

INSTITUTO DE ENGENHARIA NUCLEAR

Franciana Maria Rosa da Silva

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANO-HIDROXIAPATITA DOPADA COM
HOLMIO-166 PARA TERAPIA DO CÂNCER ÓSSEO.**

**Rio de Janeiro
Maio de 2015**

Franciana Maria Rosa da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Nucleares do Instituto de Engenharia Nuclear 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

RIO DE JANEIRO

2015

SILV Rosa da Silva, Franciana Maria

Desenvolvimento e Avaliação de Nano-hidroxiapatita
Dopada com Holmio-166 para Terapia do Câncer Ósseo. /
Franciana Maria Rosa da Silva – Rio de Janeiro: CNEN/IEN,
2015.

x, 93 f. :il; 31cm

Orientador: Ralph Santos Oliveira

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

1. Nanohidroxiapatita. 2. Nano-radiofármacos. 3. Câncer Ósseo. 4 Nanohidroxiapatita dopada com Hólmio-166. 5 Biodistribuição

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE NANO-HIDROXIAPATITA DOPADA COM
HOLMIO-166 PARA TERAPIA DO CÂNCER ÓSSEO.**

Franciana Maria Rosa da Silva

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA NUCLEARES DO INSTITUTO DE ENGENHARIA NUCLEAR DA COMISSÃO
NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA NUCLEAR

Aprovada por:

Orientador Prof. Dr. Ralph Santos-Oliveira, Ph.D - IEN

Prof. Dr Celso Marcelo Franklin Lapa - IEN

Profa. Dra Maria Angélica Vergara Wasserman - IEN

Profa. Dra. Vania Bucco - IMA/UFRJ

RIO DE JANEIRO, RJ

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, meus irmão, meu marido e amigos.

AGRADECIMENTOS

Ao longo dessa trajetória acadêmica, creio que tudo que alcancei foi devido à fé em Deus, de que tudo daria certo, mesmo quando no meu íntimo, houvesse a preocupação de que meus objetivos não fossem alcançados. Dois anos após iniciar o mestrado, vejo o quanto a força Divina foi essencial e propulsora. Sem Deus, nada disso seria possível.

Agradeço a minha amada mãezinha, Isabel, que tanto lutou por mim e sempre esteve por trás, orando e pedindo a Deus que me protegesse na minha jornada. Por tudo feito em prol da minha educação, do jardim de infância à pós-graduação, obrigada por tudo que você investiu em mim. Obrigada pelo apoio incondicional em cada escolha feita na minha vida. Sem você, eu não seria nada. Te amo, mãe!

Ao meu pai, Francisco, que mesmo dentro de suas limitações fez seu melhor, obrigada, seu Chico, Amo vc!

Ao meu companheiro de vida, meu namorado, marido, amigo, parceiro, Luã. Obrigada pelo carinho, incentivo e paciência que só você poderia me dar! Amo muito vc, cada dia mais!

Aos meu familiares, em especial, meus irmãos André e Franck, que sempre demonstraram o apreço pelo conhecimento e me impulsionaram na busca por minhas aptidões acadêmicas. Ainda me lembro dos dias em que estudávamos física, química e matemática e o quanto sofria nas mãos de vocês! Obrigada por despertarem em mim a necessidade de buscar nos estudos, um ideal de vida;

A minha querida irmã Adriana, obrigada por cada riso e pelos momentos maravilhoso que vivemos, principalmente quando morávamos juntas;

Ao meu orientador Ralph, pelos ensinamentos passados, pela paciência em me orientar, corrigir meus textos e pelas inúmeras dúvidas sanadas. Obrigada pelo apoio e encorajamento!

À Marta Albernaz, por tudo que aprendi, tanto nas reuniões do grupo de pesquisa, nas câmaras técnicas e na Radiofarmácia. Obrigada por me entender e por colocar seu ponto de vista com sua sensatez característica, me possibilitando reflexões valiosas;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Nucleares, pelo conhecimento transmitido e pelo incentivo.

Ao Professor Celso Marcelo, pelo apoio incondicional e por acreditar no meu potencial enquanto mestranda;

Ao professor Júlio Suita, pela amizade e carinho com que sempre fui tratada;

Aos funcionários da Secretaria Acadêmica que sempre me auxiliaram com tamanha eficiência e senso de urgência. À Ana Paula, ao Antônio Sérgio e à D. Cláudia;

Aos bibliotecários Maria Bernarda e Almir, muito obrigada pelos artigos enviados, sempre com pontualidade. Foram muito úteis na confecção deste trabalho;

As minhas queridas amigas da Faculdade de Farmácia da UFRJ, Mariana, Patrícia e Rafaela, pela amizade sincera e às valiosíssimas contribuições e conversas edificantes sobre a vida acadêmica! Obrigada por iluminarem minhas dúvidas e por se mostrarem sempre dispostas em me ajudar! Obrigada, “Amigas do Fundão”!

Aos queridos amigos da turma de mestrado 2013/2015, obrigada pelas segundas e sextas mais divertidas que tivemos! À Carol, Pâmela, Roque, Vieira, Ana Karla, Alexander, Almada, Mário, Deise, Luciana, João, Mauro, Sérgio, Rezende, Ângelo e Luiz!

Em especial, à amiga que tive a sorte de conhecer no dia da prova de seleção: Caroline Mattos, por toda amizade e carinho demonstrados;

Ao amigo Mário que tanto me auxiliou e compartilhou dúvidas e conhecimentos nessa reta final, obrigada pela amizade e pela paciência ao me ouvir e me direcionar;

Ao amigo Júlio, que me auxiliou com seus conhecimentos acerca do projeto desenvolvido;

À aluna de Iniciação Científica, Suyene, pela ajuda imprescindível nos experimentos in vivo;

À Capes e ao CNPQ pelo suporte financeiro da bolsa de mestrado durante a realização da pós-graduação

Aqueles que, por ventura, não citei, perdoem-me o esquecimento.

“ A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma com que nos acostumamos a ver o mundo.” (Albert Einstein).

RESUMO

O desenvolvimento de nano-radiofármacos é uma atividade imprescindível ao progresso da medicina nuclear, e fundamental para o diagnóstico eficaz e precoce de câncer ósseo. Dentre as pesquisas atuais, os nano-radiofármacos podem ser os mais eficazes na detecção de tumores. Entretanto, adversidades no biodirecionamento do tumor, assim como na adesão do nanoradiofármaco no local desejado, mostram-se como os principais problemas na detecção precoce e no tratamento destas células tumorais. As conquistas da nanotecnologia, principalmente na nanomedicina, demonstram contribuições essenciais para que se superem obstáculos fisiológicos, tais como a transposição de barreiras moleculares – através da utilização das nanopartículas. Dessa maneira, o biodirecionamento e o aumento da aderência proporcionam a biodisponibilização do fármaco, possibilitando diagnóstico precoce e tratamento com maior eficácia. Essa dissertação objetiva o desenvolvimento e avaliação da produção, caracterização e uso de nano-hidroxiapatita dopada com Hólmio-166, além de avaliar a biodistribuição, in vivo, de nanopartículas marcadas com o radionuclídeo Tecnécio-99m para a detecção de metástase óssea. A nano-hidroxiapatita foi sintetizada, por precipitação pela via úmida, de Hidroxiapatita dopada com 10% de Hólmio 165. As nano-hidroxiapatitas dopadas foram irradiadas no reator IEAR 1 no IPEN/CNEN, gerando assim o radionuclídeo Hólmio 166, beta e gama emissor. A caracterização das nanopartículas foi realizada pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A marcação com Tecnécio-99m foi pelo método direto, determinado o seu rendimento pela cromatografia em papel, utilizando a fase estacionária papel de *Whatman* nº 1 e para a fase móvel a acetona. No estudo de biodistribuição foram utilizados ratos Wistar saudáveis, que foram sacrificados 2 horas após a administração do nano-radiofármaco e dessecados para contagem dos órgãos no contador gama. O MEV evidenciou que as nanopartículas apresentam forma esférica, com dispersão de tamanho entre 200 a 250 nm.

A marcação das nanopartículas teve um rendimento maior do que 99 %. No estudo de biodistribuição com ratos Wistar saudáveis, foi observado melhora na biodistribuição deste fármaco com diminuição do efeito de primeira passagem, deixando-o mais circulante no sangue, melhora na depuração e diminuição no baço e fígado, menor comprometimento

do sistema imune. O estudo em questão sugere que nano-hidroxiapatita dopada com Hólmio-166 seja seguro e específico para as células metastáticas ósseas.

ABSTRACT

The use of nanotechnology is increasing each day. The application in human health has been one of the most important fields. Regarding this application and some materials, hydroxyapatite is among the one most studied. The affinity of hydroxyapatite for so many body constituents is incredible and his use as nanoparticle opened a totally new world. However, although all the development in the field, encapsulating a nano-hydroxyapatite still been a sensible point until now. In this article we describe a usefully methodology. This new possibility arise new applications, especially for oncology and radiopharmacy, due the possible to link a radionuclide and /or other substances like aptamers to this new nanoparticle, providing this new structure features adjuvant to conventional one.

Key words: nanoradiopharmaceuticals, nanotechnology, oncology, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, holmium-166.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados no biênio 2014/2015 por sexo, exceto pele não melanoma. (FONTE: Inca, 2014).

Figura 2. As interações entre os osteoblastos, osteoclastos e da matriz do osso durante a formação do osso e a reabsorção. Fonte: Adaptado de YIN et al., 2005.

Figura 3. Suposto mecanismo de disseminação das células tumorais para o tecido ósseo. Adaptado de: SELVAGGI; SCAGLIOTTI (2005).

Figura 4. Tomografia da bacia (esquerda) e da coluna lombar (direita) de um paciente portador de metástase de tumor de próstata, onde se evidenciam metástases de características adensantes, sem comprometimento extra-ósseo. (Fonte: <http://www.hsp.epm.br/dorto-onco/livro/tumo12p1.htm>)

Figura 5. Fratura da extremidade proximal da tíbia de uma paciente de 76 anos, portadora de metástase de tumor de mama. (Fonte: <http://www.hsp.epm.br/dorto-onco/livro/tumo12p1.htm>)

Figura 6. O gráfico demonstra o crescimento do Número de artigos publicados na base de dados Web of Science por ano considerando os cruzamentos: “nano* and cancer”, “nano* and neuro*”, “nano* and HIV” e “nano* and cardio*”. (Fonte: Adaptado de Dimer et al., 2013.)

Figura 7. Ilustração esquemática da estrutura cristalina da hidroxiapatita. (Adaptado de Guastaldi A. C et al; 2010).

Figura 8. Espectro experimental da energia das partículas β - do Ho-166 (Fonte: KOREA ATOMIC RESEARCH INSTITUTE - Nuclide Chart).

Figura 9. Aparelhagem utilizada para síntese da Hidroxiapatita, processo ocorrido no Laboratórios de Biomateriais localizado no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

Figura 10. Reator IEA-R1. O IEA-R1 é um reator de pesquisa do tipo piscina, moderado, e refrigerado a água leve, utilizando grafite como refletor. Foi projetado e construído pela empresa norte-americana Babcock & Wilcox, em 1956. Fonte: Ipen, SP.

Figura 11. Marcação direta das nanohidroxiapatitas pelo ^{99m}Tc .

Figura 12. Esquema da avaliação da marcação por CCF.

Figura 13. Injeção da amostra de nanohidroxiapatita marcadas radioativamente por via intraocular. Foram administrados, por via intraocular, 100 μL das amostras marcadas, em ratos.

Figura 14. Retirada dos órgãos dos animais para medição da radioatividade. Após 2 horas da injeção das nanopartículas marcadas radioativamente, os ratos são sacrificados por meio de asfixia.

Figura 15. Contador ParkinElmer 2470 Automatic Gamma Counter. Aparelho utilizado para radiação gama proveniente do ^{99m}Tc .

Figura 16. Imagem obtida pela MEV, mostrando o tamanho de 250 nm da hidroxiapatita dopada com Ho-165 .

Figura 17. Análise EDS mostrando a presença de hólmio na hidroxiapatita. Os pontos em amarelo referem-se ao lantanídeo.

Figura 18 . Gráfico representativo do difratograma por Raios-X da nanoHA sem dopação por Ho165

Figura 19. Difractometria por Raios-X da nanoHa dopada com 10 % de Hólmio165. Observam-se os mesmos picos caracterizados, notando-se uma diferença de densidade de uma substância para outra, tendo em vista que na nanoHAHo há um percentual inferior de cálcio e uma quantidade superior de Ho165 quando comparada a nanoHA em sua estrutura

Figura 20. FT-IR da nanohidroxiapatita evidenciando presença de grupos fosfatos.

Figura 21. Gráfico do Perfil de Biodistribuição em porcentagem dose de radiação Gama/órgão das nanoHA dopadas com Hólmio 165, marcadas com ^{99m}Tc . A nanopartícula demonstrou um metabolismo hepático baixo com um grande valor expresso para a barra referente à sangue (punção sanguínea ou blood pool), demonstrando a alta afinidade por proteínas do sangue, especialmente albumina.

Figura 22. Gráfico da Biodistribuição em porcentagem de dose de radiação Gama/tecido (g). A nanopartícula mostrou uma grande atração para o rim e não em termos de depuração, uma vez que é reabsorvido e ainda em circulação, como pode ser visto com a porcentagem de coração.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária. (Inca, 2014).

Tabela 2. As características físico-químicas do Ho-165. (Fonte: Valente, 2010).

Tabela 3. Propriedades físico-químicas do elemento terra-rara Hólmio.(Fonte:Valente, 2010)

Tabela 4. Energias Máximas e Médias das radiações (β). (Fonte: Valente, 2010)

Tabela 5. Análise EDS demonstrando a presença de Hólmio-165 e seu percentual na amostra de Hidroxiapatita.

Tabela 6. O processo de marcação obteve um percentual de mais de 99% de ligação com o ^{99m}Tc . A estabilidade do processo de marcação de nanohidroxiapatita com ^{99m}Tc foi testado durante 24 horas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALP – Fosfatase Alcalina
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BF's – Bifosfonados
BMP's - proteínas morfogenéticas do osso
Ca – Cálcio
 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - Nitrato de Cálcio
CBPF – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas
CCF – Cromatografia de Camada Fina
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
Ci – Currie
cm - centímetro
 cm^2 – centímetro quadrado
CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear
 CuK_α - radiação
DDS – Drug's Delivery System
DNA – Ácido Desoxirribonucléico
Dy - Disprósio
EDS - Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X
Emax – Energia Máxima
Emed- Energia Média
eV – elétron-volt
F – Flúor
FDA – Food and Drugs administration
FT-IR - Infravermelho com Transformada de Fourier
g – Grama
GBq - gigabecquerel
HA – Hidroxiapatita
HCl – ácido clorídrico
HIV - Human Immunodeficiency Virus
 $\text{Ho}(\text{NO}_3)_3$ – Nitrato de Hólmio
 Ho^{165} – Hólmio 165
Ho-165 – Hólmio 165
 Ho^{166} – Hólmio 166
Ho-166 – Hólmio 166
 HoCl_3 – Cloreto de Hólmio
 HoF_3 – Fluoreto de Hólmio
h – hora
IEA-R1 – Reator Nuclear tipo IEA-R1 presente no IPEN
IEN – Instituto de Engenharia Nuclear
IL – Interleucina
INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas
KeV – Kiloelétron-volt
kV – quilovolt
LHRH - Hormônio liberador do hormônio luteinizante
mA – Miliampère
MeV – megaelétron-volt
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
mg – miligrama
min – minuto
mL – mililitros
MO – metástase óssea
MRI – Imagens de Ressonância Magnética
N&N – Nanociência e Nanotecnologia
n° – número
nanoHA – nanohidroxiapatita
nanoHAHo – nanohidroxiapatita dopada com Hólmio-165
NH₄OH - hidróxido de amônio
nm – nanômetro
OH⁻ - Hidroxila
OPG – Osteoprotegerina
P – Fósforo
PET – Tomografia por Emissão de Pósitrons
pH – Potencial Hidrogeniônico
PLA - poli(ácido láctico)
PLGA - poli(L- ácido láctico-co-ácido glicólico)
PO₄⁻² – Íon Fosfato
RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
RPM – Rotações por minuto
SP – São Paulo
T_{1/2} - Tempo de meia-vida
T3 – triiodotironina
T4 – tetraiodotironina também conhecido por tiroxina
TC – Tumografia Computadorizada
TGF- β – fator de crescimento semelhante à insulina ou *insulin-like growth factor*
uL – microlitros
XRD – Difractometria por Raios-X
 α – partícula alfa
 β – partícula beta
 γ – Radiação Gama
% - porcentagem
% ID/ g – Percentual Dose por tecido (g)

% ID/ órgão – Percentual Dose por órgão

(NH₄)HPO₄ - Hidrogenofosfato de amônio

°C – grau Celsius

18-FDG – 18-fluorodeoxiglicose

^{99m}Tc – Tecnésio 99 m

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Câncer e sua incidência	20
1.2 Tecido Ósseo e Metástase Óssea	22
1.3 Câncer de Próstata e as Metástases Ósseas	27
1.4 Câncer de Mama e as Metástases Ósseas	29
1.5 Diagnóstico das Metástases Ósseas	30
1.6 Tratamento Medicamentoso em Metástases Ósseas	32
1.7 Nanotecnologia.....	34
1.7.1 Principais sistemas de distribuição e liberação controlada de fármacos.....	36
1.8 Hidroxiapatita	39
1.8.1 Síntese de Hidroxiapatita	40
1.9 Radiofármacos	42
1.10 Desenvolvimento de Nano-radiofármacos	45
1.11 Hólmio	46
1.12 Ativação Neutrônica.....	49
2. OBJETIVO	51
2.1 Objetivo Geral.....	51
2.2 Objetivo Específico	51
3. MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1 Materiais Utilizados	52
3.2 Equipamentos e Instrumentos	52
3.3 Produção de Nanohidroxiapatita.....	52
3.4 Nanohidroxiapatita dopada com Hólmio-165	53
3.5 Irradiação das Nanohidroxiapatitas dopadas com Hólmio-165	54
3.6 Técnicas de Caracterização da Nanohidroxiapatita	55
3.6.1 Difratometria de Raios X	55
3.6.2 Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier.....	55
3.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS).....	56

3.7 Biodistribuição	56
3.7.1 Seleção animal	57
3.7.2 Processo de Marcação das nanoHA com Técnico-99m	57
3.7.3 Administração	60
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS).....	62
4.3 Difractometria de Raios X.....	63
4.4 Irradiação	65
4.5 Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).....	66
4.6 Processo de Marcação e Biodistribuição	67
4.7 Biodistribuição	67
5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
7. ANEXOS	79
7.1 Ofício da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	80
7.2 Anexo I – Artigo Científico	81

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer e sua incidência

O câncer é uma das doenças que mais preocupam especialistas no mundo todo, principalmente em função da ausência de tratamento efetivo que possibilite 100% de cura para o paciente (ARAÚJO, 2010). A denominação câncer é dada a um conjunto de doenças que apresentam em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do organismo. Estas células têm um padrão de divisão e multiplicação celular acelerado e desordenado, dotando-as de uma agressividade intrínseca ¹(Inca, 2011).



O mecanismo causador das mutações que dão origem à carcinogênese (alteração do mecanismo de regulação, proliferação e diferenciação celular) não está completamente elucidado, porém sabe-se que agentes físicos, químicos, biológicos (vírus), meio ambiente e a genética são fatores capazes de influenciar no processo de desenvolvimento dos cânceres (ARAÚJO, 2010). Os diferentes tipos de cânceres correspondem aos vários tipos de células do corpo (BRASIL, 2011).

Demais aspectos diferenciadores para os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir órgãos e tecidos vizinhos ou afastados (metástases) (BRASIL, 2011). Na fase carcinogênica, as células neoplásicas adquirem a habilidade de se desprender do foco tumoral e migram. Dessa forma, invadem inicialmente os tecidos adjacentes, podendo adentrar o interior de vasos sanguíneos ou linfáticos e, através desses, disseminar-se, atingindo órgãos distantes da origem tumoral, formando as metástases. (MELO et al., 2013).

As projeções em torno do câncer na população mundial tendem a aumentar nos próximos anos, tendo em vista o aumento da expectativa de vida da população. No Brasil, as estimativas para os anos 2014 e 2015, feitas pelo Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Inca) é de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer no

¹ N. A: Um tumor benigno traduz-se em uma massa localizada de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original – o que constitui um risco de vida mais raro.

Brasil, incluindo os casos de pele não melanoma, que é o tipo mais incidente para ambos os sexos (182 mil casos novos), seguido de próstata (69 mil), mama feminina (75 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil). (Inca, 2014)

Localização primária	casos novos	%	Homens	Mulheres	Localização primária	casos novos	%
Próstata	68.800	22,8%			Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados no biênio 2014/2015 por sexo, exceto pele não melanoma. (FONTE: Inca, 2014).

Tais dados evidenciam alterações no perfil demográfico brasileiro na última década, conhecido por envelhecimento da população que, junto com a transformação nas relações entre os indivíduos e seu meio, mostrou uma mudança expressiva no perfil de morbimortalidade, diminuindo a ocorrência das doenças infectocontagiosas e enfatizando as doenças crônico-degenerativas como novo centro de atenção dos problemas de doença e morte da sociedade brasileira (Inca, 2014). A magnitude da epidemia de câncer no Brasil, levou a inserção de controle do câncer entre os Objetivos Estratégicos do Ministério da Saúde para o período 2011-2015; destacando-se as ações de redução da prevalência do tabagismo e de ampliação de acesso, diagnóstico e tratamento em tempo oportuno dos cânceres de mama e do colo do útero, assim como a publicação da nova Política Nacional de Prevenção e Controle de Câncer na Rede de Atenção às Pessoas com Doenças Crônicas. (Inca, 2014).

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estados		Capitais		Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	68.800	70,42	17.540	82,93	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	57.120	56,09	19.170	80,67
Colo do Útero	-	-	-	-	15.590	15,33	4.530	19,20
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	16,79	4.000	18,93	10.930	10,75	3.080	13,06
Cólon e Reto	15.070	15,44	4.860	22,91	17.530	17,24	5.650	23,82
Estômago	12.870	13,19	2.770	13,07	7.520	7,41	2.010	8,44
Cavidade Oral	11.280	11,54	2.220	10,40	4.010	3,92	1.050	4,32
Laringe	6.870	7,03	1.460	6,99	770	0,75	370	1,26
Bexiga	6.750	6,89	1.910	8,91	2.190	2,15	730	2,97
Esôfago	8.010	8,18	1.460	6,76	2.770	2,70	540	0,00
Ovário	-	-	-	-	5.680	5,58	2.270	9,62
Linfoma de Hodgkin	1.300	1,28	410	5,72	880	0,83	420	8,64
Linfoma não Hodgkin	4.940	5,04	1.490	6,87	4.850	4,77	1.680	7,06
Glândula Tireoide	1.150	1,15	470	1,76	8.050	7,91	2.160	9,08
Sistema Nervoso Central	4.960	5,07	1.240	5,81	4.130	4,05	1.370	5,81
Leucemias	5.050	5,20	1.250	5,78	4.320	4,24	1.250	5,15
Corpo do Útero	-	-	-	-	5.900	5,79	2.690	11,24
Pele Melanoma	2.960	3,03	950	4,33	2.930	2,85	1.150	4,57
Outras Localizações	37.520	38,40	9.070	42,86	35.350	34,73	8.590	36,49
Subtotal	203.930	208,77	51.100	241,30	190.520	187,13	58.710	248,46
Pele não Melanoma	98.420	100,75	19.650	92,72	83.710	82,24	22.540	95,26
Todas as Neoplasias	302.350	309,53	70.750	334,08	274.230	269,35	81.250	343,85

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Tabela 1. Estimativas para o ano de 2014 das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e do número de casos novos de câncer, segundo sexo e localização primária. (Inca, 2014).

1.2 Tecido Ósseo e Metástase Óssea

Dureza e rigidez definem o tecido ósseo humano, características intrínsecas a um tecido de sustentação. Este tecido abrange uma matriz mineralizada formada por sais minerais inorgânicos. A parte mineralizada deposita-se em uma matriz não mineralizada de glicosaminoglicanas e colágeno, inserindo-se nesse meio os osteoblastos (células sustentadoras) e osteoclastos (remodeladoras) (STEVENS & LOWE, 2001).

A absorção e reabsorção óssea são processos cruciais para o desenvolvimento, homeostase, processos de recuperação em doenças e metástase do tecido ósseo. O processo de formação de osso (osteogênese) envolve três passos principais: produção da matriz orgânica extracelular (osteóide); mineralização da matriz para formar o osso; e remodelação óssea por reabsorção e reforma. (YIN et al., 2005)

Há duas categorias de fatores envolvidos na formação e reabsorção dos ossos: hormônios sistêmicos, fatores que incluem o hormônio paratiróide, 1,25-dihidroxitamina D3, tiroxina (T4), prostaglandinas e fatores locais, como as proteínas

morfogenéticas do osso (BMPs), TGF- β , insulin-like growth factor (fator de crescimento semelhante à Insulina -IGF), interleucina (IL)-1, IL-6. (YIN et al., 2005)

As atividades celulares dos osteócitos, osteoblastos e osteoclastos são essenciais no processo de formação dos ossos e reabsorção óssea. Os osteoblastos sintetizam os precursores colagenosos da matriz óssea e também regulam a sua mineralização. Como o processo de formação óssea progride, os osteoblastos tendem a se localizar nas lacunas inseridas na matriz mineralizada e são então chamados osteócitos (Roodman GD, 2004; FIDLER, 2003).

O processo celular de ocupação dos canalículos, pelos osteócitos, permite a circulação de fluidos pelo tecido ósseo. Para atender às exigências do crescimento do esqueleto e da função mecânica, o osso sofre remodelação dinâmica por um processo de acoplamento de reabsorção por osteoclastos e por reposição, pelos osteoblastos. As lesões ósseas são formadas quando a regulação da massa óssea (que é mantida por um equilíbrio entre os osteoblastos e osteoclastos) é alterado. As interações moleculares entre os osteoblastos e osteoclastos durante os processos de formação de osso e reabsorção são compreendidos em nível molecular entre os osteoblastos e os osteoclastos, que é de RANK e RANKL (Fig. 2). RANK é um receptor transmembrana expresso em células precursoras de osteoclastos, enquanto que RANKL é expresso pelos osteoblastos, os quais, após ligação a RANK, levar a formação de osteoclastos. Este processo pode ser interrompido por osteoprotegerina(OPG), um receptor charmariz competitiva solúvel para RANKL, o qual pode ser segregada pelas células do estroma, linfócitos B, as células dendríticas e os osteoblastos (Hofbauer LC et al., 2000). Este *crosstalk* também parece ser o mecanismo subjacente a resposta do osso para alguns

hormônios ou fatores locais, incluindo paratireóide hormonal, 1,25-di-hidroxivitamina D3, o estrogênio, IL-11 e prostaglandina E2 (Roodman GD, 2004; YIN et al., 2005).

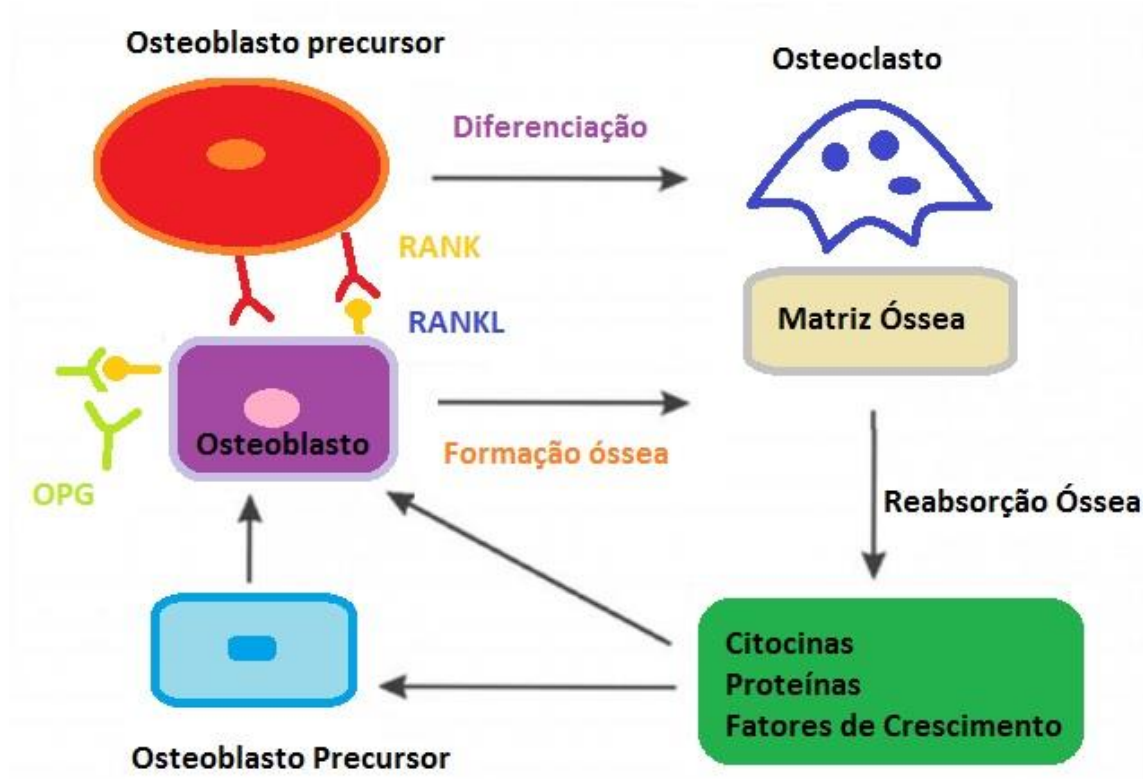


Figura 2. As interações entre os osteoblastos, osteoclastos e da matriz do osso durante a formação do osso e a reabsorção. Fonte: Adaptado de YIN et al., 2005.

Metástase

A palavra “metástase” é empregada desde os primórdios da medicina ocidental. “*Meta*” significa *além* e “*stasis*”, *parar*, numa clara referência a não interrupção do processo de divisão celular (MEOHAS W, et al, 2005). Do ponto de vista fisiológico, a metástase não é um processo biologicamente eficiente. Dados experimentais apontam que, após aplicação intravenosa de células tumorais com altíssimo potencial de metástase, somente um baixo percentual (0,01%) das células aplicadas conseguirá formar um foco tumoral (MEOHAS W, et al, 2005).

As metástases ósseas provêm da disseminação, à distância, de um tumor, com invasão do tecido ósseo. Esta patologia caracteriza-se habitualmente por dor intratável com as medidas convencionais. Considera-se que todos os tipos de tumores podem desenvolver metástases ósseas, incluindo tumores hematológicos. Dentre os tipos de tumores que mais proporcionam metástase óssea (MO), destacam-se os tumores da

mama, do pulmão e da próstata. A área mais atingida são os ossos da coluna vertebral, ainda que, qualquer osso longo do esqueleto apendicular e calota craniana possa ser atingido. (MEOHAS W, et al; FALLAHI B, et al). A metástase óssea é responsável por mais de 99% dos tumores malignos que acometem o osso,. (MEOHAS , et al, 2005).

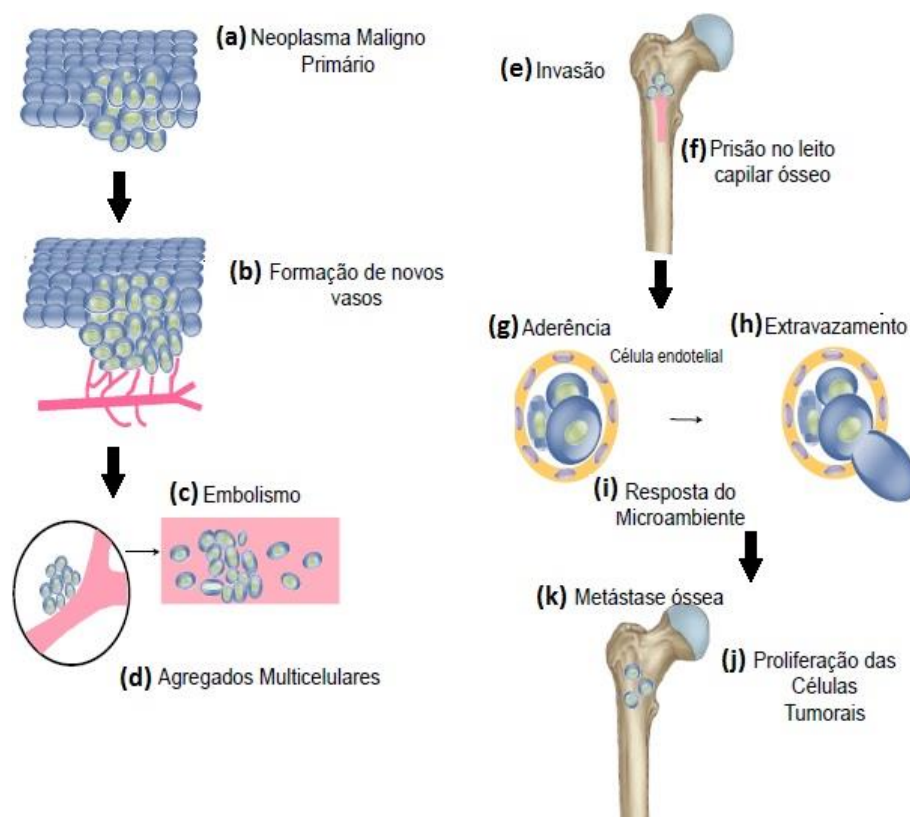


Figura 3. Suposto mecanismo de disseminação das células tumorais para o tecido ósseo. Adaptado de: SELVAGGI; SCAGLIOTTI (2005).

Classifica-se o câncer ósseo em duas vertentes (primária e secundária) em função da área óssea e do tipo de tecido adjacente afetado, bem como em função do tipo celular que constitui o tumor ósseo (ARAÚJO, 2010; TEIXEIRA et al., 2009).

O câncer ósseo primário é o que se origina no osso, desenvolvendo-se no mesmo, porém, apresenta na maioria dos casos, caráter benigno, uma vez que não oferece risco à vida do paciente. O tipo secundário é o que não se origina no osso, mas se desenvolve no osso a partir de uma metástase, geralmente apresentando malignidade (ARAÚJO, 2010, TEIXEIRA et al., 2009).

A disseminação metastática mostra-se semelhante em todos os tipos tumorais, e suas etapas relevantes são a angiogênese, a existência de células tumorais com fenótipo invasivo e com maior velocidade de crescimento, a oncogênese, a capacidade de sobreviver à circulação sanguínea, a adesão da célula tumoral ao tecido-alvo, extravasamento e crescimento celular na localização secundária, angiogênese no foco metastático e o bloqueio da resposta imune hospedeira (ARAÚJO, 2010; MEOHAS et al., 2005, TEIXEIRA et al., 2009).

Os tipos de câncer que possuem tropismo pelo tecido ósseo, são exemplos específicos de observação mais geral, onde os tumores primários mostram padrões de especificidade por determinados órgãos para a formação de metástases. Em 1889, Stephen Paget estabeleceu a hipótese de “semente e solo”, na qual sugere que a interação entre as propriedades das células cancerígenas e o microambiente do órgão em particular determinam vantagens seletivas para o crescimento dessas células (PAGET, 1889).

Mais especificamente, a habilidade para a sobrevivência das células, a expansão clonal e o recrutamento de suprimento de sangue são fatores esperados para a determinação de uma metástase bem sucedida. Outros fatores que podem influenciar na metástase de um determinado sítio específico são: as considerações anatômicas como padrões de fluxo sanguíneo a partir do tumor primário e o tropismo de células cancerígenas por determinados tecidos. Esse tropismo é provavelmente regulado por fatores quimioatrativos e moléculas de adesão que são produzidas pelos órgãos alvo em combinação com receptores apropriados expressos nas células tumorais. Uma consideração importante no entendimento da metástase óssea é sua composição única de “solo” que neste caso é representado pelo microambiente ósseo. O osso é um órgão dinâmico composto de células de várias origens embrionárias incluindo células hematopoiéticas, estromais, endoteliais e outros tipos de células (YIN; POLLOCK; KELLY, 2005).

O processo metastático do tecido ósseo relaciona-se ao aumento da morbidade dos pacientes (como fraturas patológicas, aparecimento de dor, hipercalcemia, limitação da mobilidade, compressão de estruturas nervosas, ou supressão da função da medula óssea). A dor é o sintoma mais frequentemente das metástases ósseas, podendo

relacionar-se a diferentes mecanismos como reabsorção osteoclástica mediada pelas citocinas, ativação de receptores dolorosos por prostaglandinas ou compressão de estruturas nervosas (DEFINO et al., 2001).

1.3 Câncer de Próstata e as Metástases Ósseas

O câncer de próstata é a neoplasia maligna mais recorrente entre os homens brasileiros, depois do câncer de pele não-melanoma (MIGOWSKI; SILVA, 2010). O diagnóstico da doença muitas vezes acontece quando o câncer prostático já se disseminou para outros órgãos, dificultando seu tratamento. Nos estágios iniciais, o câncer limita-se à próstata, contudo, se sem tratamento, poderá invadir órgãos próximos como vesículas seminais, uretra e bexiga, bem como espalhar-se para órgãos distantes como ossos, fígado e pulmões (TONON; SCHOFFEN, 2009). O sítio majoritário de disseminação hematogênica do câncer de próstata é o osso. As metástases ósseas indicam claramente um fator de mau prognóstico. Dos pacientes com câncer de próstata que desenvolvem metástase, 50% morrem dentro de 30 meses (em média). Na autópsia dos pacientes que morreram de câncer avançado de próstata, as metástases ósseas estavam presentes entre 80% - 90% dos casos (ABREU et al., 2005).

Os critérios de escolha do tratamento correto para o câncer de próstata baseiam-se principalmente na relação entre estágio da doença e idade do paciente após discutir possíveis riscos e benefícios. Em geral é realizado prostatectomia radical, radioterapia, quimioterapia, braquiterapia e terapia hormonal (SANTOS; SILVA; PACHECO, 2010).

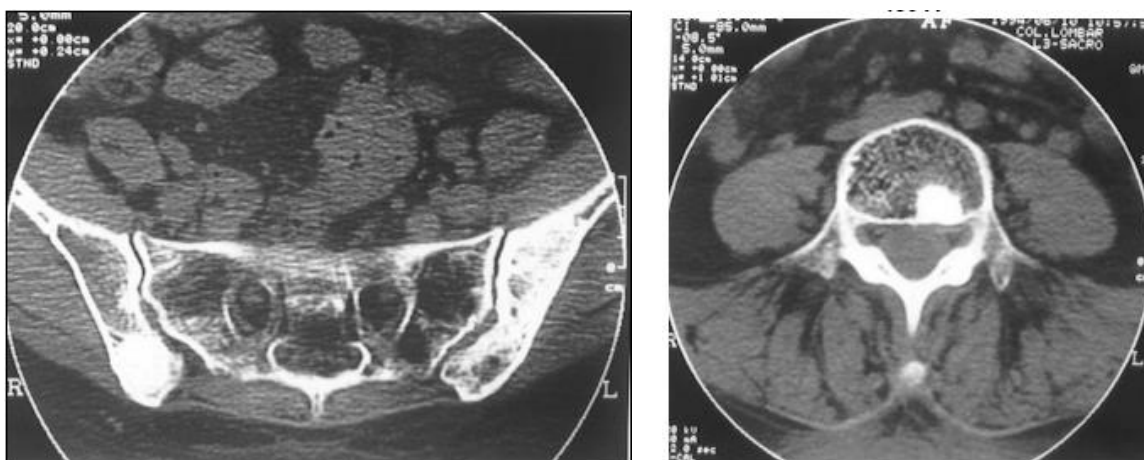


Figura 4. Tomografia da bacia (esquerda) e da coluna lombar (direita) de um paciente portador de metástase de tumor de próstata, onde se evidenciam metástases de características adensantes, sem comprometimento extra-ósseo. (Fonte: <http://www.hsp.epm.br/dorto-onco/livro/tumo12p1.htm>)

A hormonoterapia é o tratamento mais indicado nos casos de Câncer de Próstata Metastásico. O tratamento consiste no emprego de medicamentos à base de hormônios (estrógenos, análogos da LHRH e antiandrógenos), que impedem a produção de testosterona ou bloqueiam as suas ações na próstata. A orquiectomia, também é utilizada como hormonoterapia, já que elimina os órgãos que produzem o hormônio masculino, este apontado como principal responsável pelo crescimento do tumor (TONON; SCHOFFEN, 2009).

1.4 Câncer de Mama e as Metástases Ósseas

O câncer de mama é a principal causa de morte em mulheres brasileiras, por câncer. Ainda que a grande maioria das pacientes se apresente com doença localizada, em até 50 % dos casos, a doença evolui com metástases (SAAD et al., 2002). O carcinoma da mama é a neoplasia que apresenta a maior frequência de metástases ósseas, cujos relatos variam de 38,6 a 49,6%, (DEFINO et al., 2001).

O carcinoma da mama é o tipo de tumor que apresenta a maior frequência de metástases ósseas, e existem evidências de que os tumores bem diferenciados e os com receptores de estrógeno positivos, possuem os maiores índices de metástase óssea. O padrão lítico de lesão predomina, refletindo o resultado final da interação das células tumorais e o tecido ósseo. Essa interação tem sido alvo de muitos estudos, tendo sido descrito vários fatores humorais secretados pelas células do tumor, que são capazes de estimular ou inibir os osteoblastos ou osteoclastos, de modo que a atividade final dessas células determine o padrão lítico ou blástico das lesões (DEFINO et al., 2001, CHOWN, 2013). A coluna vertebral permanece como a o alvoma mais frequente de metástases dos tumores, em função das características da circulação sanguínea. A localização é preferencialmente metafisária, com afinidade pelo fêmur e úmero, por conta da medula óssea vermelha edos corpos vertebrais (DEFINO et al., 2001; CHOWN, 2013).



Figura 5. Fratura da extremidade proximal da tíbia de uma paciente de 76 anos, portadora de metástase de tumor de mama. (Fonte:<http://www.hsp.epm.br/dorto-onco/livro/tumo12p1.htm>)

O medicamento utilizado para tratamento de câncer de mama metastático baseia-se no uso de tamoxifeno. Após cirurgia, o tamoxifeno está associado a um ganho significativo, tanto em sobrevida livre de doença, quanto em sobrevida global, para as mulheres com tumores que apresentam receptores hormonais positivos ou desconhecidos. Inibidores da aromatase de terceira geração exemplificam esta estratégia (SAAD et al., 2002). Pesquisas demonstram pior prognóstico em homens, devido a eventuais diferenças nos padrões de metástase e na agressividade biológica. Não há consenso quanto a este pensamento: o pior prognóstico em homens poderia ser atribuído ao diagnóstico tardio, com apresentação da doença em estágios avançados, estadiamento inapropriado e a idade elevada no momento do diagnóstico, associada muitas vezes à comorbidades importantes (GARCIA et al., 2009).

1.5 Diagnóstico das Metástases Ósseas

O diagnóstico da metástase óssea é fundamentado em pelo menos algum dos sintomas e sinais como dor, hipercalcemia e fraturas patológicas, associado com valores séricos anormais de fosfatase alcalina e cálcio e, por conseguinte, com dados de imagens de cintilografia óssea, raios X, scans de tomografia computadorizada e estudos de imagens de ressonância magnética. O estadiamento clínico compreende testes laboratoriais como dosagem hormonal (ex.: Paratormônio), dosagem de enzimas (ex.: Desidrogenase Láctica, Fosfatase Alcalina, Fosfatase Ácida) dosagem de eletrólitos (ex.: sódio, potássio, cálcio, fósforo, magnésio), dosagem de Imunoglobulinas, dosagem de marcadores tumorais específicos (ex.: Antígeno Prostático específico, Antígeno Carcinoembrionário), de proteínas específicas (ex.: Bence-Jones) e hemograma completo (MEOHAS et al., 2005). Um painel básico de triagem inclui a contagem completa de células sanguíneas, com plaquetas, para a avaliação da anemia e mielossupressão, cálcio sérico, fósforo e níveis de fosfatase alcalina (ALP) para identificar marcadores de remodelação óssea e avaliar a hipercalcemia. Testes mais específicos incluem o nível de hormônio da paratireoide, para avaliar a doença metabólica óssea. O ALP é elevado na maioria dos casos, mas níveis normais não excluem a presença de doença óssea. (SELVAGGI; SCAGLIOTTI, 2005). Contudo, a dor é o principal sintoma, podendo ser

acompanhada de aumento de volume local e/ou fratura patológica. É importante ressaltar, que muitas vezes, a lesão, pode evoluir de maneira assintomática e apenas se mostrar em vigência de edema local ou fratura patológica, muitas vezes confundido com trombose venosa.

A cintilografia óssea utilizando compostos difosfonados marcados com Tc99m é o método mais usado na detecção e seguimento das metástases do esqueleto. Áreas de concentração aumentada do radiotraçador na cintilografia óssea são consideradas metástases se existirem dúvidas acerca desta concentração anormal do radiofármaco. Exames radiológicos complementares são realizados para afastar doenças benignas (ABREU et al., 2005). A cintilografia óssea usando o radionuclídeo ^{99m}Tc é altamente sensível, mas geralmente apresenta baixa especificidade, que se baseia na detecção de uma reação osteoblástica que sugere a presença de danos no osso. A percepção clínica difundida é que a cintilografia óssea deve ser realizada somente na presença de dor óssea, ou níveis elevados de ALP no sangue ou níveis de cálcio, ou, se necessário, de acordo com protocolos clínicos (SELVAGGI; SCAGLIOTTI, 2005).

A radiografia é uma técnica rápida, barata e prontamente disponível para a avaliação de metástases ósseas. Radiografias dão a melhor integração do alinhamento e da estrutura óssea em geral. Radiografias planas devem ser o primeiro teste para a avaliação de dor óssea. Porém, lesões metastáticas podem não aparecer em raios X por vários meses (SELVAGGI; SCAGLIOTTI, 2005).

A tomografia computadorizada e as imagens de ressonância magnética podem contribuir com informações adicionais, quando direcionada por sinais clínicos ou por focos de captação na varredura do osso (SELVAGGI; SCAGLIOTTI, 2005).

As imagens de ressonância magnética são necessárias para diagnóstico de compressão da medula espinhal e também podem ser úteis em imagens da medula óssea para avaliar o envolvimento pelo tumor. A MRI pode fornecer imagens detalhadas da medula óssea e do osso (SELVAGGI; SCAGLIOTTI, 2005).

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) É uma relativa técnica nova para avaliação não invasiva de várias vias metabólicas. É baseada na captação preferencial de 18-fluorodeoxiglicose (18-FDG) pelas células tumorais devido a seu maior metabolismo de glicose. Por isso, o PET detecta a presença do tumor diretamente por

quantificação da atividade metabólica. A captação esquelética do pósitron emissor de fluoreto F-18 é baseada na troca de íons hidroxila no cristal de hidroxiapatita. Assim, a captação de fluoreto F-18 é um indicador de mineralização óssea. (SELVAGGI; SCAGLIOTTI, 2005; SCHIRRMESTER, 2007).

Estima-se que as metástases ósseas se tornam visíveis em radiografias planas depois de 30 a 50% de perda mineral óssea. A formação secundária de osso também ocorre como resposta a destruição osteolítica. Consequentemente, mesmo metástases ósseas osteolíticas podem ser detectadas com cintilografia óssea vários meses antes de sua manifestação em radiografias planas. A cintilografia óssea não é perfeita na detecção de metástases ósseas, entretanto, estudos comparativos com imagens por ressonância magnética (MRI) revelaram significativamente mais metástases vertebrais não detectadas na cintilografia óssea planar convencional. No entanto, a cintilografia óssea convencional permanece a técnica mais adequada de screening de corpo inteiro, devido ao fato de imagens de ressonância magnética (MRI) de corpo inteiro não serem práticas atualmente para a rotina de pesquisas de corpo inteiro e, sua sensibilidade em detectar metástases extra vertebrais não é ainda suficientemente avaliada (SCHIRRMESTER, 2007).

1.6 Tratamento Medicamentoso em Metástases Ósseas

Embora atualmente existam muitas controvérsias a respeito da detecção e do manuseio, tanto da doença localizada como da metastática, o estadiamento clínico é importante para garantir que o paciente tenha a modalidade terapêutica mais adequada para o seu caso. O aspecto mais importante do estadiamento é a detecção de metástases e os métodos não invasivos são de grande importância na detecção dessas lesões. A cintilografia óssea utilizando compostos difosfonados marcados com Tc99m é o método mais usado na detecção e seguimento das metástases do esqueleto. Áreas de concentração aumentada do radiotraçador na cintilografia óssea são consideradas metástases; se existirem dúvidas acerca desta concentração anormal do radiofármaco, exames radiológicos complementares são realizados para afastar doenças benignas (ABREU et al., 2005).

Rigaud et al. (2002) descreveram o valor da cintilografia óssea considerando a distribuição das metástases no esqueleto; eles estudaram 86 pacientes com câncer de próstata e metástases ósseas submetidos a terapia de deprivação androgênica como monoterapia e os classificaram de acordo com os locais de predominância das metástases na cintilografia óssea. Encontraram que pacientes com metástases axiais (coluna, pelve e crânio) têm melhor prognóstico que os com metástases apendiculares (arcos costais e membros). Pacientes com câncer e aumentado a prevalência de casos convivendo com metástases ósseas (MO). Isso torna o controle das MO fator essencial na melhora da qualidade de vida, no controle da dor e na manutenção da independência do paciente (TEIXEIRA et al., 2009). Após mais de três décadas de pesquisas e desenvolvimento, os bisfosfonatos (BFs) tornaram-se indispensáveis no tratamento de doenças ósseas, tanto benignas quanto malignas. Essas drogas são potentes inibidores da reabsorção óssea mediada por osteoclastos e são efetivas na redução das concentrações de cálcio no soro de pacientes com hipercalcemia maligna. Os mecanismos pelos quais os BFs atuam na reabsorção óssea em nível celular envolvem provavelmente a inibição da formação e/ou recrutamento de osteoclastos a partir de células precursoras imaturas, inibição da ativação de osteoclastos, inibição da atividade de osteoclastos maduros / ou indução de apoptose. (VASCONCELLOS; DUARTE; MAIA, 2004).

1.7 Nanotecnologia

A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar que tem avançado rapidamente nos últimos anos, encontrando aplicações nas mais diversas áreas, desde setores de energia e eletrônica até a indústria farmacêutica. (Duran et al., 2006).

Na área médica, a European Medicines Agency define a nanotecnologia como o uso de estruturas menores de 1.000 nanômetros (nm) de diâmetro que são projetadas para apresentar propriedades específicas (Dimer et al., 2013)

Nos setores de nanotecnologia farmacêutica e de nanomedicina, os esforços em pesquisa e desenvolvimento objetivam desenvolver nanomedicamentos para oferecerem vantagens em relação aos seus homólogos na forma bulk, principalmente pelo seu tamanho, ou seja, pelo incremento no aumento da área de superfície em relação ao seu volume. Nesse sentido, diferentes nanopartículas estão em desenvolvimento, tanto para diagnóstico, como terapia, sendo que a tendência mais recente é o uso combinado dessas funções a partir dos dispositivos “teranósticos”(Lammers et al.; 2011).

A versatilidade dessas estruturas baseadas em nanomateriais advém da possibilidade de incorporação de vários tipos de moléculas na superfície de uma única nanopartícula, fazendo com que desempenhem múltiplas funções (Lammers et al.; 2011).

A nanomedicina pode ser considerada um refinamento da medicina molecular, integrando inovações em genômica e proteômica para uma medicina ainda mais personalizada, isto é, estudando caso a caso, do diagnóstico precoce até o tratamento pontual, minimizando os riscos para o organismo do paciente (Lammers et al.; 2011).

A importância da nanotecnologia tem atraído a atenção da comunidade mundial, em função de suas diversas aplicações nos setores industrial, farmacêutico, alimentício dentre outros. O princípio dessa ciência é que os materiais na escala nanométrica podem apresentar propriedades físico-químicas, químicas e comportamentais diferentes daquelas apresentadas em escalas maiores. Essas propriedades dos nanomateriais já estão sendo exploradas industrialmente com a fabricação de cosméticos, medicamentos, tintas, catalisadores, revestimentos, entre outros (LIU et al, 2007).

Os estudos em N&N crescem exponencialmente na virada do século XXI, sendo que a partir de 2005, se observa um maior destaque para as aplicações relativas ao câncer. (Dimer et al., 2013).

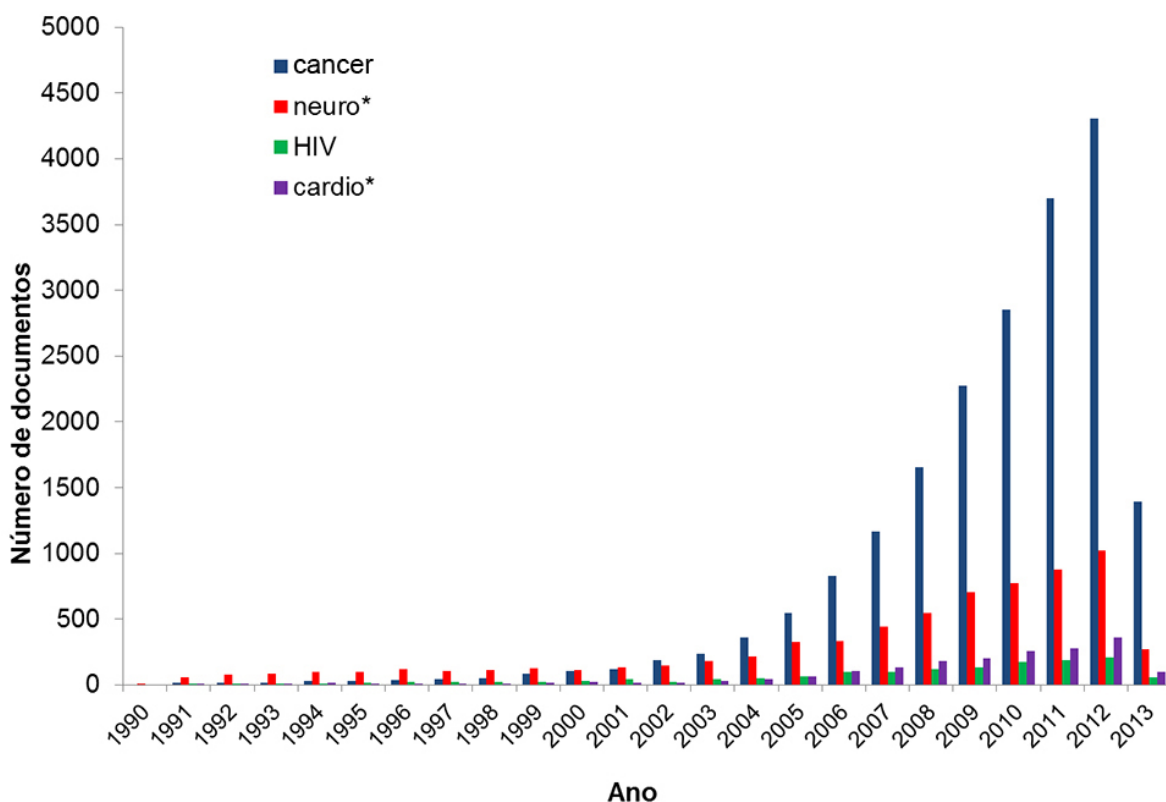


Figura 6. O gráfico demonstra o crescimento do Números de artigos publicados na base de dados Web of Science por ano considerando os cruzamentos: “nano* and cancer”, “nano* and neuro*”, “nano* and HIV” e “nano* and cardio*”. (Fonte: Adaptado de Dimer et al., 2013.)

Nanopartículas são compostos nanobiotecnológicos, capazes de contribuir significativamente para a melhoria do transporte de drogas para as células cancerígenas (Rossi-Bergmann; 2008).

Um dos campos da nanotecnologia com maior potencial de aplicação são os sistemas de carregamento e liberação de drogas (drug delivery systems) para fármacos e vacinas (Shaffer et al., 2005). O alto custo do desenvolvimento de novas moléculas ativas torna os sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos uma das áreas da indústria farmacêutica mais promissoras (LIU et al, 2007) . Isso porque uma nova formulação nanoparticulada pode resgatar drogas promissoras, que foram descartadas

após vultuosos investimentos por causa da descoberta de potenciais efeitos colaterais ou baixa biodisponibilidade, além de gerar novas patentes (LIU et al, 2007).

Os sistemas de liberação controlada de fármacos apresentam várias vantagens em relação aos sistemas convencionais, tais como: a) maior controle da liberação do princípio ativo, diminuindo o aparecimento de doses tóxicas e subterapêuticas; b) utilização de menor quantidade do princípio ativo, resultando em menor custo; c) maior intervalo de administração; e) melhor aceitação do tratamento pelo paciente; f) possibilidade de direcionamento do princípio ativo para seu alvo específico. As desvantagens que devem ser monitoradas e contornadas no desenvolvimento desses sistemas são possível toxicidade dos produtos da sua biodegradação, e custo mais elevado, dependendo do material e do processo utilizado. Este, no entanto, pode ser compensado pela redução das doses necessárias (Dimer et al., 2013).

1.7.1 Principais sistemas de distribuição e liberação controlada de fármacos

Vários tipos de nanopartículas e sistemas coloidais podem melhorar a cinética, biodistribuição e a liberação de uma droga, seja ela um fármaco, vacina, proteínas recombinantes ou oligonucleotídeos. A seguir, serão apresentados alguns dos principais sistemas nanoestruturados para carregamento de fármacos e vacinas (Santos-Oliveira, 2010).

Lipossomas

Os lipossomas são vesículas esféricas artificiais de tamanho variável (20 nm a vários micrômetros de diâmetro) que podem ser produzidas com fosfolipídios naturais e colesterol. Foram descobertos em 1961 por Alec Bagham durante um estudo de fosfolipídios e coagulação sanguínea que mostrou que quando se combinam com a água, formam imediatamente uma esfera de bicamada. Isso ocorre porque enquanto uma ponta de cada molécula é solúvel em água, a outra é hidrofóbica. Desde então, eles têm sido ferramentas bastante versáteis, amplamente utilizados como modelos de membranas celulares na biologia e bioquímica. A sua utilização como sistema carreador

de fármacos foi proposta pela primeira vez em 1971 por Gregoriadis, e a partir de então eles têm sido extensivamente utilizados (Bangham, A, 1961; Dimer et al, 2013)..

Os fármacos hidrossolúveis ficam encapsulados no interior da cavidade lipossomal enquanto que os fármacos lipossolúveis são incorporados na bicamada lipídica. Essa bicamada, por sua vez, pode se fundir com outras bicamadas lipídicas, como de células, liberando o conteúdo dos lipossomas. Os lipossomas foram os primeiros nanossistemas utilizados na clínica. O primeiro medicamento lipossomal a ser introduzido no mercado foi a doxorrubicina em 1995 para o tratamento do sarcoma de Kaposi associado à Aids. Formulações lipossomais da anfotericina B, que reduziram sensivelmente sua toxidez renal, estão no mercado desde 1998 para o tratamento de micoses sistêmicas e da leishmaniose visceral (Dimer et al, 2013)..

O uso de lipossomas catiônicos como sistemas eficientes de carregamento e transfecção de DNA foi demonstrado pela primeira vez no início da década de 1990 (Ito et al, 1990). Em animais, a administração de DNA complexado a lipossomos catiônicos promoveu a expressão terapêutica de proteínas em vários órgãos (Matsuura et al, 2003). Fibrose cística, hemofilia, determinados tipos de câncer, arteriosclerose, e anemia falciforme são doenças de potencial aplicação para a terapia gênica com lipossomos (Dimer et al, 2013).

Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas diferenciam-se dos lipossomos por não possuírem um núcleo aquoso, entretanto apresentam uma matriz sólida ou membrana constituída de polímero. O fármaco é agregado, encapsulado ou adsorvido às partículas, e, dependendo do método de preparação, pode-se obter nanoesferas ou nanocápsulas. O fármaco é liberado gradualmente da partícula por difusão ou erosão (Dimer et al, 2013).

A vantagem das nanopartículas poliméricas em relação aos lipossomos, além do menor custo dos polímeros em relação aos fosfolipídios, é a sua maior estabilidade e durabilidade, o que pode facilitar a estocagem à temperatura ambiente e aumentar o tempo de prateleira do medicamento (Dimer et al, 2013).

Os polímeros mais utilizados clinicamente, principalmente em próteses ortopédicas e fios de sutura biodegradáveis, são os sintéticos como o PLA, o PLGA e a

Poli (ε-caprolactona). Os biopolímeros como a quitosana e albumina têm a vantagem de terem custo bem mais baixo que os sintéticos, podendo ser mais econômicos. Nos últimos anos, as partículas poliméricas têm atraído atenção considerável não só como sistemas de liberação de fármacos, mas também como carreadores de DNA na terapia gênica. O tamanho das nanopartículas pode variar de 50-1000 nm. Micropartículas poliméricas (> 1000 nm) são produzidas por técnicas diferentes das nanopartículas, e têm aplicação potencial nos casos em que interessa a formação de depósitos para liberação local lenta e contínua, como, por exemplo, em vacinas e tratamentos de doenças crônicas localizadas. Micropartículas de PLGA, polifeprosan 20 e albumina já são aprovadas pelo FDA para veiculação de quimioterápicos para o tratamento de câncer cerebral e de próstata (Dimer et al, 2013).

Dendrímeros

Os dendrímeros são polímeros globulares ramificados. Possuem entre 1-10 nm e foram produzidos pela primeira vez no início da década de 1980 por Donald Tomalia. Seu diferencial em relação aos outros polímeros sintéticos é que têm alto grau de uniformidade molecular, e uma alta previsão de peso molecular e tamanho. Sua vantagem em relação às outras partículas poliméricas é a previsibilidade de seu tamanho e número de grupos funcionais, o que confere maior segurança quanto à quantidade de fármaco ou DNA complexado. Quanto à toxidez, os dendrímeros catiônicos são mais tóxicos e os aniônicos mais biocompatíveis (Demanuele A et al., 2005).

Ciclodextrinas

As Ciclodextrinas enquadram-se no grupo dos oligossacarídeos cíclicos tridimensionais em formato de copo apresentando em torno de 1 nm de altura. Possuem expressiva concentração de grupamentos hidroxilas, o que lhes garante caráter hidrofílico. Como seu interior é hidrofóbico, servem bem para solubilizar drogas lipossolúveis (Davis M et al., 2004).

1.8 Hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HA) é considerada um biomaterial cuja fórmula química é representada por $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$. Ela é o principal componente da matriz óssea natural do ser humano. A forma sintética apresenta propriedades de osteointegração e biocompatibilidade, possibilitando sua substituição no osso em processos de implante. (Eanes, 1980; Fulmer et al, 1992, Elliot, 1994).

A Hidroxiapatita possui alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas, tornando-a um excelente suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos, além de ser também eficiente no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (Eanes, 1980; Fulmer et al, 1992, Elliot, 1994).

A hidroxiapatita é encontrada raramente no meio ambiente, porém sua estrutura química é semelhante a da fluorapatita. Esses minerais ocorrem como constituintes de várias rochas ígneas e metamórficas, especialmente em calcários cristalinos (Elliot, 1994).

A fórmula da hidroxiapatita estequiométrica é $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, com razão Ca/P igual a 1,67. Porém composições estáveis podem ter esta razão estendida para aproximadamente 1,5 (Fulmer et al, 1992).

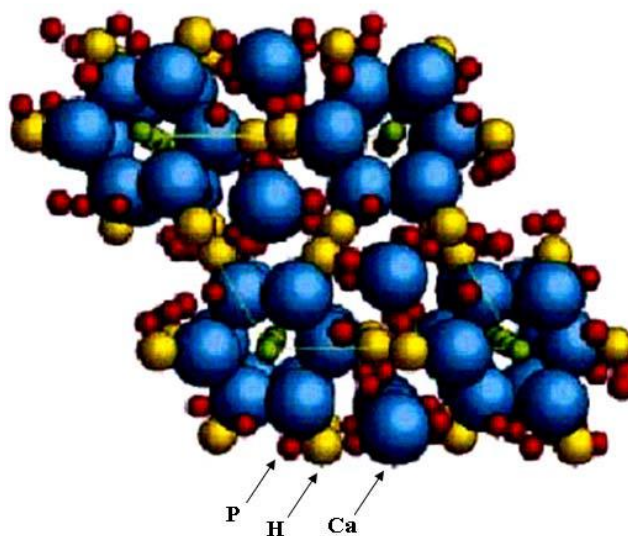


Figura 7. Ilustração esquemática da estrutura cristalina da hidroxiapatita. (Adaptado de Guastaldi A. C et al; 2010).

1.8.1 Síntese de Hidroxiapatita

Duas formas de síntese de hidroxiapatitas devem ser consideradas: as sintetizadas em altas temperaturas e que apresentam boa cristalinidade e cristais grandes, e as hidroxiapatitas sintetizadas em baixas temperaturas que apresentam baixa cristalinidade e cristais pequenos. A hidroxiapatita precipitada por via úmida possui características similares às do tecido ósseo e dentário, diferente da hidroxiapatita sintetizada a altas temperaturas (FERRAZ, MONTEIRO e MANUEL, 2004)

A estrutura da hidroxiapatita permite substituições catiônicas e aniônicas isomorfas com grande facilidade (Gauglitz, 1992; Ma et al, 2001). O Ca^{2+} pode ser substituído por metais tais como o Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Sr^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , etc; os grupos

fosfatos por carbonatos e vanadatos e as hidroxilas por carbonatos, flúor e cloro. Essas substituições podem alterar a cristalinidade, os parâmetros de rede, as dimensões dos cristais, a textura superficial, a estabilidade e a solubilidade da estrutura da hidroxiapatita (Gauglitz, 1992; Ma et al, 2001).

Biomateriais são novos materiais projetados para substituir partes prejudicadas do corpo e permitir a recuperação de funções biológicas afetadas por acidentes ou doenças, como câncer, por exemplo. Duas características principais são procuradas nos biomateriais: biocompatibilidade e biofuncionalidade (ROVERI, 2010). A biocompatibilidade é a aceitação do biomaterial pelo corpo, já a biofuncionalidade representa a habilidade do material desempenhar a função desejada (ROVERI, 2010).

A hidroxiapatita, por ser o principal constituinte da fase inorgânica do osso, tem sido muito estudada. Suas características químicas e estruturais possibilitam seu uso na área médica como material biocompatível em implantes e próteses (Eanes, 1980). No caso de tratamento de tumores ósseos, a HA vem sendo utilizada como suporte de ação prolongada de fármacos anticancerígenos. Tais medicamentos, são inseridos em blocos de hidroxiapatita porosa, permitindo que o tratamento da doença seja realizado com a liberação gradual da droga no organismo (Fulmer et al, 1992). Em função deste aspecto a técnica é interessante por combinar o tratamento do tumor com a substituição do osso afetado. (Liu, 1997).

Ultimamente as pesquisas com biomateriais é focada em superar as limitações dos fosfatos de cálcio, das cerâmicas de HA, e na melhoria das suas propriedades biológicas explorando as vantagens únicas da nanotecnologia. A tendência está mudando em direção a nanotecnologia para melhorar as respostas biológicas da HA, porque a nano-HA é semelhante, em relação dimensional, com os cristais presente no osso (ROVERI, 2010).

1.9 Radiofármacos

Radiofármacos são preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para uso, contêm um ou mais radionuclídeos. Incluem-se também os componetes não-radioativos para marcação e os radionuclídeos (Anvisa RDC 64/2009) . São substâncias marcadas para observar alterações fisiológicas e/ou o perfil de distribuição irregular de compostos de ação terapêutica na clínica médica ou para determinado composto administrado no organismo (Tewson & Krohn,1998). A Radiofarmácia é essencial para a Medicina Nuclear, pois sem os radiofármacos, inúmeros procedimentos radioterapêuticos e radiodiagnósticos não podem ser realizados (Santos-Oliveira, et al, 2008).

Os radiofármacos de tecnécio-99m (^{99m}Tc) tornaram-se, nos últimas décadas, importantes ferramentas para diagnosticar várias doenças ou disfunções de órgãos e sistemas que compõem o corpo humano. Atualmente, existem aproximadamente 30 desses compostos sendo utilizados em medicina nuclear, gerando um volume de exames correspondente a 80% da rotina clínica de um serviço de medicina nuclear (Dewanjee 1990).

Os radiofármacos são uma forma de tratamento local contra a dor apresentada na Síndrome Incurável da Metástase Óssea, com destaque para os casos previamente tratados com outros tratamentos e que não apresentaram melhor clínica expressiva e nos pacientes que desenvolveram metástases ósseas múltiplas (Paes et al., 2011).

Dentre os radionuclídeos com ação terapêutica e potencial utilização em câncer ósseo destaca-se o Hólmio-166, como exposto no presente trabalho.

A escolha de um radionuclídeo para o desenvolvimento de um radiofármaco para aplicação em diagnóstico ou terapia em Medicina Nuclear depende principalmente das suas características físicas, nomeadamente o tipo de emissão nuclear, tempo de meia-vida e energia das partículas e/ou radiação eletromagnética emitida (Santos-Oliveira, 2010).

O radiofármaco ideal é aquele que atinge o tecido tumoral sem que a radiação atinja o tecido normal (HAMOUEH I et al., 2008). Além disso, um radiofármaco deve ser capaz de permanecer no organismo por um período de tempo curto o bastante para evitar a exposição prolongada do paciente à radiação, mas suficientemente longo para permitir a aquisição e processamento de imagens, assim como desenvolver sua ação terapêutica (quando aplicável). Isso será determinado pela meia-vida efetiva do radiofármaco, que, por sua vez, depende do decaimento físico do radionuclídeo e do tempo de meia-vida biológico do carreador acoplado ao radioisótopo (OLIVEIRA et al., 2006).

Assim, após a administração, o radiofármaco penetra nos tecidos (devido ao carreador) e por meio de equipamentos de detecção e imagem pode-se realizar a medida da radiação. Este procedimento permite avaliar a biodistribuição do radiofármaco e localizar os focos onde o mesmo foi mais captado (BOERMAN et al., 2000).

A energia do fóton γ emitido pelo radionuclídeo que entra na composição do radiofármaco para diagnóstico deve situar-se entre os 80-300 keV (Saha, 1998). Isto porque os raios gama com energia inferior a 80 keV são absorvidos pelos tecidos e não são detectados exteriormente. Por outro lado, quando a sua energia é superior a 300 keV a eficiência dos detetores é baixa e daí resultam imagens de má qualidade. Em qualquer dos casos, o $t_{1/2}$ deve ser suficiente para preparar o radiofármaco, administrar ao paciente e realizar a imagem (Saha, 1998; Anderson et al, 1999).

Os radiofármacos utilizados para diagnóstico estão classificados em radiofármacos de perfusão (ou 1ª geração) e radiofármacos específicos (ou 2ª geração) (Dilworth et al., 1998, Santos-Oliveira, 2010). Os radiofármacos de perfusão são transportados no sangue e atingem o órgão alvo na proporção do fluxo sanguíneo. Não têm locais específicos de ligação e pensa-se que são distribuídos de acordo com tamanho e carga do composto. Os radiofármacos específicos são direcionados por moléculas biologicamente ativas, como, por exemplo, anticorpos e peptídeos, que se ligam a receptores celulares ou são transportados para o interior de determinadas células. A capacidade da biomolécula reconhecer os receptores vai determinar a fixação do radiofármaco no tecido pretendido e não deverá ser alterada com a incorporação do radionuclídeo (Jurisson et al., 1993; Fichna et al., 2003).

Dos radiofármacos utilizados para diagnóstico, os que contêm na sua composição ^{99m}Tc representam cerca de 90% da totalidade. Este fato deve-se às características físicas do ^{99m}Tc : $t_{1/2}$ de 6 h, emissão γ com energia adequada ao detector (140 keV) e disponível em gerador de baixo custo. O tempo de meia-vida de ^{99m}Tc é suficientemente longo para a preparação dos radiofármacos, administração e aquisição das imagens e suficientemente curto para minimizar a dose de radiação para o paciente (Dilworth et al., 1998; Jurisson et al., 1993).

Na forma de pertecnetato, tal como é obtido do gerador, o ^{99m}Tc é quimicamente estável. Contudo, como o ^{99m}Tc é um metal de transição (pertence ao grupo 7 da Tabela periódica) pode existir em 9 estados de oxidação (-1 a +7), o que lhe dá a possibilidade de formar complexos de coordenação com numerosos agentes quelantes. A coordenação de agentes quelantes ao ^{99m}Tc é feita quando o metal se encontra em estados de oxidação inferiores ao VII. A redução do metal, do estado de oxidação VII para outros estados de oxidação, é realizada normalmente com cloreto estanoso (Jurisson et al., 1993; Rakias et al., 1996).

São vários os fatores que influenciam na interação dos radiofármacos com os receptores dentre elas (Vallabhajosula, 2001):

- Depuração plasmática: os compostos para ligação aos receptores (peptídeos, esteróides, neurotransmissores) são de pequeno tamanho e eliminados rapidamente da corrente sanguínea;
- Afinidade e Especificidade: o radiofármaco deve ter elevada afinidade para determinado receptor e muito pouca afinidade para os restantes. Este fato é muito importante, pois as concentrações de radiofármaco e receptores são baixas, devendo haver ligação suficientemente forte para a realização da aplicação clínica;
- Atividade específica: é necessária elevada atividade específica, uma vez que os receptores apresentam baixa concentração, de modo a evitar a sua saturação com os ligantes "frios";
- Estabilidade in vivo para que o radiofármaco alcance intacto o local alvo;
- Fluxo sanguíneo: a captação do radiofármaco depende do fluxo sanguíneo, perfusão tecidual, permeabilidade capilar e capacidade de difusão.

1.10 Desenvolvimento de Nano-radiofármacos

Os últimos dez anos trouxeram grandes avanços no tratamento e no diagnóstico por imagem do câncer, incluindo o desenvolvimento de tratamentos com radioterapia conformada, cirurgia robótica e endoscópica e o uso de nanopartículas como o Sistema de Liberação de Fármacos ou *Drugs Delivery System (DDS)*. Estas técnicas dependem de delimitação alvo precisos e visualização de alvos tumorais, e requerem precisão sobre a escala milimétrica (Albernaz et al, 2013).

Várias novas terapias e kits de diagnóstico estão em desenvolvimento utilizando métodos inovadores de entrega, além da prática atual de introdução direta de medicamentos e dispositivos direcionados ao tumor. A Nanobiotecnologia, particularmente, as nanopartículas, estão contribuindo significativamente para a melhoria da biodistribuição de radiofármacos para tratamento e diagnóstico do câncer. A aplicação da nanotecnologia para entrega da droga é amplamente esperada para mudar o panorama das indústrias farmacêuticas e de biotecnologia para o futuro próximo. O desenvolvimento de produtos de nanotecnologia pode desempenhar um papel importante na adição de um novo arsenal de agentes terapêuticos para combater o câncer. Por meio da nanotecnologia, pode ser possível conseguir(Albernaz et al, 2013):

- 1- Melhor biodistribuição de drogas/fármacos com caráter hidrofóbico;
- 2- Biodirecionamento de drogas/fármacos de uma forma específica de célula ou tecido
- 3- Transcitose de fármacos pelas células epiteliais e barreiras endoteliais;
- 4- Co-entrega de dois ou mais fármacos para terapia combinada;
- 5- Entrega de fármacos macromoleculares para grandes locais de ação intracelulares;
- 6- Visualização dos locais biodistribuição de drogas através da combinação de agentes terapêuticos com métodos de imagem (para diagnóstico)
- 7- Analisar em tempo real a eficácia, in vivo, do agente terapêutico administrado

Recentemente, vários tipos de nanossondas têm sido desenvolvidos como agentes de contraste de TC, tais como nanossondas de ouro e nanotags, emulsões à base de iodo e nanopartículas de óxido de tântalo (Revenie et al, 2011; Sa et al, 2012)

1.11 Hólmio

Em Medicina Nuclear, os radioisótopos devem apresentar características essenciais, como tempo de meia-vida compreendido entre algumas horas e 70 dias, produto de decaimento estável, não emitindo radiação particulada, emissores beta (β) ou alfa (α) de alta energia ($E > 1 \text{ MeV}$), minimizar os efeitos da irradiação em células saudáveis e concentrá-lo nas células tumorais, alta atividade específica (Wang et al., 2002)

Hólmio 165 (^{165}Ho)

Elemento da família dos Lantanídeos, também chamada de terras-raras, sendo o mais raro desse grupo. Esse elemento químico foi descoberto também por análise de raios espectrais, em 1878, por Jacques-Louis Soret e Marc Delafontaine e, em pesquisa independente em 1879, por Per Teodor Cleve, que fez a sua separação química do érbio e do túlio. O pesquisador Cleve deu ao elemento recém-descoberto o nome latinizado da capital da Suécia, Holmia, sua cidade natal (Valente, 2010).

O Hólmio ocorre em alguns minerais, mas é também produto de fissão encontrado em reatores nucleares. O método clássico de separação e purificação é a cristalização fracionada seguida de precipitação, mas, recentemente, a tecnologia da separação iônica tem produzido grandes quantidades de óxido de hólmio (Smits et al., 2012; Valente, 2010).

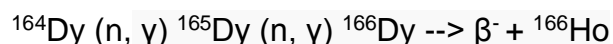
A forma metálica tem cor prateada e é obtida pela redução do fluoreto de hólmio (HoF_3). Existe apenas um isótopo estável, o Ho-165, porém, vários radioisótopos artificiais são conhecidos. Seu comportamento químico é típico das terras-raras, formando vários sais, entre eles o nitrato de hólmio, $\text{Ho}(\text{NO}_3)_3$. (Smits et al., 2012; Valente, 2010).

Características físico-químicas do Hólmio-165	
Número atômico	67
Massa Atômica	164,93
Ponto de Fusão	1470 °C
Ponto de Ebulição	2720 °C
Densidade	8,78 g/L

Tabela 2. As características físico-químicas do Ho-165. Fonte: Valente, 2010

O Hólmio-166 é produzido em reator nuclear, por reação de captura neutrônica. O óxido de hólmio (Ho_2O_3) é bombardeado por neutrões. Em seguida, há dissolução em ácido Clorídrico e ácido Nítrico, com posterior evaporação para que o resíduo seja dissolvido em HCl 0,1M. O Ho^{166} tem propriedades paramagnéticas, podendo ser utilizado em ressonância magnética nuclear e em exames cintilográficos. (SEPPENWOOLDE et al., 2004; Smits et al., 2012)

O radionuclídeo Ho^{166} também pode ser gerado a partir do decaimento do ^{166}Dy , cujo tempo de meia-vida é 81,5 horas, de acordo com a equação abaixo (Costa, 2004; Lahiri et al, 2004):



A reação inversa é preferencial para marcação de biomoléculas, em função da atividade específica ser maior (devido a presença de outros radioisótopos do hólmio menores na reação). Já a reação direta apresenta menor atividade específica, porém a atividade total é maior. O sentido direto é útil para marcação de microesferas e fosfonatos para dor óssea (Costa, 2004; Lahiri et al, 2004;)

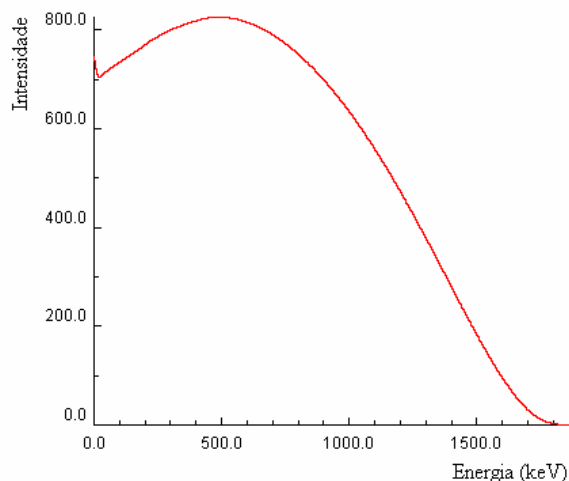


Figura 8. Espectro experimental da energia das partículas β^- do Ho^{166}
(Fonte: KOREA ATOMIC RESEARCH INSTITUTE - Nuclide Chart).

Tabela das propriedades do Holmio-166

Forma encontrada na natureza	^{165}Ho
Classificação Periódica	Família dos Lantanídeos
Número Atômico (Z)	67
Meia-vida	26,8 hr (decai para Érbio-166)
Produção	$^{165}\text{Ho} (n, \gamma) ^{166}\text{Ho}$
Forma Química	Cloreto de Hólmio (HCl 0,1 mol/L)
Pureza Radioquímica	>99%
Energia máxima das partículas beta	1855 keV
Radiação	Gama 80 KeV Beta 666KeV

Tabela 3. Propriedades físico-químicas do elemento terra-rara Hólmio. (Adaptado de VALENTE, 2013)

Emax (KeV)	Emed (keV)	Intensidade (%)
1854,7	693,6	50,0
1773,1	650,9	48,7
1068,0	369,0	0,0061
394,0	114,9	0,95
325,7	105,1	0,0024
191,5	51,9	0,307
23,4	5,9	0,0362

Tabela 4. Energias Máximas e Médias das radiações (β). (Adaptado de Valente, 2013).

1.12 Ativação Neutrônica

A ativação neutrônica é a irradiação de um núcleo atômico com nêutrons para produzir uma espécie radioativa, um radionuclídeo. O número de radionuclídeos produzidos na amostra depende do número de núcleos-alvo, do fluxo de nêutrons e da probabilidade de ocorrência da reação nuclear, também chamada seção de choque. Quando o produto da ativação neutrônica é radioativo, ele decairá com sua meia-vida característica. Portanto, o crescimento da atividade da amostra dependerá da taxa de ativação e da taxa de decaimento dos núcleos (Valente, 2010).

Os nêutrons gerados em reatores nucleares têm ampla faixa de energia que varia de 0,025 eV, chamada energia térmica, até vários MeV, sendo que a faixa situada entre 0,5 eV e 1 MeV é chamada faixa de energia epitérmica, na qual o valor de 0,5 eV, limite inferior, é definido como a energia mínima para um nêutron atravessar uma placa de Cádmio de 1 mm de espessura (Valente, 2010).

O núcleo atômico, quando captura um nêutron, fica em estado de excitação transitória e se livra do excesso de energia, após a captura, pela emissão de fótons γ , prótons, partículas β ou partículas α . O tipo de reação nuclear que ocorrerá nessas circunstâncias e, conseqüentemente, o produto da ativação dependem da energia do nêutron incidente. A reação mais comum que ocorre sob um fluxo de nêutrons térmicos

é a captura radiativa $X(n,\gamma)Y$ na qual a radiação γ é emitida imediatamente após a excitação do núcleo e é chamada de γ pronto (Valente, 2010).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de Biodistribuição de nano-hidroxiapatita dopada com Hólmio-165 para tratamento de câncer ósseo através de análises das estruturas sintetizadas utilizando-se testes físico-químicos e testes de biodirecionamento.

2.2 Objetivo Específico

- Produzir nanohidroxiapatitas por via úmida
- Caracterizar morfologicamente as nanohidroxiapatitas
- Dopar as nanohidroxiapatitas com Hólmio 165
- Irradiar o Hólmio 165 à Hólmio 166
- Estudar a eficiência da dopagem das nanohidroxiapatitas
- Avaliar a biodistribuição das nanoHa em ratos saudáveis

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais Utilizados

- Sulfato de Hólmio-165 da Sigma Aldrich
- Hidrogenofosfato de amônio (NH₄)HPO₄ da Sigma Aldrich
- Cetamin (cloridrato de cetamina 10%) da Syntec
- Xilazin (cloridrato de xilazina 2%) da Syntec
- Água Milli-Q
- Cloreto de Hólmio Hexaiidratado 289213 da Sigma Aldrich
- Fosfato Amônio Difásico da Sigma Aldrich

3.2 Equipamentos e Instrumentos

Ao realizarmos este trabalho científico foram utilizados os equipamentos e instrumentos listados:

- Agitador magnético IKA – C MAG HS 7
- Gotejador Easy-Load Masterflex
- Fita medidora de pH Merck
- Balança Analítica AR2140 OHAUS DA CA Química
- Estufa FIC04 FAMO
- Filtro Caixilho Frame Inox Abrazinox 5x2
- Ultrassonicador Sonicator® w-380 UMG com microtip
- Evaporador a vácuo Fisatom
- Espectrômetro FTIR VARIAN modelo Excalibur 3100
- Liofilizador L101 Liotop, Brasil
- TM 3000 – Hitachi OK
- Contador gama Perkin Elmer modelo Wizard
- Microscópio Eletrônico de Varredura

3.3 Produção de Nanohidroxiapatita

Via úmida

A hidroxiapatita foi precipitada pelo processo de gotejamento de solução de hidrogenofosfato de amônio (NH₄)HPO₄, contendo hidróxido de amônio (NH₄OH) e

Nitrato de Cálcio $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, à temperatura 37°C e pH 11. O precipitado foi separado por filtração, lavado repetidas vezes por água deionizada fervente e foi seca à 100°C por 24 horas. O pó seco foi manualmente granulado e as partículas menores que 210 μm foram separadas por peneiramento.

3.4 Nanohidroxiapatita dopada com Hólmio-165

A síntese de hidroxiapatita, realizada no laboratório de biocerâmica e matérias do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas no Rio de Janeiro, usando a precipitação por via úmida. A solução **A** contendo Cálcio + Hólmio¹⁶⁵ foi adicionada a uma solução de fosfato **B**, utilizando a bomba de água Masterflex® sob um fluxo de 30mL/min. O hidróxido de amônia (NH_4OH) foi introduzido no sistema, utilizando a bomba Masterflex® com um fluxo de 2-3 ml/min para se obter pH em torno de 9. A síntese e a temperatura de digestão foi de cerca de 37°C e 1 atm. Houve agitação mecânica no dispositivo IKCA-MAGHS7 a uma velocidade de 240 RPM, durante a noite (digestão overnight). Uma filtragem e duas lavagens foram feitas para que o pH ficasse em torno de 7 (meio neutro). A digestão durou aproximadamente 24 horas para ser realizado, e, depois disso, a amostra foi levada para a estufa FAMO, modelo FIC04 para liofilização das partículas.

Após liofilização, a amostra foi macerada e peneirada em uma tela metálica do fabricante ABRAZINOX com abertura de 250 μm , malha 60, caixilho (FRAME) 5x2 inoxidável para filtrar a amostra. Ao término do processo, foi obtida Hidroxiapatita com 10% de HO-165.

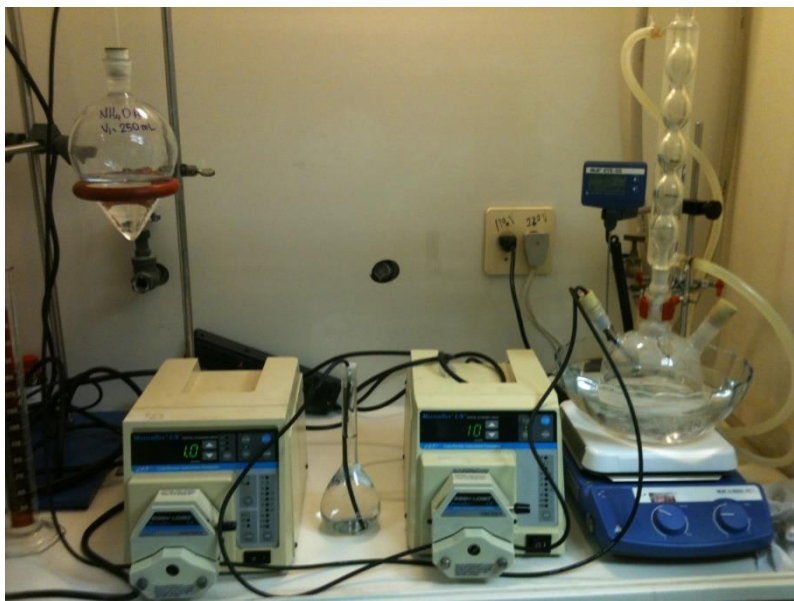


Figura 9. Aparelhagem utilizada para síntese da Hidroxiapatita, processo ocorrido no Laboratórios de Biomateriais localizado no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

3.5 Irradiação das Nano-hidroxiapatitas dopadas com Hólmio-165

Pesou-se 10 mg de nano-hidroxiapatita dopada com 10% de Ho-165. A amostra foi irradiada em quartzo revestido por embalagem de alumínio no reator IEA-R1 (IPEN-CNEN-SP) por 1 hora, com um fluxo neutrônico de $1,0 \times 10^{13} \text{ n. S}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$.

A irradiação do Ho 165 à Ho 166 ocorreu no reator nuclear IEA-R1 (IPEN-CNEN/SP), um reator de pesquisa com baixo fluxo de nêutrons. O Hólmio 165 tem uma abundância de 100% na natureza e seção de choque de 64 barns, o que possibilitou produzir uma atividade de 0,037 Ci ($\sim 0,13 \text{ GBq/g}$). Reator IEA- R1, 60 horas, $4,0 \times 10^{13} \text{ n.s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$

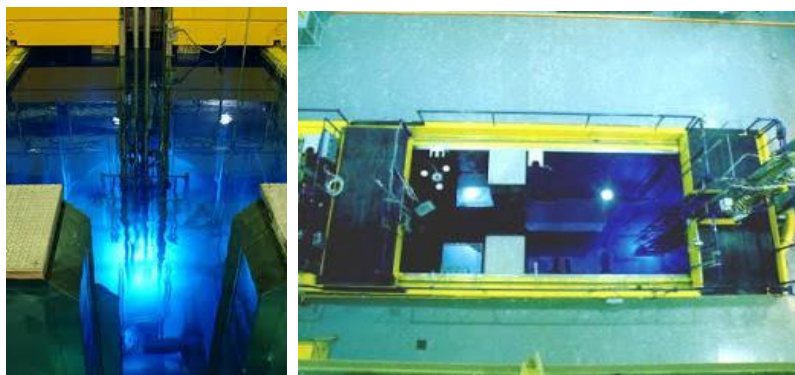


Figura 10. Reator IEA-R1. O IEA-R1 é um reator de pesquisa do tipo piscina, moderado, e refrigerado a água leve, utilizando grafite como refletor. Foi projetado e construído pela empresa norte-americana Babcock & Wilcox, em 1956. Fonte: Ipen, SP.

3.6 Técnicas de Caracterização da Nanohidroxiapatita

Dentre as mais diversas técnicas de caracterização utilizadas para materiais em geral, as técnicas de Difração de Raios-X (DRX), Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) são as técnicas mais utilizadas para a caracterização de hidroxiapatitas (Costa et al, 2009).

3.6.1 Difractometria de Raios X

Em 1912 o físico Alemão Von Laue sugeriu que se os átomos apresentam uma estrutura cristalina, organizados de forma a apresentarem periodicidade ao longo do espaço e que, se os raios-X eram ondas eletromagnéticas com comprimento de onda menor que os espaços interatômicos, então os núcleos atômicos que concentram a massa dos átomos poderiam difratar os raios-X, formando franjas de difração. Quando Laue fez um feixe de raios-X por uma amostra monocristalina e pôs filme fotográfico após a amostra, em seguida da revelação do filme, este demonstrava pontos sensibilizados pelos raios-X difratados (ARAÚJO et al, 2007).

Os difratogramas fornecem informações sobre estrutura e composição dos materiais, possibilitando o cálculo do espaçamento (d) e o parâmetro de célula (ao) para determinação de possíveis distorções das redes cristalinas. O parâmetro de célula unitária “ao” foi calculado a partir da seguinte equação $ao = 2 \cdot d_{100} / \sqrt{3}$

A fase mineral e cristalina da amostra foram avaliadas por difratometria de raios-X (DRX) com radiação CuK_{α} 40 kV e 40 mA. Espécies fosfatos e grupamentos hidroxila (OH⁻) na estrutura da hidroxiapatita foram identificadas por Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier

3.6.2 Espectrofotometria de Infravermelho por Transformada de Fourier

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho permite avaliar a análise vibracional das nanohidroxiapatitas o que possibilita fornecer importantes informações, como a estrutura configuracional, conformacional e a composição química. (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2005).

O conjunto de bandas fornecidas pelo espectro é específico para cada substância, uma vez que as bandas isoladas são referentes às vibrações de um determinado grupo funcional ou de um certo tipo de ligação do composto estudado. (JAHNO, 2005).

Os espectros de FTIR foram obtidos utilizando resolução de 2 cm⁻¹ e faixa de varredura de 4000 a 400 cm⁻¹, em temperatura ambiente.

3.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)

A morfologia das nanopartículas de hidroxiapatita foi examinada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), também chamada de Scanning Electron Microscopy (SEM). A análise foi realizada no aparelho TM 3000 da Hitachi, no Instituto de Engenharia Nuclear (IEN). Além desta análise, a presença do elemento Hólmio foi investigada por Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS).

A microfotografia das nanohidroxiapatitas baseia-se na varredura dos elétrons na superfície das amostras (raios X característicos) e permite caracterizar por EDS os elementos químicos dessas amostras. A imagem eletrônica de varredura (elétrons secundários e retroespalhados) representa em tons de cinza o mapeamento e a contagem elementar emitida pelo material analisado.

3.7 Biodistribuição

O estudo da biodistribuição do nano-radiofármaco é uma importante ferramenta para estabelecer os principais focos onde o radiotraçador é mais captado. Como a distribuição in vivo do radiofármaco é determinada pelas características fisiológicas dos tecidos, ele pode fornecer importantes informações sobre vários tecidos de forma não invasiva (BOERMAN et al. 2000, SARCINELLI, 2014).

Objetivando acompanhar a biodistribuição in vivo, determinados métodos de marcação de nanopartículas foram desenvolvidos e possuem grande utilidade, visto que não são invasivos e permitem a análise quantitativa da distribuição das partículas ao longo do tempo através de imagens (Patrício, 2012., Pyzsz et al., 2010; Soundararajan et al., 2009).

Comumente se utiliza o encapsulamento, na nanopartícula, o fármaco complexado com ^{99m}Tc para visualização na gama câmara ou fazer um complexo com metal coloidal, como Gadolínio, por exemplo, para visualização de imagens por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (Patrício, 2012).

A Biocompatibilidade das nanoestruturas com células e tecidos pode ser modulada por meio da composição química adequada dos seus constituintes através de associação de ligantes específicos na superfície da nanopartícula, tais como: ligantes

específicos (anticorpos e peptídeos), moléculas bioativas, alterações na hidrofobicidade dentre outras modulações (Mora-Huertas et al., 2010; Silva et al, 2003)

As nanopartículas podem ser recobertas pelas proteínas plasmáticas como, por exemplo, por fatores do sistema complemento e anticorpos, enquanto estiverem circulantes na corrente sanguínea. Estas proteínas atuam como opsoninas, facilitando a ligação das nanopartículas às células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos). Devido a alta densidade de fagócitos mononucleares no fígado, nódulos linfáticos e baço, essas nanopartículas podem sair da corrente sanguínea em 5 minutos (Patrício, 2012., Garnett & Kallienteri, 2006). Tal processo ocorre em função de características físico-químicas dos nanocompostos, como carga, hidrofobicidade e tamanho (Patrício, 2012., Cho et al; 2008; Duncan, 2006; Formariz et al, 2004). Nanopartículas com tamanhos inferiores a 200 nm conseguem passar pelas fenestras entre as células hepáticas de Kupffer, sendo então aprisionadas nesse órgão mais facilmente (Patrício, 2012; Cho et al, 2008). Dessa forma, as alterações superficiais das nanopartículas demonstram resultados satisfatórios, devido a elevação da quimiotaxia das nanoestruturas pelas células alvos, entretanto, sem modificar a conformação estrutural do princípio ativo e a sua eficácia (Patrício, 2012; Cho et al., 2008; Mora-Huertas et al, 2010).

Cargas negativas nas nanopartículas possibilitam um tempo de depuração menor do que cargas positivas ou nanopartículas neutras. Nesse sentido, alguns pesquisadores defendem que o recobrimento das nanopartículas com copolímeros hidrofílicos (polietileno glicol, por exemplo), diminuem o reconhecimento das nanopartículas pelo sistema imunológico, permitindo sua circulação no plasma por um intervalo de tempo maior (Patrício, 2012; Mora-Huertas et al.,2010, Vauthier & Bouchemal, 2009)

3.7.1 Seleção animal

Para o estudo, foram utilizados oito ratos Wistar, tanto fêmeas quanto machos, pesando entre 400 a 450 g com idade média de 12 meses, conforme aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) em anexo (ANEXO I).

3.7.2 Processo de Marcação das nanoHA com Técnico-99m

Para a marcação, foi realizada pelo método direto com o radionuclídeo ^{99m}Tc (Patricio et al, 2011). Consistiu na incubação, por 20 min, de 100 μCi de ^{99m}Tc em 300 μL de solução aquosa de cloreto de sódio 0,9% com 30 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (80 $\mu\text{L}/\text{mL}$ - Sigma-Aldrich) para a redução do número de oxidação do ^{99m}Tc . Após esse período, adicionou-se à solução anterior 150 μL da solução de nanoHA dopadas com Ho-165 (solução 50% p/p) e aguardou-se 10 minutos para que o processo de marcação ocorresse conforme esquema ilustrativo abaixo:

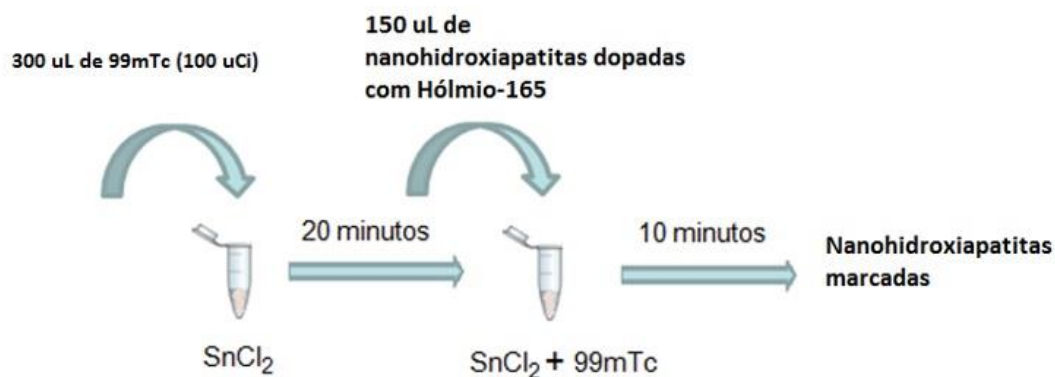


Figura 11. Marcação direta das nanohidroxiapatitas pelo ^{99m}Tc .

Um cromatografia de camada fina (CCF) foi realizada utilizando papel Whatman nº 1 para identificar a marcação correta e avaliar a eficiência do processo. O papel Whatman nº1 equivale à fase estacionária e a acetona P.A (Sigma) foi utilizada como fase móvel. Tiras do papel foram cortadas em tamanhos iguais (14 cm/1 cm), determinando-se a origem e o topo a 1 cm da parte inferior e superior, como é mostrado na figura (12) abaixo. Na origem do papel, foi adicionado 2 μL da amostra marcada através de pipeta automática. Em seguida, a tira foi incubada em cuba de vidro saturada e vedada com 0,7 mL de acetona (fase móvel). A acetona ascendeu pela tira de papel e após atingir o topo da mesma, o processo foi freado. A tira foi então colocada para secar à temperatura ambiente por 20 minutos e cortada em 4 pedaços (origem 1, origem 2, topo 1, topo 2). Cada pedaço foi introduzido em tubo de ensaio para, em seguida ser procedida a leitura da atividade no contador Gama (Perkin Elmer, Wizard). O percentual de atividade em cada uma das partes foi calculado e determinou-se o local em que as nanohidroxiapatitas marcadas sem encontravam. Fez-se um comparativo com ^{99m}Tc não marcado, fazendo-se o mesmo procedimento.

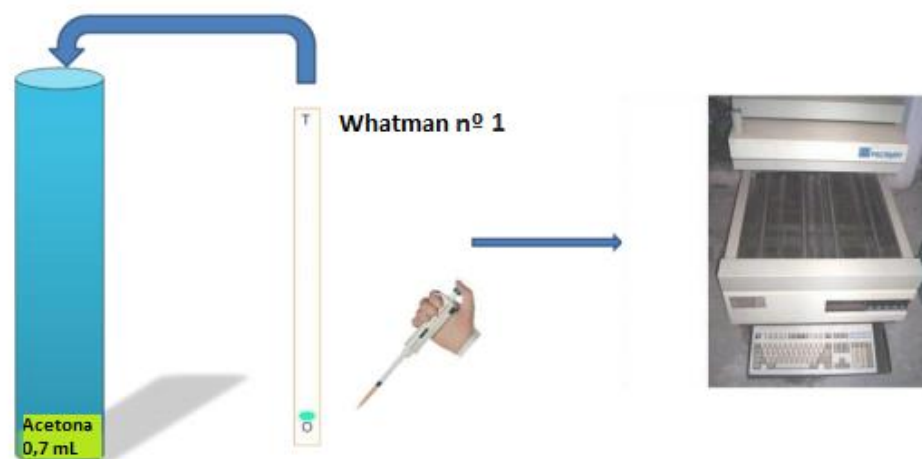


Figura 12. Esquema da avaliação da marcação por CCF.

3.7.3 Administração

Os ratos Wistar foram mantidos em ambiente cuja temperatura estava na faixa de ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) com comida e água *ad libitum*. Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina 2% (xilazyn) e cloridrato de cetamina 10% (cetamin) ambos da Syntec. Foram aplicados, pela via intraocular, 100 μL da amostra de nanoHA marcada pelo pelo $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($3.7 \text{ MBq}/0.2 \text{ mL}$) à 15:09 hrs do dia 20/02/2015.



Figura 13. Injeção da amostra de nanohidroxiapatita marcadas radioativamente por via intraocular. Foram administrados, por via intraocular, 100 μL das amostras marcadas, em ratos.

Após 2 horas da administração da droga, às 17:23 hrs, os ratos foram sacrificados através asfixia com CO_2 , e seus órgãos removidos para que a radioatividade fosse medida em um contador gama Perkin Elmer Wizard 2470, com um cristal de $\text{NaI}(\text{TI})$ de 5 cm x 5 cm em condições eletrônicas ótimas para a leitura do radioisótopo $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Os resultados das contagens foram expressos em dose por órgão (%ID/órgão) e dose por grama de tecido (%ID/g) (SA et al., 2012). Os órgãos retirados foram: cérebro, coração, pulmão direito, pulmão esquerdo, rim direito, rim esquerdo, estômago, intestino delgado, baço, sangue, fígado, intestino grosso e fêmur, totalizando 13 pontos de leitura.



Figura 14. Retirada dos órgãos dos animais para medição da radioatividade. Após 2 horas da injeção das nanopartículas marcadas radioativamente, os ratos são sacrificados por meio de asfixia.

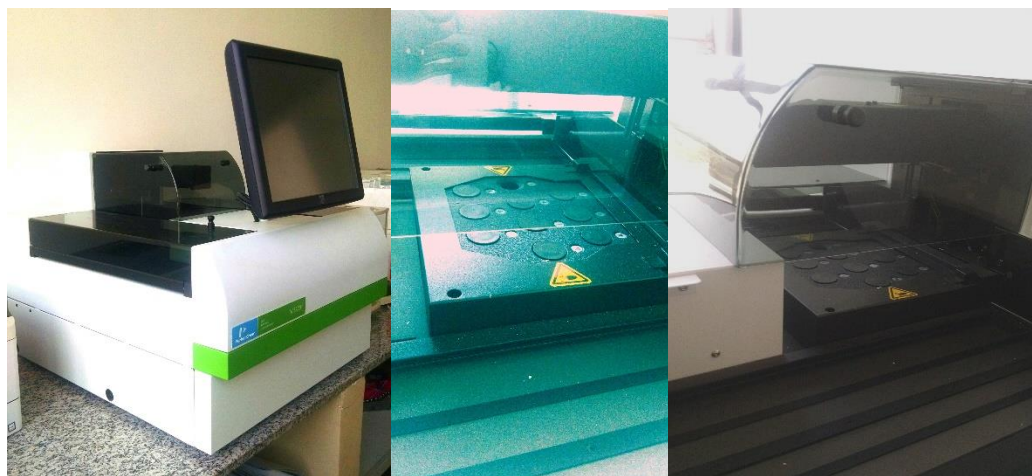


Figura 15. Contador ParkinElmer 2470 Automatic Gamma Counter. Aparelho utilizado para radiação gama proveniente do ^{99m}Tc .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Espectroscopia de Energia Dispersiva de Raios-X (EDS)

A Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV) possibilitou a formação de imagem das nanopartículas com tamanho variável entre 200-250 nm e com formato irregular (Figura 16). A análise EDS mostrou a presença de Hólmio e confirmou a dopação 10% (figura 5 e tabela 5).

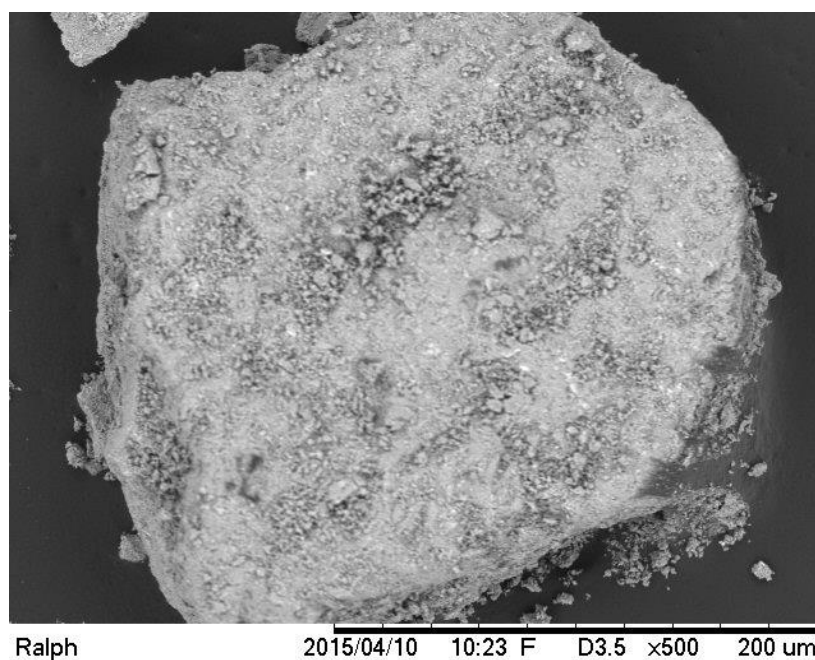


Figura 16. Imagem obtida pela MEV, mostrando o tamanho de 250 nm da hidroxiapatita dopada com Ho-165.

As nanopartículas, com tamanho de até 200 nm, conseguem entrar nas fenestrações mais largas dos neovasos dos tumores sólidos, mas não conseguem entrar nas fenestrações estreitas dos endotélios dos tecidos normais. Assim espera-se um acúmulo das nanopartículas no tumor com pouco ou nenhum acúmulo nos tecidos normais.

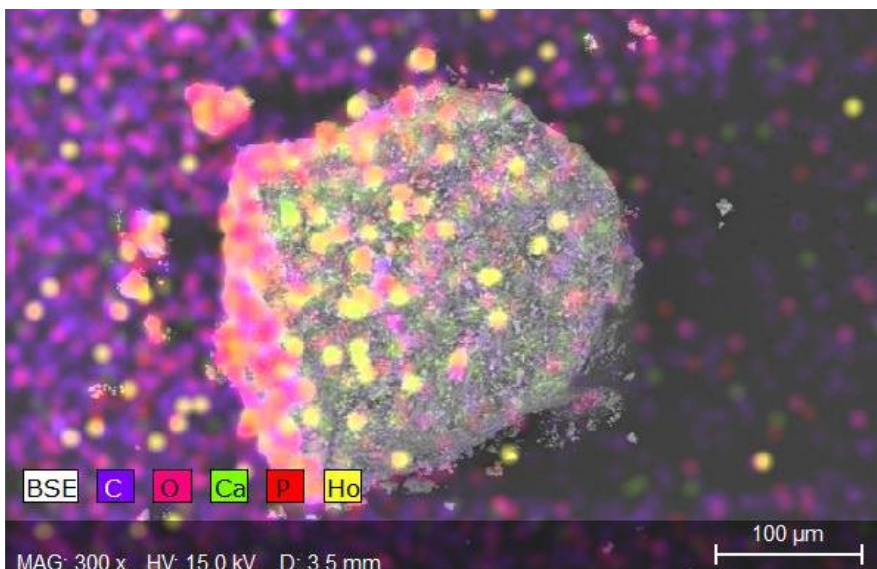


Figura 17. Análise EDS mostrando a presença de hólmio na hidroxiapatita. Os pontos em amarelo referem-se ao lantanídeo.

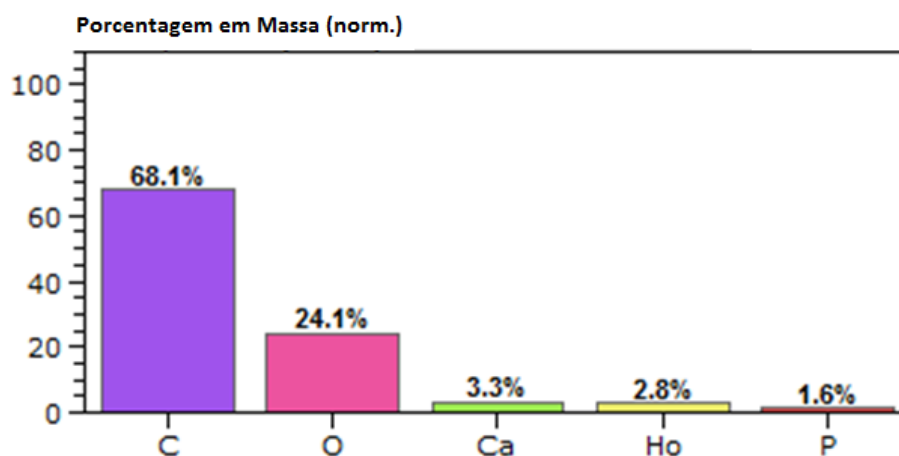


Tabela 5. Análise EDS demonstrando a presença de Hólmio-165 e seu percentual na amostra de Hidroxiapatita.

4.3 Difratometria de Raios X

A nanohidroxiapatita dopada com Ho-165 apresentou um padrão de difração de raios-X de uma hidroxiapatita pura e cristalina como mostrado nas figuras abaixo.

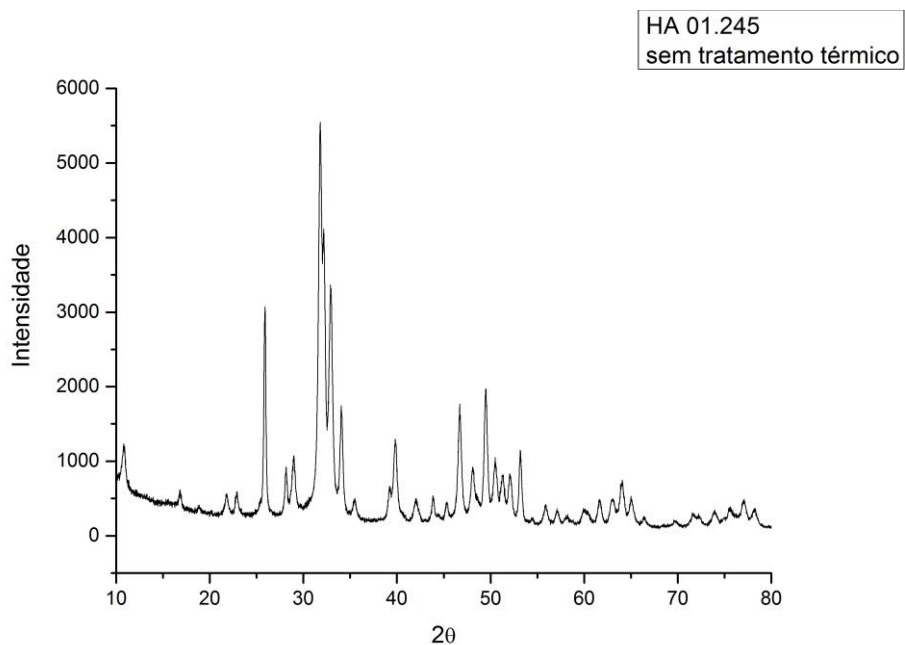


Figura 18 . Gráfico representativo do difratograma por Raios-X da nanoHA sem dopação por Ho^{165}

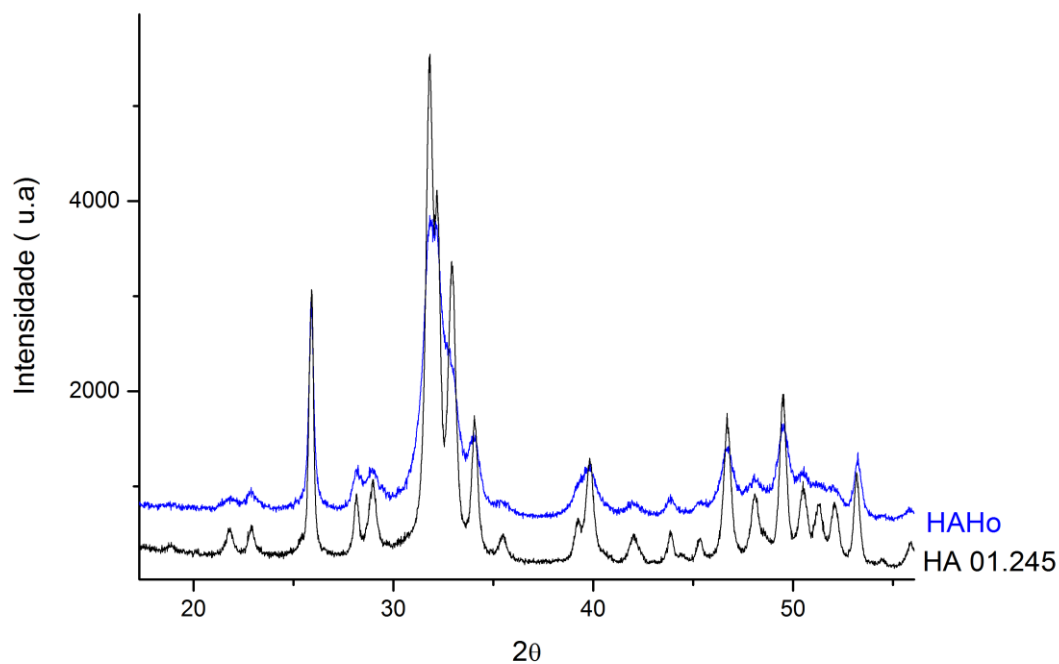


Figura 19. Difractometria por Raios-X da nanoHa dopada com 10 % de Hólmio¹⁶⁵. Observam-se os mesmos picos caracterizados, notando-se uma diferença de densidade de uma substância para outra, tendo em vista que na nanoHAHo há um percentual inferior de cálcio e uma quantidade superior de Ho^{165} quando comparada a nanoHA em sua estrutura.

4.4 Irradiação

A irradiação sob as condições descritas resultou em amostras contendo 0.037 Ci (0,13 GBq / g) na amostra. Este valor pode apoiar o uso de nano-hidroxiapatita para o procedimentos em medicina nuclear e como um novo radiofármaco para a terapia de câncer ósseo. Embora a amostra de nanohidroxiapatita dopada com Ho-165 (10%) tenha sido irradiada no IPEN, gerando nanohidroxiapatita dopada com Ho-166 (10%), as dificuldades e atrasos em matéria de transporte entre São Paulo e Rio de Janeiro para realizar os estudos em animais nos obrigou a usar a metodologia tradicional, usando processo de marcação com ^{99m}Tc nos animais estudados.

4.5 Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Pela análise do gráfico, observam-se os picos de Hidroxilas (OH), água (H₂O) e as variações de fosfatos (PO₄²⁻) compatíveis e que permitam à HA sintetizada em laboratório sua analogia à Hidroxiapatita Biológica, fazendo com que o organismo não apresente rejeição à terapia. No gráfico n, o FT-IR indica que na estrutura estudada, há todos os átomos comuns à HA, o que permite comprovar que a estrutura dos átomos não foi modificada, sendo viável para a terapia da metástase óssea.

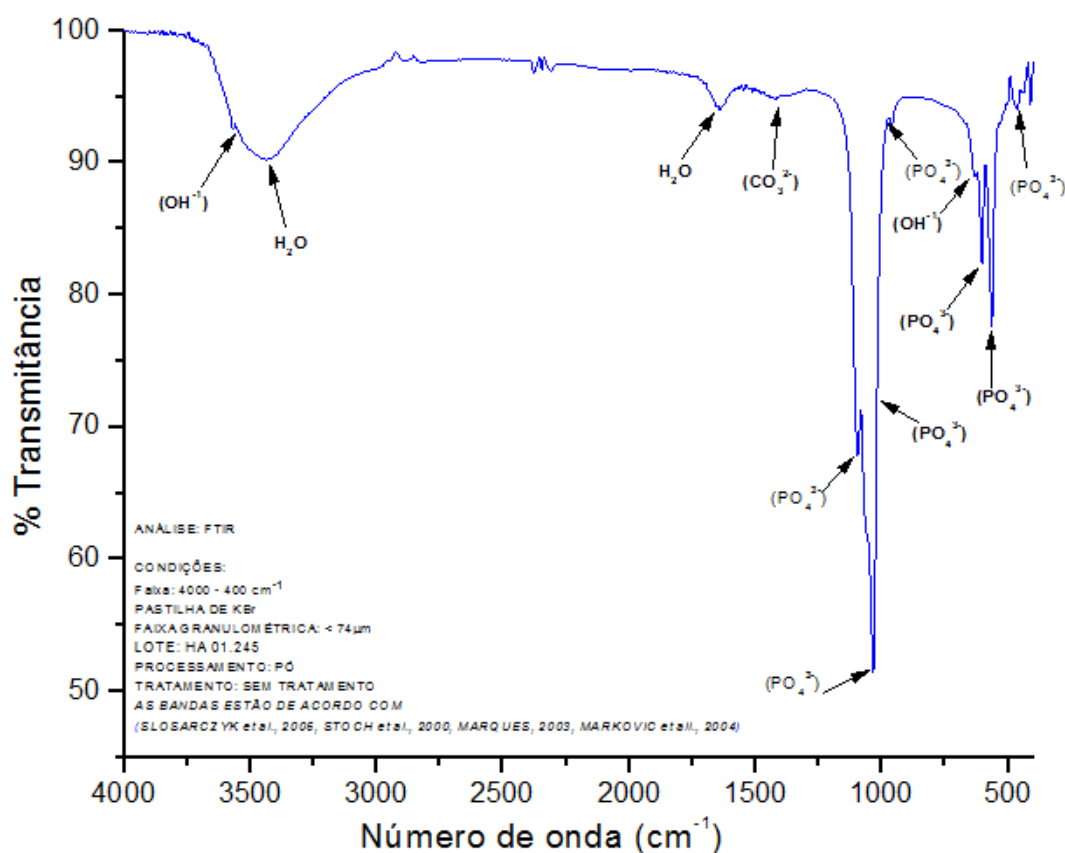


Figura 20. FT-IR da nanohidroxiapatita evidenciando presença de grupos fosfatos.

4.6 Processo de Marcação e Biodistribuição

O processo de marcação obteve um percentual de mais de 99% de ligação com o ^{99m}Tc . A estabilidade do processo de marcação foi testado durante 24 horas. Os resultados estão expressos na tabela 2. Todos os ensaios foram feitos em triplicado. A grande estabilidade do dopado nano-hidroxiapatita com Ho-165 (10%) marcado com ^{99m}Tc apoia a sua utilização para a aplicação clínica.

Teste de Marcação	Tempo em horas				
	0	1	3	5	24
	99,3				
Teste I	98,4	98,3	98,1	97,4	93,9
Teste II	99,0	97,4	97,3	95,9	91,2
Teste III	98,0	96,4	94,6	95,7	91,0
Média Final	98,5	97,4	96,7	96,3	92,0

Tabela 6. O processo de marcação obteve um percentual de mais de 99% de ligação com o ^{99m}Tc . A estabilidade do processo de marcação de nanohidroxiapatita com ^{99m}Tc foi testado durante 24 horas.

4.7 Biodistribuição

O estudo de biodistribuição das nano-hidroxiapatitas utilizou-se o método de dissecação animal e extração dos diversos órgãos para posterior contagem. Dessa forma, determina-se o percentual de acúmulo em órgão e tecidos com relação à atividade injetada, gerando gráficos de biodistribuição dos compostos marcados para diferentes órgãos (MELERO, 2008, SA et al., 2012). Os resultados estão expressos em dose por órgão (% ID / órgão) e dose por grama de tecido (% ID / g), respectivamente.

A Biodistribuição (figuras 21 e 22) mostraram resultados interessantes e pode confirmar a utilização do nano-hidroxiapatita dopada com Ho-165 (10%) como um Sistema de Liberação de Fármacos para o osso, pois a rápida captação de

nanohidroxiapatita pelo Sistema Fagocitário Mononuclear, após administração intravenosa, é a maior barreira para a sua utilização como agente de diagnóstico ou carregadores de fármacos para outros locais que não sejam as células de Küpffer no fígado e macrófago no baço (GREF et al., 1994, SOPPIMATH et al., 2001, MOSQUEIRA et al., 2001).

Nanopartículas hidrofóbicas são rapidamente recobertas por proteínas do soro, o que facilita seu reconhecimento por macrófagos e neutrófilos (GANETT & KALLINTERI, 2006, DAVIS et al., 2008). No teste realizado, obteve-se uma baixa concentração das nanohidroxiapatitas nesses órgãos (fígado e baço), propiciando assim um maior tempo de circulação destas para que exerçam sua função em outros órgãos.

A nanopartícula demonstrou um metabolismo hepático baixo (inexpressivo efeito de primeira passagem) com um grande valor expresso para a barra referente à sangue (punção sanguínea ou blood pool), demonstrando a alta afinidade por proteínas do sangue, especialmente albumina.

Em segundo lugar, a nanopartícula mostrou uma grande atração para o rim, não em termos de depuração, uma vez que é reabsorvido e ainda em circulação, como pode ser visto com a percentagem de coração. A percentagem de nano-hidroxiapatita dopada com Ho-165 (10%) que atravessou a barreira hemato-encefálica é negligenciável. O rápido clearance sanguíneo é necessário para minimizar a radioatividade no tecido não alvo.

A razão da constante de ligação do nano-radiofármaco no receptor alvo deve ser rápida e a razão de dissociação lenta. Dessa forma, o acúmulo da radiação no tecido alvo pode ser maximizado (LIU & EDWARDS, 1999)

É importante notar que, embora tenha sido utilizados ratos normais, o nano-hidroxiapatita dopada com Ho-165 (10%) apresentaram uma atração óssea e isso suporta o uso de nanoHA na terapia de metástase óssea.

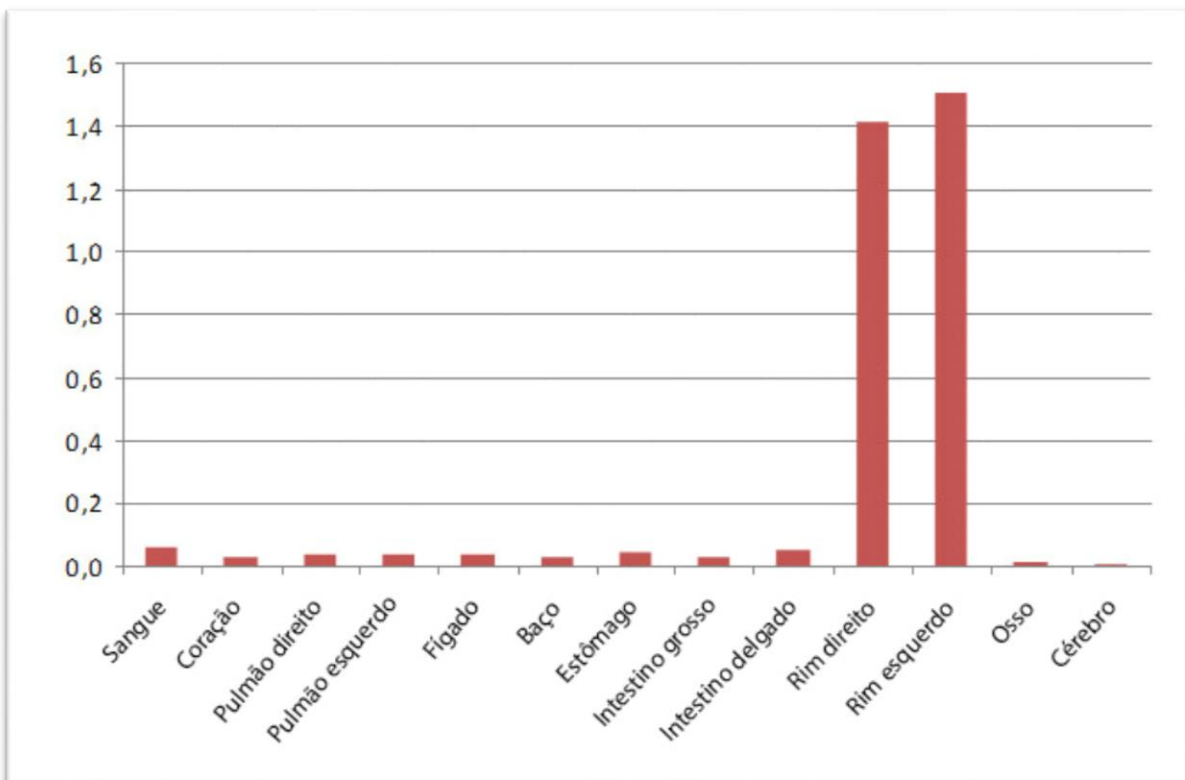


Figura 21. Gráfico do Perfil de Biodistribuição em porcentagem dose de radiação Gama/órgão das nanoHA dopadas com Hólmio 165, marcadas com ^{99m}Tc . A nanopartícula demonstrou um metabolismo hepático baixo com um grande valor expresso para a barra referente à sangue (punção sanguínea ou *blood pool*), demonstrando a alta afinidade por proteínas do sangue, especialmente albumina.

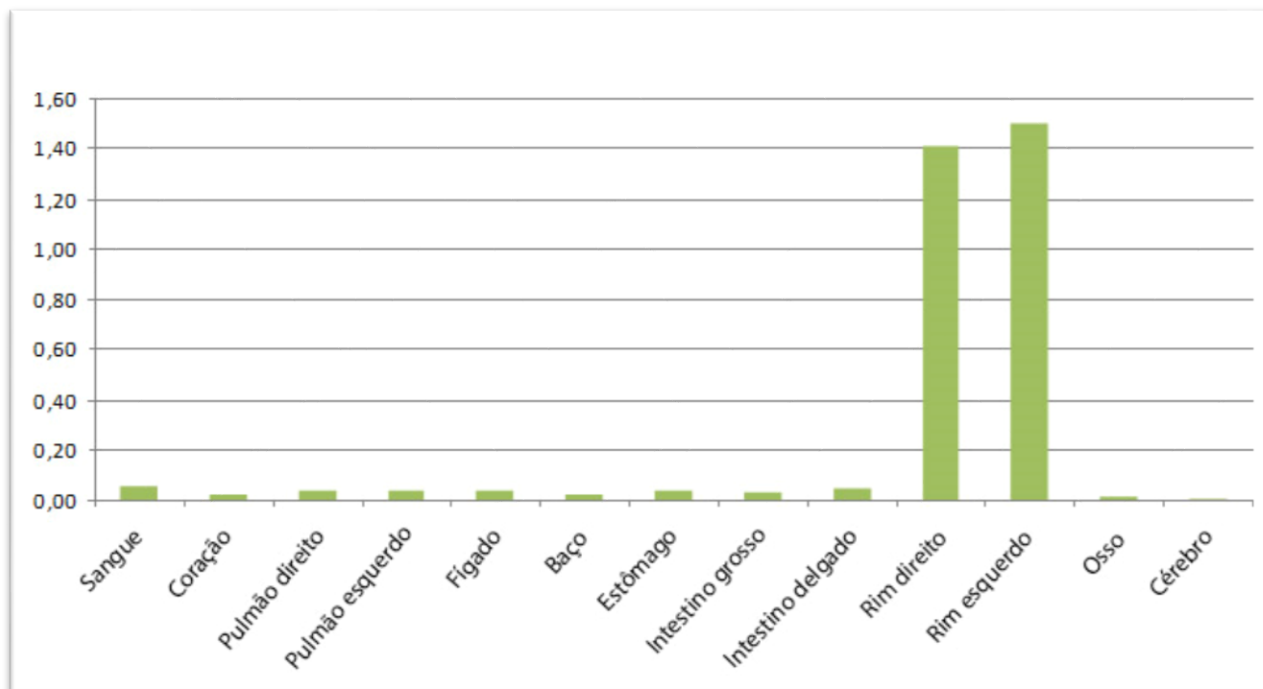


Figura 22. Gráfico da Biodistribuição em porcentagem de dose de radiação Gama/tecido (g). A nanopartícula mostrou uma grande atração para o rim e não em termos de depuração, uma vez que é reabsorvido e ainda em circulação, como pode ser visto com a porcentagem de coração.

5. CONCLUSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo da pesquisa desenvolvida em suas várias etapas, a síntese da nanopartícula foi alcançada. Nanohidroxiapatitas dopadas com 10 % Hólmio¹⁶⁵ foram sintetizadas no Laboratório de Biomaterias do CBPF. Nos ensaios realizados, foi observado que a impregnação do Hólmio¹⁶⁵ nas moléculas de nanoHA é possível.

As mesmas foram caracterizadas através de técnicas físico-químicas precisas, como XRD, MEV, FT-IR e EDS além de terem sido irradiadas no reator IEA1 do Ipen, em São Paulo. Alguns testes foram realizados no IEN/ CNEN.. Através da análise destes, pode-se concluir que a cristalinidade e impregnação estão na janela permitida para que o organismo reconheça as nanopartículas e realize as etapas de osteocondução, osteoindução e osteoregeneração.

Os testes em animais, visando avaliar a biodistribuição das nanoHA marcadas com 10 % Hólmio¹⁶⁵ e com ^{99m}Tc, apresentaram resultados satisfatórios, o que nos possibilitou concluir que ocorre baixa metabolização hepática do nano-radiofármaco, excelente clearance/depuração renal e localização das nanoHA nos ossos. Destes resultados, espera-se que mais estudos contemplem esses e demais aspectos necessários à compreensão dos mecanismos terapêuticos e diagnósticos do Hólmio¹⁶⁶, devido à emissão Beta (possibilitando tratamento do câncer ósseo) e emissão Gama (ratificando seu potencial para diagnóstico imagiológico).

Em função do panorama preocupante a respeito do câncer, estímulos para o desenvolvimento de ações que ajudem na detecção e tratamento de tumores devem ser feitos. Os avanços em nanotecnologia, principalmente pelo desenvolvimento de Sistemas de Liberação de Fármacos (Drug Delivery Systems), conjugados a agentes direcionadores que permitam o reconhecimento e liberação controlada de radiofármacos seletivamente para exames de imagem ou para terapia são imprescindíveis. Como já postulado em projetos e artigos científicos (Santos-Oliveira, 2010), a terapia com radiofármacos de variadas naturezas é ainda a terapia mais eficaz e segura ao paciente.

Os resultados iniciais são empolgantes, embora saibamos que há um amplo caminho a ser percorrido, antes de uma conclusão exata dos benefícios que a pesquisa venha a agregar tanto a terapia, quanto ao diagnóstico.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, B.A.L. et al. **Cintilografia óssea no câncer de próstata**. Radio Bras, 38(5):365-369, 2005.

ALBERNAZ MS, PATRICIO, BFC, BORDIM A, GUIMARÃES, TT, SANTOS-OLIVEIRA R. **Influence of Radiation on Polymeric Nanoparticles and in Labeling Process with ^{99m}Tc**. Advanced Science, Engineering and Medicine (2012); 4:271-272.

ARAÚJO, E. B. **Manual de Biossegurança: Radiações**. Salvador: Diretoria de Vigilância e Controle Sanitário (DIVISA), 2001.55p. pt. V, cap. 22, p. 401.

BANGHAM, A. D. "A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids". Nature 192 (480): 1197-1198, 1961.

BEDARD, G.; CHOWN, E. **The failures and challenges of bone metastases research in Radiation Oncology**. Journal of Bone Oncology, [S.l.], v. 2, n 2, p. 84-88, 2013.

Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212137413000225>>. Acesso em: 15 abr. 2015.

BOERMAN OC, DAMS ET, NIJHOF MW ET AL. **Scintigraphic evaluation of experimental chronic osteomyelitis**. J Nucl Med 41: 896 - 902

BRASIL, MS. **Secretaria de Atenção à Saúde**. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer, Inca: Rio de Janeiro, 2014
C. F. M. COSTA; M. G. LIMA; L. H. M. A. LIMA; V. V. CORDEIRO; K. M. S.

VIANA;C.V. SOUZA; H. L. LIRA. **Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v.4.3 (2009) 29-38

CHINN, P.C.; LEONARD, J.E.; ROSENBERG, J.; HANNA, N.; ANDERSON, D.R. **Preclinical evaluation of ⁹⁰Y-labeled anti-CD20 monoclonal antibody for treatment of non-Hodgkin's lymphoma**. Int. J. Oncol., 1999, 15(5), 1017-1025.

D.M.Liu, "Influence of Porosity and Pore Size on the Compressive Strength of Porous Hydroxyapatite Ceramic", Ceramics International, 23 pp. 135-139, 1997.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. "Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future". Nature Reviews Drug Discovery 3 (12): 1023-1035, 2004

DEFINO, H.L.A. et al. **Estudo da Correlação entre o Estadiamento Clínico e as Alterações Esqueléticas das Metástases Ósseas do Câncer da Mama**. ACTA ORTOP BRAS, 9(1) jan./mar.,2001.

DEMANUELE, A.; ATTWOOD, D. **"Dendrimer-drug interactions"**. Advanced drug delivery reviews 57(15): 2147-2162, 2005.

DEWANJEE, M. K. **"The chemistry of 99mTc-labeled radiopharmaceuticals"**, Seminars in Nuclear Medicine, v. 20, n. 1 (Jan), pp. 5-27. 1990.

DILWORTH, J. R.; PARROTT, S. J. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. **Chemical Society Reviews**, [S.l.], v. 27, n. 1, p. 43-55,1998. DOI: 10.1039/A827043Z.

DIMER FA, FRIEDRICH RB, BECK RCB, GUTERRES SS, POHLMANN AR. **Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos**. Quim. Nova, Vol. 36, No. 10, 1520-1526, 2013.

DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. **"Nanotecnologia"**. São Paulo, Art Liber:1-201, 2006.

EANES, E. D. 1980 . Prog. Crystal Growth Caract., vol 3, p 3-15.

ELLIOT, J. C. **Structure and chemistry of the Apatites and other Calcium Orthophosphates**. Studies in inorganic chemistry 18, Elsevier Science B.V. 1994

FERREIRA COSTA, R. **Desenvolvimento de Métodos de Preparação de Microesferas de Polímero e Resinas Marcadas com Hólmio-166**. Dissertação de Mestrado – IPEN/CNEN., 2008.

FULMER, M. T.; MARTIN, R. I.; BROWN, P. W. **Formation of Calcium deficient Hidroxyapatite at near-physiological temperature**. Journal of Materials Science: Materials in Medicine 3, p. 299-305. 1992.

GUASTALDI A. C et al. **Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos.** Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v.4.3. 2010.

HAMOUDEH, M., KAMLEH, M. A., DIAB, R., *et al.* **“Radionuclides delivery systems for nuclear imaging and radiotherapy of cancer”**, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 12 (Sep), pp. 1329-1346. 2008.

HOFBAUER LC, KHOSLA S, DUNSTAN CR, LACEY DL, BOYLE WJ and RIGGS BL: **The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption.** J Bone Miner Res 15: 2-12, 2000.

Holmim-166. **OAK Ridge National Laboratory.** Disponível em: <http://www.ornl.gov/sci/isotopes/r_ho166.html > Acesso em: 20/12/2014.

HUG R et al. **Therapeutic effects of holmium-166 chitosan complex in rat brain tumor model.** Yonsei Med J (2005); 46(1):51-60
ISSN 1809-8797

ITO, A.; MIYAZOE, R.; MITOMA, J.; AKAO, T.; OSAKI, T.; KUNITAKE, T. **"Synthetic cationic amphiphiles for liposome-mediated DNA transfection"**. Biochemistry International 22 (2): 235-241, 1990.

JURISSON, S., BENEDICT, J., ELDER, R.C., DEUTCH, E., WHITTLE, R., **Calcium affinity of coordinated diphosphonate ligands.** Inorg. Chem., 22, 1332, 1983.

KONG, L. G.; MUME, E.; TRIANI, G.; SMITH, S. V.; Langmuir 2013, 29, 5609

LAHIRI, S.; VOLKERS, K. J.; WIERCZUNSKI, B. **Production of ^{166}Ho through ^{164}Dy (n, γ) ^{165}Dy (n, γ) ^{166}Dy β^- ^{166}Ho and separation of ^{166}Ho .** Appl. Radiat. Isot., v.61, p.1157-61, 2004.

LAMMERS, T.; AIME, S.; HENNINK, W. E.; STORM, G.; KIESSLIN, F.; Acc. Chemical. Res. 2011, 44, 1029.

LIU, Y.; MIYOSHI, H.; NAKAMURA, M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: A promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional

nanoparticles. **International Journal of Cancer**, [S.l.], v. 120, n. 12, p. 2527-2537, 2007. DOI: 10.1002/ijc.22709.

MA, J.; FENG, P.; YE, C.; WANG, Y.; FANG, Y. **An improved interfacial coacervation technique to fabricate biodegradable nanocapsules of an aqueous peptide solution from polylactide and its block copolymers**. Colloid and Polymer Science, v.279, p. 387-392, May 07 2001.

MATSUURA, M.; YAMAZAKI, Y.; SUGIYAMA, M.; KONDO, M.; ORI, H.; NANGO, M.; OKU, N. **"Polycation liposome-mediated gene transfer in vivo"**. Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes 1612 (2): 136-143, 2003

McMAHON RE, WANG L, SKORACKI R, MATHUR AB. **Development of nanomaterials for bone repair and regeneration**. J Biomed Mater Res B Appl Biomater. (2013); 101(2):387-97

MELO, F. H. M.; JUNQUEIRA, M. S.; CHAMMAS, R. **Mecanismos de invasão e metástases**. In: (Ed.). 2ed. São Paulo: Tedmed Editora, 2003. p.201-226.

MEOHAS, W. et al. **Metástase óssea: revisão da literatura**. Revista Brasileira de Cancerologia; 51(1): 43-47, 2005.

NANDI SK, KUNDU B, GHOSH SK, De DK, BASU D. **Efficacy of nano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat**. J. Vet. Sci ; 9(2):183-91,2008.

OTT, G., SINGH, M., BRIONES, M., SENAWAN, E., UGGOZZOLI, M., O'HAGAN, D.T. J. A cationic sub-micron emulsion (MF59/DOTAP) is an effective delivery system for DNA vaccines. J. Control. Release, v. 1-3, n.79, p.1-5, 2002.

PAGET, S. **The distribution of secondary growths in cancer of the breast**. The Lancet, [S.l.], v. 1, n. 3421, p. 571-573, 1889. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)49915-0.

REUVENIE T, MOTIE M, ROMMAN Z, POPOVTZER R.. **Target gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer: an in vivo study**. Int J Nanomed. 6:2859-2864. 2011.

ROODMAN GD: **Mechanisms of bone metastasis**. N Engl J Med 350: 1655-1664, 2004.

ROSSI-BERGMANN. **A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico**. Cienc. Cult. vol.60 no.2 São Paulo, 2008.

SA LTM, ALBERNAZ MS, PATRICIO BFC, FALCAO Jr MV, COELHO, BF, BORDIM A, ALMEIDA JC, SANTIOS-OLIVEIRA R. **Biodistribution of nanoparticles: Initial considerations**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 70:602-604, 2012.

SA LTM, PESSOA C, MEIRA AS, SILVA, SANTOS- OLIVEIRA R. **Development of nanoaptamers using a mesoporous silica model labelled with 99mTc for cancer targeting**. Oncology. 82: 2013-217, 2012.

SAAD, E.D. et al. **Inibidores da aromatase no câncer de mama**. Revista Brasileira de Cancerologia. 48(4): 555-567, 2002.

SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. 6ª edição. Nova Iorque: Springer Verlag, 2010. 409 p. DOI: 10.1007/978 1 4419 5860 0.

SANTOS, A.C.F.; SILVA, E.M.; PACHECO, J.B.P. **Avaliação da primeira campanha para o diagnóstico e prevenção do câncer de próstata promovido pela prefeitura municipal de Anápolis– GO**. Anuário da Produção de Iniciação Científica Discente, v.13, n.17, p.25-42, 2010.

SANTOS-OLIVEIRA, R, ALBERNAZ, MS, PATRICIO, BFC. **Development of Nanoradiopharmaceuticals by Labelling Polymer Nanoparticles with Tc-99m**. World Journal of Nuclear Medicine. 12:24-26, 2013.

SANTOS-OLIVEIRA, R. **Radiofarmácia**. 1ª edição. São Paulo: Editora Atheneu, 2010. 161 p.

SCHIRRMESTER, H. Detection of Bone Metastases in Breast Cancer by Positron Emission Tomography. **Radiologic Clinics of North American**, [S.l.], v. 45, n. 4, p. 669-676, 2007. DOI: 10.1016/j.rcl.2007.05.007.

SELVAGGI, G.; SCAGLIOTTI, G. V. **Management of bone metastases in cancer: A review**. Critical Reviews in Oncology/Hematology, [S.l.], v. 56, n. 3, p. 365-378, 2005. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2005.03.011.

SEPPENWOOLDE, J. H.; NIJSEN, J. F; BARTELS, L. W.; ZIELHUS, S.W.; VAN

HET SCHIP, A. D.; BAKKER, C. J. **Internal biodistribution of holmium-loaded microspheres in animal models**. Magn. Reson. Med., v.53, p.76-84, 2004

SHAFFER, C. **"Nanomedicine transforms drug delivery"**. Drug Discovery Today 10 (23-24): 1581-1582, 2005.

SIMONET WS, LACEY DL, DUNSTAN CR, KELLEY M, CHANG MSBENNETT L, BOONE T, ReENSHAW-GEGG L, et al: **Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density**. Cell 89: 309-319, 1997.

SMITS et al. **Holmium-166 radioembolisation in patients with unresectable, chemorefractory liver metastases (HEPAR trial): a phase 1, dose-escalation study**. J Exp Clin Cancer Res ; 24(2): 43. 2012

SMITS MLJ et al. **Holmium-166 radioembolization for the treatment of patients with liver metastases: design of the phase I HEPAR trial**. J Exp Clin Cancer Res; 29(1):70. 2010.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Histologia Humana**. 2^oed. São Paulo: Manole, 2001. 1-417

TEIXEIRA, L.E.M. et al. **Complicações precoces no tratamento ortopédico das metástases ósseas**. Rev Bras Ortop.;44(6):519-23, 2009.

TEWSON, T. J; KROHN, K. A. **Pet radiopharmaceuticals: state-of-the-art and future prospects**. Sem. Nucl. Med., v.28, n.3, p.221-234, 1998.

THOMAS, V.; DEAN, D. R.; VOHRA, Y. K. **"Nanostructured biomaterials for regenerative medicine"**. Current Nanoscience 2 (3): 155-77, 2006

TONON, T.C.A.; SCHOFFEN, J.P.F. **CÂNCER DE PRÓSTATA: UMA REVISÃO DA LITERATURA**. Revista Saúde e Pesquisa, v. 2, n. 3, p. 403-410, set./dez. 2009 - ISSN 1983-1870.

VALENTE, E.S. **Sementes cerâmicas radioativas com Ho-166 e Sm-153 com perspectiva de uso em braquiterapia**. 2010. Universidade Federal de Minas Gerais. 2010.

VALLABHAJOSULA, S.; DE LEON, M. J. **Increased fibrillar amyloid- burden in normal individuals with a family history of late-onset Alzheimer's**. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 107, n. (13), p. 5949-5954, Apr 30 2010.

VASCONCELLOS, D.V.; DUARTE, M.E.L.; MAIA, R.C. **Efeito anti-tumoral dos bisfosfonatos: Uma Nova Perspectiva Terapêutica**. Revista Brasileira de Cancerologia; 50(1): 45-54, 2004.

VENTE MAD et al. **Holmium-166 poly (Llactic acid)microsphere radioembolisation of the liver: technical aspects studied in a large animal model**. Eur Radiol(2010); 20(4)862-869.

WANG Z, LI M, YU B, CAO L, YANG Q, SU J. **Nanocalcium-deficient hydroxyapatite-poly(e-caprolactone)-polyethylene glycol-poly(e-caprolactone) composite scaffolds**. Int J Nanomedicine (2012); 7:3123-31.

WANG, J.S.; TING, G. The status and prospects of radiopharmaceutical research for target radiotherapy in Taiwan. *Ann Nucl Med Sci. v.15, p.195-200,2002.*)

Wilczewska A.Z. et al. **Nanoparticles as drug delivery systems**. Pharmacological Reports 2012, 64, 1020-1037.

World Health Organization. **Internacional Agency for Research on Cancer**, WHO: Lyon, 2014.

YIN, J. J.; POLLOCK, C. B.; KELLY, K. **Mechanisms of cancer metastasis to the bone**. Cell Research, [S.I.], v. 15, n.1, p. 57-62, 2005. DOI: 10.1038/sj.cr.7290266.

7. ANEXOS

7.1 Ofício da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 02 de agosto de 2013.

Ofício nº 606/13

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof Ralph Santos Oliveira**

Faculdade de Farmácia

Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Processo nº 23076.020578/2013-27

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

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

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

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

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

Atenciosamente,


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

CCB: Integrar para desenvolver

7.2 Anexo I – Artigo Científico

Nano-Hydroxyapatite Doped with Ho-166 as Drug Delivery System for Bone Cancer Therapy

Franciana Maria Rosa da Silva¹, Julio Cezar de Almeida Junior¹, Elizabeth Eugênio de Mello Oliveira², Marta de Souza Albernaz³, Alexandre Malta Rossi³, Ralph Santos-Oliveira¹

- 1- Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals, Rio de Janeiro, Brazil
- 2- Nuclear Engineering Institute, Rio de Janeiro, Brazil
- 3- University Hospital Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro, Brazil
- 4- Brazilian Center for Physics Research, Rio de Janeiro, Brazil

All correspondence to

Dr Ralph Santos-Oliveira

Laboratory of Nanoradiopharmaceuticals
ralpholiveira@uezo.rj.gov.br

ABSTRACT

The use of nanotechnology is increasing each day. The application in human health has been one of the most important fields. Regarding this application and some materials, hydroxyapatite is among the one most studied. The affinity of hydroxyapatite for so many body constituents is incredible and his use as nanoparticle opened a totally new world. However, although all the development in the field, encapsulating a nano-hydroxyapatite still been a sensible point until now. In this article we describe a usefully methodology. This new possibility arise new applications, especially for oncology and radiopharmacy,

due the possible to link a radionuclide and /or other substances like aptamers to this new nanoparticle, providing this new structure features adjuvant to conventional one.

Key words: radiopharmaceuticals, nanotechnology, oncology, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy.

INTRODUCTION

The design and development of biomaterial that will replace the form and function of native tissue while promoting regeneration without necrosis or scar formation is a challenging area of research. Unique properties of nanomaterials, such as increased wettability and surface area, lead to increased protein adsorption when compared with conventional biomaterials. Cell-scaffold interactions at the cell-material nano interface may be mediated by integrin-triggered signaling pathways that affect cell behavior (McMahon et al, 2013). Studies have shown that nano hydroxyapatite (n-HA) has excellent biological performance, and was a potential candidate as a bioactive material for bone tissue repair. Nevertheless, the extensive application of n-HA is still limited by its powder form and brittle nature. Biodegradable polymers and their copolymers are widely investigated and used in bone regeneration, dental repair, orthopedic fixation devices, as well as many other biomedical applications (Wang et al 2012, Nandi et al, 2008).

A radiopharmaceuticals used for therapy must have some features like: i) reduce the effects of irradiation on healthy cells and concentrate the irradiation effect on cancerous cells, ii) the half-life has to be of some hours upon to 70 days; iii) the radionuclide must be a beta or alpha emitter. All this feature is match in Holmium-166 (Ho-166). The Ho-166 shows a half-life of 26, 83 hours and beta emission of 1,855 MeV (51%) and 1,776MeV (48%) and a nuclide purity of 99%. (Smits et al, 2010, Huh et al 2008, Vente et al, 2010).

The use of a nano-hydroxyapatite doped with Ho-166 for bone therapy may represent an innovative and new way to perform bone therapy especially in primary bone cancer.

MATERIALS AND METHODS

Hydroxyapatite (HA) doped with Ho-165

Was used the method of precipitation by humid way. A solution A containing calcium + holmium was added to a phosphate solution B, using water pump (masterflex) under a flow of 30 mL / min. Ammonia was introduced into the system using the pump (masterflex) with a flow 2-3 mL/ min to achieve a pH around 9. The synthesis and digestion temperature was around 37°C (310,15°K) and 1 atm. There was mechanical agitation in an IKCA-MAGHS7 device at a speed of 240 RPM, overnight. The digestion lasted approximately 24 hours to be performed, and after that, the sample was taken to the greenhouse (FAMO, FIC04 model) for lyophilization. After lyophilization the sample was macerated and screened into a woven gauze opening

of 250 Å, mesh 60, stainless 5x2 for filtering the sample. In the final a n-HA doped with 10% of HO-165 was obtained.

Irradiation

The sample (10 mg) of nano-hydroxyapatite doped with 10% of Ho-165 was irradiated in quartz into aluminum casing at the reactor IEA-RI (IPEN-CNEN-SP) by 1 hour with a neutron flux of $1,0 \times 10^{13} \text{ n.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$.

X-Ray Diffractometry (XRD)

Sample mineral phase and crystallinity were evaluated by X-ray diffractometry (XRD) with CuK α radiation at 40 kV and 40 mA.

Scanning Electron Microscopy (SEM) with Energy Dispersive Spectroscopy (EDS)

The morphology of hydroxyapatite nanoparticles were examined by Scanning Electron Microscopy (SEM) (TM 3000 – Hitachi). Also the presence of the element holmium was analyzed by Energy Dispersive Spectroscopy.

Perturbed Angular Correlation (PAC)

The hyperfine interaction (as a result of nuclear moments/electromagnetic fields interactions) of the nuclear probe ^{111}Cd in the Hydroxyapatite doped with Ho-165 compound has been investigated by gamma-gamma perturbed angular correlation (PAC) nuclear spectroscopy, in a spectrometer of PAC in the Laboratory of Angular Correlation of the Brazilian Center for Physics Research (LCA/CBPF). The equipment used is based

on the principle of operation system “slow-fast”, and is composed of 4 conical BaF_2 detectors optically coupled to photomultipliers, placed on a circular table forming angles of 90° .

The measurement was taken in room temperature for the hydroxyapatite doped with Ho-165, thermalized and not thermalized. The thermalized samples were heated at $T = 1273$ K for 6 h. The nuclear probe of ^{111}Cd was broadcast in the structure of the material by diffusion, to this end, the samples were sealed in quartz tubes and then heated, together with the radioactive PAC probe, at $T = 1073$ K for 12 h.

Biodistribution

Animal selection

In this study was used eight Wistar rats (male and female) between 400-450 g and with a mean age of 12 months.

Labeling Process

The labeling process was done using 150 μL of nano-hydroxyapatite doped with 10% Ho-165 incubated with stannous chloride (SnCl_2) solutions (80 $\mu\text{L}/\text{mL}$) (Sigma-Aldrich) for 20 minutes at room temperature. Then this solution was incubated with 100 μCi (approximately 300 μL) of technetium-99m for another 10 minutes in order to label their structures. A thin layer chromatography (TLC) was made using Whatman paper n° 1 to identify the correct labeling.

Administration

The rats were maintained under controlled temperature ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) with water and food *ad libitum*. No sedative or anesthetic was used. The labeled samples (3.7 MBq/0.2 mL) were administered by intraocular injection. After 2 hours of drug administration, the rats were sacrificed by asphyxiation (CO_2 chamber) and then dissected and their organs removed, weighed and the radioactivity uptake counted in a gamma counter (Perkin Elmer). Results were expressed as percentage of injected dose per gram of tissue. The Institutional Review Board and the Animal Ethics Committee approved the study protocol.

RESULTS & DISCUSSION

Irradiation

The irradiation under the conditions described resulted in a 0,037 Ci (0,13GBq/g) sample. This value can support the use of nano-hydroxyapatite for nuclear medicine procedure and as a new radiopharmaceutical for bone cancer therapy.

Although the sample of nano-hydroxyapatite doped with Ho-165 (10%) has been irradiated the difficulties and delays regarding transportation from São Paulo to Rio de Janeiro to perform the animal studies forced us to use the traditional methodology using $^{99\text{m}}\text{Tc}$ labeling process.

Labeling Process and Biodistribution

The labeling process showed a percentage over 99% of ligation with the ^{99m}Tc . The stability of the labeling process was tested for 24 hours. The results are expressed in table 1. All the tests were made in triplicate. The great stability of the nano-hydroxyapatite doped with Ho-165 (10%) labeled with ^{99m}Tc supports their use for clinical application.

The biodistribution (figures 1 and 2) showed interesting results and can confirm the use of the nano-hydroxyapatite doped with Ho-165 (10%) as a drug delivery system for bone. First the nanoparticle demonstrated a low hepatic metabolism with a great value in blood pool confirming the high affinity for blood proteins, especially albumin. Second, the nanoparticle showed a great attraction for the kidney and not in terms of clearance, since it is reabsorbed and still circulating, as can be seen with the percentage in heart. The percentage of nano-hydroxyapatite doped with Ho-165 (10%) that crossed the brain barrier is negligible. Is important to notice that although has been used normal rats the nano-hydroxyapatite doped with Ho-165 (10%) showed a bone attraction and this support the use for bone therapy.

Table 1 – Labeling stability of Nanoparticles of Hydroxyapatite with ^{99m}Tc

Labeling test	Time in Hours				
	0	1	2	3	4
Test I	98,4	98,3	98,1	97,4	93,9
Test II	99,0	97,4	97,3	95,9	91,2
Test III	98,0	96,4	94,6	95,7	91,0
Final Average	98,5	97,4	96,7	96,3	92,0

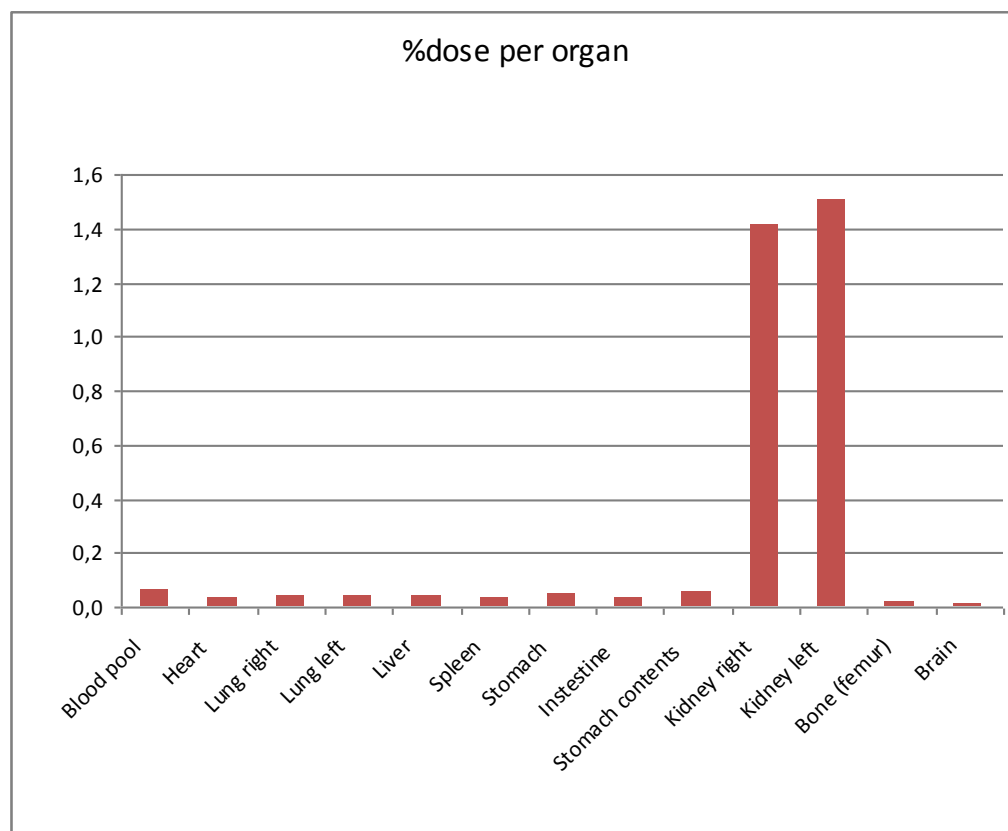


Figure 1 – Biodistribution % dose per organ of radioactivity

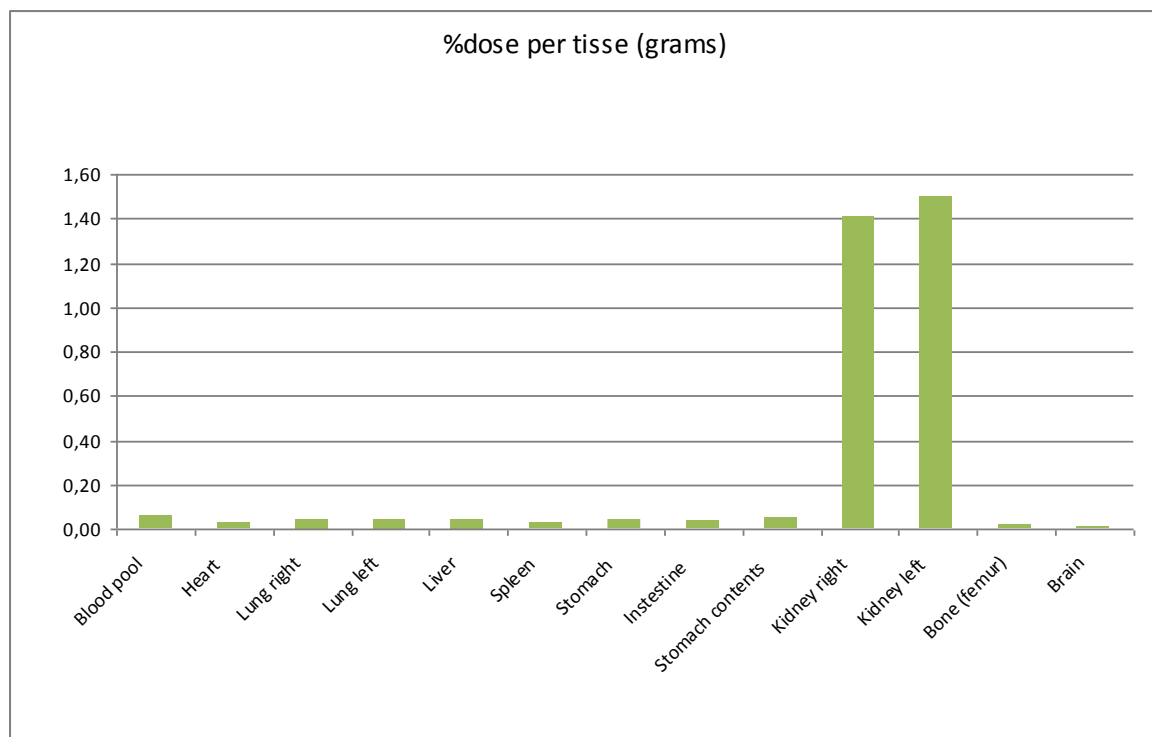


Figure 2 –Biodistribution % dose per tissue (g) of radioactivity

Perturbed Angular Correlation (PAC)

The results shows that the PAC analysis identify the presence of Holmium and also the presence of TCP formed during the synthesis process of the nano-hydroxyapatite doped with Holmium-165 (figure 3 and figure 4).

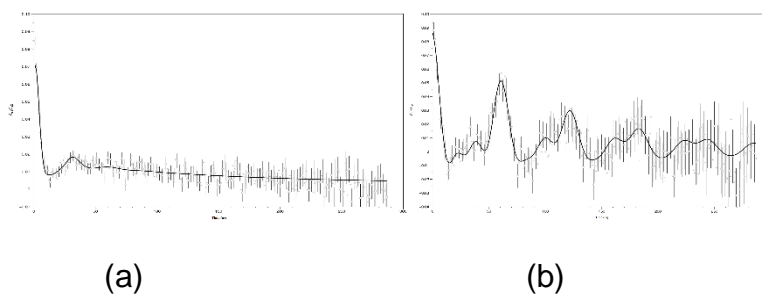


Figure 3 : Hydroxyapatite doped with Holmium-165 Ho not thermalized (a) and thermalized (a)

Scanning Electron Microscopy (SEM) with Energy Dispersive Spectroscopy (EDS)

The SEM image showed a nanoparticle with a size ranging from 200-250nm and with an irregular shape (figure 5). The EDS analysis showed the presence of the holmium and confirmed the 10% dopped (figure 6 and table 3).

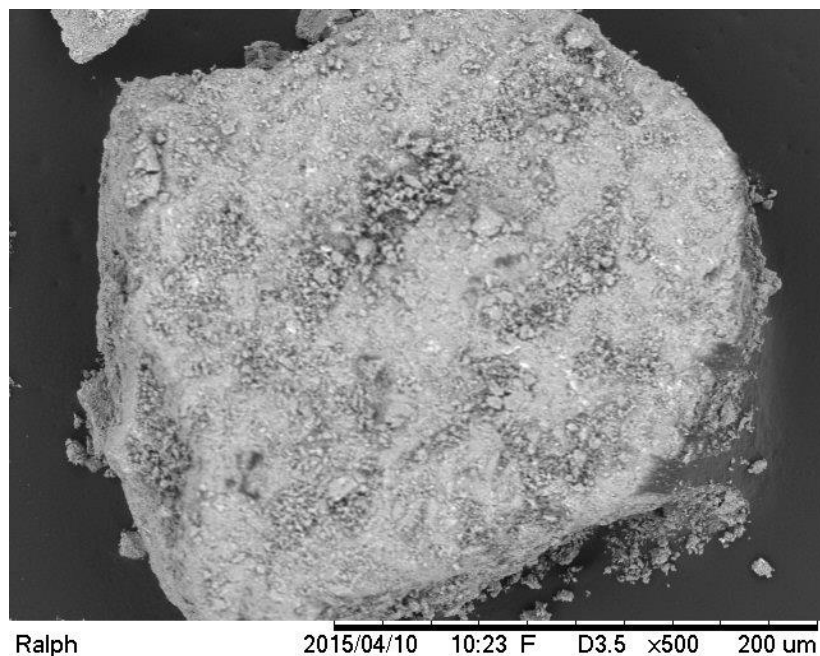


Figure 5: SEM image showing the size of 250 nm of the hydroxyapatite dopped with Ho-165.

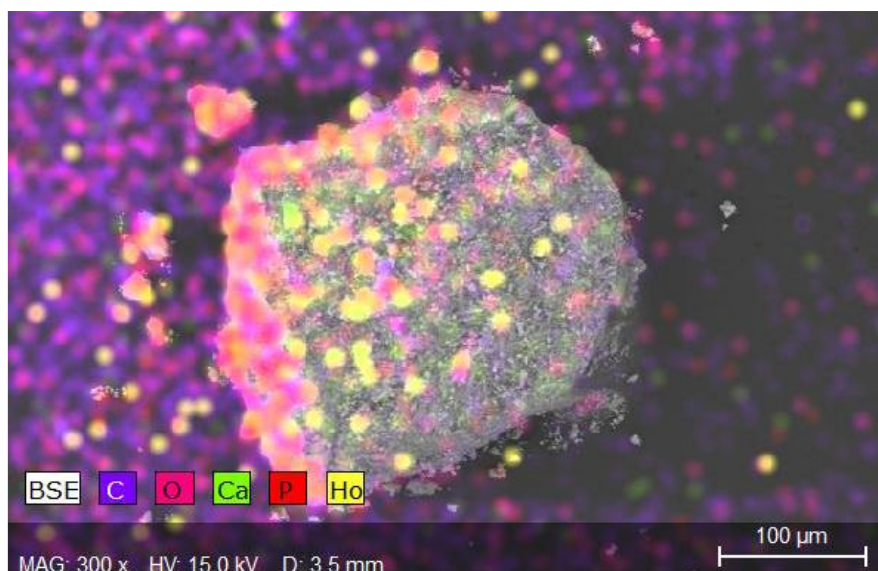


Figure 6: EDS analysis showing the presence of holmium in the hydroxyapatite

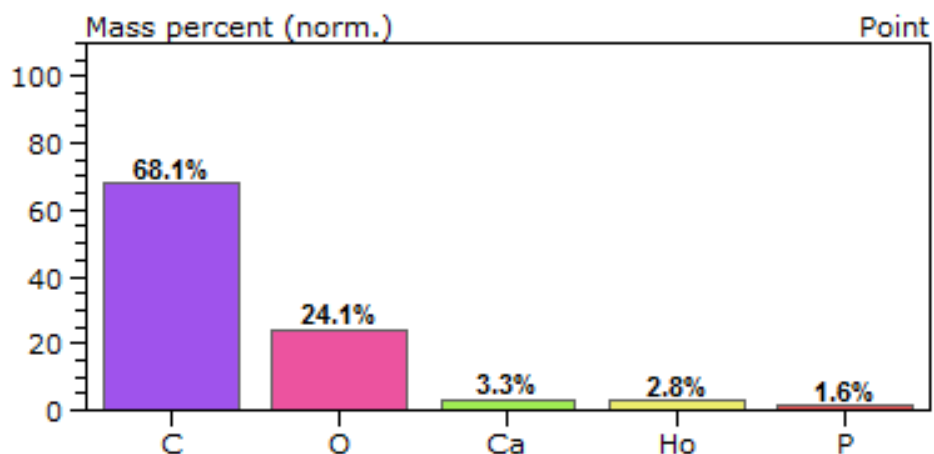


Table 3: EDS analysis demonstrating the presence of holmium and the percentage in the sample.

X-Ray Diffractometry (XRD)

The nanostructured powder (nano-hydroxyapatite doped with Ho-165) before it is presented an X-ray diffraction pattern of a pure and crystalline hydroxyapatite as shown in Figure 5.

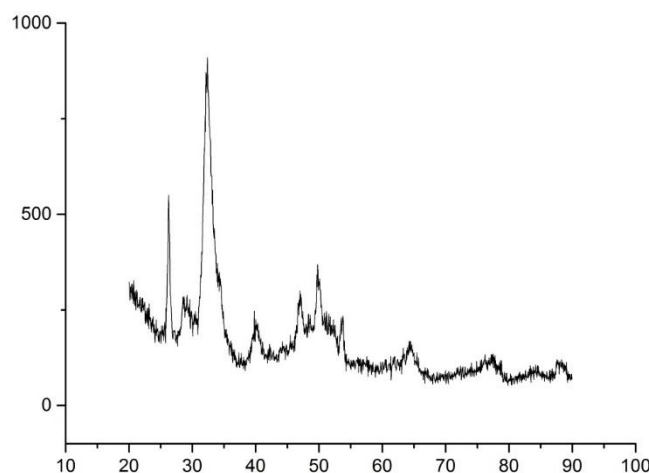


Figure 5: X-ray diffraction pattern of nanostructured hydroxyapatite doped with Ho-165

CONCLUSION

The results demonstrated that the nanoparticle doped with Ho-165 can be used in Nuclear Medicine purposes, especially for both bone cancer diagnosis and therapy.

REFERENCES

McMahon RE, Wang L, Skoracki R, Mathur AB. Development of nanomaterials for bone repair and regeneration. [J Biomed Mater Res B Appl Biomater.](#) (2013); 101(2):387-97

Wang Z, Li M, Yu B, Cao L, Yang Q, Su J. Nanocalcium-deficient hydroxyapatite-poly(e-caprolactone)-polyethylene glycol-poly(e-caprolactone) composite scaffolds. *Int J Nanomedicine* (2012); 7:3123-31.

Nandi SK, Kundu B, Ghosh SK, De DK, Basu D. Efficacy of nano-hydroxyapatite prepared by an aqueous solution combustion technique in healing bone defects of goat. *J. Vet. Sci* (2008); 9(2):183-91.

Smits MLJ et al. Holmium-166 radioembolization for the treatment of patients with liver metastases: design of the phase I HEPAR trial. *J Exp Clin Cancer Res* (2010); 29(1):70
 Hug R et al. Therapeutic effects of holmium-166 chitosan complex in rat brain tumor model. *Yonsei Med J* (2005); 46(1):51-60

Vente MAD et al. Holmium-166 poly (Llactic acid)microsphere radioembolisation of the liver: technical aspects studied in a large animal model. *Eur Radiol*(2010); 20(4)862-869.

Sa LTM, Albernaz MS, Patricio BFC, Falcão Jr MV, Coelho, BF, Bordim A, Almeida JC, Santos-Oliveira R. Biodistribution of nanoparticles: Initial considerations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2012); 70:602-604

Santos-Oliveira R, Albernaz, MS, Patricio, BFC. Development of Nanoradiopharmaceuticals by Labelling Polymer Nanoparticles with Tc-99m. *World Journal of Nuclear Medicine*. (2013); 12:24-26.

Albernaz MS, Patricio, BFC, Bordim A, Guimarães, TT, Santos-Oliveira R. Influence of Radiation on Polymeric Nanoparticles and in Labeling Process with 99mTc. *Advanced Science, Engineering and Medicine* (2012); 4:271-272