



**“IDENTIFICAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL
DE UM POLIPEPTÍDEO ISOLADO DA PEÇONHA
DO PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri* E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL USO NO
DIAGNÓSTICO DE TUMORES”**

Juliana Soprani

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre.

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Comissão Nacional de Energia Nuclear
CENTRO DE DESENVOLVIMENTO DA TECNOLOGIA NUCLEAR
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações,
Minerais e Materiais

**“IDENTIFICAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DE UM POLIPEPTÍDEO
ISOLADO DA PEÇONHA DO PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri* E
AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL USO NO DIAGNÓSTICO DE TUMORES”**

JULIANA SOPRANI

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia das Radiações, Minerais e Materiais como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre.

Área de concentração: Ciência e Tecnologia das Radiações: Técnicas Nucleares Aplicadas à Saúde e a Biologia.

Orientadora: Dra. Raquel Gouvêa dos Santos


Belo Horizonte

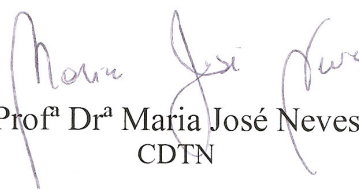
2008

A presente dissertação de mestrado, intitulada “**Identificação do efeito antitumoral de um polipeptídeo isolado da peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* e avaliação do seu potencial uso no diagnóstico de tumores**”, de autoria de **Juliana Soprani**, foi defendida e aprovada em 18 março de 2008 pela Banca Examinadora abaixo assinada.

Belo Horizonte, 18 de março de 2008


Prof.^a. Dr.^a. Raquel Gouvêa dos Santos
CDTN – Orientadora


Prof. Dr. Domokos Máthé
Instituto de Radiohigiene, Budapeste –Hungria


Prof.^a Dr.^a Maria José Neves
CDTN


Prof. Dr. Mário Sérgio Palma
UNESP

“São fúteis e cheias de erros as ciências que não nasceram da experimentação, mãe de todo conhecimento...”

Leonardo da Vinci

Agradeço a (os)...

Deus, pela vida, e por tornar tudo possível apesar de minhas fraquezas... por ter iluminado meu caminho com pessoas maravilhosas que me deram força para seguir em frente...

Meus pais, *Luiz e Eliane*, pelo amor incondicional... por cada palavra de carinho, por me apoiarem em cada decisão, pela presença constante nos momentos difíceis em que pensei em desistir... por me ensinarem o caminho do bem e da perseverança. Obrigada por serem pessoas tão maravilhosas. Não teria conseguido mais essa vitória sem vocês...

Minha irmã, *Taisla*, futura farmacêutica, pelas horas gastas ao msn, pela amizade e confiança apesar da distância, pelo conforto nos momentos de saudade...

Meu irmãozinho, *Luiz Enrico*, que trouxe mais felicidade e amor para minha vida...

Jefferson, por ser meu companheiro... por seu carinho, paciência, atenção e dedicação, me apoiando nessa caminhada e me dando força para seguir em frente apesar da distância e da saudade... por seu amor e generosidade... por me fazer tão feliz!

Dra. Raquel, minha orientadora, por toda sua atenção, dedicação, confiança, e por todos seus valiosos ensinamentos.

Marcella e Priscilla, pessoas maravilhosas sem as quais não teria conseguido realizar esse trabalho. Obrigada por cada dica, cada técnica ensinada, cada pensamento compartilhado... por estarem sempre dispostas a me ajudar... obrigada pelos passeios maravilhosos e pela alegria de viver... por terem deixado de ser colegas e terem se tornado amigas... vocês vão estar sempre no meu coração...

Amigos do Laboratório de Radiobiologia, *Lu, Paulo, Nino, Thaíssa, Jú Lage, Fred, Bárbara, Márcia, Estefânia*, pelo convívio diário, pelas risadas, pelos desabafos... por se tornarem minha família nesta cidade... adoro vocês!

Ju Cassoli e Roberta por terem compartilhado meus dias mais difíceis e tornado minha jornada mais leve e alegre... pelas horas intermináveis de conversas e risadas no sofá, pelos filmes horrorosos, pelo companheirismo e amizade, enfim... por esses dois anos de casa compartilhada... adoro vocês! Ju... obrigada por sua prontidão e generosidade em estar sempre disposta a me ensinar...

Amigos do Laboratório de Química de Proteínas (UFES), *Jú Bambrilla, Rafa, Renan, Pedro, e Felipe*, por tantos momentos divertidos! Em especial a *Gillian*, por sua disposição em me ajudar, pelo incentivo, pela paciência em ouvir minhas intermináveis reclamações... por todas as risadas compartilhadas... obrigada por sua amizade e carinho...

Minha turma da Pós-Graduação, pela convivência alegre e pelos momentos de aprendizagem compartilhados...

Dra. Suely Gomes de Figueiredo, sempre disposta a me ajudar e ensinar com prazer tudo que sabe... por acreditar em mim e continuar sempre uma grande amiga... pela colaboração no fracionamento e fornecimento da peçonha do *Scorpaena plumieri*.

Professores da Radiobiologia, *Dr. Antero Silva e Dra. Maria José Neves*, por sua atenção e auxílio...

Professor *Dr. Alfredo Góes*, por permitir o uso dos equipamentos do seu laboratório e por estar sempre disposto a colaborar.

Professor *Geovani Cassali* pela atenção, boa vontade e colaboração nos experimentos com animais implantados com Tumor se Ehrlich.

Dr. Carlos Simal, pelo fornecimento do ^{99m}Tc e ^{131}I .

Dr. Sérgio Túlio Alves Cassini por permitir a utilização de seu laboratório e equipamentos.

Professores da pós-graduação, por todo conhecimento transmitido...

Zacarias, pelo apoio técnico.

Bibliotecárias, Virgínia, Lenira e Nívea.

Secretárias da pós-graduação, *Roseli e Andréia*, pelo auxílio nas questões administrativas.

CDTN, pelas instalações e apoio financeiro

Você, que por esquecimento, mas não por falta de merecimento, não encontrou seu nome nesta lista, mas que participou de alguma forma para realização deste trabalho...

MUITO OBRIGADA!

IDENTIFICAÇÃO DO EFEITO ANTITUMORAL DE UM POLIPEPTÍDEO ISOLADO DA PEÇONHA DO PEIXE-ESCORPIÃO *Scorpaena plumieri* E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL USO NO DIAGNÓSTICO DE TUMORES

Juliana Soprani

RESUMO

O câncer tem levado a óbito milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar dos conhecimentos a respeito dos mecanismos moleculares desta patologia estarem aumentando rapidamente, poucos avanços estão sendo conseguidos nas clínicas de terapia e diagnósticos de tumores, o que torna de extrema importância o desenvolvimento de novas moléculas para fins terapêuticos e diagnósticos. Toxinas animais possuem uma diversidade de atividades biológicas e farmacológicas e têm se mostrado fonte rica de moléculas com potencial terapêutico. Diversos trabalhos têm sido realizados com toxinas de animais terrestres, mas toxinas de peixes venenosos marinhos são uma fonte potencial e ainda inexplorada de novas moléculas. Neste trabalho a peçonha bruta do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* (SPB) e uma enzima gelatinolítica (SPGP) purificada a partir desta peçonha, foram avaliadas quanto a sua aplicabilidade na detecção diferencial de tumores. Os resultados *in vitro* demonstraram que tanto SPB quanto SPGP possuem potente efeito antitumoral sobre células de glioblastoma p-53 selvagem ($DL_{50} = 3,9 \pm 0,98 \mu\text{g/mL}$ e $8,00 \times 10^{-12} \pm 2,94 \times 10^{-12} \text{M}$, respectivamente) e células de carcinoma ascítico de Ehrlich ($DL_{50} = 14,05 \pm 2,95 \mu\text{g/mL}$ e $1,22 \times 10^{-11} \pm 6,56 \times 10^{-12} \text{M}$, respectivamente), sendo células de glioblastoma p53-mutante mais resistentes, para ambas as substâncias ($DL_{50} > 125 \mu\text{g/mL}$ para SPB e $DL_{50} > 1,39 \times 10^{-9} \text{M}$ para SPGP). As alterações morfológicas observadas nestas linhagens quando tratadas com SPB e SPGP, e os dados da coloração com DAPI, indicam que o efeito antitumoral destas substâncias ocorre via apoptose. Sondas radioativas de SPB ($[^{99\text{m}}\text{Tc}] \text{SPB}$) e SPGP ($[^{131/125}\text{I}] \text{SPGP}$) foram sintetizadas com alta atividade específica e alta pureza radioquímica. Estudos de biodistribuição, realizados por injeções via endovenosa caudal, em camundongos implantados nos coxins plantares com tumor de Ehrlich mostraram que a SPB não é captada significativamente pelo tumor. Por outro lado, a SPGP foi significativamente captada pela pata com tumor, em todos os tempos avaliados ($p < 0,05$). A administração intratumoral da $[^{125}\text{I}] \text{SPGP}$ elevou os níveis desta molécula no tumor e reduziu a captação em outros órgãos. Estudos em animais com edema demonstraram que a SPGP apresenta um tempo de residência maior na região tumoral do que em regiões inflamatórias. Estudos hematológicos e histopatológicos realizados demonstraram que a SPB e SPGP não apresentam toxicidade aguda, mesmo em concentrações dez vezes maiores que as utilizadas nos experimentos de biodistribuição e detecção de tumores. Estes resultados são inéditos e mostram o potencial da SPGP como molde para o desenvolvimento de fármacos e radiofármacos para terapia e diagnóstico de tumores.

IDENTIFICATION OF ANTITUMORAL EFFECT OF A POLYPEPTIDE ISOLATED FROM SCORPIONFISH *Scorpaena plumieri* VENOM AND EVALUATION OF ITS POTENTIAL USE FOR TUMOR DIAGNOSIS

Juliana Soprani

ABSTRACT

Cancer has killed millions of people worldwide. Despite the increasing knowledge about the molecular basis of tumor development, few advances have been reached in clinical therapy and diagnoses, which shows the importance of new drugs development for therapeutic and diagnosis purpose. Venomous creatures have been studied as potential sources of pharmacological agents and physiological tools. A lot of work has been done about biological activity of terrestrial animals, but comparatively less research has been undertaken on venomous marine creature, particularly fish, which means that marine toxins represent a vast and unexplored source of novel molecules with therapeutical potential. In this work, the scorpionfish *Scorpaena plumieri* crude venom (SPB) and a gelatinolytic protease purified from this venom (SPGP) were evaluated for their applicability for *in vivo* tumor detection. *In vitro* results showed that both, SPB and SPGP, possess a powerful antitumor effects on p53-wild-type glioblastoma cells ($LD_{50} = 3,9 \pm 0,98 \mu\text{g/mL}$ and $8,00 \times 10^{-12} \pm 2,94 \times 10^{-12} \text{M}$, respectively) and Ehrlich ascites carcinoma cells ($LD_{50} = 14,05 \pm 2,95 \mu\text{g/mL}$ and $1,22 \times 10^{-11} \pm 6,56 \times 10^{-12} \text{M}$, respectively). P53-mutant glioblastoma cells were more resistant to both, SPB and SPGP treatment ($LD_{50} > 125 \mu\text{g/mL}$ and $LD_{50} > 1,39 \times 10^{-9} \text{M}$, respectively). The morphological changes observed in the cell lines treated with SPB and SPGP, and the data of DAPI staining, indicate that the antitumor effect of these substances occurs via apoptosis. Radioactive probes of SPB ($[^{99\text{mTc}}] \text{SPB}$) and SPGP ($[^{125}\text{I}] \text{SPGP}$) with high specific activity and high radiochemical purity were synthesized. Data of biodistribution studies, performed by intravenous injections in Swiss mice bearing Ehrlich carcinoma cells, showed that SPB has poor uptake in tumor region. On the other hand, SPGP had a substantial uptake in tumor at all analyzed times. Intratumoral administration of $[^{125}\text{I}] \text{SPGP}$ increased its uptake by the tumoral region and substantially reduced the uptake by other organs. Biodistribution studies in animals with edema confirmed that SPGP presents longer residence time in tumoral region than into inflammation site. Hematologic and histopathologic studies showed that SPB and SPGP did not present acute toxicity, even at concentrations ten times higher than those used in biodistribution studies. These results indicate the potential of SPGP as template for the development of new drugs and radiopharmaceuticals for tumors diagnosis and therapy.

LISTA DE FIGURAS

FIG.1: Alterações fisiológicas essenciais para estabelecimento e crescimento neoplásico (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2000).....	28
FIG.2: Imagens ilustrativas dos processos de apoptose e necrose (Modificado de Cruchten & Broeck, 2002 / Pudence University Cytometry Laboratories, <i>On line</i> , 2005).....	34
FIG.3: Desenho esquemático da via apoptótica intrínseca ou mitocondrial (Adaptado de Klener et al., 2006).....	36
FIG.4: Desenho esquemático da Via Extrínseca da apoptose e do Receptor transmembrana de Morte (Modificado de: Espreafico, 2005. Disponível em: http://rbp.fmrp.usp.br/didatico/Medicina- Biologia Celular/ Aula15%20 Apoptose.ppt)..	38
FIG.5: Esquema da formação de raios gama a partir da aniquilação de pósitrons (Fonte: Robilota, 2006).....	46
FIG.6: O peixe escorpião <i>Scorpaena plumieri</i> (Fonte: Laboratório de Química de Proteínas – Universidade Federal do Espírito Santo).....	54
FIG.7: Passo a passo da extração da peçonha do peixe-escorpião <i>S. plumieri</i> (Fonte: Arquivo do Laboratório de Química de Proteínas/ Universidade Federal do Espírito Santo).....	64
FIG.8: Câmara de Neubauer	69
FIG.9: Desenho esquemático das cromatografias realizadas para o controle de qualidade da radiomarcção com ^{99m} Tc.....	75
FIG.10: O aminoácido aromático Tirosina.....	77
FIG.11: Esquema da cromatografia em papel Whattman nº1 utilizando como fase móvel metanol saturado com iodeto de potássio	78
FIG.12: Efeito citotóxico da SPB sobre células RT2.....	89
FIG.13: Efeito citotóxico da SPB sobre células CAE.....	89
FIG.14: Efeito citotóxico da SPB sobre células T98.....	90

FIG.15: Fotomicrografia óptica de células RT2: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com SPB.....	91
FIG.16: Fotomicrografia óptica de células CAE: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com SPB.....	92
FIG.17: Fotomicrografia óptica de células T98: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com SPB.....	93
FIG.18: Análise do DNA cromossomal de células RT2 após 48h de tratamento com SPB, na concentração de 3µg/mL.....	95
FIG.19: Alterações do DNA cromossomal de células CAE coradas com DAPI, após 48 horas de tratamento com 10µg/mL de SPB.....	96
FIG.20: Células T98 coradas com DAPI, após 48 horas de tratamento com SPB (125µg/mL).....	97
FIG.21: Avaliação da manutenção da atividade antitumoral da SPB após radiomarcção com ^{99m} Tc. MTT em células RT2.....	99
FIG.22: Avaliação da manutenção da atividade antitumoral da SPB após radiomarcção com ^{99m} Tc. MTT em células CAE	99
FIG.23: Avaliação da manutenção da atividade antitumoral da SPB após radiomarcção com ^{99m} Tc. MTT em células T98.....	100
FIG.24: Verificação <i>in vivo</i> da pureza radioquímica da [^{99m} Tc]SPB.....	101
FIG.25: Comparação da concentração da [^{99m} Tc]SPB na pata implantada com tumor de Ehrlich e pata sem tumor (pata normal), ao longo do tempo.....	103
FIG.26: Fluxograma do processo de purificação da SPGP a partir da SPB. (Modificado de Andrich, 2005).....	104
FIG.27: Perfil cromatográfico da Filtração em Gel da fração solúvel da SPB em Coluna Sephacryl S 200 HR (1,2 x 120cm).....	105
FIG.28: Perfil cromatográfico da troca aniônica da fração FIII. Coluna de troca aniônica (DEAE Celulose, 1,0 x 10cm).....	106

FIG.29: Zimograma das frações obtidas da segunda etapa de purificação cromatográfica.....	107
FIG.30: Perfil cromatográfico obtido da etapa 3 de purificação: Coluna de fase reversa C4 (Supelco, 0,46 x 15cm) equilibrada com solução de 0,1% de TFA em água.....	108
FIG.31: Zimograma das frações obtidas da terceira etapa de purificação cromatográfica.....	108
FIG.32: Perfil da recromatografia em Fase Reversa (HPLC) da fração FIII200/2.....	109
FIG.33: Eletroforese em gel de poliacrilamida sistema gradiente Laemmli para verificação da homogeneidade da enzima purificada (SPGP).....	110
FIG.34: Efeito citotóxico da SPGP sobre células RT2.....	111
FIG.35: Efeito citotóxico da SPGP sobre células CAE.....	112
FIG.36: Efeito citotóxico da SPGP sobre células T98.....	112
FIG.37: Fotomicrografia óptica de células RT2: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com SPGP.....	114
FIG.38: Fotomicrografia óptica de células CAE: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com SPGP.....	115
FIG.39: Fotomicrografia óptica de células T98: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com SPGP.....	116
FIG.40: Análise do DNA cromossomal de células RT2 coradas com DAPI, após 48 horas de tratamento com SPGP ($8,01 \times 10^{-11} \text{M}$).....	118
FIG.41: Análise do DNA cromossomal de células CAE coradas com DAPI, após 48 horas de tratamento com SPGP ($1,01 \times 10^{-11} \text{M}$).....	119
FIG.42: Análise do DNA cromossomal de células T98 coradas com DAPI, após 48 horas de tratamento com SPGP ($1,39 \times 10^{-9} \text{M}$).....	120

FIG.43: Controle de qualidade da [125I]SPGP: avaliação da integridade estrutural. Perfil cromatográfico obtido em Coluna de fase reversa C18 (Supelco, 0,46 x 25cm) equilibrada com solução de 0,1% de TFA em água.....	122
FIG.44: Avaliação da manutenção da atividade biológica da SPGP após reação de radioiodação.....	123
FIG.45: Verificação <i>in vivo</i> da pureza radioquímica da [¹²⁵ I]SPGP. Comparação dos perfis de biodistribuição da molécula radiomarcada e do possível contaminante presente (Na ¹²⁵ I) após 30 minutos da injeção.....	124
FIG.46: Comparação da captação de [¹²⁵ I]SPGP, injetada via endovenosa, na pata implantada com tumor de Ehrlich e na pata sem tumor (pata normal), ao longo do tempo.....	126
FIG.47: Comparação da captação de [¹²⁵ I]SPGP na pata implantada com tumor de Ehrlich e na pata sem tumor (pata normal), quando administrada por via intratumoral.....	128
FIG.48: Comparação da captação de [¹²⁵ I]SPGP e do Na ¹²⁵ I na pata com tumor de Ehrlich, após injeção intratumoral.....	129
FIG.49: Comparação da captação de [¹²⁵ I]SPGP na pata com edema e na pata com tumor de Ehrlich, com injeções administradas por via intraedema e intratumoral.....	130
FIG.50: Análise das alterações hematológicas, nas células da série vermelha, geradas pela administração de SPB e SPGP, em uma dose 10 vezes maior que a dose utilizada em experimentos de biodistribuição.....	132
FIG.51: Análise das alterações hematológicas, nas células da série branca, geradas pela administração de SPB e SPGP, em uma dose 10 vezes maior que a dose utilizada em experimentos de biodistribuição.....	133
FIG.52: Análise das Proteínas Plasmáticas Totais (PPT) e plaquetas em animais tratados com SPB e SPGP.....	134
FIG.53: Fotomicrografia do rim, fígado, cérebro e coração de um animal representativo do grupo tratado com 3µg de SPB, por 24 horas.....	135

FIG.54: Fotomicrografia do rim, fígado, cérebro e coração de um animal representativo do grupo tratado com 0,3µg de SPGP, por 24 horas.....	136
FIG.55: Fotomicrografia do pulmão de animais representativos dos grupos A) Controle, B) tratado com 3µg de SPB, C) tratado com 0,3 µg de SPGPpor, por 24 horas.....	136
FIG.56: Emissão de partículas e raios gama por núcleos instáveis (Fonte: Cardoso, 2003).....	168
FIG.57: Diferentes tipos de emissões radioativas e seu poder de penetração (Adaptado de Andreucci, 2005)	168
FIG.58: Efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante sobre os sistemas biológicos (Fonte: Nouailhetas, 2006).....	171
FIG.59: Imagem planar de corpo inteiro de camundongos injetados via endovenosa com a sonda [¹³¹ I]SPGP.....	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que diferenciam os processos de morte celular por necrose e apoptose. (Modificada de Solá <i>et al.</i> , 2001).....	33
Tabela 2: Principais emissores de pósitrons utilizados na Medicina Nuclear e suas respectivas meias-vidas (Adaptado de Robilota, 2006).....	47
Tabela 3: Cinética da biodistribuição da [99mTc]SPB (%DI/g) injetada via endovenosa, em animais com tumor de Ehrlich. (n=4; p<0,05).....	102
Tabela 4: Cinética da biodistribuição da [¹²⁵ I]SPGP (%DI/g), injetada via endovenosa, em animais com tumor de Ehrlich. (n=4; p<0,05).....	125
Tabela 5: Proporção entre a concentração de [¹²⁵ I]SPGP no tumor e órgãos adjacentes, 24 horas após injeção endovenosa caudal.....	126
Tabela 6: Cinética da biodistribuição da [125I]SPGP (%DI/g), injetada via intratumoral, em animais com tumor de Ehrlich. (n=2; p<0,05).....	127
Tabela 7: Valores de referência em análises hematológicas de camundongos adultos.....	131
Tabela 8: Comparação dos valores de DL50 em células RT2, CAE e T98, quando tratadas com SPB, SPGP e cisplatina.....	140

LISTA DE ABREVIATURAS

- **%DI:** porcentagem de dose injetada
- **µg:** micrograma
- **µL:** microlitro
- [¹²⁵I]SPGP: SPGP radiomarcada com ¹²⁵I
- [¹³¹I]SPGP: SPGP radiomarcada com ¹³¹I
- [^{99m}Tc]SPB: SPB radiomarcada com ^{99m}Tc
- ¹¹B: boro-11
- ¹¹C: carbono-11
- ¹²⁵I: iodo-125
- ¹³¹I: iodo-131
- ¹³N: nitrogênio-13
- ¹⁵O: oxigênio-15
- ¹⁸F: flúor-18
- ²⁰¹Ta: tálio-201
- ⁶⁷Ga: gálio-67
- ^{99m}Tc: tecnécio -99-metaestável
- ^{99m}Tc-DMSA: ^{99m}Tc-ácido dimercaptossuccínico
- ^{99m}Tc-DTPA: ^{99m}Tc-ácido-dietilenotriaminopentacético
- ^{99m}Tc-MDP: ^{99m}Tc-medronato
- ^{99m}TcO₂: tecnécio coloidal
- ^{99m}TcO₄⁻: pertecnetato
- AA: ácido araquidônico
- ACN: acetonitrila
- AIF: fator de indução da apoptose (*apoptosis-inducing factor*)
- Apaf-1: fator de ativação da apoptose
- Bad: promotor de morte associado a Bcl-2
- Bax: proteína x associada a Bcl2
- Bcl2: B-linfoma celular-2
- Bid: agonista do domínio de morte de interação com BH₃
- Bq: Becquerel

- **BSA:** albumina sérica bovina
- **Ca⁺²:** cálcio
- **CAE:** células de carcinoma ascítico de Ehrlich
- **CAMs** – moléculas de adesão célula-célula (*Cell-cell adhesion molecules*)
- **CEBIO:** Centro de bioterismo
- **cFLA2:** fosfolipase A2
- **Ci:** Curie
- **CNEN:** Comissão Nacional de Energia Nuclear
- **DAPI:** 4',6- diamidina- 2' - fenindole dihidroclorido
- **DISC:** complexo de sinalização de indução de morte
- **DMEM:** meio *Dulbecco's modified Eagle's*
- **DMSO:** dimetilsulfóxido
- **DNA:** ácido desoxirribonucléico
- **eV:** eletrônvolt
- **FADD:** domínio de morte associado à Fas
- **FDG:** flúordeoxiglicose
- **FGF** – fator de crescimento de fibroblasto (*fibroblast growth factor*)
- **g:** força centrífuga relativa (RCF)
- **Gy:** Gray
- **h:** horas
- **HCl:** ácido clorídrico
- **H. E.:** Hematoxilina/ Eosina
- **HPLC:** cromatografia líquida de alta eficiência
- **IAPs:** proteínas inibidoras da apoptose
- **IBAMA:** Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
- **kDa:** kilodáton
- **keV:** kiloeletronvolt
- **M:** Molar
- **MBq:** megabequerel
- **MET-** microscopia eletrônica de transmissão
- **MEV:** microscopia eletrônica de varredura

- **min:** minutos
- **MMPs:** metaloproteinases de matrix
- **MO:** microscópio óptico
- **MTT:** 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
- **Na¹²⁵I:** iodeto de sódio
- **NaBH₄:** borohidreto de sódio
- **NaCl:** cloreto de sódio
- **NaOH:** hidróxido de sódio
- **nm: nanômetro**
- **°C:** graus Celsius
- **PBS:** tampão fosfato
- **PDGF:** fator de crescimento derivado de plaqueta
- **PET:** Tomografia por Emissão de Pósitron
- **pRb** – proteína do retinoblastoma
- **Ras-MAPK:** via de sinalização de proteína kinase ativada por mitógeno (*Ras-mitogen activated protein kinase*)
- **RM:** ressonância magnética
- **RNA:** ácido ribonucléico
- **ROS** – espécies reativas de oxigênio
- **RT2** – linhagem celular de glioblastoma murino p-53 selvagem
- **SDS:** duodecil sulfato de sódio
- **SFB:** soro fetal bovino
- **Smac/DIABLO:** Segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria/Proteína ligada diretamente a IAP com baixo pI (*second mitocôndria-derived activator of caspase/ direct IAP-binding protein with low pI*)
- **SnCl₂:** cloreto estanoso
- **SPB:** peçonha bruta de *Scorpaena plumieri*
- **SPECT:** Tomografia por Emissão de Fóton Único
- **SPGP:** proteína gelatinolítica purificada da SPB
- **SUS:** Sistema Único de Saúde
- **SVMPs:** metaloproteinases de veneno de serpentes

- **T_{1/2}**: meia vida
- **T98** – linhagem celular de glioblastoma humano p53-mutante
- **TC**: tomografia computadorizada
- **TEMED**: N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
- **TFA**: ácido trifluoroacético
- **TGF**: fator de crescimento tumoral
- **TNF**: fator de necrose tumoral
- **TNFR**: receptores de fator de necrose tumoral
- **Tris**: trishidroximetilaminometano
- **UV**: ultravioleta
- **VEGF**: fator de crescimento vasoendotelial (*Vascular endothelial growth factor*)

INDICE

RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XV
1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. O Câncer.....	25
1.1.1. Definição e estatística.....	25
1.1.2. Formação de tumores.....	26
1.2. Apoptose: a morte celular programada.....	31
1.3. Tratamento do câncer.....	39
1.3.1. Cirurgia.....	39
1.3.2. Quimioterapia.....	39
1.3.3. Radioterapia.....	42
1.3.3.1. Dosimetria interna.....	42
1.3.4. Uso combinado da radioterapia e quimioterapia.....	43
1.4. Radiação ionizante e o diagnóstico de tumores.....	44
1.5. A necessidade da busca de novos compostos para tratamento e diagnóstico.....	48
1.6. As toxinas animais.....	50
1.7. O Peixe escorpião: biologia e classificação.....	51
1.8. Enzimas proteolíticas: Metaloproteinasas.....	54
1.9. Parâmetros farmacocinéticos e o desenvolvimento de novos fármacos.....	56
2. JUSTIFICATIVA.....	58

3. OBJETIVOS.....	60
3.1. Objetivo geral.....	61
3.2. Objetivos específicos.....	61
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
4.1. Reagentes.....	63
4.2. Obtenção da peçonha de <i>S. plumieri</i>	63
4.3. Determinação do conteúdo protéico da SPB e suas frações.....	64
4.4. Purificação de uma enzima gelatinolítica a partir da SPB.....	64
4.4.1. Etapa 1 – Cromatografia por filtração em Gel	65
4.4.2. Etapa 2 – Cromatografia por Troca Iônica.....	65
4.4.3. Etapa 3 – Cromatografia em Fase Reversa.....	66
4.4.4. Etapa 4 - Recromatografia em Fase Reversa.....	66
4.5. Avaliação do peso molecular aparente e da pureza da SPGP: eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS.....	67
4.6. Monitoramento da atividade gelatinolítica da SPGP durante as etapas cromatográficas.....	67
4.7. Cultivo celular.....	68
4.8. Células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE).....	69
4.9. Estudo <i>in vitro</i> do efeito citotóxico da SPB e SPGP sobre células tumorais.....	70
4.10. Análises morfológicas <i>in vitro</i>	71
4.11. Análise das alterações do DNA cromossomal através da coloração com DAPI...71	
4.12. Controle positivo de apoptose: a Cisplatina.....	72
4.13. Síntese de sondas radioativas utilizando ^{99m} Tc, ¹²⁵ I e ¹³¹ I como radiotraçadores.....	72
4.13.1. Manipulação de radioisótopos.....	72

4.13.2. Radiomarcção de SPB com ^{99m}Tc : radiosíntese da [^{99m}Tc]SPB	73
4.13.3. Radiomarcção da SPGP com ^{125}I : radiosíntese da [^{125}I]SPGP.....	76
4.13.4. Marcação da SPGP com ^{131}I : radiosíntese da [^{131}I]SPGP.....	79
4.14. Manipulação de Animais.....	79
4.15. Modelo animal.....	79
4.15.1. Modelo animal tumoral.....	79
4.15.2. Modelo animal de edema.....	80
4.16. Cálculo do número experimental de animais.....	81
4.17. Experimentos de biodistribuição e detecção de sítios antitumorais <i>in vivo</i>	82
4.18. Avaliação da toxicidade aguda produzida pela administração de SPB e SPGP <i>in vivo</i>	83
4.19. Cálculos farmacocinéticos.....	84
4.20. Análise estatística.....	85
5. RESULTADOS.....	86
5. 1. Avaliação do efeito antitumoral da SPB.....	87
5.1.1. Avaliação do efeito antitumoral <i>in vitro</i> da SPB sobre células tumorais.....	88
5.1.2. Análise da morfologia celular de células submetidas à tratamento com SPB	90
5.1.3. Análise das alterações do DNA cromossomal induzidas pela SPB e SPGP.....	93
5.2. Síntese, avaliação da preservação da atividade antitumoral e avaliação da pureza radioquímica da sonda radioativa de SPB utilizando ^{99m}Tc como radiotraçador.....	98
5.3. Determinação dos parâmetros farmacocinéticos e avaliação da interação <i>in vivo</i> da [^{99m}Tc]SPB com sítios tumorais: Biodistribuição em animais com Tumor de Ehrlich.....	101
5.4. Purificação da enzima gelatinolítica SPGP à partir da peçonha de <i>S. plumieri</i>	104

5.4.1. Cromatografia de filtração em Gel em coluna Sephacryl S200HR.....	105
5.4.2. Cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE Celulose.....	106
5.4.3. Cromatografia em Coluna de Fase Reversa C4	107
5.4.4. Recromatografia em Coluna de Fase Reversa C18	109
5.4.5. Verificação da pureza da SPGP.....	109
5.5. Avaliação do efeito antitumoral a SPGP.....	110
5.5.1. Avaliação do efeito antitumoral <i>in vitro</i> da SPGP sobre células tumorais.....	110
5.5.2. Análise da morfologia celular de células submetidas à tratamento com SPB e SPGP.....	113
5.5.3. Análise das alterações do DNA cromossomal induzidas pela SPGP.....	117
5.6. Síntese, avaliação da manutenção da atividade e avaliação da pureza radioquímica da sonda radioativa de SPGP utilizando ¹²⁵ I como radiotraçador.....	121
5.7. Determinação dos parâmetros farmacocinéticos e avaliação da interação <i>in vivo</i> da [¹²⁵ I]SPGP: Biodistribuição em animais com Tumor de Ehrlich.....	124
5.8. Avaliação da toxicidade aguda da SPB e SPGP produzida pela dose administrada para experimentos de biodistribuição.....	130
6. DISCUSSÃO.....	137
6.1. Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> da SPB e SPGP.....	139
6.2. Obtenção de sondas radioativa de SPB e SPGP para estudos de biodistribuição e imagem.....	142
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	147
7.1. Conclusões	148
7.2. Perspectivas.....	149
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	150
APÊNDICE.....	166

APÊNDICE A: Radiações ionizantes e seus efeitos biológicos.....	167
APÊNDICE B: Avaliação preliminar do potencial uso da [¹³¹ I]SPGP para radiodiagnóstico na Medicina Nuclear.....	172
ANEXOS	174
ANEXO 1: Certificado de aprovação do Comitê de Ética em experimentação Animal.....	175
ANEXO 2: Trabalhos publicados em anais de congressos.....	176

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Câncer

1.1.1. Definição e estatística

Câncer é um termo genérico utilizado para um conjunto de mais de 100 doenças que podem afetar qualquer parte do corpo. Elas são resultado de um processo de crescimento desordenado de células anormais que crescem além de seus limites usuais e podem invadir partes adjacentes do corpo e/ou se propagarem para outros órgãos, num processo conhecido como metástase (Chambers, 2002). Os termos câncer, neoplasia maligna e tumor maligno são sinônimos e distinguem-se dos tumores benignos principalmente devido ao poder de invasão e capacidade de metastatizar (Rang *et al.*, 2003). Além disso, diferente das neoplasias benignas, as quais apresentam células bem diferenciadas, as neoplasias malignas são caracterizadas por possuírem células em uma variedade de graus de diferenciação (desde células muito bem diferenciadas até completamente indiferenciadas).

O câncer é uma das maiores causas de morte em todo mundo, sendo responsável por 13% dos óbitos em 2005 (OMS, 2006). O número de casos da doença tem crescido anualmente, e segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (2006), no ano 2020 serão mais de 15 milhões de novos casos e mais de 12 milhões de mortes pelo câncer. Deve-se ressaltar ainda que esses índices estão subestimados devido às dificuldades de notificação e registro dessa patologia em muitos países subdesenvolvidos (De Carvalho, 2006).

No Brasil, a incidência de câncer na população acompanha as estatísticas mundiais. As neoplasias representam a segunda maior causa de morte por doenças, ficando atrás apenas das doenças do aparelho circulatório. Nos últimos cinco anos o SUS (Sistema Único de Saúde) tem registrado um aumento expressivo no número de pacientes oncológicos atendidos por suas unidades de alta complexidade. Só em 2006 foram 1,6 milhão de consultas ambulatoriais na área de oncologia, sendo registrados 472 mil novos casos e 423 mil internações (Mendonça *et al.*, 2006; INCA, 2007).

Segundo estudos realizados pela IARC (Agência Internacional para Pesquisa contra o Câncer), o aumento do número de casos de câncer em todo o mundo pode ser explicado pelo contínuo crescimento da população e pelo aumento da expectativa de vida. Também a propagação de fatores de risco tais como o tabaco, o consumo excessivo de enlatados e corantes artificiais e os altos índices de estresse podem contribuir para a elevação dos casos de câncer (IARC, 2006).

Existem vários fatores que elevam a propensão individual ao câncer. As mudanças provocadas no meio ambiente pelo próprio homem, os hábitos e o estilo de vida adotado pelas pessoas, em si, não produzem o câncer, mas aumentam a probabilidade de mutações genéticas resultarem em câncer. Esses fatores podem ser externos ou internos ao organismo, estando inter-relacionados. Fatores externos referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de um ambiente sócio-cultural. Por exemplo, já se sabe que cigarro e a exposição excessiva ao sol podem causar, respectivamente, câncer de pulmão e de pele. Uma dieta rica em corante, conservantes e gorduras também contribuem para o aumento da carcinogênese (Pusztai *et al.*, 1996). Os fatores internos são, na maioria das vezes geneticamente pré-determinados, e estão ligadas à capacidade do organismo de se recuperar das agressões externas. Estima-se que aproximadamente 5-10% de todos os tumores estão ligados a fatores hereditários (American Brain Tumor Association, 2006). Também têm sido relatados como fatores internos agentes biológicos capazes de desencadear o processo de tumorigênese. O papiloma vírus, por exemplo, tem sido identificado em 18 a 95% dos carcinomas de colo uterino e embora a infecção viral sozinha não seja suficiente para iniciar o processo de transformação maligna do epitélio cervical, numerosas evidências indicam que a presença do vírus predispõe a alterações genéticas adicionais (Zur Hausen, 2001). São raros casos de cânceres que ocorrem somente por fatores internos. Na maioria, fatores externos e internos interagem de várias formas, aumentando a probabilidade de transformações malignas nas células normais. O surgimento da doença depende também da intensidade e duração da exposição das células aos agentes causadores de câncer (INCA 2007).

1.1.2. Formação de tumores

O crescimento anormal das células no tumor é resultado de sucessivas modificações genéticas e moleculares, que geralmente ocorrem e se acumulam no organismo através

de décadas (Crowell, 2005). O desenvolvimento do câncer tem forte relação com danos e reparos do material genético das células, o DNA (Reddy *et al.*, 2003).

Células cancerosas possuem defeitos nas vias regulatórias que governam os processos de proliferação e homeostase em células normais. A enorme variedade de tipos tumorais existentes e a variedade de alterações genéticas encontradas em cada um deles levantam questões a respeito de sua formação, como por exemplo: quantas vias regulatórias dentro de cada tipo celular devem ser alteradas para que ela se torne cancerosa? O mesmo grupo de alterações, em tipos celulares diferentes, desencadearia o mesmo tipo de resposta, encaminhando células normais para o desenvolvimento neoplásico? Ou mesmo, é possível que a imensa e diversa gama de genes associados ao câncer seja parte de um pequeno número de vias regulatórias? (Michalides *et al.*, 2002).

Sabe-se com certeza que a tumorigênese em humanos é um processo de múltiplos passos, onde cada passo reflete alterações genéticas que dirigem a progressiva transformação das células normais em suas derivadas de crescimento maligno (Renan, 1993). Apesar da complexidade dessa doença, pesquisadores têm sugerido que a gama de alterações encontradas nas células cancerosas é a manifestação direta de seis alterações fisiológicas básicas que, coletivamente ditariam o crescimento neoplásico. Seriam elas: a auto-suficiência em fatores de crescimento, a insensibilidade a fatores antiproliferativos, a evasão da apoptose, a aquisição de potencial replicativo ilimitado, a angiogênese auto-sustentada e a invasão tecidual (FIG.1) (Hanahan & Weinberg, 2000). Cada uma dessas alterações fisiológicas constitui uma nova capacidade adquirida pela célula, e representa a quebra de um poderoso sistema de defesa anticâncer existente em todos os tecidos do organismo.

Segue abaixo uma breve explanação de como cada uma destas capacidades pode ser adquirida e como colaboram para o desenvolvimento do câncer.

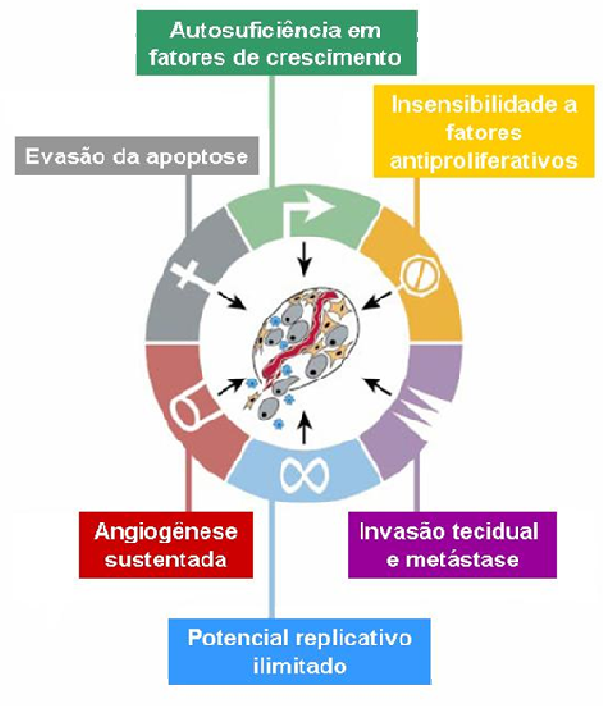


FIG.1: Alterações fisiológicas essenciais para estabelecimento e crescimento neoplásico. A maior parte, se não todos os cânceres, sofrem as mesmas alterações funcionais durante seu desenvolvimento, embora as alterações possam ocorrer por danos em diferentes pontos das vias. Adaptado de Hanahan & Weinberg (2000).

Auto-suficiência em fatores de crescimento: Toda célula inicia o processo de proliferação celular depois de receber um sinal externo, rigidamente controlado (Mareel & Leroy, 2003). Os estímulos proliferativos (tais como fatores de crescimento TGF e PDGF) são então transduzidos do meio extracelular para o interior das células através de receptores de membrana. A aquisição de auto-suficiência em fatores de crescimento pode ocorrer por diferentes mecanismos. Algumas adquirem a capacidade de produzir os fatores de crescimento que deveriam ser providos por outras células, ou super expressam esses receptores, o que permite que níveis extracelulares normais de fatores de crescimento desencadeiem um processo proliferativo acelerado (Pauwels *et al.*, 1998). Outra alteração comum é a expressão de receptores constitutivamente ativos, os quais propagam o sinal de crescimento mesmo sem a presença do ligante externo (Fedi *et al.*, 1997; Bertram, 2001).

Insensibilidade a fatores antiproliferativos: Em um tecido normal, vários sinais antiproliferativos operam para manter a quiescência celular e a homeostase tecidual. Os sinais antiproliferativos, assim como os de crescimento, interagem com receptores transmembrana que possuem um domínio citoplasmático acoplado a uma cascata de sinalização interna (Chin *et al.*, 1998). Em nível molecular, a maioria das células tumorais escapa da sinalização antiproliferativa por alterações nos receptores de membrana, que param de transduzir sinais extracelulares para o interior da célula, fazendo com que ela perca a capacidade de interpretar o estímulo inibitório (Bertram, 2001).

Potencial replicativo ilimitado: Em teoria, células normais possuem um número limite de divisões celulares após o qual entram em senescência e morrem. Essa característica, inicialmente descrito por Hayflick e por isso batizada “Limite de Hayflick”, seria uma proteção do organismo contra a imortalidade das células, e garantiria a saúde dos tecidos. Este limite foi observado em cultura de células, onde o número máximo de divisões antes que a célula morra gira em torno de 50-70 (Holt *et al.*, 1999). Na tumorigênese, as células perdem a capacidade de detectar este limite e adquirem potencial replicativo ilimitado. Em geral, essa fuga ocorre graças a uma super expressão da telomerase, uma enzima responsável pela reposição dos telômeros, os quais são seqüências de DNA formados por milhares de elementos repetitivos de seis pares de base (pb). Cada telômero perde de 50 a 100pb a cada divisão celular e sua erosão progressiva ao longo das duplicações causa uma instabilidade cromossômica que eleva a ocorrência de danos não corrigidos (tais como fusões) capazes de desencadear a morte celular apoptótica. Essa expressão aumentada é observada em 85% dos tumores humanos, e já foi descrita também em tumores obtidos em camundongos predispostos ao câncer (p16^{INK4A-/-}) (Ainsner *et al.*, 2002).

Angiogênese auto-sustentada: A necessidade de oxigênio e nutrientes determina que a maioria das células do organismo estejam localizadas junto a um capilar sanguíneo (Mareel & Leroy, 2003). Contudo, durante o processo inicial de transformação maligna, o crescimento celular rápido e desorganizado não é acompanhado pela proliferação vascular e provoca a morte massiva das células tumorais. Para que o tumor avance, as células precisam então adquirir a capacidade de induzir a proliferação vascular (angiogênese ou neovascularização), e possibilitar a obtenção de nutrientes (Skobe *et*

al., 1997). Os tumores promovem a vascularização através da quebra do equilíbrio entre indutores e inibidores, sendo comum observar o aumento da expressão de indutores como VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e FGF (*fibroblast growth factor*), ou a diminuição da expressão de inibidores (trombospondina-1 e interferon β) ou mesmo a ocorrência de ambos os processos simultaneamente (O'Reilly *et al.*, 1994; Hahn *et al.*, 1999, Skobe *et al.*, 2001).

Resistência a apoptose: A aquisição de resistência a apoptose é uma característica inerente a todos os cânceres. Certamente, os mecanismos apoptóticos constituem a grande barreira para a progressão tumoral e uma célula cancerosa para ser bem sucedida deve ser capaz de burlar mais este controle de manutenção da homeostase tecidual. O mecanismo de evasão pode residir na inativação de vias relacionadas à indução de morte, na super expressão de genes anti-apoptóticos (como *IAPs*), e nas deleções em genes pró- apoptóticos (como *BCL2*). Mas o mecanismo de evasão encontrado na maioria dos cânceres é a inativação do gene *P53*, ou de alguma molécula de sua via de sinalização (Igney & Krammer, 2002; Shivapurkar *et al.*, 2003). Mutações que inativam p53 ou moléculas efetoras de sua via, e possibilitam a fuga aos sinais apoptóticos, são encontradas em mais de 50% dos tumores humanos (Igney & Krammer, 2002).

Invasão tecidual e metástase: Mais de 90% das mortes por câncer acontecem quando a doença atinge o processo de metástase e para que esse processo aconteça, a célula tumoral deve ser capaz de migrar de seu tecido de origem e se estabelecer com sucesso em outras regiões do corpo (Sporn, 1996). O fenômeno da invasão tecidual pelas células tumorais talvez seja o mais complexo e o menos compreendido de todos (Mareel & Leroy, 2003). Resultados experimentais indicam que moléculas de adesão intercelular, de adesão a matriz extracelular e proteases intersticiais são os principais componentes deste complicado processo (Hananhan & Weinberg, 2000). Entre as moléculas de adesão célula-célula, ou CAMs (cell-cell adhesion molecules), estão as integrinas, uma família de receptores glicoprotéicos transmembrana que participam da adesão célula-matriz extracelular (Thorne *et al.*, 2000). Elas medeiam a ancoragem e migração via reconhecimento de diferentes moléculas da matriz extracelular. Mais que isso, sinais intracelulares gerados pelos domínios citoplasmáticos desses receptores influenciam a expressão gênica, afetam o controle de sobrevivência celular, a proliferação e diferenciação (Cepek *et al.*, 1994; Aplin *et al.*, 1998; Giancotti & Ruoslahti, 1999).

Uma vez que os diferentes tecidos invadidos possuem diferentes componentes em sua matriz, células malignas experimentam alterações em seu micro ambiente à medida que executam sua jornada migratória, e a colonização bem sucedida de novos locais depende da adaptação celular conseguida por meio de alterações nos padrões de expressão das integrinas (Bergers & Coussens, 2000; Vihinen *et al.*, 2000, Furuta *et al.*, 2007).

O estudo das alterações que levam uma célula normal a se torna maligna, e a aquisição de conhecimentos sobre as vias moleculares pelas quais essas alterações ocorrem é de extrema importância para o tratamento do câncer. A utilização das capacidades adquiridas pelas células tumorais como marcadores para o desenvolvimento de novos fármacos, pode permitir a geração de drogas específicas para cada tipo de tumor e para cada estágio da doença, ou mesmo drogas capazes de detectar células apenas potencialmente cancerosas (Hanahan & Weinberg, 2000).

1.2. Apoptose: a morte celular programada

A apoptose ou morte celular programada é um conjunto de eventos ordenados que culminam na remoção seletiva de células dos tecidos (Los *et al.*, 2003). É um acontecimento comum no organismo, tanto em situações fisiológicas quanto patológicas, e permite que organismos multicelulares controlem o número de células em seus tecidos e eliminem células individuais que possam trazer algum risco a sua sobrevivência, tais como células que sofreram danos em seu material genético, ou que estejam infectadas por vírus (Arends & Wyllie, 1991; Cohen, 1997). Os mecanismos fisiológicos de morte celular são essenciais no desenvolvimento e homeostase dos organismos, ocorrendo no desenvolvimento embrionário durante a morfogênese, em adultos durante a renovação tecidual e mesmo ao fim de uma resposta imune (Thompson, 1995).

Diferente do que ocorre na morte necrótica (que provoca uma resposta inflamatória potencialmente prejudicial ao organismo), alterações na membrana plasmática de células apoptóticas resultam em seu reconhecimento e fagocitose pelos macrófagos antes da liberação do seu conteúdo citoplasmático para o meio extracelular, o que

previne o desencadeamento de um processo de inflamação do tecido (Ziegler *et al.*, 1997; Ashkenasi & Dixit, 1998). Enquanto a necrose é definida como um processo descontrolado de colapso celular, iniciado como consequência de danos significativos e irreversíveis, a apoptose é um processo controlado de desintegração celular (Fadeel & Orrenius, 2005). Diversas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas distinguem os processos de morte celular por necrose e apoptose. A Tabela 1, trás as principais diferenças existentes entre estes dois processos. Na apoptose, a cromatina nuclear se condensa se marginaliza em torno da carioteca, e é fragmentada em pontos específicos de 180 pares de base. Também ocorre compactação das organelas citoplasmáticas, e uma dilatação do retículo endoplasmático, além de uma marcante redução no volume celular. Ao fim do processo são originados os corpos apoptóticos, os quais são fagocitados pelos macrófagos (FIG.2).

Devido à importância desse mecanismo fisiológico, falhas em sua regulação podem favorecer o aparecimento de diversas patologias e serem fatais para o organismo. Em certos neurônios, por exemplo, o aumento da taxa apoptótica contribui para o aparecimento de doenças neurodegenerativas, tais como as Doenças de Alzheimer e Parkinson. Já a ocorrência reduzida deste processo pode levar ao surgimento de doenças auto-imunes e ao aparecimento dos mais diversos tipos de câncer (Thompson, 1995; Solá *et al.*, 2001).

Tabela 1: Resumo das características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas que diferenciam os processos de morte celular por necrose e apoptose. Modificada de Solá *et al.*, 2001.

<i>Características</i>	<i>Necrose</i>	<i>Apoptose</i>
<i>Morfológicas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Perda da integridade da membrana celular; • Lise total da célula; • Não há formação de vesículas; • Desintegração desordenada das organelas celulares. 	<ul style="list-style-type: none"> • Não ocorre perda da integridade de membrana; • Condensação e fragmentação da cromatina nuclear; • Redução do volume citoplasmático; • Fragmentação da célula em corpos apoptóticos; • Aumento da permeabilidade mitocondrial.
<i>Bioquímicas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Perda da regulação da homeostase iônica; • Não requer gasto de energia; • Degradação aleatória do DNA. 	<ul style="list-style-type: none"> • Processo dependente de ativação enzimática; • Dependente de ATP; • Degradação do DNA em porções específicas de 180pb; • Ativação da cascata de caspases; • Alterações direcionadas na membrana plasmática.
<i>Fisiológicas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Afeta grupos de células; • Iniciada por estímulos não fisiológicos; • Gera resposta inflamatória. 	<ul style="list-style-type: none"> • Afeta células individuais; • Induzida por estímulos fisiológicos; • Fagocitose por macrófagos; • Não gera resposta inflamatória.

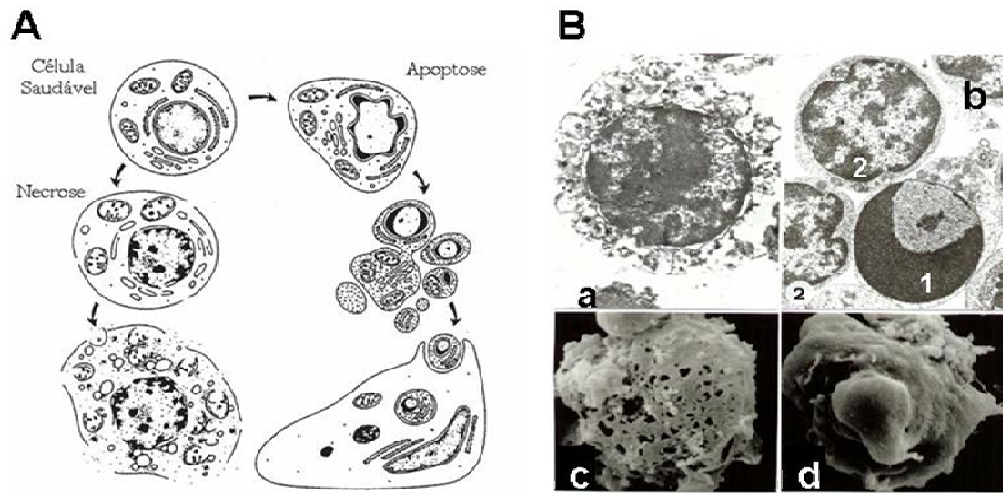


FIG.2: Imagens ilustrativas dos processos de apoptose e necrose. (A) Imagem ilustrativa dos processos de necrose e apoptose (Modificado de Cruchten & Broeck, 2002). (B) Alterações celulares sofridas durante os processos de morte por necrose e apoptose: a) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) de uma célula necrótica, onde é possível visualizar a desintegração desordenada das organelas e da membrana celular (aumento de 10000 vezes). b) MET de uma célula normal (1) e de uma célula apoptótica (2). Observe a condensação da cromatina característica do processo de apoptose (aumento de 8000 vezes). c) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de uma célula necrótica mostrando a perda da integridade da membrana plasmática (aumento de 5000 vezes). d) MEV de célula apoptótica, e visualização da fragmentação ordenada por meio da formação dos corpos apoptóticos (aumento de 5000 vezes). Modificado de: Pudence University Cytometry Laboratories, *On line*, 2005.

Este tipo de morte celular exige, portanto, um processo de regulação muito fino, onde o destino de viabilidade ou de morte celular é determinado pelo balanço entre proteínas anti e pro-apoptóticas. Normalmente, sinais de sobrevivência vindos da vizinhança celular e sensores internos para manutenção da integridade da célula mantêm a maquinaria apoptótica desligada. Quando, por algum motivo a célula perde contato com sua vizinhança, ou apresenta um dano interno irreparável inicia-se o processo de apoptose. Células que recebam sinais confusos de pausa e/ou avanço no ciclo celular também iniciam o suicídio apoptótico (Evan & Littlewood, 1998). Na verdade, muitos genes que controlam o ciclo celular, tais como *P53*, *MYC* e *RB1*, e proteínas da família *pBCL2* (Bcl2, Bax, Bad, Bid, dentre outros), estão envolvidos no processo de morte por

apoptose (Ricci *et al.*, 2006). Outra classe de proteínas que desempenha papel central neste processo são as caspases, as quais são uma família de cisteíno-proteases, que clivam especificamente substratos com resíduos de ácido aspártico (Martin & Green, 1995). Elas existem no citosol da maioria das células na forma inativa (de procaspases), como uma única cadeia polipeptídica. Sua ativação ocorre por meio de uma clivagem proteolítica que consiste na remoção do pro-domínio aminoterminal e na clivagem do peptídeo resultante em duas subunidades, que unidas produzem a enzima funcional (Putcha *et al.*, 2002).

Em mamíferos, as cascatas de sinalização que culminam na apoptose podem ser iniciadas por duas vias principais: a via mitocondrial ou intrínseca, e a via de receptores de morte ou extrínseca (Green & Kroemer, 2004). No final, ambas as vias convergem para as mesmas ações, e resultam na clivagem das moléculas estruturais e reguladoras da célula. Os dois caminhos se interconectam através da mitocôndria, e a separação dos mesmos em processos distintos é, na verdade, meramente didática (Klener Jr *et al.*, 2006).

Dentre os fatores que podem desencadear a via intrínseca da apoptose estão às injúrias físicas e químicas (radiação UV, hipoxia, desbalanço osmótico, alterações bruscas de temperatura, etc.), alterações na expressão de oncogenes ou genes supressores de tumor (*MYC*, *FOS*, *P53*, etc.), danos ao citoesqueleto, danos irreversíveis ao material genético (por agentes mutagênicos, citostáticos, radiação ionizante, etc.), fatores de crescimento celular, deficiência de nucleotídeos ou ATP, acúmulo de proteínas desnaturadas, entre outros fatores de estresse (Thorburn, 2004). Apesar de diferentes fatores funcionarem como iniciadores dessa via, todos desencadeiam os mesmos efeitos na célula, a saber: o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que culminam na liberação para o citoplasma, de citocromo-c e outras moléculas pró-apoptóticas, tais como Smac/DIABLO, AIF e endonuclease-G (Li *et al.*, 2001). O mecanismo pelo qual ocorre a liberação desses fatores pró-apoptóticos a partir do espaço intermembranar mitocondrial ainda não é totalmente compreendido. Acredita-se que, em resposta a diferentes fatores de estresse, proteínas pró-apoptóticas tais como Bcl2 (Bax, Bak, Bid, Bad), ligam-se a membrana mitocondrial externa e inativam proteínas anti-apoptóticas, o que induz a formação de poros transmembranares, por meio dos quais são liberados o

citocromo-c (Green & Kroemer, 2004). No citoplasma, o citocromo-c se liga, na presença de ATP, à proteína adaptadora Apaf-1 e à procaspase-9, formando um complexo multiprotéico, denominado apoptossoma (Klener *et al*, 2006). O apoptossoma ativa caspase-9, a qual ativa caspase-3, o que resulta na morte celular (FIG.3).

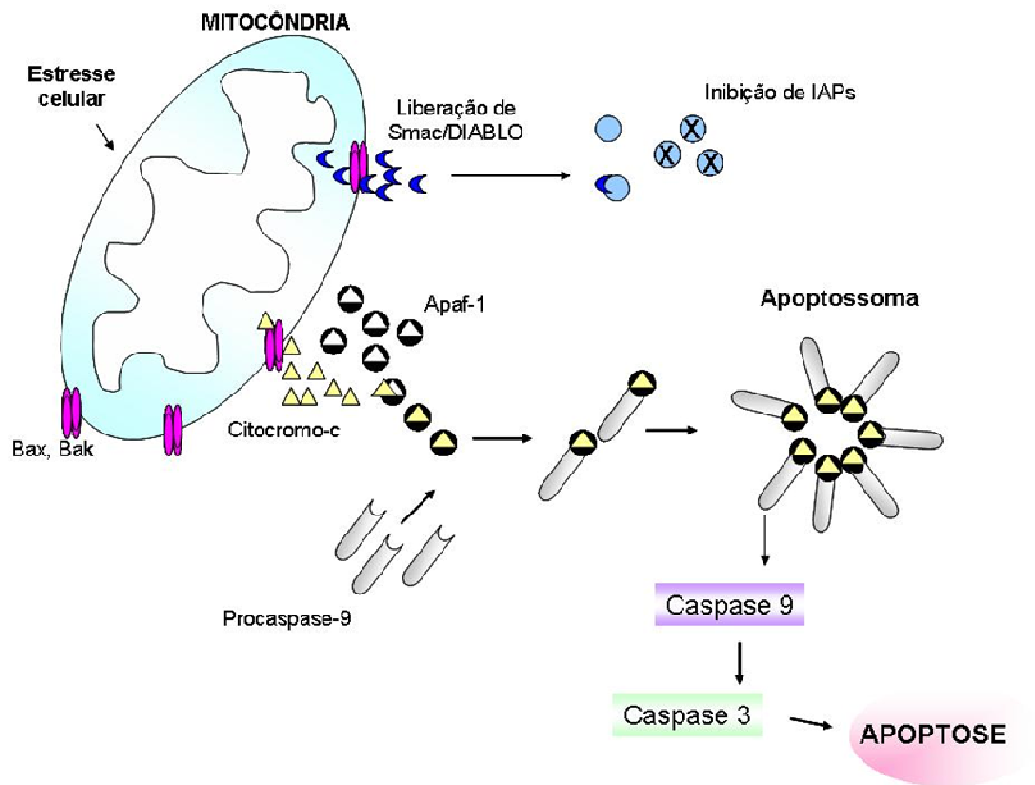


FIG.3: Desenho esquema da via apoptótica intrínseca ou mitocondrial. Vários estímulos pró-apoptóticos estimulam proteínas da família Bcl2 (Bax, Bad, Bak, Bid) a formarem poros na membrana mitocondrial externa. A liberação de citocromo-c por meio desses poros permite a formação dos apoptossomos, o que ativa a caspase-9. Esta por sua vez, ativa caspases efetoras, propagando o sinal de morte. Outras moléculas (ex. Smac/DIABLO) colaboram com a execução do sinal apoptótico inibindo moléculas anti-apoptóticas (IAPs). Adaptado de Klener et al., 2006.

Também a liberação de Ca^{2+} , pelo retículo endoplasmático, desempenha papel crucial na via intrínseca. Quando liberado para o citosol é rapidamente captado pela mitocôndria, o que estimula a formação de ROS e facilita a abertura dos poros

transitórios formados pelas proteínas da família Bcl2 e conseqüentemente a liberação dos fatores pró-apoptóticos (Brookes *et al.*, 2004).

A via extrínseca é ativada por receptores de morte da superfamília de receptores TNFR (*Tumor Necrosis Factor Receptors*), e atua mais diretamente sobre a cascata de caspases. Os receptores de morte são proteínas transmembranas tipo I, que transmitem sinais de apoptose para o interior da célula quando ligantes específicos se conectam a eles. São caracterizados pela presença de um domínio extracelular rico em cisteína que se repete 2-5, o qual medeia à ligação receptor-ligante, e um domínio intracelular extremamente conservado chamado domínio de morte (DD – *Death Domain*), responsável pela transmissão do sinal para o interior da célula. Os ligantes de morte são glicoproteínas de membrana do tipo II, pertencentes à superfamília TNF (MacEwan, 2002). Essas moléculas se tornam disponíveis para ligação aos receptores quando são fisiologicamente liberadas da membrana, ou quando são clivadas por metaloproteases específicas e se tornam solúveis. A ligação do ligante ao seu receptor induz alterações conformacionais ou permite a formação de complexos moleculares capazes de ativar caspases (FIG.4B).

Por exemplo: a interação de Fas (um membro da família TNFR) com seu ligante (Fas-L) no meio extracelular dispara a formação de um complexo de sinalização de indução de morte (DISC - do inglês *Death-inducing signaling complex*). Nessa via de sinalização, que inclui a molécula adaptadora FADD (*Fas-associated death domain*), a procaspase-8 é recrutada, e a ligação FADD-procaspase-8 leva formação de caspase-8, por meio de uma clivagem autoproteolítica. A caspase-8 então é capaz de ativar outras caspases, propagando o sinal de morte celular, como mostra a FIG.4A (Salvesen & Dixit, 1999; Kang *et al.*, 2003). A partir da clivagem da procaspase-8 a caspase-8, os caminhos apoptóticos das vias intrínseca e extrínseca se interconectam.

Há ainda um terceiro mecanismo que não envolve nem os receptores de morte nem a sinalização por danos à mitocôndria. Este caminho está associado à ativação da proteína nuclear p53 em resposta a danos no material genético (Shivapurkar *et al.*, 2003).

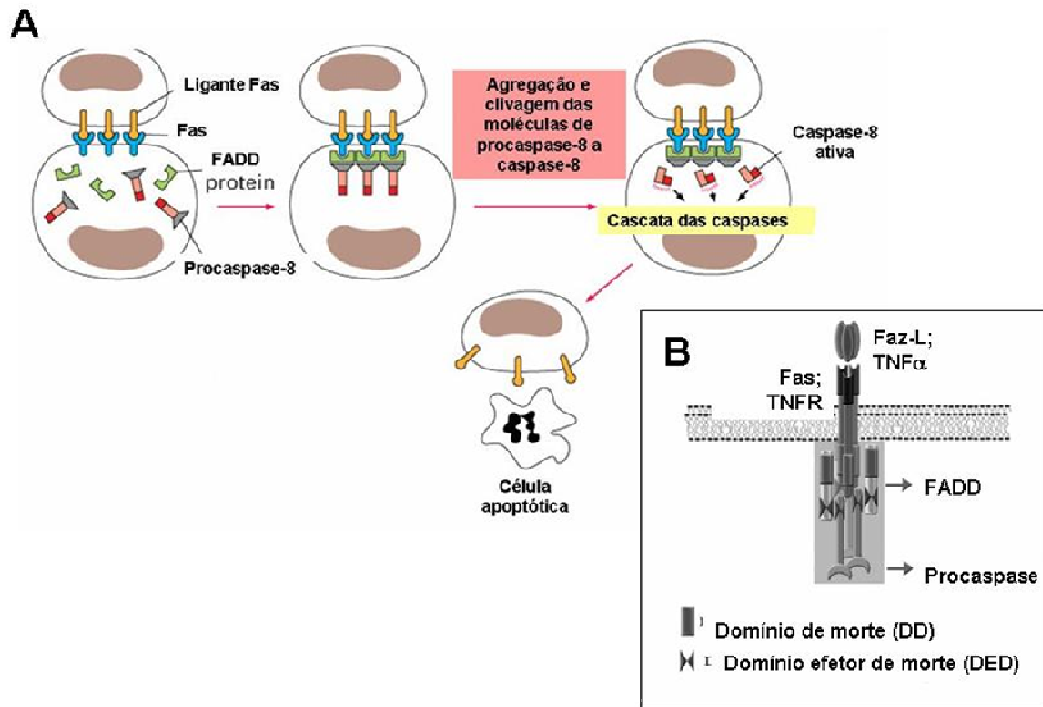


FIG.4: Desenho esquemático da Via Extrínseca da apoptose e do Receptor transmembrana de Morte. (A) Esquema da via extrínseca da apoptose. Sinais de morte vindos do meio extracelular desencadeiam a cascata de ativação das caspases, o que culmina no processo de suicídio celular. (B) Detalhe do Receptor de Morte e seus domínios. Adaptado de Kliner et al., 2006. (Modificado de: Esprefico, 2005. Disponível em: <http://rbp.fmrp.usp.br/didatico/Medicina- BiologiaCelular/ Aula15%20 Apoptose.ppt>. Acessado em: 03/03/2007.

A p53 é uma fosfoproteína nuclear, implicada no controle do ciclo, reparo e síntese de DNA e diferenciação celular. Age como um fator de transcrição capaz de regular muitos genes e desempenha papel central nos pontos de checagem do ciclo celular. (Prives *et al.*, 1999). Apesar de seu papel nos processos de checagem do ciclo celular, esse gene é também capaz de induzir a morte apoptótica. Quando um dano ao material genético é detectado, esta proteína retarda a passagem da célula da fase G1 à fase S do ciclo celular, até que haja o reparo no DNA. Se o dano for grave, e o reparo inviável, a molécula p53 sinaliza para o início da apoptose, através do estímulo para expressão de genes pro-apoptóticos da família *BCL2*, e pela inibição de fatores anti-apoptóticos (Miyashita & Reed, 1995). *P53* também pode aumentar a expressão do gene *FAS* ou

facilitar seu transporte do complexo de Golgi para a membrana celular (Hahn, *et al.*, 1999).

1.3. Tratamento do câncer

Diferentes técnicas podem ser utilizadas no tratamento de tumores. O tipo e o número de tratamentos empregados dependem do tamanho, localização, taxa de crescimento e dos sintomas apresentados pelo paciente (Taraphdar *et al.*, 2001). Tratamentos locais convencionalmente incluem a cirurgia e a radioterapia, sendo a quimioterapia utilizada para tratamentos regionais. Tumores sólidos são de difícil tratamento, mas avanços na qualidade das drogas quimioterápicas têm permitido maior índice de cura em tumores locais e maior controle das metástases (Parnell & Woll, 2006; INCA, 2007).

1.3.1. Cirurgia

A cirurgia é a forma mais antiga de tratamento para o câncer. Avanços nas técnicas cirúrgicas têm possibilitado o aumento do número de procedimentos realizados com sucesso. Atualmente, cirurgias menos invasivas frequentemente são capazes de remover tumores maiores sem afetar áreas saudáveis do órgão. Esse método é utilizado como tratamento principal para a maioria dos cânceres não metastáticos, sendo geralmente realizado quando o tumor gera risco de morte ou afeta demasiadamente a qualidade de vida do paciente. Entretanto, mesmo aliviando os sintomas da doença, na maioria dos casos a cirurgia não é capaz de curar por si só: são necessários métodos pós-cirúrgicos complementares, tais como a radio e a quimioterapia (Pollock & Morton, 2003). Outro grande problema do tratamento cirúrgico, é que ele se torna inviável em muitos casos nos quais o tumor está inacessível ou localizado próximo a estruturas cerebrais vitais, ou mesmo quando o paciente está debilitado demais para resistir ao procedimento cirúrgico (IRSA, 2006).

1.3.2. Quimioterapia

A quimioterapia consiste na utilização de substâncias químicas para combater células tumorais. A maioria dos agentes quimioterápicos exerce seus efeitos pela inibição de

um ou mais processos envolvidos na divisão celular e podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação em agente alquilantes, antimetabólitos, inibidores de mitose e antibióticos antitumorais.

Agentes alquilantes são drogas quimicamente reativas que interagem covalentemente com DNA, causando quebras duplas ou simples na fita, e ligações cruzadas inter e intrafita. Também são capazes de interagir com outras moléculas celulares, fazendo com que percam suas funções. Antimetabólitos são agentes citotóxicos que estruturalmente se assemelham as purinas, pirimidinas e ácidos nucleicos, e são capazes de inibir enzimas da via de síntese do DNA ou RNA, causar quebras na fita ou mesmo causar término prematuro do processo de replicação. A citotoxicidade destes agentes depende do período de tratamento, não sendo dose-dependente. Inibidores de mitose podem atuar por inibição da ação da topoisomerase, um grupo de enzimas que controla a estrutura tridimensional da molécula de DNA durante o processo de replicação, ou pela ligação a dímeros de tubulina. No primeiro caso a inativação da enzima leva a uma desestabilização do material genético, causando quebras e ligações cruzadas. Já o segundo grupo de compostos se liga aos dímeros de tubulina, a unidade básica de formação dos microtúbulos, impedindo a formação dessas estruturas, as quais exercem funções cruciais durante a mitose, meiose, processos de transporte intracelular e secreção. O último grupo de compostos, os antibióticos antitumorais, possuem diferentes modos de ação, podendo realizar ligações cruzadas com DNA ou mesmo inibir a mitose, através da liberação de radicais livres e alterações na membrana plasmática (Sikic, 1999; Lind, 2004; Parnel & Woll, 2006).

Agentes quimioterápicos freqüentemente pode trazer um alívio temporário dos sintomas, prolongando a vida dos pacientes, e podem até mesmo fornecer a cura. A quimioterapia pode ser utilizada em combinação com outros tratamentos, ou mesmo isoladamente, podendo ser:

Curativa: quando utilizada como tratamento principal. É administrada em um pequeno grupo de tumores quimiossensíveis, os quais respondem à combinação de drogas de forma positiva, permitindo a eliminação de tumores volumosos ou mesmo metástases.

Neoadjuvante: quando administrada antes do tratamento local principal (cirurgia ou radioterapia), com objetivo de reduzir o tamanho da massa tumoral e inibir possíveis micrometástases. Sua aplicação facilita o processo cirúrgico, melhorando a preservação e manutenção do aspecto normal do órgão.

Potencializadora: quando administrada juntamente com a radioterapia, visando reduzir a dose de radiação e elevar o potencial terapêutico do tratamento.

Adjuvante: quando administrada após o tratamento principal (cirurgia ou radioterapia). Visa eliminar células não detectadas capazes de gerar metástases. Em pacientes com alto risco de recidiva, a quimioterapia adjuvante eleva a sobrevida e as taxas de cura.

Paliativa: para a maioria dos tumores metastáticos sólidos, a quimioterapia não é curativa, mais pode reduzir a massa tumoral, aliviar os sintomas e estender a sobrevida dos pacientes. Quando utilizada com esse objetivo, a quimioterapia é dita paliativa.

A escolha do tipo de administração quimioterápica depende diretamente do tipo e localização do tumor, do estágio da doença, do tipo de ação da droga (inibidor de mitose, quelante de DNA, etc.), da probabilidade de aquisição de resistência à droga pelas células tumorais, do nível de toxicidade de cada agente, da compatibilidade desses agentes com a radiação ionizante e das condições do paciente.

Apesar de serem eficazes no tratamento de muitos tipos de tumores, os agentes quimioterápicos convencionais agem de forma não específica, atuando também em tecidos normais de multiplicação rápida, como as do sistema hematopoiético e as mucosas. Por esse motivo a quimioterapia tende a produzir, em maior ou menor grau, os seguintes efeitos tóxicos gerais: mielossupressão, cicatrização deficiente, alopecia, lesão do epitélio gastrointestinal; depressão do crescimento em crianças, esterilidade e teratogenicidade (Workman, 2002). Por este motivo, a cada ano, novas drogas e combinações de drogas são utilizadas em pesquisas com intuito de desenvolver quimioterápicos mais efetivos, que causem menos efeitos colaterais (IRSA, 2006).

1.3.3. Radioterapia

A radioterapia pode ser definida como um método terapêutico que utiliza a administração local, regional ou geral de radiação ionizante com objetivo de destruir tecidos alvo doentes (Brans *et al.*, 2007). O Apêndice 1 trás uma visão geral dos tipos de radiação ionizante e seus respectivos efeitos biológicos. É uma modalidade crucial no tratamento contra o câncer, sendo, depois da cirurgia, o método curativo mais aplicado. Constitui também a maior fonte de alívio das dores e sintomas de cânceres metastáticos (radioterapia paliativa). Atualmente, a maioria dos tratamentos radioterápicos são realizados com doses padrões pré-estabelecidas na literatura, as quais variam para cada tipo de tumor (Symonds & Foweraker, 2006).

O efeito da radioterapia depende da localização do tumor, da dose total aplicada, do fracionamento da dose, da duração total do tratamento e do tipo de radiação ionizante empregado. Características teciduais tais como oxigenação, radiosensibilidade intrínseca e capacidade proliferativa também influenciam o resultado total da radioterapia (Falk, 2006).

1.3.3.1. Dosimetria interna

A dosimetria interna tem como finalidade determinar a dose de radiação recebida pelos diversos órgãos e tecidos do corpo humano em decorrência do tratamento radioterápico. Diferentemente dos demais tratamentos sistêmicos utilizados no combate aos tumores, os efeitos biológicos da radioterapia são conhecidos e podem ser medidos por uma unidade física bem definida, a dose absorvida, a qual é dita como a energia absorvida por unidade de massa do tecido (Sgouros, 2005). Observações realizadas ao longo dos tratamentos radioterápicos mostraram que é possível prever os efeitos biológicos da terapia a partir da determinação da dose absorvida total administrada ao paciente (Hellmans, 2001). Também nas fases pré-clínicas de desenvolvimento de novos radiofármacos os estudos de dosimetria têm sido considerados obrigatórios. A avaliação da dose absorvida nestas fases tem permitido o acúmulo de dados sobre doses máximas toleradas pelos pacientes, sobre a relação dose absorvida/resposta biológica e sobre a efetividade e toxicidade das novas terapias, o que tem viabilizado a otimização da

utilização de radionuclídeos e reduzido os efeitos colaterais da terapia (Brans *et al.*, 2007).

Atualmente, a dose absorvida em órgãos alvos e tumores tem sido calculada através de um sistema desenvolvido pelo Medical Internal Radiation Dose (MIRD) Committee of the Society of Nuclear Medicine, o qual utiliza dados de biodistribuição espacial e temporal do radiofármaco e os converte em dados de dose absorvida (Stabin, 2006a). O software MIRDOSE, por exemplo, faz cálculos para mais de 200 radionuclídeos diferentes e leva em conta o sexo e a idade da pessoa no qual a biodistribuição está sendo realizada. Uma versão mais atual do software, o OLINDA/EX (Organ Level Internal Dose Assessment/ Exponencial Modeling) funciona com banco de dados para mais de 800 radioisótopos, incluindo emissores *alpha*, e diferencia doses entre homens e mulheres, mulheres grávidas e crianças (Stabin, 2006b).

1.3.4. Uso combinado da radioterapia e quimioterapia

Terapias multimodais são cada vez mais rotineiras no combate ao câncer. A utilização concomitante de radio e quimioterapia têm elevado às expectativas de cura e se mostrado uma excelente escolha para tratamento dessa doença.

Nem todas as drogas podem ser utilizadas em conjunto com a radioterapia. Agentes citotóxicos tais como doxorrubicina aumentam os danos causados pela radiação aos tecidos normais. Mas alguns quimioterápicos, tais como a cisplatina e o 5-fluoruracil, são capazes de potencializar o efeito antitumoral da radiação sem elevar os danos aos tecidos normais (McKnight, 2003).

As bases moleculares e os mecanismos de ação pelos quais essa cooperação ocorre têm sido investigados ao longo dos anos. Em 1979, Steel e Peckham introduziram as bases teóricas de tais mecanismos, aceitas até hoje (Seiwert *et al.*, 2007). O primeiro mecanismo é o da cooperação espacial. O termo “cooperação espacial” é utilizado para descrever um cenário no qual não existe interação direta entre esses dois agentes, e sim uma complementação de efeitos, onde se somariam as ações antitumorais. A radiação trabalharia localmente e a quimioterapia reduziria o aparecimento de micrometástases por meio de sua ação regional. Nesse caso, a toxicidade dos agentes deve ser complementar, para que doses efetivas de cada um possam ser usadas separadamente

sem que se elevem os danos aos tecidos normais. Na verdade poucas drogas atendem esse critério, sendo mais comum a utilização de uma dose reduzida do quimioterápico (Brizel *et al.*, 2000). Em alguns casos a cooperação ocorre através da “proteção seletiva dos tecidos normais” pelo agente quimioterápico, o que permite que maiores doses de radiação sejam empregadas sem danos adicionais aos tecidos saudáveis. Ou ainda, os dois agentes atuam sobre as mesmas células tumorais, potencializando diretamente os efeitos um do outro e “elevando a resposta de morte tumoral” (Falk, 2006; Seiwert *et al.*, 2007).

1.4. Radiação ionizante e o diagnóstico de tumores

A detecção precoce do câncer é um passo chave para o processo de cura dos pacientes. Uma característica comum aos tipos de cânceres de maior ocorrência é que o prognóstico é melhor e o tratamento obtém maior índice de sucesso se a doença for detectada quando ainda está localizada, em seus estágios iniciais. O diagnóstico precoce permite intervenções locais, detecção de focos potencialmente invasivos, alteração do curso natural da doença através do bloqueio do crescimento maligno e a prevenção da morte do paciente (Eyre *et al.*, 2000).

O diagnóstico do câncer pode ser feito através de análises bioquímicas do sangue, estudos citopatológicos e anátomopatológicos, imuno-histoquímica e imagem (Oliveira *et al.*, 2006). De forma geral têm-se buscado métodos diagnósticos menos invasivos, o que têm tornado o diagnóstico por imagem uma das modalidades mais utilizadas pelos especialistas. Tumores malignos frequentemente alteram sua relação espacial com os tecidos normais do corpo, e a imagem é extremamente importante, não só para o diagnóstico, mas também para determinação do estágio da doença e para o monitoramento do paciente após o tratamento.

A rápida revolução tecnológica tem permitido o desenvolvimento de computadores e máquinas cada vez mais poderosas, e tem afetado todas as áreas da medicina, mas nenhuma tanto quanto o diagnóstico por imagem. Num futuro próximo, os avanços tecnológicos devem permitir aos clínicos não só a visualização do tumor, mas também a

elucidação de parâmetros tumorais e a avaliação da eficácia do tratamento (Steckel, 2000). Técnicas convencionais de obtenção de imagem, tais como a Ressonância Magnética (RM), a Tomografia Computadorizada (TC) e o ultra-som são ferramentas importantes na detecção de massas tumorais, mas não podem ser utilizadas sozinhas. Pelo fato de sua imagem significar o mapa de atenuação do objeto, ou seja, as variações de densidade presentes no tecido, esses exames permitem apenas a caracterização de alterações anatômicas, não sendo possível a partir deles avaliar alterações funcionais e metabólicas (Tinoiz, 2005). A presença de massa residual em pacientes com boa resposta ao tratamento, assim como a infiltração de linfonodos de pequenas dimensões, são exemplos de situações nas quais a avaliação estrutural é insuficiente (Oliveira *et al.*, 2006).

Atualmente, os exames que permitem a caracterização metabólica e a observação do funcionamento dinâmico dos tecidos são obtidos da Medicina Nuclear, a qual se fundamenta na detecção do padrão de distribuição biológica de fármacos acoplados a isótopos radioativos (radiofármacos), por meio de um equipamento denominado gama-câmara (Coutinho, 2004). O diagnóstico pode ser feito por dois diferentes exames: Tomografia por Emissão de Fóton Único (SPECT) e Tomografia por Emissão de Pósitron (PET), os quais são geralmente utilizados em conjunto com TC o que permite a localização anatômica das alterações metabólicas/funcionais, otimizando o diagnóstico e o tratamento dos pacientes (Venneri, 2007).

A SPECT utiliza radiofármacos emissores gama de meia vida curta, e é capaz de gerar imagens planares ou tridimensionais. Dentre os fatores de seleção para utilização de um radioisótopo estão seu tempo de meia-vida, sua disponibilidade comercial, seu tipo de emissão e a energia de sua emissão. As gama-câmaras atualmente disponíveis possuem sensibilidade para adquirir imagem a partir de fótons de energia entre 50-500keV, sendo a melhor resolução conseguida na faixa de 140keV (Hustinx & Alavi, 2005).

Os radiofármacos mais comumente usados na imagem oncológica em SPECT são aqueles marcados com os radioisótopos ^{131}I (364keV), ^{67}Ga (93keV), ^{201}Tl (135 e 167keV) e o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (140keV). O ^{131}I é principalmente utilizado para detecção de carcinomas de tireóide, devido à alta captação de iodo por esse órgão. O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ transformou-se em um traçador muito importante para diagnóstico tumoral, devido a

sua disponibilidade comercial, dosimetria favorável, meia vida curta ($T_{1/2} = 6$ horas) e emissão de fóton gama único de energia favorável para a imagem. Alguns dos radiofármacos que utilizam o ^{99m}Tc como traçador para detectar tumores primários ou metastáticos são: ^{99m}Tc -medronato (^{99m}Tc -MDP) para detecção óssea, ^{99m}Tc -enxofre coloidal para fígado e baço, ^{99m}Tc -gluco-heptonato e ^{99m}Tc -ácido-dietilenotriaminopentacético (^{99m}Tc -DTPA) para cérebro, e ^{99m}Tc -ácido dimercaptossuccínico (^{99m}Tc -DMSA) para imagem do córtex renal (Thrall, 2003; Venneri, 2007).

O PET é uma modalidade de tomografia que utiliza compostos biológicos marcados com elementos de elevada instabilidade atômica que sejam emissores de pósitrons. Quando o pósitron é emitido por um núcleo instável, ele segue sua trajetória até encontrar um elétron negativo do meio, com o qual se combina. Essa união causa a aniquilação do par pósitron-elétron e conseqüente liberação de energia na forma de dois fótons gama de 511keV cada, de mesma direção e sentidos opostos (FIG.5). Esses fótons são detectados externamente, e a informação é usada para a reconstrução das tomografias (Robilota, 2006).

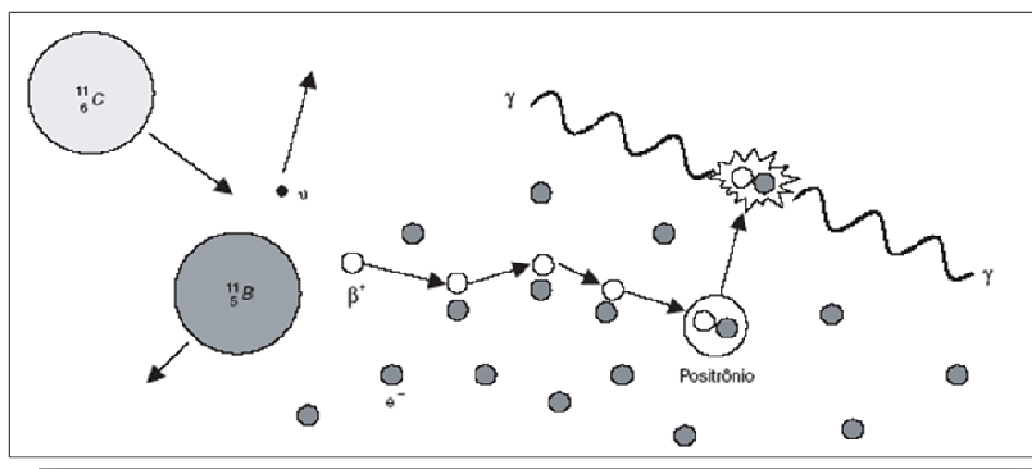


FIG.5: Esquema da formação de raios gama a partir da aniquilação de pósitrons.

Exemplo do decaimento do ^{11}C para ^{11}B e da aniquilação pósitron-elétron e conseqüente formação do par de fótons de 511 keV cada, de mesma direção e sentidos opostos. Positrônio é o sistema pósitron-elétron formado antes da aniquilação, e que resulta na produção do par de fótons. Fonte: Robilota, 2006.

Os radionuclídeos emissores de pósitron utilizados atualmente na Medicina Nuclear são produzidos por ciclotrons, e estão representados na Tabela 2. O ^{11}C e ^{15}O são de elementos constituintes dos organismos vivos, fato que os torna muito adequados para a marcação de biomoléculas. Por outro lado, como suas meias-vidas físicas são muito curtas, assim como a do ^{13}N , só podem ser utilizados se o acelerador para sua produção estiver nas dependências do próprio centro diagnóstico o que é muito raro (Fraser *et al.*, 1999).

Hoje, o radionuclídeo mais usado é o ^{18}F , marcando a fluordeoxiglicose (FDG), um análogo da glicose que é consumido pelas células ativas de tal maneira que sua presença indica função metabólica tecidual. Os quase 110 minutos de meia-vida do ^{18}F permitem que a ^{18}F -FDG seja transportada a locais de exame razoavelmente afastados do centro de produção (em torno de 100 km por transporte terrestre) e viabilizam sua ampla utilização (Robilota, 2006).

Tabela 2: Principais emissores de pósitrons utilizados na Medicina Nuclear e suas respectivas meias-vidas. (Adaptado de Robilota, 2006).

<i>RADIONUCLÍDEO</i>	<i>T_{1/2} (minutos)</i>
Carbono-11 (^{11}C)	20,4
Nitrogênio-13 (^{13}N)	9,96
Oxigênio-15 (^{15}O)	2,07
Flúor-18 (^{18}F)	109,8
Gálio-68 (^{68}Ga)	68
Rubídio-82 (^{82}Rb)	1,3

Apesar de amplamente utilizados, os radiofármacos atualmente disponíveis para exames de PET e SPECT não são específicos para tumores, e sim para órgãos, detectando “áreas quentes” (hipercaptantes) e “áreas frias” (hipocaptantes ou não captantes). É a maior vascularização das áreas neoplásicas devido a seu metabolismo acelerado que levam ao acumulação desse radiofármaco em regiões de células tumorais e permitem a detecção das mesmas.

Esse mecanismo de acumulação e detecção pode gerar falsos positivos quando existe, por exemplo, a presença de inflamação ou infecção (Thrall *et al.*, 2003). Para detecção de inflamações e infecções o gálio-67 e leucócitos radiomarcados com ^{99m}Tc , mas estas moléculas também não possuem reconhecimento específico para imagens de sítios de infecção ou inflamação (Lupetti *et al.*, 2003).

1.5. A necessidade da busca de novos compostos para tratamento e diagnóstico

Uma droga anticâncer ideal deve matar ou incapacitar as células tumorais sem causar danos excessivos às células normais. Como dito anteriormente, essa situação ideal ainda não foi alcançada com os tratamentos atualmente disponíveis, os quais acabam gerando uma grande variedade de efeitos colaterais. Na verdade, a toxicidade para as células normais e a resistência de alguns tipos tumorais às drogas têm sido apontadas como as principais causas da falha terapêutica e perda de vidas durante o tratamento do câncer. Por isso, cada vez mais, se torna necessária à busca de novos agentes com potencial terapêutico, seletivos para células tumorais, capazes de reduzir os danos aos tecidos saudáveis do organismo e aumentar a sobrevida dos pacientes.

Atualmente, o maior esforço das pesquisas está concentrado em utilizar biomoléculas que reconheçam seletivamente estruturas moleculares que só existam na superfície tumoral (Winberg, 2005). Para tal, o conhecimento dos mecanismos pelos quais uma célula normal se torna maligna é de extrema importância e permite saber, com cada vez mais precisão, como e porque uma droga antitumoral foi bem sucedida ou não (Hanahan & Weinberg, 2000). Por exemplo, alguns antígenos associados a tumores, ou mesmo receptores celulares (tais como hormônios de crescimento, vitaminas e lipídeos) são super expressos na superfície tumoral e podem ser usados como alvos para terapia. Pesquisas recentes também mostraram que a indução seletiva de apoptose em células cancerosas, através da utilização de marcadores específicos expressos por essas células, pode modular os níveis de apoptose, o que seria um alvo para desenvolvimento de novos medicamentos e terapias anticâncer (Taraphdar *et al.*, 2001).

Também para o diagnóstico por imagem do câncer, diversos estudos têm sido realizados com objetivo de obter um radiofármaco capaz de se dirigir com alto grau de captação, específica e seletivamente aos tumores malignos, o que permitiria a detecção de tumores ainda pequenos e a realização do tratamento nos estágios iniciais da doença (Reubi, 2007). O grande objetivo dos pesquisadores é desenvolver uma molécula com atividade antitumoral, passível de ligação a um radionuclídeo, que se concentre somente nos tecidos tumorais. A grande vantagem destas novas moléculas é que a união de uma droga antitumoral a um radionuclídeo seria útil não somente para diagnóstico, mas também para o tratamento, uma vez que podem ser utilizadas como carreadoras diretas de radiação gama ou beta para a região tumoral. (Pauwels *et al.*, 1998)

A vasta quantidade de pesquisas com substâncias sintéticas tem contribuído relativamente pouco para o desenvolvimento de novas drogas e radiofármacos. Entretanto a busca desses protótipos tem sido significativamente bem sucedida quando desenvolvida a partir de produtos naturais (Extermann *et al.*, 2002; Lewis & Garcia, 2003; ABTA, 2006). Henry Wagner (1996), nas comemorações dos 100 anos da Medicina Nuclear, disse que, marcadores tumorais geradas a partir de peptídeos naturais representam uma das áreas de pesquisa mais promissoras do século XXI. Muitos fármacos disponíveis no mercado, ou em fase de teste clínico, foram obtidos a partir de produtos naturais derivados de plantas, como por exemplo, a morfina (analgésico), taxol, podofilotoxina, camptotecina e alcalóides da vinca (antitumorais), artemisinina (antimalárico), aspirina (antiinflamatório, analgésico, antipirético e inibidor de agregação plaquetária) (David *et al.*, 2002), ou derivados de venenos animais como captopril (anti-hipertensivo, derivado da peçonha de *Bothrops jararaca*) e crotalina (analgésico derivado da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*).

Atualmente, estudos pré-clínicos estão sendo realizados com a TM-601 radiomarcada com ¹³¹I. Essa molécula é uma versão sintética da clorotoxina, um peptídeo purificado da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus*. A TM-601 tem forte afinidade por tumores cerebrais malignos e é forte candidata a radiofármaco padrão para detecção de gliomas (Hockaday *et al.*, 2005, Mamelak *et al.*, 2006).

Os primeiros testes utilizando venenos como agentes antitumorais foram realizados no início do século passado, quando Calmette *et al.* (1933) relataram a atividade da

peçonha de *Naja sp.* em células de adenocarcinoma. (Balasubashini *et al.*, 2006). Desde então o efeito antitumoral de várias moléculas derivadas de peçonhas animais têm sido demonstrado. O veneno da aranha *Macrothele raven* mostrou-se citotóxico *in vitro* de forma dose-dependente para células de carcinoma mamário (Gao *et. al.*, 2007). Pesquisas atualmente realizadas mostraram que proteínas purificadas de peçonha de cobra têm seletividade citotóxica para células tumorais. Omran (2003) relatou o feito citotóxico do veneno do escorpião *Leiurus quinquestriatus* em células de câncer de próstata e mama. Karthkeijam *et al.*, (2008) relataram a atividade antitumoral da peçonha da cobra *Lapemis curtus* em testes *in vitro* com células de carcinoma de laringe humano e carcinoma de colo do útero humano. Para a mesma peçonha também foi verificada a capacidade de reduzir o crescimento tumoral *in vivo*, de animais implantados com tumor ascítico de Ehrlich. Mady (2002) Trabalhando com a peçonha bruta da cobra *Echis coloratus* relatou a redução da viabilidade metabólica de células de tumor ascítico de Ehrlich quando tratadas com tal peçonha, *in vitro* e *in vivo*. Balasubashini *et al.* (2006) mostrou efeito antitumoral de um peptídeo isolado do veneno do peixe leão *Pterios volitans* em células de carcinoma alveolar e câncer cervical.

1.6. As toxinas animais

Criaturas venenosas produzem e utilizam seu veneno como parte de mecanismos de ataque, captura, digestão e defesa contra predadores, agressores e competidores. (Halstead, 1988; Bulaj *et al.*, 2003). Venenos têm evoluído em diferentes filós (plantas, animais e microorganismos), e são encontradas em animais que habitam tanto o ambiente aquático, tais como águas vivas (*Carybdea*), anêmonas (*Bunossoma*) e peixes (*Pterois*, *Scorpaena*), como em animais de hábitos terrestres, como aranhas (*Latrodectus*), cobras (*Bothrops*, *Crotalus*) e escorpiões (*Tityus*) (McCormick & Meinwald, 1993; Lewis & Garcia, 2003).

De maneira geral, os venenos são uma mistura complexa de substâncias de composição química diversificada e variado espectro de ação farmacológica. Dentre estas substâncias encontram-se enzimas, neurotransmissores, ácidos nucléicos, sais

inorgânicos, monoaminas, toxinas protéicas, toxinas não-protéicas e outros compostos orgânicos ainda não identificados (Figueiredo, 1995).

Historicamente, o interesse inicial no estudo das peçonhas era voltado para descoberta de terapias anti-envenenamento, devido ao número relativamente alto de acidentes e à gravidade dos mesmos. As pesquisas desenvolvidas eram realizadas com animais que apresentavam maior interesse epidemiológico, ou seja, foram concentradas nos organismos terrestres (Church & Hodgson, 2002). Entretanto, o avanço das descobertas com toxinas demonstrou a diversidade e seletividade farmacológica das mesmas, colocando-as como fontes de moléculas biologicamente ativas com potencial farmacológico e/ou terapêutico, e também como instrumentos de investigação de mecanismos moleculares relacionados à suas ações (Andrich, 2005). Desde então, criaturas venenosas têm sido estudadas como fontes potenciais de agentes farmacológicos e ferramentas para estudos de mecanismos fisiológicos (Smith & Wheeler, 2006).

Muitos são os trabalhos caracterizando as atividades biológicas/farmacológicas de peçonhas de animais terrestres, mas existem pouquíssimas pesquisas sendo realizadas com animais venenosos marinhos, particularmente com os peixes venenosos. Isso se deve, além do fator histórico anteriormente mencionado, a maior dificuldade de obtenção/criação de espécimes marinhos e da maior dificuldade de extração de suas peçonhas (Church & Hodgson, 2002).

Desta forma, as toxinas originadas de animais marinhos representam uma vasta e ainda inexplorada fonte de novos componentes farmacológicos e moléculas capazes de se tornarem moldes para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

1.7. O Peixe escorpião: biologia e classificação

Os peixes constituem quase metade do número de espécies de vertebrados na terra, sendo classificados em 50 ordens, as quais abrigam 445 famílias com um total de 22 000 espécies (Nelson, 1984). Deste total, mais de 200 espécies de peixes marinhos, incluindo os peixes-escorpião (*Scorpaena plumieri*), peixes-zebra (*Danio rerio*), peixes-

pedra (*Synanceia verrucosa*), arraias (*Pastinachus sp.*), peixe-aranha (*Trachinus draco*), niquin (*Thalassophryne nattereri*), caboz gigante (*Lipophrys pholis*) e algumas espécies de tubarões, possuem algum tipo de substância tóxica (Russel, 1996).

Para ser classificada como venenosa, uma espécie de peixe além de secretar algum tipo de substância nociva a partir de glândulas especializadas, deve também possuir algum aparato especializado para a inoculação do veneno. Em peixes, esse aparato invariavelmente consiste de espinhos, os quais podem estar localizados na região dorsal (mais comum), peitoral, opercular, pélvica, anal ou caudal do animal, dependendo da espécie (Williamson, 1995).

A família Scorpaenidae é a mais venenosa da costa brasileira, e consiste de oito diferentes gêneros, totalizando 18 espécies, sendo que somente peixes do gênero *Scorpaena* estão associados a acidentes com seres humanos. O peixe-escorpião *S. plumieri* é popularmente conhecido como moréia-atí ou mangangá e, assim como outros *Scorpaena*, tem o hábito de permanecer imóvel e parcialmente escondido por longos períodos de tempo e é comumente encontrado dentro ou perto de rochas, recifes de coral ou algas marinhas, com os quais costumam se camuflar de maneira muito eficaz o que eleva a ocorrência dos acidentes. É considerado o peixe mais venenoso do litoral brasileiro (Russel, 1965; Schaeffer *et al.*, 1971; Haddad Jr., 2000; Khoo, 2002).

A identificação da espécie é realizada através da visualização de manchas brancas que aparecem sobre a coloração negra da região axilar das nadadeiras peitorais (FIG.6). Estes animais possuem um aparato primitivo de inoculação da peçonha, e a utilizam principalmente como forma de defesa. Possuem treze espinhos no dorso, dois nas nadadeiras pélvicas e três anais, todos envolvidos por membranas tegumentares (Haddad Jr. *et al.*, 2003). O envenenamento ocorre por pressão mecânica quando o animal é tocado ou pisado. Neste momento os espinhos se tornam eretos e perfuram os tecidos das vítimas, e a bainha tegumentária que envolve os espinhos é rompida permitindo que a peçonha penetre no ferimento (Carvalho-Filho, 1999).

Recentemente, Haddad Jr. *et al.* (2003) relataram as manifestações clínicas de 14 acidentes humanos com o peixe escorpião *Scorpaena plumieri*. Dentre os sintomas, incluem-se: dor intensa e irradiada, adenopatia precoce na raiz do membro afetado,

edema, eritema, náuseas, vômitos, febre, agitação, mal-estar, sudorese, diarreia, taquicardia, arritmias e hipotensão arterial, não sendo relatados óbitos.

Apesar da sintomatologia causada pelos acidentes com a peçonha de *S. plumieri* estar bem estabelecida, pouco se sabe sobre as propriedades fisio-farmacológicas e bioquímicas desta peçonha, assim como também sobre seus possíveis componentes de interesse terapêutico e os mecanismos de ação envolvidos em tais efeitos. Para esta peçonha já foram relatados atividade hemolítica e hemorrágica (Andrich *et al.*, 2004; Cassoli *et al.*, 2004). Carrijo *et al.* (2003), em suas investigações sobre a peçonha deste peixe-escorpião, detectou a presença de atividade tóxica/letal enzimática (proteolítica) em camundongos albinos com uma DL₅₀ de 0,28mg de proteína/Kg. No mesmo trabalho, Carrijo *et al.* (2003) descreveu a purificação, a partir da peçonha bruta, de uma enzima proteolítica com atividade gelatinolítica. Tentativas de seqüenciamento desta enzima não foram bem sucedidas, sugerindo que a molécula possui a região N-terminal bloqueada. Apesar disso, as seqüências de aminoácidos obtidas a partir de fragmentos desta enzima demonstraram sua semelhança com metaloproteinases já descritas na literatura.

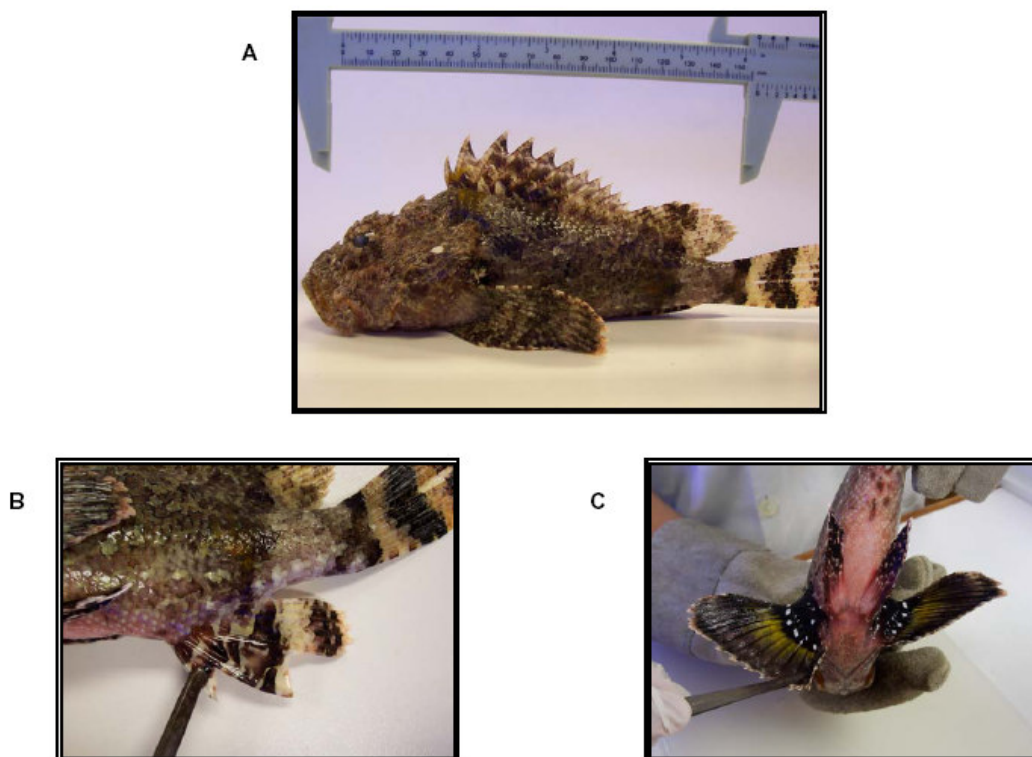


FIG.6: O peixe escorpião *Scorpaena plumieri*. A) Vista lateral de um exemplar coletado na ilha de Vitória - ES, com os espinhos dorsais eretos. B) Nadadeira anal e espinhos anais. C) Manchas brancas sobre coloração negra na região axilar das nadadeiras peitorais, as quais são características desta espécie (Fonte: Laboratório de Química de Proteínas – Universidade Federal do Espírito Santo).

1.8. Enzimas proteolíticas: Metaloproteínases

As enzimas proteolíticas realizam a hidrólise de ligações peptídicas, e por isso são também chamadas de amida-hidrolases. São classificadas em amidases, as quais degradam amidas lineares e cíclicas, ou proteases, que degradam peptídeos e proteínas. No grupo das proteases encontram-se as exopeptidases (peptidases), capazes realizar clivagens próximas ao grupo N- ou C-terminal, e as endopeptidases, as quais catalisam hidrólise de ligações peptídicas internas. As endopeptidases são classificadas em quatro diferentes classes, distintas em sua estrutura catalítica e seu mecanismo de ação: cisteíno, aspartato, serino e metaloproteínases (Antonov, 1993).

As metaloproteínases contêm um íon metálico importante no sítio catalítico, e geralmente atuam em meio neutro e/ou fracamente alcalino (Rawlings & Barrett, 1995). Metaloproteínases de matriz (MMPs) são uma família de mais de 23 endopeptidases neutras dependentes de zinco que coletivamente são capazes de degradar componentes estruturais da matriz extracelular (Engeblad & Werb, 2002). Mas existem também aquelas capazes de degradarem proteínas ligadas a fatores de crescimento, precursores hormonais e de fatores de crescimento, receptores da superfície celular, bem como moléculas de adesão celular (como por exemplo, integrinas) (Sternlicht & Werb, 2001). As MMPs estão amplamente distribuídas no organismo humano onde desempenham uma série de funções fisiológicas como, por exemplo, na cicatrização (Wolf *et al.*, 1992), na reabsorção óssea (Delaisé *et al.*, 1992), na involução mamária (Talhouk *et al.*, 1992) e em outras funções fisiológicas associadas a gravidez e parto (Jeffrey, 1991). Por sua vasta ação nos tecidos, as MMPs são consideradas enzimas chave em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo o desenvolvimento tumoral. A expressão e atividade dessas enzimas aparecem aumentadas em quase todos os tipos de câncer humanos, e na verdade, virtualmente, as MMPs podem contribuir em todos os estágios de progressão do câncer, incluindo o crescimento, angiogênese, apoptose, bem como invasão tecidual e formação de metástase.

Até hoje, a maior parte das proteases isoladas de peçonhas animais pertence a classe das serino ou metaloproteases existindo apenas poucas evidências da presença de cisteíno e aspartato-proteínases (Felicori *et al.*, 2003). As metaloproteínases de peçonhas de serpentes (Snake Venom MetalloProteínases - SVMP's), por exemplo, são enzimas envolvidas nos efeitos tóxicos observados nos envenenamentos humanos (Bjarnason e Fox, 1995). Mais de 100 SVMP's já foram purificadas, a maioria das quais têm a habilidade de hidrolisar componentes protéicos da matriz extracelular como fibronectina, enactina, laminina e colágeno tipo IV, além de clivar gelatina desnaturada (Baramova *et al.*, 1989; Bjarnason e Fox, 1995). Essa enzimas possuem fortes semelhanças estruturais com as MMPs de mamíferos (Ho *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2005), e dois membros da família de MMP's bem caracterizados, as progelatinases A e B humanas, são enzimas ativas na degradação de colágeno desnaturado (gelatina) (Murphy & Crabe, 1995).

Estruturalmente, duas classes de metaloproteinases isoladas de venenos animais, as PII e PIII, possuem domínios desintegrinas em sua estrutura, ou seja, possuem regiões capazes de se ligarem a integrinas na superfície celular, e impedir que estas moléculas executem suas funções celulares. A capacidade de ligação com as integrinas presentes em linhagens de células tumorais e a conseqüente inibição da adesão destas células às proteínas presentes na membrana basal faz com que muitas desintegrinas sejam capazes de inibir a formação de metástases e sejam potenciais moléculas para detecção de tumores.

1.9. Parâmetros farmacocinéticos e o desenvolvimento de novos fármacos

A distribuição, metabolismo e a excreção de um composto exógeno em um organismo vivo dependem de fatores físicos, químicos e fisiológicos. Esses fatores controlam a dispersão do composto de seu local de administração, permitem sua difusão, promovem sua passagem através da membrana plasmática e finalmente determinam seus locais de acúmulo e excreção (Silva *et al.*, 2006).

A farmacocinética é a divisão da farmacologia que usa modelos matemáticos para descrever e prever a quantidade dos medicamentos e suas concentrações em vários fluidos do organismo e as mudanças nestas quantidades com o tempo (Jang *et al.*, 2001).

Para o desenvolvimento racional de novas drogas esses parâmetros devem ser primariamente avaliados. São os perfis de absorção, distribuição, metabolismo e excreção da molécula que determinarão seu potencial terapêutico e seus possíveis órgãos alvo (Terasaki & Ohtsuki, 2005).

Existem quatro etapas determinantes na farmacocinética, geralmente chamadas de ADME: absorção, distribuição, metabolismo e excreção. A absorção descreve os processos pelos quais as moléculas do fármaco se movimentam do local de administração para a circulação sistêmica. Quando a administração é feita por via endovenosa/endoarterial não são realizados estudos desta natureza. A distribuição descreve o movimento das moléculas da circulação sistêmica para tecidos

extravasculares. O metabolismo, ou biotransformação, descreve a ação enzimática do organismo sobre a droga. Frequentemente é um mecanismo de defesa primário através do qual o corpo tenta evitar a exposição aos xenobióticos. Tipicamente, as moléculas são convertidas em metabólitos mais hidrofílicos e inativos, os quais são posteriormente excretados do corpo. Mas algumas vezes os metabólitos gerados pelo metabolismo enzimático podem contribuir para atividade da droga ou mesmo elevar sua toxicidade. Finalmente a excreção diz respeito ao transporte ativo ou passivo de transporte das moléculas para a bile ou urina (Rowland & Tozer, 1995).

Durante o desenvolvimento de um novo fármaco é necessário o estabelecimento de quais propriedades a nova molécula deve possuir para permitir seu uso. Segundo Knigh (2006), no caso de moléculas para detecção de tumores por imagem é interessante que ela possua um decaimento sanguíneo rápido, para permitir a aquisição de uma imagem com background reduzido. Sua excreção deve ser realizada preferencialmente pelos rins, sem fixação renal, e rapidamente ser eliminado pela urina, para que o tempo de exposição do paciente a altas doses de radiação seja reduzido.

2. JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

O câncer têm matado milhões de pessoas em todo o mundo. Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (2006), no ano 2020 serão mais de 15 milhões de novos casos e mais de 12 milhões de mortes pelo câncer. No Brasil, a incidência dessa doença na população acompanha as estatísticas mundiais. As neoplasias representam a segunda maior causa de morte por doenças, ficando atrás apenas das doenças do aparelho circulatório. Os tratamentos atualmente disponíveis, na maioria dos casos, mesmo quando utilizados em conjunto, não são capazes de curar totalmente, e não discriminam eficientemente tecidos normais de tecidos tumorais. Também a falta de diagnósticos precisos e realizados nos estágios iniciais da doença contribuem para o aumento do número de mortes pelo câncer. Apesar de diversos radionuclídeos serem amplamente utilizados no diagnóstico câncer, ainda não existe na Medicina Nuclear um fármaco reconhecido com específico para imagem de sítios tumorais.

Poucos avanços estão sendo conseguidos nas clínicas de terapia e diagnósticos de tumores, o que torna de extrema importância o desenvolvimento de novas moléculas com potencial terapêutico e diagnóstico que permitam o diagnóstico precoce e o aumento da sobrevida do paciente. Atualmente, o maior esforço das pesquisas está concentrado em utilizar biomoléculas que reconheçam especificamente estruturas moleculares que só existam na superfície tumoral. Pesquisas com substâncias sintéticas tem contribuído relativamente pouco para o desenvolvimento de novas drogas anticâncer. Entretanto, a busca desses protótipos tem sido significativamente bem sucedida quando desenvolvida a partir de produtos naturais e têm despertado cada vez mais o interesse da indústria farmacêutica.

Toxinas animais possuem uma diversidade de atividades biológicas e farmacológicas e têm-se mostrado fonte rica de moléculas com potencial terapêutico. Diversos trabalhos têm-se realizado com toxinas de animais terrestres, mas toxinas de peixes venenosos marinhos são uma fonte potencial e ainda inexplorada de novas substâncias capazes de se tornarem moldes para o desenvolvimento desses novos agentes. Neste projeto, a peçonha bruta do peixe marinho *Scorpaena plumieri* e uma enzima gelatinolítica purificada à partir desta peçonha, foram avaliados quanto a seu potencial uso como moléculas alternativas para detecção de sítios tumorais *in vivo*.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar e caracterizar parcialmente a atividade antitumoral da peçonha do peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* (SPB), bem como de uma enzima gelatinolítica (SPGP), previamente purificada a partir desta peçonha, e avaliar o potencial uso destas substâncias na detecção de sítios tumorais *in vivo*.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Identificar o efeito antitumoral da peçonha de *Scorpaena plumieri* (SPB), através da avaliação de sua citotoxicidade em linhagens de células de glioblastoma p53-mutante (RT2), glioblastoma p53-selvagem (T98) e carcinoma mamário p53-selvagem (carcinoma ascítico de Ehrlich - CAE);

3.2.2. Obter, a partir da peçonha bruta, a SPGP, em quantidade suficiente para realização dos estudos propostos;

3.2.3. Radiomarcas a SPB e a SPGP, utilizando ^{99m}Tc , ^{125}I e ^{131}I como radiotraçadores;

3.2.4. Realizar o controle de qualidade radioquímico das moléculas radiomarcadas;

3.2.5. Avaliar a manutenção da atividade biológica das moléculas radiomarcadas;

3.2.6. Estudar o padrão de biodistribuição das moléculas radiomarcadas em animais com Tumor de Ehrlich;

3.2.7. Avaliar a eficiência das moléculas radiomarcadas em detectar sítios tumorais *in vivo* de forma a verificar seu potencial uso para diagnóstico por imagem;

3.2.8. Avaliar a toxicidade aguda das moléculas radiomarcadas, quando administradas numa dose 10 vezes maior que a dose injetada nos estudos de biodistribuição e imagem.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de qualidade analítica, sendo as cromatografias realizadas com reagentes grau HPLC. As soluções utilizadas nas cromatografias foram preparadas em água purificada em sistema milli-Q, e as utilizadas nos demais experimentos em água destilada.

4.2. Obtenção da peçonha de *S. plumieri*

Os exemplares de peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* (FIG.6A) foram capturados por mergulhadores licenciados pelo IBAMA, com auxílio de puçá manual, em locais de águas rasas, próximo de rochas e recifes de coral na baía de Vitória-ES. Os exemplares foram identificados e mantidos em aquário com água marinha e suprimento adequado de oxigênio até momento da extração da peçonha. A identificação dos espécimes foi feita pela visualização de manchas brancas sobre coloração negra na região axilar das nadadeiras peitorais, as quais são características desta espécie (FIG.6C).

A peçonha foi extraída dos espinhos dorsais e anais de acordo com Schaeffer *et al.* (1971), utilizando método *Batch*. Os espinhos foram removidos do peixe, previamente anestesiado por resfriamento (-20°C), e fatiados manualmente com auxílio de alicate. Os fragmentos foram transferidos para um frasco contendo água ultrapura (4°C) e manualmente homogeneizados para solubilização da peçonha. Todo o processo foi realizado em banho de gelo. O extrato foi centrifugado a 4°C e 6000g por 15 minutos para remoção de partículas insolúveis. O sobrenadante obtido da centrifugação corresponde à fração solúvel da peçonha bruta (SPB), e foi imediatamente aliquoteado e liofilizado. A FIG.7 mostra os passos do processo de extração da peçonha de *S. plumieri*.

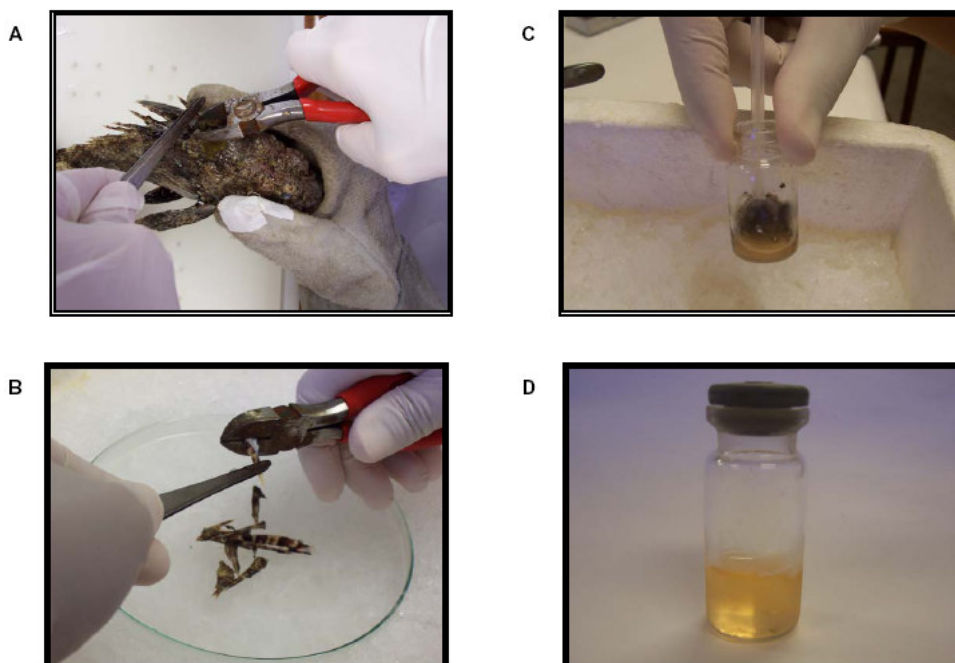


FIG.7: Passo a passo da extração da peçonha do peixe-escorpião *S. plumieri*. A) Remoção dos espinhos dorsais do peixe escorpião. B) Seccionamento dos espinhos. C) Homogeneização dos espinhos fatiados em água purificada. d) Fração solúvel da peçonha bruta após remoção das partículas insolúveis por centrifugação. Fonte: Arquivo do Laboratório de Química de Proteínas/ Universidade Federal do Espírito Santo).

4.3. Determinação do conteúdo protéico da SPB e suas frações

O conteúdo protéico da peçonha bruta e suas frações foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando soro albumina bovina como padrão.

4.4. Purificação de uma enzima gelatinolítica a partir da SPB

Todas as etapas de purificação e avaliação da atividade gelatinolítica foram realizadas no Laboratório de Química de Proteínas da Universidade Federal do Espírito Santo, sob orientação da Dra. Suely Gomes de Figueiredo.

A obtenção de um componente protéico purificado com atividade gelatinolítica, foi realizada através da adaptação do método de Carrijo *et al* (2005), utilizando quatro etapas cromatográficas. O peso molecular aparente da proteína foi avaliado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, conforme descrito no item 4.5. A presença da atividade gelatinolítica foi monitorada por meio de zimografia (conforme descrito no item 4.6.).

4.4.1. Etapa 1 – Cromatografia por filtração em Gel

Imediatamente após a extração, uma amostra da SPB foi aplicada em coluna de filtração molecular Sephacryl S 200 HR (1,2 x 120cm), equilibrada e eluída com tampão fosfato de sódio 10mM pH 7,4 contendo 0,4M de NaCl. O fracionamento foi realizado a 4°C, com fluxo de 5,4ml/hora, as frações foram coletadas com volume de 1,8mL e tiveram sua absorbância lida a 280nm. Este comprimento de onda foi escolhido para monitoramento do perfil de eluição do conteúdo protéico das amostras, pois representa o pico máximo de absorção da radiação eletromagnética na região do ultravioleta, gerado pela deslocalização eletrônica presente nos anéis aromáticos que compõe determinados aminoácidos (Dickson, 1999).

Após quantificação do conteúdo protéico através da medida da absorbância a 280nm, a atividade gelatinolítica foi avaliada. As frações dotadas de atividade foram agrupadas e dialisadas contra água destilada por 24h a 4°C. A amostra resultante foi liofilizada e mantida a -20°C até ser submetida à próxima etapa de fracionamento.

4.4.2. Etapa 2 – Cromatografia por Troca Iônica

O material com atividade gelatinolítica obtido por filtração em gel foi submetido à cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE-Celulose (1,0 x 10cm), previamente equilibrada com o tampão fosfato 0,1M pH 7,6. A amostra foi solubilizada e aplicada com tampão fosfato 0,1M pH 7,6 e, após adsorção, eluída com gradiente não-linear (“step-wise”). Para eluição foram utilizadas soluções do tampão de equilíbrio contendo diferentes concentrações de NaCl (0,1; 0,2 e 0,4M). O fluxo foi de ~1,5mL/min e foram coletadas frações de 1,5mL. Para avaliação do conteúdo protéico, as frações coletadas foram lidas à 280nm. As frações eluídas na mesma concentração de sal foram agrupadas

e testadas quanto à atividade gelatinolítica, conforme item 4.6. A amostra ativa foi mantida a -20°C até ser submetida à próxima etapa de fracionamento.

4.4.3. Etapa 3 – Cromatografia em Fase Reversa

O material bioativo obtido da cromatografia em troca iônica foi submetido à cromatografia em fase reversa em sistema HPLC, High Pressure Liquid Chromatography (Shimadzu, modelo LC20AD/T).

A amostra foi centrifugada a 16000g por 15 minutos, para retirada de partículas insolúveis, e aplicada em coluna de fase reversa Supelco C4 (0,46 x 15cm), previamente equilibrada com a fase móvel A (0,1% de ácido trifluoracético (TFA) em água) a 23°C . As proteínas foram eluídas da coluna usando gradiente linear descontínuo da fase móvel B, a qual era composta de 0,1% TFA em acetonitrila (ACN), de 0 a 50%, segundo o programa: 0% de B de 0 a 10 minutos; 0 → 20% de B de 10 a 15 minutos; 20 → 50% de B de 15 a 90 minutos. O fluxo utilizado foi de 1mL/min, sendo as proteínas detectadas pela absorção a 280nm. O material eluído foi coletado manualmente, e as frações foram liofilizadas e testadas quanto à atividade gelatinolítica (conforme descrito no item 4.6.).

4.4.4. Etapa 4 - Recromatografia em Fase Reversa

O material ativo liofilizado proveniente da terceira etapa de fracionamento foi solubilizado em solução 0,1% de TFA em água, filtrado em filtro Millipore Millex 0,22 μm , e submetido à recromatografia em fase reversa em coluna de fase reversa Supelco C18 (0,46 x 25cm) A cromatografia foi desenvolvida a 23°C , em condições idênticas à etapa 3 (item 4.4.3.). As proteínas foram detectadas a 280nm, e o material eluído, contendo a proteína gelatinolítica pura, foi liofilizado e armazenado a -20°C para posterior utilização. A proteína purificada foi denominada SPGP (*Scorpaena plumieri* gelatinolytic protein).

4.5. Avaliação do peso molecular aparente e da pureza da SPGP: eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

A eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970). O gel de separação (gradiente de 10 a 20%) foi preparado a partir de uma solução de acrilamida-bisacrilamida em água (29,2: 0,8%), contendo 0,1% SDS p/v, 0,1% persulfato de amônio p/v, 0,1% de tetrametiletenodiamina (TEMED) v/v e 0,375M Tris-HCl pH 8,8. O gel de concentração foi preparado a 10% a partir da mesma solução de acrilamida-bisacrilamida, contendo as mesmas proporções de SDS, TEMED e persulfato de amônio do gel de separação, e Tris-HCl 0,0625M pH 6,8. O gel foi polimerizado em um minissistema de eletroforese Bio-rad, no qual a dimensão das placas para polimerização é de 10,0cm de comprimento por 8,2cm largura e 0,75mm de espessura. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador de baixo e alto peso molecular Full Range Rainbow Protein Molecular Weight.

As amostras foram solubilizadas em tampão da amostra (Tris-HCl 0,125M pH 6,8 contendo 4% SDS p/v, 20% glicerol p/v e 1% azul de bromofenol p/v), e as soluções resultantes foram incubadas por 5 minutos a 100°C. Posteriormente, foram resfriadas à temperatura ambiente e aplicadas no poço do gel (20µL da solução contendo 10µg de proteína). A eletroforese foi conduzida à temperatura ambiente à 50V por 40 minutos e posteriormente a 100V até o término da corrida, a qual foi realizada com tampão Tris-HCl 0,025M, glicina 0,2M, contendo 0,1% de SDS, pH 8,3. O gel foi corado por 1 hora em solução 0,25% de azul de coomassie (R-250) em metanol: ácido acético: água (5: 1: 5) e o descorado em metanol: ácido acético: água (1: 2: 19).

4.6. Monitoramento da atividade gelatinolítica da SPGP durante as etapas cromatográficas

Para avaliação da presença de atividade gelatinolítica na peçonha bruta e em suas frações cromatográficas, foram realizadas eletroforeses em gel de poliacrilamida com substrato protéico (gelatina) copolimerizado (zimografia), segundo metodologia descrita por Heussen & Dowdle (1980).

O gel de separação (7,5%) foi preparado a partir de uma solução de acrilamida-bisacrilamida em água (29,2: 0,8%), contendo 0,1% de SDS p/v, 0,02% de persulfato de amônio p/v, 0,1% de TEMED v/v, 0,1% de gelatina e 0,375M Tris-HCl pH 8,8. O gel de concentração (5%) foi preparado a partir da mesma solução de acrilamida-bisacrilamida, contendo as mesmas proporções de SDS, TEMED e persulfato de amônio do gel de separação, e Tris-HCl 0,0625M pH 6,8. A eletroforese foi realizada no mini sistema Bio-rad. O gel foi polimerizado à temperatura ambiente e posteriormente mantido a 4°C por um tempo mínimo de 4 horas. As amostras foram preparadas em solução contendo 2,5% de SDS p/v, 3% sacarose p/v e 4µg/mL de vermelho de fenol e então, aplicadas nos poços do gel. A eletroforese foi conduzida a 4°C, com tensão de 50V durante 30 minutos seguida por 100V até o término da corrida. Utilizou-se Tris-HCl 0,025M, glicina 0,2M, contendo 0,1% de SDS, pH 8,3 como tampão de corrida. Após o tempo de migração completa da eletroforese (~1,5h) indicado pela migração do vermelho de fenol, o gel foi removido da placa e mergulhado em solução 2,5% de Triton X-100 v/v em água, durante uma hora, à temperatura ambiente e sob agitação, para a remoção do SDS. Em seguida, foi lavado rapidamente com água destilada e incubado em tampão fosfato 0,1M pH 7,5, por 4h a 37°C. O gel foi corado em solução 0,25% de azul de coomassie R-250 em metanol: ácido acético: água (5: 1: 5), durante 30 minutos. O descoramento foi feito em etanol, ácido acético e água (1: 2: 19). A atividade gelatinolítica foi detectada pela visualização de regiões não coradas indicativas da proteólise da gelatina.

4.7. Cultivo celular

Células imortalizadas de glioblastoma p53-selvagem (RT2) e glioblastoma p-53-mutante (T98) foram respectivamente cedidas pelo Dr. William Broaddus do Departamento de Neurocirurgia da MCV-VCU (Medical College of Virginia, Virginia Commonwealth University) e obtidas da ATCC (American Type Cell Collection). Ambas foram cultivadas em estufa de CO₂ (5% CO₂ - Cole Parmer) com atmosfera úmida à 37°C, em meio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina (meio DMEM completo). Ao atingirem 80% de confluência, as células foram tripsinizadas e a viabilidade celular avaliada através do teste de exclusão do azul de Tripán. A avaliação da viabilidade

celular através deste teste consiste em incubar as células por 1 minuto com este corante e quantificá-las com o auxílio de uma câmara de Neubauer (FIG.8). O azul de Tripán é um corante de alto peso molecular capaz de entrar apenas em células mortas ou que possuam aumento na permeabilidade da membrana. Células vivas, em perfeito estado (membrana impermeável), permanecem incolores enquanto células mortas ou com a permeabilidade de membrana aumentada são visualizadas em azul. Para realização dos experimentos foram utilizadas células viáveis (incolores) na faixa de passagem: 5-20, para ambas as linhagens.

A manutenção das culturas foi garantida através do congelamento a -20°C , -80°C e -120°C de alíquotas contendo 5×10^6 células em DMEM enriquecido de 50% de soro fetal bovino (SFB), 1% de penicilina e 10% de DMSO.

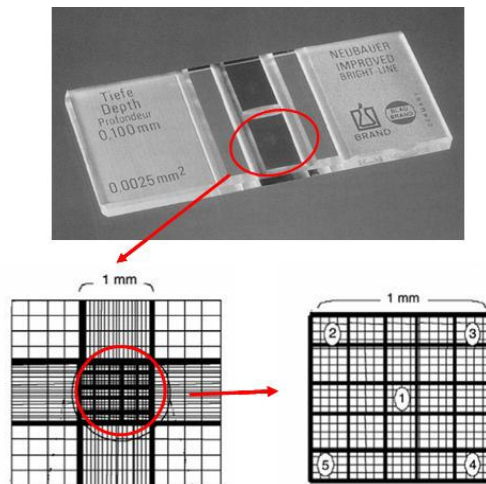


FIG.8: Câmara de Neubauer

4.8. Células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE)

Inicialmente, células de Carcinoma Ascítico de Ehrlich (CAE) foram cedidas pelo Dr. Geovanni Dantas Cassali, do Departamento de Patologia Geral - ICB/UFMG (Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais). A propagação do tumor, para manutenção da cultura de células *in vivo*, foi realizada por meio de injeções

intraperitoneais de 0,2mL de fluido ascítico recém extraído de um camundongo doador (inoculado 7/8 dias antes) em um camundongo receptor. O transplante foi realizado utilizando-se agulhas (25 x 0,7mm) e seringas estéreis, sob condições de assepsia. As células foram utilizadas nos experimentos de citotoxicidade *in vitro* e para o desenvolvimento do modelo animal de tumor em camundongos Swiss fêmeas.

Para realização dos testes *in vitro*, uma alíquota de 2mL de fluido ascítico foi retirada de animais com tumor ascítico de Ehrlich (inoculados 7/8 dias antes) e imediatamente levada a centrifugação por 7 minutos a 1000g. Após centrifugação, as células de CAE (as quais aparecem como uma fase esbranquiçada sobre as hemácias e no soro) foram removidas do fluido, ressuspensas em 5mL de PBS estéril e novamente centrifugadas por 7 minutos a 1000g. O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspensionado em 5mL de meio *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina/estreptomicina. Para avaliação da viabilidade celular foi realizado o teste de exclusão do Azul de Tripán (como descrito no item 4.7.). Células viáveis (incolores) foram imediatamente utilizadas nos experimentos.

4.9. Estudo *in vitro* do efeito citotóxico da SPB e SPGP sobre células tumorais

A citotoxicidade da SPB e da SPGP foi avaliada através do teste do MTT, seguindo metodologia descrita por Plumb e colaboradores (1989). O ensaio do brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] (MTT), foi primeiramente descrito por Mosmann em 1983, e se baseia na capacidade celular de converter anéis do sal de tetrazólio, de coloração amarela, em cristais de formazan (de coloração azul escura). Essa reação é realizada por enzimas desidrogenases mitocondriais de células metabolicamente viáveis, e os cristais insolúveis formados se acumulam no interior das células. O número de células viáveis é diretamente proporcional ao nível de formazan produzido, e é avaliado pela leitura de absorbância a 570nm, após solubilização dos cristais.

Para realização dos experimentos células de diferentes linhagens foram semeadas em placas de 96 poços (RT2 e T98: 500 células viáveis/poço; CAE: 2500 células/poço) e mantidas em estufa de CO₂ (5% CO₂ - Cole Parmer) com atmosfera úmida à 37°C por 24 horas para completa adesão. Após esse período, as células foram incubadas por 48h com diferentes concentrações da SPB e da SPGP. Após 48h de exposição aos tratamentos, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 4h, ao abrigo da luz, na presença de solução de MTT (0,5mg/mL de tampão glicina). Os cristais formados foram então solubilizados com 100µL de DMSO, e a citotoxicidade celular foi medida espectrofotometricamente em um leitor de microplaca UV-visível (Molecular Devices) a 570nm.

A fração de células sobreviventes nos grupos tratados foi calculada como porcentagem do grupo controle, sendo a absorbância no controle considerada 100% de sobrevivência. Os valores obtidos são resultado de dois experimentos independentes, realizados em quadruplicata.

4.10. Análises morfológicas *in vitro*

Análises morfológicas das células foram realizadas rotineiramente durante a realização dos testes de citotoxicidade, utilizando-se Microscópio Óptico Invertido Nikon. As culturas foram fotografadas periodicamente para registros de possíveis alterações na morfologia celular, sendo as imagens captadas com Câmera Digital Nikon Coolpix 4500 utilizando contraste de fase.

4.11. Análise das alterações do DNA cromossomal através da coloração com DAPI

O DAPI (4',6- diamidina- 2'- fenindole dihidroclorido) é um corante fluorescente, capaz de se ligar especificamente às fitas duplas do DNA cromossomal (Kubota *et al.*, 2000). Para análise das alterações do DNA cromossomal, células foram semeadas em placas de 96 poços (RT2 e T98: 500 células viáveis/poço; Ehrlich: 2500 células/poço) mantidas por 24h em estufa de CO₂ para completa adesão, e foram posteriormente

incubadas com diferentes concentrações da SPB e SPGP. Após 48h de tratamento, as células foram lavadas 1x com PBS estéril e incubadas em Metanol 100% (gelado) por 20 minutos para fixação. Após fixação, foram novamente lavadas em PBS e incubadas por 30 minutos com DAPI (SIGMA – Chemical Co.) na concentração de 400ng/mL, diluído em PBS. Logo após, o sobrenadante contendo DAPI foi retirado, e as células foram lavadas 5x com PBS. Os núcleos das células corados com DAPI foram visualizados em microscópio de fluorescência (Nikon- 385-410nm) e fotografados com Câmera Digital Nikon Coolpix 4500.

4.12. Controle positivo de apoptose: a Cisplatina

A cisplatina é um agente antineoplásico utilizado na clínica para o tratamento de alguns tipos de tumores. Alguns autores já demonstraram que a cisplatina induz a morte apoptótica (Mi-Rieong *et al.*, 2004; Fukotomi *et al.*, 2006) e, por este motivo, ela foi utilizada nos experimentos como controle positivo de apoptose.

Para realização dos mesmos, a cisplatina em pó (Sigma Chemical Co.) foi inicialmente dissolvida em DMSO (quantidade suficiente para diluição) e filtrada em filtro Millipore Millex 0.22µm. Em seguida, foi diluída em meio completo DMEM e adicionada em diferentes concentrações às culturas de células utilizadas nos experimentos de citotoxicidade e coloração com DAPI. A concentração máxima de DMSO utilizada foi de 5% e não causou alterações significativas na viabilidade celular. Todas as manipulações da cisplatina foram feitas ao abrigo da luz. Todo material utilizado na manipulação da cisplatina foi neutralizado em hipoclorito, por 24 horas, antes do descarte.

4.13. Síntese de sondas radioativas utilizando ^{99m}Tc , ^{125}I e ^{131}I como radiotraçadores

4.13.1. Manipulação de radioisótopos

Para síntese de sondas radioativas com a SPB e SPGP foram utilizados os radioisótopos tecnécio-99m (^{99m}Tc), iodo-125 (^{125}I) e iodo-131 (^{131}I), os quais, segundo Norma CNEN-NE-6.02 são classificados respectivamente como radioisótopos de relativa e alta radiotoxicidade. Por esse motivo todos os experimentos utilizando material radioativo foram realizados tomando-se os devidos cuidados de radioproteção, de acordo com a norma CNEN-NE-3.01. As bancadas foram devidamente forradas, e o operador fez uso de todos os EPI necessários (jaleco, luvas, filme dosimétrico, dosímetro digital (RAD ALARM DOSIMETER 50/51/52/60/62) e óculos de proteção. Os descartes de rejeitos foram etiquetados com as informações pertinentes (identificação do radioisótopo, tipo de emissão e o tipo de rejeito), a blindagem adequada foi utilizada de acordo com cada radioisótopo, e o monitoramento das possíveis contaminações de superfície foi feito com o detector Geiger-Müller. Os rejeitos radioativos foram segregados quanto ao tipo de radioisótopo, tempo de meia vida, separados em material sólido e material líquido, e acondicionados em embalagens próprias (saco plástico e bombonas de polipropileno, respectivamente) mantidos blindados até completo decaimento. Após decaimento, os rejeitos foram recolhidos pelo setor de rejeitos do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN/CNEN), o qual é responsável pelo correto descarte dos mesmos.

Após os experimentos com animais, as carcaças e órgãos foram acondicionados em freezer -80°C , em embalagens com blindagem adequada, por um período de tempo suficiente para permitir o decaimento dos radioisótopos (de acordo com a norma CNEN NE 6.05). Após decaimento, as carcaças e órgãos foram monitorados com detector de exposição de dose RADIATION SURVEY METER PRM301, e descartados como resíduo de serviço de saúde (Anvisa, 2006).

4.13.2. Radiomarcção de SPB com ^{99m}Tc : radiosíntese da $[^{99m}\text{Tc}]\text{SPB}$

O ^{99m}Tc é um metal de transição que pode existir em 9 diferentes estados de oxidação, apresentando Nox que variam de -1 a +7. Essa variação permite que o ^{99m}Tc forme diferentes complexos de coordenação, com diferentes quelantes, mais o metal só é reativo quando em estados de oxidação inferiores ao +7. O ^{99m}Tc utilizado em reações de radiomarcção é obtido a partir de um gerador de molibdênio sob a forma oxidada

$\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ (pertechnetato de estado de oxidação +7), que é quimicamente estável. Ao ser reduzido, entretanto, o $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ pode se complexar a ligantes que contenham grupos doadores de elétrons, tornando-se parte da molécula e gerando compostos radioativos. O $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ que não encontra ligantes no meio de reação forma um colóide composto por moléculas de $^{99\text{m}}\text{TcO}_2^-$ (Jurisson *et al.*, 1999).

A SPB foi radiomarcada com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ utilizando cloreto estanoso (SnCl_2) e borohidreto de sódio (NaBH_4) como agentes redutores, de acordo com método descrito por Pauwels *et al.* (1993). Estudos preliminares foram realizados para avaliação das condições ótimas de reação para obtenção de maior rendimento de marcação dessa peçonha.

Em um tubo foram misturados 2 μL de solução cloreto estanoso em HCl (2mg/mL), 2 μL de solução borohidreto de sódio em NaOH (10mg/mL) e 100 μg de SPB. Após ajuste do pH, com NaOH, para 7,5 a mistura foi incubada com 3,7MBq de $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ por um período de 30 minutos, sob condições de vácuo e à temperatura ambiente. Posteriormente, 500 μL de solução salina (NaCl 0,9%) foram acrescentados ao meio, para completo bloqueio da reação de radiomarcção.

Devido a formação de colóide e a presença de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ livre no meio de reação é necessária a realização de um controle de qualidade após a radiosíntese, o qual garanta a qualidade do radiofármaco produzido. O controle de qualidade inclui a avaliação da pureza físico-química do material e a avaliação da atividade biológica após a reação de radiosíntese. O controle físico é realizado através da observação do aspecto da solução, que deve ser límpida, sem alterações de cor e sem partículas visíveis. As análises radioquímicas determinam quanto da radioatividade total na amostra está presente na forma desejada (ligada as moléculas de interesse) e foi realizada por método adaptado da Farmacopéia Norte-americana-USP 21 (United States Pharmacopeia, 1995), utilizando dois sistemas cromatográficos: cromatografia ascendente em Sílica gel 60 (Merck), tendo acetona como fase móvel; e descendente em papel Whattman n° 1, utilizando solução salina 0,9% como fase móvel. No sistema cromatográfico da Sílica Gel, quaisquer impurezas hidrofílicas originadas da reação com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$, que não estejam ligadas a substância radiomarcada, tais como $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertechnetato ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$), migram ao longo da fita de sílica, enquanto as moléculas protéicas radiomarcadas permanecem no ponto de aplicação. Já na cromatografia realizada em papel, as

proteínas radiomarcadas migram através da fita juntamente com a solução salina, e quaisquer espécies insolúveis de ^{99m}Tc (tal como o colide $^{99m}\text{TcO}_2$) permanecem no local de aplicação (FIG.9).

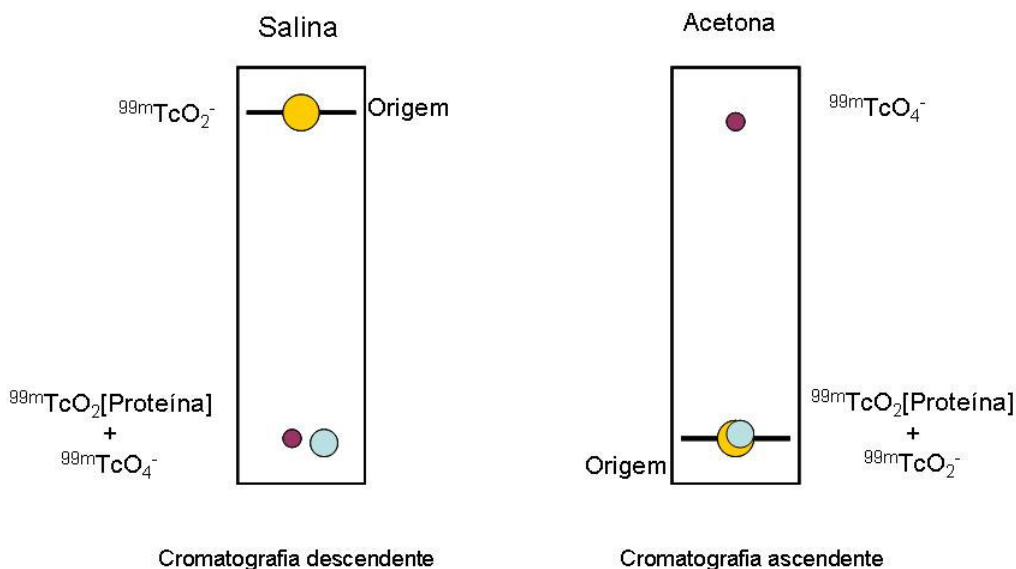


FIG.9: Desenho esquemático das cromatografias realizadas para o controle de qualidade da radiomarcagem com ^{99m}Tc . O controle foi realizado por meio de cromatografia descendente em papel Whatman n°1 utilizando solução salina 0,9% como fase móvel, e cromatografia ascendente em Sílica Gel 60 utilizando acetona como fase móvel.

Após a migração cromatográfica, as fitas foram cortadas em tiras de 1cm e tiveram sua radioatividade medida em um contador gama (Wallac Wizard 1480 - Janela:140keV - Eficiência do aparelho para o ^{99m}Tc : 80%). Através destes dados foi possível calcular o rendimento de reação, ou seja, qual proporção do ^{99m}Tc se ligou às moléculas protéicas da peçonha e qual porcentagem reagiu formando outros compostos, segundo a fórmula:

RENDIMENTO = 100% - (X+Y), onde

X= % $^{99m}\text{TcO}_4$

Y= % $^{99m}\text{TcO}_2$

Após o cálculo do rendimento da reação, foi possível calcular a atividade específica da sonda radioativa sintetizada, a qual é definida como a atividade por unidade de massa do material radiomarcado.

A avaliação da manutenção da atividade antitumoral da peçonha após a radiomarcção foi avaliada por meio do teste do MTT (conforme já descrito no item 4.9.).

4.13.3. Radiomarcção da SPGP com ^{125}I : radiosíntese da [^{125}I]SPGP

Métodos sintéticos para a incorporação de ^{125}I em um determinado ligante são primariamente determinados pelo fato do iodo ser ou não um átomo endógeno na molécula a ser marcada, e com poucas exceções o iodo aparece como um átomo exógeno, substituinte ou adicional. Existem dois métodos de radioiodação, o direto e o indireto. Marcações diretas envolvem a adição de um ou mais átomos de iodo a uma molécula, enquanto marcações indiretas, ou derivatizações, envolvem a ligação do átomo de iodo à uma molécula por meio de um quelante.

O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ foi escolhido como radiotraçador para síntese da sonda radioativa de SPB por apresentar uma energia de emissão gama de 140keV, o que é ideal para posterior aquisição de imagem em gama-câmara. Apesar disto, não é um bom radiotraçador quando os trabalhos são realizados com moléculas de difícil obtenção, como o caso da enzima purificada SPGP, pois sua curta meia-vida física (6,02 horas) não permite a utilização da sonda radioativa gerada por mais que 1 dia. Desta forma, o ^{125}I foi selecionado para síntese da sonda de SPGP por possuir uma meia vida física mais longa (58,2 dias), o que permite um maior aproveitamento da molécula radiomarcada. O gama emitido pelo ^{125}I (27-35keV) não permite a aquisição de imagem em gama-câmaras convencionais, mas este radioisótopo pode ser substituído pelo ^{131}I na reação de radiosíntese, o qual é amplamente utilizado para aquisição de imagem (gama de 365keV).

Neste trabalho os experimentos de radioiodação foram realizados pelo método de ligação direta. Esse método envolve a oxidação do I^- para I_2 (I^+) e uma subsequente substituição eletrofílica, a qual ocorre em um anel aromático na maioria das vezes. Geralmente essa oxidação é conseguida pela adição de agentes como

lactoperoxidase/H₂O₂ no meio de reação. Métodos diretos de iodinação são muito eficientes, rápidos e de simples execução, o que permite a redução do tempo de exposição do operador à fonte de radiação .

Em moléculas de proteínas, os locais com maior probabilidade de marcação são as regiões que apresentam o aminoácido tirosina, o qual apresenta a seguinte estrutura:

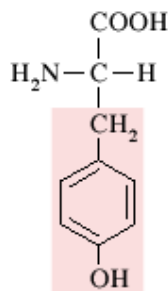


FIG.10: O aminoácido aromático Tirosina.

A SPGP é uma enzima proteolítica primeiramente purificada da peçonha do peixe escorpião *Scorpaena plumieri* por Carrijo *et al.* (2005) e possui treze resíduos de tirosina em sua região já sequenciada, o que a torna uma boa candidata a radioiodação.

Desta forma a síntese da sonda radioativa [¹²⁵I]SPGP foi realizada por uma reação de substituição eletrofílica, de acordo com Santos *et al.*, 2002, misturando-se 0,6nmol de SPGP com 0,5mCi de Na¹²⁵I e quantidade adequada de lactoperoxidase. A reação foi iniciada pela adição de 10μL de solução de peróxido de hidrogênio e, após dois minutos, foi interrompida através da diluição da mistura de reagentes em uma solução contendo 0,05M de PBS e 0,1% de BSA. A separação do iodo livre (¹²⁵I) presente no meio de reação foi feita em resina de troca aniônica (DOWEX[®] 1X), previamente saturada com solução de 0,05M de PBS (pH= 7,4) e 0,1% de BSA.

O controle de qualidade da síntese da radiomarcagem foi feito por cromatografia ascendente em papel Whattman N°1 (2x20cm) usando como fase móvel metanol saturado com iodeto de potássio (FIG.11). Após a corrida cromatográfica, as fitas foram cortadas em tiras de 1cm e a radioatividade foi medida em um aparelho de espectrometria gama (Wallac Wizard 1480 - Janela:35keV - Eficiência do aparelho para

o ^{125}I : 80%). Após o cálculo da eficiência da radiomarcção, foi possível determinar a atividade específica da SPGP radiomarcada.

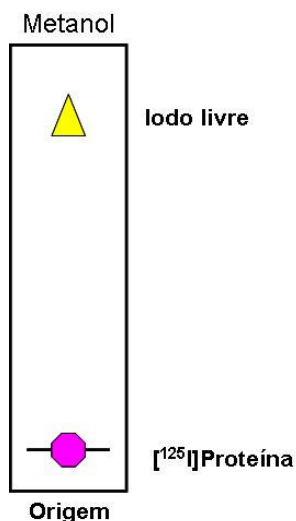


FIG.11: Esquema da cromatografia em papel Whattman n°1 utilizando como fase móvel metanol saturado com iodeto de potássio. A cromatografia foi realizada para controle de qualidade da radioiodação e determinar o rendimento da marcação.

A avaliação da integridade estrutural da SPGP após radioiodação foi realizada por cromatografia em HPLC. Após a radiosíntese, a mistura de reação foi submetida à cromatografia em coluna de fase reversa Supelco C18 (0,46 x 25cm) previamente equilibrada com a fase móvel A (0,1% de TFA). A cromatografia foi desenvolvida a 23°C e as proteínas eluídas da coluna usando gradiente linear da fase móvel B (composta de 0,1% TFA em ACN), segundo o programa: 0 → 60% de B de 0 a 70 minutos. O fluxo utilizado foi de 1,2ml/min, sendo as proteínas detectadas pela absorção a 280nm. Para validação do método, também a SPGP nativa e NaI foram submetidos a cromatografia em HPLC, nas mesmas condições, e foram utilizados como padrões.

A avaliação da manutenção da atividade biológica da [^{125}I]SPGP após a reação de radiomarcção foi confirmada pela realização de eletroforeses em gel de poliacrilamida com substrato protéico (gelatina) copolimerizado (zimografia), segundo metodologia descrita no item 4.6.

4.13.4. Marcação da SPGP com ^{131}I : radiosíntese da [^{131}I]SPGP

A síntese da sonda radioativa de SPGP com ^{131}I foi realizada por meio de marcação direta, segundo descrição do item 4.13.3, utilizando-se ^{131}I como radioisótopo. Os devidos cuidados de proteção radiológica, pertinentes ao manuseio deste radioisótopo, foram tomados. O ^{131}I possui meia vida física de 8,02 dias e decai por emissão de radiação gama de 365 keV (81,2%), 637 keV (7,3%) e 284 keV (6,1%) e de radiação beta de energia máxima de 606 keV.

4.14. Manipulação de Animais

Os experimentos envolvendo animais foram feitos de acordo com o Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório da NRC (National Research Council, Institucional Animal Care and Use Committee Guidebook, 1996) utilizando protocolo previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (processo nº152/2007). Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, pesando de 25-30g, obtidos no Centro de bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG. Durante todo período experimental os animais receberam água (filtrada) e comida (ração comum sem suplementação) *ad libitum* e foram mantidos em sala com temperatura controlada de 25°C em estante ventilada Alesco com sistema de fotoperíodo ciclos dia/noite (12/12 horas), sistema de filtros de ar com fluxo de troca de ar de 54 trocas/hora. Foram acondicionados em gaiolas pequenas (30x20x15cm = 600cm²) forradas com palha e higienizadas todos os dias. Cada caixa abrigou o número máximo de 7 (sete) animais. O cálculo do número de animais por gaiola foi realizado de acordo com Guia de Cuidados e Utilização de Animais de Laboratório (NRC, 1996), segundo o qual cada camundongo necessita de 77cm² para sobrevivência. Todos os animais foram eutanasiados ao final dos experimentos.

4.15. Modelo animal

4.15.1. Modelo animal tumoral

O comportamento e interação das sondas radioativas [^{99m}Tc]SPB e [^{125}I]SPGP foram avaliadas *in vivo* em camundongos implantados com tumor de Ehrlich.

O tumor de Ehrlich foi descrito em 1906, como um carcinoma mamário murino sólido que se desenvolvia em fêmeas. Em 1932, Loewenthal & Jahn descreveram a forma ascítica do tumor, a qual se crescia no peritônio de animais inoculados com as células tumorais. Este tipo de tumor possui alto índice mitótico, e se caracteriza pela presença de poucas células inflamatórias, estroma escasso e presença de células extremamente anaplásicas. Além disso, é facilmente induzido em animais saudáveis não imunossuprimidos, através do transplante direto de células tumorais retiradas de um animal que já possua a neoplasia desenvolvida. Devido a suas características histológicas e sua facilidade de manuseio experimental, o tumor de Ehrlich tem sido extensamente aplicado como modelo tumoral animal em estudos de Oncologia Experimental (Dagli, 1989).

O preparo das células tumorais para implante incluiu a lavagem, contagem e teste de viabilidade das mesmas de acordo com procedimento descrito no item 4.8. Com o auxílio de seringas e agulhas descartáveis estéreis, foram retirados 3mL do fluido ascítico de camundongos pré-inoculados há 10 dias com tumor de Ehrlich na cavidade peritoneal. O fluido foi lavado 3x em salina fisiológica para a obtenção de um líquido denso e claro, correspondendo a uma suspensão celular com o mínimo de fibrina e hemácias. A viabilidade celular foi então avaliada através da exclusão do Azul de Tripán e as células de carcinoma ascítico de Ehrlich ($2,5 \times 10^6$) foram inoculadas entre os coxins plantares do membro posterior esquerdo dos animais (com auxílio de agulhas estéreis) para obtenção do tumor na forma sólida. Após seis dias do implante do tumor, os animais foram utilizados nos experimentos de biodistribuição.

4.15.2. Modelo animal de edema

Na Medicina Nuclear, a busca por radiofármacos capazes de fazer a detecção diferencial entre patologias como câncer, inflamação e infecção é de grande importância. Os radiofármacos tradicionais para detecção de tumores são em sua maioria marcadores de presença de atividade metabólica elevada, e podem gerar falsos positivos quando da presença de inflamação e infecção. No caso de países tropicais, como o Brasil, a

situação se agrava com a problemática de infecções crônicas torácicas, como é o caso da tuberculose e algumas infecções fúngicas, uma vez que alguns radiofármacos tradicionais podem marcar o pulmão independentemente da presença de infecção (Peters, 1998; Lupetti *et al.*, 2003).

Para avaliar o potencial da SPGP em detectar diferencialmente inflamação e sítios tumorais, testou-se a captação da mesma por sítios inflamatórios em animais com edema.

O processo inflamatório é uma resposta dos organismos vivos a estímulos lesivos, com a finalidade de reconstituir a estrutura e a função do tecido ou órgão afetado. Independente da natureza do estímulo lesivo observa-se fenômenos como aumento do fluxo sanguíneo e aumento da permeabilidade vascular resultando na formação de edema. A carragenina é um agente lesivo que estimula o desencadeamento dos fenômenos de transformações nos tecidos (Garcia *et al.*, 1993).

Para desenvolvimento do edema os animais foram inoculados entre os coxins plantares do membro inferior esquerdo com 30 μ L de uma solução 4,5mg/mL de Carragenina dissolvida em solução salina estéril (0,9%), e após 3 horas da estimulação do edema, utilizados em experimentos de biodistribuição.

4.16. Cálculo do número experimental de animais

O tamanho da amostra para realização dos experimentos *in vivo* foi calculado pelo método estatístico de cálculo da amostra para análise de grupos independentes, segundo Callegari-Jaques, 2003.

Realizados os cálculos, verificou-se que o número de animais necessário para identificar uma diferença de pelo menos 30% entre o grupo controle e tratado, com um nível de 0,05 de significância e poder de 70%, é de no mínimo 4 animais por ponto de análise.

4.17. Experimentos de biodistribuição e detecção de sítios tumorais *in vivo*

Para os experimentos de biodistribuição, animais implantados com tumor de Ehrlich foram injetados com 17kBq de [^{99m}Tc]SPB ou [¹²⁵]SPGP. As injeções foram ministradas por via endovenosa caudal, de acordo com o descrito por Pujatti *et al* (2005) sendo os animais sacrificados por guilhotinamento (Guilhotina insight modelo EB271) em diferentes tempos após a injeção (0, 10, 30, 60, 180, 360, 1440 minutos).

Além das sondas radioativas acima citadas, o ^{99m}TcO₂, ^{99m}TcO₄⁻ e Na¹²⁵I também foram injetados, nas mesmas condições, para determinação dos perfis de biodistribuição dos possíveis contaminantes químicos presentes nos meios de reação.

Numa tentativa de otimizar a detecção do tumor e aumentar o tempo de residência do radiofármaco no sítio tumoral, também foram realizados experimentos de biodistribuição com injeções ministradas via intratumoral. Nestes experimentos, além do grupo controle constituído por animais injetados somente com o radioisótopo de interesse (^{99m}Tc ou ¹²⁵I), animais possuindo edema também foram utilizados como grupo controle. Neste experimento, os animais foram sacrificados 10, 30 e 60 minutos após a injeção da molécula radiomarcada.

Após as injeções, os animais foram mantidos atrás de blindagens de chumbo adequadas até momento do sacrifício, para evitar doses desnecessárias de radiação nos operadores (de acordo com norma de radioproteção 3.01 da CNEN). A guilhotina foi escolhida como método de eutanásia por ser eficaz e causar morte instantânea, o que é muito importante em experimentos de biodistribuição pois, além de evitar o sofrimento do animal permite maior exatidão nos tempos de sacrifício. Além disso, possui baixo custo e pouco risco para o operador, desde que o mesmo receba treinamento adequado. Após o sacrifício, foram coletadas amostras de sangue, e órgãos (tireóide, coração, pulmões, fígado, estômago, intestino, bexiga, rins, músculo esquelético, osso, aparelho reprodutor, cérebro, cerebelo e cauda) foram removidos, pesados e analisados em um espectrometro gama automático (1480 Wizard 3'' Wallac).

Os resultados obtidos foram analisados pelo software Excel e apresentados como porcentagem da dose injetada por volume/peso do órgão (%DI/mL ou %DI/g). Nos

animais injetados via endovenosa caudal, os valores da dose injetada foram ajustados através da subtração da radioatividade remanescente na cauda. As doses de radioatividade injetadas nos animais foram calculadas com base nas doses clínicas utilizadas em humanos, garantindo-se que a injeção da substância radioativa não gere sofrimento físico ou fisiológico ao animal.

4.18. Avaliação da toxicidade aguda produzida pela administração de SPB e SPGP *in vivo*

Para verificar a toxicidade da SPB e SPGP *in vivo*, camundongos Swiss fêmeas saudáveis, pesando entre 25-30g, foram injetados com uma concentração 10 vezes maior que a concentração de SPB e SPGP ministrada nos experimentos de biodistribuição. Para este experimento os animais foram divididos em 3 grupos: controle, o qual foi injetado com solução salina estéril (0,9%); grupo tratado 1, injetados com 3µg de SPB; grupo tratado 2, injetados com 0,3µg de SPGP. Após 24 horas, os animais foram eutanasiados por guilhotinamento, e uma alíquota de sangue foi imediatamente coletada em solução EDTA 10%, para avaliação das alterações hematológicas geradas pela SPB e SPGP. As análises sanguíneas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais. Para quantificação de leucócitos foi utilizado um contador automático de células- Ábacos, enquanto para a quantificação de hemácias as amostras de sangue foram centrifugadas à 3000rpm por 10 minutos e as células vermelhas foram transferidas para um tubo contendo líquido diluidor (Líquido de Dacie- Citrato de sódio 3,1%, Formol 0,4% e água destilada). Posteriormente, as hemácias foram contadas em Microscópio Óptico com o auxílio de uma câmara de Neubauer.

Também os órgãos (coração, pulmão, fígado, rins e cérebro) foram retirados para avaliação das possíveis alterações histológicas.

4.19. Cálculos farmacocinéticos

A caracterização do perfil farmacocinético de uma nova molécula é obtida do cálculo de parâmetros matemáticos calculados a partir de dados de biodistribuição. Os principais parâmetros são a área sob a curva (ASC), o volume de distribuição (Vd), a depuração (ou clearance), a meia-vida e a biodisponibilidade.

Para simplificação dos cálculos realizados neste trabalho foi assumido que o perfil farmacocinético correspondia ao modelo monocompartimental, no qual o corpo é considerado um compartimento único. Este modelo descreve adequadamente as alterações sofridas ao longo do tempo na concentração plasmática e na via de excreção de fármacos que após a administração se distribuem rapidamente para os tecidos.

A biodisponibilidade diz respeito à quantidade de uma substância que, introduzida no organismo, ganha a circulação e torna-se disponível para exercer sua atuação terapêutica. O cálculo deste parâmetro é dispensável quando a via de administração é a endovenosa, pois 100% da droga está disponível na circulação.

A ASC foi calculada a partir do gráfico de cinética sanguínea das moléculas e foi utilizada para determinação dos tempos de meia-vida, volume de distribuição e depuração.

A depuração indica o volume de líquido biológico (sangue/ plasma) totalmente livre do fármaco em uma determinada unidade de tempo. Na verdade, é a medida da eficiência do corpo na eliminação da molécula. A depuração plasmática (C_L) foi calculada pela fórmula:

$$C_L = D/ASC \text{ (mL/min)}$$

Onde:

D = massa da droga administrada

ASC = área sob a curva no gráfico que descreve a concentração da molécula na circulação sanguínea.

O volume de distribuição é a constante de proporcionalidade que descreve a relação entre a quantidade de fármaco em todo o organismo e a quantidade existente no sangue ou plasma e foi calculado pela fórmula:

$$Vd = D/Cp (\mu\text{g/mL})$$

Onde:

Vd = volume de distribuição aparente

D: massa da droga administrada

Cp: concentração sanguínea após completa administração.

O tempo de meia-vida é o intervalo de tempo durante o qual um fármaco tem sua concentração plasmática reduzida em 50%. A meia vida também pode ser calculada independentemente para cada órgão no qual a molécula se acumula. Os valores de meia-vida foram determinados diretamente a partir dos gráficos de cinética, para cada órgão de interesse.

4.20. Análise estatística

Todos os experimentos *in vitro* foram realizados em quadruplicata, inclusive os respectivos grupos controles. Os resultados foram expressos como a média \pm DP de pelo menos dois experimentos. Os testes *in vivo* foram realizados em duplicata, e os resultados expressos como a média \pm DP de pelo menos dois experimentos. Os dados foram analisados pelo teste t de Student não pareado; foram considerados significativos aqueles dados com $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

Vários trabalhos têm demonstrado o potencial dos produtos naturais como fontes de moléculas para o desenvolvimento de novos produtos terapêuticos. Os estudos têm se concentrado em plantas e toxinas de animais terrestres, e poucos são os estudos realizados com peçonhas de animais marinhos, principalmente peixes. O peixe-escorpião *S. plumieri* é pouquíssimo estudado e as referências a esta espécie na literatura se resumem a relatos de acidentes com humanos e à sintomatologia gerada por tais acidentes. Trabalhos atualmente realizados por nossos colaboradores têm demonstrado a presença de atividades variadas na peçonha deste peixe, tais como hialuronidase, fibrinogenolítica, edematogênica, caseinolítica e gelatinolítica. Apenas uma enzima, com atividade gelatinolítica, foi purificada com sucesso a partir desta peçonha, e manteve sua atividade intacta após todo processo de purificação (Carrijo *et al.*, 2005).

Apesar desta gama de atividades detectadas, ainda não existem trabalhos avaliando o potencial terapêutico desta peçonha nem da enzima purificada. Por esse motivo o presente estudo representa uma investigação pioneira das possíveis propriedades antitumorais e diagnósticas da peçonha bruta do peixe escorpião (SPB), bem como da enzima gelatinolítica purificada a partir desta peçonha (SPGP), estando focado principalmente na capacidade de detecção de sítios tumorais *in vivo*.

5. 1. Avaliação do efeito antitumoral da SPB

Venenos animais são misturas complexas de proteínas e peptídeos biologicamente ativos. A variação na composição destes venenos é um fenômeno natural que ocorre em todas as espécies de animais venenosos. Geralmente a presença de determinado conjunto protéico, em maior ou menor grau, varia de acordo com a época do ano, a idade, sexo, hábito alimentar e região de origem do indivíduo (Mackessy *et al.*, 2003). Por esse motivo para realização dos experimentos com SPB e para purificação da SPGP, foram utilizados “pools” de soluções protéicas, originadas de vários exemplares de peixes escorpião de diferentes idades, tamanhos e regiões do litoral de Vitória, ES.

5.1.1. Avaliação do efeito antitumoral *in vitro* da SPB sobre células tumorais

Para avaliar o potencial terapêutico da SPB foram realizados testes de citotoxicidade, através do método do MTT, em células RT2 (glioblastoma p53-selvagem), T98 (glioblastoma p53-mutante) e CAE (carcinoma mamário p53-selvagem). As células foram tratadas com diferentes concentrações de SPB e após 48h foram avaliadas quanto à sobrevivência.

Os resultados obtidos mostraram que a SPB foi citotóxica, de maneira dose-dependente, para células RT2 e CAE. O efeito da SPB sobre a viabilidade de células RT2 é mostrado na FIG.12. Foram testadas concentrações de 0,5 a 125µg/mL, e a DL₅₀ foi calculada em 3,90±0,98µg/mL (concentração capaz de reduzir o número de células vivas pela metade).

Também para células CAE a SPB foi citotóxica de forma dose-dependente, apesar destas células apresentarem maior resistência à ação da SBP que células RT2. Foram testadas concentrações de 0,25 a 200µg/mL, e a DL₅₀ foi de 14,05±2,95µg/mL. Após 48h de tratamento, na concentração de 200µg/mL, não foram encontradas células vivas (FIG.13).

O efeito citotóxico da SPB sobre células T98 é mostrado na FIG.14. Foram testadas concentrações de 0,5 a 125µg/mL, e após 48 horas de tratamento o efeito citotóxico máximo observado ocorreu na concentração de 125µg/mL de SPB, onde a peçonha foi letal para apenas 25 ±2,48% das células. O efeito da SPB sobre esta linhagem não foi dose-dependente, na faixa de concentrações avaliadas, e mesmo a maior concentração de SPB testada sobre essas células não foi capaz de reduzir o número de células vivas pela metade, o que impossibilitou o cálculo da DL₅₀ por meio deste experimento. Este resultado sugere que glioblastomas malignos mutantes para o gene *P53* são resistentes ao efeito citotóxico da SPB.

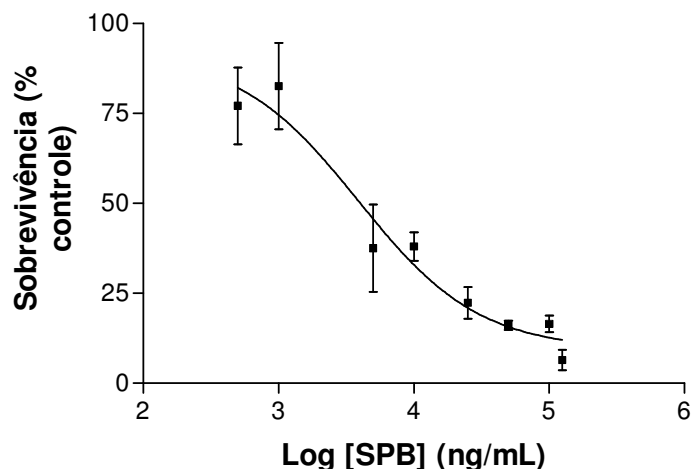


FIG.12: Efeito citotóxico da SPB sobre células RT2. Células RT2 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações de peçonha a 37°C por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. A menor concentração de peçonha utilizada não se mostrou significativamente citotóxica para as células testadas. As demais doses (a partir de 1µg/mL) foram significativamente citotóxicas, de maneira dose-dependente, com DL₅₀ de 3,90±0,98µg/mL. (p < 0,05).

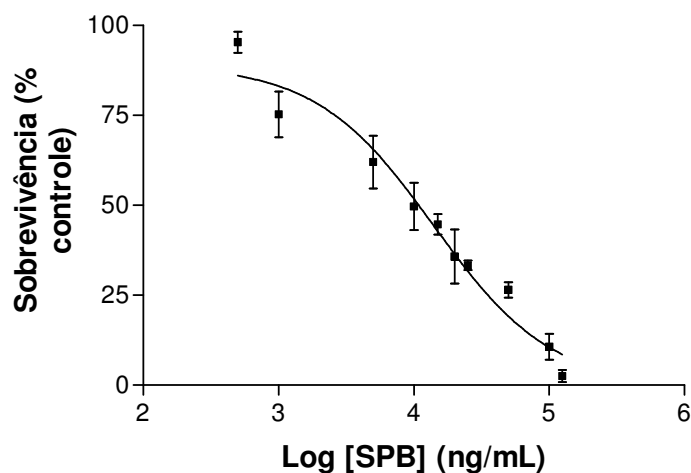


FIG.13: Efeito citotóxico da SPB sobre células CAE. Células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações da peçonha a 37°C por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. A menor concentração de peçonha utilizada não se mostrou citotóxica para as células testadas. As demais doses (a partir de 1µg/mL) foram significativamente citotóxicas, de maneira dose-dependente, com uma DL₅₀ de 14,05±2,95µg/mL. (p < 0,05).

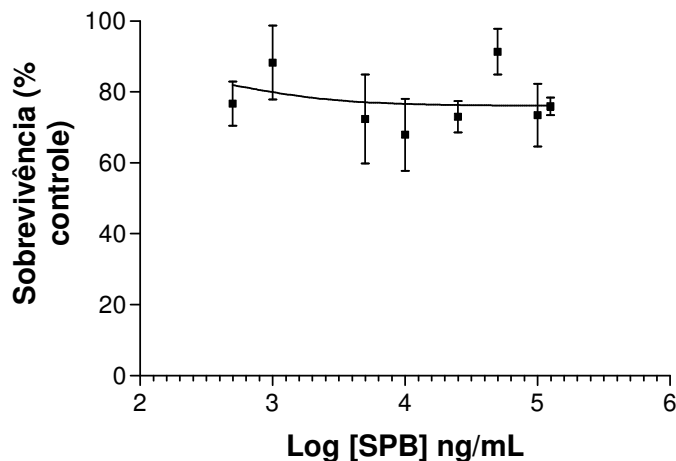


FIG.14: Efeito citotóxico da SPB sobre células T98. Células T98 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações da peçonha bruta de *S. plumieri* a 37°C por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. O efeito citotóxico máximo da SPB ocorreu na concentração de 125µg/mL, onde a peçonha foi letal para 25 ±2,48% das células. (p < 0,05).

5.1.2. Análise da morfologia celular de células submetidas ao tratamento com SPB

As análises morfológicas foram realizadas com auxílio de uma câmera fotográfica digital acoplada à microscópio óptico (MO), onde as células foram visualizadas e fotografadas. As alterações sofridas pelas células RT2, CAE e T98, quando submetidas ao tratamento com SPB podem ser observadas nas FIG. 15, 16 e 17, respectivamente. O tratamento das linhagens com SPB causou significativas alterações na morfologia das células. Mesmo células T98, apesar de sua resistência a ação citotóxica da peçonha, sofreram significativas alterações em sua morfologia. As alterações mais aparentes foram uma redução do volume citoplasmático, com conseqüente redução do tamanho celular, formação de vesículas (ou vacúolos) no citoplasma, irregularidades na membrana plasmática e arredondamento celular. Em todas as linhagens essas alterações foram agravadas com o aumento da concentração de SPB no meio. Em células RT2 e CAE também foi observada a formação de *blebs*, os quais são protuberâncias irregulares da membrana citoplasmática formadas em conseqüência da perda de integridade do citoesqueleto celular durante o processo de apoptose. O tratamento das células T98 com SPB não levou a formação de *blebs*, mesmo nas concentrações mais altas.

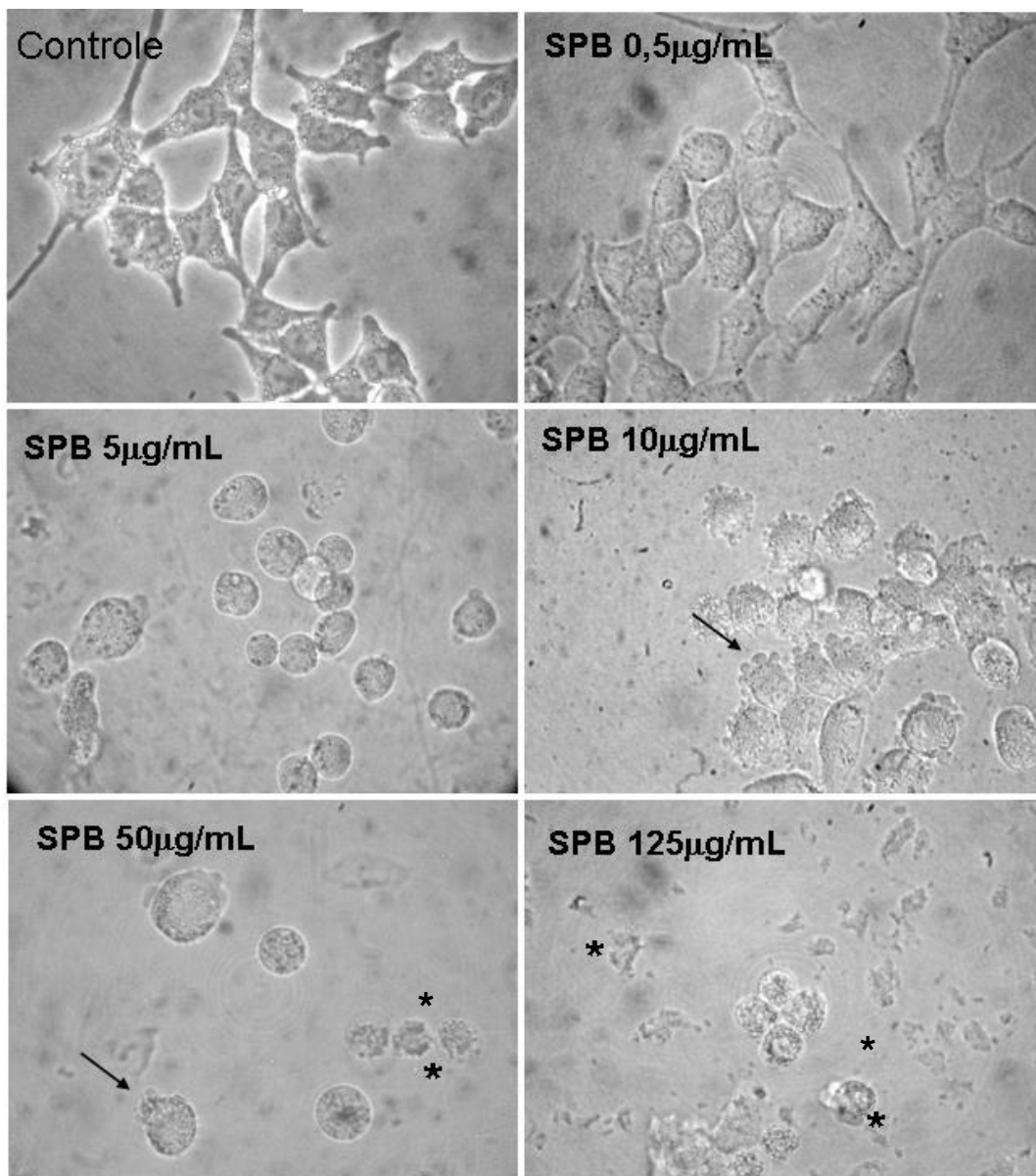


FIG.15: Fotomicrografia óptica de células RT2: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com SPB. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500, acoplada ao MO (aumento de 400x). Células tratadas com SPB apresentaram redução do volume celular e irregularidades na membrana plasmática (indicadas pelos asteriscos). O tratamento também causou a formação de *blebs*, os quais são indicados pelas setas pretas.

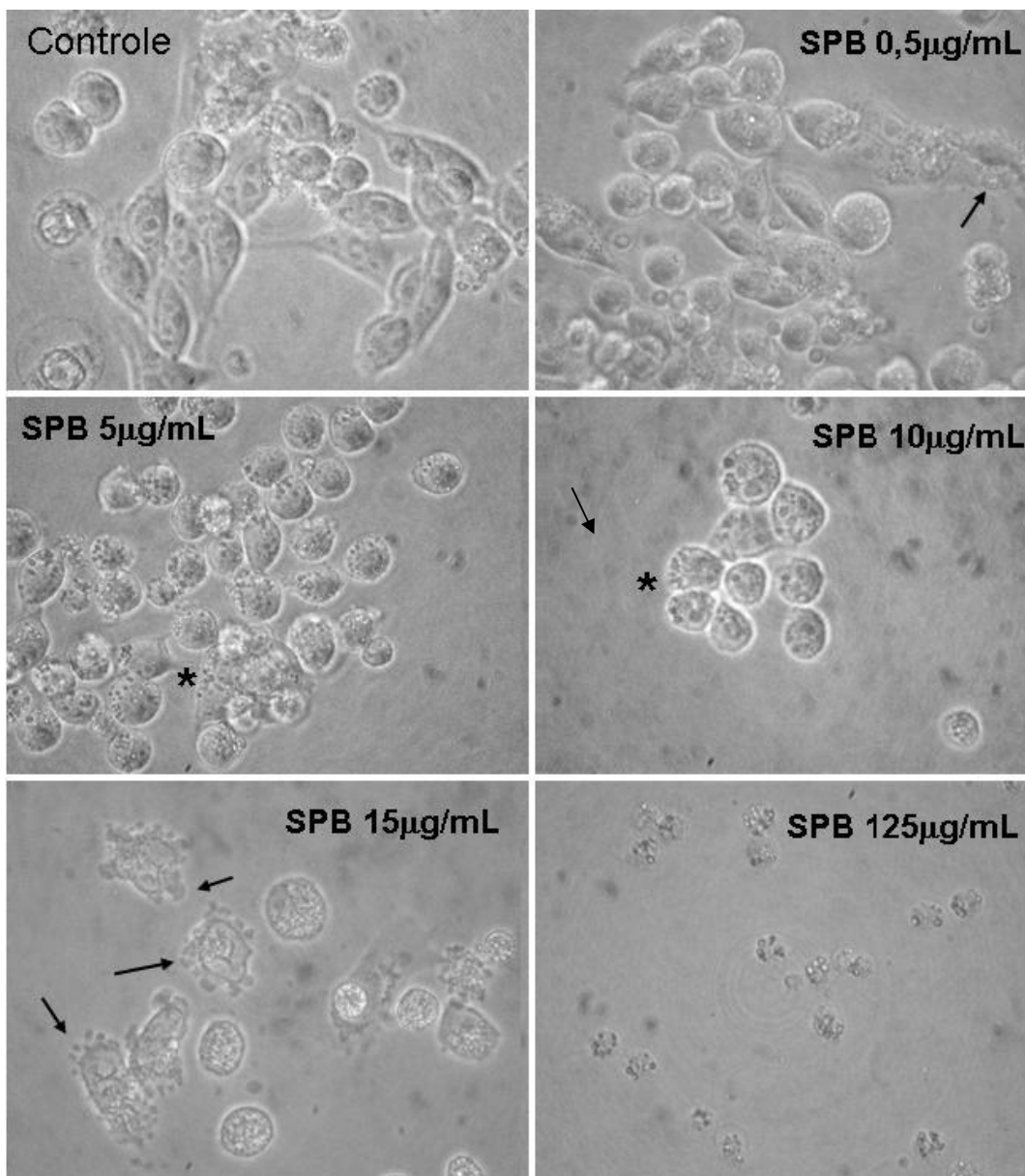


FIG.16: Fotomicrografia óptica de células CAE: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com SPB. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500, acoplada ao MO (aumento de 400x). O tratamento causou irregularidades da membrana plasmática (indicados pelos asteriscos) e formação de *blebs* (setas pretas).

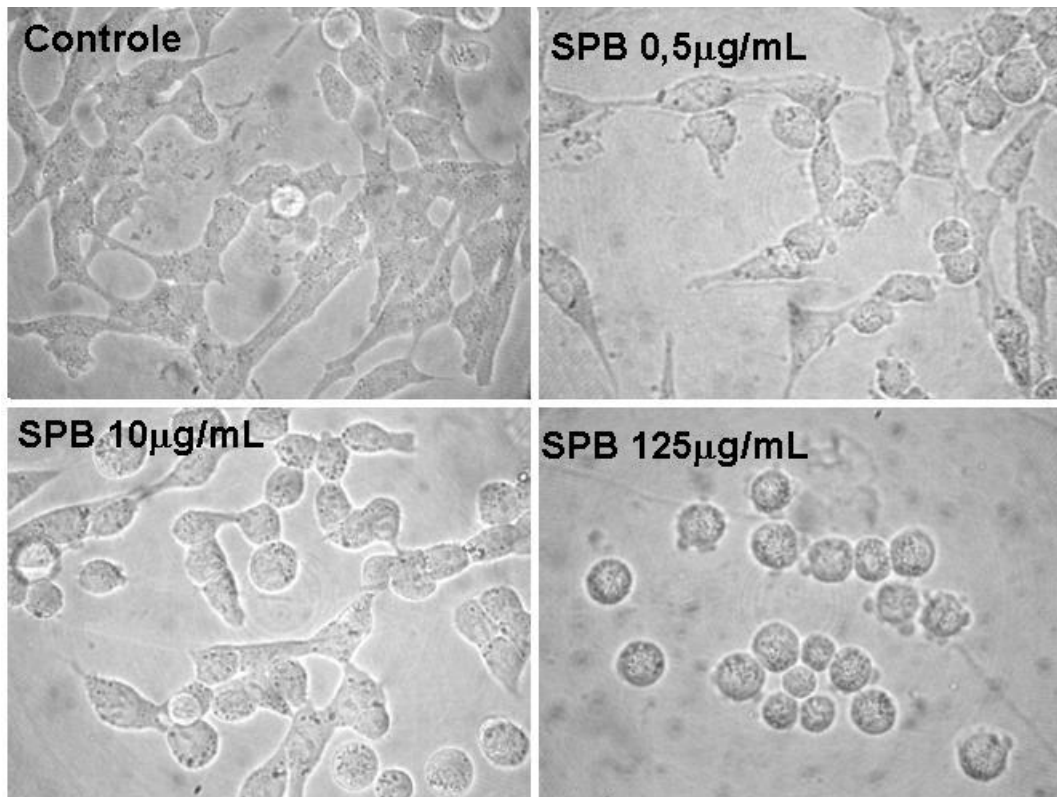


FIG.17: Fotomicrografia óptica de células T98: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com SPB. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500, acoplada ao MO (aumento de 400x). Apesar da resistência dessa linhagem ao efeito citotóxico da peçonha, o aumento da dose de SPB gerou arredondamento e redução do volume celular.

5.1.3. Análise das alterações do DNA cromossomal induzidas pela SPB

A morfologia do DNA cromossomal de células submetidas a tratamento com SPB foi avaliada através da coloração com DAPI. Este corante é específico para DNA e se intercala entre as duplas fitas, reagindo com as bases nitrogenadas e formando complexos fluorescentes. Essa técnica permite não só avaliar fragmentações no material genético da célula, mas também outras características do processo de apoptose tais como a condensação da cromatina e a formação dos corpos apoptóticos, e permite a

complementação dos dados obtidos durante a análise morfológica das células (Tarnowski *et al.*, 1991).

Para realização dos experimentos de coloração com DAPI, células RT2 e CAE foram tratadas com concentrações de SPB próximas a DL_{50} (a qual foi previamente estabelecida pelos experimentos de citotoxicidade: $3\mu\text{g/mL}$ e $10\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Células T98 foram tratadas com a maior dose utilizada nos experimentos de citotoxicidade ($125\mu\text{g/mL}$). Células RT2 e CAE, após 48h de tratamento apresentaram condensação da cromatina, fragmentação do DNA, e formação de corpos apoptóticos (FIG. 18 e 19). Em células T98, após 48 horas de tratamento, foi possível visualizar a condensação da cromatina, formação de poucos corpos apoptóticos (FIG.20). Todas as alterações morfológicas observadas no DNA cromossomal, em todas as linhagens, são características do processo de morte celular programada.

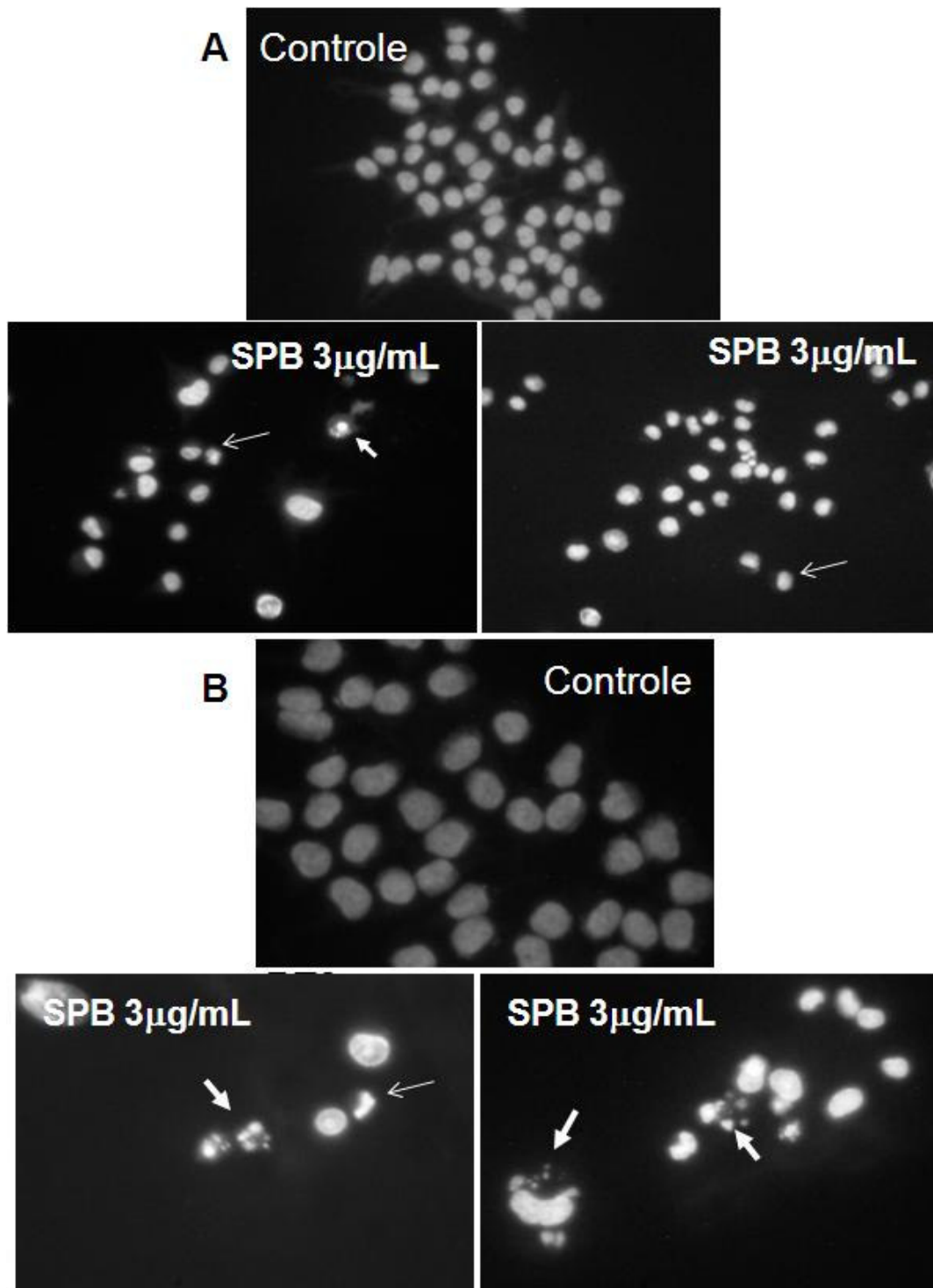


FIG.18: Análise do DNA cromossomal de células RT2 após 48h de tratamento com SPB, na concentração de 3μg/mL. Células RT2 coradas com DAPI após tratamento com SPB,. A) aumento de 200x; B) aumento de 400x. Setas finas indicam condensação da cromatina e setas grossas indicam corpos apoptóticos.

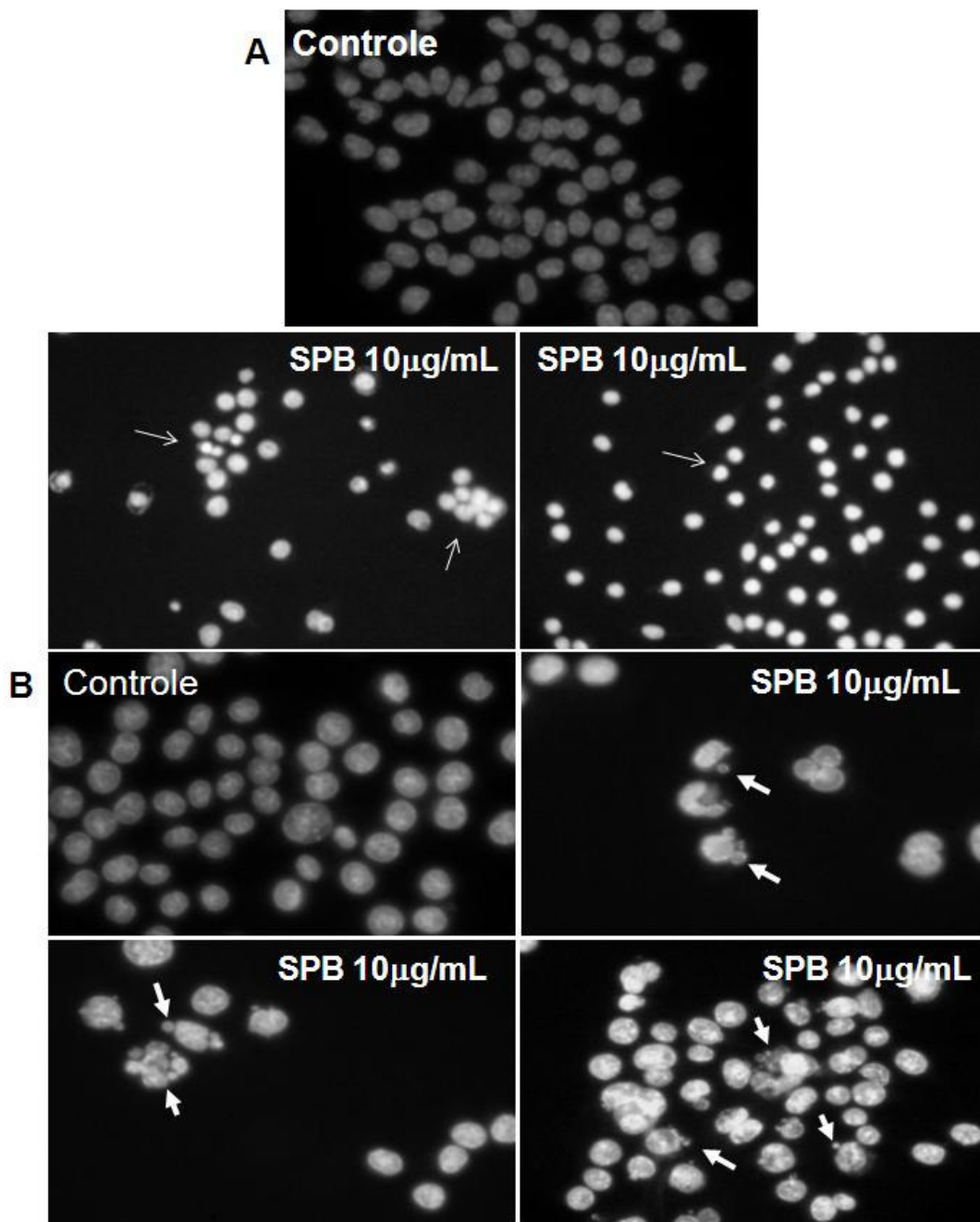


FIG.19: Alterações do DNA cromossomal de células CAE coradas com DAPI, após 48 horas de tratamento com 10µg/mL de SPB. A) aumento de 200x; B) aumento de 400x. Setas finas indicam condensação da cromatina e setas grossas indicam corpos apoptóticos.

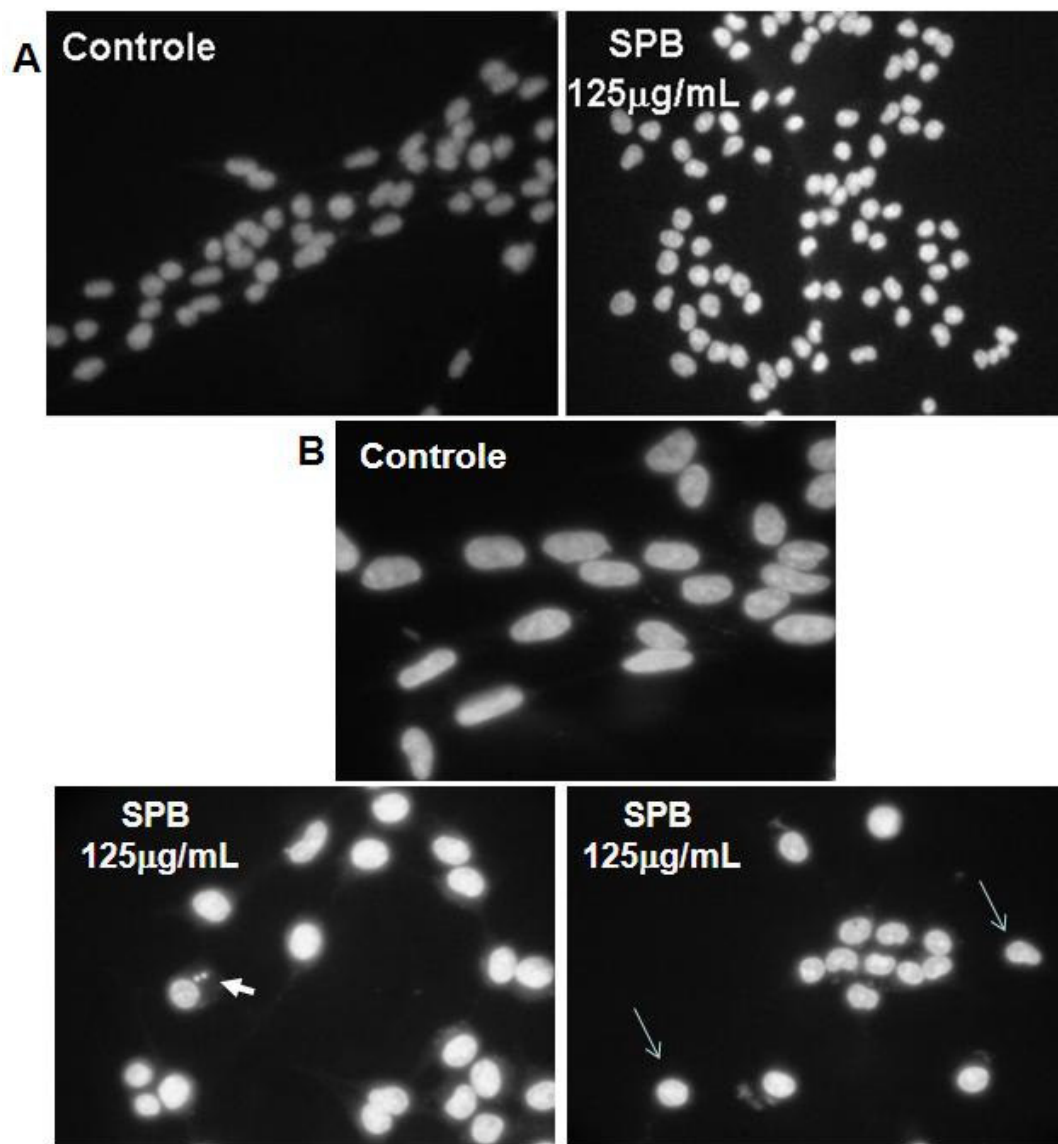


FIG.20: Células T98 coradas com DAPI, após 48 horas de tratamento com SPB (125µg/mL). A cromatina apresentou pontos de condensação, mas poucos corpos apoptóticos foram formados. A) aumento de 200x; B) aumento de 400x. Setas finas indicam condensação da cromatina e setas grossas indicam corpos apoptóticos.

5.2. Síntese, avaliação da preservação da atividade antitumoral e avaliação da pureza radioquímica da sonda radioativa de SPB utilizando ^{99m}Tc como radiotraçador

Pouco se sabe sobre as propriedades fisio-farmacológicas e bioquímicas da SPB, bem como sobre seus possíveis componentes tóxicos e de interesse terapêutico, e os mecanismos de ação pelos quais agem tais componentes. Não existem estudos sobre radiomarcagem e perfil de distribuição desta peçonha descritos na literatura. Por este motivo, com o objetivo de determinar o perfil de biodistribuição da SPB, e posteriormente avaliar sua interação com células tumorais *in vivo*, a peçonha bruta foi radiomarcada com ^{99m}Tc , de forma a se obter uma sonda radioativa. Como este é o primeiro trabalho relatando a radiomarcagem da SPB, foram realizadas diversas reações de síntese, sob diferentes condições de pH, temperatura e saturação de oxigênio (condição ambiente e de vácuo), de forma a se obter o melhor protocolo para a reação de radiomarcagem. Em condições ambientes, o rendimento médio das radiomarcações foi de 55%. O maior rendimento foi obtido em pH 7,6, em condições de vácuo. Em tais condições, o rendimento médio das reações de radiosíntese foi de 74,77%. A sonda radioativa sintetizada a partir da peçonha bruta foi chamada de [^{99m}Tc]SPB.

A radiomarcagem com ^{99m}Tc consiste em um processo de marcação não isotópico, onde ocorre a introdução de um elemento “estranho” nas moléculas, o que pode levar a sua ruptura e/ou à perda de suas funções. Desta forma, para garantir que o processo de radiomarcagem não alterou os componentes da peçonha de forma a reduzir sua atividade antitumoral, a [^{99m}Tc]SPB foi testada sobre células RT2, CAE e T98 quanto a sua citotoxicidade.

Em células RT2, a união das proteínas da peçonha com a emissão de radiação gama do ^{99m}Tc possibilitou um aumento da atividade antitumoral da SPB. Na menor concentração testada (0,5 $\mu\text{g/mL}$) a [^{99m}Tc]SPB foi citotóxica para 76,75 \pm 2,08% das células (FIG. 21). As FIG. 22 e 23, demonstram que a radiomarcagem da peçonha não reduziu significativamente sua atividade antitumoral em células CAE (DL₅₀ = 16,98 \pm 2,93 $\mu\text{g/mL}$) e T98 (onde a concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$ foi citotóxica para 24,03 \pm 2,486% das células, respectivamente).

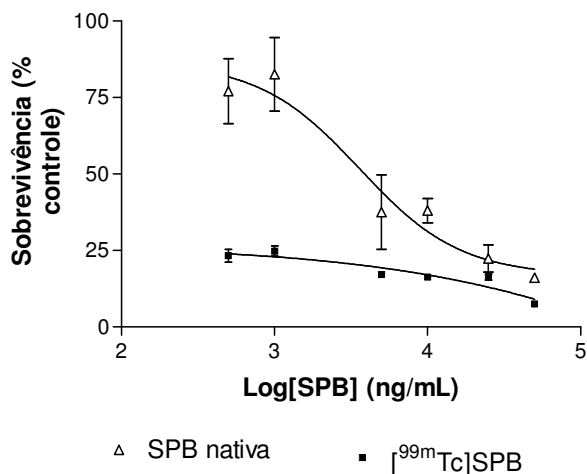


FIG.21: Avaliação da manutenção da atividade antitumoral da SPB após radiomarcção com ^{99m}Tc . Teste do MTT sobre células RT2. Comparação da ação antitumoral da SPB e $[^{99m}\text{Tc}]$ SPB em células RT2. A peçonha radiomarcada teve sua atividade antitumoral aumentada, demonstrando que a marcação não causou degradação ou perda de atividade dos componentes antitumorais da SPB. Na menor concentração testada ($0,5\mu\text{g/mL}$) a $[^{99m}\text{Tc}]$ SPB foi citotóxica para $76,75\pm 2,08\%$ das células

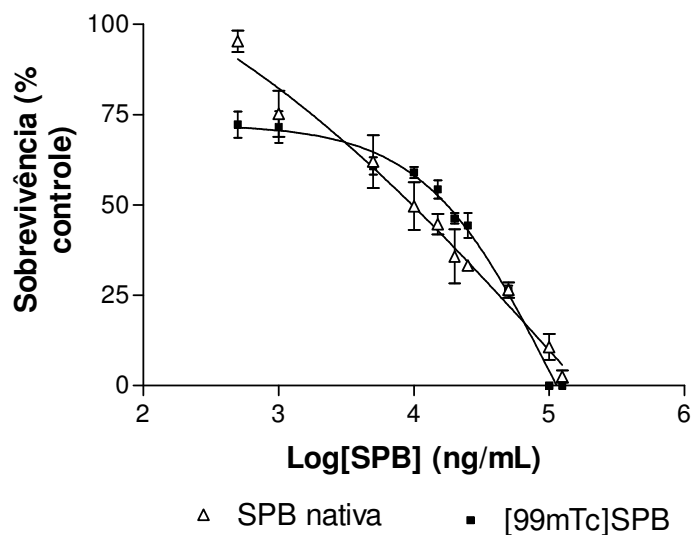


FIG.22: Avaliação da manutenção da atividade antitumoral da SPB após radiomarcção com ^{99m}Tc . MTT sobre células CAE. Comparação da ação antitumoral da SPB e $[^{99m}\text{Tc}]$ SPB em células CAE. A peçonha radiomarcada manteve sua atividade antitumoral, demonstrando que a marcação não causou degradação ou perda de atividade dos componentes antitumorais da SPB ($DL_{50} = 16,98\pm 2,93\mu\text{g/mL}$).

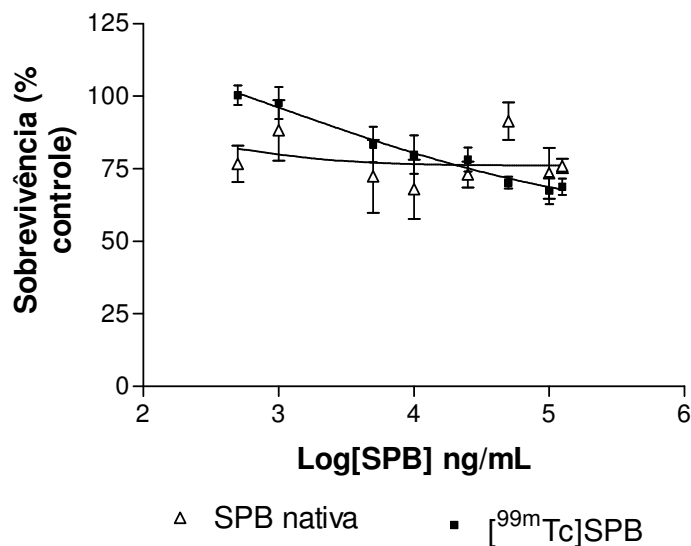


FIG.23: Avaliação da manutenção da atividade antitumoral da SPB após radiomarcção com ^{99m}Tc . Comparação da ação antitumoral da SPB e $[^{99m}\text{Tc}]\text{SPB}$ em células T98. A peçonha radiomarcada manteve seu perfil citotóxico, demonstrando que a marcação não causou perda ou ganho de atividade dos componentes antitumorais da SPB. A concentração de $125\mu\text{g}/\text{mL}$ foi citotóxica para $24,03\pm 2,486\%$ das células.

As análises cromatográficas realizadas para determinação do rendimento das reações, mostrou que 24% da radioatividade total encontrada estava na forma de colóide ($^{99m}\text{TcO}_2$) e 1% na forma de $^{99m}\text{TcO}_4^-$. Para verificar se tais impurezas poderiam interferir no perfil de biodistribuição da $[^{99m}\text{Tc}]\text{SPB}$, foram realizadas análises comparativas *in vivo* entre os perfis de biodistribuição desta sonda e dos contaminantes gerados nas reações de radiomarcção ($^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$). Para tal, camundongos Swiss fêmeas foram injetados via endovenosa caudal com $16,67 \times 10^3 \text{Bq}$ de $[^{99m}\text{Tc}]\text{SPB}$, $^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$, e dissecados para avaliação da radioatividade captada em cada órgão. Os resultados são apresentados na FIG.24 e demonstram que os possíveis contaminantes e a SPB radiomarcada apresentam perfis completamente distintos de biodistribuição.

Nos experimentos, os contaminantes foram consideravelmente captados pela tireóide e estômago, o que não ocorreu com a $[^{99m}\text{Tc}]\text{SPB}$. Este é outro dado que confirma a pureza radioquímica da preparação, uma vez que amostras com altas proporções de

$^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ são altamente captadas pela tireóide, devido a afinidade deste órgão por estas moléculas.

Os dados acima expostos demonstraram que a realização de reações sob condições de vácuo possibilitou a síntese de uma sonda radioativa com alta atividade específica ($0,352 \times 10^9 \text{Bq/mg}$) e atividade biológica preservada, e com alta pureza radioquímica. A boa qualidade da sonda sintetizada possibilitou sua utilização em experimentos de biodistribuição e interações com sítios tumorais *in vivo*.

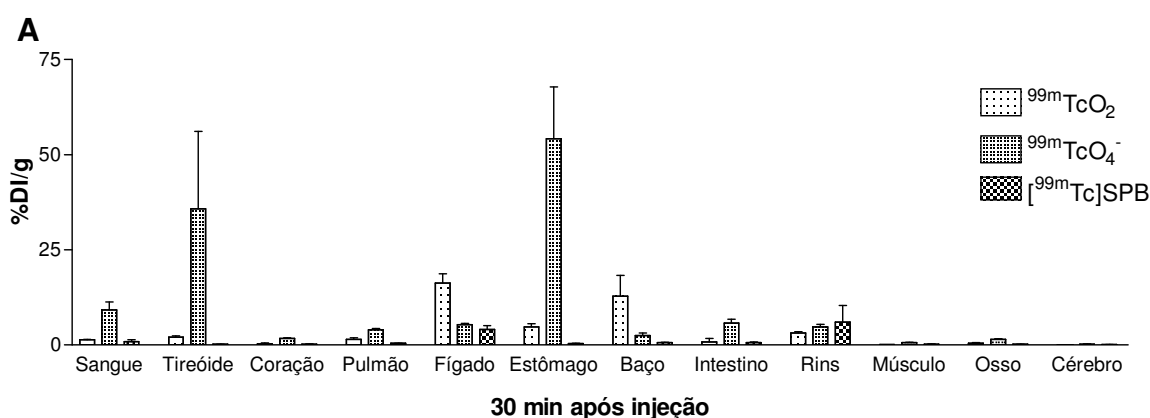


FIG.24: Verificação *in vivo* da pureza radioquímica da $[^{99m}\text{Tc}]\text{SPB}$. Comparação dos perfis de biodistribuição das moléculas radiomarcadas e dos possíveis contaminantes presentes nos radiofármacos ($^{99m}\text{TcO}_2$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$) após 30 minutos da injeção via endovenosa caudal. A distinção entre os perfis de biodistribuição dos contaminantes e da $[^{99m}\text{Tc}]\text{SPB}$ confirma a pureza da mesma.

5.3. Determinação dos parâmetros farmacocinéticos e avaliação da interação *in vivo* da $[^{99m}\text{Tc}]\text{SPB}$ com sítios tumorais: Biodistribuição em animais com Tumor de Ehrlich

A capacidade de interação com sítios tumorais *in vivo* da $[^{99m}\text{Tc}]\text{SPB}$ foi determinada através de experimentos de biodistribuição em camundongos Swiss fêmeas implantados com tumor de Ehrlich.

Os animais receberam injeções com $16,67 \times 10^3 \text{Bq}$ da peçonha radiomarcada e tiveram os órgãos retirados para análise. A Tabela 3 trás a cinética de biodistribuição da $^{99\text{m}}\text{Tc}$ SPB e permite a identificação dos órgão que a acumularam.

Tabela 3: Cinética da biodistribuição da $^{99\text{m}}\text{Tc}$ SPB (%DI/g), em animais com tumor de Ehrlich, injetados via endovenosa com $16,67 \times 10^3 \text{Bq}$ (n=4; p<0,05)

Órgão	<i>Tempo após a injeção</i>						
	1 min.	10 min.	30min.	60 min.	180min.	360min.	1440 min.
Sangue	9,02±1,68	2,1±0,41	0,84±0,50	0,41±0,03	0,29±0,02	0,26±0,07	0,24±0,01
Tireóide	0,60±0,12	0,29±0,17	0,16±0,04	0,18±0,01	0,17±0,09	0,08±0,02	0,10±0,03
Coração	1,30±0,43	0,37±0,09	0,20±0,10	0,12±0,01	0,09±0,01	0,07±0,02	0,09±0,03
Pulmão	4,11±1,15	1,03±0,46	0,41±0,03	0,18±0,02	0,11±0,04	0,06±0,02	0,05±0,01
Fígado	2,87±0,33	6,67±2,19	3,01±1,32	1,47±0,24	1,37±0,70	0,51±0,30	0,41±0,07
Baço	0,56±0,42	2,47±1,03	0,76±0,66	0,53±0,26	0,25±0,15	0,21±0,10	0,24±0,02
Pâncreas	0,32±0,03	0,21±0,06	0,11±0,04	0,08±0,01	0,06±0,01	0,08±0,02	0,09±0,02
Rins	2,88±0,43	11,83±2,05	5,96±4,36	2,82±0,51	1,11±0,70	0,81±0,51	0,75±0,09
Estômago	0,34±0,09	0,46±0,12	0,34±0,06	0,39±0,13	0,17±0,11	0,12±0,05	0,19±0,11
Intestino	0,41±0,02	0,44±0,05	0,16±0,08	0,13±0,07	0,07±0,04	0,05±0,03	0,06±0,01
Osso	0,21±0,14	0,35±0,21	0,14±0,06	0,16±0,08	0,07±0,05	0,15±0,011	0,12±0,05
Músculo	0,01±0,01	0,15±0,09	0,06±0,02	0,04±0,01	0,07±0,02	0,04±0,02	0,04±0,01
Útero/Ovário	0,13±0,03	0,19±0,09	0,07±0,01	0,05±0,01	0,05±0,02	0,47±0,08	0,07±0,02
Bexiga	0,31±0,08	0,31±0,16	0,33±0,03	0,36±0,06	0,31±0,14	0,27±0,07	0,27±0,06
Cérebro	0,12±0,02	0,05±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01
Cerebelo	0,15±0,03	0,07±0,02	0,09±0,03	0,07±0,01	0,06±0,02	0,12±0,07	0,07±0,01

Os resultados mostraram que a concentração de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ SPB no sangue diminuiu significativamente nos primeiros 10 minutos após a injeção endovenosa caudal, com uma depuração plasmática de $0,217 \text{mL}/\text{min}$ e um $T_{1/2}$ plasmático de $6,31 \pm 0,41 \text{min}$. Após 180 minutos da injeção apenas uma pequena quantidade de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ SPB foi detectada no sangue, a qual se manteve estável até o maior tempo avaliado ($0,26 \pm 0,07 \% \text{DI}/\text{mL}$). O volume de distribuição da SPB foi calculado em $0,45 \text{mL}/\text{g}$. A baixa quantidade de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ SPB na tireóide durante todos os tempos analisados, como dito anteriormente é mais uma característica que confirma a alta pureza radioquímica

desta preparação. A concentração da [^{99m}Tc]SPB no coração, pulmão e pâncreas seguiu a cinética sanguínea, sendo reduzida ao longo do tempo. A captação desta molécula no cérebro e cerebelo foi desprezível, indicando que a peçonha bruta não foi capaz de atravessar a barreira hematoencefálica e provavelmente não produz efeitos neurotóxicos diretos quando injetado via intravenosa.

A captação da [^{99m}Tc]SPB no fígado e rins indica que estes órgão são os responsáveis pela metabolização e excreção desta molécula. Após 24 horas da injeção esta molécula já havia sido quase completamente eliminada ($0,75 \pm 0,09\% \text{DI/g}$)

A concentração da [^{99m}Tc]SPB na região tumoral, em diferentes tempos, é mostrada na FIG.25. Em nenhum dos tempos analisados houve diferença significativa entre a captação na pata implantada com tumor de Ehrlich e na pata contralateral normal. A maior captação observada no tumor ocorreu 10 minutos após a injeção ($0,51 \pm 0,1\% \text{DI/g}$), sendo gradativamente reduzida nos tempos subseqüentes, de acordo com a cinética sanguínea. Estes dados mostraram que a SPB não possui afinidade pelas células tumorais.

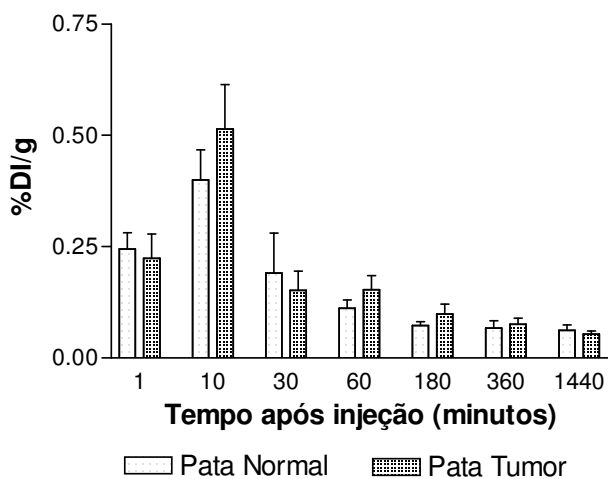


FIG.25: Comparação da concentração da [^{99m}Tc]SPB na pata implantada com tumor de Ehrlich e pata sem tumor (pata normal), ao longo do tempo. A concentração da [^{99m}Tc]SPB na pata com tumor não foi significativamente diferente de sua concentração na pata normal. (n=4; $p < 0,05$).

5.4. Purificação da enzima gelatinolítica SPGP à partir da peçonha de *S. plumieri*

Os resultados obtidos com a SPB mostraram que essa peçonha possui efeito antitumoral, e permitiram a avaliação das propriedades antitumorais da enzima com atividade gelatinolítica, a SPGP, purificada a partir desta peçonha, para verificar se esta enzima colabora ou é responsável pelo efeito antitumoral da SPB.

Por meio de adaptações na metodologia descrita por Carrijo *et al.* (2005), a SPGP foi isolada da SPB. Para purificação foram realizadas 4 cromatografias, sendo o rendimento da purificação de aproximadamente 1,5% em relação ao material de partida. A FIG.26 trás o fluxograma do processo de purificação dessa enzima.

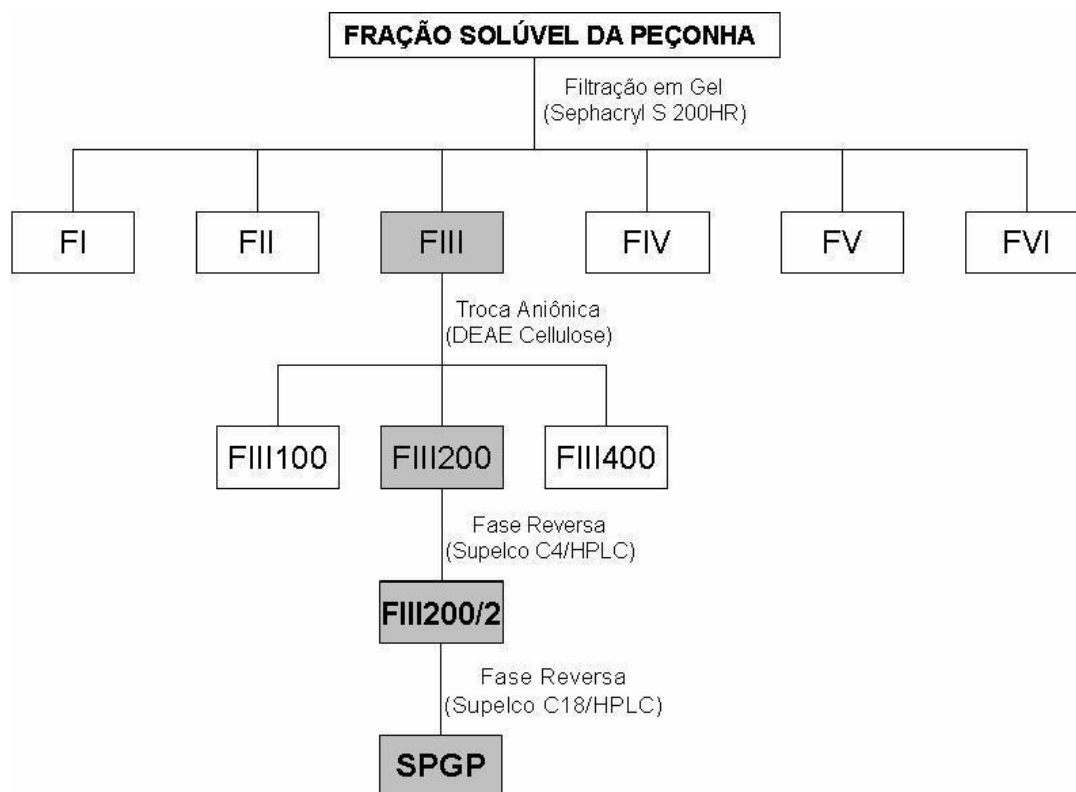


FIG.26: Fluxograma do processo de purificação da SPGP a partir da SPB. (Modificado de Andrich, 2005).

5.4.1. Cromatografia de filtração em Gel em coluna Sephacryl S200HR

A FIG.27 mostra o perfil cromatográfico obtido do fracionamento da fração solúvel da SPB em coluna de Sephacryl S 200 HR. Esta primeira etapa de purificação resultou em seis picos principais, sendo o conteúdo protéico agrupado em seis frações denominadas FI a FVI. Os testes eletroforéticos demonstraram que a atividade gelatinolítica está principalmente associada às frações FIII e FV (dado não mostrado). A fração FIII, por apresentar maior conteúdo protéico e atividade gelatinolítica intensa, foi selecionada para dar continuidade ao processo de fracionamento.

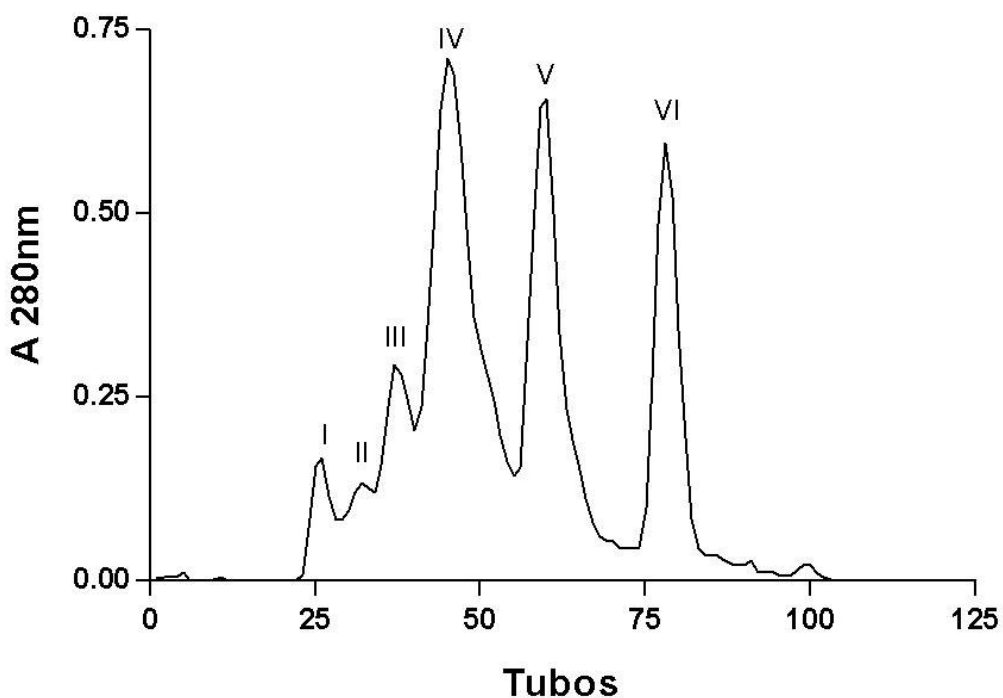


FIG.27: Perfil cromatográfico da Filtração em Gel da fração solúvel da SPB em Coluna Sephacryl S 200 HR (1,2 x 120cm). A coluna foi equilibrada e eluída com tampão fosfato 10mM pH 7,4, a 4°C. O fluxo foi de 5,4ml/hora com frações de 1,8ml/tubo. O conteúdo protéico do eluato foi estimado pela leitura da absorbância a 280nm. As abreviações FI a FVI correspondem às frações agrupadas.

5.4.2. Cromatografia de troca aniônica em coluna DEAE Celulose

A fração FIII, com atividade gelatinolítica intensa foi submetida à cromatografia de troca aniônica em coluna de DEAE-Celulose. Três grupos de proteínas foram obtidos e denominados de acordo com a concentração de sal necessária para sua eluição (FIII100, FIII200 e FIII400). A FIG.28 mostra o perfil obtido neste processo cromatográfico. A atividade gelatinolítica predominante estava associada à fração FIII200 (FIG.29), a qual foi utilizada para dar continuidade ao processo de purificação.

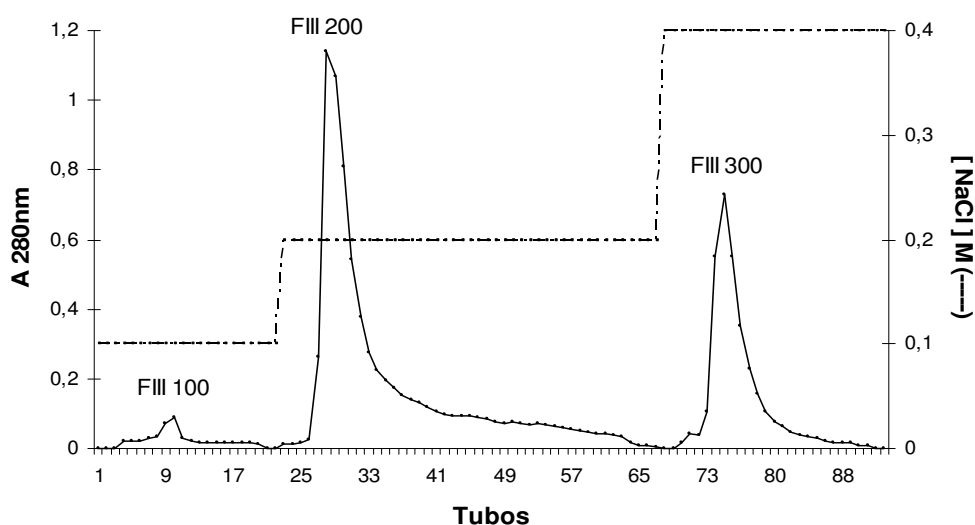


FIG.28: Perfil cromatográfico da troca aniônica da fração FIII. Coluna de troca aniônica (DEAE Celulose, 1,0 x 10cm). A coluna foi equilibrada e eluída com tampão fosfato 10mM pH 7,6, a 4°C e as proteínas foram eluídas com um gradiente “step-wise” de NaCl (0; 0,1; 0,2 e 0,4M). O fluxo foi de ~1,5ml/min com frações de 1,5ml/tubo. O conteúdo protéico do eluato foi estimado pela leitura da absorbância a 280nm. As abreviações FIII100, FIII200 e FIII400 correspondem às frações agrupadas.

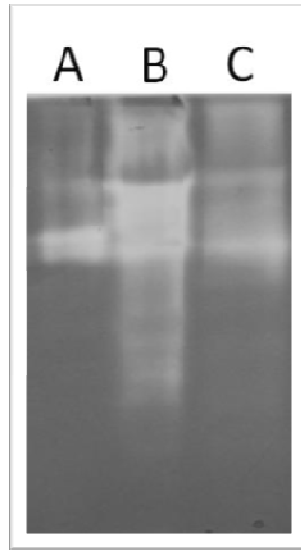


FIG.29: Zimograma das frações obtidas da segunda etapa de purificação cromatográfica.

O zimograma em detalhe mostra a atividade gelatinolítica das frações (~5µg) (A) FIII100, (B) FIII200 e (C) FIII400, utilizando gel 7,5% de acrilamida em Tris- HCl pH 8,8 contendo 0,1% de gelatina. Após remoção do SDS do gel com Triton X-100, este foi incubado em tampão fosfato 0,1M pH 7,5 por 16h a 37°C. O gel foi revelado com azul de coomassie. A fração FIII200 foi selecionada para dar continuidade ao processo de purificação.

5.4.3. Cromatografia em Coluna de Fase Reversa C4

Nesta etapa, a fração FIII200 foi submetida à cromatografia de fase reversa em HPLC utilizando coluna analítica Supelco C4. Neste processo foram obtidos três picos principais, dois durante o gradiente de ACN (denominados FIII200/1 e FIII200/2), e um eluído à 100% de ACN (denominado FIII200/3) (FIG.30). Os três picos foram testados quanto à presença de atividade gelatinolítica, sendo FIII200/2, eluído com aproximadamente 39% de ACN, o único a apresentar tal atividade (FIG.31).

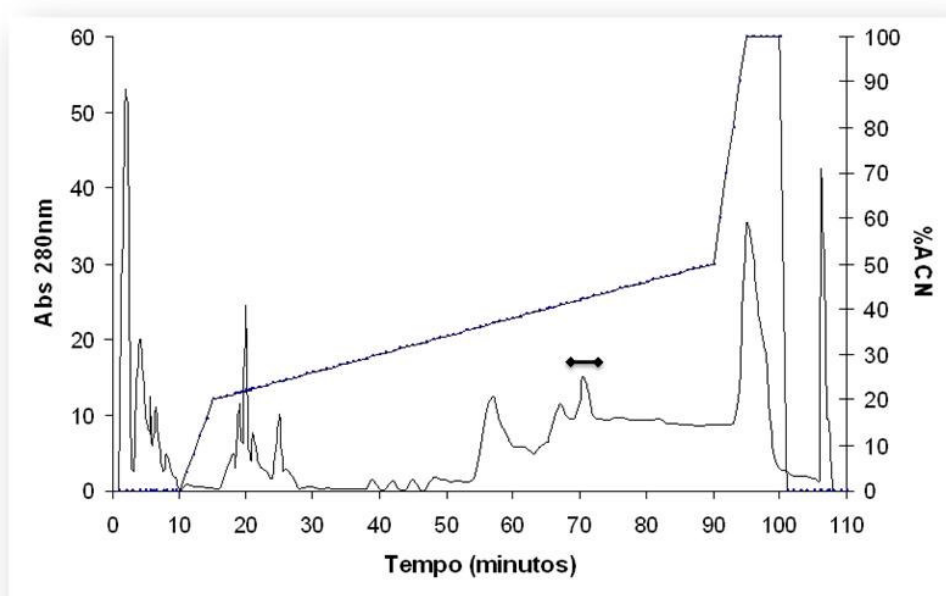


FIG.30: Perfil cromatográfico obtido da etapa 3 de purificação: Coluna de fase reversa C4 (Supelco, 0,46 x 15cm) equilibrada com solução de 0,1% de TFA em água. A cromatografia foi desenvolvida usando um gradiente linear de 0 a 50% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA a 23°C. Amostra: FIIID200. O fluxo foi de 1,0ml/min. O conteúdo protéico do eluato foi estimado pela absorbância a 280nm. A barra horizontal corresponde à fração com atividade gelatinolítica.

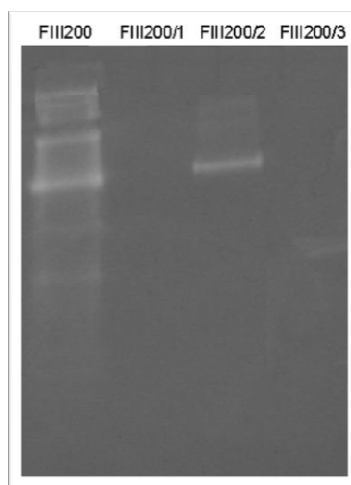


FIG.31: Zimograma das frações obtidas da terceira etapa de purificação cromatográfica. O zimograma em detalhe mostra a atividade gelatinolítica da fração aplicada FIII200 (~5µg) e das frações obtidas: FIII200/1, FIII200/2 e FIII200/3, utilizando gel 7,5% de acrilamida em Tris- HCl pH 8,8 contendo 0,1% de gelatina. Após remoção do SDS do gel com Triton X-100, este foi incubado em tampão fosfato 0,1M pH 7,5 por 4h a 37°C. O gel foi revelado com azul de coomassie. Apenas a fração FIII200/2 apresentou atividade gelatinolítica.

5.4.4. Recromatografia em Coluna de Fase Reversa C18

O perfil da recromatografia em Coluna de Fase Reversa C18 Supelco está mostrado na FIG.32. As proteínas foram eluídas (com 48% de ACN), m um pico único e simétrico, o qual corresponde a enzima gelatinolítica SPGP.

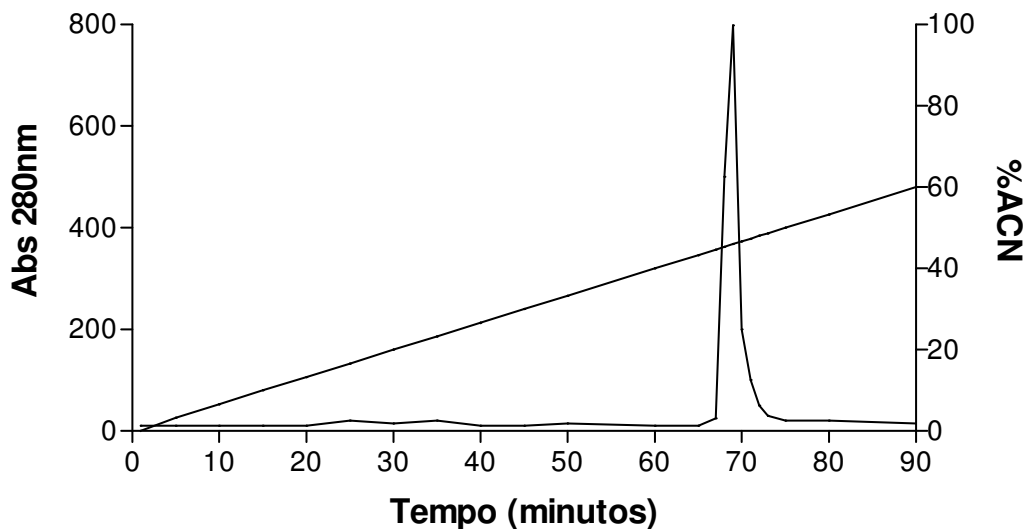


FIG.32: Perfil da recromatografia em Fase Reversa (HPLC) da fração FIII200/2. A corrida cromatográfica foi realizada em Coluna Supelco C18 (0,46 x 25cm) equilibrada com solução de 0,1% de TFA em água. A cromatografia foi desenvolvida usando um gradiente linear de 0 a 60% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA a 23°C. Amostra: FIII200/2. O fluxo foi de 1,0ml/min. O conteúdo protéico do eluato foi estimado pela absorbância a 280nm, sendo o único pico encontrado correspondente a enzima gelatinolítica SPGP.

5.4.5. Verificação da pureza da SPGP

A verificação da pureza da SPGP foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida (gradiente Laemmili), o qual está representado na FIG.33. A observação de que a amostra contendo SPGP migrou como uma única banda protéica sugere a homogeneidade e pureza deste componente, o qual foi então confirmado como sendo a enzima gelatinolítica SPGP (conforme previamente descrito por Carrijo *et al.*, 2005). O peso molecular aparente da enzima purificada está de acordo com dados anteriormente

publicados por Carrijo *et al.* (2005), em torno de 80 kDa, quando sob condições não redutoras.

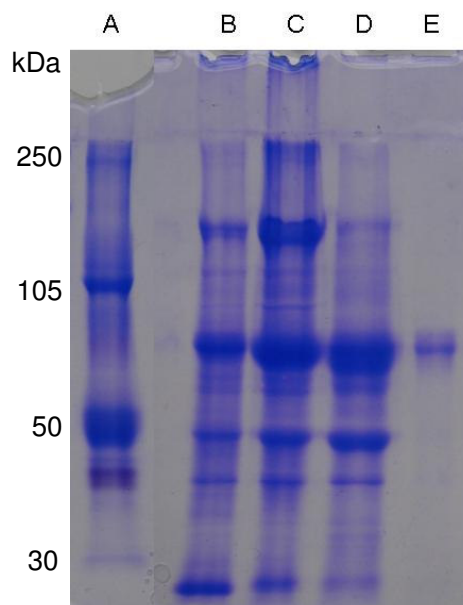


FIG.33: Eletroforese em gel de poliacrilamida sistema gradiente Laemmli para verificação da homogeneidade da enzima purificada (SPGP). (A) Marcador de peso molecular Rainbow; (B) SPB (~ 15µg); (C) FIII (~ 10µg); (D) FIII200 (~ 10µg); (E) SPGP (~ 5µg). Gel 7,5% de acrilamida em Tris-HCl, pH 8,8. As bandas protéicas foram reveladas com azul de comassie.

5.5. Avaliação do efeito antitumoral a SPGP

5.5.1. Avaliação do efeito antitumoral *in vitro* da SPGP sobre células tumorais

Assim com a SPB, a citotoxicidade da SPGP foi avaliada sobre células RT2, CAE e T98. A FIG.34 mostra a citotoxicidade de SPGP sobre células RT2, após 48 horas de tratamento. Foram testadas concentrações de $3,35 \times 10^{-13} \text{M}$ à $6,95 \times 10^{-10} \text{M}$. Os resultados obtidos mostraram que células RT2 são mais sensíveis a SPGP que à SPB, como pode ser observado pelo valor da DL_{50} , calculado em $8,81 \times 10^{-12} \pm 2,94 \times 10^{-12} \text{M}$ para essa

enzima. Após 48 horas de tratamento, na maior concentração testada, não foram encontradas células vivas.

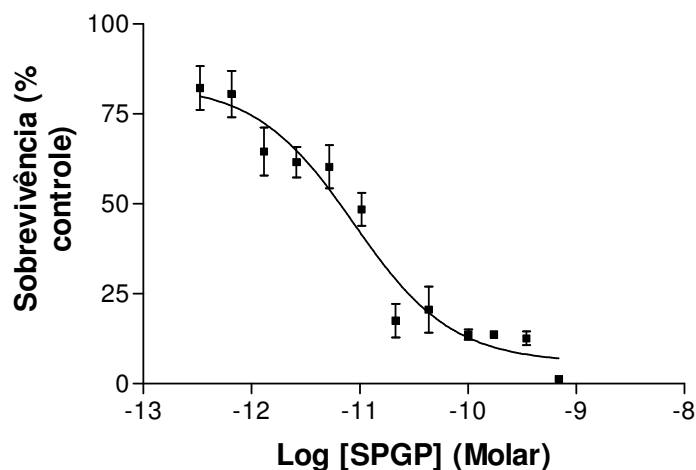


FIG.34: Efeito citotóxico da SPGP sobre células RT2. Células RT2 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações de SPGP a 37°C por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. A SPGP foi significativamente citotóxica, de maneira dose-dependente, com uma DL_{50} de $8,81 \times 10^{-12} \pm 2,94 \times 10^{-12} M$. ($p < 0,05$).

O efeito citotóxico da SPGP sobre células do CAE, após 48 horas de tratamento, é mostrado na FIG.35. Foram testadas concentrações de $3,35 \times 10^{-13} M$ à $1,41 \times 10^{-9} M$, sendo a DL_{50} de $1,22 \times 10^{-11} \pm 6,56 \times 10^{-12} M$. Células CAE foram mais resistentes que células RT2 ao tratamento com SPGP, assim como ocorreu para a SPB.

O efeito da SPGP sobre a sobrevivência de células T98 é mostrado na FIG.36. A SPGP foi mais citotóxica que a SPB em células T98. Assim como nos testes com a peçonha bruta, as concentrações testadas de SPGP sobre células T98, não foram citotóxicas para mais de 50% das células, o que impossibilitou o cálculo da DL_{50} para essa linhagem. A citotoxicidade máxima observada, após 48 horas de tratamento, ocorreu nas concentrações de $6,95 \times 10^{-10} M$ e $1,39 \times 10^{-9} M$, onde a SPGP foi letal para $40 \pm 4,69\%$ das células.

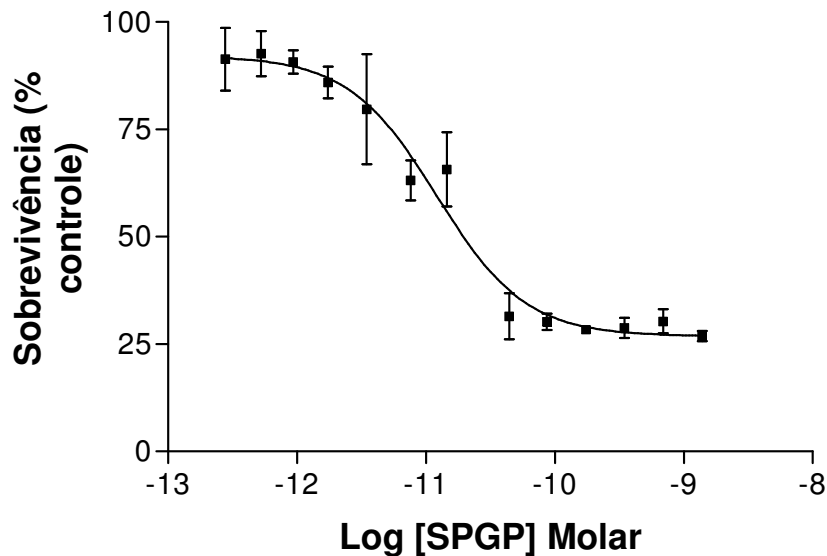


FIG.35: Efeito citotóxico da SPGP sobre células CAE. Células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações de SPGP a 37°C por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT, e a enzima foi significativamente citotóxica, de maneira dose-dependente, com uma DL_{50} de $1,22 \times 10^{-11} \pm 6,56 \times 10^{-12}$ M . ($p < 0,05$).

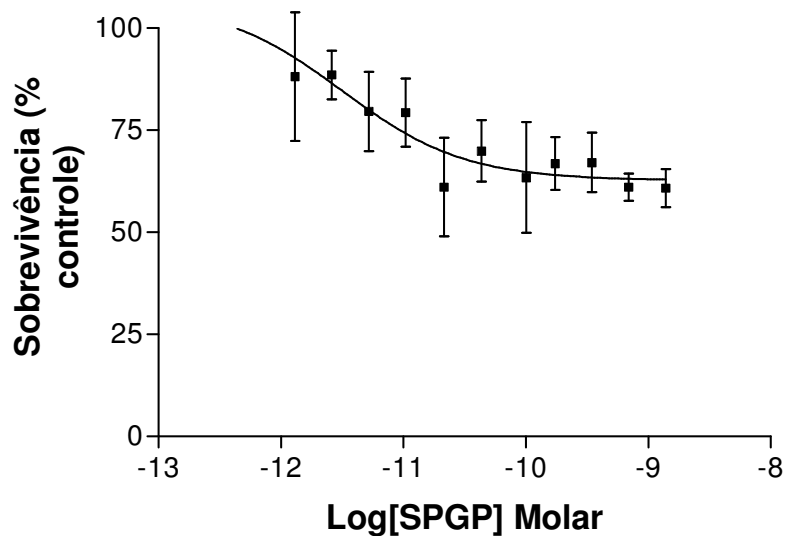


FIG.36: Efeito citotóxico da SPGP sobre células T98. Células T98 foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações da SPGP a 37°C por 48 horas. A taxa de sobrevivência foi medida pelo MTT. O efeito citotóxico máximo da SPGP ocorreu nas maiores concentrações testadas, onde a SPGP foi letal para $40,00 \pm 4,69\%$ das células. ($p < 0,05$).

5.5.2. Análise da morfologia celular de células submetidas à tratamento com SPGP

As análises morfológicas foram realizadas com auxílio de uma câmera fotográfica digital acoplada à microscópio óptico (MO), onde as células foram visualizadas e fotografadas.

As alterações sofridas pelas células RT2, CAE e T98, quando submetidas ao tratamento com SPB e SPGP podem ser observadas nas FIG. 37, 38 e 39, respectivamente.

O tratamento de células RT2 e CAE, com a SPGP, causou significativas alterações na morfologia dessas células, as quais foram agravadas com o aumento da concentração desta molécula no meio. Células T98 também apresentaram tais alterações, apesar de sua resistência a ação citotóxica da SPGP. As alterações mais aparentes foram a redução do volume citoplasmático, formação de vesículas (ou vacúolos) no citoplasma, irregularidades na membrana plasmática e arredondamento celular. Também foi observada a formação de *blebs*.

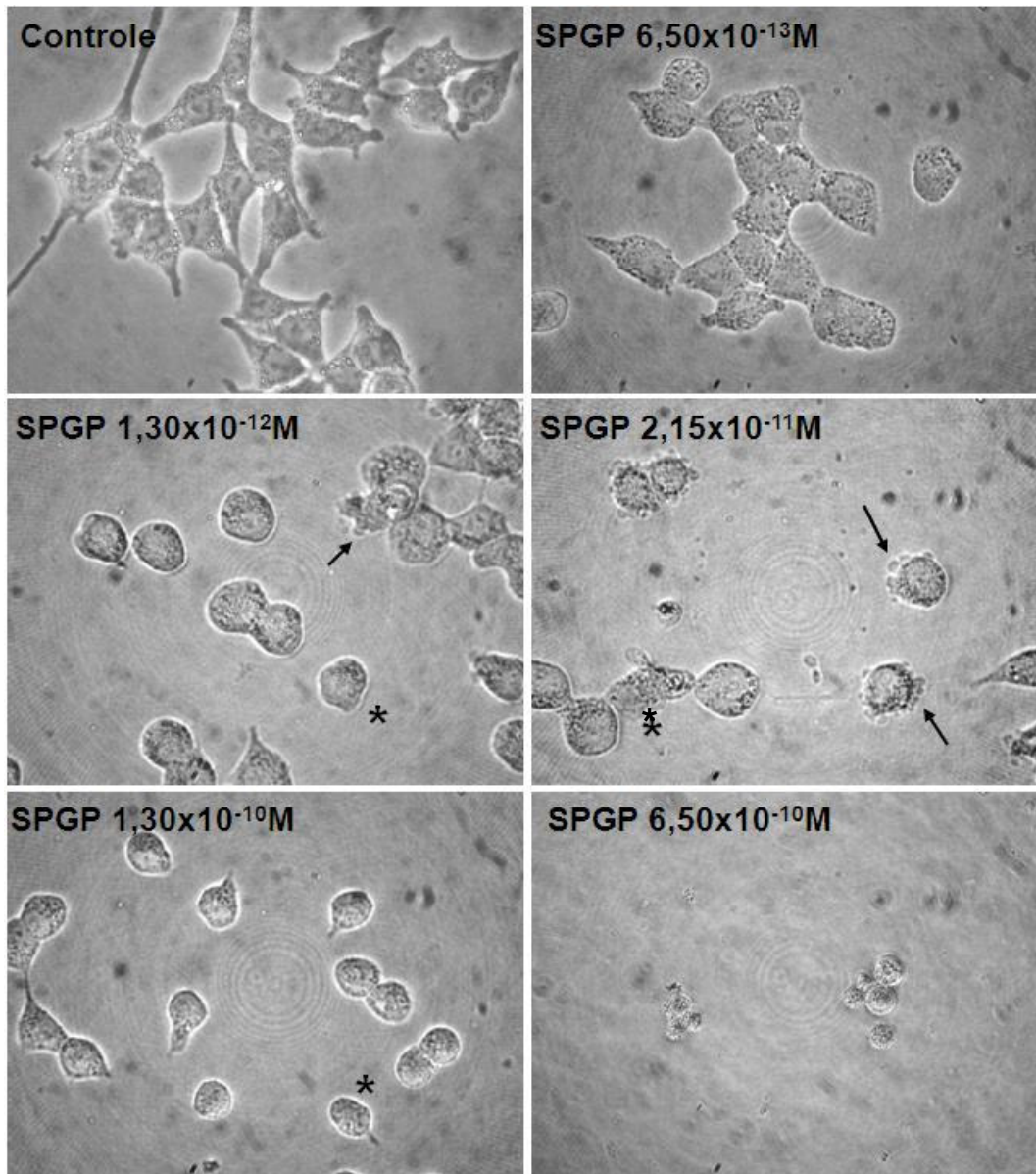


FIG.37: Fotomicrografia óptica de células RT2: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com SPGP. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500, acoplada ao MO (aumento de 400x). Células tratadas com SPGP sofreram redução do volume celular e apresentaram irregularidades na membrana plasmática (indicadas pelos asteriscos). O tratamento também causou a formação de *blebs*, os quais estão indicados pelas setas pretas.

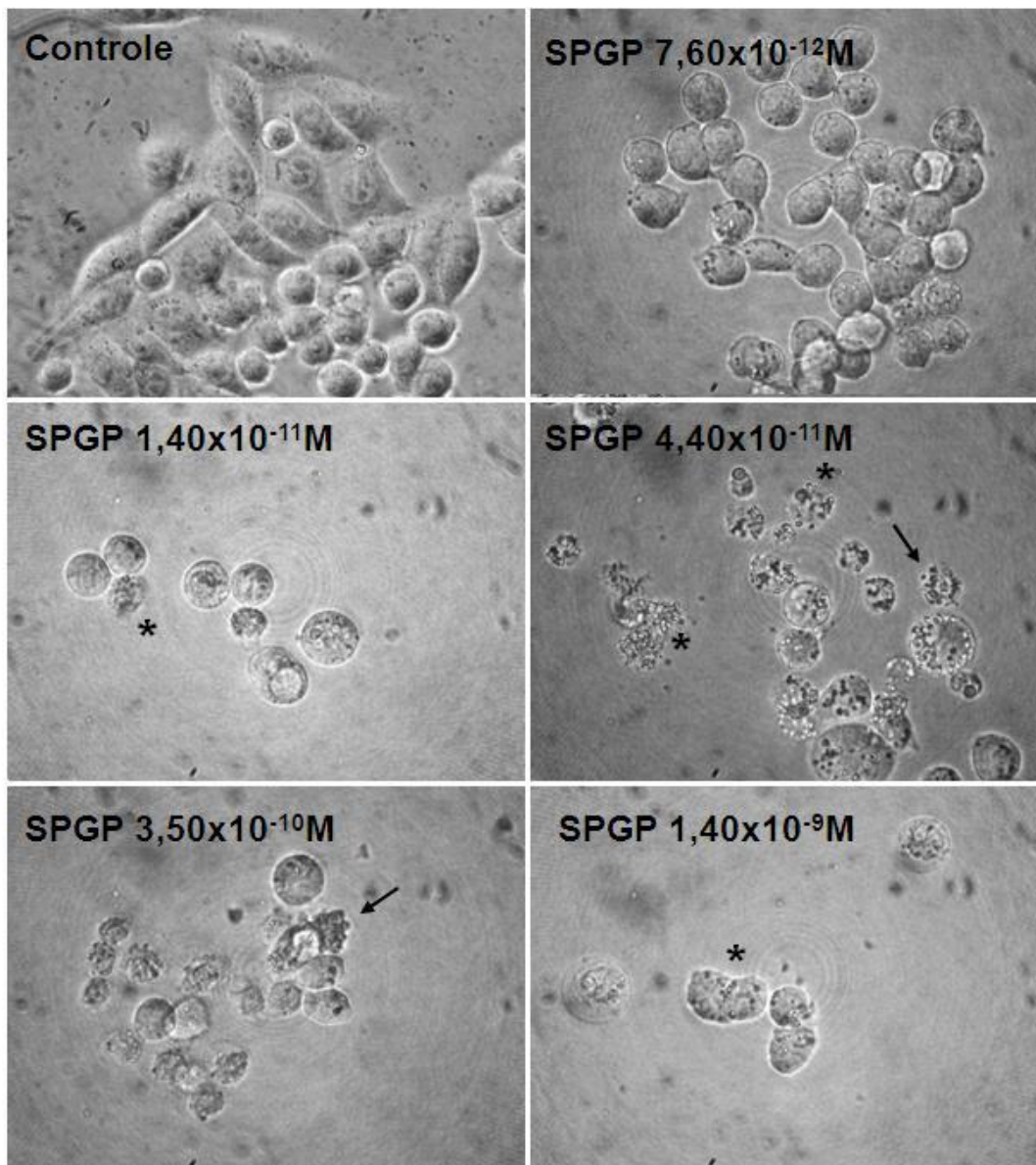


FIG.38: Fotomicrografia óptica de células CAE: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com SPGP. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500, acoplada ao MO (aumento de 400x). Os asteriscos indicam formação de *blebs.*, enquanto as setas pretas mostram irregularidades da membrana plasmática.

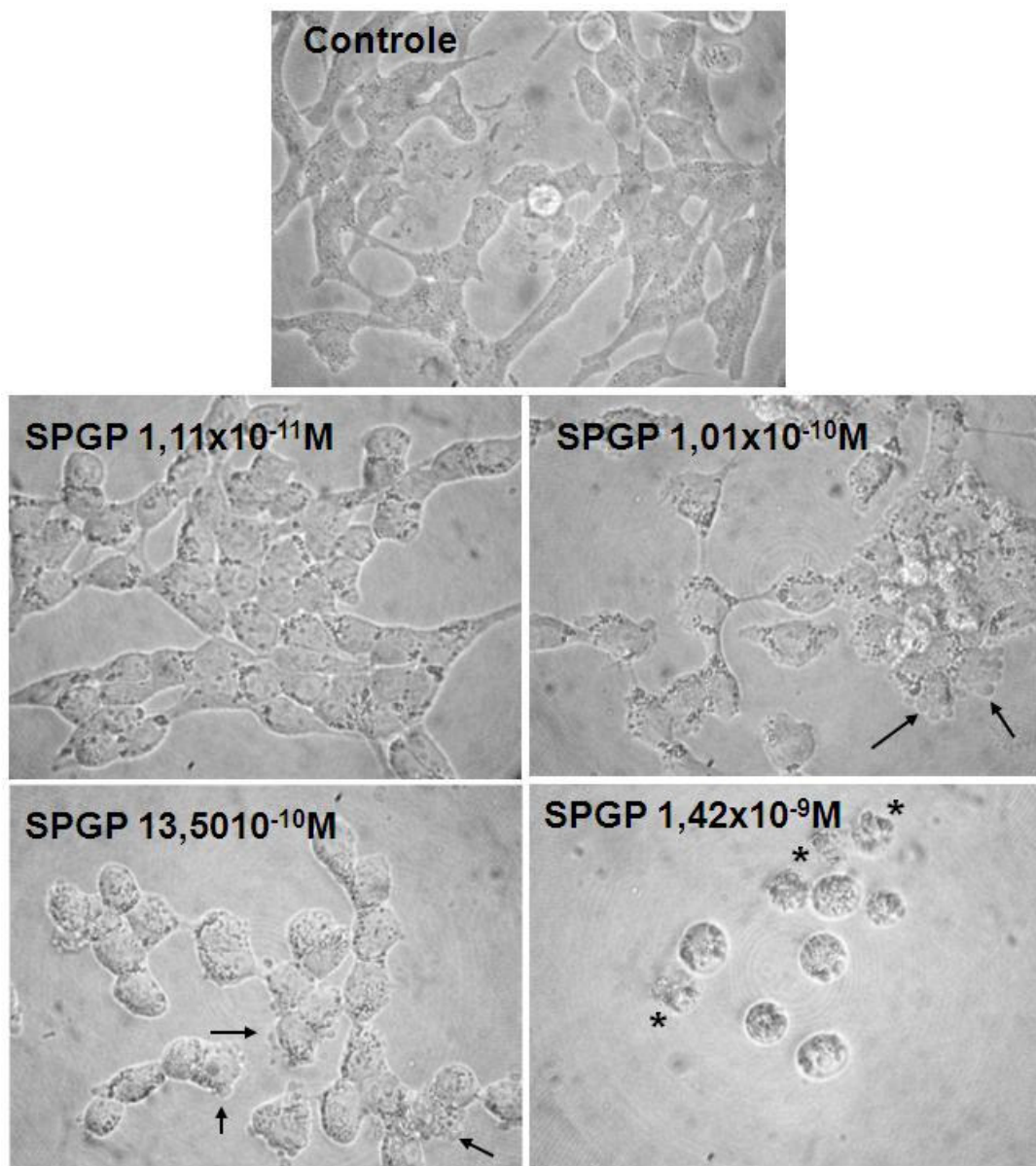


FIG.39: Fotomicrografia óptica de células T98: alterações morfológicas após 48 horas de tratamento com SPGP. Imagens adquiridas em Câmera fotográfica Digital Nikon Coolpix 4500, acoplada ao MO (aumento de 400x). Pode –se observar a formação dos *blebs* (setas pretas) e irregularidades da membrana plasmática (asteriscos), além do crescente arredondamento celular.

5.5.3. Análise das alterações do DNA cromossomal induzidas pela SPGP

Como anteriormente mencionado, as análises de alterações do DNA cromossomal foram realizadas por meio de coloração com DAPI.

Para realização dos experimentos células RT2 e CAE foram tratadas com SPGP respectivamente nas concentrações de $8,01 \times 10^{-11} \text{M}$ e $1,01 \times 10^{-11} \text{M}$, próximas a DL_{50} (a qual foi previamente estabelecida pelos experimentos de citotoxicidade). Células T98 foram tratadas com a maior dose utilizada nos experimentos de citotoxicidade ($1,39 \times 10^{-9} \text{M}$). Células RT2 e CAE, após 48h de tratamento apresentaram condensação da cromatina, fragmentação do DNA, e formação de corpos apoptóticos (FIG. 40 e 41). Todas as alterações morfológicas no DNA cromossomal observadas são características do processo de morte celular programada. Em células T98, após 48 horas de tratamento, foi possível visualizar a condensação da cromatina, mas as células não apresentaram formação de corpos apoptóticos (FIG.42).

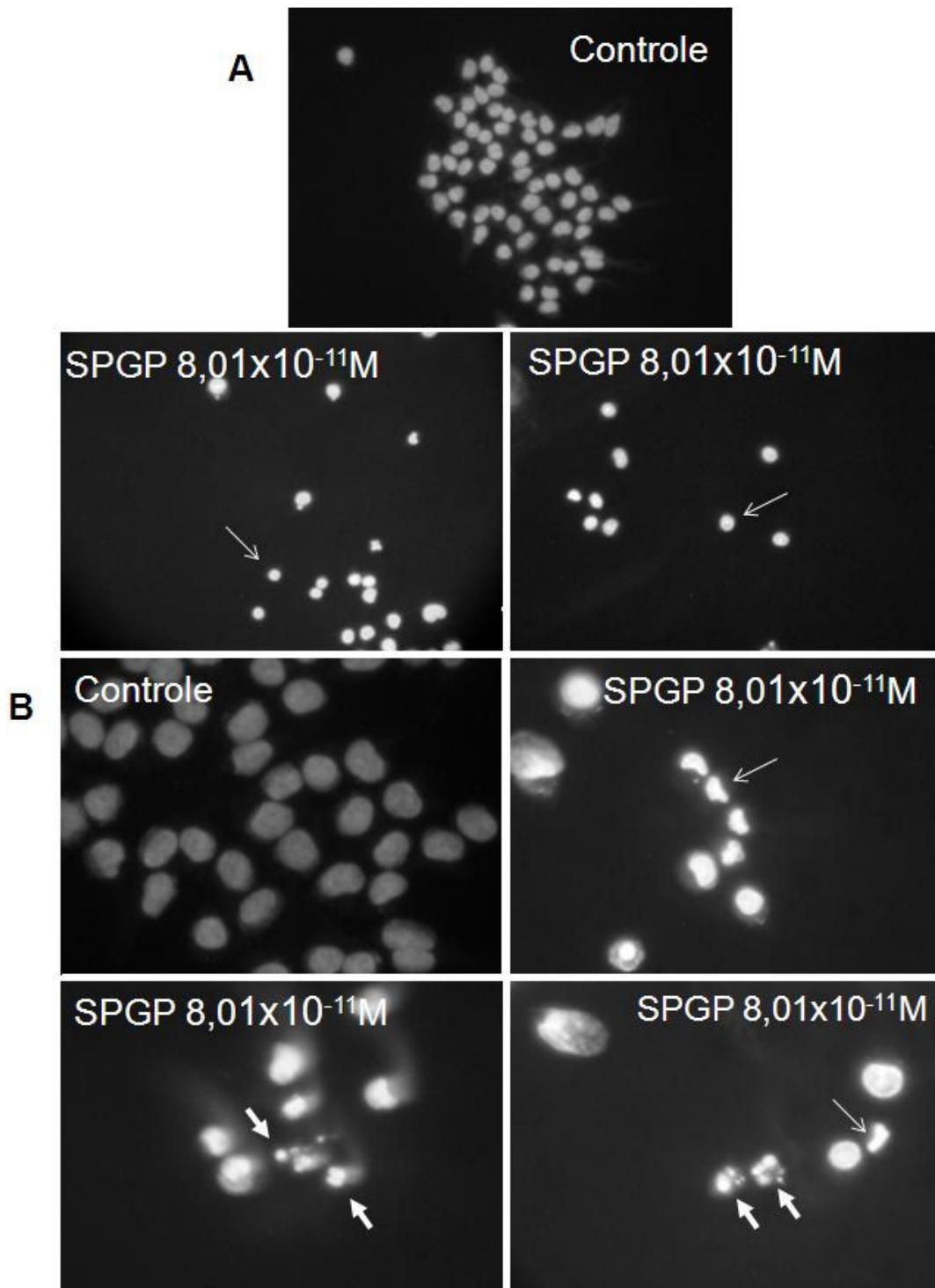


FIG.40: Análise do DNA cromossomal de células RT2 coradas com DAPI, após 48 horas de tratamento com SPGP ($8,01 \times 10^{-11} \text{M}$). Células RT2 coradas com DAPI, após 48 horas de tratamento com SPGP. A) aumento de 200x; B) aumento de 400x. Setas finas indicam condensação da cromatina e setas grossas indicam corpos apoptóticos.

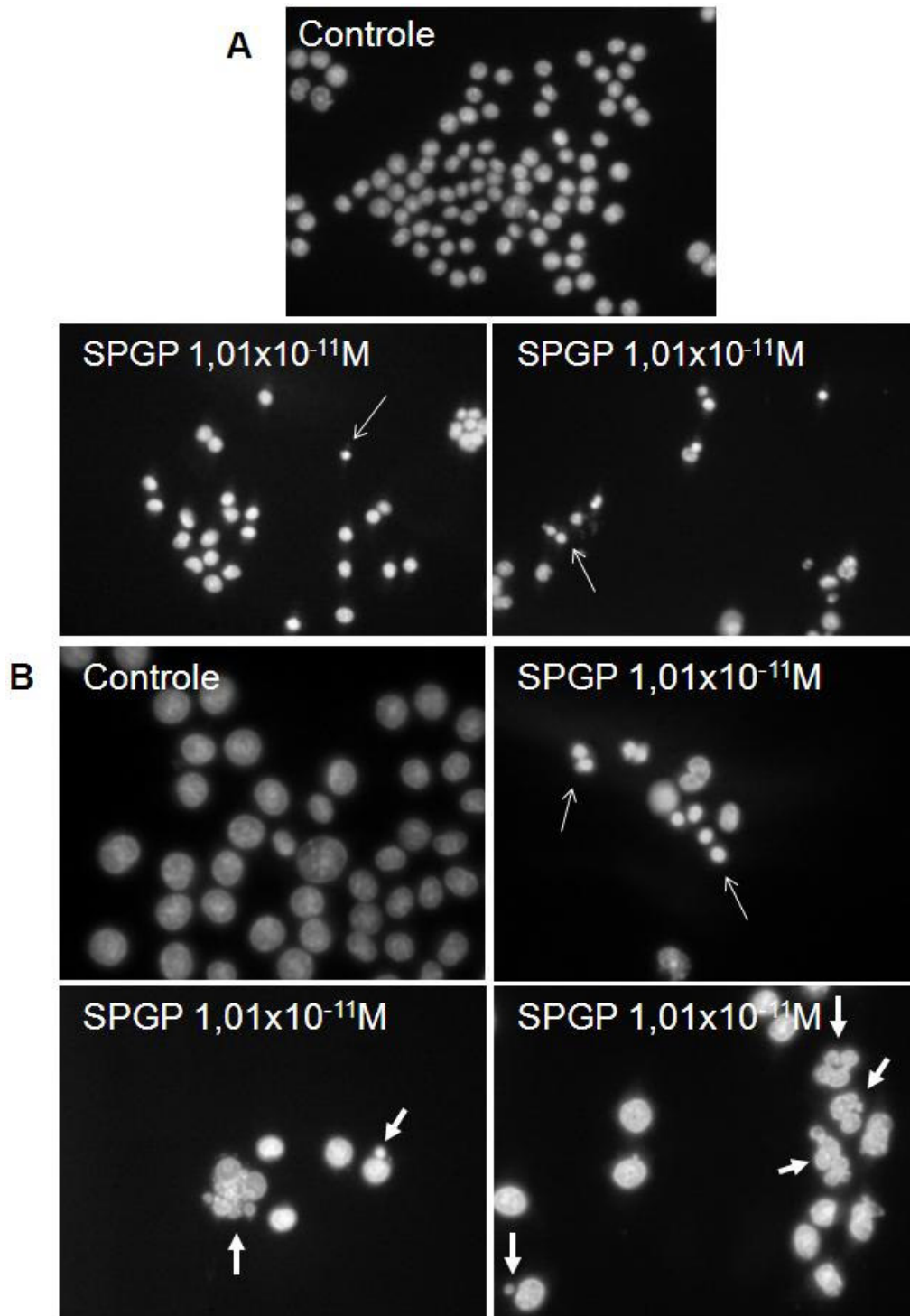


FIG.41: Análise do DNA cromossomal de células CAE coradas com DAPI, após 48 horas de tratamento com SPGP (1,01x10⁻¹¹M). A) aumento de 200x; B) aumento de 400x. Setas finas indicam condensação da cromatina e setas grossas indicam corpos apoptóticos.

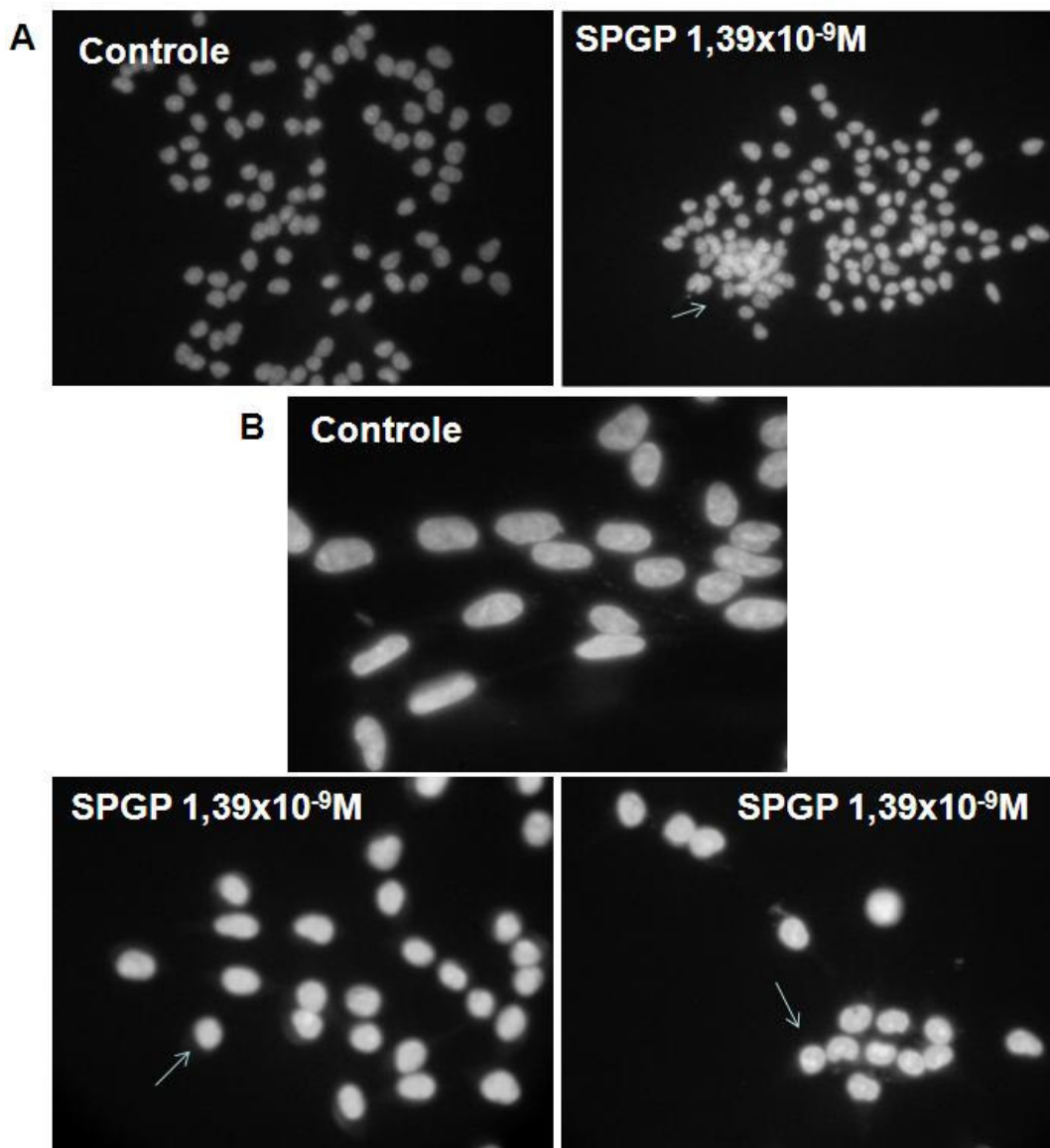


FIG.42: Análise do DNA cromossomal de células T98 coradas com DAPI, após 48 horas de tratamento com SPGP ($1,39 \times 10^{-9} \text{M}$). Não foi observada a formação de corpos apoptóticos, apesar da cromatina apresentar pontos de condensação (indicados pelas setas). A) aumento de 200x; B) aumento de 400x.

5.6. Síntese, avaliação da manutenção da atividade biológica e avaliação da pureza radioquímica da sonda radioativa de SPGP utilizando ^{125}I como radiotraçador

Com o objetivo de avaliar o perfil de biodistribuição e a capacidade de interação da SPGP com sítios de células tumorais *in vivo*, esta enzima foi radiomarcada com ^{125}I , de forma a se obter uma sonda radioativa. Assim como a radiomarcagem de moléculas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, a radioiodação consiste em um processo de marcação não isotópico. Por esse motivo a reação foi realizada de forma a permitir a incorporação do radioisótopo apenas em concentrações traço, o que reduz possíveis alterações estruturais e eleva a preservação da atividade biológica da molécula.

Da reação de radiomarcagem, obteve-se uma sonda radioativa de alta atividade específica ($1,375 \times 10^{13} \text{Bq/mmol}$) denominada [^{125}I]SPGP, a qual foi avaliada quanto a sua pureza radioquímica, integridade estrutural e atividade biológica. A avaliação da pureza radioquímica por cromatografia em papel Whatman nº1, mostrou que o rendimento da reação foi de 85% e a porcentagem de recuperação da [^{125}I]SPGP após sua lavagem na resina cromatográfica DOWEX, foi de 99%.

A integridade estrutural da molécula radiomarcada foi confirmada por cromatografia em sistema HPLC. Os perfis cromatográficos encontrados foram os mesmos para SPGP nativa (FIG.43A) e radiomarcada (FIG.43B), sendo ambas eluídas a 48% de ACN, em um pico simétrico, assim como ocorreu durante o processo de purificação desta enzima.

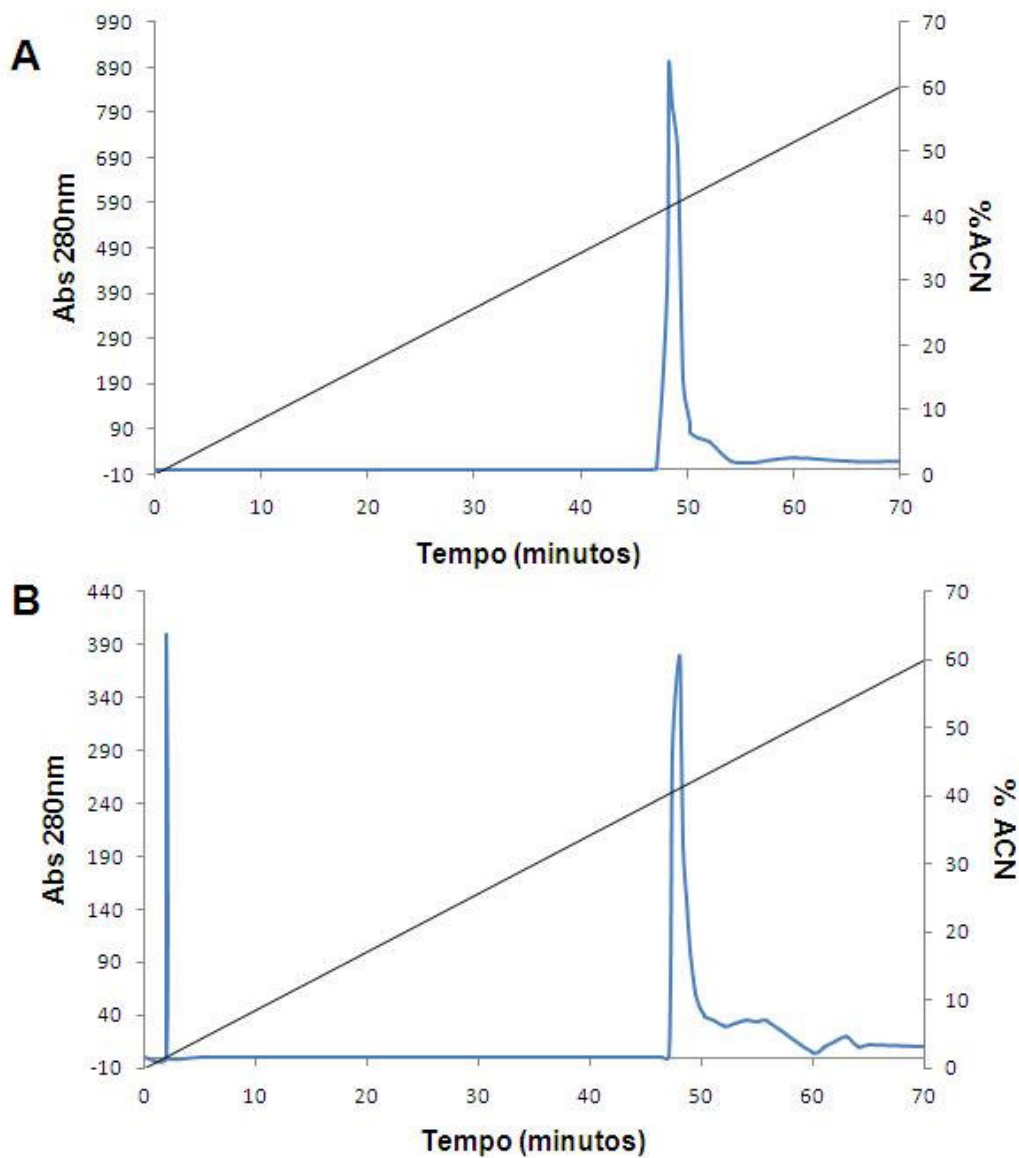


FIG.43: Controle de qualidade da [125I]SPGP: avaliação da integridade estrutural. Perfil cromatográfico obtido em Coluna de fase reversa C18 (Supelco, 0,46 x 25cm) equilibrada com solução de 0,1% de TFA em água. A cromatografia foi desenvolvida usando um gradiente linear de 0 a 60% de acetonitrila contendo 0,1% de TFA a 23°C, com fluxo de 1,2ml/min. O conteúdo protéico do eluato foi estimado pela absorbância a 280nm. A) Perfil da SPGP nativa. B) Perfil da [125I]SPGP. Ambas as moléculas foram eluídas da coluna com o mesmo perfil e mesmo tempo de retenção, o que mostra a integridade estrutural da molécula radiomarcada.

A avaliação da manutenção da atividade biológica da SPGP foi realizado através de eletroforese em gel de poliacrilamida com substrato protéico (gelatina) copolimerizado (zimografia), segundo item 5.6. O resultado obtido demonstraram que a e $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ manteve seu padrão de migração e sua atividade biológica, o que permitiu sua utilização nos experimentos de biodistribuição e detecção *in vivo* de sítios tumorais (FIG.44).

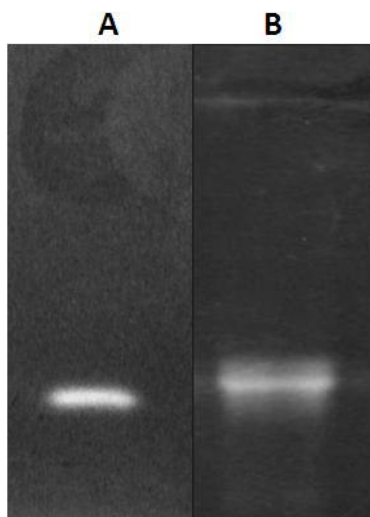


FIG.44: Avaliação da manutenção da atividade biológica da SPGP após reação de radioiodação. O zimograma em detalhe mostra a atividade gelatinolítica (A) da SPGP nativa (5µg) e (B) da $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ (~5µg). O gel mostra que a $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ manteve seu padrão de migração e sua atividade biológica, o que permitiu sua utilização nos experimentos de biodistribuição e detecção *in vivo* de sítios tumorais.

Para verificar a pureza radioquímica da $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$, foram realizadas análises comparativas *in vivo* entre seu perfil de biodistribuição e o possível contaminante gerado na reação de radiomarcção (Na^{125}I). Para tal, camundongos Swiss fêmeas foram injetados via endovenosa caudal com $16,67 \times 10^3 \text{Bq}$ de $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ e Na^{125}I e dissecados para avaliação da radioatividade captada em cada órgão. Os resultados são apresentados na FIG.45 e demonstram que $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ e Na^{125}I apresentam perfis completamente distintos de biodistribuição. Também a elevada captação de Na^{125}I pela tireóide, como mencionado anteriormente, pode ser um indicador da pureza radioquímica, devido a sua já estabelecida afinidade por essas moléculas. Nos experimentos, o contaminante foi consideravelmente captado pela tireóide, o que não ocorreu com a $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$. Os dados

acima expostos confirmam a boa qualidade e a adequação deste radiofármaco sintetizados como ferramenta para estudos de biodistribuição *in vivo*.

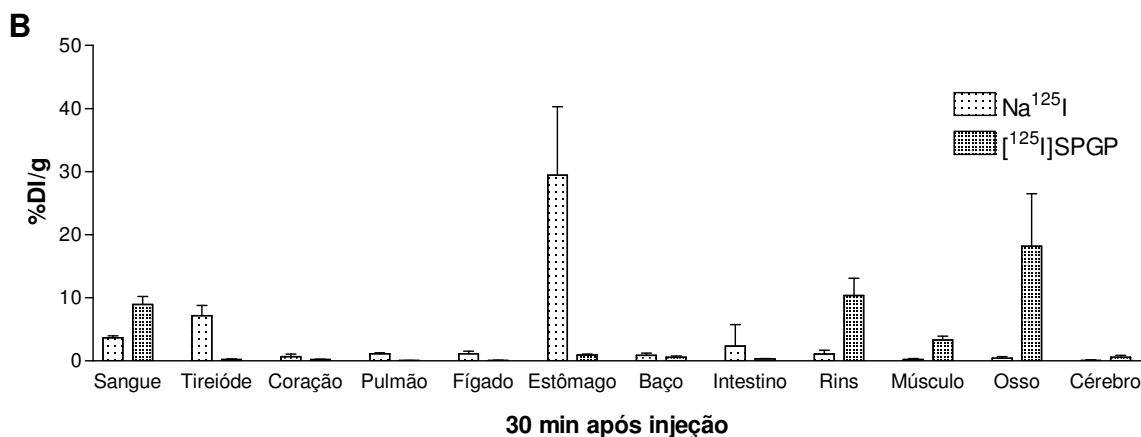


FIG.45: Verificação *in vivo* da pureza radioquímica da $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$. Comparação dos perfis de biodistribuição da molécula radiomarcada e do possível contaminante presente (Na^{125}I) após 30 minutos da injeção. Perfil de biodistribuição da $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ e do Na^{125}I . A distinção entre os perfis de biodistribuição dos contaminantes e da molécula radiomarcada confirma sua pureza.

5.7. Determinação dos parâmetros farmacocinéticos e avaliação da interação *in vivo* da $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$: Biodistribuição em animais com Tumor de Ehrlich

Estudos da cinética de biodistribuição também foram realizados com a sonda radioativa $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ (Tabela 4). A concentração desta molécula no sangue se manteve alta até o tempo de 360 minutos ($5,14 \pm 0,89\% \text{DI/g}$), se tornando desprezível apenas 24 horas após a injeção ($0,39 \pm 0,01\% \text{DI/g}$). O $T_{1/2}$ no sangue foi de $47,88 \pm 2,79 \text{min}$, com uma depuração plasmática de $0,02 \text{mL/min}$ e um volume de distribuição de $0,25 \text{mL/g}$. No coração e no fígado, a $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ apresentou-se em concentração significativa somente no tempo de 1 min, com subsequente redução em seus níveis. A baixa captação encontrada no cérebro e cerebelo indica que a SPGP, bem como a SPB, não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, provavelmente não exercendo ação direta sobre o Sistema Nervoso Central. Houve um acúmulo de $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ nos rins, com pico de captação no tempo de 30 minutos após injeção ($30,23 \pm 6,69\% \text{DI/g}$), o que sugere que, assim com a SPB, a SPGP é preferencialmente excretada por esse órgão. Apesar da alta

captação renal, 24 horas após a injeção a [¹²⁵I]SPGP já havia sido quase completamente eliminada (0,43±0,15%DI/g). Diferentemente da SPB, a [¹²⁵I]SPGP foi significativamente captada pelos ossos, e pâncreas.

A FIG.46 mostra a comparação da concentração da [¹²⁵I]SPGP na pata implantada com tumor de Ehrlich e na pata contralateral normal. Ao contrário da peçonha bruta, a SPGP foi significativamente captada pelo tumor já no tempo de 10 minutos após a injeção (Pata com tumor: 2,43±0,32%DI/g; Pata normal: 1,39±0,09%DI/g). Além disso, a concentração de [¹²⁵I]SPGP no tumor se manteve estável até 360 minutos após a injeção, e mesmo após 24 horas, uma concentração significativa da [¹²⁵I]SPGP ainda permanecia no tumor (0,68±0,1%DI/g).

Tabela 4: Cinética da biodistribuição da [¹²⁵I]SPGP (%DI/g), injetada via endovenosa, em animais com tumor de Ehrlich. (n=4; p<0,05).

Órgão	<i>Tempo após a injeção</i>						
	1 min.	10min.	30min.	60min.	180min.	360min.	1440min.
Sangue	16,29± 3,99	11,74± 2,58	8,92± 1,31	5,97± 2,55	5,52±0,98	5,14±0,89	0,39±0,01
Tireóide	0,02±0,00	0,01±0,01	0,21±0,01	0,27±0,13	0,15±0,12	0,10±0,01	0,09±0,01
Coração	2,16±0,68	0,33±0,06	0,19±0,1	0,28±0,14	0,30±0,16	0,15±0,02	0,046±0,01
Pulmão	2,24±1,03	0,62±0,03	0,08±0,01	0,09±0,03	0,10±0,01	0,33±0,15	0,17±0,02
Fígado	1,85±0,163	0,22±0,01	0,11±0,03	0,24±0,09	0,53±0,048	0,07±0,04	0,05±0,01
Baço	0,84±0,12	1,01±0,16	0,59±0,16	0,79±0,13	0,62±0,15	0,35±0,08	0,02±0,01
Pâncreas	11,42±9,6	5,81±0,68	2,59±1,41	2,35±0,61	2,76±1,66	2,30±0,07	0,05±0,01
Rins	2,02±0,79	30,23±6,69	10,39±2,72	7,72±0,45	8,59±1,02	5,03±0,03	0,43±0,15
Estômago	0,67±0,04	2,82±0,05	0,96±0,12	0,88±0,28	0,80±0,30	0,48±0,20	0,02±0,01
Intestino	0,53±0,26	0,47±0,12	0,91±0,07	0,87±0,56	0,56±0,08	0,26±0,11	0,02±0,01
Ossos	0,60±0,08	15,09±3,31	18,20±8,30	11,13±7,43	5,22± 1,42	3,38±1,25	0,02±0,01
Músculo	0,39±0,08	3,57±1,11	3,32±0,61	3,87±0,31	1,44±0,72	1,26±0,07	0,01±0,00
Útero/Ovário	1,22±0,49	1,28±0,30	0,99±0,69	2,41±1,03	0,62±0,41	0,60±0,42	0,05±0,02
Bexiga	2,06±0,70	2,47±0,90	3,71±0,39	3,04±1,018	0,71±0,58	2,20±0,43	0,16±0,02
Cérebro	0,50±0,34	0,95±0,48	0,60±0,28	0,25±0,17	0,16±0,02	0,32±0,12	0,03±0,01
Cerebelo	0,62±0,33	0,80±0,28	0,51±0,069	0,72±0,17	0,68±0,31	0,34±0,37	0,04±0,01

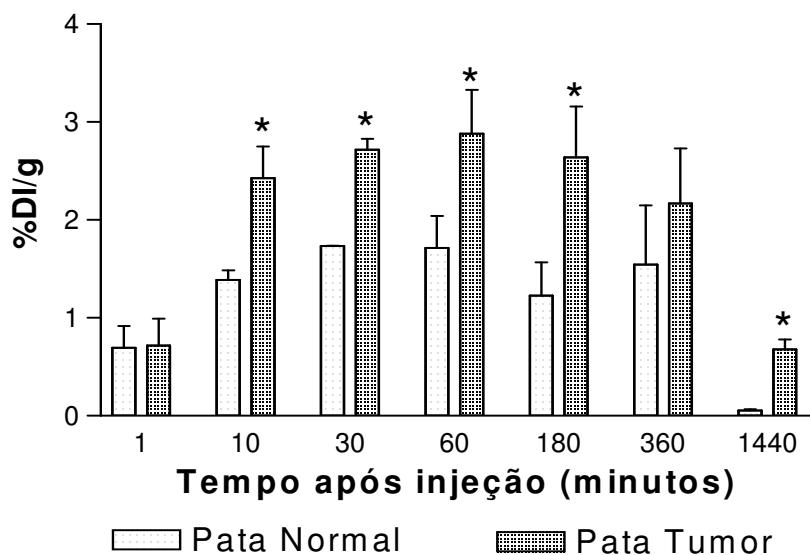


FIG.46: Comparação da captação da $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$, injetada via endovenosa, na pata implantada com tumor de Ehrlich e na pata sem tumor (pata normal), ao longo do tempo.

A concentração da $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ na região tumoral foi significativamente maior que na pata sem tumor, após 10, 30, 60, 180 e 1440 minutos após a injeção endovenosa caudal de $16,67 \times 10^3 \text{ Bq}$ da SPGP radiomarcada ($n=4$; $*p<0,05$).

IA Tabela 5 apresenta a proporção entre a quantidade de $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ presente no tumor e aquela presente no sangue e órgãos adjacentes ao tumor, 24 horas após a injeção endovenosa. As proporções são suficientemente altas para evitar a interferência de tecidos adjacentes na detecção tumoral, indicando que a molécula radiomarcada possui potencial para ser utilizada como molde para novos radiofármacos.

Tabela 5: Proporção entre a concentração de $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ no tumor e órgãos adjacentes, 24 horas após injeção endovenosa caudal

	<i>Tumor/Pata normal</i>	<i>Tumor/Sangue</i>	<i>Tumor/músculo</i>	<i>Tumor/Osso</i>
Proporção	12,81±0,15	1,83±0,01	67,69±0,11	33,85±0,22

Após verificação da capacidade de ligação da $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ ao sítio tumoral *in vivo*, quando administrada por via intravenosa, foram realizados estudos de biodistribuição com injeções administradas por via intratumoral, de forma a avaliar possíveis alterações

no perfil de biodistribuição e/ou interação com o tumor. Foram avaliados os tempos 10, 30 e 60 minutos pós-injeção. Os resultados da cinética de biodistribuição são mostrados na Tabela 6.

A via intratumoral alterou o perfil de biodistribuição da [¹²⁵I]SPGP, o que pode ser explicado pela alteração da biodisponibilidade desta molécula. Na via intravenosa, 100% da molécula administrada entra imediatamente na corrente sanguínea e fica disponível para distribuição pelos órgãos, enquanto na via intratumoral somente o que é extraído da região da aplicação se encontra disponível para distribuição.

Tabela 6: Cinética da biodistribuição da [125I]SPGP (%DI/g), injetada via intratumoral, em animais com tumor de Ehrlich (n=2; p<0,05).

Órgão	<i>Tempo após a injeção</i>		
	10 min	30min	60 min
Sangue	3,68±0,28	8,36±0,75	16,04±5,13
Tireóide	0,32±0,18	5,42±1,93	1,08±0,94
Coração	0,45±0,15	2,21±1,21	1,65±0,60
Pulmão	0,31±0,20	2,68±1,23	2,44±0,01
Fígado	0,57±0,52	1,27±0,36	2,61±1,66
Baço	3,19±02,17	1,47±0,97	1,07±0,49
Pâncreas	0,15±0,01	0,01±0,00	0,0±0,0
Rins	0,669±0,087	1,97±0,36	2,56±0,59
Estômago	1,79±1,51	5,29±0,80	7,07±3,15
Intestino	0,48±0,22	0,52±0,41	0,63±0,11
Ossos	0,19±0,06	0,30±0,20	0,96±0,75
Músculo	0,08±0,02	0,25±0,17	0,30±0,05
Útero/Ovário	0,05±0,04	0,12±0,016	0,41±0,15
Bexiga	0,40±0,03	0,31±0,26	0,51±0,15
Cérebro	0,06±0,02	0,12±0,02	0,25±0,06
Cerebelo	0,12±0,04	0,45±0,04	0,28±0,05

A concentração da [¹²⁵I]SPGP no sangue aumentou com o tempo, chegando a 16,04±5,13%DI/g no tempo de 60 minutos após a injeção. Também foram aumentadas

as concentrações desta molécula quando comparadas aos valores da biodistribuição via intravenosa, no coração e pulmão. A captação renal foi significativamente reduzida, passando de $10,39 \pm 2,72\% \text{DI/g}$ na via intravenosa para $2,56 \pm 0,59\% \text{DI/g}$ na administração intratumoral, no tempo de 60 minutos. Também a captação nos ossos foi drasticamente reduzida de $18,20 \pm 8,30\% \text{DI/g}$ (via intravenosa) para $0,96 \pm 0,75\% \text{DI/g}$ (via intratumoral), no tempo de 60 minutos após a injeção. A alteração da via de administração foi capaz de elevar os níveis de $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ na região tumoral e retardar a saída desta molécula do tumor, como mostra a FIG.47. Mesmo após 60 minutos da injeção, $75,50 \pm 10,54\% \text{DI/g}$ do radiofármaco permanecia no tumor.

Para avaliar se essa permanência se devia simplesmente a aplicação local da molécula, ou se havia uma afinidade real pelo tumor, animais com tumor de Ehrlich foram injetados via intratumoral com o possível contaminante do radiofármaco: o Na^{125}I . A FIG.48 mostra a comparação da concentração da $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ e do Na^{125}I na pata com tumor de Ehrlich, após 10, 30 e 60 minutos da injeção intratumoral. A concentração de Na^{125}I no tumor diminui consideravelmente ao longo do tempo enquanto a $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ permanece na região tumoral.

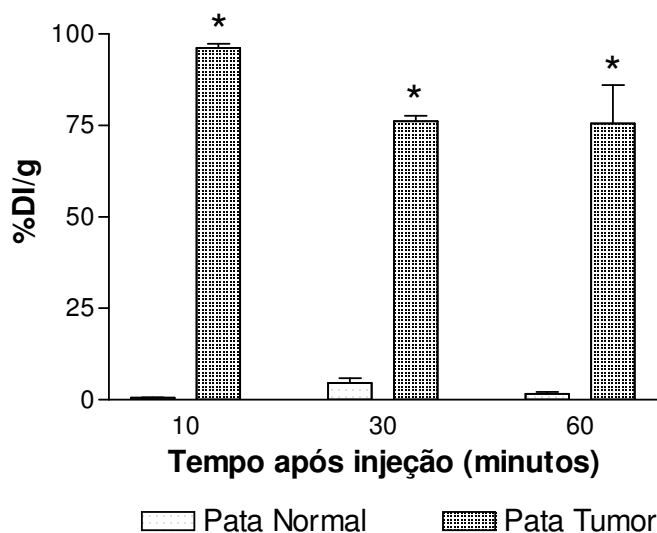


FIG.47: Comparação da captação de $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ na pata implantada com tumor de Ehrlich e na pata sem tumor (pata normal), quando administrada por via intratumoral. A concentração da $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ na região tumoral foi significativamente maior que na pata sem

tumor, em todos os tempos pós-injeção analisados, após injeção intratumoral de $16,67 \times 10^3$ Bq da SPGP radiomarcada ($n=2$; $*p<0,05$).

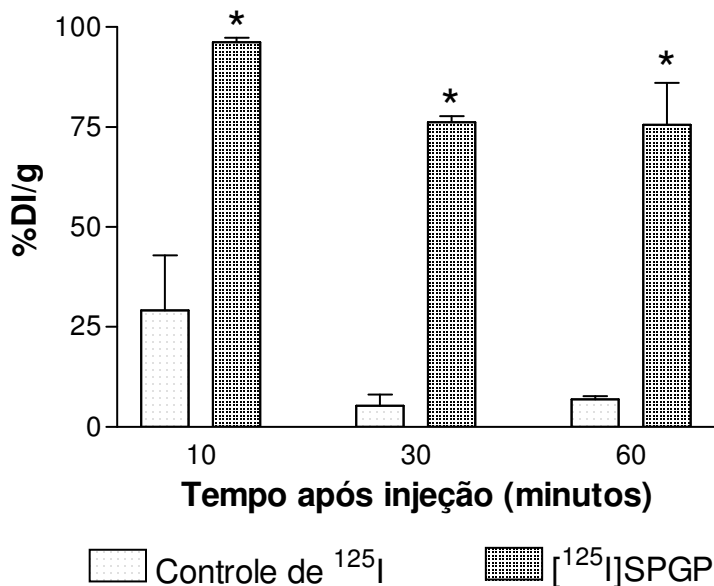


FIG.48: Comparação da captação de $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ e do Na^{125}I na pata com tumor de Ehrlich, após injeção intratumoral. A concentração de Na^{125}I na região tumoral diminui consideravelmente ao longo do tempo enquanto a $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ permanece na região tumoral. ($n=2$; $*p<0,05$).

A injeção intraplantar de células de tumor ascítico de Ehrlich e o crescimento tumoral ao longo dos dias pós-implante obstruem vasos sanguíneos e levam ao aparecimento de edema na região do tumor. Desta forma para verificar a especificidade de uma nova droga pelas células tumorais é preciso garantir que ela não se mantenha na região do tumor devido ao edema gerado por ele. Simulações em modelos animais com edema também permitem o estudo da detecção diferencial entre sítios tumorais e sítios inflamatórios, o que é importante no caso do desenvolvimento de novas drogas para diagnóstico por imagem.

Para verificar se a permanência da SPGP na região tumoral, quando injetada por via intratumoral, se devia a sua especificidade pelas células tumorais ou ao edema, foram realizados estudos de biodistribuição da $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ em animais com edema, injetados via intraedema.

Os resultados demonstraram que a concentração da $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ diminuiu consideravelmente ao longo do tempo no edema, enquanto permaneceu estável na região do tumor, o que indica o potencial uso desta molécula para detecção diferencial de sítios tumorais (FIG.49).

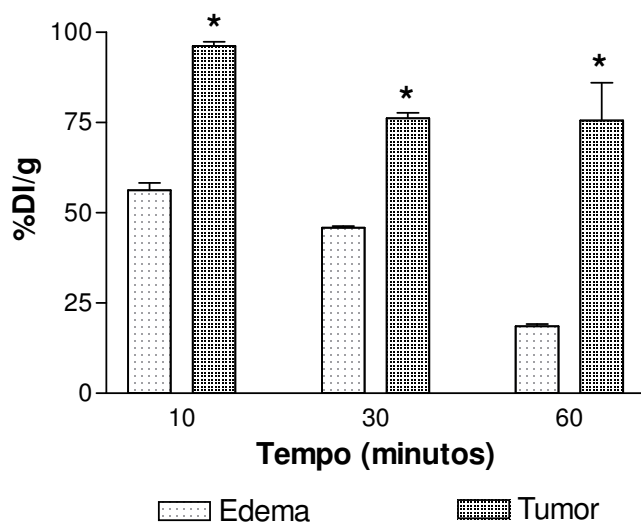


FIG.49: Comparação da captação de $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ na pata com edema e na pata com tumor de Ehrlich, com injeções administradas por via intraedema e intratumoral. A concentração de $[^{125}\text{I}]\text{SPGP}$ diminuiu consideravelmente ao longo do tempo na região do edema enquanto permaneceu estável na região tumoral. (n=2; *p<0,05).

5.8. Avaliação da toxicidade aguda da SPB e SPGP produzida pela dose administrada para experimentos de biodistribuição

Para avaliar os possíveis efeitos tóxicos da administração da SPB e da SPGP ao organismo, foram realizados estudos hematológicos e histopatológicos, em camundongos injetados via endovenosa com uma dose de SPB e SPGP dez vezes maior que a dose utilizada nos experimentos de biodistribuição (3 μg de SPB e 0,3 μg de SPGP).

As análises hematológicas foram realizadas através de hemograma e das amostras foram avaliados o conteúdo de Proteína Plasmáticas Totais (PPT), a concentração de hemácias

e os índices hematimétricos: seu tamanho (VCM– volume corpuscular médio), cor (HCM– hemoglobina corpuscular média e CHCM– concentração de hemoglobina corpuscular média) e variações de diâmetro (RDW – cell distribution width), todos parâmetros relacionados à presença de anemia. Também foram dosadas hemoglobina, leucócitos totais, mielócitos, metamielócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos.

A Tabela 7 trás os valores de referência dos parâmetros avaliados no eritograma e leucograma, para um camundongo adulto (Jain, 1993).

Tabela 7: Valores de referência em análises hematológicas de camundongos adultos.

<i>ERITOGRAMA</i>	
Hemoglobina (g/dL)	10,1 – 16,1
Hemácias ($\times 10^6$ céls/ μ L)	6,5 – 10,1
VCM (fL)	42,3 – 55,9
CHCM (g/dL)	29,5 – 35,1
HCM (g/dL)	13,7 – 18,1
RDW (%)	11 - 16

<i>LEUCOGRAMA (céls/μL)</i>	
Leucócitos totais	2610 – 10050
Mielócitos	0
Metamielócitos	0
Neutrófilos bastonetes	0
Neutrófilos segmentados	400 – 2000
Eosinófilos	0 – 170
Basófilos	Raros
Linfócitos	1270 - 8440
Monócitos	0 - 290

As análises realizadas mostraram que o número, a forma e a cor das hemácias permaneceram normais após o tratamento com SPB e SPGP, assim como as concentrações de hemoglobina e demonstraram que a administração destas substâncias

não gerou anemia, hemólise ou eritrocitose (redução no número de hemácias). Os resultados são mostrados na FIG.50.

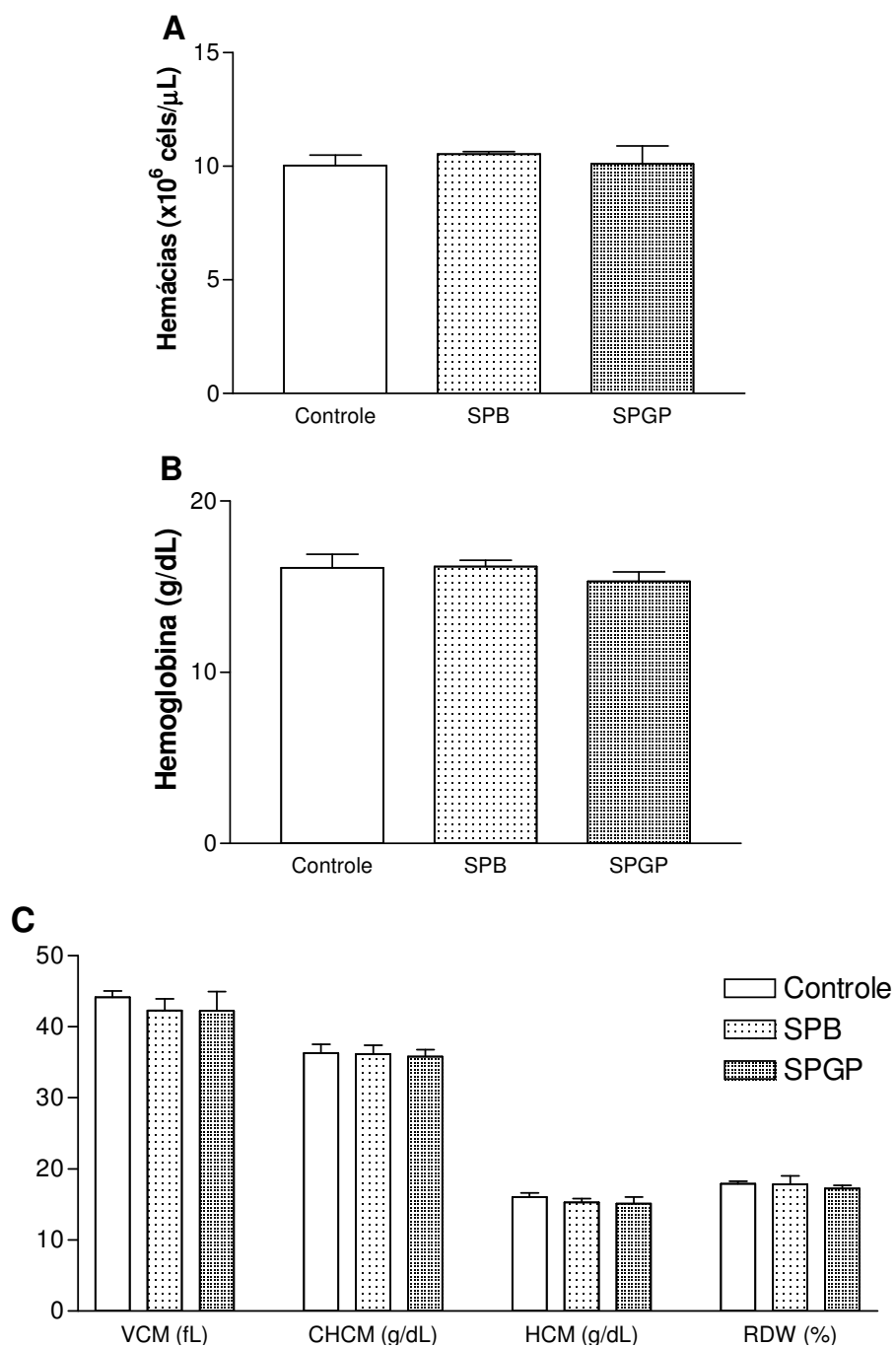


FIG.50: Análise das alterações hematológicas, nas células da série vermelha, geradas pela administração de SPB e SPGP, em uma dose 10 vezes maior que a dose utilizada em experimentos de biodistribuição. (A) Contagem de hemácias dos animais controle e tratados

com SPB e SPGP. (B) Concentração da hemoglobina nas amostras analisadas. (C) Valores dos índices hematimétricos. Nenhum dos parâmetros avaliados foi significativamente alterado pelos tratamentos com SPB e SPGP. (n=3) (p<0,05).

Os níveis de leucócitos totais, monócitos e linfócitos apresentaram-se normais tanto no grupo controle quanto nos animais tratados com SPB e SPGP (FIG.51A). Também o número de neutrófilos segmentados se manteve dentro dos níveis normais estabelecidos para camundongos (400-2000), e não foram encontrados mielócitos, metamielócitos e neutrófilos bastonetes. A ausência destas células na circulação sanguínea e a manutenção do número global de leucócitos, monócitos e linfócitos são um indicativo de que não houve efeitos tóxicos depressores na medula óssea, nem o desencadeamento de mecanismos de defesa. Eosinófilos e basófilos, responsáveis pelas reações alérgicas, também não foram evidenciados em nenhuma das amostras avaliadas (FIG.51B).

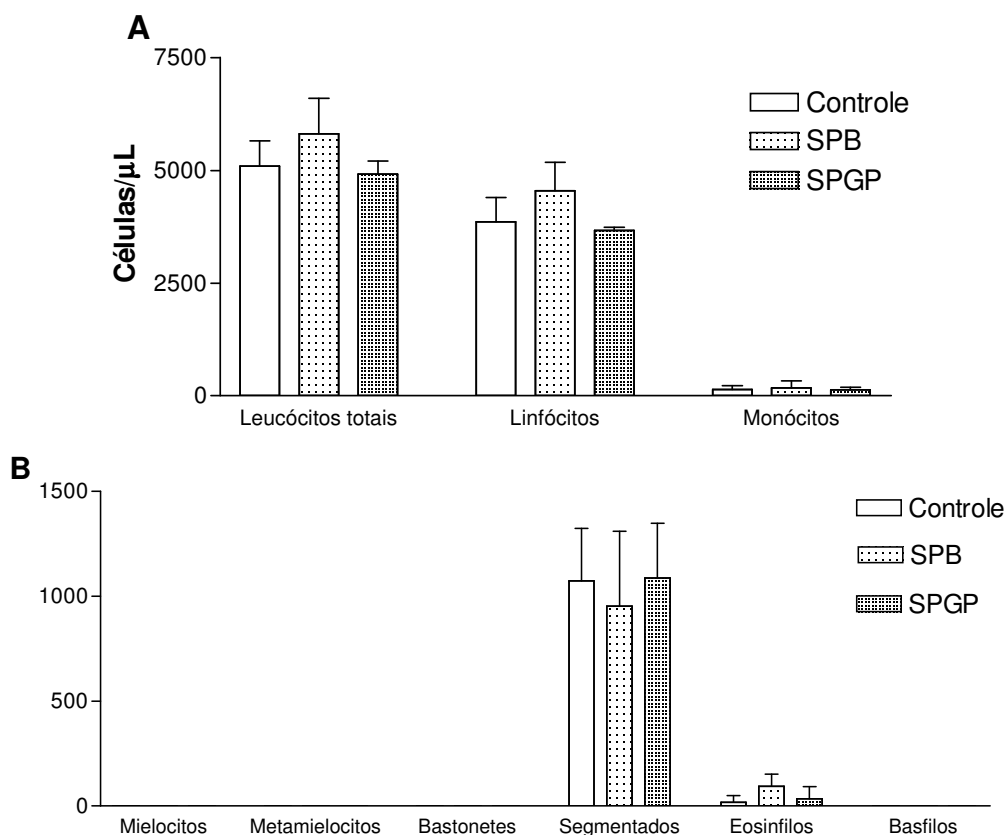


FIG.51: Análise das alterações hematológicas, nas células da série branca, geradas pela administração de SPB e SPGP, em uma dose 10 vezes maior que a dose utilizada em experimentos de biodistribuição. (A) Contagem do número de leucócitos totais, monócitos e linfócitos dos animais controle e tratados com SPB e SPGP. (B) Contagem de mielócitos,

metamielócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, eosinófilos e basófilos. Os níveis de todos os tipos celulares avaliados permaneceu normal nos grupos tratados. (n=3) ($p < 0,05$).

A FIG.52 trás os valores de PPT (FIG.54A) e plaquetas (FIG.54B), e demonstra que o tratamento dos animais com SPB e SPGP não alterou os índices de PPT nem reduziu significativamente o número de plaquetas encontradas no sangue.

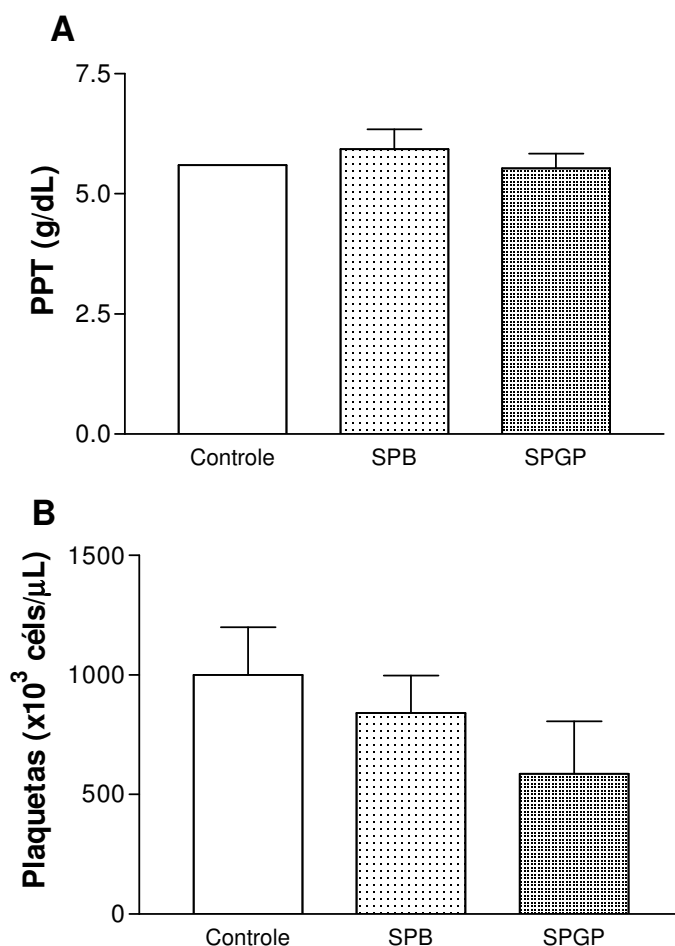


FIG.52: Análise das Proteínas Plasmáticas Totais (PPT) e plaquetas em animais tratados com SPB e SPGP. O tratamento não alterou as concentrações de PPT e plaquetas no sangue dos animais. (n=3) ($p < 0,05$).

As análises histológicas dos órgãos de camundongos injetados com 3 μ g de SPB e 0,3 μ g de SPGP realizadas mostraram que nenhuma alteração histopatológica aparente foi

encontrada nos rins, fígado, cérebro e coração, em ambos os tratamentos (FIG.53 e 54). O pulmão de todos os animais, inclusive controle, apresentou leve dilatação dos alvéolos pulmonares, indicando um início de enfisema pulmonar. Como esta alteração ocorreu também no grupo de camundongos controle é possível que seja resultado de estresse, ou mesmo da forma de sacrifício empregada (FIG.55).

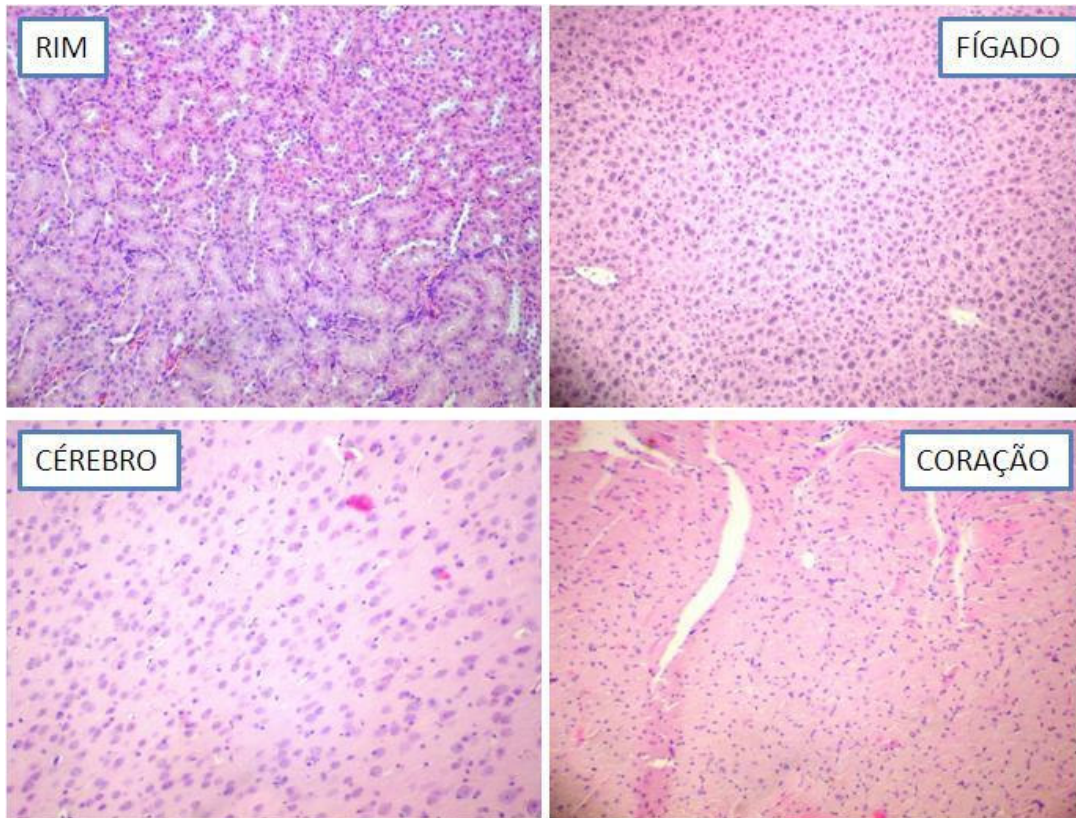


FIG.53: Fotomicrografia do rim, fígado, cérebro e coração de um animal representativo do grupo tratado com 3µg de SPB, por 24 horas. Não foi observada nenhuma alteração morfológica aparente nos órgãos avaliados. Coloração H.E. Foto adquirida em MO, aumento de 200x.

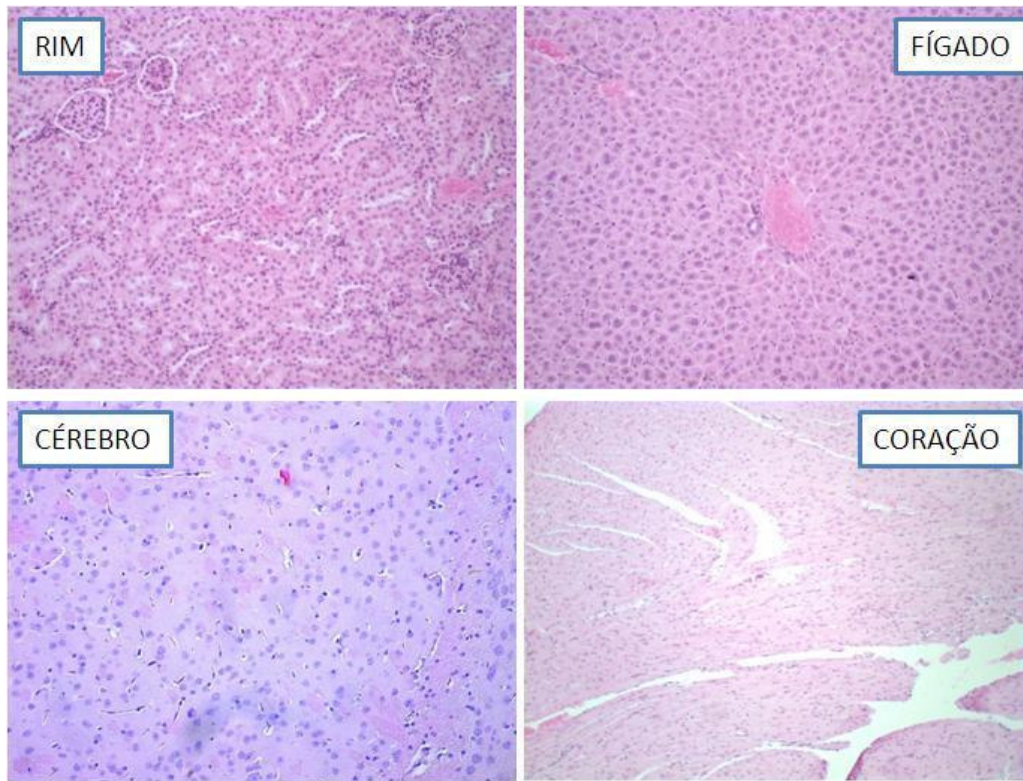


FIG.54: Fotomicrografia do rim, fígado, cérebro e coração de um animal representativo do grupo tratado com 0,3µg de SPGP, por 24 horas. Não foi observada nenhuma alteração morfológica aparente nos órgãos avaliados. Coloração H.E. Foto adquirida em MO, aumento de 200x.

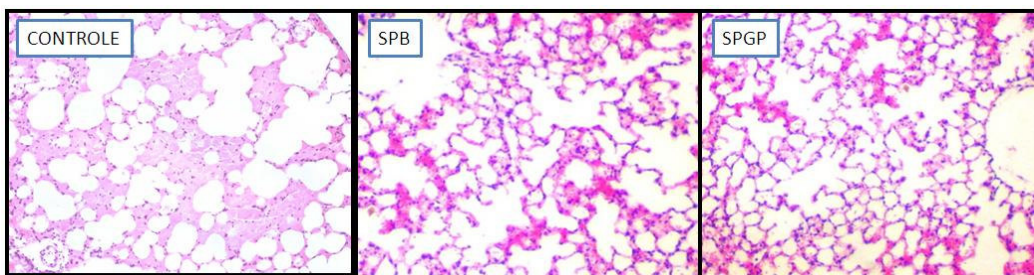


FIG.55: Fotomicrografia do pulmão de animais representativos dos grupos A) Controle, B) tratado com 3µg de SPB, C) tratado com 0,3 µg de SPGP por, por 24 horas. Em todos os grupos foi observada a presença de leve dilatação dos alvéolos pulmonares. Coloração H.E. Foto adquirida em MO, aumento de 200x.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O câncer é a segunda causa de morte na maioria dos países do mundo, ficando atrás apenas das mortes por problemas cardiovasculares. A Organização Mundial de Saúde estima que 12,5% de todas as mortes no mundo sejam consequência do câncer, sendo mais de 11 milhões de novos casos descobertos todos os anos.

Para que o tratamento seja eficiente, é crucial que o diagnóstico seja realizado ainda nos estágios iniciais da doença. Mas apesar dos esforços atuais para redução dos casos fatais de câncer, a falta de fármacos capazes de detectar pequenas regiões potencialmente neoplásicas e a inespecificidade dos quimioterápicos disponíveis levam a maioria dos casos da doença a serem diagnosticados em estágios tardios, o que reduz as chances de cura total (OMS, 2006; Reubi *et al.*, 2007).

Uma droga eficiente no tratamento de tumores deve ser citotóxica para as células tumorais, sem causar danos excessivos às células normais (Vorherr, 1984). Tem sido um desafio para físicos, químicos e biólogos identificar e sintetizar essa molécula única, capaz de localizar e combater especifica e seletivamente células tumorais, ainda nos estágios iniciais de desenvolvimento.

Pesquisas realizadas com peçonhas animais (tais como de serpentes, aranhas, abelhas e escorpiões) têm demonstrado que essas substâncias possuem alta toxicidade para células tumorais e baixa toxicidade sobre culturas de tecidos normais (Balasubashini *et al.*, 2006). Diversos autores têm reportado ainda que a administração de doses subletais de peçonha em camundongos implantados com tumor é capaz de reduzir o crescimento tumoral sem gerar danos aos tecidos normais. Geralmente tal atividade está associada à porção protéica destas peçonhas (Mayer, 1999; Abu-Sinna *et al.*, 2003).

Enquanto peçonhas de animais terrestres têm sido bastante exploradas, os peixes venenosos têm sido ignorados nas pesquisas pela busca de substâncias com potencial terapêutico (Smith & Wheeler, 2006). Na verdade, menos de 8% das toxinas estudadas pertencem a peixes venenosos (Church & Hodgson, 2002). Essa deficiência é em parte devida à falta de estimativas reais do número e diversidade das espécies de peixes

venenosos, e em parte devida à dificuldade de captura destes animais para obtenção das peçonhas (Haddad Jr. *et al.*, 2003).

O peixe-escorpião *Scorpaena plumieri* é o peixe mais venenoso do Oceano Atlântico. Ele pertence à família Scorpaenidae, a qual é incluídos os peixes-pedra (*Synanceia verrucosa*) e os peixes-leão (*Pterois volitans*), entre outros (Church & Hodgson, 2002; Carrijo *et al.*, 2005). O veneno dos Scorpaenidae contém uma mistura de proteínas, em sua maioria consideradas lábeis, e geralmente apresentam propriedades fisiofarmacológicas em comum tais como hipotensão, hemólise e citotoxicidade (Aunstin *et al.* 1961; Carrijo *et al.*, 2005). Quase não existem informações sobre as propriedades farmacológicas e terapêuticas da peçonha do peixe-escorpião uma vez que a maior parte dos estudos com peçonhas de peixe têm se concentrado nos peixes-leão (*Pterois volitans*) e peixes-pedra (Garnier *et al.*, 1995). Na verdade, os dados descritos na literatura para *S. plumieri* são limitados ao estudo clínico e epidemiológico dos envenenamentos (Haddad Jr. *et al.*, 2003), a uma caracterização inicial das propriedades biológicas de sua peçonha e à purificação de uma enzima com atividade gelatinolítica a partir desta peçonha (Carrijo *et al.*, 2005).

Desta forma, o presente estudo representa uma investigação pioneira das possíveis propriedades antitumorais desta peçonha, bem como da única enzima purificada a partir dela. Também a radiomarcagem e biodistribuição destas substâncias, bem como a avaliação de seu potencial uso na detecção *in vivo* de tumores foram estudados pela primeira vez neste trabalho.

6.1. Avaliação da citotoxicidade *in vitro* da SPB e SPGP

Culturas de células tumorais têm se mostrado um excelente modelo para desenvolvimento de experimentos *in vitro* que objetivem avaliar alterações de crescimento e proliferação celular, bem como estabelecer os mecanismos pelos quais ocorrem tais alterações (Correa *et al.*, 2002).

Atividade antitumoral *in vitro* de peçonhas de peixe foi anteriormente relatada para o peixe-leão *Pterois volitans*, a qual induz apoptose seletivamente em células de câncer.

Os experimentos de citotoxicidade mostraram que a SPB foi significativamente mais citotóxica para células RT2 e CAE que para células T98. O mesmo ocorreu para SPGP, a qual foi menos citotóxica para células T98. Apesar disso, os valores de DL₅₀ mostraram que esse polipeptídeo foi significativamente mais citotóxico que a cisplatina, um agente quimioterápico clinicamente utilizado para o tratamento de tumores. A Tabela 8 trás uma comparação dos valores de DL₅₀ obtidos para essas duas substâncias e para cisplatina.

Tabela 8: Comparação dos valores de DL₅₀ em células RT, CAE e T98 quando tratadas com SPB, SPGP e cisplatina

<i>Linhagem</i>	<i>Valor da DL₅₀</i>		
	SPB (µg/mL)	SPGP (Molar)	Cisplatina (Molar)
RT2	3,90±0,98	8,80x10 ⁻¹² ±2,94x10 ⁻¹²	1,65x10 ⁻⁵ ± 0,14x10 ⁻⁵
CAE	14,05±2,95	1,22x10 ⁻¹¹ ±6,56x10 ⁻¹²	5,12x10 ⁻⁷ ±1,33x10 ⁻⁷
T98	> 125	>1,39x10 ⁻⁹	5,31x10 ⁻⁶ ±1,94x10 ⁻⁶

Vários autores têm relatado que peptídeos de peçonhas animais têm demonstrado em experimentos *in vitro*, que desempenham importantes papéis na regulação de diversos tipos de câncer, sugerindo que o tratamento em longo prazo, com o peptídeo adequado, ou moléculas análogas, podem reduzir, ou mesmo bloquear o crescimento tumoral (Reubi *et al*, 2007). Balasubashini *et al.*, (2006), relataram a atividade antitumoral de um peptídeo purificado da peçonha do peixe-leão *Pterois volitans*, o qual foi capaz de reduzir o crescimento tumoral *in vivo* em camundongos implantados com tumor ascítico de Ehrlich.

O acompanhamento das alterações morfológicas nas linhagens celulares pelo tratamento com SPB e SPGP, e os experimentos de coloração com DAPI evidenciaram alterações observadas quando a ação citotóxica do tratamento desencadeia a morte células por apoptose. Mesmo na linhagem celular mais resistente aos tratamentos, a T98, foi possível tais alterações morfológicas, mas com menor intensidade.

Wang & Ji (2005) em seus trabalhos com a peçonha bruta do escorpião *Buthus martensii* relatou apoptose em células de glioblastoma murino, após tratamento das células com 10 µg/mL desta peçonha. A apoptose foi observada por coloração com DAPI, e após 40 horas de tratamento, 63,08% das células estavam em processo de apoptose. Também Debnath e colaboradores (2007) relataram que a peçonha da serpente *Naja kaouthia* induziu alterações morfológicas características da apoptose em células de CAE. A peçonha do escorpião branco *Heterometrus bengalensis* foi citotóxica e apoptogênica para células humanas leucêmicas, com uma DL₅₀ de 41,5µg/mL para células U937 e 88,3 µg/mL para células K562 (após 48 horas de tratamento) (Gupta *et al.*, 2007).

A SPGP é uma enzima proteolítica, com atividade sobre substrato de gelatina, a qual foi caracterizada como uma metaloprotease. As metaloproteases contém em sua estrutura um íon importante para sua atividade catalítica (Rawlings & Barrett, 1995), e dentro desta família estão incluídas as gelatinases, as quais são metaloendopeptidases específicas para a gelatina, atuam em pH neutro e têm pouca atividade sobre outros substratos, como a caseína e a hemoglobina (Almeida, 2000). A capacidade de metaloproteases de desencadear o processo de morte celular por apoptose já foi anteriormente descrito. A haliase, uma metaloprotease isolada do veneno da cobra *Gloydius halys* induz apoptose em células endoteliais. Ela é capaz de hidrolisar componentes da matriz extracelular tais como fibronectina e colágeno, como também impede a interação de diferentes integrinas com a matriz. O mecanismo elucidado para ação de tal enzima deixa clara sua estreita relação com a ativação da caspase-3 e uma redução nos níveis de Bcl2 e Bax, uma cascata que leva a apoptose através da ativação da via extrínseca (You *et al.*, 2003). Trummal *et al.* (2005), também isolaram da peçonha da cobra *Vipera labetina* uma metaloprotease indutora de apoptose. Essa molécula mostrou a capacidade de desencadear a apoptose em células endoteliais HUVEC. O mecanismo de ação pelo qual ocorre ainda precisa ser estudado.

Durante os últimos 15 anos, o interesse da ciência clínica e básica na influência da morte celular programada sobre a sensibilidade de tumores tem crescido dramaticamente (Brown & Wouters, 1999). Atualmente se aceita que a morte celular após danos no DNA por agentes anticâncer é primariamente resultado da apoptose, e que células que por algum motivo são capazes de evitá-la se tornam resistentes. A

necessidade da presença do gene *P53* selvagem para o desencadeamento da apoptose após danos genotóxicos por tais agentes, incluindo a radiação ionizante e substâncias de origem natural, tem sido claramente demonstrada, principalmente em células transformadas de roedores (Lowe *et al.*, 1993; Komarova *et al.*, 1997).

Se o mecanismo de ação citotóxico da SPB e SPGP ocorre através do desencadeamento da apoptose, a resistência das células T98 e maior sensibilidade de RT2 e CAE a essas substâncias podem estar relacionadas justamente ao status do gene *P53* de cada uma destas linhagens. Células RT2 e CAE possuem o gene *p53* selvagem (regulado normalmente) enquanto células T98 são mutantes para tal gene, o que permitiria uma resistência a apoptose nestas células.

Mas, apesar de sua maior resistência, as células T98 apresentaram as alterações morfológicas características do início da apoptose. Igney e Krammer (2002), argumentam que mesmo com todas as evidências da necessidade do gene *P53* selvagem para o desencadeamento da apoptose, alguns estudos vêm reunindo indicações de que existem rotas alternativas que levam as células a morte por apoptose mesmo quando elas não possuem o gene *P53* funcionando corretamente. Esses resultados aparecem quando as células são expostas por maior período ou a maiores concentrações às drogas (Brown & Wouters, 1999;). É necessário então que se realizem novos testes com células T98, elevando seu tempo de exposição à SPB e SPGP, e elevando as concentrações destas substâncias.

Outros testes devem ser realizados para determinar com maior precisão o mecanismo pelo qual se dá o efeito citotóxico da SPB e SPGP, tais como citometria de fluxo, coloração com anexina/PI, testes para detecção de caspases, etc.

6.2. Obtenção de sondas radioativa de SPB e SPGP para estudos de biodistribuição e imagem

A determinação dos parâmetros farmacocinéticos e da toxicologia são aspectos muito importantes durante a pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos. Estudos de distribuição, concentração, função e localização de uma determinada molécula são

fundamentais para entender seu papel biológico e elucidar seus potenciais usos para tratamento dos mais diversos distúrbios. Para realizar tais estudos, utilizam-se versões destas moléculas ligadas a uma substância capaz de ser localizada. Na maioria das vezes essa substância é um átomo radioativo. Os radionuclídeos mais utilizados são o iodo-125 e o tecnécio-99m.

Neste trabalho sondas radioativas foram sintetizadas com alta eficiência (75-85% de rendimento) e atividade específica bastante satisfatória, ($[^{99m}\text{Tc}] \text{SPB} = 0,352 \times 10^9 \text{Bq/mg}$ / $[^{125}\text{I}] \text{SPGP} = 375 \times 10^{13} \text{Bq/mmol}$) na mesma ordem de grandeza de moléculas radiomarcadas comerciais. Após as reações de síntese tanto a SPB quanto a SPGP continuaram biologicamente ativas, o que permitiu sua utilização nos experimentos de biodistribuição

A administração de doses dez vezes maiores que as doses utilizadas nos experimentos de biodistribuição não gerou alterações hematológicas significativas e nem alterações morfológicas visíveis. O aparecimento de uma dilatação dos alvéolos pulmonares pode ser uma consequência do método de sacrifício empregado e uma ação das substâncias injetadas, uma vez que o controle também apresentou tal alteração. Segundo McInnes (2005), as alterações morfológicas observadas ao microscópio nem sempre estão relacionadas a uma patologia tecidual. Os métodos de sacrifício, bem como as condições anteriores à morte dos animais pode gerar tais alterações, as quais não são consequência direta da administração de uma droga. O aparecimento de dilatação alveolar geralmente está relacionado a algum tipo de estresse no momento do sacrifício. A guilhotina foi escolhida como método de sacrifício por ser rápida, não gerar alterações nos parâmetros hematológicos e permitir precisão nos tempos de sacrifício em experimentos de cinética de biodistribuição. Outros métodos de sacrifício, tais como doses elevadas de anestésicos, também podem gerar alterações hematológicas e teciduais, irritação das vias aéreas entre outros, o que pode ocasionar o aparecimento de resultados semelhantes ao encontrados neste trabalho.

A sonda radioativa $[^{99m}\text{Tc}] \text{SPB}$ foi mais citotóxica para células RT2 que a SPB nativa, sendo a menor concentração testada (0,5µg/mL) citotóxica para 77,75±2,08% das células. Segundo Salvajoli *et al.* (1999), além dos tratamentos antineoplásicos tradicionais, como a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, uma das grandes

estratégias terapêuticas contra tumores é a utilização combinada de radiação com uma molécula quimioterápica capaz de elevar a sensibilidade das células à radiação. Estes dados podem indicar que a SPB possui potencial radiosensibilizador sobre células RT2.

Para avaliar o perfil de biodistribuição e a capacidade de interação com tumores *in vivo*, a [^{99m}Tc]SPGP e a [¹²⁵I]SPGP foram administradas via endovenosa em animais com tumor de Ehrlich. Este modelo animal é bastante utilizado na oncologia experimental, pois permite o conhecimento prévio da quantidade e características iniciais das células tumorais inoculadas, e possui um desenvolvimento rápido, o que diminui os tempos de estudo (Da Silva *et al.*, 2004).

O estudo da cinética de biodistribuição da SPB mostrou que esta peçonha possui rápida depuração plasmática (0,02mL/min com um $T_{1/2}$ de $6,31 \pm 0,41$ min), o que é uma característica favorável para aquisição de imagem, uma vez que baixas concentrações sanguíneas da molécula reduzem o background nas imagens. A captação da [^{99m}Tc]SPB no fígado e rins indica que estes órgãos são os responsáveis pela metabolização e excreção desta molécula, e a baixa captação no cérebro e cerebelo mostram que a SPB não é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica.

Os dados mostraram que a SPGP é preferencialmente excretada pelos rins, e não é significativamente captada pelo cérebro e cerebelo.

Os dados da biodistribuição mostraram que as moléculas testadas não foram capazes de atravessar significativamente a barreira hematoencefálica, o que seria um problema durante a administração endovenosa destas moléculas em modelos de tumores cerebrais. Entretanto, segundo Wrensch *et al.* (2002), grande parte das moléculas são capazes de atravessar a barreira quando ocorrem grandes distúrbios cerebrais, tais como o estabelecimento de tumores da glia, como glioblastomas. Desta forma os dados obtidos não impedem futuros estudos em modelos animais com tumores cerebrais.

O processo de radiomarcção por iodinação direta de resíduos de tirosinas em proteínas gera estruturas semelhantes a tiroxinas, as quais são facilmente desalogenadas no organismo. Desta forma, proteínas radiomarcadas pelo método direto freqüentemente

sofrem desalogações e liberam iodo no organismo, o qual se acumula na tireóide e no estômago (Hulme, 1991). Os resultados da biodistribuição mostraram que a [¹²⁵I]SPGP é estável no organismo, sofrendo baixa desalogação, uma vez que a captação nos órgãos acima citados foi muito baixa.

A SPGP apresentou uma depuração plasmática mais lenta que a SPGP (0,217mL/min com T_{1/2} de 47,88±2,79min). Apesar disto, após 24 horas apenas concentrações desprezíveis foram encontradas no sangue. O ¹¹¹In-DTPA-Octreotideo, um análogo sintético da somatostatina amplamente utilizado para detecção de tumores neuroendócrinos, possui clearance sanguíneo ainda mais lento, e as imagens a partir deste radiofármaco só podem ser obtidas de 4 a 24 horas após sua administração (Knight, 2005).

O volume de distribuição da SPB (0,45mL/g) foi maior que o da SPGP (0,25/mL), indicando que a SPB é mais rápida e amplamente distribuída para os tecidos.

Também foi observada uma captação elevada da SPGP nos ossos. Segundo Delaissé *et al.* (1992) diversas metaloproteinases participam dos processos de reabsorção óssea através da degradação da matriz, e este é um processo contínuo no organismo, o que pode justificar o direcionamento desta molécula para os ossos.

Apesar da SPB não ter se ligado especificamente ao tumor, a SPGP apresentou significativa captação nesta região, apresentando-se em altas proporções no tumor mesmo após 24 horas após a administração. A ligação da SPGP ao tecido tumoral, e a manutenção desta ligação mesmo após 24 horas, deve ser vista de forma positiva. Isso permite a detecção após a uma redução dos níveis da molécula no sangue, osso, músculos e rins, o que reduz o background na imagem e permite uma detecção mais correta dos sítios tumorais.

A administração da droga por injeção direta na região tumoral tem sido vastamente estudada na última década, mais tem sido pouco utilizada nas clínicas. Em parte, a baixa utilização desta via se deve a natureza invasiva da administração, e à necessidade do conhecimento da localização do tumor. Mas, estudos de biodistribuição com drogas administradas por essa via são importantes para determinar alterações no perfil de

distribuição e captação do fármaco, além de avaliar a possibilidade da geração de fármacos de aplicação tópica. (Lammers *et al.*, 2006)

Segundo Shen *et al.* (2005), a vantagem da administração intratumoral do radiofármaco é que desta forma a radiação pode agir mais intensa e localmente, sem que os órgãos vizinhos sadios sejam significativamente irradiados. Esse mesmo autor, em testes com a TM-601, um peptídeo derivado da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus*, administrou a toxina via intracranial, visando detectar e tratar um glioma maligno. A alteração da via de injeção elevou a qualidade da imagem adquirida e reduziu a concentração da toxina nos demais órgãos, o que conseqüentemente diminuiu os efeitos colaterais gerados pela TM-601.

Também para a SPGP, a administração intratumoral elevou os níveis da molécula no tumor e seu tempo de residência, além de reduzir a exposição dos outros órgãos à radiação (devida a menor captação pelos mesmos). As biodistribuições realizadas com Na¹²⁵I mostraram que o iodo não permanece em altas concentrações no tumor, mesmo quando administrado intratumoralmente. A SPGP também não permanece no local da injeção quando injetada em animais com edema, o que indica uma capacidade de diferenciar sítios tumorais de inflamatórios.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

7.1. CONCLUSÕES

- A peçonha do peixe escorpião, SPB, bem como a enzima purificada a partir desta peçonha, possuem atividade antitumoral contra células de tumores cerebrais e carcinoma de mama murino;
- A SPGP foi mais citotóxica para as linhagens celulares testadas que a cisplatina, o controle positivo de citotoxicidade utilizado;
- Células RT2 são mais sensíveis a SPB e SPGP que células CAE e T98;
- Células T98 são mais resistentes que células RT2 e CAE, para ambas as substâncias testadas;
- SPB e SPGP possivelmente desencadeiam morte celular por apoptose;
- Uma sonda radioativa de SPB utilizando ^{99m}Tc como radiotraçador foi sintetizada com sucesso, alta pureza radioquímica e alta atividade específica;
- Uma sonda radioativa de SPGP utilizando ^{125}I como radiotraçador foi sintetizada com sucesso, alta pureza radioquímica e alta atividade específica;
- SPB e SPGP não atravessam a barreira hematoencefálica, nas condições testadas;
- A SGP se liga muito mais ao tumor de Ehrlich que a SPB in vivo;
- A SPGP permanece em concentração significativa na região tumoral por até 24 horas;
- A administração intratumoral da SPGP elevou seu tempo de residência no tumor e reduziu a captação dos órgãos de excreção, nos tempos observados;
- A SPB e SPGP não provocaram alterações hematológicas em camundongos, mesmo quando administradas em concentrações dez vezes maiores que as utilizadas nos experimentos de biodistribuição;
- Os resultados indicam o potencial da SOB como fonte de moléculas para desenvolvimento de novos fármacos;
- Os resultados indicam potencial uso da SPGP como molde para desenvolvimento de novos fármacos para diagnóstico e tratamento de tumores.

7.2. PERSPECTIVAS

- Identificar outras moléculas da SPB envolvidas em sua atividade antitumoral;
- Realizar estudos para verificação do mecanismo de citotoxicidade da SPB e SPGP;
- Realizar estudos da cinética completa da SPGP administrada via intratumoral;
- Realizar novos experimentos de aquisição de imagem cintilográfica, por diferentes vias de injeção, para confirmação do potencial uso da SPGP radiomarcada com ^{131}I para radiodiagnóstico.
- Tendo em vista que a [^{125}I]SPGP foi um bom marcador tumoral *in vivo*, sua versão radiomarcada com ^{131}I poderia ser utilizada para radiodiagnóstico *in vivo* e radioterapia interna. De fato, experimentos preliminares sugerem que a versão de SPGP radiomarcada com ^{131}I se mantém ativa após a reação de radiosíntese, e pode ser utilizada para detecção em gama-câmara (conforme pode ser visualizado no Apêndice B).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-SINNA, G.; ESMAT, A.Y.; AI-ZAHABY, A.S.; SOLIMAN, N.A.; IBRAHIM, T.M. Fractionation and characterization of *Cerastes cerastes cerastes* snake venom and the antitumor action of its lethal and non-lethal fractions. **Toxicol.** v.42, p.207-215, 2003.

AINSNER, D.L.; WRIGHT, W.E.; SHAY, J.W. . Telomerase regulation: not just flipping the switch. **Oncog and Cell Prolifer.** v.12, p.80-85, 2002.

AKALIN, A.; ELMORE, L.W.; FORSYTHE, H.L.; AMAKER, B.A.; MCCOLLUM, E.D.; NELSON, P.S.; WARE, J.L.; HOLT, S.E. A novel mechanism for chaperone-mediated Telomerase regulation during prostate cancer progression. **Cancer Res.** v.61, p.4791-4796, 2001

ALMEIDA, F. M. Estudo de enzimas proteolíticas presentes nos venenos dos escorpiões *Tityus bahiensis* e *Tityus serrulatus*.. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2000

AMERICAN BRAIN TUMOR ASSOCIATION. Causes & Risks facts. In: **A Primer of Brain Tumors**. 2006. Cap.4.

ANDREUCCI R. Radiação e Radioatividade. In: **Proteção Radiológica: Aspectos Industriais**. São Paulo: Assessoria e Serviços Técnicos Ltda, 2006. Cap. 3.

ANDRICH, F.; CASSOLI, J.S.; CARRIJO, L.C.; DE LIMA, M.E.; FIGUEIREDO, S.G. Partial biochemical and pharmacological characterization of *Scorpaena plumieri* fish venom. **VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Toxinologia**, Angra dos Reis-RJ, 2004.

ANDRICH, F. Propriedades biológicas da peçonha do peixe-escorpião (*Scorpaena plumieri*) e purificação de uma protease gelatinolítica. **Dissertação de Mestrado** – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 121p. 2005.

ANTONOV, V.K. Chemistry of proteolysis. **Springer-Verlag**, 1993.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Manual de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde / **Ministério da Saúde**. Ed Anvisa, 1ª ed. 182p. 2006.

APAC/SUS – Autorização para procedimentos de alta complexidade/ Sistema único de saúde. Ministério da Saúde. On line. 2002. Disponível em: <http://www.fesehf.org.br/documentos/tabelas/manual%20de%20onco.htm>. Acessado em: 02/08/2007.

APLIN, A.E.; HOWE, A.; ALAHARI, S.K.; JULIANO, R.L. Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. **Pharmacol. Rev.** v.50, p.197–263, 1998.

ARENDS, M. J.; WYLLIE, A. H. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. **Int. Rev. Exp. Pathol.** v.32, p. 223 -254, 1991.

ASHKENAZI, A.; DIXIT, V.M. Death receptors: signaling and modulation. **Science.** v.281, p.1305–1308, 1998.

ATSUMI, G.; MURAKAMI, M.; KOJIMA, K.; HADANO, A.; TAJIMA, M.; KUDO, I. Distinct roles of two intracellular phospholipase A2s in fatty acid release in the cell death pathway. **J. Biol. Chem.** v.275, p.18248-18258, 2000.

AUSTIN, L.; CAIRNCROSS, K.D.; MCCALLUM, I.A.N. Some pharmacological actions of the venom of the *Synanceja horrida*. **Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v.131, p. 339-347, 1961.

AZENSHTAIN, E.; LUBOSHITS, G.; SHINA, S.; NEUMARK, E.; SHAHBAZIAN, D.; WEIL, M.; WIGLER, N.; KEYDAR, I.; BEN-BARUCH, A. The chemokine in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. **Cancer Res.** v.62, p.1093–1102, 2002.

BALASUBASHINI, M.S.; KARTHIGAYAN, S.; SOMASUNDARAM, S.T.; BALASUBRAMANIAN, T.; RUKKUMANI, R.; MENON, V.P. FV peptide induces apoptosis in HEP 2 and HeLa cells: a insight into the mechanism of induction. **Journal of Carcinogenesis.** v.5, p.27-35, 2006.

BARAMOVA, E.N., SHANNON, J.D., BJARNASON, J.B., FOX, J.W. Degradation of extracellular matrix proteins by hemorrhagic metalloproteinases. **Arch. Biochem.Biophys.** v.275, p. 63-71, 1989.

BERGERS, G.; COUSSENS, L.M. Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. **Curr. Opin. Genet. Dev.** v.10, p.120–127, 2000.

BERTRAM, J.S. The Molecular biology of câncer. **Mol. Asp. Med.** v.21, p.167-223, 2001.

BIRAL, A. R. Radiações Ionizantes Para Físicos Médicos e Leigos, Florianópolis – SC: Editora Insular. 2002.

BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Snake venom metalloproteinases: reprotolysins. **Methods Enzymol.** v. 248, p. 345-368, 1995.

BOTELHO, M.F. Bioterrorismo: Etiopatogenia da agressão por radiações. **Rev Pot Pneumol.** v.10, p.91-103, 2004.

BRANS, B.; BODEI, L.; GIAMMARILE, F.; LINDEN, O.; LUSTER, M.; OYEN, W.J.G.; TENNAVALL, J. Clinical radionuclide therapy dosimetry: the quest for the “Holy Gray”. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.** v. 34, p.722-786, 2007.

BRIZEL, D.M.; WASSERMAN, T.H.; HENKE, M.; STRNAD, V.; RUDAT, V.; MONNIER, A.; ESCHWEGE, F.; ZHANG, J.; RUSSELL, L.; OSTER, W.; SAUER, R.

Phase III randomized trial of amifostine as a radioprotector in head and neck cancer. **J. Clin. Oncol.** v.18, p.3339–3345, 2000.

BROOKES, P. S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J. L.; ANDERS, M. W.; SHEU, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial lovehate triangle. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.** v.287, p.817-833, 2004.

BROWN, J.M.; WOUTERS, B.G. Apoptosis, p53 and tumor cell sensitivity to anticancer agents. **Can. Res.** v.59, p. 1391-1399, 1999.

BULAJ, G.; BUCZEL, O.; GOODSSELL, I.; JIMENEZ, E.C.; KRANSKI, J.; NIELSEN, J.S.; GARRETT, J.E.; OLIVERA, B.M. Efficient oxidative folding of conotoxins and the radiation of venomous cone snails. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.100, p.14562-14568, 2003.

CALLEGARI-JACQUES S.M. Amostras. In: **Bioestatística**. Porto Alegre: Artmed, 2003. Cap.16.

CALMETTE, A.; SAENZ, A.; COSTIL, L.C. Effects du venin de cobra sur les greffes cancéreuses et sur le cancer spontané (adeno-carcinome) de la souris. **C. R. Acad. Sci.** v.197, p.205, 1933.

CARRIJO, L.C.; ANDRICH, F.; FERREIRA-DE-OLIVEIRA, R.; CORDEIRO, M.N.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO, S.G. Some chemical and pharmacological properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena plumieri*. **XXXII Reunião da SBBq**. Caxambu-MG, 2003.

CARRIJO, L.C.; ANDRICH, F.; LIMA, M.E.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO S.G. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. **Toxicon**. v. 45, p.843-50, 2005.

CARVALHO-FILHO, A. Peixes: Costa Brasileira. São Paulo: Melro, p. 92-94, 1999.

CASSOLI, J.S.; ANDRICH, F.; CARRIJO, L.C.; DE LIMA, M.E.; FIGUEIREDO, S.G. Biological properties and partial biochemical characterization of the scorpionfish *Scorpaena plumieri* whole venom. **XXXIII Reunião anual da Sbbq**. Caxambu – MG, 2004.

CARDOSO, E.M. Radioatividade. In: Apostila Educativa. Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). 2006. **On line**. Disponível em: <http://www.cnem.gov.br/ensino/apostilas/radio.pdf>. Acessado em: 15/08/2007.

CEPEK, K.L.; SHAW, S.K.; PARKER, C.M.; RUSSELL, G.J.; MORROW, J.S.; RIMM, D.L.; BRENNER, M.B. Adhesion between epithelial cells and T lymphocytes mediated by E-cadherin and the $\alpha E\beta 7$ integrin. **Nature**. v.372, p.190–193, 1994.

CHAMBERS, A.F.; GROOM, A.C.; MACDONALD, I.C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nat Rev Cancer**, v.2, p.563-57, 2002.

CHIN, L.; POMERANTZ, J.; DEPINHO, R.A. The INK4a/ARF tumor suppressor: one gene two products two pathways. **Trends Biochem. Sci.** v.23, p.291–296, 1998.

CHURCH, J.E.; HODGSON, W.C. The pharmacological activity of fish venoms. **Toxicon.** v. 40, p. 1083-1093, 2002.

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear. Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica. Norma 3.01 (Janeiro, 2005). *On line.* Disponível em: <http://www.cnen.gov.br/seguranca/normas/mostra-norma.asp?op=301>. Acessado em: 22/07/2007.

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear. Licenciamento de instalações radioativas. Norma 6.02 (Janeiro, 2005). *On line.* Disponível em: <http://www.cnen.gov.br/seguranca/normas/mostra-norma.asp?op=602>. Acessado em: 22/12/2007.

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear. Instalações Radioativas: Gerência de rejeitos radioativos em instalações radioativas. Norma 6.05 (Janeiro, 2005). *On line.* Disponível em: <http://www.cnen.gov.br/seguranca/normas/mostra-norma.asp?op=605>. Acessado em: 22/07/2007.

COHEN, G.M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem. J. Rev.** v.326, p.1-16, 1997.

CORREA Jr., M.C.; DURVANEI, A.M.; SILVA, M.D., PIZZOCARO, K.F.; RUIZ, I.R.G. Inhibition of melanoma cell tumorigenicity by the snake venom toxin jarrahagin. **Toxin.** v.40, p.739-748, 2002.

COUTINHO, A. Avaliação da relevância das imagens simultâneas de fusão: SPECT com 99m Tc-MDP e Tomografia Computadorizada aplicada no diagnóstico das Disfunções Temporomandibulares. **Dissertação de Mestrado.** Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

CROWELL, J.A. The chemopreventive agent development research program in the Division of Cancer Prevention of the US Nation cancer Institute: An Overview. **Eur. J. Cancer (in press)**, 2005.

CRUCHTEN, S.V.; BROECK, W.V. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat. Histol. Embr.** v.31, p.214-223, 2002

DAGLI, M.L.Z. Disseminação linfática to tumor de Ehrlich: estudo experimental. **Tese de Doutorado.** Universidade de São Paulo. São Paulo, 148p. 1989.

DAS GRUPTA, S.; DEBNATH, A.; SAHA, A.; GIRI, B.; TRIPATHI, G.; VEDASIROMONI, J.R.; GOMES, A. Indian blanck scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukenic cell lines U937 and K562. **Leukemia Research.** v.31, p.817-825, 2007.

DA SILVA A. E.; SERAKIDES R.; FERREIRA E.; MORAES J.R.C.; OCARINO N.M.; CASSALI G.D. Efeito do Hipotireoidismo no Tumor de Ehrlich Sólido em

Camundongos Fêmeas Castradas e Não Castradas. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v.48, p.867-874, 2004.

DAVID J. P.; DAVID J. M. Planta Mediciniais. Fármacos Derivados de Plantas. In: **Farmacologia**. 6.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 134-145, 2002.

DELAISSÉ, J.M.; VAES, G. Mechanism of mineral solubilization and matrix degradation in osteoclastic bone resorption. **Biol. Physiol. Osteoclast**. Boca Raton: CRC Press, p.289-314, 1992.

DEBNATH, A.; CHATTERJEE, U.; DAS, M.; VEDASIROMONI, J.R.; GOMES, A. Venom of Indian monocellate cobra and Russell's viper show anticancer activity in experimental models. **J. Ethnoph.** v.111, p.681-684, 2007.

DE CARVALHO, J.E. Atividade antiulcerogênica e anticancer de produtos naturais e de síntese. **Multiciência**. v.7, p.1-18, 2006.

DICKSON, C. Medicinal Chemistry Laboratory Manual. **CRC Press**, Londres. 1999.

DING W.; YIN, X. Dissection of the multiple mechanisms of TNF α induced apoptosis in liver injury. **J. Cell. Mol. Med.** v.8, p.445-454, 2004.

EGBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**. v.2, p.161-174, 2002.

ESPRAFICO, E.M. Morte celular programada e câncer. **On line**. 2005. Disponível em: [http://rbp.fmrp.usp.br/didatico/Medicina-BiologiaCelular/Aula15%20 Apoptose .ppt](http://rbp.fmrp.usp.br/didatico/Medicina-BiologiaCelular/Aula15%20Apoptose.ppt). Acessado em: 03/03/2007.

EXTERMANN, M.; CHEN, H.; CANTOR, A.B.; CONCORAN, M.B.; MEYER, J., GRENDYS, E.; CAVANAUGHT, D.; ANTONEK, S.; CAMARATA, A.; HALEY, W.E.; BALDUCCI, L. Predictors of tolerance to chemotherapy in older cancer patients: a prospective pilot study. **Eur. J. Cancer**. v.38, p.1466-1473, 2002.

EYRE, H.J.; SMITH, R.A.; METTLIN, C.J. Cancer screening and early detection. In: **Cancer medicine**. 6^a ed. Ontário, 2000. cap7.

EVAN, G.; LITTLEWOOD, T. A life matter of life and cell death. *Science*. v. 281, p.1317-1322, 1998.

FADEEL, B., ORRENIUS, S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. **J. Intern. Med.** v.258, p.479-517, 2005.

FALK, S. Principles of cancer treatment by radiotherapy. **Surgery (Oxford)**. v. 24, p. 62-65, 2006.

FEDI, P.; TRONICK, S.R.; ARONSON, S.A. Growth factors. In: **Cancer Medicine**, J.F. Holland, R.C. Bast, D.L. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), pp. 41-64. 1997.

FELICORI, L.F.; SOUZA, C.T.; VELARDE, D.T.; MAGALHAES, A.; ALMEIDA, A.P.; FIGUEIREDO, S.; RICHARDSON, M.; DINIZ, C.R.; SANCHEZ, E.F. Kallikrein-like proteinase from bushmaster snake venom. **Protein Expression and Purification**. v. 30, p. 32-42, 2003.

FIGUEIREDO, S.G. *Tx4(6-1)*: Toxina com atividade inseticida da peçonha da aranha *Phoneutria nigriventer*. Purificação e caracterização química. **Tese de Doutorado** - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1995.

FILHO, G.B.; PITELLA, J.E.H.; PEREIRA, F.E.L.; BAMBIRRA, E.A.; BARBOSA, J.A. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: **Bogliolo patologia**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan., 2000. Cap.8.

FRASER, R.S.; PARÉ, P.D.; MÜLLER, N.L.; COLMAN, N. Diagnosis of diseases of the chest. 4th ed. Philadelphia-London-Toronto: W.B. Saunders, 1999.

FUKOTOMI J.; FUKUDA A.; FUKUDA S.; HARA M.; TERADA A.; YOSHIDA M. Scavenging activity of índole compounds against cisplatin-induced reactive oxygen species. **Life Sciences**. v.80, p. 254-257, 2006.

FURUTA, A.; FUNAHASHI, H.; SAWAI, H. SATO, M.; OKADA, Y.; TAKEYAMA, H.; MANABE, T. The relationship between GDNF and integrins in human colorectal cancer cell activity. **Hepatog**. v.54, p. 1398-1402, 2007.

GAO, L.; YU, S.; WU, Y.; SHAN, B. Effect os spider venom on cell apoptosis and necrosis rates in MCF7 cells. **DNA Cell Biol**. v.26, p.485-489, 2007.

GARCIA, L.J.; HARMAMURA, L.; LEITE M.P.; ROCHA, E.; SILVA, M. Pharmacological Analysis Of Local The Acute Inflammatory Process Induced In The Rat'S Paw By Local Injection Of Carrageem And By Heating. **Br. J. Pharmacol**. v.48, p.88-96, 1993.

GARNIER, P.; GOUDEY-PERRIÈRE, F.; BRETON, P.; DEWULF, C.; PETEK, F.; PERRÈIRE, C. Enzymatic properties of the stonefish (*Synanceia verrucosa* Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive end cytolytic factor. **Toxicon**, v. 33, p. 143-155, 1995.

GIANCOTTI, F.G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**. v.285, p.1028–1032, 1999.

GOODHEAD, D.T. Mechanisms for the biological effectiveness of high-LET radiations. **J. Radiat. Res**. v.40, p.1-13, 1999.

GREEN, D.R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**. v.305, p.626-629, 2004.

GUPTA, S.; DEBNATH, A.; SAHA, A.; GIRI, B.; TRIPATHI, G.; VEDASIROMONI, J.; GOMES, A. Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis* Koch) venom induced antiproliferativa and apoptogenic activity against leukemic cell lines U937 and K562. **Leuk. Res**. v.31, p.817-825, 2007.

HADDAD, V. JR. *Atlas de animais aquáticos perigosos do Brasil: guia médico de identificação e tratamento*. São Paulo: Roca, 2000.

HADDAD, V. JR.; MARTINS, I.A.; MAKYAMA, H.M. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. **Toxicon**, v. 42, p. 79-83, 2003.

HAHN, W.C.; COUNTER, C.M.; LUNDBERG, A.S.; BEIJERSBERG, R.L.; BROOKS, M.W.; WEINBERG, R.A. Creation of human tumor cells with defined genetic elements. **Nature**. v.400, p.464-468, 1999.

HALL, E.J. Radiobiology for the radiologist. Fourth edition, Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 219p., 1994.

HALSTEAD, B.W. Poisonous and venomous marine animals of the world. The Darwin Press (N.J.). 1168 pp. 1988

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**. v.100, p.57-70, 2000.

HELLMAN, S. Principles of cancer management: radiation therapy. **In: DEVITA, V.T.; HELLMAN, S.; ROSENBERG, S.A. Cancer: Principles and practice of oncology**. Philadelphia. p.265-288, 2001.

HENRY WAGNER, N. Nuclear Medicine: 100 years in the making. **J. Nucl. Med.** v.37, p.18-37, 1996.

HEUSSEN, C.; DOWDLE, E.B. Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrilamide Gels containing Sodium Dodecyl Sulfate and copolymerized substrates. **Anal. Biochem.** v. 102, p. 196-202, 1980.

HO, P.L.; SERRANO, S.M.T.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M.; MOURA-DASILVA, A.M.; MENTELE, E.; CALDAS, C.; OLIVA, M.L.V.; BATISTA, I.F.C.; OLIVEIRA, M.L.S. Angiostatin-like molecules are generated by snake venom metalloproteinases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 294, p. 879-885, 2002.

HOCKADAY, D.C.; SUI SHEN, B.S.; FIVEASH, J.; RAUBITSCHKE, A.; COLCHER, D.; LIU, A.; ALVAREZ, V.; MAMELAK, A.N. Imaging glioma extent with ¹³¹I-TM-601. **J. Nucl. Med.** v. 46, p.580-586, 2005.

HOLT, S.E.; WRIGHT, W.E.; SHAY, J.W. Regulation on telomerase activity in immortal cell lines. **Mol. Cell Bol.** v.16, p.2932-2939, 1999.

HULME, E. C. Receptor-Ligand Interactions: A practical Approach. **Oxford University Press**, 458p. 1991.

HUSTINX, R.; ALAVI, A. Tumor imaging. In: **Handbook of radiopharmaceuticals: Radiochemistry and applications**. Englan. Jonh Wiley and Sons Ltda. 823p. 2005. cap.22.

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature Rev. Cancer**. v.2, p.277-88, 2002.

INCA - Instituto Nacional do Câncer/ Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. TNM: classificação de tumores malignos. 6. ed. Rio de Janeiro, 2004.

INCA -Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 15 de janeiro de 2007.

IRSA – International Radiosurgery Association – **On line**. 2006. Disponível em: <http://www.irsa.org/glioblastoma.html>. Acessado em: 22/01/2007.

IUCC – International Union Against Câncer. **On line**, 2006. Disponível em: <http://www.uicc.org/>. Acessado em: 22/01/2007.

JANG, G.R.; HARRIS, R.Z.; LAU, D.T. Pharmacokinetics and its role in small molecular drug discovery research. **Med. Res. Rev.** v.21, p.382-396, 2001.

JEFFREY, J.J. Collagen and collagenase: pregnancy and parturition. **Semin Perinatol**. v.15, p.118-26, 1991.

JURISSON S.S.; LYDON, J.D. Potencial technecium small molecule, radiopharmaceuticals. **Chem. Rev.** v. 99, p. 2205-2218, 1999.

KANG, J.; KISENGE, R.R.; TOYODA, H.; TANAKA, S.; BU, J.; AZUMA, E.; KOMADA, Y. Chemical sensitization and regulation of TRAIL-induced apoptosis in a panel of B-lymphocytic leukaemia cell lines. **Br. J. Haematol**. v.123, p.921-932, 2003.

KARTHIKEYAN, R.; KARTHIGAYAN, S.; SRI BALASUBASHINI, M.; SOMASUNDARAM, S.T.; BALASUBRAMANIAN, T. Inhibition of Hep2 and HeLa cell proliferation *in vitro* and EAC tumor growth *in vivo* by *Lapemis curtus* (Shaw 1802) venom. **Toxicon**. v.51, p.157-161, 2008.

KLENER JR., P.; ANDERA, L.; KLENER, P.; NECAS, E.; ZIVNÝ, J. Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: Overview of Apoptotic Pathways. **Folia Biologica**. v.52, p.34-44, 2006.

KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Lessons from hereditary to carcinoma colorectal cancer. **Cell**. v.87, p.159–170, 1996.

KHOO, H.E. Bioactive proteins from stonefish venom. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v.29, p.802-806, 2002.

KNIGHT, L.C. Radiolabeled peptides for tumor imaging. In: **Handbook of Radiopharmaceuticals**. England. Jonh Wiley & Sons Ltda, 2005. Cap.23.

KOMAROVA, E. A.; CHERNOV, M. V.; FRANKS, R.; WANG, K.; ARMIN, G.; ZELNICK, C. R.; CHIN, D. M.; BACUS, S. S.; STARK, G. R.; GUDKOV, A. V. Transgenic mice with p53-responsive lacZ: p53 activity varies dramatically during normal development and determines radiation and drug sensitivity *in vivo*. **Embo J.** v.16, p.1391–1400, 1997.

KUBOTA Y.; KUBOTA K.; TANI S. DNA binding properties of DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) analogs having an imidazoline ring or a tetrahydropyrimidine ring: Groove-binding and intercalation. **Nucleic Acids Symposium.** v. 44, p. 53-54, 2000.

LAMMERS, T.; PESCHKE, P.; KUHNLEIN, R.; SUBR, V.; ULBRICH, K.; HUBER, P.; HENNINK, W.; STORM, G. Effect of intratumoral injection on the Biodistribution and the therapeutic potential of HPMA copolymer-Based drug delivery systems. **Neoplasia.** v.8, p.788-795, 2006.

LEWIS, R.J.; GARCIA, M.L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Review.** v.2, p.790-802, 2003.

LI, L.Y.; LUO, X.; WANG, X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. **Nature.** v.412, p.95-99, 2001.

LIND, M.J. Principles of cytotoxic chemotherapy . **Medicine.** v.132, p 20-25, 2004.

LOS, M.; BUREK, C.J.; STROH, C.; BENEDYK, K.; HUG, H.; MACKIEWICZ, A. Anticancer drugs of tomorrow: apoptotic pathway as target for drug design. **Drug Discovery Today.** v.8, p. 67-77. 2003.

LOWE, S. W.; SCHMITT, E. M.; SMITH, S. W.; OSBORNE, B. A.; JACKS, T. P53 is required for radiation-induced apoptosis in mouse thymocytes. **Nature.** v.362, p.847–849, 1993.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.I.; FAAR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v.193, p.265-275, 1951.

LUPETTI, A.; PAUWELS, E.K.J.; NIBBERING, P.H.; WELLING, M.M.; ^{99m}Tc-antimicrobial peptides: promising candidates for infection imaging, **Q. J. Nucl. Med.** v.47, p.238-245, 2003.

MAcEWAN, D. J. TNF ligands and receptors – a matter of life and death. **Br. J. Pharmacol.** v.135, p.855-875, 2002.

MACKESSY, S.P.; WILLIAMS, K.; ASHTON, K.G. Ontogenetic variation in venom composition and diet of *Crotallus oreganus concolor*. A case of venom paedomorphism? **Copeia,** v.4, p.769-782, 2003.

MADY, E.A. Antitumor and biochemical effects of *Echis coloratus* crude venom on Ehrlich ascites carcinoma cells *in vivo*. **J. Venom Anim. Toxins.** v.8, p.283-296, 2002.

- MAMELAK, A.N.; ROSENFELD, S.; BUCHOLZ, R.; RAUBITSCHKEK, A.; NABORS, L.B.; FIVEASH, J.B.; SHEN, S.; KHAZAELI, M.B.; COLCHER, D.; LIU, A.; OSMAR, M.; GUTHRIE, B.; SCHADE-BIJUR, S.; HABLITZ, D.M.; ALVAREZ, V.L.; GONDA, M.A. Phase I single-dose study of intracavitary-administrated iodine-131-TM-601 in adults with recurrent high-grade glioma. **J. Clin. Oncol.** v.24, p. 3644-3650, 2006.
- MAREEL, M.; LEROY, A. Clinical. Cellular and molecular aspects of cancer invasion. **Physiol. Rev.** v.83, p.337–376, 2003.
- MARTIN, S.J.; GREEN, D.R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts. **Cell.** v.82, p.349–352, 1995.
- MATHIAS, S.; PENA, L.A.; KOLESNICK, R.N. Signal transduction of stress via ceramide. **Biochem. J.** v.3, p.465-480, 1998.
- MAYER, A.M.S. Marine pharmacology in 1998: a antitumor and cytotoxic compounds. **The Pharmacologist.** v.41, p.159-164, 1999.
- McCORMICK, K.D.; MEINWALD, J. Neurotoxic acylpolyamines from spider venoms. **J. Chem. Ecology**, v. 19, n.10, p. 2411-2451, 1993.
- McINNES, E. Artefacts in histopathology. **Comp. Clin. Path.** v.13, p.100-108, 2005.
- MCKNIGHT J. A. Principles of chemotherapy. **Clin. Tech. Small. Anim. Pract.** v.18, p. 67-72, 2003.
- MELMED, S. Acromegaly. **N. Engl. J. Med.** v.322, p.966 –977, 1990.
- MENDONÇA, G.A.S.; NORONHA, C.P.; ALMEIDA, L.M. A situação do câncer no Brasil: INCA – Instituto do Câncer/ Ministério da Saúde. 2006. **On line.** Disponível em: <http://www.inca.gov.br/situacao/>. Acessado em: 15/02/2007.
- MICHALIDES, R.J.; VAN DE BREKEL, M.; BALM, F. Defects in G-S cell cycle in head and neck cancer: a review. **Head Neck.** v.24, p.694-704, 2002.
- MI-RIEONG R.; SOON-YOUNG P.; SU-MI C. Combined effect of of heptaplatin andionizing radiation on human squamous carcinoma cell lines. **Mol. Cells.** v.19, p.143-148, 2004.
- MIYASHITA, T.; REED, J.C. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. **Cell.** v.80, p.293-299, 1995.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.** v.65, p.55-64, 1983.
- MURPHY, G.; CRABBE, T. Gelatinases A and B. *Methods in enzymology*, v. 248, p. 470-484, 1995.
- NELSON, J.S. Fishes of the world. Wiley, New York, 1984.

NOLLET, F.; KOOLS, P.; VAN ROY, F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. **J. Mol. Biol.** v.299, p.551–572, 2000.

NOUAILHETAS, Y. Radiações Ionizantes e a vida. In: Apostila Educativa. Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). **On line.** 2006. Disponível em: http://www.cnem.gov.br/ensino/apostilas/rad_ion.pdf. Acessado em: 28/08/2007

NRC- National Research Council. Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook. Institute of Laboratory Animal Resources – Commission on Life Sciences – National Research Council – Washington D.C. 2ed. 1996.

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

OMRAN M. A. A.; FABB S. A.; DICKSON G. Biochemical and morphological analysis of cell death induced by Egyptian cobra (*Naja haje*) venom on cultured cells. **J.Venom. Anim. Toxins.** v.10, p.219-241, 2003.

O'REILLY, M.S.; HOLMGREN, L.; SHING, Y.; CHEN, C.; ROSENTHAL, R.A.; MOSES, M.; LANE, W.S.; CAO, Y.; SAGE, E.H.; FOLKMAN, J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. **Cell.** v.79, p.315–328, 1994.

OMS – Organização Mundial de Saúde. Classification of tumour: pathology and genetics. 2006. **On line.** Disponível em: <http://www.iarc.fr/WHO-BlueBooks/>. Acessado em: 02/09/2007.

OMS – Organização Mundial de Saúde. **On line.** 2006. Disponível em: <http://www.who.int/topics/cancer/en/>. Acessado em: 17/08/2007.

OSIPOV, A.N.; KOLOMIITSEVA, G. Post-radiation changes of DNA-protein crosslinks and single-stranded DNA breaks in cells of various organs in gamma-irradiated rats. **Biokhimiia.** v.61, p.927-931, 1996.

PARNELL, P.; WOLL, P.J. Principles of cancer treatment by chemotherapy. Surgery (oxford). v.24, p.272-276, 2003.

PAUWELS, E.K.J.; WELLING, M.M.; FEITSMA, R.I.J.; ATSMAS D.E.; NIEUWENHUIZEN, W. The labeling of proteins and LDL with ^{99m}Tc: a new direct method employing KBH₄ and stannous chloride., **Nucl. Med.Biol.**, v.20, p.825-833, 1993.

PAUWELS, E.K.J.; McCREADY, V.R.; STOOT, J.H.M.B.; Van DEURZEN, D. F. P. The mechanism of accumulation of tumour-localising radiopharmaceuticals. **Eur. J. Nucl Med.** v.25, p.277-305, 1998.

PEREZ-TAMAYO, R. Some aspects of connective tissue of the liver. In: POPPER, H.; SCHAFFNER, F. **Progress in liver disease**. London, Churchill & Livingstone, p. 192-210. 1965.

PERL, A.K.; DAHL, U.; WILGENBUS, P.; CREMER, H.; SEMB, H.; AND CHRISTOFORI, G. Reduced expression of neural cell adhesion molecule induces metastatic dissemination of pancreatic β tumor cells. **Nat. Med.** v.5, p.286–291, 1999.

PETERS, A.M. The use of nuclear medicine in infections. **British J. Radiol.**, v.71, p.251-261, 1998.

POLLOCK, R.E.; MORTON, D.L. Principles of surgical oncology. In: KUFEL, D.W.; POLLOCK, R.E.; WEICHSELBAUM, R.R.; BAST, R.C.; GANSLER, T.S.; HOLLAND, J.F.; FREI, E III. **Cancer Medicine**. 6th Ed. Hamilton, Ontario: BC Decker, p.569-583. 2003

POTTER, E.; BERGWITZ, C.; BRABANT, G. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. **Endocr Rev.** v.20, p.207-39, 1999.

PRIVES, C.; ALL, P.A. The p53 pathway. **J. Pathol.** v.187, p.112-126, 1999.

Prudence University Cytometry Laboratory. **On line**. Disponível em: www.cyto.purdue.edu/.../apopto/data/chap10.htm. Acessado em: 15/08/2007.

PUJATTI, P. B.; SOARES, M. A.; CASTRO, M. S. A.; SIMAL, C.; SANTOS, R. G. Preparation, characterization, and biodistribution study of technetium-99m labeled Crotalus venom. In: **International symposium in trends on radiopharmaceuticals**. Book of extend synopses. Viena: 149 – 150. 2005.

PUSZTAI, L.; LEWIS, C.E.; YAP, E. Cell proliferation in cancer: regulatory mechanisms of neoplastic cell growth. **Oxford Medical Publication**. Oxford University Press – Oxford, Nova Iorque, 1996.

PUTCHA, G.V.; HARRIS, C.A.; MOULDER, K.L.; EASTON, R.M.; THOMPSON, C.B.; JOHNSON JR, E.M. **Intrinsic and Extrinsic Pathway Signaling during Neuronal Apoptosis: Lessons from the Analysis of Mutant Mice**. **J. Cell Biol.** v.157, p.441-453, 2002.

QUE, X.; REED, S.L. The role of extracellular cysteine proteinases in pathogenesis of Entamoeba histolytica invasion. **Parasitol. Today.** v.13, p.190–194, 1997.

RAMALHO, A.T. Fundamentos em Radiobiologia. Rio de Janeiro: IRD, 2000.

RANG H.P.; DALE M.M.; RITTER J. M.; MOORE P.K. Quimioterapia do cancer. In: **Farmacologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2003. Cap.5.

RAWLINGS, N.D.; BARRETT, A.J. Evolutionary families of metalloproteinases. **Methods Enzymol**, v. 248, p. 183-228, 1995.

- REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K.D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology and Therapeutics**. v.99, p.1-13, 2003.
- RENAN, M.J. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. **Mol. Carcinogenesis**. v.7, p.139–146, 1993.
- REUBI, J.C. Peptides receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. **End Rew**. v.24, p.389-427, 2007.
- RICCI, M. S.; ZONG, W. chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist**. v.11, p.342-357, 2006.
- ROBILOTTA, C.C. A tomografia por emissão de pósitrons: uma nova modalidade na medicina nuclear brasileira. **Rev. Panam Salud Publica**. v.20, p.134–42, 2003.
- ROWLAND, M. TOZER, T.N. Clinical pharmacokinetics: concepts and applications. 3ed. Lippincott. Media, 1995. 601p.
- RUSSEL, F.E. Marine toxins and venomous and poisonous marine animals. In: **Advances in Marine Biology**. v.2, p. 137-151, (Russel, F.S., Ed.). London: Academic Press, 1965.
- RUSSELL, F.E. Toxic effects of animals toxins. In: Klaasen, C.D., (Ed.), **Casarett and Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons**, McGraw-Hill, Sydney, 1996.
- SALVAJOLI, J.V. Radioterapia em Oncologia. 1999. Rio de Janeiro: MEDSI.
- SALVASEN, G.S.; DIXIT, V.M. Caspase activation: the induced proximity model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 96, p. 10964–10967, 1999.
- SCHAEFFER, R.C. JR.; CARLSON, R.W.; RUSSEL, F.E. Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. **Toxicon**. v. 9, p.69-78, 1971.
- SANTOS, R.G.; RENTERGHEM, C.V.; MOUTOT, N.M.; MANSUELLE, P.; CORDEIRO, M.N.; DINIZ, C.R.; MORI, Y.; LIMA, M.E.; SEAGAR, M. *Phoneutria nigriventer* IIA toxin blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with W conotoxin binding sites. **J. Biol. Chem**. v.277, p.13856-13862, 2002.
- SEIWERT, T.Y.; SALAMA, J.K.; VOKES, E.E. The concurrent chemoradiation paradigm: general principles. **Nature Clinical Practice Oncology**. v.4, p. 86-100, 2007.
- SGOUROS, G. Dosimetry of internal emitters. **J. Nucl. Med**. v.46, p.18-27, 2005.
- SHEN, S.; KHAZAELI, M.B.; GILLESPIE, G.Y.; ALVAREZ, V.L. Radiation dosimetry of ¹³¹I-chlorotoxin for targeted radiotherapy in glioma-bearing mice. **J. Neur. Oncol**. v.71, p.113-119, 2005.
- SHIVAPURKAR, N.; REDDY, J.; CHAUDHARY, P.M.; GAZDAR, A.F. **Apoptosis and lung cancer: A review**. **J. Cel. Bioch**. v.88, p.885- 898, 2003.

- SIKIC, B. I. New approaches in cancer treatment. **Ann. Oncol.** v.10, p.149-153, 1999.
- SILVA, I. S. Epidemiología Del câncer: princípios y métodos. Editora IARC. 442p. 1999.
- SILVA, J.A.; MURAMOTO, E.; RIBELA, M.T.C.P.; ROGERO, J.R.; CAMILLO, M.A.P. Biodistribution of gyrixin using ^{125}I as radiotracer. *J. Radio. Nucl. Chem.* v.269, p.579-583, 2006.
- SKOBE M, ROCKWELL P, GOLDSTEIN N, VOSSELER S, AND FUSENIG NE. Halting angiogenesis suppresses carcinoma cell invasion. **Nature Med.** v.3, p.1222–1227, 1997.
- SKOBE, M.; HAWIGHORST, T.; JACKSON, D.G.; PREVO, R.; JANES, L.; VELASCO, P.; RICCARDI, L.; ALITALO, K.; CLAFFEY, K.; DETMAR, M. Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis. **Nature Med.** v.7, p.192–198, 2001.
- SMITH, W.L.; WHEELER, W.C. Venom evolution widespread in fishes: a phylogenetic road map for the bioprospecting of piscine venoms. **Journal of Heredity.** v.9, p.206–221, 2006.
- SOLÁ, S.; PEDRO, T.; FERREIRA, H.; RODRIGUES, C.M.P. Apoptose: uma questão de vida ou morte. **On line.** Centro de Patologia Molecular, Faculdade de Farmácia. Universidade de Lisboa. 2001. Disponível em: <http://www.ordemblogos/Biologias/N2.html>. Acessado em: 22/08/2007.
- SPORN, M.B. The war on cancer. **Lancet.** v.347, p.1377–1381, 1996.
- STABIN, M. Nuclear Medicine dosimetry. **Phys. Med. Biol.** v. 51, p.187-202, 2006a.
- STABIN, M.G. Internal radiation dosimetry. In: Nuclear Medicine. Philadelphia. Jonh Kennedy Blund, 2006b. Cap.22.
- STECKEL, R.J.; Principles of imaging. In: **Cancer Medicine.** 6ª ed. Ontário, B.C. Decker, 2000. Cap 9.
- STERNLICHT, M.D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Dev. Biol.** v.17, p.463-516, 2001.
- STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V.M. Apoptosis signaling. **Annu. Rev. Biochem.** v.69, p.217-245, 2000.
- SYMONDS, R.P.; FOWERAKER, K. Principles of chemotherapy and radiotherapy. **Current Obstetrics and Gynaecology.** v.16, p.100-106, 2006.
- TALHOUK, R.S.; BISSELL, M.J.; WERB, Z. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. **J Cell Biol.** v.118, p.1272-1282, 1992.

- TARAPHDAR, A.K.; ROY, M.; BHATTACHARYA, R.K. Natural products as inducers of apoptosis: implications for cancer therapy and prevention. **Current Science**. v.80, p.1387-1396, 2001.
- TARNOWSKI, B.I.; SPINALE, F.G.; NICHOLSON, J.H. DAPI as a useful stain for nuclear quantitation. **Biotech. Histochem.** v.66, p.297-302, 1991.
- TEIXEIRA, C.F.P.; FERNANDES, C.M.; ZULIANI, J.P.; ZAMUNER, S.F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 99, 2005.
- TERASAKI, T.; OHTSUKI, S. Brain-to-blood transporters for endogenous substrates and xenobiotics at the blood-brain barrier: Na overview of biology and methodology. **NeuroRX**. v.2, p.63-72, 2005.
- THRALL, J.T.; ZIESSMAN, H.A. Princípios Básicos. In: **Medicina Nuclear**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 1.
- THRALL, J.T.; ZIESSMAN, H.A. Radiofarmácia. In: **Medicina Nuclear**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 4.
- THOMPSON, C.B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of diseases. **Science**. v.267, p.1456, 1995.
- THORBURN, A. Death receptor-induced cell killing. **Cell Signal**. v.16, p.139-144, 2004.
- THORNE, R.F.; MARSHALL, J.F.; SHAFREN, D.R.; GIBSON, P.G.; HART, I.R.; BURNS, G.F. The integrins alpha3beta1 and alpha6beta1 physically and functionally associate with CD36 in human melanoma cells: Requirement for the extracellular domain OF CD36. **J. Biol. Chem.** v.275, p.35264-75, 2000.
- TINOIS, E. Imagens Funcionais PET e fMRI. **Multicidência: tecnologia para a saúde**. p.1-14, 2005.
- TRUMMAL, K.; TONISMAGI, K.; SIIGUR, E.; AASPOLLU, A.; LOPP, A.; SILLAT, T.; SAAT, R.; SIIGUR, E. A novel metalloprotease from *Vipera lebetina* venom induces human endothelial cell apoptosis. **Toxicol.** v.46, p. 46-61, 2005.
- TURNER, J.E. Radioactive decay. In: **Atoms, Radiation and Radiation Protection**. 2.ed. New York: Wiley Interscience , 1995. Cap. 4.
- VENERI, A. Imaging treatment effects in Alzheimer's disease. **Magnetic Resonance Imaging**. v.25, p.953-968, 2007.
- VIHINEN, P.; NIKKOLA, J.; VLAYKOVA, T.; HAHKA-KEMPPINEN, M.; TALVE, L.; HEINO, J.; PYRHONEN, S. Prognostic value of beta1 integrin expression in metastatic melanoma. **Melanoma Res**. v.10, p.243-251, 2000.
- VORHERR H. Adjuvant chemotherapy of breast cancer: Hope — Reality — Hazard?

Journal of Molecular Medicine. p.149-161, 1984.

WAGNER Jr., H.N. Nuclear medicine: 100 years in the making. **J. Nucl. Med.** v.37, p.18-27, 1996.

WANG, W.X.; JI, Y.H. Scorpion venom induces gliomas cell apoptosis in vitro and inhibits gliomas tumor growth in vitro. **J. Neurooncol.** v.73, p.1-7, 2005.

WEI, Y.; WEI, X.; WANG, Y.; LIU, X.; CHU, T.; HU, S.; WANG, X. Iodination and radiolabeling of α -allocryptopine with iodine-125. **Ap. Rad. Iso.** v.62, p.55-62, 2005.

WILLIAMSON, J.A. Clinical toxicology of venomous Scorpaenidae and other selected fish stings. In: MEIER, J.; WHITE, J. Clinical toxicology of animal venoms and poisons. CRC Press, Florida, p.142-158, 1995.

WILLIAMSON, J.F. Brachytherapy technology and physics practice since 1950: a half-century of progress. **Phys. Med. Biol.** v.51, p.303-25, 2006.

WINBERG, K.J.; MUNE, E.; TOLMACHEV, V.; SJOBERG, S. Radiobromination of closo-carborates using palladium-catalysed halogen exchange. **J. Labelled. Compd. Radiopham.** v.48, p.195-202, 2005.

WOLF, C.; CHENERD, M.P.; DURAND, D.E.; GROSSOUVRE, P.; BELLOCQ, J.P.; CHAMBON, P.; BASSET, P. Breast-cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed in basal cell carcinoma and during cutaneous wound healing. **J Invest Dermatol.** v.99, p. 870-872, 1992.

WORKMAN, P.; KAYE, S.B. Cancer therapeutics: A Trends Guide with eleven reviews of various new potentials approaches to the development of anticancer drugs. **S. Trends. Mol. Med. Suppl.** v.8, p.1-73, 2002.

WRENSCH, M.; MINN, Y.; CHEW, T.; BONDY, M.; BERGER, M.S. Epidemiology of primary brain tumors: current concepts and review of the literature. **Neuro-Oncology.** v.4, p.278-299, 2002.

YOU, W.K.; SEO, H.J.; CHUNG, K.H.; KIM, D.S. A Novel Metalloprotease from Gloydius halys Venom Induces Endothelial Cell Apoptosis through Its Protease and Disintegrin-Like Domains. **Journal of Biochemistry,** 134(5): 739-749). 2003.

ZHAO S.; DU X.; CHAI M.; CHEN J.; ZHOU Y.; SONG J. Secretory phospholipase A2 induces apoptosis via a mechanism involving ceramide generation. **Biochimica et. Biophysica Acta.** v.1581, p.75-88, 2002.

ZIEGLER, A, LUEDKE, G.H.; FABBRO, D.; ALTMANN, K.H., STAHEL, R.A.; ZANGEMEISTER-WITTKE, U. Induction of apoptosis in small-cell lung cancer cells by an antisense oligodeoxynucleotide targeting the Bcl-2 coding sequence. **J. Nucl. Nat. Can. Inst.** v.89, p.1027-1036, 1997.

ZUR HAUSEM, H. Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road or preventing a major human cancer. **J. Natt. Cancer Inst.** v. 93, p. 252-253, 2001.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Radiações ionizantes e seus efeitos biológicos

A radiação é definida como qualquer processo físico de emissão e propagação de energia, seja por intermédio de fenômenos ondulatórios, seja por meio de partículas dotadas de energia cinética (Cardoso, 2006).

Radiação ionizante é a radiação cuja energia é superior à energia de ligação dos elétrons ao átomo. Elas possuem energia suficiente para atravessar a matéria e remover seus elétrons, gerando átomos e moléculas ionizadas. A radiação ionizante pode ser particulada (partículas alfa, beta e nêutrons) ou eletromagnética (radiação gama e raios X), ambas emitidas por núcleos de átomos instáveis (FIG.1) (Thrall, 2003).

As partículas *alfa* (α) são constituídas por dois prótons e dois neutros, o que caracteriza um núcleo de hélio (${}^4_2\text{He}$). Por possuírem carga elétrica e massa, essas partículas não possuem grande poder de penetração, podendo ser barradas por uma folha de papel ou mesmo pela epiderme. Por esse motivo, só representam perigo a saúde se ingeridas (Biral, 2002). As partículas *beta* (β) são elétrons emitidos por núcleos atômicos instáveis, e podem possuir carga elétrica negativa (β^- , o negatron), quando o núcleo possui excesso de nêutrons, ou positiva (β^+ , o pósitron) quando existe um excesso de prótons. A partícula β^- é resultado da conversão de um nêutron em um próton, enquanto partículas β^+ surgem da conversão de um próton em um nêutron. Por possuírem massa muito pequena tem poder de penetração maior que o das partículas α , mas podem ser facilmente contidas por alguns centímetros de acrílico ou plástico. Nos tecidos são capazes de penetrar cerca um cm, ocasionando danos à pele mas não aos órgãos internos, a não ser que sejam ingeridas ou aspiradas. Os raios *gama* (γ) são ondas eletromagnéticas emitidas por núcleos instáveis logo após a emissão de uma partícula α ou β . Sua emissão permite o descarte do excesso de energia que ainda persistia no núcleo, levando o átomo a um estado estável. Por não possuírem massa ou carga, esses raios possuem grande poder de penetração, sendo parados apenas por grossas barreiras de concreto ou metal de alto número atômico (FIG.2) (Turner, 1995; Goodhead, 1999; Thrall, 2003; Andreucci, 2005; Cardoso, 2006; Nouailhetas, 2006).

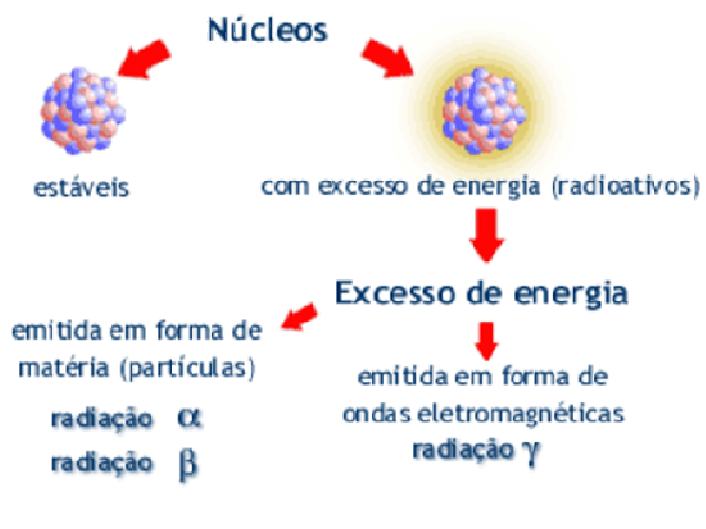


FIG.56: Emissão de partículas e raios gama por núcleos instáveis. Para alcançar a estabilidade núcleos muito energéticos emitem partículas visando reduzir seu nível energético. Quando a emissão particulada não é suficiente, o excesso de energia é descartado na forma de raios gama. Fonte: Cardoso, 2006.

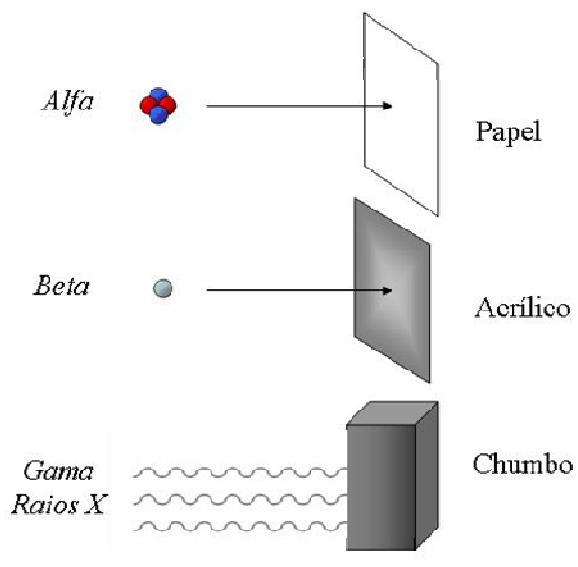


FIG.57: Diferentes tipos de emissões radioativas e seu poder de penetração. Radiação *Alfa* consiste em um núcleo de [hélio](#) e é detida por uma folha de papel. Radiação *Beta* são [elétrons](#), e é detida por uma folha de alumínio. Radiação *Gama* e X são ondas eletromagnéticas e é parcialmente absorvida ao penetrar em um material denso. Adaptado de Andreucci, 2005.

As emissões de radiação por um átomo são realizadas ao acaso, não sendo possível determinar o momento em que um núcleo irá decair liberando radiação. Apesar disso, em uma amostra com grande quantidade de átomos é possível avaliar a probabilidade de certo número de emissões ocorrerem em um período de tempo. Essa taxa de emissões é chamada de atividade (Cardoso, 2006). A unidade padrão da atividade de um radioisótopo é o *Becquerel* (Bq), equivalente a um átomo se desintegrando por segundo (1Bq = 1dps). Porém, a atividade também pode ser medida em *Curie* (Ci), onde 1 Ci equivale a $3,7 \times 10^{10}$ dps ou $3,7 \times 10^{10}$ Bq (Turner, 1995). Ou seja, a atividade de um radioisótopo em um dado momento é proporcional ao número de átomos instáveis presentes na amostra.

O tempo necessário para que metade dos átomos de um elemento radioativo se tornem estáveis é chamado de Tempo de meia vida ($T_{1/2}$). Cada elemento decai a uma velocidade característica, o que faz com que o $T_{1/2}$ seja diferente entre elementos radioativos (Andreucci, 2005).

A quantificação da transferência de energia radioativa para o meio é dada pela grandeza dose absorvida. A unidade usual de dose de radiação absorvida é o *Gray* (Gy), sendo 1 Gy correspondente à absorção de 1 Joule de energia por quilograma de tecido. No entanto, ela também pode ser medida em *rads* que é equivalente a 0,01Gy (1Gy = 100rads), apesar desta unidade não estar sendo mais utilizada (Salvajoli, 1999).

Efeitos biológicos da radiação

As diferentes células e tecidos biológicos apresentam sensibilidades diferentes à ação das radiações. Na verdade, em sistemas biológicos, o grau e a velocidade com que ocorrem os efeitos nocivos da radiação ionizante são significativamente variáveis, e dependem do tipo e estágio do desenvolvimento celular, e da intensidade e taxa de dose da radiação. Em 1959, Bergonie e Tribondeau lançaram o princípio de que células com alta taxa reprodutiva e pouco diferenciadas são mais radiosensíveis que células diferenciadas e de pouca taxa mitótica (Botelho, 2004). Por exemplo: células tumorais, que são pouco diferenciadas proliferam rapidamente, são mais radiosensíveis que neurônios, os quais são altamente especializados e não se dividem. Por esse motivo a radiação ionizante é utilizada como tratamento para o câncer.

Quando um feixe de radiação ionizante interage com uma célula, a transferência de energia aos componentes celulares pode ocorrer diretamente para moléculas intracelulares tais como lipídeos e proteínas, o que caracteriza os efeitos diretos da radiação. A energia também pode ser transferida para moléculas de água, causando sua radiólise e a liberação de radicais livres, gerando os efeitos indiretos da radiação (Nouailhetas, 2006). Os radicais livres formados pela hidrólise da água são entidades químicas altamente reativas (devido à presença de átomos cuja última camada eletrônica está incompleta), e podem atuar como agentes oxidantes e redutores, além de formar peróxidos, e são capazes de reagir e alterar estruturas celulares. Na verdade, como a água é o componente principal dos seres vivos, mais de 80% dos danos observados nos sistemas biológicos são decorrentes dos efeitos indiretos da radiação (Ramalho, 2000; Botelho, 2004).

Potencialmente, qualquer molécula intracelular pode ser ionizada/excitada e perder sua função. A transformação de uma molécula específica pela ação da radiação ionizante gera conseqüências de acordo com a função celular desempenhada por tal molécula. Proteínas e outras biomoléculas, quando danificadas, podem ser sintetizadas *de novo* se a estrutura do DNA estiver íntegra. Por esse motivo, são os danos causados ao material genético da célula o ponto crítico para a sua sobrevivência. Danos muito extensos ao material genético podem impedir a replicação celular ou mesmo levar a célula à morte (Osipov *et al.*, 1996).

A FIG.3 trás um resumo dos mecanismos pelos quais acontecem os danos biológicos da radiação ionizante. A radiação, por efeito direto ou indireto, pode causar ligações cruzadas intracadeia DNA-DNA e ligações DNA-proteína, as quais impedem a replicação correta do material genético e podem levar a mutações. Também podem ocorrer danos e perdas de bases nitrogenadas, e neste caso, quando houver replicação do material genético, sítios sem base ou com a base danificada impedem a especificação correta da base complementar, gerando mutações por alterações na seqüência de bases do DNA. Quebras simples ou duplas nas fitas de DNA, que ocasionam a união de partes não seqüenciais do DNA e a perda de genes inteiros também são comuns em células submetidas à radiação.

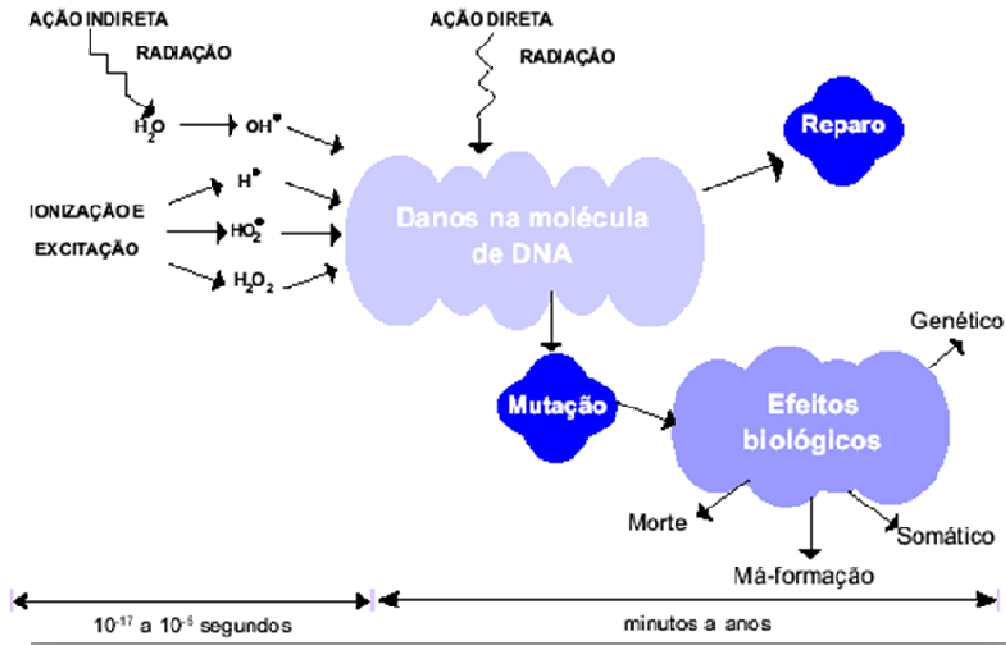


FIG.58: Efeitos diretos e indiretos da radiação ionizante sobre os sistemas biológicos. Efeitos diretos são observados quando a radiação transfere energia e ioniza diretamente os componentes celulares. Já efeitos indiretos ocorrem quando componentes celulares são oxidados ou reduzidos pela ação de radicais livres, os quais foram previamente formados pela transferência de energia da radiação para moléculas de água. Fonte: Nouailhetas, 2006.

APENDICE B

Avaliação preliminar do potencial uso da [¹³¹I]SPGP para radiodiagnóstico na Medicina Nuclear

Os resultados obtidos nos estudos de biodistribuição da [¹²⁵I]SPGP em animais com tumor de Ehrlich, demonstraram o potencial da SPGP para detecção de sítios tumorais *in vivo*, e permitiram a avaliação do melhor tempo para captação ótima da molécula radiomarcada pela região tumoral.

Uma avaliação preliminar do potencial uso da SPGP na detecção de tumores por imagem cintilográfica, quando injetado via endovenosa caudal, foi realizado com a sonda radioativa de [¹³¹I]SPGP. A molécula foi radiomarcada com ¹³¹I, um radioisótopo amplamente utilizado em para diagnósticos por imagem de problemas da Tireóide, emissor de raios gama na faixa de 365keV, o qual é detectado pela gâma-câra utilizada.

As imagens foram obtidas de 2 animais, nos tempos 30 e 60 minutos após a injeção endovenosa caudal de 6,15MBq de [¹³¹I]SPGP. Nos tempos pós injeção acima determinados os animais foram anestesiados intraperitonealmente por Virboxil® (cloridrato de xilazina) associado a Francotar® (Quetamina). Após anestesia os animais foram posicionados e fixados de forma a garantir a completa imobilização, o que é necessário para a perfeita aquisição da imagem. Imagens ventrais de corpo inteiro foram adquiridas por 15 minutos em Gama Câmara G&E Healthcare Millenium (FIG.55).

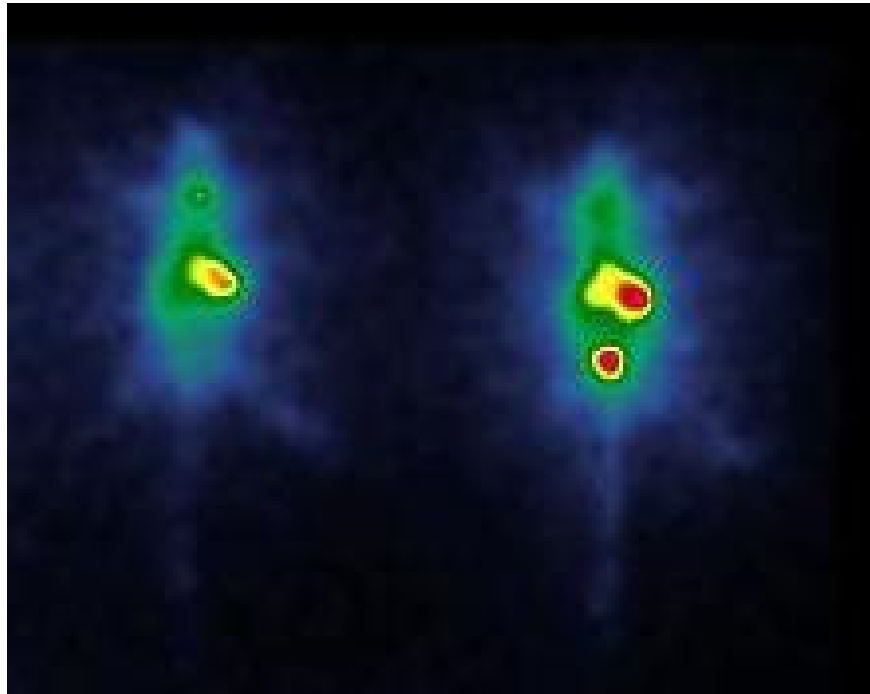


FIG.59: Imagem planar de corpo inteiro de camundongos injetados via endovenosa com a sonda [^{131}I]SPGP. As áreas hipercaptantes são o caminho de excreção da molécula. Apenas a pata com tumor foi detectada na cintilografia.

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 152/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Identificação e caracterização de novos fármacos, derivados de peçonhas animais, para a terapia e diagnóstico de tumores**", que tem como responsável **Raquel Gouvêa dos Santos**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **5/ 12/2007**.

Este certificado expira-se em **5/ 12 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 152/2007**, related to the project entitled "**Identification and characterisation of new antitumoral drugs derived from animal venoms for tumours therapy and diagnosis**", under the supervision of **Raquel Gouvêa dos Santos**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **December 5, 2007**.

This certificate expires in **December 5, 2012**.

Belo Horizonte, 11 de Dezembro de 2007.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 - Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod. Cert. v.1.0)

XXXVI Reunião Anual da SBBq e 10th IUBMB Conference, 2007, Salvador. Livro de Resumos da XXXVI Reunião Anual da SBBq, 2007.

Effect of *SCORPAENA PLUMIERI* venom and fractions on murine glioblastoma cells.

Soprani J.¹, Soares M. A.¹, Cassoli J. S.² Figueiredo S.G.³, Santos R.G.¹

¹Lab. Radiobiologia, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CDTN/CNEN, Minas Gerais, Brazil. ²Lab. Venenos e Toxinas Animais, ICB, UFMG, Minas Gerais, Brazil. ³Depto de Ciências Fisiológicas, UFES, Espírito Santo, Brazil.

Animal venoms are source of structural templates for development of new therapeutic agents against cancer. The aim of this work was to identify and characterize the antitumoral effect of *Scorpaena plumieri* venom (SP) and fractions on cultured murine glioblastoma cells. Glioma cells were sensitive to SP in a dose-dependent way. Significant reduction in metabolism followed by morphological disturbs (rounded cell shape and reduction of the cytoplasmic volume) could be observed after treatment by SP. These cytotoxic effects were time and dose-dependent ($IC_{50} = 3,48\mu\text{g/mL}$). Inhibition of cell adhesion and proliferation could also be observed at concentrations higher than $10\mu\text{g/mL}$. Tests of metabolic viability with the fractions have shown that the FI, FII, FIV and FVI fractions were equally powerful, reducing the metabolism in 70% at concentration of $10\mu\text{g/mL}$. Theses fractions proved to have important kallikrein-like, edematogenic, hyaluronidase and caseinolytic activity, respectively. These results are an evidence of the worthy anticancer activity of SP and fractions, and morphological disturbs of cells treated with SP are suggestive of the apoptosis occurrence. Further studies are in development in order to characterize the antitumoral mechanisms of action of the SP venom and its components.

KEY WORDS: scorpionfish, venom, glioblastoma, cytotoxicity

FINANCIAL SUPPORT: CNPq, CDTN/CNEN

TITLE: Effect of scorpionfish (*SCORPAENA PLUMIERI*) venom on cultured murine glioblastomas cells (RT2) .

AUTHORS: SOPRANI J. (1) SILVA P.R.O.(1) SOARES M. A.(1) FIGUEIREDO S.G.(2) SANTOS R.G. (1)

AFFILIATIONS: (1) Lab. Radiobiologia, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear – CDTN/CNEN, Minas Gerais, Brasil (2) Depto de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo, Brasil.

ABSTRACT: Animal venoms have been recognized as potential sources of pharmacological agents and physiological tools. The scorpionfishes (*Scorpaena*) are the most venomous fishes in the Atlantic Ocean. There is very little information on the venom of scorpionfishes whereas studies describing biological properties of fish venoms have focused mainly on lionfishes. These venoms often contain active components such as catecholamines, acetylcholine and some enzymatic activities such as proteolytic hyaluronidases and phosphatases. The effect of *Scorpaena plumieri* venom (SP) on tumoral cells has not been studied yet. The aim of this work was to identify and characterize the antitumoral effect of SP on cultured murine glioblastomas cells (RT2). RT2 cells were treated with varying concentrations of SP and cytotoxicity was established using MTT assay. RT2 cells were sensitive to SP in a dose-dependent way. Low concentrations of SP venom did not modified significantly the metabolism of RT2 cells, but significant reduction in metabolism could be observed at SP concentrations higher than 5µg/mL (IC₅₀=16,7µg/mL) followed by morphological disturbs, such as rounded cell shape and reduction of the cytoplasmic volume. SP effects on cell adhesion and clonogenicity were also evaluated. Inhibition of cell adhesion and proliferation could be observed at concentrations higher than 10µg/mL. At concentration of 100µg/mL the cells were completely lysed. Metalloproteases are involved in cell-matrix interactions. Since proteolytic activity has been found in many fish venoms, we evaluated the SP venom proteolytic activity on gelatin by zymography, in order to shed some light on the mechanisms of its effects. We found that SP venom presents gelatinolytic activity that could stand, at least partially, for the anti-tumoral effect of SP.

KEY WORDS: scorpionfish, venom, glioblastoma, metabolism

FINANCIAL SUPPORT: CNPq, CDTN/CNEN

CORRESPONDENCE TO:

RG Santos, Lab de Radiobiologia; CDTN/CNEN; C. P. 941; 30123-970; BH- MG – Brasil, santosr@cdtn.br

**BIODISTRIBUTION AND PHARMACOLOGICAL EFFECTS OF
SCORPAENA PLUMIERI VENOM**

J. Soprani¹, Figueiredo S.G.², R.G. Santos¹

¹*Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Comissão Nacional de Energia Nuclear, Belo Horizonte, Brasil,* ²*Laboratório de Química de Proteínas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil.* Email: santosr@cdtn.br

The venomous fish *Scorpaena plumieri* is found along the Brazilian coast, where provokes a great number of accidents causing severe injuries, characterized by local and systemic effects such as intense pain, edema, haemorrhagic and cardiovascular disorders. However, there are few studies on the effects of this venom and clinical aspects of human envenomation. Our group has worked to unravel the puzzling molecular components of its venom and their pharmacological effects. In the present study were evaluated the edematogenic activity of *Scorpaena plumieri* venom (SP) and its tissue distribution using a radiotracer as probe. Intraplantar injection of SP in the hind paw produced an immediate dose-dependent local edema with maximum response at 30 minutes post injection which correlated with the nociceptive effect. Although edema decreased after the peak phase, it maintained significant over 24 hours. This edematogenic effect is associated with an inflammatory response and lymphocyte recruitment which can be triggered by a cascade of cell signaling pathways involving proteolytic cleavage of several substrates. The role of SP venom proteolytic activities on SP induced edema is under investigation. Radiolabeled venom was obtained with high yield and biological activity preserved, suggesting that ^{99m}Tc-SP could be an useful tool for in vivo studies. Following intravenous injection of 17kBq (0,6µg/mouse) of ^{99m}Tc-SP, it was detected in the kidney (36.21%ID/g of tissue), spleen (1.08 %ID/g), brain (0.13%ID/g), lung (2.37 %ID/g) and heart (1,42%ID/g). The analysis indicated that SP is excreted mainly by the kidneys with a slow clearance rate (0.07mL/minute). It has been shown that SP contains potent enzymatic activities. The significant [^{99m}Tc]SP uptake by the heart and lungs are in agreement with toxicological data from human envenomation reporting respiratory distress, tachycardia, intense pain and swelling. This report presents for the first time the pharmacokinetics and biodistribution profile of SP and points lung, heart and kidneys as potential targets for SP pharmacological effects. Although our data shed some light on the toxicology of SP, a lot of work last to be done to make clear the pharmacological effects of the components of this venom as well as the role of proteolytic activities in the envenomation symptoms.

Key words: *Scorpaena plumieri*, radiolabeling, biodistribution, edema

Financial support: CNPq , CAPES, CDTN/CNEN

**^{99m}Tc RADIOLABELING AND BIODISTRIBUTION STUDY OF
SCORPIONFISH (*Scorpaena plumieri*) VENOM IN SWISS MICE**

Soprani, J.¹; Pujatti, P.B.¹; Figueiredo, S.G.²; Simal, C.³; Santos, R.G.¹.

¹ Lab. Radiobiologia, Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear(CDTN/CNEN)
Rua Professor Mário Werneck s/n, Cidade Universitária/UFMG
31120-970 Belo Horizonte, MG, Brasil.
falejs@yahoo.com.br
priscillapujatti@yahoo.com.br
santosr@cdtn.br

² Depto de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Espírito Santo
Avenida Marechal Campos, 1468
29060-900 Vitória, ES, Brasil.
suelygf@gmail.com

³Faculdade de Medicina/UFMG
Avenida Prof. Alfredo Balena 190 / sala 6000
Belo Horizonte - MG
CEP 30.130-100
csimal@brfree.com.br

ABSTRACT

The use of radiotracers in research of animal venom has been scarce, although it allows an excellent approach to follow the process of biodistribution and kinetics of toxins, and tissue distribution studies are very important for clinical use. Our group has demonstrated that Scorpaena plumieri venom (SP) possess high antitumoral activity and can be a source of template molecules for the development of antitumoral drugs. The purpose of this study was to radiolabel SP with ^{99m}Tc and investigate its biodistribution profile. High labeling yield was obtained and the results suggest that [^{99m}Tc]SP can be an useful tool for in vivo studies. The analysis indicated that SP is excreted manly by the kidneys with a slow clearance rate. The significative [^{99m}Tc]SP uptake in the heart and lungs may explain, at least partially, the pulmonar edema and effect cardiac observed by the envenoming.

1. INTRODUCTION

The genus *Scorpaena*, which includes the scorpionfish (*Scorpaena plumieri*), has the most venomous fishes in the Atlantic Ocean. These venoms often contain bioactive components such as catecholamines, acetylcholine and some enzymatic activities such as proteolytic, hyaluronidases and phosphatases (Garnier et al., 1996; Church and Hodgson, 2002).

S. plumieri is commonly called moreia-atí or mangangá and is the most venomous and one of the most abundant fish specie of the Brazilian coast ([Haddad et al., 2003](#)). There is very little information on the bioactivity/pharmacological activity of this fish venom (Carrijo et al., 2005).

Our group has demonstrated that SP possess high antitumoral activity against malignant tumours and can be a source of template molecules for the development (design) of antitumoral drugs (Soprani et al., 2006). Determination of pharmacokinetics parameters and toxicological evaluation are very important during the research for new pharmaceuticals.

Technetium-99m (^{99m}Tc) has been selected as a radiotracer of choice for several experimental studies and nuclear medicine procedures. Over 80% of the radiopharmaceuticals currently being used make use of this short-lived, metastable radionuclide. The preminence of ^{99m}Tc is ascribed to its optimal nuclear properties of a short half-life (about 6 hours) and a high energy gamma photon emission of 140 keV, which is suitable for high-efficiency detection and which results in low radiation exposure (Banerjee et al, 2001).

Here we report the ^{99m}Tc radiolabeling of *Scorpaena plumieri* (SP) and its utility for biodistribution study in order to determine pharmacokinetics parameters of this venom, excretion pathway and evaluate potential target organs for pharmacological and toxic effects.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Reagents

Unless otherwise noted all chemicals and media were purchased from Sigma (St. Louis, MO). ^{99m}Tc radionuclide was extracted from $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator (obtained from IPEN, São Paulo, Brazil), using solvent extraction procedures. All other reagents were from Sigma Co.

2.2. Venom

Crude SP was obtained from wild specimens of *S. plumieri*, collected on shallow water beaches on the coast of the State of Espírito Santo- Brazil. The venom extraction was carried out according to the batch method, previously described by Schaeffer et al. (1971).

2.3. Animals

Adult female Swiss mice (25-30g body weight) were obtained from Central Biotory of Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) and used in the biodistribution studies. All animals received food and water *ad libitum* and were kept in a room with natural light and controlled temperature (25°C).

2.4. SP labeling with ^{99m}Tc

Crude venom saline extract was labeled with ^{99m}Tc using stannous chloride and sodium borohydride as reducing agents according to Pauwels *et al.* (1993). Preliminary studies were done to establish the optimum conditions for obtaining the highest yield of labeled venom. Briefly, stannous chloride (2-4 μg) and sodium borohydride (20 μg) were transferred to a vial containing SP (100 μg) for reduction of pertechnetate anions. The pH was adjusted to 7.5 with sodium hydroxide. $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (3.7MBq) freshly eluted from a $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator was added to the reaction vial. The mixture was incubated for 30 min at room temperature under vacuum condition. After this time 500 μL of saline solution were added to reaction vial in order to interrupt the labeling reaction.

2.5. Labeling yield

Radiochemical analyses were performed by the method adapted from United States Pharmacopeia-USP 21 (United States Pharmacopeia, 1995) using two chromatographic systems: ascending chromatography in silica gel 60 (Merck) developed in acetone and descending chromatography in Whatman paper n° 1 developed in saturated sodium chloride solvent. Any unbound hydrophilic ^{99m}Tc -impurities such as ^{99m}Tc -pertechnetate ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) migrate to RF 1.0, and [^{99m}Tc]SP remains at RF 0.0 in ITLC-SG chromatograms developed in acetone solvent. In paper chromatography developed in saline solution, [^{99m}Tc]SP migrates to RF 1.0 whereas any insoluble ^{99m}Tc ($^{99m}\text{TcO}_2$) species remain at RF 0.0.

2.6. In vivo assay

For biodistribution studies, female Swiss mice were injected in the tail vein with 17KBq of [^{99m}Tc]SP. Animals were sacrificed after different times post-injection (5, 30, 60, 180, 1280 minutes), blood samples and organs (thyroid, heart, lungs, liver, stomach, spleen, kidneys, skeletal muscle, brain, cerebellum and tail) were removed and had the deposited activity measured in an automatic gamma spectrometer (1480 Wizard 3'' Wallac). The injected dose was adjusted by the subtraction of the radioactivity remaining in the tail. The data were expressed as percentage uptake of injected dose per volume/gram of organ (%ID/mL or %ID/g).

3. RESULTS and DISCUSSION

SP labeling yield and the specific radioactivity (27.6MBq/mg [^{99m}Tc]SP) were adequate indicating that [^{99m}Tc]SP could be an useful tool for *in vivo* biodistribution studies. Thyroid actively uptakes $^{99m}\text{TcO}_4^-$ can be used as a physiological indicator of the

preparation radiochemical purity. The low thyroid uptake of [^{99m}Tc]SP confirmed its good quality. The distribution, metabolism and excretion (DME) of an exogenous compound in a living organism depends on physicals, chemicals and physiological factors. These factors remove and dilute the compound from its place of entrance in the biological system, carry it to different tissues, allow its diffusion or promote its permeation through cell membrane and finally determine its accumulation, disposition and excretion.

Kinetic profile of [^{99m}Tc]SP in each organ is depicted in fig. 1 and allows the identification of the organs that accumulate [^{99m}Tc]SP (Fig. 1). Figure 2 summarize the kinetics for [^{99m}Tc]SP in different organs. This kind of analysis facilitates the visualization of the [^{99m}Tc]SP biodistribution profile during the DME process.

Our results showed that [^{99m}Tc]SP is excreted slowly and preferentially by the kidneys (the calculated clearance was 0,07mL/minute), but after 24 hours of injection it was almost completely eliminated (6.32%ID/g). The enzymatic activities present in this venom and the slow renal clearance also make us to think in a possible nephrotoxic effect of this venom. Hepatobiliary pathway is also involved in the excretion mechanism of [^{99m}Tc]SP as it can be

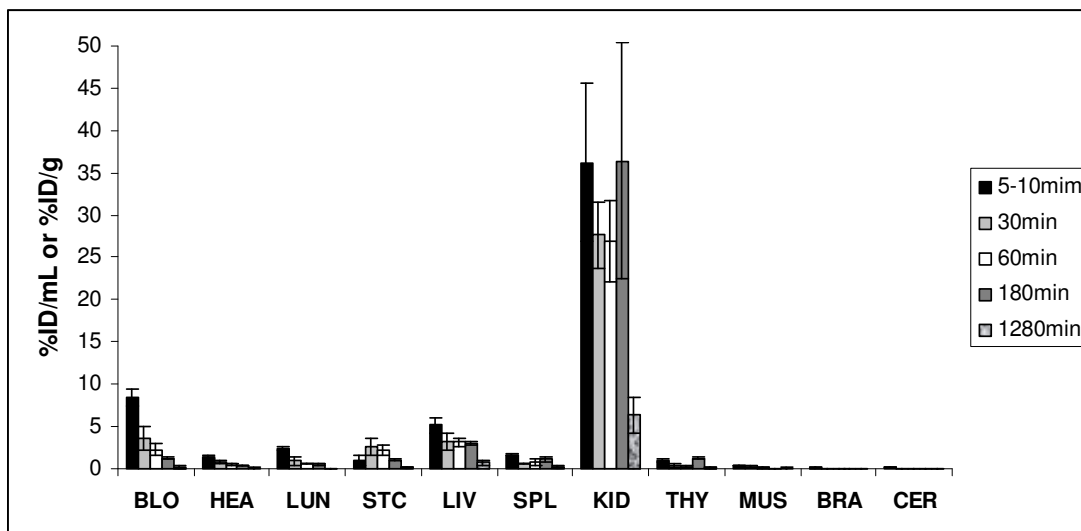


Figure 1: [^{99m}Tc]SP detected on the blood (BLO) and in different organs: heart (HEA), lungs (LUN), stomach (STC), liver (LIV), spleen (SPL), kidneys (KID), thyroid (THY), skeletal muscle (MUS), brain (BRA) and cerebellum (CER) at different times.

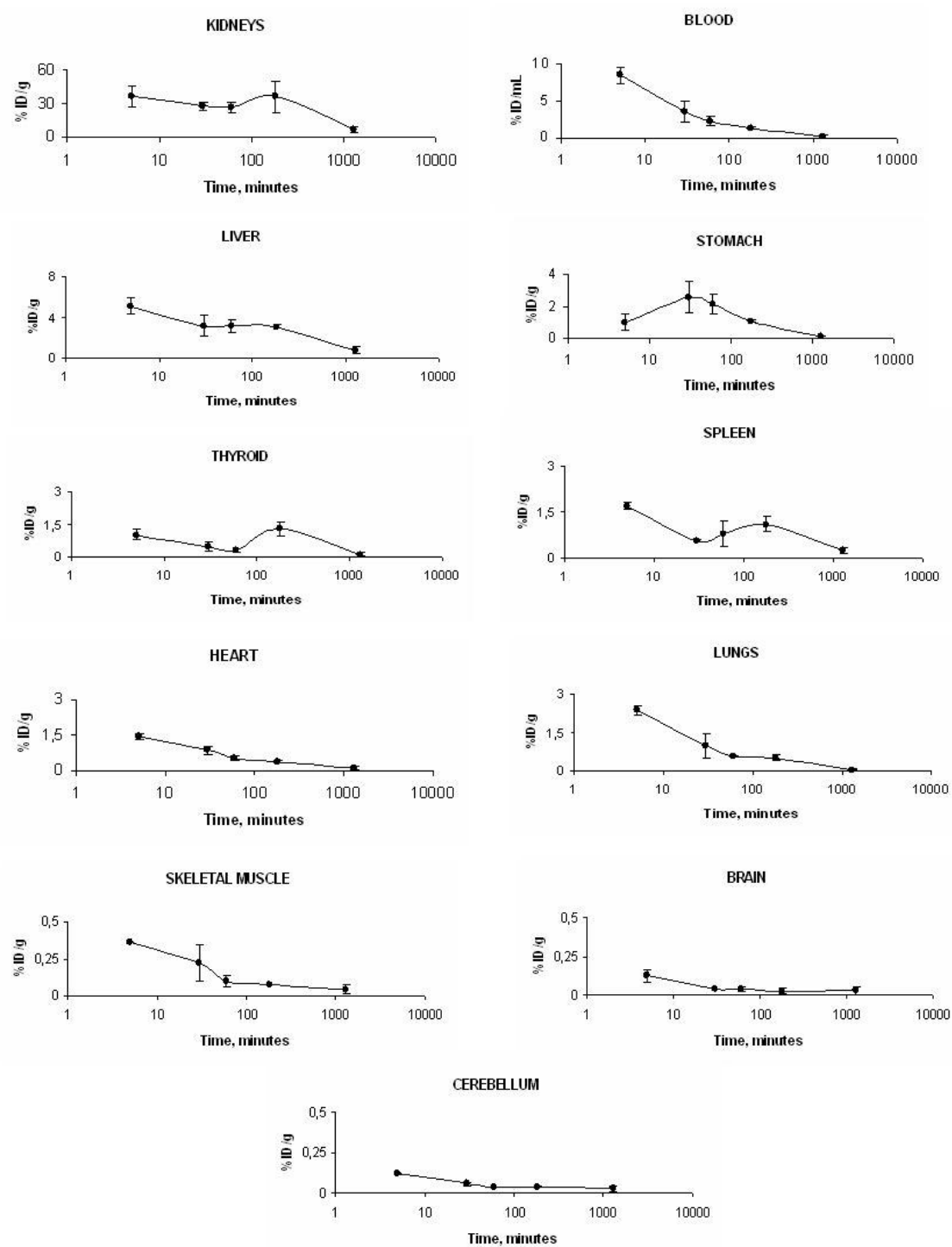


Figure 2: $[^{99m}\text{Tc}]$ SP kinetics behavior in each organs and blood over 24 hours after intravenous administration. Data were expressed as the percentage of total injected dose per tissue weight (%ID/g).

seen in Fig 1 and Fig.2. Brain uptake was negligible indicating that this venom can not pass through the blood brain barrier and probably SP may not has direct central neurotoxic effect when injected intravenously.

In spite of slight, lung (2.3%ID/g) and heart (1.4%ID/g) uptake were significant and sustained high ratio against blood up to 3 hours (Fig. 3). It has been reported that SP induces acute lung injury by protein passage from the vascular to the alveolar space and infiltration of macrophages, secretion of cytokines and proteinases with gelatinolytic activity, but the mechanism of action of these effects remains to be clarified (Boletini et al., 2006). Colasante *et al.* (1996) working with *Scorpaena* fishes reported a hypotenseve effect of this venom. Andrich, 2005 also reported that *S. plumieri* venom have a cardiovascular effect causing reduction of cardiac frequency and arterial blood pressure.

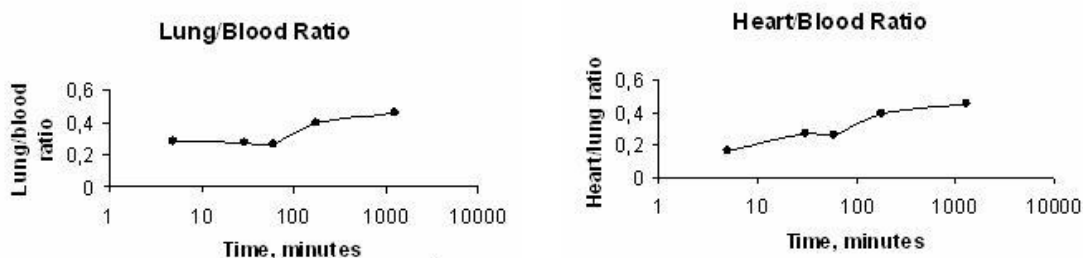


Figure 3: Ratio of [^{99m}Tc]SP in lungs and heart against the blood up 180 minutes. The [^{99m}Tc]SP increases with time in lung and heart when compared with blood percentage.

Considering the enzymatic activities present in SP venom and the sustained uptake observed on lungs and heart, our data suggest that SP venom may produce some tissue damage directly on these organs triggering a panel of pharmacological effects such as vascular permeability disturbances, extravascular proteolytic products leakage, activation of signaling cascades (chemotaxy, inflammation, clotting alteration, etc.).

4. CONCLUSIONS

These report present for the first time the pharmacokinetics profile of SP venom using a radiolabeled probe and indicate lung, heart and kidney as the potential targets for pharmacological effects of this venom. Although our data shed more light on the toxicology of SP venom a lot of work last to be done to make clear the pharmacological effects of the components of this venom.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CDTN/CNEN (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear/ Comissão Nacional de Energia Nuclear) by financial support.

REFERENCES

1. ANDRICH, F. Propriedades biológicas da peçonha do peixe-escorpião (*Scorpaena plumieri*) e purificação de uma protease gelatinolítica. *Tese de Mestrado* – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 121p. 2005.
2. BANERJEE, S.; PILLAI, M.R.A.; RAMAMOORTHY, N. Evolution of Tc-99m in Diagnostic Radiopharmaceuticals., *Seminars in Nuclear Medicine*, **XXXI**, 260-277. 2001.
3. BOLETINI, S.D.; HADDAD JR., V.; FIGUEIREDO, S.G.; LOPES, F.M.; LIMA, C. Evaluation of the acute lung injury in a murine model induced by Scorpana plumieri fish venom. In: Abstract book, *XV World Congress on Animal, Plant and Microbial Toxins*. Glasgow, Scotland. 2006.
4. CARRIJO, L.C.; ANDRICH, F.; LIMA, M.E.; RICHARDSON, M.; FIGUEIREDO S.G. Biological properties of the venom from the scorpionfish (*Sorpaena plumieri*) and purification of a gelatinolytic protease. *Toxicon*, **45(7)**:843-50. 2005.
5. CHURCH, J.E.; HODGSON, W.C. The pharmacological activity of fish venoms. *Toxicon*, **40**: 1083-1093. 2002.
6. COLASANTE, C.; MEUNIER, F.A.; KREGER, A.S.; MOLGO, J. Selective depletion of clear synaptic vesicles and enhanced quantal transmitter release at frog motor nerve endings produced by trachynilysin, a protein toxin isolated from stonefish (*Synanceia trachynis*) venom. *Eur. J. Neurosci.* **8**: 2149–2156. 1996.
7. GARNIER, P.; GOUDEY-PERRIÈRE, F.; BRETON, P.; DEWULF, C.; PETEK, F.; PERRÈIRE, C. Enzymatic properties of the stonefish (*Synanceia verrucosa* Bloch and Schneider, 1801) venom and purification of a lethal, hypotensive and cytolytic factor. *Toxicon*, **33**: 143-155. 1995.
8. HADDAD, V. JR.; MARTINS, I.A.; MAKYAMA, H.M. Injuries caused by scorpionfishes (*Scorpaena plumieri* Bloch, 1789 and *Scorpaena brasiliensis* Cuvier, 1829) in the Southwestern Atlantic Ocean (Brazilian coast): epidemiologic, clinic and therapeutic aspects of 23 stings in humans. *Toxicon*, **42**: 79-83. 2003.
9. PAUWELS, E.K.J.; WELLING, M.M.; FEITSMA, R.I.J.; ATSMÁ D.E.; NIEUWENHUIZEN, W. The labeling of proteins and LDL with ^{99m}Tc: a new direct method employing KBH4 and stannous chloride., *Nucl. Med.Biol.*, **20**, 825-833. 1993.
10. SCHAEFFER, R.C. JR.; CARLSON, R.W.; RUSSEL, F.E. Some chemical properties of the venom of the scorpionfish *Scorpaena guttata*. *Toxicon*, **9**: 69-78. 1971.
11. SOPRANI, J.; SILVA, P.R.O.; SOARES M.A.; FIGUEIREDO, S.G.; SANTOS, R.G. Effect of Scorpionfish (*Scorpana plumieri*) venom on cultured murine glioblastoma cells (RT2). *IX Congresso Brasileiro de Toxinologia*, Fortaleza, Brazil. 2006.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)