



Susana Catarina Monteiro Valente

Licenciada

**Marcação da Anexina V para imagem funcional da
apoptose celular**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática, IBILI/FMUC

Co-orientador: Ana Margarida Abrantes, Mestre, IBILI/FMUC

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Doutora Maria de Lurdes Barreira Patrício Gano

Vogal: Prof.^a Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho



Susana Catarina Monteiro Valente

Licenciada

**Marcação da Anexina V para imagem funcional da
apoptose celular**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Genética Molecular e Biomedicina

Orientador: Maria Filomena Botelho, Professora Catedrática, IBILI/UC

Co-orientador: Ana Margarida Abrantes, Mestre, IBILI/UC

Júri:

Presidente: Prof. Doutor José Paulo Nunes de Sousa Sampaio

Arguente: Doutora Maria de Lurdes Barreira Patrício Gano

Vogal: Prof.^a Doutora Maria Filomena Rabaça Roque Botelho



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Julho de 2011

Marcação da Anexina V para imagem funcional da apoptose celular

Copyright Susana Catarina Monteiro Valente, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

"Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos."

Albert Einstein

Agradecimentos

Embora a dissertação do trabalho seja individual, não posso deixar de expressar aqui os meus sinceros agradecimentos a todos os que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Um agradecimento especial à Professora Doutora Maria Filomena Botelho, que desde logo aceitou a orientação deste trabalho, pela competência com que orientou esta tese e o tempo que generosamente me dedicou, pela transmissão de conhecimentos e pela crítica e sugestões prestadas no decorrer do trabalho e pela amizade.

À minha co-orientadora Mestre Ana Margarida Abrantes pelo apoio incondicional neste trabalho, pelo estímulo e entusiasmo, pelas críticas e sugestões feitas durante a orientação, pela disponibilidade sempre revelada, pelo incansável apoio moral e pela amizade e confiança demonstradas.

À Catarina Mamede, Mafalda Laranjo e Mónica Martins pela excelente relação pessoal que criámos e por toda a colaboração, apoio e amizade.

À Dr.^a Cristina Gonçalves, investigadora nesta instituição, pelo auxílio e disponibilidade prestada, assim como a transmissão de conhecimentos nos estudos de citometria de fluxo.

À Professora Doutora Elisa Maria Serra pelo apoio e sugestões feitas na fase inicial deste projecto.

Ao *National Cancer Institute* por generosamente ter cedido a Anexina V, fulcral para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Serviço de Medicina Nuclear dos Hospitais da Universidade de Coimbra e ao Instituto de Ciências Nucleares Aplicadas por ter cedido Tecnécio-99m imprescindível na marcação da Anexina.

À Mestre Bárbara Oliveira pela disponibilidade e apoio na análise estatística dos resultados.

À Ana Marau técnica do biotério, à Cláudia Caridade secretária da direcção, aos estagiários de Medicina Nuclear da ESTS do Porto pela ajuda prestada ao longo deste projecto.

E de um modo geral a todos aqueles que directa ou indirectamente me foram ajudando, fornecendo informações, ideias e críticas, algumas das quais essenciais para a prossecução deste trabalho.

Aos meus amigos pelo estímulo e confiança, fazendo-me acreditar que era possível chegar ao fim com sucesso, mas também pela compreensão de algumas ausências.

Ao Jorge pelo pleno apoio, compreensão e motivação prestado desde o primeiro dia e que em muito contribuiu para a concretização desta etapa.

Aos meus pais e à minha irmã pelo apoio incondicional que deram em mais esta etapa da minha vida, pelo conforto e dedicação.

Índice Geral

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Cancro Colorrectal	1
1.1.1. Diagnóstico do Cancro Colorrectal	3
1.1.2. Terapêuticas do Cancro Colorrectal	4
1.2. Etiologia do Cancro	5
1.3. Apoptose	6
1.3.1. Vias de Sinalização Envolvidas na Morte Celular	7
1.3.1.1. Via intrínseca da apoptose	8
1.3.1.2. Via extrínseca da apoptose	9
1.3.2. Alterações Morfológicas.....	10
1.3.2.1. Fosfatidilserina.....	11
1.4. Detecção de Apoptose para avaliação da Resposta à Terapêutica.....	11
1.4.1. Anexina V.....	12
1.4.2. Radiomarcagem da Anexina V com Tecnécio-99metastável	12
1.5. Objectivos do Trabalho	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	17
2.1. Estudos de Química.....	17
2.1.1. Preparação da ^{99m} Tc-HYNIC-Anexina V.....	17
2.1.2. Controlo da Qualidade da ^{99m} Tc-HYNIC-Anexina V	18
2.1.2.1. Controlo visual do radiofármaco	18
2.1.2.2. Controlo da qualidade radioquímico da ^{99m} Tc-HYNIC-Anexina V	18
2.1.2.3. Controlo do pH da ^{99m} Tc-HYNIC-Anexina V.....	20
2.2. Estudos <i>In Vitro</i>	20
2.2.1. Cultura de Células.....	20
2.2.2. Estudos de Captação.....	20
2.2.3. Estudos de Captação em Células WiDr.....	21
2.2.4. Determinação da Viabilidade Celular.....	21
2.2.5. Estudos de captação em Células WiDr Incubadas com TRAIL.....	22
2.2.6. Citometria de Fluxo	22
2.2.6.1. Determinação de apoptose por citometria de fluxo através da anexina V	22
2.3. Estudos <i>In Vivo</i>	23
2.3.1. Estudos de Biodistribuição.....	23
2.3.1.1. Anestesia	23
2.3.1.2. Biodistribuição da ^{99m} Tc-HYNIC-Anexina V em ratinhos normais.....	24
2.3.1.3. Biodistribuição da ^{99m} Tc-HYNIC-Anexina V em ratinhos com xenotransplantes	24

2.3.1.4. Imagem em câmara gama.....	25
2.4. Tratamento de Dados.....	25
3. RESULTADOS.....	27
3.1. Estudos de Química.....	27
3.2. Estudos <i>In Vitro</i>	28
3.2.1. Cultura de Células.....	28
3.2.1.1. Estudos de captação em células WiDr.....	28
3.2.1.2. Estudos de Captação em Células WiDr Incubadas com TRAIL.....	29
3.3. Citometria de Fluxo.....	30
3.3.1. Determinação de Apoptose Celular por Citometria de Fluxo Através da Anexina V.....	30
3.4. Estudos <i>In Vivo</i>	31
3.4.1. Biodistribuição da ^{99m} Tc-HYNIC-Anexina V em Ratinhos Normais.....	31
3.4.2. Biodistribuição da ^{99m} Tc-HYNIC-Anexina V em Ratinhos com Xenotransplantes.....	33
3.4.3. Imagem em Câmara Gama.....	35
4. DISCUSSÃO.....	37
4.1. Estudos de Química.....	37
4.2. Estudos <i>In Vitro</i>	39
4.3. Estudos <i>In Vivo</i>	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

Índice de Figuras

Figura 1.1 - (A) Estrutura Química da ^{99m}Tc -BTAP-Anx V. (B) Estrutura Química da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V usando a tricina como co-ligando.	14
Figura 2.1 – Sistema cromatográfico para determinação da pureza radioquímica: fase estacionária ITLC-SG e fase móvel ACD.....	19
Figura 3.1 - Percentagem de captação da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V e de ^{99m}Tc pela linha celular WiDr durante um período de 120 minutos.	29
Figura 3.2 - Percentagem captação da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V, ao longo de um período de 120 minutos, pela linha celular WiDr após incubação com TRAIL.	30
Figura 3.3 - Representação gráfica da biodistribuição em percentagem de actividade injectada/grama de tecido da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V em ratinhos Balb/c nu/nu normais.	32
Figura 3.4 - Representação gráfica da biodistribuição em % de captação/grama de tecido do ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V em ratinhos Balb/c nu/nu com xenotransplante.	33
Figura 3.5 – Percentagem de actividade injectada/grama de tecido tumoral ao longo do período de 360 minutos	34
Figura 3.6 – (A) Imagem planar do Ratinho I, aos 5min após a injeção da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V., sem zoom; (B) Imagem planar do Ratinho I, aos 60 min após a injeção da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V, com zoom 1,33. A seta indica a localização do tumor.	35

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 – Estadiamento do cancro colorrectal.....	4
Tabela 3.1 – Pureza radioquímica obtida na marcação do ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V por redução através da tricina estanhosa.	27
Tabela 3.2 – Pureza radioquímica obtida na marcação do ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V por redução através do cloreto estanhoso di-hidratado.	28
Tabela 3.3 – Percentagem em apoptose da linha celular WiDr após incubação com TRAIL durante períodos de 2h, 12h, 24h e 48h.	31

Resumo

O cancro colorrectal é a segunda principal causa de morte a nível mundial por neoplasia. A externalização da fosfatidilserina é um dos primeiros eventos da apoptose. Assim, o uso da Anexina V radiomarcada com ^{99m}Tc torna-se num importante método de detecção e monitorização terapêutica de cancro *in vivo*. A ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V foi usada para detecção de apoptose em células do cancro colorrectal (WiDr) *in vitro* e *in vivo*.

A Anexina V foi marcada com o ^{99m}Tc usando o HYNIC como agente bifuncional. Foram realizados estudos *in vitro* na linha celular WiDr com e sem incubação do indutor de apoptose TRAIL em diferentes concentrações e incubados durante 2, 12 e 24h. Esses estudos incluíram a avaliação da captação entre os 5min e os 120min após a adição da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V; e estudos de citometria com Anexina V-FITC para avaliação de células em apoptose em células incubadas com TRAIL. Os estudos *in vivo* efectuados incluíram estudos de biodistribuição e estudos de imagem da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V em ratinhos *Balb/c nu/nu* normais e *Balb/c nu/nu* com xenotranplante de células WiDr.

A eficiência de marcação da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V foi superior a 90%. Através dos estudos *in vitro* observou-se que a captação celular de ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V na linha celular WiDr aumentou ao longo do tempo. As células incubadas com TRAIL também evidenciam um aumento de captação ao longo do tempo, em todas as incubações. De acordo com os estudos de biodistribuição a captação pelo tumor (%ID/g), excluindo os órgãos de excreção, rins e fígado, é ligeiramente superior aos restantes órgãos. É também possível verificar que a captação no tumor se mantém ao longo do tempo. Comparando o tumor com o músculo existem diferenças estatisticamente significativas entre estes órgãos ($p < 0,05$).

Os dados obtidos demonstram que a ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V permite a avaliação funcional de apoptose, de forma não invasiva, na detecção de cancro colorrectal.

Palavras-chave: Apoptose, Anexina V, Cancro colorrectal, Fosfatidilserina, TRAIL

Abstract

Aim: Colorectal cancer is the second leading of mortality caused by cancer. The externalization of the phosphatidylserine is one of the earliest events of the apoptosis. Once, the use of Annexin V, which has a high affinity to the phosphatidylserine, when radiolabelled with ^{99m}Tc becomes useful for *in vivo* detection and monitorization of cancer. ^{99m}Tc -Hynic-Annexin V was used to detect apoptosis in colorectal cells (WiDr) *in vitro* and *in vivo*.

Annexin V was labelled with ^{99m}Tc using HYNIC as bifunctional agent. *In vitro* studies were performed in WiDr cells cultured without and with different concentrations of TRAIL and incubated 2, 12 and 24h. These studies included cellular uptake between 5min and 120min after the addition of ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V; and flow cytometry with FITC-Annexin V to examine apoptosis cells after the same periods of time incubated with TRAIL. *In vivo* studies included biodistribution studies and imaging techniques in *Balb/c nu/nu* and *Balb/c nu/nu* xenotransplanted with WiDr cells.

The radiochemical purity of ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V was superior to 90%. Through *in vitro* studies were observed an increase cellular uptake of the ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V over time in WiDr cells. Cells incubated with TRAIL also showed an increased uptake over the time for all incubations. Accordingly to the biodistribution studies the tumour uptake (%ID/g), excluding the organs involved in the radiopharmaceutical excretion, like kidneys and liver, was a little higher than the remaining structures. It was also possible to verify that the uptake in tumour maintains over time. Comparing tumour with muscle there were statistical differences among them ($p < 0.05$).

These data demonstrate that ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V is useful in the functional detection of apoptosis in colorectal tumour, using as a noninvasive technique.

Keywords: Apoptosis, Annexin V, Colorectal cancer, Phosphatidylserine, TRAIL.

Lista de abreviaturas

- 5-FU** – 5-Fluorouracilo
- ABC** – *ATP binding cassette*
- ACD** – Ácido citrato dextrose
- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- AIF** – *Apoptosis-Inducing factor*
- Apaf-1** – *Apoptotic protease activating factor 1*
- APC** – Gene *adenomatous polyposis coli*
- Bcl-2** – *B-cell lymphoma 2*
- Bid** – *Bcl intercatating domain*
- Bq** – Becquerel (uma desintegração por segundo - unidade do sistema internacional)
- CAP** – Capecitabina
- Caspases** – *Cystein aspartic acid-specific proteases*
- CCR** – Cancro colorrectal
- CIN** – *Chromosomal instability*
- CPM** – Contagens por minuto
- CPS** – Contagens por segundo
- CT** – *Computed tomography*
- Da** – Dalton
- DD** – *Death domains*
- DDC** – Gene *deleted in colorectal cancer*
- DIABLO** – *Direct IAP binding*
- DISC** – *Death-inducing signaling complex*
- DM** – Domínio da morte
- DMEM** – *Dubelcco's modified eagle's medium*
- DR** – *Death receptor*
- DcR1** – *Decoy receptor 1*
- DcR2** – *Decoy receptor 2*
- DR4** – *Death receptor 4*
- DR5** – *Death receptor 5*
- EC** – Etilenodiciesteína
- EDDA** – Ácido etilendiamina diacético
- EDTA** – Ácido etilendiamina tetraacético
- FADD** – *Fas associated death domain*
- FAP** – *Familial adenomatous polyposis*
- FDA** – Foods and drugs administration
- FITC** – Fluorocromo isotiocianato de fluoresceína
- FOLFORI** – Ácido folínico + 5-Fluorouracilo + Irinotecano
- FOLFOX** – Ácido folínico + 5-Fluorouracilo + Oxaliplatina

HNPCC – *Hereditary nonpolyposis colorectal cancer*

HYNIC – Ácido hidrazinonicotínico: *6-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid*

IAP – *Inhibitor of apoptosis proteins*

IARC – *International agency for research on cancer*

IP – Iodeto de propídeo

ITLC – *Instant thin layer chromatography*

LS – *Lynch syndrome*

LV – Vitamina leucovorina

MAG₃ – Mercaptoacetil-glicil-glicerina

MAMA – Monoamina monoamina tióis

MLH1 – Gene *mutL homolog 1*

MLH2 – Gene *mutL homolog 2*

MLH6 – Gene *mutL homolog 6*

MMR – Gene *mismatch repair*

MSI – *Microsatellite instability*

MUTYH – Gene *mutY Homolog (E.coli)*

NCI – *National Cancer Institute*

Nk – *Natural killer*

OPG – Osteoprotegerina

p53 – Proteína 53

PARP-1 – *Poly-ADP ribose polymerase 1*

PCM – Programmed cell death

PET – *Positron emission tomography*

PMS2 – Gene *postmeiotic segregation increased 2*

PS – Fosfatidilserina

Rh – Recombinante humana

ROIS – Regiões de interesse

rpm – Rotações por minuto

SG – Sílica Gel

SMAC – *Second mitochondria-derived activator of caspases*

SPSS – *Statistical package for the social sciences*

TNF – Tumour necrosis factor

TNM – Tumor, nódulos e metástases

TRADD – *Tumor associated death domain*

TRAIL – *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

TRAIL-R1 – *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-receptor 1*

TRAIL-R2 – *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-receptor 2*

TRAIL-R3 – *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-receptor 3*

TRAIL-R4 – *Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-receptor 4*

VAC-α – *Vascular anticoagulant protein alpha*

WiDr – Linha celular de adenocarcinoma colorrectal

XELOX – Oxaliplatina + Capecitabina

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cancro Colorrectal

A nível mundial o cancro colorrectal (CCR) é, de acordo com os dados mais recentes da Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro (IARC, do acrónimo inglês *International Agency for Research on Cancer*), o terceiro tipo de cancro mais incidente, englobando ambos os sexos de todas as idades (IARC, 2010a; IARC, 2010b). Relativamente à taxa de mortalidade associada ao CCR, este é a segunda causa de morte por neoplasia (IARC, 2010a; IARC, 2010b). De acordo com estas estatísticas, Portugal segue as tendências mundiais, estimando-se que o cancro colorrectal, incluindo toda a população, é o que apresenta maior incidência e tem também associada a maior taxa de mortalidade (IARC, 2010b).

O desenvolvimento do CCR resulta da acumulação de alterações genéticas em genes cruciais no controlo do crescimento e diferenciação celular epitelial (Llor *et al.*, 2005). O epitélio do intestino grosso compreende um elevado número de células criptais, constituídas por células estaminais e células diferenciadas (enterócitos, células enteroendócrinas e células *goblet*). As células estaminais estão localizadas no limite inferior das criptas e dão origem a células progenitoras que são capazes de se diferenciar em todas as linhagens epiteliais. Em condições normais, uma das células estaminais em mitose permanece como célula estaminal no limite inferior da cripta e a outra célula migra gradualmente até à superfície luminal da cripta como célula epitelial. As células que atingem a parte mais superior sofrem apoptose e descamação, pelo que, mutações nestas células não têm essencialmente nenhum impacto na renovação normal da mucosa. Contudo, são as células com danos no ácido desoxirribonucleico (ADN) que não sofrem apoptose, que alcançam a parte superior da cripta e continuam a proliferar, dando origem a alterações pré-neoplásicas (Tanaka, 2009).

Durante vários anos o CCR foi considerado uma patologia homogénea em que a maioria se desenvolvia a partir de adenomas pré-existentes (Jass, 2007a). No entanto, o CCR engloba um complexo heterogéneo de desordens, em que cada doente com CCR apresenta uma alteração única motivada por um fundo genético/epigenético distinto (Ogino e Goel, 2008). O processo cancerígeno que dá origem ao CCR é um processo linear *multistep*, no qual alterações genéticas e epigenéticas se acumulam sequencialmente (Jass, 2007a). Embora as alterações moleculares possam ocorrer de forma estocástica em muitas células diferentes, estas alterações tendem a acumularem-se de forma não aleatória no tumor, provavelmente causada por selecção de vantagens ou desvantagens destas muitas alterações (Ogino e Goel, 2008).

O CCR é classificado em duas formas de doença: a forma hereditária ou familiar e a forma esporádica. Aproximadamente 80% dos doentes desenvolvem o CCR de forma esporádica, ou seja, sem evidência de ter herdado a alteração. Os restantes cerca de 20% de CCR ocorrem no âmbito da forma hereditária, no qual está presente uma predisposição

hereditária para a neoplasia (Dionigi *et al.*, 2007). Embora descendentes de doentes com CCR de origem esporádica apresentam um risco aumentado de desenvolver esta patologia (Morán *et al.*, 2010).

Relativamente à forma hereditária de CCR estão descritos duas síndromas genéticas de padrão autossómico dominante: a polipose adenomatosa familiar (FAP, do acrónimo inglês *familial adenomatous polyposis*) e o cancro colorrectal hereditário sem polipose (HNPCC, do acrónimo inglês *hereditary nonpolyposis colorectal cancer*) também denominado como síndrome de Lynch (LS, do acrónimo inglês *Lynch Syndrome*) (Dionigi *et al.*, 2007).

A síndrome FAP tem na sua origem uma mutação na linha germinativa do gene APC (*adenomatous polyposis coli*), que dá origem à proteína multifuncional APC, supressora tumoral. Esta desempenha um papel fulcral na via de sinalização de Wnt e em parte na regulação da degradação da β -catenina que está envolvida na regulação de proteínas do citoesqueleto (Dionigi *et al.*, 2007; Jass, 2007b; Nathke, 2004; Half *et al.*, 2009). No entanto, existe um subconjunto de doentes com características clínicas de FAP que não apresentam mutação no gene APC, mas no gene MUTYH (*mutY homolog*) (Half *et al.*, 2009). Esta síndrome caracteriza-se pelo desenvolvimento de centenas de pólipos adenomatosos no cólon e recto, que são usualmente benignos durante a adolescência, com progressão quase inevitável para carcinoma aproximadamente aos 40 anos (Galiatsatos e Foulkes, 2006; Nieuwenhuis e Vasen, 2007).

A LS caracteriza-se por mutações germinais em pelo menos quatro genes associados à reparação de erros de replicação do ADN – genes MMR (do acrónimo inglês *mismatch repair*): MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 (Hampel *et al.*, 2008). A existência destas mutações aumenta o risco de CCR e consequentemente maior é a contribuição para a susceptibilidade mendeliana. Além disso, a presença de instabilidade de microsatélites (MSI) permite identificar doentes com CCR susceptíveis de ter LS, dado que é uma característica da deficiência de MMR (Hampel *et al.*, 2008; Lubbe *et al.*, 2009).

Relativamente à forma esporádica de CCR, esta pode surgir a partir de pelo menos duas vias tumorais diferentes: a via supressora e a via mutadora. A via supressora envolve instabilidade cromossomal (CIN, do acrónimo inglês *chromosomal instability*) e está presente em 80 a 85% dos casos esporádicos de CCR. Esta via é caracterizada por alterações em genes supressores tumorais como o APC, a p53 (proteína 53) e o DCC (do acrónimo inglês *deleted in colorectal cancer*), e em oncogenes como o *K-ras*, através de perdas alélicas. A via mutadora está presente nos restantes 15 a 20% dos casos. Os tumores associados a esta via são motivados por uma elevada acumulação de mutações em sequências microsatélite. A acumulação destas mutações *frameshift* é causada por defeitos primários em genes MMR (Morán *et al.*, 2010).

Os sintomas associados ao CCR podem ser inespecíficos e difusos o que pode dificultar o reconhecimento desta neoplasia, tanto da parte do próprio doente com do médico e, consequentemente, atraso no início do tratamento (Terhaar sive Droste *et al.*, 2010). Vários dos sintomas, como prisão de ventre, perda de peso e fadiga são comuns a outras patologias

que não o CCR. Por outro lado, a obstrução intestinal e a dor abdominal ou rectal grave, que levaria a uma avaliação rápida da situação, são bastante invulgares. A presença de sangramento rectal e alterações nos hábitos intestinais, embora sejam sintomas com valor preditivo positivo elevado, são também sintomas raros (Fletcher, 2009).

A par com a susceptibilidade genética, a influência ambiente é um importante contributo para o desenvolvimento do cancro colorrectal; dados epidemiológicos sugerem a dieta como um factor preponderante nesta neoplasia (Lyll *et al.*, 2006). Comportamentos sedentários, obesidade e baixos níveis de vitamina D, consumo de carnes vermelhas e carnes processadas, álcool, assim como doenças intestinais inflamatórias como doença de Crohn e colite ulcerosa também estão identificados como factores de risco para o CCR. Contrariamente, o exercício físico parece reduzir o risco desta neoplasia (Thompson e Gerner, 2009; Hu *et al.*, 2010).

1.1.1. Diagnóstico do Cancro Colorrectal

O CCR, devido à sua longa fase pré-clínica, é uma neoplasia na qual o rastreio é extremamente vantajoso pois permite a sua detecção precoce e com maior probabilidade de cura (Heiken, 2006). Com a descoberta de mutações relacionadas com o CCR hereditário a avaliação do risco baseada nos resultados dos testes genéticos é hoje possível. Os testes genéticos podem confirmar ou rejeitar o diagnóstico a nível molecular, e assim, permitir a tomada de decisões mais adequadas nestas síndromas (Dionigi *et al.*, 2007).

A idade média dos doentes assintomáticos em risco, que não têm história pessoal ou familiar de CCR, pólipos adenomatosos, ou história de doença inflamatória intestinal, é aos 50 anos ou mais velhos (Heiken, 2006). Dado que, a forma esporádica de CCR compreende a grande fatia de doentes com esta neoplasia, o rastreio parece ser a melhor forma de permitir o diagnóstico precoce e, conseqüentemente, o tratamento potencialmente curativo. Actualmente, as opções de rastreio recomendadas no CCR são: os testes de pesquisa de sangue oculto nas fezes, que deve ser realizado anualmente; a sigmoidoscopia flexível, realizada a cada cinco anos; o enema baritado com duplo contraste também realizado de 5 em 5 anos; e a colonoscopia que deve ser efectuada a cada 10 anos (Heiken, 2006).

Em doentes sintomáticos, o uso da colonoscopia convencional é a técnica eleita de diagnóstico, uma vez que é sensível e altamente específica, e pode ser combinada com biopsia e polipectomia. A colonoscopia guiada por tomografia computadorizada (CT, do acrónimo inglês *Computed tomography*) melhorou a capacidade de detecção principalmente de lesões pequenas (Fugazzola e losca, 2007). No entanto, esta técnica não permite o estadiamento do tumor, factor crucial para o prognóstico e planeamento terapêutico, pois é com base na extensão tumoral que é decidido a realização de cirurgia ou cirurgia combinada com terapia neoadjuvante (Klessen *et al.*, 2007). As técnicas imagiológicas recentes como a PET/CT (do acrónimo inglês *Positron Emission Tomography/Computed tomography*) e da ressonância

magnética de corpo inteiro permite melhorar o estadiamento, *follow-up* e avaliação pós-terapêutica de doentes com CCR (Fugazzola e losca, 2007).

1.1.2. Terapêuticas do Cancro Colorrectal

A abordagem terapêutica do CCR é baseada no estadiamento da doença e está por isso relacionada com a profundidade de invasão da parede intestinal, a existência de envolvimento de nódulos linfáticos regionais e de metástases à distância. No caso do cancro colorrectal para além do sistema TNM (do acrónimo tumor, nódulo e metástases) também é frequente o estadiamento feito segundo a classificação de Dukes (*cf.* Tabela 1.1).

O CCR é normalmente tratado por cirurgia de ablação se detectado em estadios precoces, englobando a quimioterapia adjuvante em estadios mais tardios. Assim, resumidamente, o corrente paradigma terapêutico consiste na: (i) ressecção cirúrgica curativa em doentes diagnosticados em estadios iniciais de doença localizada (Dukes A); (ii) cirurgia acompanhada ou não de quimioterapia adjuvante quando existe extensão local mas sem envolvimento linfático (Dukes B); (iii) ressecção cirúrgica do tumor primário seguida de quimioterapia adjuvante para estados avançados da doença com envolvimento nodular linfático (Dukes C) ou metástases em outros órgãos (Dukes D) (Hector e Prehn, 2009). As metástases à distância, que ocorrem normalmente no pulmão e/ou fígado e a realização de cirurgia das lesões secundárias constitui também parte da abordagem terapêutica actual (Gravalos *et al.*, 2009).

Tabela 1.1 – Estadiamento do cancro colorrectal

TNM	Estadiamento		Descrição Patológica	Sobrevida aos 5 anos aproximada (%)
	Númérico	Dukes		
T1N0M0	I	A	Cancro está limitado à mucosa e submucosa	>90
T2N0M0	II	B1	Cancro estende-se até à muscular	85
T3N0M0	III	B2	Cancro estende-se até ou através da serosa	70-80
TxN1M0	IV	C	Cancro envolve nódulos linfáticos regionais	35-65
TxNxM1	V	D	Metástases à distância (ex., fígado e pulmão)	5

(adaptado de *Harrison Internal Medicine*)

Embora a cirurgia seja a modalidade de tratamento primária, a ressecção curativa não é possível para cerca de 25% dos doentes, e mesmo quando é realizada ressecção radical, a recorrência intra-abdominal e à distância ocorre em mais de um terço dos casos (Aschele *et al.*, 2009). Assim, para erradicar a existência de possível doença micrometastática remanescente da cirurgia a administração de quimioterapia adjuvante apresenta-se vantajosa, permitindo reduzir o risco de recorrência (De Dosso *et al.*, 2009). De um modo geral, as estratégias de quimioterapia têm por objectivo induzir toxicidade e regressão tumoral ou mesmo parar a progressão tumoral (Kasibhatla e Tseng, 2003).

Desde 1957 que o agente citostático 5-Fluorouracilo (5-FU) tornou-se disponível clinicamente, desempenhando um papel importante no tratamento de várias neoplasias, designadamente no CCR (Sugimoto *et al.*, 2009). A taxa de resposta no CCR era de 10-20% após a administração única em bólus do 5-FU, aumentando para mais de 30% pelo uso do 5-FU modulado com o ácido folínico – vitamina leucovorina (LV) (Noordhuis *et al.*, 2004). Com vista a uma taxa de resposta superior, assim como a sobrevida livre de doença, o actual paradigma terapêutico baseia-se na combinação do 5-FU/LV com a oxaliplatina ou com o irinotecano, tendo aumentado a taxa de resposta para mais de 60% (Hector e Prehn, 2009; Noordhuis *et al.*, 2004). Os regimes anteriormente descritos são designados pelos acrónimos FOLFOX e FOLFIRI, e descrevem a combinação de FOL relativa ao ácido folínico e F relativo ao 5-FU, com OX de oxaliplatina ou IRI de irinotecano, respectivamente (Segal e Saltz, 2009).

Outro agente utilizado é a capecitabina (CAP), um pró-fármaco oral, que é convertido em 5-FU através da timidina fosforilase no local do tumor. Este agente apresenta uma eficácia idêntica ao 5-FU combinado com a leucovorina (Segal e Saltz, 2009). Esta activação intratumoral selectiva pode melhorar o índice terapêutico, tendo sido demonstrado que a CAP é uma alternativa efectiva ao 5-FU/LV na terapêutica de primeira linha para metástases CCR. O regime XELOX é composto pela combinação de CAP e Oxaliplanina (De Dosso *et al.*, 2009).

Para além dos regimes terapêuticos baseados na administração isolada de FOLFOX e FOLFIRI, estes também podem ser combinados com anticorpos monoclonais, como o bevacizumab e o cetuximab, que estão dirigidos para o factor de crescimento vascular endotelial e para o receptor do factor de crescimento epidérmico, respectivamente (Correale *et al.*, 2008)

Outro agente anti-cancerígeno actualmente usado apenas em ensaios pré-clínicos é o ligando indutor de apoptose relacionado com o factor de necrose tumoral (TRAIL, do acrónimo inglês *Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*). O TRAIL é uma molécula naturalmente expressa por células imunitárias e induz preferencialmente apoptose em células cancerígenas sem toxicidade nos tecidos normais (Szliszka *et al.*, 2009).

O cancro do cólon e outras neoplasias supra-peritoneais, como apresentam um baixo risco de recorrência local a radioterapia não está normalmente indicada (Andre *et al.*, 2007).

1.2. Etiologia do Cancro

A causa associada à maioria dos cancros permanece desconhecida. As células são continuamente alvo de danos no ADN, em consequência de agressões externas como a luz ultravioleta, a radiação ionizante, o stresse oxidativo entre outros. Como resultado desse dano podem ocorrer mutações, assim com rearranjo cromossómico ou perda cromossomal (Gewirtz *et al.*, 2007). Tais mutações levam à expressão anormal ou irregular dos proto-oncogenes, deleção de genes supressores tumorais, ou à combinação de ambos. Esta instabilidade genética proporciona o modo pela qual uma célula normal pode acumular mutações suficientes

para se tornar maligna, estando assim na base da proliferação celular anormal (Brown e Attardi, 2005; Rugo, 2010).

De um modo geral, a base do cancro era essencialmente atribuída à proliferação acelerada e desregulada, que levava à conseqüente expansão celular e acumulação de massas teciduais. No entanto, progressos recentes permitiram ampliar a compreensão do cancro e a sua etiologia. Tendo-se verificado que os reguladores fundamentais do ciclo celular, envolvidos na protecção contra a instabilidade genómica, estão frequentemente alterados em vários tipos de tumores, com conseqüente impacto nos elementos de controlo proliferativo, como os *checkpoints* do ciclo celular e respostas ao dano no ADN (Kasibhatla e Tseng, 2003). A p53, proteína supressora tumoral, desempenha um papel fulcral neste mecanismo de manutenção da integridade genómica, actuando como guardião do genoma na protecção celular contra o cancro. (Brown e Attardi, 2005; Bhana e Lloyd, 2008). A actividade supressora tumoral da p53 é explicada pela sua capacidade de evitar a expansão/replicação de células potencialmente malignas por indução de apoptose, paragem na fase G1 do ciclo celular ou reparação do ADN (Chylicki *et al.*, 2000; Fridman e Lowe, 2003).

O gene *TP53* é o mais frequentemente mutado no cancro humano (Brown e Attardi, 2005). A conseqüência da ruptura da função da p53 promove defeitos nos *checkpoints* celulares, instabilidade genómica, sobrevivência inapropriada permitindo a contínua proliferação e evolução das células deletérias (Fridman e Lowe, 2003).

Clinicamente os tumores são acumulações de um largo número de células que escaparam aos mecanismos que restringem o seu número, pela ausência ou insuficiência da apoptose (Tamm *et al.*, 2001). Assim, esta condição pode ser melhorada se o tumor for submetido a modalidades terapêuticas que aumentem a apoptose, retardando o crescimento, como a radiação, a quimioterapia, a ablação hormonal ou a terapêutica fotodinâmica. (Kerr *et al.*, 1994; Boersma *et al.*, 2003; Subbarayan *et al.*, 2003)

A actuação dos fármacos anti-cancerígenos e terapias físicas na célula interferem na cascata da apoptose de modos distintos, e a sua forma de actuação é variável, despoletando conseqüentemente a activação de vias diferentes, sendo por isso importante uma melhor compreensão dos aspectos inerentes ao processo de morte celular por apoptose, como as alterações bioquímicas, das cascatas e das vias envolvidas.

1.3. Apoptose

A homeostase na proliferação celular, desenvolvimento de órgãos e regulação do sistema imunitário é essencialmente mantida pela principal forma de morte celular programada, a apoptose, que selectivamente elimina as células desnecessárias, danificadas ou potencialmente deletérias (Lahorte *et al.*, 2004; Kenis *et al.*, 2006; Hail *et al.*, 2006; Kim, 2005; Fadeel e Orrenius, 2005). A desregulação do mecanismo de apoptose altera assim o balanço fisiológico contribuindo para uma multiplicidade de doenças. As patologias resultantes da ocorrência excessiva de apoptose levam à remoção prematura de células necessárias como

ocorre em doenças degenerativas, rejeição de órgãos após transplante, isquemia e enfarte miocárdio. Por outro lado, a diminuição da apoptose, caracterizada pela proliferação celular excessiva e acumulação desnecessária de células, contribui para patologia como o lúpus eritematoso sistémico e a artrite reumatóide por permitir a sobrevivência demasiada de células imunológicas competentes que danificam órgãos saudáveis, mas também o desenvolvimento de tumores (Subbarayan *et al.*, 2003; Blankenberg, 2008a; Kiechle e Zhang, 2002).

A apoptose inicialmente descrita por Kerr e colegas em 1972 é uma forma de morte celular regulada pelo ADN, sendo por isso um processo organizado e dependente de energia (Kerr *et al.*, 1972). Embora a apoptose tenha sido considerada, nas últimas décadas, sinónimo de morte celular programada (PCM, do acrónimo inglês *Programmed Cell Death*), recentemente tornou-se evidente que existem outros tipos de suicídio celular programado não-apoptótico, que têm em comum o facto de serem executadas por processos celulares activos que podem ser interceptados por interferir com a sinalização intracelular. O que os distingue da forma acidental de necrose que ocorre de forma caótica, e é caracterizado por edema celular e ruptura da membrana plasmática, levando à liberação dos componentes celulares e a resposta inflamatória dos tecidos envolventes (Abedin *et al.*, 2007; Broker *et al.*, 2005).

A apoptose pode ser identificada pela morfologia das células, vias bioquímicas activadas, mecanismos de eliminação, a as consequências extracelulares de morte celular como a ausência de resposta inflamatória (Tait, 2008). A forma de morte celular por apoptose, necrose ou outros, depende em parte da natureza do sinal que a despoleta, do tipo de tecido e do estado de desenvolvimento do tecido, assim como do meio fisiológico envolvente (Burz *et al.*, 2009).

Este tipo de morte celular pode ser desencadeada por uma grande variedade de estímulos e condições, quer fisiológicas quer patológicas, dentro ou fora da célula através de duas vias. (Strasser *et al.*, 2000; Boersma *et al.*, 2005). No entanto, nem todas as células irão necessariamente morrer em resposta ao mesmo estímulo (Elmore, 2007). Os estímulos endógenos que podem iniciar a apoptose são, por exemplo, a ausência de oxigénio, nutrientes, factores de crescimento/sobrevivência, por outro lado os estímulos exógenos que a podem iniciar são a radiação ionizante, terapia anti-hormonal ou fármacos quimioterapêuticos, mas as citocinas podem induzir as duas vias (Kim, 2005; Blankenberg, 2008a; Koornstra *et al.*, 2003; Blankenberg, 2009; Mirzaie-Joniani *et al.*, 2002).

1.3.1. Vias de Sinalização Envolvidas na Morte Celular

Embora a compreensão detalhada das vias de sinalização que despoletam a apoptose seja incompleta, o mecanismo de apoptose é reflexo de duas vias distintas que convergem mutuamente através da cascata proteolítica complexa que envolvem a activação de grupos de cisteínas proteases denominadas de caspases (do acrónimo inglês *cystein aspartic acid-specific proteases*), executores centrais na indução da morte celular (Lahorte *et al.*, 2004; Wu, 2009; Ghobrial *et al.*, 2005). Estas podem ser classificadas em dois grupos, as caspases

activadoras ou apicais e as caspases efectoras ou executoras. As caspases activadoras são capazes de activação auto-catalítica, enquanto as caspases efectoras necessitam de activação para iniciarem a clivagem das caspases (Ricci e El-Deiry, 2007). Todo o processo é controlado por proteínas da família Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*), que embora apresentem funções moleculares diferentes, partilham sequências homólogas variando nos domínios Bcl-2 homólogos ou na homologia alfa-helical Bcl-2 (Hector e Prehn, 2009). As caspases são expressas como pro-enzimas que devem ser proteoliticamente processadas de forma a tornarem-se activas (Fadeel e Orrenius, 2005).

As vias apoptóticas são classificadas em intrínseca e extrínseca, e são também denominadas de via mitocondrial ou via dos receptores da morte, por respectivamente serem activadas por sinais intracelulares desencadeados pelas mitocôndrias activadas ou por serem activados sinais externos que actuam sobre os receptores da morte existentes na superfície da célula (Elmore, 2007). Subsequentemente à activação das cascatas apoptóticas, várias proteínas vitais são clivadas. Essa clivagem permite a correlação dos eventos morfológicos com os mecanismos moleculares subjacentes (Ziegler e Groscurth, 2004).

Para além das duas principais vias, extrínseca e intrínseca, que requerem a activação de caspases, existem outras vias que activam a apoptose. Por exemplo, as células T citotóxicas e as células Nk (do acrónimo inglês *natural killer*) despoletam de células susceptíveis alvo, quer através do ligando Fas ou através da via dependente da perforina/granzima B (Fadeel e Orrenius, 2005).

1.3.1.1. Via intrínseca da apoptose

A via intrínseca ou mitocondrial apresenta como característica distintiva o envolvimento da mitocôndria e é mediada pela libertação do citocromo c através deste organelo (Stoka *et al.*, 2006). A base bioquímica para o efluxo do citocromo c pela mitocôndria é alvo de especulação. No entanto, estudos mais recentes têm-se focado no papel dos membros da família Bcl-2, que parecem controlar e regular esta via (Hector e Prehn, 2009; Elmore, 2007; Kaufmann, 2007).

A via intrínseca depende da permeabilização da membrana mitocondrial externa para permitir a libertação selectiva de citocromo c e outros polipéptidos para o espaço citoplasmático (Hail *et al.*, 2006; Kaufmann, 2007). A permeabilização da membrana externa depende da razão entre os membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos da família Bcl-2. Por exemplo, os membros da família anti-apoptótica, como por exemplo Bcl-2 e Bcl-X_L, existentes na membrana mitocondrial externa, podem ser destabilizados por um aumento da expressão ou pela indução de membros da família pró-apoptótica Bcl-2, como por exemplo a Bax, Bad e Bak. Se a razão entre os membros da família pró-apoptótica e os membros da família anti-apoptótica posteriormente aumenta, possibilita a formação de canais proteicos na membrana externa, pelos membros da família pró-apoptótica, permitindo então a libertação do citocromo c (Hail *et al.*, 2006).

Uma vez no citosol, o citocromo c liga-se à proteína adaptadora Apaf-1 (do acrónimo inglês *Apoptotic protease activating factor 1*) e à procaspase-9 formando uma estrutura

conhecida com “apoptossoma” (Lahorte *et al.*, 2004; Wu, 2009). Esta estrutura, o apoptossoma, subsequentemente cliva e activa a caspase-9, que é, por sua vez, responsável pela activação das caspases efectoras -3, -6 e -7 (Hector e Prehn, 2009; Blankenberg, 2009). A caspase-3 activada activa a polimerase poli ADP ribose 1 (PARP-1, do acrónimo inglês *poly-ADP ribose polymerase 1*) que facilita a degradação sistemática do ADN em múltiplos fragmentos de tipicamente 180-200 pb (Lahorte *et al.*, 2004). Mas também despoleta outros processos bioquímicos e moleculares da apoptose que levam à desagregação da célula, como por exemplo clivagem das proteínas celulares e o empacotamento das proteínas celulares incluindo o citoesqueleto e matriz nuclear (Blankenberg, 2009; Johnstone *et al.*, 2008).

Em determinadas condições a membrana mitocondrial interna também pode ser permeabilizada em conjunto com a membrana externa libertando outras proteínas como o factor indutor de apoptose (AIF, do acrónimo inglês *apoptosis-inducing factor*), Omi e Endo G, que são translocados para o núcleo resultando numa forma de apoptose independente das caspases (Blankenberg, 2008b).

1.3.1.2. Via extrínseca da apoptose

A via apoptótica extrínseca ou dos receptores da morte é activada através da ligação aos receptores da morte existentes na superfície da célula dos seus ligandos específicos, activando as caspases parcialmente independentes da mitocôndria (Hector e Prehn, 2009). Os receptores da morte são membros das glicoproteínas transmembranares da superfamília dos receptores TNF (do acrónimo inglês *tumor necrosis factor*) do tipo I, e são caracterizados por partilhar domínios extracelulares ricos em cisteína e possuem um motivo citoplasmático, que transmite o sinal, denominado de domínio da morte (DM) (Elmore, 2007; D'Amelio *et al.*, 2008; Dempsey *et al.*, 2003). Também os ligandos são proteínas transmembranares do tipo II libertadas da superfície sobretudo por metalo-proteinases específicas (Kopper e Peták, 2008; Gulow *et al.*, 2006). Foram já identificados seis receptores da morte: TNF-R1 (CD120 α), CD95 (APO-1, FAS), DR3 (APO-3, LARD, TRAMP, WSL1), TRAIL-R1 (APO-2, DR4), TRAIL-R2 (DR5, KILLER; TRICK2) e o DR6. Relativamente aos ligandos estão identificados o TNF- β (LT- α), LT- β , TWEAK (APO-3L), TNF α , CD95 ligando (CD95L) (APO-1L, FasL) e o TRAIL (Gulow *et al.*, 2006).

Após a ligação dos ligandos, os receptores sofrem alterações conformacionais que resultam no recrutamento de moléculas do citoplasma, como a FADD (do acrónimo inglês *Fas Associated Death Domain*) ou a TRADD (do acrónimo inglês *Tumor Associated Death Domain*) e a caspase-8 ou -10, para formar o complexo sinalizante de indução da morte – DISC (do acrónimo inglês *death-inducing signaling complex*) (Ricci e El-Deiry, 2007; Blankenberg, 2008b). O complexo DISC permite a auto-activação das caspases recrutadas (Johnstone *et al.*, 2008). Estas vão subsequentemente clivar e activar as caspases executoras a jusante, terminando com a activação da caspase-3 (Blankenberg, 2008b; D'Amelio *et al.*, 2008). Uma vez activada, a caspase-3 vai desencadear a desagregação celular já referida na via intrínseca.

Alternativamente, as caspases-8 e -10 podem conectar a via extrínseca com a intrínseca através da clivagem da Bid (do acrónimo inglês *Bcl intercatting domain*), o único membro BH3 da família Bcl-2 (Ricci e El-Deiry, 2007; Dai *et al.*, 2009). A Bid truncada despoleta alterações conformacionais na Bak e na Bax, proteínas necessárias para formar canais na membrana mitocondrial externa, mediando assim a permeabilização da membrana mitocondrial externa, que conseqüentemente permite a libertação do citocromo c para o citoplasma. Assim, o recrutamento da via intrínseca da apoptose pela activação da caspase-8 pode servir para iniciar e/ou amplificar os sinais intracelulares que desencadeiam a apoptose (Hail *et al.*, 2006; Blankenberg, 2009).

Ambas as vias são altamente reguladas e podem ser controladas pelas proteínas inibidoras da apoptose (IAP, do acrónimo *inhibitor of apoptosis proteins*). As proteínas IAP inibem a actividade enzimática de caspases e também despoletam a sua degradação proteossomal. A libertação mitocondrial da proteína pró-apoptótica SMAC/DIABLO (do acrónimo inglês *Second mitochondria-derived activator of caspases/Direct IAP binding*) durante a apoptose pode superar esse bloqueio (Hector e Prehn, 2009).

1.3.2. Alterações Morfológicas

Antes de ocorrerem alterações morfológicas existe uma sequência de iniciação, denominada *lag phase* ou *trigger phase*. Este tempo de latência entre a exposição aos factores que despoletam a apoptose e as alterações morfológicas é variável, e também está dependente do tipo de célula, das condições do meio envolvente, bem como a intensidade de exposição e a duração do estímulo (Blankenberg, 2008b).

As alterações morfológicas iniciam-se com a retracção da célula que causa perda de aderência quer com a matriz extracelular, como com as células vizinhas (Grivicich *et al.*, 2007). Nesta fase inicial do processo de apoptose é possível visualizar com recurso ao microscópio a diminuição da célula, no qual o citoplasma se torna mais denso e os organelos mais compactados, bem como uma das principais características da apoptose, a picnose que resulta da condensação da cromatina (Elmore, 2007). Posteriormente a membrana celular forma prolongamentos (*blebbing*) e o conteúdo intracelular é empacotado em pequenas estruturas vinculadas por membranas, denominadas de corpos apoptóticos (Blankenberg, 2009). Os corpos apoptóticos são removidos rápida e eficientemente por fagócitos ou por células vizinhas. (Cotter, 2009).

Estas transformações morfológicas visíveis são acompanhadas de alterações bioquímicas. Ao nível intracelular ocorre a degradação do ADN em fragmentos de elevado peso molecular e fragmentos oligonucleossomais, assim como a clivagem de proteínas celulares específicas. Relativamente à superfície da célula ocorre uma alteração bioquímica fundamental para o reconhecimento dos fagócitos, a externalização da fosfatidilserina (Tamm *et al.*, 2001). Esta externalização precede a maioria das alterações morfológicas anteriormente referidas, como a condensação do núcleo ou a diminuição do citoplasma (Lahorte *et al.*, 2004).

1.3.2.1. Fosfatidilserina

A fosfatidilserina (PS, do acrónimo inglês *phosphatidylserine*) é um fosfolípido de membrana que está ubiquamente presente em membranas eucarióticas e procarióticas (Vance e Steenbergen, 2005). A membrana plasmática caracteriza-se por uma distribuição assimétrica dos fosfolípidos em células eucariotas. Os aminofosfolípidos como a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina estão geralmente em maior quantidade no folheto interno, enquanto a fosfatidilcolina, a esfingomielina e a glicosfingolípido estão principalmente localizados no folheto externo (Chaurio *et al.*, 2009). A grande variedade destes fosfolípidos na membrana define a fluidez desta, dado que regula as propriedades das proteínas aí existentes (Vance e Steenbergen, 2005).

A exposição da PS à superfície actua como sinal de reconhecimento para os macrófagos que expressam receptores da PS, promovendo assim a eliminação das células apoptóticas (Lahorte *et al.*, 2004). Ainda que a identificação de um receptor dominante capaz de reconhecer esse sinal permaneça controversa (Botto, 2004).

Embora no passado, a exposição da PS para a membrana externa fosse considerada como um dos pontos de não retorno da morte celular, esta não define necessariamente a morte celular (Kroemer *et al.*, 2009). A exposição da PS pode ocorrer a baixos níveis e de forma reversível sob condições de stresse, não sendo necessariamente significado de apoptose. A reversibilidade da exposição da PS é reposta com a remoção do stresse fisiológico, como são exemplo o óxido nítrico ou a privação dos factores de crescimento, entre outros. Neste sentido, a exposição da PS, ainda que de forma reversível, pode ser usada para avaliar tecidos em risco de morte celular e que devem ser recuperados ou sujeitos a imediata intervenção terapêutica (Blankenberg, 2008a). Além disso, existem linhas celulares não-apoptóticas que apresentam variantes da normal exposição da PS, como granulócitos, mastócitos, neutrófilos, linfócitos B e T, assim como anticorpos estimulados (Blankenberg, 2008a; Kroemer *et al.*, 2009).

1.4. Detecção de Apoptose para avaliação da Resposta à Terapêutica

A imagem *in vivo* constitui uma ferramenta indispensável na pesquisa de cancro. Para melhorar a abordagem terapêutica individual torna-se necessário localizar e estadiar o tumor, mas essencialmente monitorizar a resposta do cancro à terapêutica aplicada. A morte celular programada tem um papel preponderante quer no desenvolvimento do cancro quer na resposta à terapêutica. Assim, a aplicação de técnicas de imagem da apoptose poderá ser um excelente método para a monitorização da terapêutica, dado que poderão dar informação clínica acerca do tempo e extensão da apoptose, contribuindo para a escolha dos protocolos terapêuticos.

Apesar de mais de uma década de intensa investigação, ainda não existe um método completamente validado para imagem de apoptose (injúria irreversível) ou stresse fisiológico celular (potencialmente reversível) para humanos. Existem vários traçadores propostos, mas

ainda não foi nenhum aceite pela FDA (do acrónimo inglês *Food and Drug Administration*). A Anexina V radiomarcada é um dos poucos radiotraçadores que tem sido amplamente usado em ensaios da fase II, e que permanece em desenvolvimento (Blankenberg, 2009).

1.4.1. Anexina V

A Anexina V é um ligando natural da PS, com afinidade nanomolar, que pertence à superfamília de proteínas anexinas (Chaurio *et al.*, 2009; Sarda-Mantel *et al.*, 2006). Esta é constituída por 319 aminoácidos e apresenta um peso molecular de 36 kDa (Vriens *et al.*, 1998).

Os membros da família de anexinas compartilham funções e estrutura idênticas, e caracterizam-se pela capacidade de se ligarem à superfície de fosfolípidos de carga negativa de forma reversível e dependente de cálcio (Ca^{2+}) (Brumatti *et al.*, 2008). Cada anexina é constituída por duas regiões diferentes, o domínio N-terminal único, também denominado de cauda, e o domínio C-terminal ou núcleo. O domínio C-terminal consiste em quatro repetições similares de aproximadamente 70 aminoácidos, excepto para a Anexina VI que contém 8 repetições. Este domínio é em geral o responsável pela ligação ao Ca^{2+} e aos fosfolípidos (Chaurio *et al.*, 2009).

A Anexina V encontra-se principalmente no espaço intracelular, no citosol, ainda que em pequena concentração circule também no compartimento sanguíneo de humanos saudáveis. Além disso, esta proteína é expressa numa variedade de tipos celulares, nomeadamente: cardiomiócitos, endotélio vascular, eritrócitos, trombócitos, linfócitos, células gliais, astrócitos, oligodendrócitos, células de *Schwann*, hepatócitos, células da mucosa brônquica, condrócitos e osteoblastos (Lahorte *et al.*, 2004).

Embora sejam bem estudadas várias funções desta proteína, a função fisiológica precisa das anexinas permanece incerta. Nos finais da década de 70 foi isolada da placenta humana e, posteriormente, foi descoberta nos vasos sanguíneos e devido às suas propriedades anti-coagulantes foi denominada de proteína vascular anti-coagulante alfa (VAC- α , do acrónimo inglês *vascular anticoagulant protein alpha*) (Boersma *et al.*, 2005). Além desta função, a anexina inibe a fosfolipase A_2 , uma enzima responsável pela libertação de ácido araquidónico, componente do processo inflamatório, pela membrana celular; e inibe a proteína cinase C, responsável pelo sistema de sinalização intracelular (Blankenberg, 2008a).

O número de locais de ligação à PS pela Anexina V em células tumorais apoptóticas são de 6 a 24×10^6 locais/célula. E, tendo em conta a esteriometria da ligação anexina V à PS, quatro a oito moléculas de anexina são capazes de se ligar por cada resíduo de PS exposta (Lahorte *et al.*, 2004).

1.4.2. Radiomarcção da Anexina V com Tecnécio-99metastável

A anexina V marcada com o isótopo Tecnécio-99metastável (^{99m}Tc) é o marcador de expressão da PS mais amplamente investigado; no entanto foram usados para a marcação da

Anexina V outros isótopos radioactivos, nomeadamente os halogéneos, tais como ^{123}I , ^{125}I , ^{124}I e ^{18}F . Nos últimos anos foram desenvolvidos vários radioligandos de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Anexina V, variando o tipo de agentes quelantes e co-ligandos usados na marcação, tendo resultado, como tal, em comportamentos biológicos distintos. (Lahorte *et al.*, 2004).

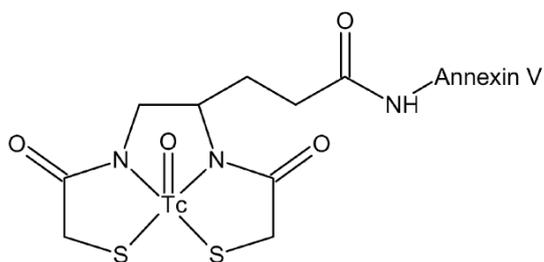
A marcação de proteínas e péptidos com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ geralmente envolve a derivatização através de agente um quelante bifuncional. Os agentes quelantes como N_3S -triamidéticos, N_2S_2 -diamidéticos, MAMA (monoamina monoamina tióis) são normalmente usados para a marcação de pequenas moléculas. No entanto, dado que a maioria desses quelantes bifuncionais requer condições de radiomarcação mais rigorosas, como temperaturas e pH elevados não podem ser aplicados na radiomarcação de proteínas (Verbeke *et al.*, 2003).

O primeiro ensaio clínico da Anexina V radiomarcada foi realizado em doentes com cancro do pulmão, linfoma não Hodgkin e cancro da mama, tendo sido utilizado o radioligando marcado $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -4,5-bis-(tioacetamido)pentanoil-Anexina V, ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BTAP-Anexina V) (*cf.* Figura 1.1 1.1A) (Lahorte *et al.*, 2004; Belhocine *et al.*, 2002). O processo de marcação deste radioligando envolvia vários passos, iniciando-se com a quelação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ na presença de gluconato estanhoso, seguido de um período de incubação sob aquecimento, que permitia a formação de complexo estável $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - N_2S_2 com o ligando pentioato. Após o arrefecimento era adicionada a anexina V-rh, seguido de um novo período de incubação. A etapa final da marcação consistia na purificação através de filtração em gel (Kemerink *et al.*, 2001). Este processo de marcação configurou-se moroso e complicado, expondo o operador à radiação, o rendimento radioquímico obtido também não era muito elevado, e além disso apresentava excreção não específica pela biliar (Lahorte *et al.*, 2004; Blankenberg, 2008b).

Outro radioligando aplicado em ensaios clínicos foi o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -(n-1-imino-4-mercaptobutyl)-Anexina V, ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -i-Anexina V). O processo de marcação do radioligando $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -i-Anexina V apresenta um método de marcação mais simples que o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BTAP-Anexina V, embora o período de incubação após a marcação seja muito extenso, 2 horas. Além disso, a eficiência de marcação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -i-Anexina V não é superior a 82%, e por isso inconveniente para o uso clínico. A *clearance* do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -i-Anexina V do corpo humano comparativamente ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BTAP-Anexina V é mais lenta e a dose de radiação é maior (Boersma *et al.*, 2003).

Ambos os radioligandos $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -i-Anexina V e $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BTAP-Anexina V apresentam uma captação muito elevada ao nível do fígado, rins e baço, e como tal não são bons na detecção de apoptose ao nível abdominal (Boersma *et al.*, 2005).

A



B

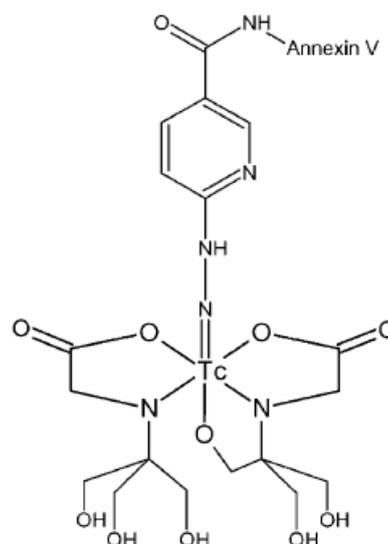


Figura 1.1 - (A) Estrutura Química da ^{99m}Tc -BTAP-Anx V. (B) Estrutura Química da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V usando a tricina como co-ligando.

O método de marcação da anexina V baseado no agente bifuncional hidrazino nicotinamida (HYNIC do acrónimo inglês *6-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid*) foi estudado no ensaio clínico subsequente (Blankenberg, 2009). A introdução do HYNIC representa um marco no desenvolvimento dos radiofármacos de péptidos marcados com ^{99m}Tc . Dado que permitiu uma eficiência de marcação mais elevada, pois o ligando HYNIC ocupa apenas um local de coordenação, e co-ligandos como a tricina, o ácido etilendiamina diacético (EDDA, do acrónimo *ethylenediamine diacetic acid*) podem completar a esfera de coordenação do metal (Pietzsch *et al.*, 2007). O HYNIC requer duas moléculas de tricina para completar a esfera de coordenação (Verbeke *et al.*, 2003).

O ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V (*cf.* Figura 1.1B) foi o único radioligando estudado para detecção de apoptose investigado em ensaios clínicos de fase II/III, em doentes com cancro do pulmão de não pequenas células (Lahorte *et al.*, 2004). O processo de marcação estava bem definido e eram fornecidos em *kits* pela *Theseus Imaging Corporation* permitindo a rápida marcação. No entanto, devido ao fecho da empresa os ensaios clínicos em desenvolvimento ficaram incompletos e outras patologias não foram estudadas (Boersma *et al.*, 2005; Blankenberg, 2009). Desta forma, o ^{99m}Tc -HYNIC-Anexin V apenas pode ser estudado em modelos animais.

Para além destes radioligandos usados na marcação da anexina V com ^{99m}Tc aplicados em ensaios clínicos, outros foram estudados, nomeadamente o etilendicisteína (EC) ou o mercaptoacetil-glicil-glicerina (MAG_3) (Yang *et al.*, 2001; Vanderheyden *et al.*, 2006). As alterações para na marcação da anexina V não se cingiram apenas à mudança dos radioligandos, também existem estudos nos quais foram realizadas mutações da anexina V.

1.5. Objectivos do Trabalho

O principal objectivo deste projecto foi a determinação da capacidade da anexina V radiomarcada na avaliação de apoptose em células neoplásicas de adenocarcinoma colorrectal, para avaliação tumoral e monitorização terapêutica.

Na fase inicial pretendeu-se realizar a marcação desta molécula com ^{99m}Tc e posteriormente estudar a sua estabilidade ao longo do tempo. Numa fase posterior pretendeu-se avaliar o comportamento do radiofármaco *in vitro*, e *in vivo*.

No sentido de conseguir os objectivos definidos, o trabalho desenvolvido contemplou os seguintes passos:

- Preparação e optimização da marcação do radiofármaco. Para alcançar o objectivo proposto foi necessário a determinação da pureza radioquímica, através de técnicas de controlo de qualidade radioquímico, por cromatografia em camada fina.
- Estudo do comportamento do radiofármaco *in vitro*, usando a linha celular de adenocarcinoma colorrectal humano WiDr (ATCC®), através de estudos de captação do radiofármaco.
- Estudo do comportamento do radiofármaco *in vivo*, usando o modelo animal de xenotransplante da mesma linha celular usada nos estudos *in vitro*. Para tal, realizaram-se estudos de biodistribuição e estudos de imagem com recursos a câmara gama.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A anexina V é uma proteína de 36 kDa com ligação a fosfolípidos, dependente de cálcio, que possui afinidade nanomolar para a PS (Ishino *et al.*, 2007). A anexina V marcada com fluorocromos é bastante usada para a detecção *in vitro* por citometria de fluxo de células em apoptose (Vriens *et al.*, 1998). Uma alternativa a essa abordagem é a marcação da anexina V com um radioisótopo para permitir a análise *in vivo* de tecidos em apoptose, através de imagem funcional e de forma não invasiva.

2.1. Estudos de Química

2.1.1. Preparação da ^{99m}Tc-HYNIC-Anexina V

A marcação radioactiva da anexina V com o isótopo tecnécio-99m foi feita através do método indirecto, pelo uso do quelante bifuncional HYNIC. A aplicação deste método permite salvaguardar a estrutura, bem como a actividade biológica da proteína (Karczmarczyk *et al.*, 2004). A anexina V humana foi obtida por expressão na *Escherichia coli* e purificada. Posteriormente, foi tratada com o quelante HYNIC e derivatizada.

A solução de anexina V derivatizada com HYNIC utilizada neste projecto, bem como o agente redutor tricina estanhosa, foram generosamente cedidos pelo NCI (do acrónimo inglês *National Cancer Institute*), sob a forma de *kits* liofilizados.

Os *kits* de anexina V disponibilizados continham uma quantidade de anexina V superior à necessária para cada estudo, pelo que, para não desperdiçar anexina V, uma vez que após a radiomarkação não é reutilizável, alíquotaram-se os *kits* de acordo com as indicações fornecidas pelo NCI, em quantidades adequadas às necessidades de cada estudo e nunca inferiores a 25µg de anexina V. Cada *kit* com o ligando continha 0,275mg de HYNIC-Anexina V.

Para proceder à marcação da anexina V foi retirada a alíquota de HYNIC-Anexina V e o *kit* de tricina estanhosa do congelador, onde estavam armazenados a -80°C, e colocados a descongelar à temperatura ambiente. Após o descongelamento, foi adicionado ao *kit* frio o pertecnetato de sódio (^{99m}TcO₄⁻), numa actividade nunca superior a 7,4MBq/µg de anexina V, e no volume compreendido entre os 10-30µL, e agitou-se suavemente. De referir que, para aumentar a actividade específica utilizou-se sempre um eluato fresco, eluído à menos de 4h, e nunca proveniente da primeira eluição. De imediato, foi adicionado ao *kit* o agente estanhoso e agitou-se novamente. A preparação foi incubada durante 15 minutos à temperatura ambiente (± 20°).

Os *kits* de tricina estanhosa cedidos pelo NCI correspondiam ao número de *kits* de anexina V. Como a tricina estanhosa não é facilmente alíquotada, e de acordo com o NCI após a marcação podem surgir quantidades significativas de tecnécio reduzido-hidrolizado (^{99m}TcO₂),

foi otimizada a marcação da anexina V com recurso a outro agente redutor, o cloreto estanhoso di-hidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Sigma 208035). Dado que, o objectivo da tricina estanhosa é constituir uma fonte de iões de estanho, para reduzir o pertecnetato de sódio e desta forma este ligar-se à anexina V.

Nos processos de marcação foram realizadas apenas duas marcações do radioligando sem aplicação de nenhum agente redutor, usando alíquotas de $100\mu\text{g}$ de anexina V derivatizada com HYNIC. A actividade radioactiva utilizada para cada uma das marcações foi $247,9\text{MBq}$ e $183,5\text{MBq}$, num volume de $30\mu\text{L}$.

Na marcação da anexina V baseada na redução do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pela tricina estanhosa, foram usadas alíquotas de 100, de 75 ou $50\mu\text{g}$ de anexina V. A actividade de pertecnetato usada para as marcações compreendeu valores entre $97,3\text{MBq}$ e $111,4\text{MBq}$ ($105,9 \pm 9,2$; média \pm desvio padrão), num volume de $30\mu\text{L}$. A quantidade de tricina estanhosa adicionada foi de $16,7\mu\text{g}$, para todas as marcações.

Para a marcação através de reduções com o cloreto estanhoso di-hidratado utilizaram-se alíquotas de 100, de 75 ou $50\mu\text{g}$ de anexina V. Foram adicionadas actividades de pertecnetato de sódio entre $75,8\text{MBq}$ e 333MBq ($139,5 \pm 59,1$), num volume de $30\mu\text{L}$. A quantidade de cloreto estanhoso utilizada compreendeu valores entre os $10\mu\text{g}$ e os $100\mu\text{g}$ ($30,4 \pm 24,9$). Em aproximadamente um terço das marcações por redução com cloreto estanhoso foi adicionado $10\mu\text{L}$ de solução de bicarbonato de sódio (HNaCO_3).

2.1.2. Controlo da Qualidade da $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Anexina V

2.1.2.1. Controlo visual do radiofármaco

Após a marcação os *kits* foram inspeccionados visualmente para verificar se não existiam precipitados em suspensão e se a solução era límpida e incolor.

2.1.2.2. Controlo da qualidade radioquímico da $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Anexina V

O controlo da qualidade radioquímico visa avaliar a pureza radioquímica do radiofármaco, que é definida como a fracção da actividade total na forma química pretendida relativamente à actividade total. Na preparação podem existir as seguintes espécies radioquímicas: $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -complexado ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Anexina V), e as impurezas radioquímicas de $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ e $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$.

O controlo de qualidade radioquímico da $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-Anexina V foi realizado através da técnica de cromatografia em camada fina instantânea (ITLC, do acrónimo inglês *Instant Thin Layer Chromatography*). Esta técnica permite a separação dos componentes de uma mistura devido às diferentes interacções com a fase estacionária e à diferença de solubilidade nos vários solventes. Cada soluto é caracterizado por um R_f , definido pela distância percorrida pelo soluto e a distância percorrida pelo solvente, e varia entre 0 e 1. O $R_f = 0$ corresponde ao

composto que permaneceu no ponto de aplicação e o $R_f = 1$ corresponde ao composto que migrou para a frente de solvente.

O suporte de ITLC usado foi a tira de ITLC impregnada com sílica-gel (ITLC-SG, Gelman®), com as dimensões de 2cm de largura e 8 cm de altura, e o solvente foi a solução tampão ACD (ácido citrato dextrose), colocada a 0.5 cm de altura na câmara de saturação.

Após o período de incubação foi retirada uma pequena amostra de 2-5 μ L da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V e aplicada no ponto de aplicação, a 1cm do limite inferior da tira. Posteriormente, a tira foi colocada na câmara de saturação até o solvente atingir o $R_f=1$. De seguida, retirou-se a tira, deixou-se secar, e cortou-se em três secções: origem do 0-2,75cm, meio de 2,75-3,25 cm, e frente de solvente de 3,25-6cm. Cada uma das partes foi medida em contador de poço (DPC Gamma C12®), e obtidas as contagens por minuto (CPM) de cada uma.

Deste sistema cromatográfico espera-se que a ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V permaneça na origem, enquanto os compostos indesejados $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e o $^{99m}\text{TcO}_2$ migrem para a frente de solvente, representado na Figura 2.1. A secção média da tira permite verificar se ocorre a completa separação do radioligando e das impurezas.

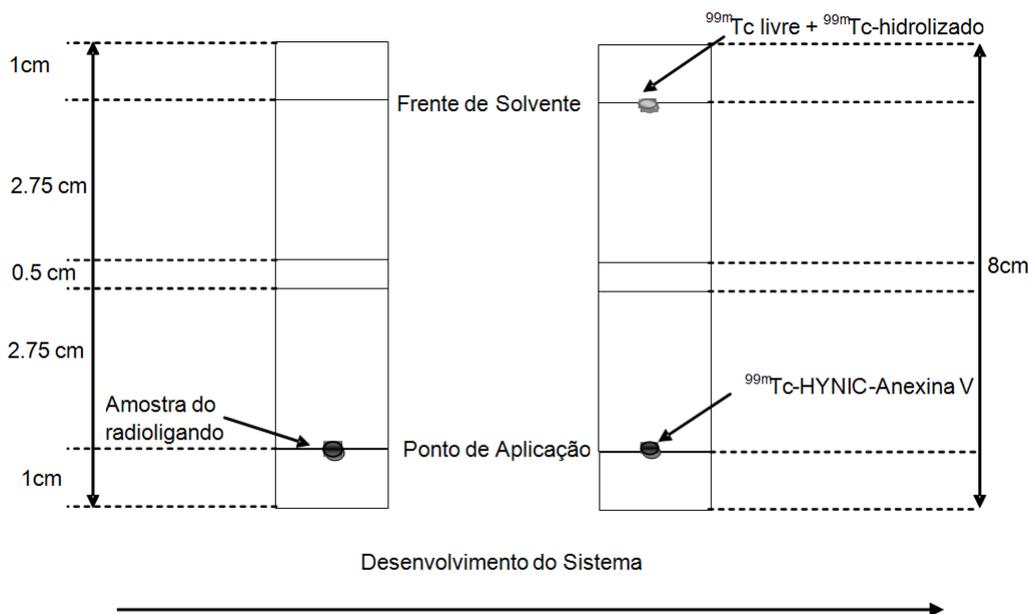


Figura 2.1 – Sistema cromatográfico para determinação da pureza radioquímica: fase estacionária ITLC-SG e fase móvel ACD.

Para maximizar a actividade retida no tecido/órgão alvo a eficiência de marcação deve ser superior a 90%. O cálculo da pureza radioquímica foi determinado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ Pureza radioquímica} = \frac{\text{Actividade na origem}}{\text{Actividade total da tira}} \times 100$$

2.1.2.3. Controlo do pH da ^{99m}Tc-HYNIC-Anexina V

A determinação do pH foi feita através do método colorimétrico de tiras de pH (pH-Fix 0.0-14.0, Machenerey-Nagel®).

2.2. Estudos *In Vitro*

2.2.1. Cultura de Células

No presente estudo foi usada uma linha celular de adenocarcinoma colorrectal humano, a linha WiDr obtida pela ATCC® (*American Type Culture Collection*). Esta linha celular foi obtida a partir de uma porção de adenocarcinoma primário do cólon rectosigmóide, de uma doente de 78 anos, em 1971 (Noguchi *et al.*, 1979). Esta linha celular apresenta de mutação *missense* na p53, mutação G→A, o que resulta na substituição de uma Arg → Hist na posição 273 (Rodrigues *et al.*, 1990).

A cultura da linha celular WiDr foi ampliada em frascos de cultura aderentes de 75cm², em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma D-5648) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco 2010-09®), 20mM de tampão HEPES, e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 10 µg/mL estreptomicina, Gibco 15140-122®). As células cresceram exponencialmente em monocamada, numa atmosfera humidificada contendo 5% de dióxido de carbono (CO₂) e a uma temperatura de 37°C (incubadora HeraCell 150). As células foram divididas ao atingirem uma confluência de aproximadamente 80%. O meio de cultura das células era substituído a cada 2 dias.

De referir que, todos os procedimentos da cultura de células foram realizados assepticamente de forma a prevenir contaminações com bactérias, fungos, micoplasma ou mesmo contaminação cruzada de outras linhas celulares.

As células cultivadas foram aplicadas nos estudos *in vitro*, bem como nos estudos *in vivo* desenvolvidos neste projecto.

2.2.2. Estudos de Captação

Para a realização dos estudos de captação, incubaram-se as células com 3mL de solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco 25200®) durante três minutos a 37°C, com o objectivo de haver desagregação das células. Logo de seguida, para inactivar a acção da tripsina foi adicionado cerca de 8mL de DMEM. A suspensão celular foi centrifugada a 1000 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7 cm).

O número de células existente na suspensão foi estimado por contagem, com recurso a um hemocítmetro (Nageotte Chamber, Hausser Scientific Company), em microscópio óptico (Motic AE31) com uma ampliação de 100x. As células foram depois ressuspensas no meio de cultura, em volume adequado à obtenção da concentração necessária para estudo, e

colocadas em repouso durante 1 hora, em atmosfera humidificada com 5% de CO₂ e a uma temperatura de 37°C, com o objectivo de recuperar do stress causado pela acção enzimática. Posteriormente, foram usadas nos estudos de captação.

2.2.3. Estudos de Captação em Células WiDr

Nos estudos de captação de células WiDr, sem inoculação de fármacos, foram usadas células em frascos de cultura de 25cm², numa concentração de 2×10⁶ células/mL. Após o tempo de repouso, foram adicionados aos frascos 0,925MBq/mL de ^{99m}Tc ou de ^{99m}Tc-HYNIC-Anexina V, e seguidamente foram retiradas alíquotas de 200 µL da suspensão celular, aos 5, 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos, para tubos de *ependorf* aos quais previamente se tinha adicionado 500µL de solução do tampão fosfato (PBS) gelado, com o objectivo de reduzir o metabolismo celular. Posteriormente, para fazer a separação entre o *pellet* e o sobrenadante, as amostras foram centrifugadas durante 60 segundos a 10 000 rpm (VWR Micro Centrifuge, Model V), sendo removido para cada tubo o sobrenadante. Para otimizar essa separação, foi feita uma nova lavagem do *pellet* com mais 500 µL de PBS gelado, repetiu-se a centrifugação nas mesmas condições e adicionou-se o sobrenadante obtido ao tubo correspondente.

As amostras obtidas, de *pellet* e sobrenadante, foram medidas em contador de poço. A percentagem de captação da ^{99m}Tc-HYNIC-Anexina V pelas células de adenocarcinoma colorrectal foi determinada pela expressão da equação:

$$\% \text{ captação} = \frac{\text{CPM}_{\text{pellet}}}{\text{CPM}_{\text{pellet}} + \text{CPM}_{\text{sobrenadante}}} \times 100$$

2.2.4. Determinação da Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi observada utilizando a técnica de exclusão de azul tripano, na qual apenas as células não viáveis coram de azul. O facto de estas corarem de azul deve-se ao facto de a membrana celular estar destruída, contrariamente às células viáveis em que a membrana, por se encontrar intacta, constitui uma barreira para a entrada do corante.

O estudo de viabilidade celular foi realizado no fim dos estudos de captação. Para tal, recolheu-se uma amostra de 20µL da suspensão celular e juntou-se a 20µL azul tripano a um tubo de *ependorf*. A mistura depois de homogeneizada foi colocada no hemocitómetro e observada ao microscópio óptico. A determinação da percentagem de viabilidade celular pelo método de exclusão de azul tripano foi feita através da expressão definida pela seguinte equação:

$$\% \text{ de viabilidade celular} = \frac{\text{células vivas}}{\text{células vivas} + \text{células mortas}} \times 100$$

2.2.5. Estudos de captação em Células WiDr Incubadas com TRAIL

Apesar dos avanços significativos na investigação clínica, a radioterapia e a quimioterapia induzem toxicidade sistémica. O TRAIL, identificado há mais de uma década, é uma molécula promissora no tratamento de cancro por induzir apoptose numa grande variedade de células neoplásicas, não afectando células normais.

Nos estudos de captação de ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V por células WiDr incubadas com TRAIL (ENZO, Life Science) foram usados 5×10^5 células em 3mL de meio por cada poço, em placas de cultura de células de 6 poços. Após ficaram em repouso durante 1 hora, a 37°C e a 5% de CO_2 , e de se verificar ao microscópio que estavam aderentes à placa de cultura, adicionou-se a cada poço a concentração de 100ng/mL de TRAIL.

As células foram incubadas com o TRAIL durante 2, 12 e 24 horas, a 37°C em 5% de CO_2 , após esses tempos de incubação foi adicionado ao poço 0,925MBq/mL de ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V. Posteriormente, aos 5, 30, 60, 90 e 120 minutos após a adição foi removido todo o sobrenadante de cada um dos poços e colocado num novo poço. Todos os poços, com as células aderidas ou com sobrenadante foram de seguida medidos na Câmara Gama (GE 400 AC). A percentagem de captação do radiofármaco foi determinada com base equação acima descrita, no qual as CPM neste caso correspondiam ao total de contagens do respectivo poço determinado pelo processamento de regiões de interesse (ROI, do acrónimo inglês *regions of interest*) determinadas na estação de processamento Xeleris[®].

2.2.6. Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a análise e quantificação de células ou partículas biológicas em suspensão. O seu princípio baseia-se na dispersão da luz, frontal (*forward scatter* – FSC) e lateral (*side scatter* – SSC), emitida de um feixe de luz (laser de árgon), e pela fluorescência emitida pelos fluorocromos ligados a anticorpos monoclonais.

2.2.6.1. Determinação de apoptose por citometria de fluxo através da anexina V

A apoptose *in vitro* induzida pelo TRAIL para diferentes concentrações e com diferentes tempos de incubação, foi determinada através de citometria de fluxo pela quantificação dos níveis de fosfatidilserina na membrana externa das células apoptóticas.

A aplicação da citometria de fluxo, através do uso simultâneo da anexina V conjugada com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) e do iodeto de propídio (IP), permite a distinção entre a apoptose e a necrose. Como referido anteriormente, a anexina V tem afinidade nanomolar para a fosfatidilserina, e quando conjugada com o FITC permite a quantificação células em apoptose. Por outro lado, a aplicação do iodeto de propídeo permite a marcação das células em que há perda da integridade da membrana, células em necrose, dado que se intercala na dupla cadeia do ADN emitindo fluorescência, mas não consegue atravessar uma membrana citoplasmática saudável. Neste sentido, pela exposição simultânea

à anexina V e ao IP é possível a discriminação de quatro grupos: (i) células viáveis, ou seja que não marcadas pela anexina V nem pelo IP; (ii) células em apoptose inicial, marcadas pela anexina V; (iii) células em apoptose tardia/necrose, e portanto marcadas pela anexina V, bem como pelo IP; (iv) e células em necrose, apenas marcadas pelo IP.

Para quantificação da viabilidade celular usaram-se 1×10^6 células que foram sujeitas a centrifugação de uma suspensão celular a 2500rpm, durante 5 minutos. Posteriormente, para se proceder à marcação com os fluorocromos, retirou-se o sobrenadante e lavou-se o *pellet* com FacsFlow[®] (BDBiosciences). Depois, o *pellet* foi incubado com 100 μ L de tampão de ligação (KIT Immunotech), 5 μ L de anexina V – FITC (KIT Immunotech) e 5 μ L de iodeto de propídeo (KIT Immunotech), a 4°C durante 15 minutos, no escuro. A seguir ao período de incubação adicionaram-se 400 μ L de FacsFlow[®] e efectuou-se a análise no citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de argon, utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525nm para a anexina V – FITC e 640nm para o IP.

Foram adquiridas 10 000 células através do programa CellQuest[™] e para a análise dos dados obtidos utilizou-se software Paint-a-Gate 3.02. Os resultados são expressos em percentagem de células identificadas com base na positividade de marcação para anexina V-FITC.

2.3. Estudos *In Vivo*

O objectivo último de um radiofármaco é a sua aplicação *in vivo* para diagnóstico ou terapia. O estudo de biodistribuição de radiofármacos em modelos animais é uma das etapas que permite avaliar a farmacocinética *in vivo* de novos radiofármacos para uma possível aplicação clínica.

O modelo animal usado para o desenvolvimento dos estudos *in vivo* deste projecto foi ratinhos *Balb/c nu/nu*, jovens adultos e de ambos os sexos.

Os animais foram mantidos no biotério em condições de temperatura, humidade e condições de regulação de luz padrão, e tratados de acordo com a legislação em vigor para os cuidados de animais em laboratório.

2.3.1. Estudos de Biodistribuição

2.3.1.1. Anestesia

Antes de serem injectados com o radiofármaco, todos os animais foram anestesiados através de injeção subcutânea de uma solução de ketamina (77%) (Kelatar[®], Porke-Davis) e clorpromazina (23%) (Largactil[®], Laboratórios Vitória). Após estarem anestesiados foram injectados por via intravenosa na veia dorsal da cauda. Durante o tempo em que se mantiveram sob anestesia foram mantidos a uma temperatura de aproximadamente 26°C.

2.3.1.2. Biodistribuição da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V em ratinhos normais

Nos estudos de biodistribuição de ratinhos sem tumor foram usados os ratinhos *Balb/c nu/nu* normais. Os animais pesavam entre 1,68 e 33,92g, ($26,12 \pm 4,17$). A actividade do radioligando administrada foi registada com valores entre 0,222MBq e 6,216MBq ($1,87 \pm 1,47$).

Após a administração do radiofármaco, os ratinhos foram sacrificados por deslocamento cervical, nos seguintes tempos: 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 e 360 minutos. Posteriormente foram recolhidos os seguintes órgãos: cérebro e cerebelo, tiróide, pulmão, coração, estômago, vesícula biliar, fígado, baço, intestino delgado, intestino grosso, rins. Foram também retiradas amostras de alguns tecidos como o músculo, osso, sangue, cartilagem, assim como também fluidos de excreção como a bÍlis e a urina. Para todos estes órgãos, tecidos e fluidos foi determinada a massa e as respectivas contagens, em CPM, em contador de poço.

Através dos valores obtidos foi calculada a percentagem de actividade de ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V administrada por grama (%ID/g) de órgão, tecido ou fluido excretado, de acordo com a seguinte expressão:

$$\% \text{ Actividade injectada/grama} = \frac{\text{CPM}_{\text{total do órgão}} / \text{Massa}_{\text{órgão}}}{\text{CPM}_{\text{actividade total administrada}}} \times 100$$

2.3.1.3. Biodistribuição da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V em ratinhos com xenotransplantes

No estudo de biodistribuição do radiofármaco no modelo animal com tumor foram usados xenotransplantes em ratinhos *Balb/c nu/nu*, dado que por serem atímicos permitem a implantação de células tumorais humanas sem desenvolverem rejeição.

Os animais usados pesavam entre 16,6 e 33,3g ($22,3 \pm 3,8$). A actividade radioactiva administrada foi registada com valores entre 0,5MBq e 33,7MBq ($6,4 \pm 8,1$).

Os xenotransplantes foram implantados no cavado axilar direito, pela injeção de aproximadamente 8×10^6 células da mesma linha celular aplicada nos estudos *in vitro*.

No estudos de biodistribuição de ratinhos *Balb/c nu/nu* com xenotransplantes foi aplicada a mesma metodologia que nos ratinhos normais *Balb/c nu/nu*. Tendo também sido feita a recolha do tumor, que seguiu o protocolo dos restantes órgãos.

O estudo de biodistribuição em ratinhos com xenotransplantes incluiu ainda a razão das percentagens de actividade administrada/grama entre tumor e músculo. Assim como, também foram determinadas as razões que correlacionam a %ID/g do tumor com as suas dimensões (volume). Para tal, após a excisão do xenotransplante foi medido o maior diâmetro (D) e o menor diâmetro (d) do tumor com recurso a uma craveira, tendo sido posteriormente determinado o volume com através da seguinte expressão (Wang *et al.*, 2008):

$$V = \frac{d \times D^2}{2}$$

2.3.1.4. Imagem em câmara gama

Os estudos de imagem através de câmara gama utilizaram ratinhos *Balb/c nu/nu*. Antes da realização das imagens todos os ratinhos foram anestesiados, segundo o procedimento anteriormente referido. De seguida, foram posicionados em posição de pronação em cima do detector, correctamente protegido. No momento da injeção endovenosa de ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V, na veia dorsal da cauda, iniciou-se a aquisição de estudos dinâmicos em câmara gama (GE 400AC), com colimador paralelo de alta resolução e baixa energia, e com janela de energia de 10% centrada nos 140keV, fotopico do ^{99m}Tc . O estudo dinâmico compreendeu a aquisição de 600 imagens de 10 segundos cada uma. A matriz utilizada foi de 128x128, sem magnificação (zoom de 1,0).

Posteriormente ao estudo dinâmico foram adquiridas imagens estáticas de 5 minutos, aos 30, 60, 90, 120, 180, 210, 270, 360 minutos após administração da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V. A matriz aplicada nas imagens estáticas foi de 256x256, magnificada em 1,33.

As aquisições dos estudos dinâmicos e estáticos foram iniciados e controlados pelo computador de aquisição GenieAcq. Após concluídas as imagens, estas foram transferidas para a estação de processamento Xeleris[®]. O processamento consistiu no desenho de ROIs do tumor, para obtenção de curvas actividade/tempo.

Para além da aquisição de imagens estáticas dos ratinhos, foram também adquiridas imagens estáticas do tumor excisado e de uma amostra de tecido muscular dos ratinhos, com matrizes de 256x256 e sem magnificação. O processamento destas últimas imagens consistiu no desenho de ROIs de cada uma das estruturas.

2.4. Tratamento de Dados

Os dados recolhidos ao longo do projecto foram compilados no programa *Microsoft Office Excel 2007*[®].

Para análise quantitativa dos dados aplicaram-se técnicas de estatística descritiva e testes não paramétricos recorrendo-se ao *software SPSS*[®], versão 15.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*). Nos testes estatísticos aplicados considerou-se um nível de significância de 5%, ou seja $p < 0,05$. A maioria dos valores descritos ao longo do trabalho estão expressos sob a forma de média \pm desvio padrão.

3. RESULTADOS

Em sequência da metodologia aplicada procedeu-se ao registo e análise dos resultados relativos a cada uma das fases metodológicas acima descritas.

3.1. Estudos de Química

Após a reconstituição da anexina V com o ^{99m}Tc a solução foi observada, tendo-se verificado que em algumas radiomarcações ocorreu a presença de precipitados na solução. Nas situações em que se observou a presença de precipitados a eficiência de marcação foi inferior aos 90%.

Com recurso à cromatografia em camada fina verificou-se que, após o período de incubação, a pureza radioquímica do radioligando não sujeito à presença de agente redutor foi de 0% e 3.2%. Aumentando para 10,1%, aos 90 minutos, na segunda marcação. Relativamente ao pH, obtiveram-se valores de 7 e 6,5, respectivamente.

Na pureza radioquímica da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V marcada através do processo de redução baseada na tricina estanhosa, medida aos 15 minutos após ao período de incubação, obteve-se um valor médio $84,8 \pm 8,8$ (média \pm DP), (cf. Tabela 3.1). O pH medido foi sempre de 6,5.

Tabela 3.1 – Pureza radioquímica obtida na marcação do ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V por redução através da tricina estanhosa.

Tempo (minutos)	Eficiência de Marcação (%)		pH
	Intervalo	Média \pm DP	
15	70,1 – 93,0	$84,8 \pm 8,8$	6,5
30	85,0 – 93,5	$89,2 \pm 3,1$	6,5
60	73,8 – 93,2	$84,4 \pm 9,8$	6,5
90	88,2	88,2	6,5
180	72,5 – 93,9	$83,2 \pm 15,1$	6,5
300	75,2 – 89,0	$82,1 \pm 9,7$	6,5

Relativamente, à pureza radioquímica da marcação da anexina V pelo processo de redução através do cloreto estanhoso, medida aos 15 minutos após ao período de incubação, obteve-se um valor médio de $85,7 \pm 6,5$ (média \pm DP), (cf. Tabela 3.2). O pH medido compreendeu valores entre os 4,5 e os 6,5.

Tabela 3.2 – Pureza radioquímica obtida na marcação do ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V por redução através do cloreto estanhoso di-hidratado.

Tempo (minutos)	Eficiência de Marcação (%)		pH
	Intervalo	Média \pm DP	
15	71,3 – 97,8	85,7 \pm 6,5	4,5 – 6,5
30	55,8 – 96,6	81,1 \pm 10,4	4,5 – 6,5
60	69,6 – 98,9	80,9 \pm 9,6	4,5 – 6,5
120	77,4 – 97,9	87,3 \pm 7,5	4,5 – 6,5
180	79,6 – 89,7	86,1 \pm 4,2	4,5 – 6,5
240	71,1 – 91,8	84,6 \pm 10,1	4,5 – 6,5
300	85,8 – 91,1	88,7 \pm 2,7	4,5 – 6,5
360	77,8 – 90,1	84,9 \pm 4,8	4,5 – 6,5
400	71,0-96,6	87,5 \pm 7,8	4,5 – 6,5

A ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V, quer marcada através da redução com tricina estanhosa, quer com cloreto estanhos manteve-se estável ao longo do tempo, de acordo com os resultados obtidos pelo controlo de qualidade radioquímico medido até aos 300 e os 400 minutos, respectivamente (cf. Tabela 3.1 e Tabela 3.2).

3.2. Estudos *In Vitro*

Em seguimento dos estudos de química procedeu-se à realização dos estudos *in vitro* para avaliar a estabilidade da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V. Para tal, foram efectuados estudos de captação na linha celular WiDr ao longo de um período de 120 minutos. Foram também realizados estudos de captação da linha celular WiDr na presença da molécula de acção indutora de apoptose TRAIL.

De referir que, em todos os estudos *in vitro* apenas foi utilizada ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V com uma eficiência de marcação superior a 90%.

3.2.1. Cultura de Células

3.2.1.1. Estudos de captação em células WiDr

Da análise da representação gráfica dos estudos de captação com a ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V e com o ^{99m}Tc livre (cf. Figura 3.1) observa-se que o seu comportamento ao longo do tempo é distinto. Desta representação gráfica, observa-se ainda que a percentagem de

captação da anexina V radiomarcada aumenta progressivamente ao longo dos 120 minutos, de valores compreendidos entre 4,14% e 15,25%. De acordo com a análise do teste de Friedman verifica-se que existem diferenças estatisticamente significativas na captação do ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V pela linha celular de WiDr ao longo do tempo, $p(0,000) < \alpha(0,05)$.

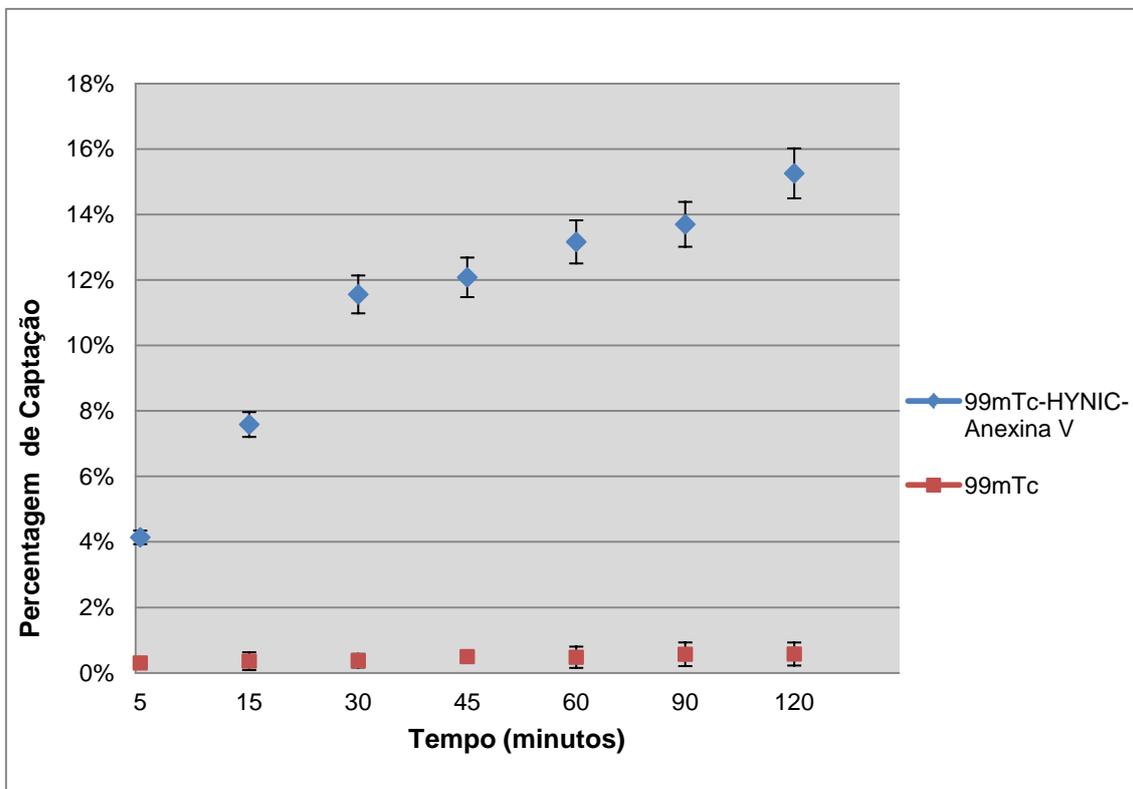


Figura 3.1 - Percentagem de captação da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V e de ^{99m}Tc pela linha celular WiDr durante um período de 120 minutos.

Por outro lado, a captação de tecnécio livre na linha celular WiDr segundo o que se observa pela Figura 3.1 mantém-se em valores próximos dos 0,5% ao longo dos 120 minutos, e de acordo com a análise do teste de Friedman, não existem verificam diferenças significativas, $p(0,187) > \alpha(0,05)$.

Ainda pela análise estatística, através do teste de Wilcoxon, verifica-se que a captação da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V é significativamente superior à captação do ^{99m}Tc pela linha celular estudada ao longo dos 120min, dado que o $p(0,008) < \alpha(0,05)$.

De acordo com os estudos de viabilidade celular, realizados no final dos estudos de captação, através do método de exclusão do azul tripano, verificou-se que a viabilidade celular se manteve sempre acima dos 90%.

3.2.1.2. Estudos de Captação em Células WiDr Incubadas com TRAIL

Dos estudos de captação do radiofármaco na linha celular de WiDr sujeita à acção do TRAIL incubado durante 2h,12h e 24h verifica-se, através da análise da Figura 3.2, que a percentagem de captação ao longo do tempo em células incubadas com TRAIL é em geral

semelhante à percentagem de captação do respectivo controlo, ou seja, pelas células não incubadas com o TRAIL.

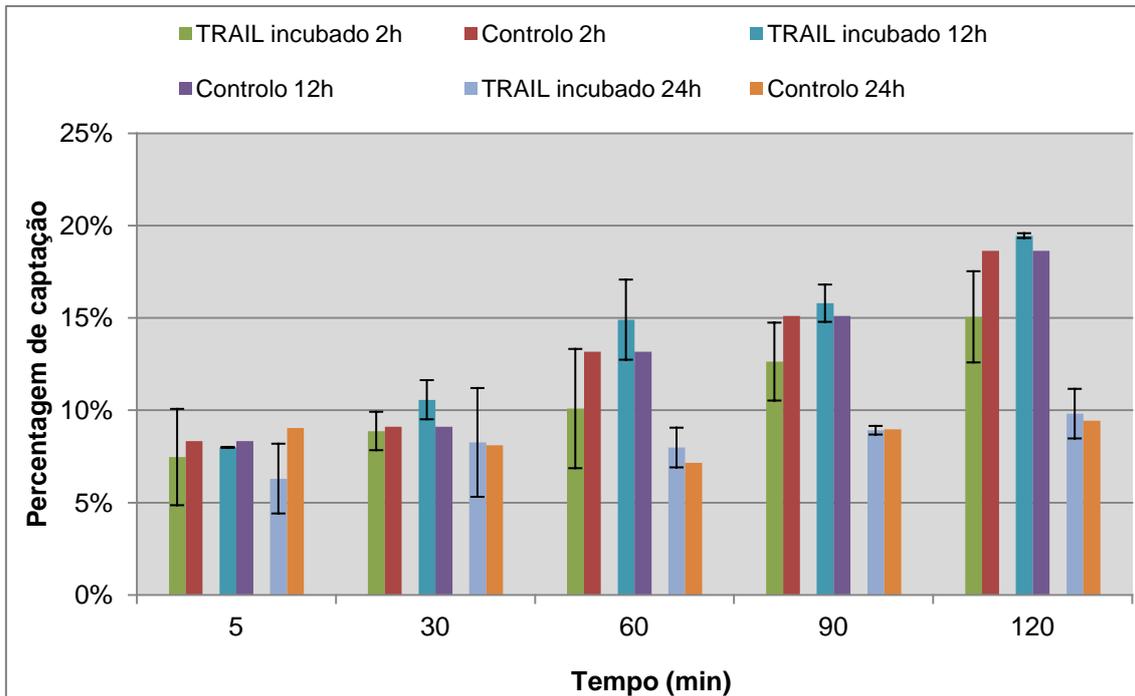


Figura 3.2 - Percentagem captação da ^{99m}Tc-HYNIC-Anexina V, ao longo de um período de 120 minutos, pela linha celular WiDr após incubação com TRAIL.

No entanto, de forma mais pormenorizada observa-se que a percentagem de captação pelas células incubadas com TRAIL durante 2h é sempre inferior ao controlo, enquanto para as células incubadas com o TRAIL durante 12h e 24h a percentagem de captação, ao longo do tempo, apenas é inferior ao respectivo controlo aos 5 minutos.

Também se observa que, de um modo geral, essa captação aumenta a longo do tempo. Assim como, se observa que as células incubadas com o TRAIL durante 24 horas apresentam valores de percentagem de captação do radioligando inferiores à captação nas células incubadas durante 2 e 12 horas, principalmente após os 60 minutos.

3.3. Citometria de Fluxo

3.3.1. Determinação de Apoptose Celular por Citometria de Fluxo Através da Anexina V

A caracterização da viabilidade celular após a aplicação do agente indutor de apoptose TRAIL foi efectuada pela técnica de citometria de fluxo. Através da dupla marcação com anexina V-FITC e IP verificou-se que na linha celular WiDr os valores de apoptose inicial e tardia, de um modo geral, aumentaram para valores de concentração de TRAIL superiores. A percentagem de apoptose nos controlos, ou seja nas células não incubadas, apresenta em

todos os tempos valores de apoptose inferiores às células WiDr tratadas com TRAIL, como é possível verificar pela análise da Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Percentagem em apoptose da linha celular WiDr após incubação com TRAIL durante períodos de 2h, 12h, 24h e 48h.

		2h	12h	24h	48h
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
		(%)	(%)	(%)	(%)
Controlo	Vivas	80 ± 0	93 ± 2	84 ± 0	84 ± 0
	Apoptose Inicial	5 ± 0	2,5 ± 1,5	4 ± 0	4 ± 0
	Apoptose Tardia	12 ± 0	10 ± 2	4 ± 0	4 ± 0
	Necrose	3 ± 0	8,5 ± 5,5	8 ± 0	8 ± 0
20ng/mL	Vivas	68 ± 2	91 ± 1	65 ± 1,5	69,5 ± 3,5
	Apoptose Inicial	13,5 ± 1,5	4 ± 1	6 ± 1	7 ± 1
	Apoptose Tardia	13 ± 1	2,5 ± 0,5	9,5 ± 0,5	9 ± 0,5
	Necrose	5,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5	17,5 ± 0,5	14 ± 3
100ng/mL	Vivas	55 ± 1	84 ± 1	64 ± 1	64 ± 1,5
	Apoptose Inicial	11,5 ± 1,5	6,5 ± 0,5	6,5 ± 2,5	10 ± 0,5
	Apoptose Tardia	19,5 ± 1,5	5 ± 0	14,5 ± 0,5	12 ± 2
	Necrose	11,5 ± 2,5	3 ± 2	15 ± 3	13,5 ± 1,5
200ng/mL	Vivas	55 ± 0,5	76 ± 5	60,5 ± 3,5	63 ± 1
	Apoptose Inicial	16,5 ± 0,5	13,5 ± 5,5	13,5 ± 2,5	9 ± 1
	Apoptose Tardia	22,5 ± 0,5	7 ± 1	14,5 ± 2,5	17 ± 1
	Necrose	5,5 ± 0,5	4 ± 1	11,5 ± 1,5	10,5 ± 1,5

3.4. Estudos *In Vivo*

A análise desta fase do projecto contemplou os estudos de biodistribuição da ^{99m}Tc-HYNIC-Anexina V. A realização dos estudos de biodistribuição em ratinhos *Balb/c nu/nu* normais serviu para avaliar a farmacocinética do radiofármaco. Além disso, teve como objectivo ser usado como modelo comparativo dos estudos de biodistribuição em ratinhos com xenotransplante, permitindo verificar se existem alterações na biodistribuição devido ao tumor.

É também aqui importante referir que apenas foi utilizada para estes estudos a ^{99m}Tc-HYNIC-Anexina V com eficiência de marcação superior aos 90%.

3.4.1. Biodistribuição da ^{99m}Tc-HYNIC-Anexina V em Ratinhos Normais

A análise da biodistribuição da ^{99m}Tc-HYNIC-Anexina V em ratinhos *Balb/c nu/nu* normais foi feita com base na representação gráfica da percentagem de actividade injectada/grama do órgão, tecido ou fluidos excretados, ao longo do tempo (*cf.* Figura 3.3). Pela análise da biodistribuição do radiofármaco verificou-se que a excreção é essencialmente

realizada pela via renal, pois os rins e a urina são o órgão e fluido que apresentam maior percentagem de actividade injectada/grama. Ainda de acordo com a análise da Figura 3.3 também se verifica que, embora numa percentagem consideravelmente inferior, existe eliminação pela via hepatobiliar, dado que se observa uma percentagem de actividade injectada/grama mais elevada ao nível do fígado e, vesícula biliar, comparativamente a outros órgãos.

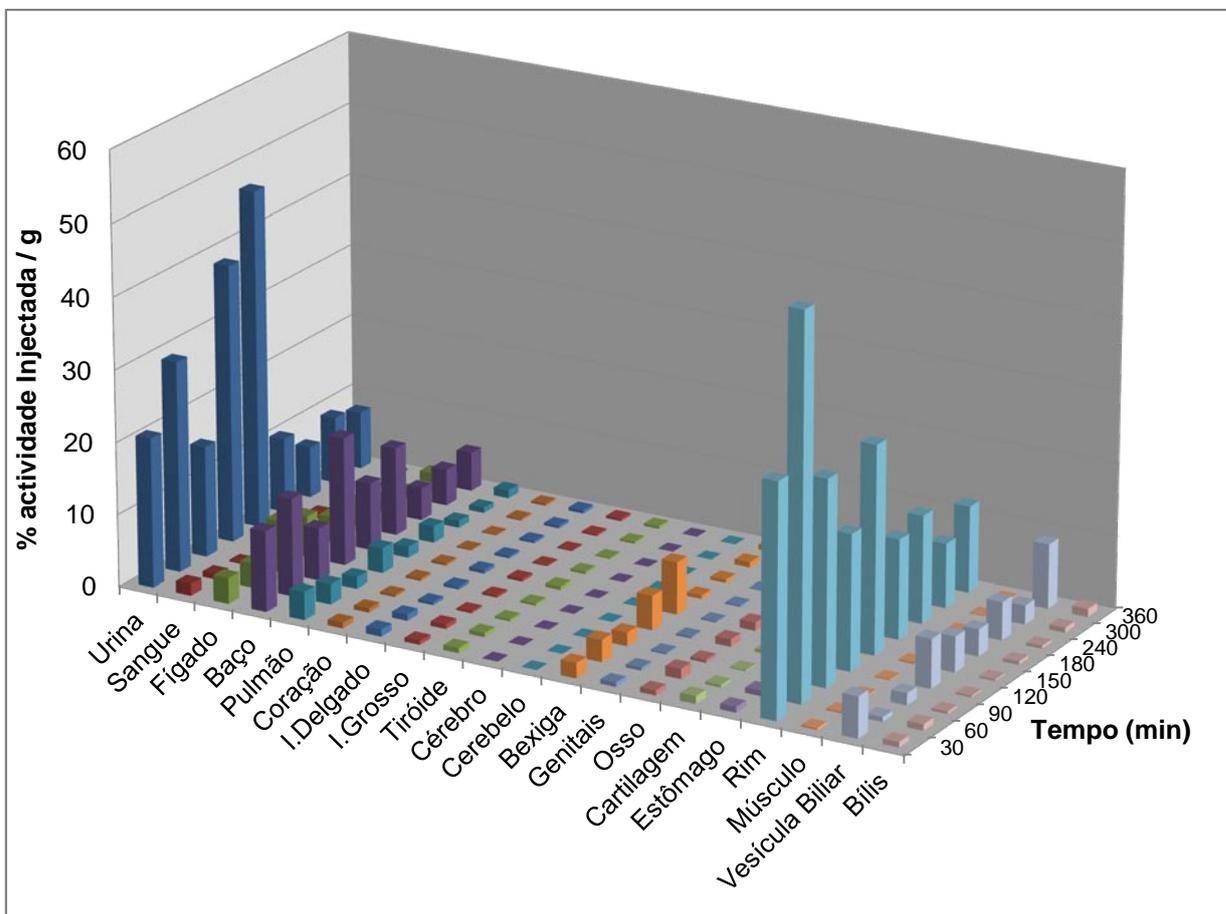


Figura 3.3 - Representação gráfica da biodistribuição em percentagem de actividade injectada/grama de tecido da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V em ratinhos Balb/c nu/nu normais.

O baço também apresenta uma percentagem de captação visivelmente superior que os restantes órgãos, estando mais diminuído a partir das 4 horas após a administração do radiofármaco. E no pulmão, apesar de numa percentagem inferior à do baço, também se verifica uma percentagem de ID/g ligeiramente superior aos outros órgãos.

A percentagem de ID/g ao nível sanguíneo evidenciou uma rápida *clearance* sanguínea, tendo-se registado um valor máximo aos 30 minutos, correspondente a 1,6%, que baixou para 0,8% e 0,2% aos 60 e aos 90 minutos, respectivamente.

Nos restantes órgãos/tecidos não se verifica a existência de percentagem de captação significativa. Assim, da análise da percentagem de ID/g nos órgãos tiróide e estômago observa-se, através da Figura 3.3, que os valores são semelhantes aos do músculo. Enquanto os

órgãos como o cérebro e o cerebello os valores de percentagem de ID/g apresentaram valores de aproximadamente 0,0%, inferiores aos do músculo.

3.4.2. Biodistribuição da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V em Ratinhos com Xenotransplantes

Em ratinhos *Balb/c nu/nu* com xenotransplantes, também se procedeu de forma igual para avaliar a biodistribuição da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V, através da representação gráfica da percentagem de actividade injectada por grama do órgão, tecido ou fluidos excretados, ao longo do tempo (cf. Figura 3.4).

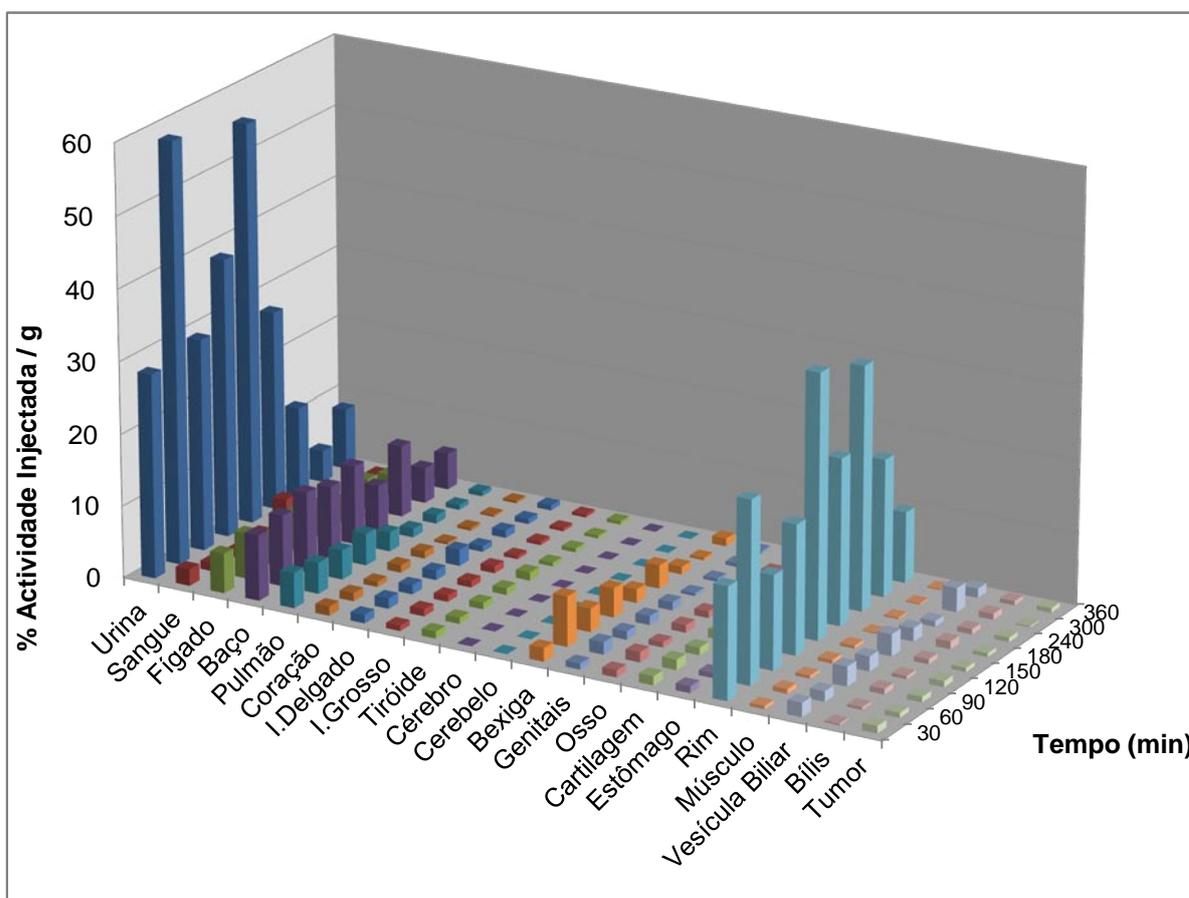


Figura 3.4 - Representação gráfica da biodistribuição em % de captação/grama de tecido do ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V em ratinhos *Balb/c nu/nu* com xenotransplante.

No caso da biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V, em ratinhos com xenotransplante verifica-se de um modo geral, excepto para o cérebro e cerebello, que existe um ligeiro aumento da percentagem de captação nos órgãos, tecidos e fluidos comparativamente aos mesmos em ratinhos *Balb/c nu/nu* normais.

Relativamente ao tumor verifica-se que a percentagem de actividade injectada/g, não considerando os órgãos envolvidos na excreção, não é muito maior que os restantes órgãos. É

ainda possível observar-se que essa percentagem é praticamente constante ao longo do tempo, como se pode verificar com melhor detalhe, através da representação gráfica da Figura 3.5, em que a média da percentagem de actividade injectada é inferior a 1% ao longo dos 360 minutos, embora seja muito próximo de 1% aos 30 minutos.

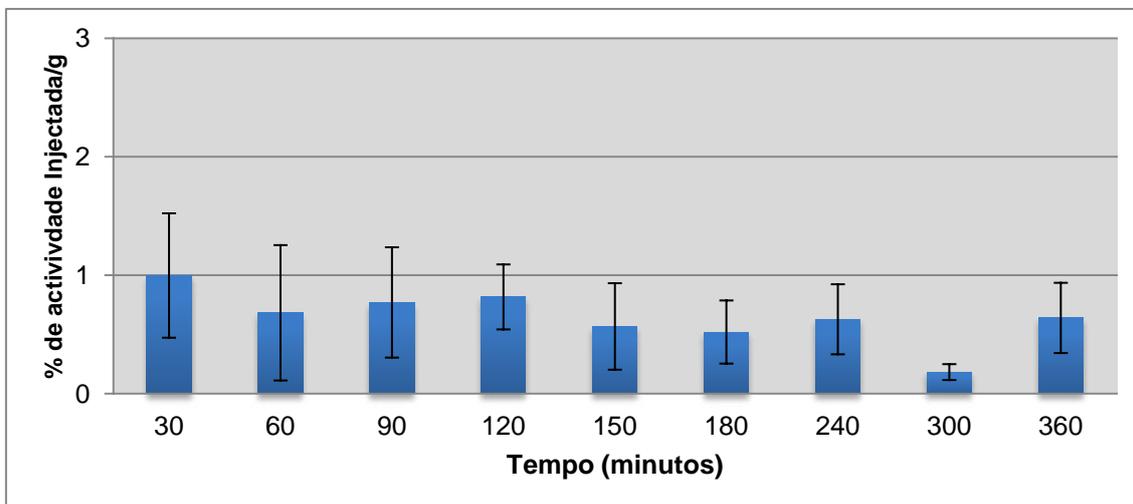


Figura 3.5 – Percentagem de actividade injectada/grama de tecido tumoral ao longo do período de 360 minutos

Para avaliar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores medianos de captação da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V pelo tumor e o volume do tumor procedeu-se à aplicação do teste não paramétrico *Kruskal-Wallis*. Para tal, dividiu-se o volume do tumor em três categorias: pequeno, para volumes de tumor inferior a 500mm^3 ; médio, que compreende volumes de tumor entre 501 e 1500mm^3 ; e grande, para volumes superiores a 1501mm^3 . Da análise deste teste, como o p ($0,035$) $<$ α ($0,05$) verifica-se que pelo menos uma das categorias de volume tumoral difere significativamente entre as restantes. Para determinar qual a categoria para a qual a % ID/g de ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V difere procedeu-se ao teste de *Mann-Whitney*. E, da aplicação do teste *Mann-Whitney* para comparação dos valores medianos de %ID/g de ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V entre volumes do tumor verificou-se que existem diferenças estatisticamente significativas entre tumores pequenos e grandes, e entre médios e grandes, com um p ($0,028$) e p ($0,016$) $<$ α ($0,05$), respectivamente. No caso de tumores pequenos e médios como o p ($0,454$) $>$ α ($0,05$), então conclui-se que não existem diferenças estatisticamente significativas entre estes.

Para avaliar a razão alvo/fundo procedeu-se à aplicação da razão entre a % de ID/g do tumor e músculo. Do total de ratinhos com xenotransplante verificou-se que apenas quatro apresentam uma razão alvo/fundo inferior a 1. Na maioria dos ratinhos a razão alvo/fundo varia entre 2 e 4, verificando-se ainda que em dois dos ratinhos essa razão é superior a 6. Após a aplicação do teste de Wilcoxon, para verificar se a %ID/g do tumor é superior à %ID/g do músculo, como o p ($0,00$) $<$ α ($0,05$), verifica-se que o %ID/g no alvo é significativamente superior ao do músculo.

3.4.3. Imagem em Câmara Gama

Além dos estudos de biodistribuição foram adquiridas imagens através da câmara gama, imediatamente após a injeção do ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V. As imagens obtidas foram visualizadas e processadas na estação de processamento Xeleris[®]. Através do processamento, baseado na normalização para uma escala de cores apropriada, foi possível identificar o tumor xenotransplantado de forma evidente nas imagens adquiridas após os 60 minutos, como pode ser visualizado na Figura 3.6B. Mas a visualização embora ténue já era possível nas imagens obtidas aos 5 minutos após a injeção do radioligando (*cf.* Figura 3.6A). Salienta-se, ainda, o facto de a razão alvo/fundo permitir a discriminação entre tecido alvo, ou seja o tumor, e o fundo, músculo.

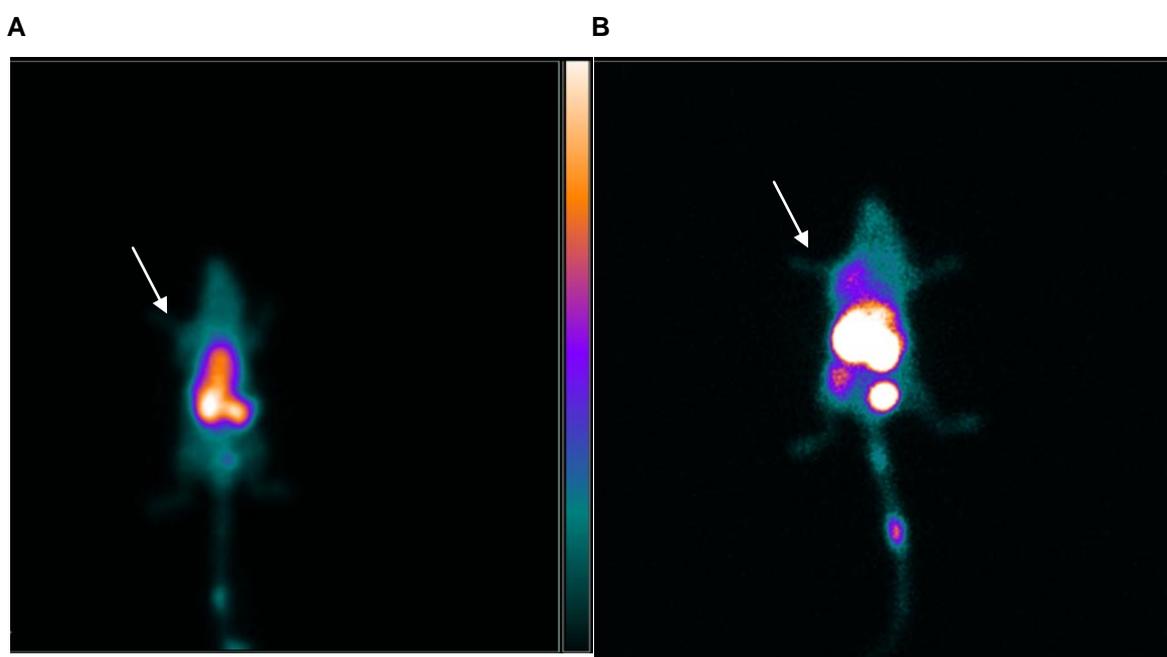


Figura 3.6 – (A) Imagem planar do Ratinho I, aos 5min após a injeção da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V., sem zoom; (B) Imagem planar do Ratinho I, aos 60 min após a injeção da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V, com zoom 1,33. A seta indica a localização do tumor.

Pelas imagens obtidas é também possível verificar a elevada captação ao nível renal e bexiga. Além disso, também é possível verificar a presença de actividade intestinal na imagem adquirida aos 60 minutos (*cf.* Figura 3.6B).

Da análise da Figura 3.6A, que corresponde à imagem somada do estudo dinâmico aos 5 minutos após a injeção, verifica-se também alguma captação na região cardíaca relativa à primeira passagem da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V na circulação. No entanto, essa captação deixa de estar visível a partir dos 30 minutos.

4. DISCUSSÃO

Após a análise dos dados obtidos nas diferentes etapas deste projecto, torna-se imperioso proceder à interpretação criteriosa dos aspectos mais relevantes observados neste projecto. Assim, a análise que se pretende delinear assenta sobre a importância da marcação da anexina V, e o seu comportamento *in vitro* e *in vivo*. Da aplicação destas três abordagens pretende-se, ainda, analisar a recíproca relação em situações onde a apoptose possa estar aumentada.

A ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V tem sido amplamente estudada, demonstrando ser uma técnica de imagem eficaz para avaliação de stresse celular e apoptose em modelos animais, bem como em ensaios clínicos (Blankenberg *et al.*, 2006). Até à data, no entanto, não existem estudos publicados da aplicação desta molécula no CCR.

4.1. Estudos de Química

A marcação da anexina V foi efectuada através do método indirecto com o ligando bifuncional HYNIC, dado que a marcação directa de proteínas/péptidos provoca facilmente alteração das suas propriedades biológicas. Assim, o HYNIC fica conjugado com a anexina V num lado ficando disponível para se conjugar com o ião metálico no lado oposto (Saha, 2010). O ester activo do HYNIC é usado para derivatizar o grupo amina dos resíduos de anexina V (Saha, 2010). A anexina V cedida pelo NCI, como referido anteriormente, já estava derivatizada com o HYNIC.

A marcação foi feita com o isótopo ^{99m}Tc , que é um elemento artificial obtido por decaimento radioactivo do molibedénio-99, e que pertence ao grupo VII da tabela periódica. De entre os radionuclídeos utilizados, o ^{99m}Tc representa o mais atractivo na medicina nuclear de fotão simples dado o pico energético emitido, óptimo para o uso em câmara gama, a disponibilidade através do sistema de gerador ^{99}Mo (Molibdénio-99)/ ^{99m}Tc , o seu relativo baixo custo e a facilidade de marcação dos *kits* liofilizados nos serviços de medicina nuclear, bem como a baixa radiação para os doentes, devido à curta semi-vida (Mazzi *et al.*, 2007).

O ^{99m}Tc pode co-existir em 8 estados de oxidação, podendo variar entre (VII) e (-I). Após eluído de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ vem sob a forma de anião pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e pertence ao estado de oxidação mais elevado (VII). No entanto, tendo em conta que a reactividade do anião pertecnetato é insignificante, não se liga directamente a nenhuma molécula. Para que ocorra a radiomarkação o pertecnetato terá de ser reduzido a estados de oxidação inferiores e na presença do ligando pretendido (Mazzi *et al.*, 2007).

Na marcação por redução com a tricina estanhosa obteve-se um valor médio de eficiência de marcação semelhante ao da marcação com o agente estanhoso. Embora a tricina estanhosa fosse o agente estanhoso que acompanhava os *kits* de anexina V, a aplicação de ambos tem o mesmo objectivo, constituir uma fonte de iões de estanho para a marcação, para permitir a redução do tecnécio a um estado de valência inferior. Pelo que, a aplicação de um ou

outro agente estanhoso, por si só, não reflecte as diferenças registadas ao longo das marcações pelos diferentes agentes.

Além disso, o *kit* da anexina V continha uma quantidade de molécula de tricina suficiente para suportar um bom rendimento de marcação, mesmo que a fonte de iões de estanho (Sn^{2+}) não fosse a tricina estanhosa. Isto porque, dado que, o grupo HYNIC apenas ocupa um local na esfera de coordenação do tecnécio, é por isso necessário o uso de um co-ligando, neste caso, a tricina, para completar a esfera de coordenação (Liu *et al.*, 1996). E, por outro lado, a adição de um co-ligando na marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ aumenta a eliminação do produto marcado do sangue, melhorando, assim, a razão alvo/fundo (Saha, 2010).

A eficiência de marcação de um radiofármaco é condicionada pela existência de impurezas, como o tecnécio livre e o tecnécio hidrolisado na solução, para além do radioligando marcado, ou seja, do tecnécio complexado. No entanto, dado que o método usado para determinar a eficiência de marcação deste radioligando contempla apenas um sistema, não foi possível a diferenciação entre as impurezas, pois ambas migram para a frente de solvente, enquanto a forma complexada permanece no ponto de aplicação.

A presença tecnécio livre ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) pode dever-se à hidrólise do estanho Sn (II) ou dever-se à introdução de oxigénio (O_2) que oxida o Sn (II) a Sn (IV). Atendendo que a massa de anexina V aliquotada era muito pequena, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ adicionado bem como o agente redutor eram também proporcionalmente pequenos. Assim, o doseamento destes foi feito através de micropipetas. Ou seja, durante a introdução destes componentes a solução esteve por breves instantes sujeitas à presença de O_2 , uma vez que o frasco tinha de ser aberto. Situação distinta do que ocorre em kits liofilizados, que usam maiores volumes passíveis de ser doseados através de seringas, possibilitando assim que estas soluções sejam adicionadas através de uma agulha, seguida da remoção do mesmo volume da mistura gasosa do interior do frasco para igualar as pressões. Esta situação é um dos factores plausíveis para a diminuição na eficiência de marcação.

No entanto, no caso da marcação por redução através do cloreto estanhoso, contrariamente ao que acontece na marcação através da tricina estanhosa, as alterações do pH também sugerem ser outra das causas da diminuição da eficiência de marcação. Uma vez que o pH inferior a 6,5 está associado a valores de eficiência de marcação inferiores. Valores de pH baixos podem por um lado originar a precipitação da proteína e por outro, o tecnécio pode sofrer hidrólise na solução aquosa, levando a que ocorra competição no processo de marcação e conseqüentemente redução da eficiência de marcação. Assim, na marcação pelo uso do cloreto estanhoso di-hidratado para otimizar a marcação, como era necessário aumentar ligeiramente o pH foi adicionado também NaHCO_3 numa concentração molar de 95mM, levando a um aumento da eficiência de marcação.

Importa ainda referir que nos estudos químicos iniciais, outro factor parece ter contribuído para a uma eficiência de marcação inferior aos 90%, não real. Dado que, a amostra retirada para controlo da qualidade possui uma concentração radioactiva elevada levou à saturação dos cristais do contador de poço durante a determinação das cpm na parte inicial da

tira, diminuindo assim a razão entre o radioligando e as impurezas radioactivas, e consequentemente diminuindo a eficiência de marcação. Este problema foi identificado pela aquisição da imagem da tira aos 15 minutos em câmara gama e análise através de processamento no sistema Xeleris[®]. Através do desenho de ROIs das diferentes regiões da tira, e usando a equação para a determinação da percentagem de pureza radioquímica, verificou-se que a eficiência de marcação era superior à medida no contador de poço. Após nova medição ao final do dia, depois de corrigido o decaimento radioactivo, o valor de eficiência obtido corroborou sempre o determinado em câmara gama.

Relativamente à marcação sem o uso de agente redutor como seria de esperar conduziu a eficiências de marcação de 0%, dado que o tecnécio adicionado, sob a forma de pertecnetato de sódio, está na forma de tecnécio (VII) não sendo por isso susceptível de se ligar à anexina V.

Idealmente, o pH do radiofármaco para administração endovenosa deve ser o mais próximo ao pH fisiológico, pH=7,4. Contudo são toleráveis valores de pH entre 2 e 9, devido à capacidade tampão do sangue (Saha, 2010). Assim, outro aspecto que deve ser salientado é o facto do pH das marcações efectuadas se encontrarem entre valores de 4,5 e 6,5, por redução através de cloreto estanho di-hidratado e de 6,5 por redução com tricina estanhosa.

4.2. Estudos *In Vitro*

O cancro constitui um dos principais problemas de saúde pública em todo o mundo. Tornando-se por isso importante o desenvolvimento de técnicas de rastreio que permitam o seu diagnóstico precoce, de modo a intervir precocemente. Idealmente, as terapêuticas baseadas em agentes quimioterapêuticos devem, por um lado, ser selectivas para as células tumorais para que os efeitos colaterais do tratamento sejam mínimos, e por outro, assegurar de forma definitiva a morte das células neoplásicas. As modalidades terapêuticas podem não se apresentar eficientes da mesma forma para todos os doentes. A existência de alterações da expressão e mutações na apoptose representam um importante mecanismo para o tumor se tornar quimio-resistente. Essa quimio-resistência pode ser inerente, levando por isso à consequente ausência de resposta terapêutica, ou pode ser adquirida durante o tratamento levando à recorrência da doença. Desta forma, a monitorização da terapêutica configura-se como o melhor meio para aumentar a sobrevida e até mesmo a qualidade de vida dos doentes. Sendo importante a existência de um biomarcador/marcador que permita essa monitorização capaz de prever a eficácia terapêutica.

A aplicação de marcadores de apoptose, dado que a acção dos agentes de quimioterapia e da radioterapia é essencialmente a indução de apoptose/necrose, afigura-se uma excelente estratégia nessa mesma monitorização. A anexina V marcada com fluorocromos para detecção, através citometria de fluxo de células em apoptose tem sido amplamente usada. No entanto, apenas abrange estudos *in vitro*. Desta forma, uma alternativa a essa abordagem passa pela marcação da anexina V através de isótopos radioactivos, que

possibilitam não só a detecção *in vitro* como *in vivo*. A detecção *in vivo* pode ser feita através de PET ou câmara-gama, dependendo do tipo de isótopo usado para essa marcação.

Assim, os estudos *in vitro* realizados assentam em duas perspectivas fundamentais, ou seja, na análise da percentagem de captação da anexina V radiomarcada em células da linha celular WiDr não tratadas e em células WiDr sujeitas a terapêutica com o fármaco indutor de apoptose, o TRAIL.

Nos estudos de captação realizados na linha celular WiDr, pela análise visual da Figura 3.1, observa-se a existência de captação do radioligando, em pequena percentagem ($\approx 4\%$) pelas células logo aos 5 minutos. A expressão de apoptose em células neoplásicas, ainda que insuficiente para retardar o seu crescimento, ocorre de forma espontânea (Kerr *et al.*, 1994). Nesta perspectiva, o valor de percentagem de captação do radioligando obtido inicialmente parece reflectir essa baixa expressão de apoptose.

Ainda de acordo com os dados referidos na Figura 3, podemos observar que a percentagem de captação cresce até aos 120 minutos atingindo cerca de 15%. Este facto deve-se à cinética da própria molécula ou às condições a que a suspensão está sujeita durante os 120 minutos. Isto porque, para cada tempo de captação é necessário retirar o frasco de cultura da incubadora para colher as alíquotas, expondo por isso as células a stresse, o que pode consequentemente induzir a apoptose. Além disso, através dos resultados dos estudos de viabilidade celular com azul tripano realizados ao final dos 120 minutos verifica-se que a viabilidade nunca foi 100%, embora apresentasse valores sempre superiores aos 90%. Ou seja, nos restantes cerca de 10%, apesar de não ser possível através deste método distinguir células em necrose de células em apoptose tardia, não se pode descartar a presença de células em apoptose.

No caso do ^{99m}Tc -livre a captação observada é inferior a 1% ao longo do tempo. Estes valores permitem depreender que a captação obtida nas células de adenocarcinoma colorrectal com a anexina V radiomarcada são consequência da ligação da anexina V à fosfatidilserina exposta, e não consequência da captação de ^{99m}Tc -livre pela linha celular estudada devido à separação do radioligando.

Os resultados obtidos pelos testes não paramétrico, teste de Friedman e teste de Wilcoxon, permitem reforçar a análise efectuada.

A indução de apoptose pelo TRAIL é feita em ambas as vias, extrínseca e intrínseca, através da ligação a receptores existentes na membrana celular (Rozanov *et al.*, 2009). Existem cinco receptores identificados, o TRAIL-R1 (DR4) e o TRAIL-R2 (DR5) que contém domínios de morte (DD, *death domains*), os quais são necessários para a activação da apoptose após a ligação do TRAIL. Os restantes receptores são os receptores armadilha TRAIL-R3 (DcR1) e o TRAIL-R4 (DcR2), e o receptor denominado osteoprotegerina (OPG) circulante que não têm o DD funcional. Pensa-se que estes receptores estão envolvidos na regulação negativa da apoptose por sequestro do TRAIL ou por estimulação de sinais pró-sobrevida (Kruyt, 2008). Após se ligar ao DR4 ou DR5, o TRAIL induz a trimerização do receptor e a alteração conformacional intracelular do DD, e consequente activação do receptor

que permite a ligação do FADD desencadeando-se as vias apoptóticas (Mahalingam *et al.*, 2009).

Nos estudos *in vitro* com as células de adenocarcinoma colorrectal incubadas com TRAIL pretendeu-se analisar a captação da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V por células tratadas com um agente indutor de apoptose TRAIL. Da análise destes estudos de captação verificou-se que a percentagem da anexina V radiomarcada captada, como é possível visualizar através da Figura 3.2, apresenta valores semelhantes entre as células incubadas com o TRAIL e os respectivos controlos (células não tratadas). O que primeiramente, e de acordo com a revisão da literatura, sugere que esta linha celular de adenocarcinoma colorrectal possa ser resistente ao TRAIL. No entanto, relativamente aos resultados obtidos pelos estudos de citometria de fluxo com a anexina V-FITC (*cf.* Tabela 3.3), a percentagem de apoptose nas células incubadas com o TRAIL comparativamente com a percentagem de captação para os mesmos tempos, 2h, 12h e 24h, são semelhantes. Excepto nos controlos, em que a percentagem de apoptose nos estudos de citometria são inferiores comparativamente com a percentagem de captação aos 5min. Esta situação poderá ser reflexo da metodologia aplicada nestes estudos de captação, dado que após o tempo de incubação com o TRAIL o meio foi substituído e só então adicionada a ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V. Pelo que terão sido eliminadas células em apoptose tardia e em necrose, que como tal já não aderidas à placa de cultura.

Outro aspecto a salientar é o facto de a percentagem de captação em células incubadas 2h e 12h com TRAIL ser superior que em células incubadas 24h, visível no gráfico da Figura 3.2. Uma explicação susceptível de afectar a percentagem de captação deve-se ao motivo, anteriormente referido, em que estando mais tempo incubadas com o TRAIL ocorreu mais apoptose nas células, e como tal aquando da substituição do meio foram eliminadas mais células comparativamente aos outros dois tempos de incubação, afectando os valores de percentagem captação. O mesmo pode ser extrapolado através dos resultados de citometria, expostos na Tabela 3.3, em que se verifica que a apoptose aumenta ao longo do tempo, assim como através do aumento de concentração de TRAIL incubado.

Outro factor que possa levar a que os valores de apoptose, determinados nas células tratadas com TRAIL, não sejam muito superiores aos da apoptose determinada nas células WiDr não tratadas é a possível reversibilidade do efeito do TRAIL, devido a mecanismos de resistência ao nível intracelular. Isto porque, apesar dos resultados iniciais promissores, existem vários estudos que mostram que vários tipos de células neoplásicas humanas são resistentes ao TRAIL. Estão descritos diversos mecanismos que conferem resistência ao TRAIL, alguns dos quais estão associados aos receptores de morte e outros ao nível mitocondrial, embora não haja consenso geral (Mellier *et al.*, 2010). De entre vários mecanismos, está postulado que a sobreexpressão de receptores armadilha como os DcR1 e/ou DcR2 pode contribuir para a resistência ao TRAIL, protegendo as células neoplásicas de indução de apoptose pelo TRAIL (Mahalingam *et al.*, 2009).

4.3. Estudos *In Vivo*

Nos estudos de biodistribuição da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V pela análise visual da representação gráfica dos estudos em ratinhos *Balb/c nu/nu* normais e em *Balb/c nu/nu* com xenotransplante verifica-se que são semelhantes, o que sugere que a presença de tumor não altera a farmacocinética da molécula marcada.

Nos estudos *in vivo*, em concordância com os estudos *in vitro*, verifica-se que os valores de captação de anexina V radiomarcada no tumor reflectem a expressão de apoptose, como se pode verificar pela Figura 3.4, em que a percentagem de ID/grama é superior no tumor comparativamente ao músculo. Na mesma linha de raciocínio, de um modo geral, verifica-se que a razão tumor/músculo foi superior à unidade. Estas diferenças foram avaliadas pelo teste de *Wilcoxon* que revela diferenças estatisticamente significativas entre a captação do radiofármaco pelo tumor e pelo músculo. Estes resultados confirmam a potencialidade da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V na diferenciação entre a acumulação do radiofármaco entre tecidos normais e tecidos em apoptose.

Relativamente à influência do volume do tumor na %ID/g verifica-se que apenas existem diferenças estatisticamente significativas entre tumores de volumes pequeno e grande e entre médio e grande. Uma razão passível que justifica esta situação é o facto de o volume da maioria dos tumores pequenos ser próximo dos 500cm^3 , ou seja terem volumes próximos do limite dos tumores de volume médio. Outra justificação possível poderá dever-se à inacessibilidade da molécula marcada ao interior da massa tumoral de CCR por ser um tumor sólido e pouco vascularizado no interior.

Os resultados da biodistribuição, quer nos ratinhos *Balb/c nu/nu* normais quer nos ratinhos com xenotransplante, mostram ainda uma rápida *clearance* sanguínea do radiofármaco, permanecendo abaixo de 0,8% e 1,2% de ID/g, respectivamente, após os 60 minutos (*cf.* Figura 3.3; Figura 3.4). Em concordância, os estudos de imagem em câmara gama reflectem essa farmacocinética favorável, como é possível visualizar pela Figura 3.6 do ratinho 5 minutos após injeção comparativamente com a imagem do mesmo 60 minutos depois.

Outro aspecto que deve ser salientado é a via de excreção do radiofármaco. Após a interpretação das Figura 3.3 e Figura 3.4 verifica-se que a excreção é essencialmente feita ao nível renal, mas verifica-se igualmente que uma pequena percentagem é pela via hepática. Relativamente à elevada percentagem de ID/g nestes dois órgãos, e na sequência da revisão da literatura, esta hipercaptação pode dever-se a que os lisossomas presentes nos rins e no fígado são os principais locais de catabolismo intracelular de proteínas e péptidos. A retenção prolongada da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V nestes órgãos parece ser justificada pela lenta eliminação do produtos de degradação da anexina V marcada pelos lisossomas (Verbeke *et al.*, 2003; Tait *et al.*, 2005). No caso da eliminação pela via hepática, em caso de patologias abdominais, como o cancro colorrectal, pode levantar dificuldades na interpretação das imagens. O facto da acumulação da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V no CCR xenotransplantado se manter praticamente inalterada durante os 360 minutos, afigura-se vantajoso pois permite fazer imagens tardias do tumor, colmatando, assim, esta acumulação elevada no fígado e rins.

Para além destes órgãos observa-se também acumulação moderada do radiofármaco no baço e nos pulmões, pensa-se que devido às propriedades intrínsecas da proteína, como sugerem outros estudos realizados (Tait *et al.*, 2005; Kartachova *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2009; Penn *et al.*, 2010). Ou, devido ao facto da anexina V marcada estar ligada às células apoptóticas que estão em fase de ser removidas por células fagocitárias no baço e pulmão, o que se pode aplicar também ao fígado (Tait *et al.*, 2005).

A percentagem de ID/g ao nível do estômago e tiróide, com valores semelhantes aos do músculo, corroboram os resultados previamente obtidos pelo controlo da qualidade radioquímico. O que reflecte que a molécula radiomarcada com o ^{99m}Tc se mantém intacta *in vivo*. Também como seria de esperar não se verifica captação ao nível cerebral, pois dado a tamanho da molécula marcada, esta não atravessa a barreira hemato-encefálica.

Por outro lado, em contraste com os estudos *in vitro* no qual se verificou um aumento da percentagem de captação nas células de cancro colorrectal, ao longo dos 120 minutos, a percentagem de ID/g mantém-se praticamente inalterada, ao longo dos 360 minutos, nos estudos de biodistribuição. Tais resultados, embora não sejam directamente correlacionáveis, parecem sugerir que o aumento da percentagem de captação ao longo do tempo deve-se ao facto de as células estarem consecutivamente em stresse.

De um modo geral, pode-se constatar através dos resultados por nós obtidos que o processo de radiomarkação da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V permite obter uma boa eficiência de marcação, superior a 90%, sendo um método de preparação rápido e fácil.

A percentagem de captação de ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V por células de cancro colorrectal é significativamente superior à percentagem de captação pelo isótopo ^{99m}Tc , usado na marcação da molécula. Além disso, os resultados dos estudos de captação no qual a mesma linha celular foi tratada com o indutor de apoptose TRAIL reflectem o aumento da percentagem captação relativamente ao aumento de apoptose. Os resultados dos estudos *in vivo* corroboram com estudos anteriores relativamente à acumulação moderada de ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V no baço e fígado, o que poderá tornar o radiofármaco menos conveniente para avaliação de apoptose na região abdominal. Também a nível renal este radiofármaco não se apresenta propício para a avaliação de imagem funcional de apoptose, uma vez que é eliminado na sua maioria pelo rim não permitindo a visualização específica da molécula. Atendendo a localização de captação da ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V sugere-se que a molécula é excretada através do sistema renal e do sistema reticuloendotelial.

Como esperado, a localização do tumor de adenocarcinoma xenotransplantado *in vivo* é possível, sendo ainda confirmado através dos estudos de biodistribuição no qual a razão alvo/fundo, ou seja tumor/músculo, é superior à unidade. Pelo que, se pode considerar que a ^{99m}Tc -HYNIC-Anexina V é um radiofármaco clinicamente útil para a imagem funcional de apoptose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- IARC. 2010a. Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008. 16 de Agosto de 2010. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=900> in Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008, <http://globocan.iarc.fr>
- IARC. 2010b. Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008. 16 de Agosto de 2010. http://globocan.iarc.fr/bar_pop.asp?selection=219900&title=World&sex=0&statistic=1&window=1&grid=1&info=1&color1=4&color1e=&color2=5&color2e=&orientation=1&submit=%A0Execute%A0 in Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008, <http://globocan.iarc.fr>
- Llor X, Pons E, Xicola RM, Castells A, Alenda C, Pinol V, *et al.* 2005. Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway. *Clin Cancer Res* 11:7304-10.
- Tanaka T. 2009. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. *J Carcinog* 8:5.
- Jass JR. 2007a. Molecular heterogeneity of colorectal cancer: Implications for cancer control. *Surg Oncol* 16 Suppl 1:S7-9.
- Ogino S and Goel A. 2008. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 10:13-27.
- Dionigi G, Bianchi V, Rovera F, Boni L, Annoni M, Castano P, *et al.* 2007. Genetic alteration in hereditary colorectal cancer. *Surg Oncol* 16 Suppl 1:S11-5.
- Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, Sánchez-Pernaute A, *et al.* 2010. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical features. *World J Gastrointest Oncol* 2:151-8.
- Jass JR. 2007b. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50:113-30.
- Nathke IS. 2004. The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:337-66.
- Half E, Bercovich D, and Rozen P. 2009. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* 4:22.
- Galiatsatos P and Foulkes WD. 2006. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 101:385-98.
- Nieuwenhuis MH and Vasen HF. 2007. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol* 61:153-61.
- Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, *et al.* 2008. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26:5783-8.
- Lubbe SJ, Webb EL, Chandler IP, and Houlston RS. 2009. Implications of familial colorectal cancer risk profiles and microsatellite instability status. *J Clin Oncol* 27:2238-44.
- Terhaar sive Droste J, FA O, van der Hulst R, Coupé V, Craanen M, Meijer G, *et al.* 2010. Does delay in diagnosing colorectal cancer in symptomatic patients affect tumor stage and survival? A population-based observational study. *BMC Cancer*. 10:11.
- Fletcher RH. 2009. The diagnosis of colorectal cancer in patients with symptoms: finding a needle in a haystack. *BMC Med* 7:18.
- Lyll MS, Dundas SR, Curran S, and Murray GI. 2006. Profiling markers of prognosis in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 12:1184-91.
- Thompson PA and Gerner EW. 2009. Current concepts in colorectal cancer prevention. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 3:369-82.
- Hu J, La Vecchia C, Negri E, and Mery L. 2010. Nutrients and Risk of Colon Cancer. *Cancers* 2:51-67.
- Heiken JP. 2006. Screening for colon cancer. *Cancer Imaging* 6:S13-21.
- Fugazzola C and Iosca S. 2007. Imaging of colorectal cancer: introduction. *Surg Oncol* 16 Suppl 1:S47-8.
- Klessen C, Rogalla P, and Taupitz M. 2007. Local staging of rectal cancer: the current role of MRI. *Eur Radiol* 17:379-89.

Referências Bibliográficas

- Hector S and Prehn JH. 2009. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review. *Biochim Biophys Acta* 1795:117-29.
- Gravalos C, Garcia-Escobar I, Garcia-Alfonso P, Cassinello J, Malon D, and Carrato A. 2009. Adjuvant chemotherapy for stages II, III and IV of colon cancer. *Clin Transl Oncol* 11:526-33.
- Aschele C, Bergamo F, and Lonardi S. 2009. Chemotherapy for operable and advanced colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 35:509-16.
- De Dosso S, Sessa C, and Saletti P. 2009. Adjuvant therapy for colon cancer: present and perspectives. *Cancer Treat Rev* 35:160-6.
- Kasibhatla S and Tseng B. 2003. Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Ther* 2:573-80.
- Sugimoto S, Katano K, Kanazawa A, Yoshimura H, Kidani A, Takeda H, *et al.* 2009. Multicenter safety study of mFOLFOX6 for unresectable advanced/recurrent colorectal cancer in elderly patients. *J Exp Clin Cancer Res* 28:109.
- Noordhuis P, Holwerda U, Van der Wilt CL, Van Groenigen CJ, Smid K, Meijer S, *et al.* 2004. 5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers. *Ann Oncol* 15:1025-32.
- Segal NH and Saltz LB. 2009. Evolving treatment of advanced colon cancer. *Annu Rev Med* 60:207-19.
- Correale P, Tagliaferri P, Fioravanti A, Del Vecchio MT, Remondo C, Montagnani F, *et al.* 2008. Immunity feedback and clinical outcome in colon cancer patients undergoing chemoimmunotherapy with gemcitabine + FOLFOX followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and aldesleukin (GOLFIG-1 Trial). *Clin Cancer Res* 14:4192-9.
- Szliszka E, Czuba ZP, Mazur B, Sedek L, Paradysz A, and Krol W. 2009. Chalcones Enhance TRAIL-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 11:1-13.
- Andre T, Afchain P, Barrier A, Blanchard P, Larsen AK, Tournigand C, *et al.* 2007. Current status of adjuvant therapy for colon cancer. *Gastrointest Cancer Res* 1:90-7.
- Gewirtz DA, Holt SE, Grant S, Duprè A, and Gautier J. 2007. Overview of the DNA Damage Checkpoint. *In: Apoptosis, Senescence, and Cancer* (eds), ed., pp 193-221, Humana Press,
- Brown JM and Attardi LD. 2005. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer* 5:231-7.
- Rugo H. 2010. Cancer. *In: CURRENT Medical Diagnosis and Treatment 2010* (MAP Stephen J. McPhee, Lawrence M. Tierney eds), 49 ed., pp 1756, McGraw-Hill,
- Bhana S and Lloyd DR. 2008. The role of p53 in DNA damage-mediated cytotoxicity overrides its ability to regulate nucleotide excision repair in human fibroblasts. *Mutagenesis* 23:43-50.
- Chylicki K, Ehinger M, Svedberg H, and Gullberg U. 2000. Characterization of the molecular mechanisms for p53-mediated differentiation. *Cell Growth Differ* 11:561-71.
- Fridman JS and Lowe SW. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22:9030-40.
- Tamm I, Schriever F, and Dorken B. 2001. Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *Lancet Oncol* 2:33-42.
- Kerr JF, Winterford CM, and Harmon BV. 1994. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013-26.
- Boersma HH, Liem IH, Kemerink GJ, Thimister PW, Hofstra L, Stolk LM, *et al.* 2003. Comparison between human pharmacokinetics and imaging properties of two conjugation methods for 99mTc-annexin A5. *Br J Radiol* 76:553-60.
- Subbarayan M, Hafeli UO, Feyes DK, Unnithan J, Emancipator SN, and Mukhtar H. 2003. A simplified method for preparation of 99mTc-annexin V and its biologic evaluation for in vivo imaging of apoptosis after photodynamic therapy. *J Nucl Med* 44:650-6.
- Lahorte CM, Vanderheyden JL, Steinmetz N, Van de Wiele C, Dierckx RA, and Slegers G. 2004. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 31:887-919.
- Kenis H, van Genderen H, Deckers NM, Lux PA, Hofstra L, Narula J, *et al.* 2006. Annexin A5 inhibits engulfment through internalization of PS-expressing cell membrane patches. *Exp Cell Res* 312:719-26.
- Hail N, Jr., Carter BZ, Konopleva M, and Andreeff M. 2006. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. *Apoptosis* 11:889-904.

- Kim R. 2005. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. *Cancer* 103:1551-60.
- Fadeel B and Orrenius S. 2005. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 258:479-517.
- Blankenberg FG. 2008a. In vivo detection of apoptosis. *J Nucl Med* 49 Suppl 2:81S-95S.
- Kiechle FL and Zhang X. 2002. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clin Chim Acta* 326:27-45.
- Kerr JF, Wyllie AH, and Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-57.
- Abedin MJ, Wang D, McDonnell MA, Lehmann U, and Kelekar A. 2007. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ* 14:500-10.
- Broker LE, Kruyt FA, and Giaccone G. 2005. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 11:3155-62.
- Tait JF. 2008. Imaging of apoptosis. *J Nucl Med* 49:1573-6.
- Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, and Irimie A. 2009. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol* 48:811-21.
- Strasser A, O'Connor L, and Dixit VM. 2000. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69:217-45.
- Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, Bennaghmouch A, Hofstra L, Narula J, *et al.* 2005. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. *J Nucl Med* 46:2035-50.
- Elmore S. 2007. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35:495-516.
- Koornstra JJ, de Jong S, Hollema H, de Vries EG, and Kleibeuker JH. 2003. Changes in apoptosis during the development of colorectal cancer: a systematic review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol* 45:37-53.
- Blankenberg FG. 2009. Imaging the molecular signatures of apoptosis and injury with radiolabeled annexin V. *Proc Am Thorac Soc* 6:469-76.
- Mirzaie-Joniani H, Eriksson D, Sheikholvaezin A, Johansson A, Lofroth PO, Johansson L, *et al.* 2002. Apoptosis induced by low-dose and low-dose-rate radiation. *Cancer* 94:1210-4.
- Wu GS. 2009. TRAIL as a target in anti-cancer therapy. *Cancer Lett* 285:1-5.
- Ghobrial IM, Witzig TE, and Adjei AA. 2005. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 55:178-94.
- Ricci M and El-Deiry WS. 2007. The Extrinsic Pathway of Apoptosis. *In: Apoptosis, Senescence, and Cancer* (DA Gewirtz, SE Holt, and S Grant eds), ed., pp 31-54, Humana Press,
- Ziegler U and Groscurth P. 2004. Morphological features of cell death. *News Physiol Sci* 19:124-8.
- Stoka V, Turk V, and Bredesen DE. 2006. Differential regulation of the intrinsic pathway of apoptosis in brain and liver during ageing. *FEBS Lett* 580:3739-45.
- Kaufmann S. 2007. The Intrinsic Pathway of Apoptosis. *In: Apoptosis, Senescence, and Cancer* (DA Gewirtz, SE Holt, and S Grant eds), ed., pp 3-30, Humana Press,
- Johnstone RW, Frew AJ, and Smyth MJ. 2008. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer* 8:782-98.
- Blankenberg FG. 2008b. In vivo imaging of apoptosis. *Cancer Biol Ther* 7:1525-32.
- D'Amelio M, Tino E, and Cecconi F. 2008. The apoptosome: emerging insights and new potential targets for drug design. *Pharm Res* 25:740-51.
- Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, and Cheng G. 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev* 14:193-209.
- Kopper L and Peták I. 2008. Apoptosis and cancer. *In: Selected Aspects of Cancer Progression: Metastasis, Apoptosis and Immune Response* (HE Kaiser and A Nasir eds), ed., pp 103-13, Springer,
- Gulow K, Kaminski J, and Krammer P. 2006. The role of CD95/CD95 Ligand Signaling in Apoptosis and Cancer. *In: Apoptosis and Cancer Therapy* (KM Debatin and S Fulda eds), ed., pp 3-30, Wiley-VCH,
- Dai Y, Liu M, Tang W, Li Y, Lian J, Lawrence TS, *et al.* 2009. A Smac-mimetic sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis via modulating both IAPs and NF-kappaB. *BMC Cancer* 9:392.

Referências Bibliográficas

- Grivicich I, Regner A, and Rocha AB. 2007. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia* 53:335-46.
- Cotter TG. 2009. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer* 9:501-7.
- Vance JE and Steenbergen R. 2005. Metabolism and functions of phosphatidylserine. *Prog Lipid Res* 44:207-34.
- Chaurio RA, Janko C, Munoz LE, Frey B, Herrmann M, and Gaipf US. 2009. Phospholipids: key players in apoptosis and immune regulation. *Molecules* 14:4892-914.
- Botto M. 2004. Phosphatidylserine receptor and apoptosis: consequences of a non-ingested meal. *Arthritis Res Ther* 6:147-50.
- Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, *et al.* 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16:3-11.
- Sarda-Mantel L, Coutard M, Rouzet F, Raguin O, Vrigneaud JM, Hervatin F, *et al.* 2006. ^{99m}Tc-annexin-V functional imaging of luminal thrombus activity in abdominal aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:2153-9.
- Vriens PW, Blankenberg FG, Stoot JH, Ohtsuki K, Berry GJ, Tait JF, *et al.* 1998. The use of technetium Tc ^{99m} annexin V for in vivo imaging of apoptosis during cardiac allograft rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg* 116:844-53.
- Brumatti G, Sheridan C, and Martin SJ. 2008. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods* 44:235-40.
- Verbeke K, Kieffer D, Vanderheyden JL, Reutlingsperger C, Steinmetz N, Green A, *et al.* 2003. Optimization of the preparation of ^{99m}Tc-labeled Hynic-derivatized Annexin V for human use. *Nucl Med Biol* 30:771-8.
- Belhocine T, Steinmetz N, Hustinx R, Bartsch P, Jerusalem G, Seidel L, *et al.* 2002. Increased uptake of the apoptosis-imaging agent (^{99m}Tc) recombinant human Annexin V in human tumors after one course of chemotherapy as a predictor of tumor response and patient prognosis. *Clin Cancer Res* 8:2766-74.
- Kemerink GJ, Boersma HH, Thimister PW, Hofstra L, Liem IH, Pakbiers MT, *et al.* 2001. Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc-BTAP-annexin-V in humans. *Eur J Nucl Med* 28:1373-8.
- Pietzsch H-J, Künstler J-U, and Spies H. 2007. Technecium in Medicine - Technecium Coupled to Biologically Active Molecules. *In: Technetium-99m Pharmaceuticals* (IE Zolle eds), ed., pp 40-58, Springer Berlin Heidelberg, Vienna.
- Yang DJ, Azhdarinia A, Wu P, Yu DF, Tansey W, Kalimi SK, *et al.* 2001. In vivo and in vitro measurement of apoptosis in breast cancer cells using ^{99m}Tc-EC-annexin V. *Cancer Biother Radiopharm* 16:73-83.
- Vanderheyden JL, Liu G, He J, Patel B, Tait JF, and Hnatowich DJ. 2006. Evaluation of ^{99m}Tc-MAG3-annexin V: influence of the chelate on in vitro and in vivo properties in mice. *Nucl Med Biol* 33:135-44.
- Ishino S, Kuge Y, Takai N, Tamaki N, Strauss HW, Blankenberg FG, *et al.* 2007. ^{99m}Tc-Annexin A5 for noninvasive characterization of atherosclerotic lesions: imaging and histological studies in myocardial infarction-prone Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 34:889-99.
- Karczmarczyk U, Markiewicz A, Mikolajczak R, Lisiak E, Bilski M, Pietrzykowski J, *et al.* 2004. (^{99m}Tc) human IgG radiolabelled by HYNIC. Biodistribution and scintigraphy of experimentally induced inflammatory lesions in animal model. *Nucl Med Rev Cent East Eur* 7:107-12.
- Noguchi P, Wallace R, Johnson J, Earley EM, O'Brien S, Ferrone S, *et al.* 1979. Characterization of the WIDR: a human colon carcinoma cell line. *In Vitro* 15:401-8.
- Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, *et al.* 1990. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7555-9.
- Wang J, Seethala RR, Zhang Q, Gooding W, van Waes C, Hasegawa H, *et al.* 2008. Autocrine and paracrine chemokine receptor 7 activation in head and neck cancer: implications for therapy. *J Natl Cancer Inst* 100:502-12.
- Blankenberg FG, Kalinyak J, Liu L, Koike M, Cheng D, Goris ML, *et al.* 2006. ^{99m}Tc-HYNIC-annexin V SPECT imaging of acute stroke and its response to neuroprotective therapy with anti-Fas ligand antibody. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 33:566-74.
- Saha GB. 2010. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*

- Mazzi U, Schibli R, Pietzsch H-J, Künstler J-U, and Spies H. 2007. Technetium in Medicine - ^{99m}Tc-Technetium Chemistry. *In: Technetium-99m Pharmaceuticals* (IE Zolle eds), ed., pp 7-26, Springer Berlin Heidelberg,
- Liu S, Edwards DS, Looby RJ, Harris AR, Poirier MJ, Barrett JA, *et al.* 1996. Labeling a hydrazino nicotinamide-modified cyclic IIb/IIIa receptor antagonist with ^{99m}Tc using aminocarboxylates as coligands. *Bioconjug Chem* 7:63-71.
- Rozanov DV, Savinov AY, Golubkov VS, Rozanova OL, Postnova TI, Sergienko EA, *et al.* 2009. Engineering a leucine zipper-TRAIL homotrimer with improved cytotoxicity in tumor cells. *Mol Cancer Ther* 8:1515-25.
- Kruyt FA. 2008. TRAIL and cancer therapy. *Cancer Lett* 263:14-25.
- Mahalingam D, Szegezdi E, Keane M, de Jong S, and Samali A. 2009. TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev* 35:280-8.
- Mellier G, Huang S, Shenoy K, and Pervaiz S. 2010. TRAILing death in cancer. *Mol Aspects Med* 31:93-112.
- Tait JF, Smith C, and Blankenberg FG. 2005. Structural requirements for in vivo detection of cell death with ^{99m}Tc-annexin V. *J Nucl Med* 46:807-15.
- Kartachova M, Haas RL, Olmos RA, Hoebbers FJ, van Zandwijk N, and Verheij M. 2004. In vivo imaging of apoptosis by ^{99m}Tc-Annexin V scintigraphy: visual analysis in relation to treatment response. *Radiother Oncol* 72:333-9.
- Guo MF, Zhao Y, Tian R, Li L, Guo L, Xu F, *et al.* 2009. In vivo ^{99m}Tc-HYNIC-annexin V imaging of early tumor apoptosis in mice after single dose irradiation. *J Exp Clin Cancer Res* 28:136.
- Penn DL, Kim C, Zhang K, Mukherjee A, Devakumar D, Jungkind D, *et al.* 2010. Apoptotic abscess imaging with ^{99m}Tc-HYNIC-rh-Annexin-V. *Nucl Med Biol* 37:29-34.