UEGO