

**Instituto de Engenharia Nuclear  
IEN**

**AVALIAÇÃO DE DUAS FORMULAÇÕES PARA O DIAGNÓSTICO POR  
IMAGEM DA ENDOMETRIOSE UTILIZANDO ANTICORPO ANTI VEGF-A  
(BEVACIZUMABE) RADIOMARCADO.**

MARIA CRISTINA DE SOUZA GAMA

Rio de Janeiro, RJ  
Novembro de 2015

MARIA CRISTINA DE SOUZA GAMA

**AVALIAÇÃO DE DUAS FORMULAÇÕES PARA O DIAGNÓSTICO POR  
IMAGEM DA ENDOMETRIOSE UTILIZANDO ANTICORPO ANTI VEGF-A  
(BEVACIZUMABE) RADIOMARCADO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Nucleares do Instituto de Engenharia Nuclear da Comissão de Energia Nuclear, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestra em Ciência e Tecnologia Nucleares.

Orientador: Ph.D Ralph Santos-Oliveira

Rio de Janeiro, RJ  
Novembro de 2015

GAMA Gama, Maria Cristina de Souza.  
Avaliação de duas formulações para o diagnóstico por imagem da endometriose utilizando anticorpo Anti VEGF-A (Bevacizumabe) radiomarcado / Maria Cristina de Souza Gama – Rio de Janeiro: CNEN/IEN, 2015.

70f.

Orientador: Ralph Santos-Oliveira  
Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologias Nucleares) – Instituto de Engenharia Nuclear, PPGIEN, 2015

1. Endometriose. 2. Bevacizumabe. 3. Radiofármaco.  
4. Nanotecnologia.

**AVALIAÇÃO DE DUAS FORMULAÇÕES PARA O DIAGNÓSTICO POR  
IMAGEM DA ENDOMETRIOSE UTILIZANDO ANTICORPO ANTI VEGF-A  
(BEVACIZUMABE) RADIOMARCADO.**

MARIA CRISTINA DE SOUZA GAMA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Nucleares do Instituto de Engenharia Nuclear da Comissão Nacional de Energia Nuclear, como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Mestra em Ciência e Tecnologia Nucleares.

Aprovada por:

---

Prof. Ralph Santos-Oliveira, Ph.D

---

Prof. Gláucio Diré Feliciano, Dr. - UEZO

---

Prof<sup>a</sup>. Jamila Alessandra Perini, Dr.<sup>a</sup> - UEZO

---

Prof. Antônio Carlos de Abreu Mól, D.Sc. - IEN

RIO DE JANEIRO, RJ  
NOVEMBRO DE 2015

## **Dedicatória**

Dedico esta dissertação à Deus, pois nada em minha vida acontece sem que seja da sua vontade.

Dedico principalmente às minhas filhas Ana Carolina e Ana Clara que são o incentivo maior em minha vida pra que eu busque cada vez mais melhorar e servir de exemplo para elas.

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu orientador Ralph Santos-Oliveira que é minha referência como profissional e ser humano, motivo de orgulho para a profissão farmacêutica e para a radiofarmácia, peça fundamental para que eu chegasse ao objetivo que agora alcanço.

Às pacientes portadoras de endometriose, que assim como eu, sofrem e lutam contra essa doença ainda misteriosa.

Aos professores que contribuíram como exemplos profissionais e com o conhecimento compartilhado por eles para a minha formação.

Aqueles que de alguma forma me ajudaram; e também aqueles que tentaram me prejudicar, me ensinando como vencer as barreiras.

Aos órgãos de fomento CNPq, FAPERJ e CAPES que de forma direta ou indireta proporcionaram esse trabalho.

Às alunas de iniciação científica Suyene e Sarah e ao Mestre Fagner, que me ajudaram em meu experimento.

## *Epígrafe*

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos  
não é senão uma gota de água no mar, mas  
o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

*(Madre Teresa de Calcutá)*

*“A verdadeira viagem de descobrimento não  
consiste em procurar novas paisagens, mas  
em ter novos olhos”.*

*(Marcelo Proust)*

## RESUMO

Radiofármacos são preparações farmacêuticas que possuem em sua composição um ou mais radionuclídeos e que podem ser utilizados em medicina nuclear para terapia ou diagnóstico. Entre os radiofármacos destacam-se os anticorpos monoclonais, por sua alta especificidade para antígenos de doenças como o câncer e outras patologias. O bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante IgG1 específico, inibidor do VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular). A endometriose é uma doença caracterizada pela presença de tecido endometrial fora da cavidade uterina e que acomete de 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva. Várias teorias tentam explicar a origem desta misteriosa patologia, porém a hipótese mais aceita atualmente é a teoria da menstruação retrógrada, formulada por Sampson em 1927. Segundo esta teoria, fragmentos do endométrio sofrem refluxo em direção contrária ao fluxo menstrual normal, passando pelas trompas ovarianas e alcançando a cavidade peritoneal, onde podem se aderir, implantar ou proliferar. Esses implantes necessitam de suprimento sanguíneo para sobreviver, por isso a angiogênese e a vasculogênese estão diretamente relacionadas à fisiopatologia da endometriose. Baseado nestas informações, diversas substâncias tem sido desenvolvidas com o intuito de inibir o processo de angiogênese e servirem de tratamento ou diagnóstico para a endometriose. O bevacizumabe radiomarcado com tecnécio 99-m está sendo estudado como opção diagnóstica alternativa, pouco invasiva e que permite detectar mais precocemente a doença; contudo, obstáculos como o direcionamento e adesão do fármaco ao sítio alvo e dificuldades com a transposição de barreiras moleculares tem sido observados no uso de radiofármacos para diagnóstico. A utilização da nanotecnologia pode ajudar na transposição destes problemas, melhorando o direcionamento, funcionalidade e disponibilidade do radiofármaco. O objetivo deste estudo foi comparar e analisar duas formulações de bevacizumabe marcadas com Tecnécio 99-m: uma convencional e outra nanoparticulada, como possíveis métodos de diagnóstico por imagem da endometriose. O estudo foi realizado em duas ratas *Wistar* com endometriose peritoneal induzida através do modelo experimental. Cada rata recebeu uma formulação diferente do radiofármaco através de injeção via intra-ocular; após uma hora as ratas foram sacrificadas, seus órgãos removidos e



levados ao contador gama para que a radioatividade fosse quantificada. Os resultados obtidos através de gráficos, foram comparados e demonstraram que ambas as formulações conseguiram alcançar a lesão e desta forma podem ser utilizadas como diagnóstico da endometriose, no entanto a nanopartícula apresentou vantagens em relação ao fármaco livre: O nanorradiofármaco possui melhores padrões farmacocinéticos, como distribuição sanguínea, metabolização hepática e eliminação renal quando comparado à formulação convencional; além disso, apresenta menor quantidade de efeitos adversos indesejáveis em órgãos como estômago, intestinos, coração e cérebro devido a sua reduzida concentração nestes órgãos, o que proporciona mais segurança para o paciente. Diante dos resultados obtidos a nanopartícula, se mostrou como a melhor opção para diagnóstico por imagem da endometriose, por ser mais segura e específica do que o radiofármaco convencional.

**Palavras-Chaves:** Radiofármaco; Endometriose; Bevacizumabe; Nanotecnologia.

## ABSTRACT

Radiopharmaceuticals are pharmaceutical preparations, which have in their composition one or more radionuclides that may be used in nuclear medicine for therapy or diagnosis. Among the radiopharmaceuticals stand out monoclonal antibodies, for its high specificity for disease antigens like cancer and other diseases. Bevacizumab is a recombinant humanized monoclonal IgG1 antibody specific inhibitor, VEGF (vascular endothelial growth factor). Endometriosis is a disease characterized by the presence of endometrial tissue outside the uterine cavity and that affects 10 to 15% of women in reproductive age. Several theories attempt to explain the origin of this mysterious disease, but the most accepted hypothesis is the retrograde menstruation theory, formulated by Sampson in 1927. According to this theory, endometrial fragments suffer from reflux in the opposite direction to normal menstrual flow, through the ovarian tubes and reaching the peritoneal cavity, where they can join, deploy or proliferate. These implants require blood supply to survive, so angiogenesis and vasculogenesis are directly related to the pathophysiology of endometriosis. Based on this information, various substances have been developed in order to inhibit the process of angiogenesis and serve for treatment or diagnosis of endometriosis. Bevacizumab radiolabeled with technetium 99-m is being studied as an alternative diagnostic option, minimally invasive and allows early detect the disease; however, barriers such as targeting and adhesion of the drug to the target site and difficulties with the implementation of molecular barriers have been observed in the use of radiopharmaceuticals for diagnosis. The use of nanotechnology can help in the implementation of these problems, improving the targeting, functionality and availability of the radiopharmaceutical. The objective of this study was to compare and analyze two bevacizumab formulations labeled with Technetium 99-m: one conventional and one nanoparticle as possible imaging methods endometriosis. The study was conducted in two Wistar rats with peritoneal endometriosis induced by experimental model. Each rat received a different formulation of the radiopharmaceutical by injection via intraocular; after an hour the rats were sacrificed, their organs removed and taken to the range counter to that radioactivity was quantified. The results obtained in graphs were compared and showed that both formulations were able to reach the lesion and thus can be used as diagnosis of

endometriosis, however the nanoparticle advantageous in relation to free drug: Nanoradiopharmaceuticals has better pharmacokinetic patterns such as blood distribution, liver metabolism and renal elimination when compared to conventional formulation; moreover, presents a lower amount of undesirable adverse effects on organs such as stomach, intestines, heart and brain due to its reduced concentration in these organs which provides more safety for the patient. Based on these results, the nanoparticle has proved to be the best option for image diagnosis of endometriosis, because it is safer and specific than conventional radiopharmaceutical.

**Keywords:** Radiopharmaceutical; Endometriosis; Bevacizumab; Nanotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1:</b> Localização dos focos de endometriose.....	16
<b>Figura 2:</b> Endometriose grave com aderências da parede posterior do útero no cólon sigmoide.....	17
<b>Figura 3:</b> Endometriose. Lesões vermelhas em vários órgãos.....	18
<b>Figura 4:</b> Endometriomas (endometriose nos ovários).....	22
<b>Figura 5:</b> Ultrassom de endometriose.....	23
<b>Figura 6:</b> Ressonância Magnética de Endometriose.....	24
<b>Figura 7:</b> Tomografia PET de endometriose.....	24
<b>Figura 8:</b> Classificação da endometriose segundo a American Society of Reproductive Medicine: A) Endometriose de Grau I (mínima); B) Endometriose de Grau II (leve); C) Endometriose de Grau III (moderada) e D) Endometriose de Grau IV (severa).....	25
<b>Figura 9:</b> Ciclo de produção de anticorpos monoclonais.....	31
<b>Figura 10:</b> Geradores de tecnécio-99m. O da esquerda, com plástico transparente, permite a observação de parte do sistema de eluição e da blindagem.....	35
<b>Figura 11:</b> Abordagens utilizadas para desenvolvimento de Nanoestruturas.....	40
<b>Figura 12:</b> Procedimento cirúrgico para o estabelecimento das lesões endometrióticas em ratas. (A) Região peritoneal aberta e útero localizado; (B e C) Corno uterino retirado e colocado em meio de cultura (D) Fragmentos de endométrio coletados após abertura longitudinal do corno uterino.....	45
<b>Figura 13:</b> Preparação da Emulsão Água/Óleo (a/o) com 2% de Bevacizumabe.....	47
<b>Figura 14:</b> Preparação da Emulsão Água/Óleo/Água (a/o/a) com 2% de Bevacizumabe.....	47
<b>Figura 15:</b> Evaporação do Solvente Orgânico da Emulsão Água/Óleo/Água (a/o/a) com 2% de Bevacizumabe.....	48
<b>Figura 16:</b> Retirada do Excesso de resíduos das nanopartículas de PLA/PVA/BEVACIZUMABE.....	49
<b>Figura 17:</b> Esquema de marcação direta do Avastin® utilizando cloreto estano como agente redutor.....	50

<b>Figura 18:</b> Dissecção da rata <i>Wistar</i> para retirada dos órgão após sacrifício na câmara de gás dióxido de carbono.....	51
<b>Figura 19:</b> contador Gama Perkin Elmer modelo Wizard® 2470 utilizado no experimento para quantificar a radiação.....	52
<b>Figura 20:</b> Biodistribuição do bevacizumabe (Avastin®).....	53
<b>Figura 21:</b> Biodistribuição da nanopartícula de bevacizumabe (Nano-Avastin®).....	53
<b>Figura 22:</b> Biodistribuição do Avastin® sem a biodistribuição renal.....	54
<b>Figura 23:</b> Biodistribuição do Nano-Avastin® sem a biodistribuição renal.....	55

## LISTA DE TABELAS

Pág.

<b>Tabela 1:</b> Kits de reagentes liofilizados usados para diagnóstico e marcação com Tecnécio-99m (Fonte: Manual de especificações técnicas dos radiofármacos, IPEN, 2013).....	35
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**<sup>99m</sup>Tc** - Tecnécio 99-metaestável

**ACHOs** - Anticoncepcionais Hormonais Orais

**aGnRH** - Análogos do GnRH

**ASRM** - American Society for Reproductive Medicine

**CCRm** - Câncer colorretal metastático

**CMM** - câncer de mama metastático

**Cn** - Cloreto de sódio

**CISn<sup>2</sup>** – Cloreto estanoso

**CNEN** - Comissão Nacional de Energia Nuclear

**CNPq** - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**DMPA** - Aepot-MedroxyProgesterone Acetate

**FDA** - Food and Drug Administration

**FEBRASGO** - Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia

**ICT** - Instituto de Ciência e Tecnologia

**IL** - Interleucina

**MCT** - Ministério da Ciência e Tecnologia

**mRCC** - Câncer de Células Renais Metastático

**NK** - Natural Killer

**NNI** - National Nanotechnology Initiative

**NSCNN** - Comitê Nacional para Nanociência e Nanotecnologia

**P&D** - Pesquisa e Desenvolvimento

**PET** - Positron Emission Tomography

**PPA** - Plano Pluri Anual

**RM** - Ressonância Magnética

**SEPR** - Síndrome da Encefalopatia Posterior Reversível

**SPECT** - Single Photon Emission Computatorized Tomography

**TNF** - Fator de Necrose Tumoral

**VEGF** – Vascular Endothelial Growth Factor

## SUMÁRIO

	Pág.
<b>1.0 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>15</b>
2.1 Endometriose.....	15
2.1.1 <b>Definição.....</b>	<b>15</b>
2.1.2 <b>Fisiopatologia.....</b>	<b>16</b>
2.1.3 <b>Epidemiologia.....</b>	<b>19</b>
2.1.4 <b>Etiologia.....</b>	<b>19</b>
2.1.4.1 Endometriose e angiogênese.....	20
2.1.5 <b>Diagnóstico.....</b>	<b>21</b>
2.1.6 <b>Classificação.....</b>	<b>25</b>
2.1.7 <b>Tratamento.....</b>	<b>26</b>
2.1.7.1 Tratamento cirúrgico.....	26
2.1.7.2 Tratamento medicamentoso.....	27
2.2 Bevacizumabe.....	28
2.3 Radiofármacos.....	32
2.4 Nanorradiofármacos.....	36
2.5 Nanotecnologia.....	36
2.5.1 <b>Métodos de preparação de nanomateriais.....</b>	<b>39</b>
2.5.2 <b>Aplicações da nanotecnologia.....</b>	<b>40</b>
2.5.3 <b>Nanobiotecnologia.....</b>	<b>41</b>
2.5.4 <b>Nanocarreadores de fármacos.....</b>	<b>42</b>
<b>3.0 OBJETIVO.....</b>	<b>43</b>
3.1 Objetivo geral.....	43
3.2 Objetivos Específicos.....	43
<b>4.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1 Materiais.....	44
4.1.1 <b>Equipamentos.....</b>	<b>44</b>
4.1.2 <b>Reagentes e solventes.....</b>	<b>44</b>



4.1.3	<b>Animais.....</b>	<b>44</b>
4.2	<b>Métodos.....</b>	<b>45</b>
4.2.1	<b>Modelo Experimental de endometriose em ratas <i>WISTAR</i>.....</b>	<b>45</b>
4.2.2	<b>Obtenção da nanopartícula de bevacizumabe.....</b>	<b>46</b>
4.2.3	<b>Marcação do bevacizumabe na forma convencional e na forma de nanopartícula com <sup>99m</sup>Tc.....</b>	<b>49</b>
4.2.4	<b>Estudo de biodistribuição do bevacizumabe radiomarcado com <sup>99m</sup>Tc (convencional e nanopartícula) .....</b>	<b>51</b>
5.0	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
5.1	Estudo de biodistribuição do bevacizumabe radiomarcado com <sup>99m</sup> Tc.....	53
6.0	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>57</b>
7.0	<b>OBJETIVOS FUTUROS.....</b>	<b>59</b>
8.0	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>
Anexo A:	Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEZO).....	65

## 1.0 INTRODUÇÃO

Radiofármacos são preparações farmacêuticas sem ação farmacológica, com finalidade diagnóstica ou terapêutica e que possuem em sua composição um ou mais radionuclídeos emissores de radiação  $\gamma$  ou pósitrons ( $\beta^+$ ), que quando decaem emitem uma radiação eletromagnética penetrante capaz de atravessar os tecidos e serem detectadas por aparelhos específicos no meio externo (ANVISA, 2009). Em medicina nuclear, há muito que são utilizados no diagnóstico de diversas doenças como o câncer (OLIVEIRA, 2006); neste contexto o uso de anticorpos monoclonais radiomarcados com propósito diagnóstico é um recurso bastante útil, visto que possuem alta especificidade para antígenos associados à tumores e outras patologias. Esta característica permite que eles sejam usados como carreadores de radionuclídeos altamente específicos para células e órgãos. O radioisótopo mais empregado na marcação de anticorpos atualmente é o tecnécio-99m (mais de 80% dos radiofármacos), porém outros isótopos podem ser utilizados como: Iodo-131, Iodo-123 e Índio-111 (DIAS, 2005).

Entre os anticorpos monoclonais disponíveis, destaca-se o Bevacizumabe, indicado para o tratamento de primeira linha do câncer colorretal metastático e de alguns outros tipos de cânceres quando associado à outras terapias. É um anticorpo monoclonal humanizado recombinante IgG1 específico com alta afinidade pelo Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) (KRÄMER e LIPP, 2007), onde se liga e impede que o mesmo se ligue à seus receptores tirosina quinase Flt-1 (VEGFR-1) e KDR (VEGFR-2), na superfície das células endoteliais, reduzindo assim a vascularização dos tumores e inibindo o crescimento tumoral (ANVISA, 2014).

A endometriose, uma doença que atinge de 10 a 15% das mulheres em idade reprodutiva e apresenta alta prevalência em mulheres com dor e infertilidade (MATTA e MULLER, 2006), é uma patologia estrógeno dependente, na qual o tecido endometrial (glândulas e estroma) implanta-se fora da cavidade uterina (SOUZA *et al.*, 1996; BARTKOWIAK *et al.*, 2000).

Ao longo dos anos, foram descritas várias teorias para explicar a etiologia da endometriose, contudo pouco se sabe ainda da sua etiologia e a da sua evolução (Lagos *et al.*, 2010). A teoria da menstruação retrógrada formulada por Sampson em

1927, é atualmente a hipótese mais aceita como causa da endometriose. Esta propõe que fragmentos do endométrio sofram refluxo em direção contrária ao fluxo menstrual normal, passando pelas trompas ovarianas e alcançando a cavidade peritoneal, onde podem se aderir, implantar ou proliferar (BRAGANÇA, 2013). A sobrevivência destes fragmentos em localização ectópica exige o fornecimento de sangue através da formação de novos vasos sanguíneos, desta forma a endometriose é caracterizada por vasta vascularização e presença de vários fatores angiogênicos, dentre eles o VEGF (FERRERO, 2006). Com base nessa observação, muitas substâncias capazes de interferir no processo de angiogênese vem sendo estudadas para o tratamento e diagnóstico da endometriose (MACHADO, 2009).

Na busca por um método menos invasivo no diagnóstico da endometriose, já que o método diagnóstico definitivo disponível atualmente é a videolaparoscopia (um método cirúrgico), inúmeros estudos tem sido feitos. O uso do bevacizumabe tem sido avaliado como método diagnóstico alternativo, pouco invasivo e capaz de detectar precocemente a doença.

No estudo de Machado *et al.*, 2015, o bevacizumabe marcado com tecnécio-99m foi injetado em ratas *WISTAR* com endometriose experimental induzida no peritônio. O objetivo foi avaliar o uso do radiofármaco no diagnóstico precoce e não invasivo da endometriose. Neste trabalho, foram feitos testes de biodistribuição das lesões e diversos órgãos, no entanto, muitas vezes, surgem alguns obstáculos no direcionamento e na adesão do radiofármaco ao local de interesse diagnóstico, sobretudo dificuldades na transposição de barreiras moleculares. A nanotecnologia oferece uma importante contribuição na superação destes obstáculos e na funcionalização das nanopartículas, melhorando o direcionamento através do uso de nucleotídeos de superfície e do aumento da aderência, o que facilita a disponibilidade do radiofármaco (BRAGA, 2015).

O presente trabalho reproduziu o estudo de Machado *et al.*, 2015, só que com o bevacizumabe encapsulado em forma de nanopartículas. O objetivo principal do trabalho foi avaliar as duas formulações de bevacizumabe marcadas com tecnécio 99-m: a forma convencional e a forma nanoparticulada. Ambas as formulações foram administradas em ratas *WISTAR* que após serem sacrificadas, tiveram seus órgãos e lesão removidos e levados ao contador gama para quantificar a radiação de cada órgão, do sangue e da lesão. Os resultados foram gerados através de gráficos e suas considerações e conclusões são discutidas ao longo do trabalho.

## 2.0 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ENDOMETRIOSE

#### 2.1.1 Definição

A FEBRASGO (Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia) define a endometriose como sendo a presença de tecido semelhante ao endométrio, com glândulas e estroma, fora da cavidade do útero (localização ectópica). Pode ser classificada como interna ou externa; a interna atualmente denominada “adenomiose”, refere-se à presença de tecido endometrial no miométrio e a externa refere-se à presença de endométrio em todas as outras localizações. A adenomiose é considerada uma entidade clínica distinta já que a sua patogênese, sintomas e epidemiologia diferem da endometriose. A endometriose externa, simplesmente conhecida por endometriose, é uma das principais causas de dor pélvica e infertilidade, comprometendo a qualidade de vida e causando o desgaste físico, mental e emocional das mulheres acometidas por esta patologia, visto que seu diagnóstico costuma ser falho e tardio. Estudos demonstram que o tempo do início do sintoma até o diagnóstico definitivo pode levar muitos anos. Em média, uma paciente demora até 8 anos para apresentar dor e 5 anos para apresentar infertilidade relacionada a endometriose (CAMPOS *et al.*, 2008).

Normalmente a endometriose atinge locais como a cavidade peritoneal, ovários ou septo retovaginal (figura 1) e pode ser de evolução lenta e benigna ou atingir, mesmo que raramente, vários órgãos distantes da pélvis como bexiga, intestino, encéfalo, rins e pulmões, sendo também capaz de causar o chamado carcinoma endometrióide (CAMPOS *et al.*, 2008).

Segundo Navarro *et al.* (2006), a endometriose é o motivo da infertilidade de 20 a 50% das mulheres que possuem problemas para engravidar, sendo que de 30 a 50% das mulheres portadoras de endometriose são inférteis. A infertilidade está associada à endometriose principalmente quando é moderada ou severa e quando ocorre comprometimento da anatomia pélvica.



Figura 1 - Localização dos focos de endometriose (Fonte: [www.endometrioses.com.br](http://www.endometrioses.com.br)).

### 2.1.2 Fisiopatologia

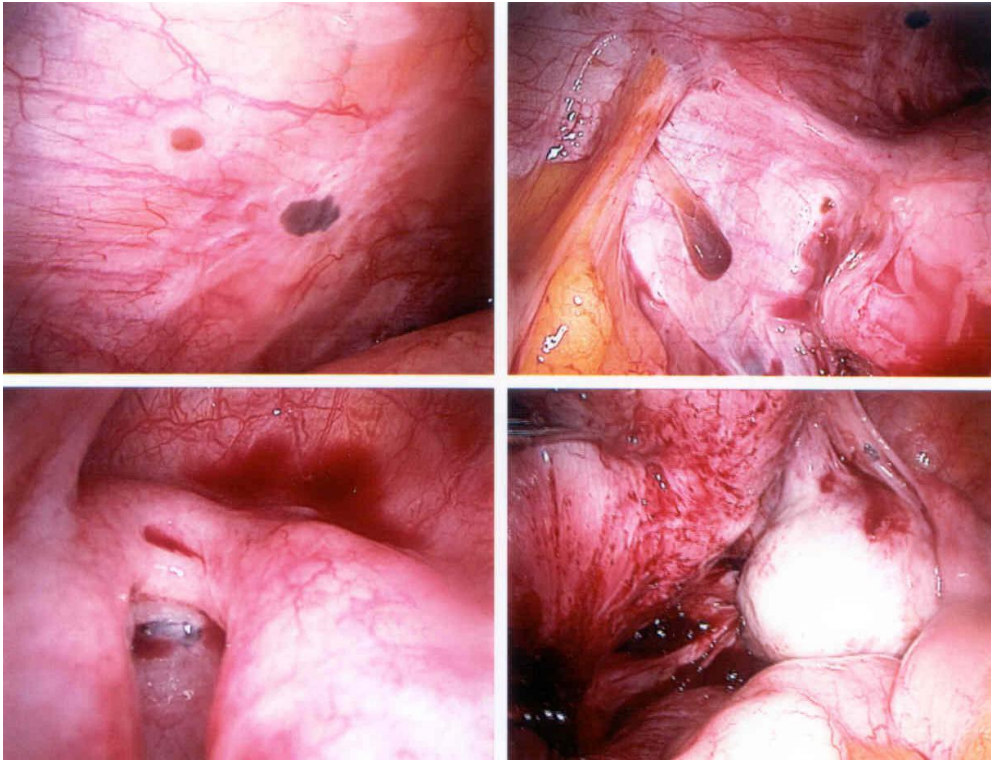
Uma das queixas mais frequentes em portadoras de endometriose é a dor cíclica e acíclica. Esta dor é causada pela estimulação hormonal do estrogênio e da progesterona durante o ciclo menstrual; esses hormônios estimulam os implantes endometrióticos (que podem ser superficiais ou invasivos), a crescerem e sofrerem alterações, respondendo ao mesmo estímulo hormonal do ciclo menstrual normal da mulher. Todas as mudanças do endométrio que ocorrem dentro da cavidade uterina, também podem ocorrer fora da cavidade uterina. A presença de um tecido fibrótico que rodeia o implante endometriótico, impede sua expansão e consequente drenagem do líquido hemorrágico; este sangramento interno provoca aumento das lesões e causa inflamações, dor, infertilidade, aderências (Figura 2) e dificuldades funcionais. Esse processo se repete todo mês durante os ciclos menstruais causando dor e inflamação na lesão e ao redor da lesão. A inflamação é causada pela pressão exercida sobre as aderências associadas à lesão, pelo número de implantes, pela sua proximidade a estruturas nervosas e sensitivas e pelo efeito de

massa das lesões de maior dimensão (MATTA e MULLER, 2006; CAMPOS *et al.*, 2008).

Segundo o aspecto laparoscópico das lesões, estas podem ser tipicamente negras; pregueadas e associadas a uma cicatrização em forma de estrela, originadas do sangramento tecidual e retenção de pigmentos sanguíneos. Outras lesões mais comuns são lesões vermelhas (lesões em chama de vela, petéquias, áreas de hipervascularização e excrescências vasculares) (Figura 3) e lesões brancas (opacificações brancas, aderências subovarianas, defeitos do peritônio e lesões do tipo café com leite) (PODGAEC, 2004).



**Figura 2 - Endometriose grave com aderências da parede posterior do útero no cólon sigmóide (Fonte: <http://drwilliamkondo.site.med.br>).**



**Figura 3 - Endometriose. Lesões vermelhas em vários órgãos.**  
 (<http://emedicine.medscape.com/article/271899-overview>).

Se faz necessário ressaltar, que muitas portadoras de endometriose não sentem dor, sendo portanto assintomáticas. A dor grave é associada muito mais a presença de lesões infiltrativas profundas, tendo mais relação com a profundidade da invasão, do que com a quantidade e distribuição da doença (CAMPOS *et al.*, 2008) portanto, a dor não pode ser utilizada como único parâmetro de diagnóstico e classificação da doença.

O mecanismo fisiopatogênico da infertilidade é desconhecido. É possível que as lesões endometrióticas segreguem prostaglandinas F<sub>2</sub> e E<sub>2</sub><sup>1</sup> para o líquido peritoneal. Outro fator associativo a infertilidade é referente a foliculogênese das portadoras. Essas apresentam baixos níveis séricos de estradiol, pequena dimensão dos folículos durante o crescimento folicular, menores índices de fertilização dos oócitos e baixos índices de gravidez nos processos de reprodução assistida. Existem igualmente problemas com a captação do oócito pela trompa de falópio e de implantação do embrião no endométrio (CAMPOS *et al.*, 2008; MEYER, 2011).

---

<sup>1</sup> N.A.: moléculas que podem, em teoria, diminuir a fertilidade pelo potencial de alterarem a ovulação, motilidade tubária, nidacão e fase lútea

### 2.1.3 Epidemiologia

A endometriose é uma patologia em que sua epidemiologia apresenta dados científicos conflitantes e inconclusivos. Sua incidência depende do grupo de pacientes avaliados, variando de acordo com a idade, escolha do procedimento diagnóstico, interesse do médico pela patologia, hospital em que está sendo realizado o estudo e das queixas das pacientes que estão sendo estudadas (FEBRASGO, 2010).

No período entre julho de 1999 a dezembro de 2009 foi feito um estudo em 892 pacientes do setor de endometriose do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os resultados do estudo confirmaram que a idade média das pacientes foi de 33,2 anos com uma maior prevalência de mulheres brancas (78,7%) e casadas ou com união estável. Em relação ao grau de instrução 76,9 possuíam 2º ou 3º graus completos. Aproximadamente 5,3% das pacientes tinham histórico familiar de primeiro grau de endometriose. Em relação aos antecedentes obstétricos, 56,5% das pacientes eram nulíparas<sup>2</sup>. Das 387 pacientes que já haviam engravidado 49,3% apresentavam uma única gestação (BELLELIS *et al.*, 2010). Existe uma relação entre a nuliparidade e uma maior incidência de endometriose, ficando a paciente nuligesta mais tempo exposta ao estrogênio, sem a proteção da progesterona da gestação (FEBRASGO, 2010).

### 2.1.4 Etiologia

Existem várias teorias que tentam explicar a origem da endometriose, contudo nenhuma consegue explicar todos os casos e localizações da doença; talvez a associação de duas ou mais teorias consiga explicar melhor esta enigmática patologia (KRATKA, 2002).

---

<sup>2</sup> N.A: Nuliparas: mulheres que nunca tiveram filhos.



Entre as diversas teorias propostas existe a “teoria da metaplasia celômica”, em que a origem da patologia seria a transformação, ou seja a metaplasia do tecido peritoneal normal (mesotélio) em tecido endometrial ectópico, induzida por estimulantes endógenos liberados pela degeneração do endométrio menstrual ou por fatores imunológicos (FAGUNDES *et al.*, 2012). Outras teorias foram propostas como a teoria dos restos embrionários, teoria da disseminação linfática e hematogênica, teoria hormonal, da hipótese iatrogênica, entre outras (LAGOS *et al.*, 2010).

A principal teoria aceita atualmente é a teoria formulada por Sampson em 1927: a “teoria da menstruação retrógrada”, que defende a ocorrência de refluxo do sangue menstrual através das tubas uterinas para a cavidade abdominal e que neste local os fragmentos endometriais formam aderências (MACHADO, 2009). Apesar de ser uma teoria bem aceita, muitos aspectos celulares e moleculares ainda não estão bem estabelecidos. Muitas mulheres podem apresentar fluxo menstrual retrógrado, no entanto, a grande maioria não desenvolve endometriose, o sistema imunológico destas mulheres é capaz de eliminar os fragmentos endometriais e impedir sua implantação e desenvolvimento em região ectópica. Em algumas pacientes, estes fragmentos não conseguem ser eliminados, ocorrendo então o desenvolvimento da endometriose (CARDOSO, 2013). Para que esses fragmentos possam se implantar e se desenvolver na cavidade peritoneal, é necessário o fornecimento de sangue através da criação de nova rede vascular, este processo é denominado angiogênese (FERRERO, 2006).

#### **2.1.4.1 Endometriose e angiogênese**

A angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos pré-existentes e raramente ocorre em adultos, a não ser durante o período menstrual, em processos de cicatrização de feridas ou no desenvolvimento de doenças como o câncer (MACHADO, 2009).

Constitui uma sequência de eventos fisiológicos fundamentais para o organismo, que incluem a embriogênese, o ciclo menstrual e a cicatrização de feridas, porém pode também estar envolvida em eventos patológicos como o

crescimento de tumores, aterosclerose, inflamação crônica e endometriose. A angiogênese é um pré-requisito para a manutenção e crescimento da endometriose (NAP *et al*, 2004).

Existem vários fatores que controlam a estimulação ou a inibição da angiogênese. O *Endotelial Vascular Growth Factor* (VEGF) é um dos mais potentes fatores angiogênicos envolvidos no progresso das lesões ectópicas da endometriose e está diretamente envolvido na fisiopatologia da doença (PERINI *et al*, 2014).

O VEGF é uma glicoproteína homodimérica de 30–46 kDa, dividida em 5 membros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e PlGF e pode se ligar a três tipos de receptores transmembrana tirosina quinase: receptor do fator de crescimento endotelial vascular - 1 (VEGFR-1) e receptor do fator de crescimento endotelial vascular - 2 (VEGFR-2), expressos nas células endoteliais vasculares e receptor do fator de crescimento endotelial vascular - 3 (VEGFR-3), expresso principalmente em células endoteliais linfáticas (CARDOSO, 2013).

Esse fator é produzido e secretado principalmente por macrófagos no líquido peritoneal e é responsável pelo crescimento do endotélio através do aumento da permeabilidade vascular e pela modulação de enzimas proteolíticas ligadas à angiogênese. O implante endometrial ectópico é bastante vascularizado, o que favorece a ação do VEGF na perpetuação e infiltração dos focos endometrióticos (RICCI *et al.*, 2011; FERRARA *et al.*, 2005).

### 2.1.5 Diagnóstico

Embora o diagnóstico definitivo da endometriose só possa ser feito através da videolaparoscopia e da análise histopatológica dos focos endometrióticos, existem achados nos exames físicos, laboratoriais e de imagem que podem prever com segurança o diagnóstico da paciente. Entre eles o Ca-125<sup>3</sup> que é um marcador bioquímico que se coletado no primeiro ou segundo dia do ciclo menstrual, pode ser bastante útil para o diagnóstico da endometriose em estágio avançado,

---

<sup>3</sup> N.A.: O antígeno do câncer 125 é uma proteína (antígeno de superfície da célula, membro da família das glicoproteínas mucinas, codificada pelo gene MUC 16)

principalmente quando os valores são superiores a 100 UI/mL, embora concentrações normais não excluam a doença e o mesmo não possa ser sempre utilizado em função de sua inespecificidade. Algumas citocinas como a Interleucina-6 (IL-6), vêm sendo estudadas como novos marcadores (SPRITZER e NÁCUL, 2010).

Entre os exames de imagem, a ultrassonografia pélvica transvaginal (figura 5) é o procedimento de escolha. Possui uma sensibilidade de 94% e uma especificidade de 98% na identificação de focos de endometriose profunda. Um resultado normal deste exame sugere que a paciente não tem a patologia ou é portadora de doença inicial não-infiltrativa, desta forma, pode ser necessário o requerimento de exames adicionais pra confirmação. A ultrassonografia transvaginal também é um método eficiente para avaliar endometriomas (figura 4) maiores do que 2cm e também fazer o diagnóstico de endometriose de bexiga, com uma sensibilidade de 71,4% e especificidade de 100% (SPRITZER e NÁCUL, 2010).

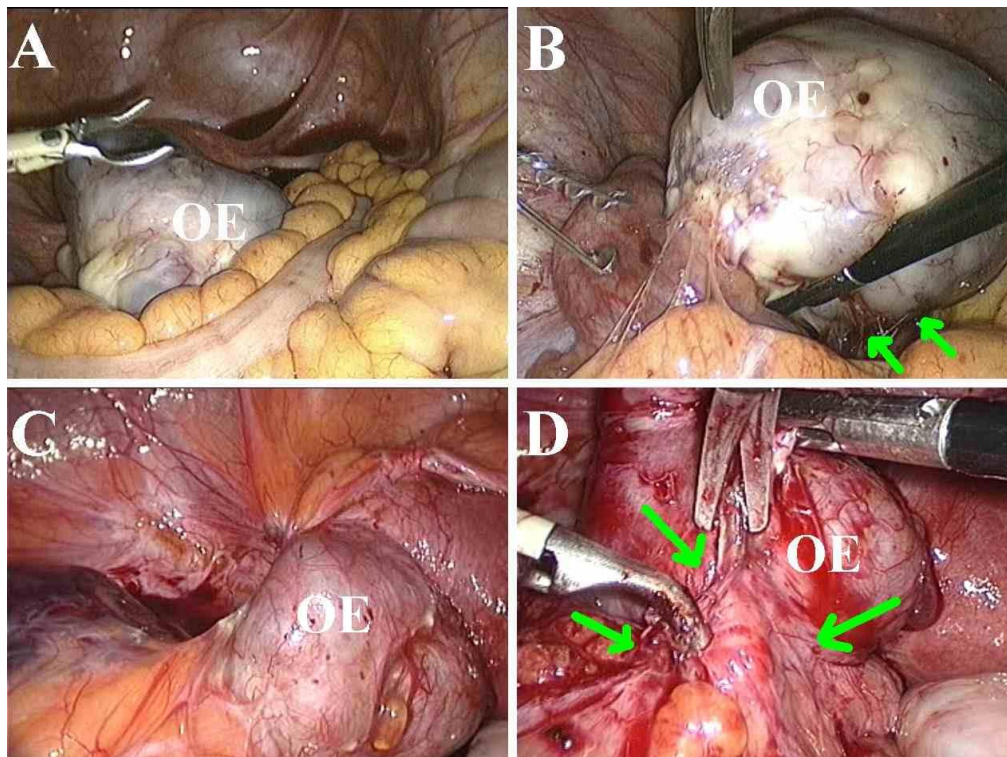


Figura 4 - Endometriomas (endometriose nos ovários) (Fonte: <http://drwilliamkondo.site.med.br>).

A ressonância Magnética (MR) (figura 6) é um método de diagnóstico que permite fazer o diagnóstico de massas ovarianas de hipótese duvidosa; doença

profunda invasiva do trato intestinal; alterações sugestivas de doença do septo retovaginal, ligamentos uterossacos ou do retossigmoide (SPRITZER e NÁCUL, 2010).

O diagnóstico da endometriose em medicina nuclear, pela utilização de radiofármacos ainda é muito raro e experimental. Na sua maioria utiliza 18-F-FDG para localização de lesões profundas (LERMAN, 2004). Entretanto, estudos com radiofármacos SPECT, como o 99mTc ainda é um modelo experimental realizado em animais (MACHADO *et al.*, 2015). É importante ressaltar que entre os métodos de imagem de medicina nuclear, PET (Positron Emission Tomography (figura 7) e SPECT (Single Photon Emission Computorized Tomography) são os que apresentam a maior especificidade ( $10^{-15}$ ,  $10^{-13}$ , respectivamente), em particular, comparado com uma uma CT (Tomografia Computadorizada) ( $10^{-9}$ ), MR (Ressonancia Magnética) ( $10^{-10}$ ) e conseqüentemente maior sensibilidade.

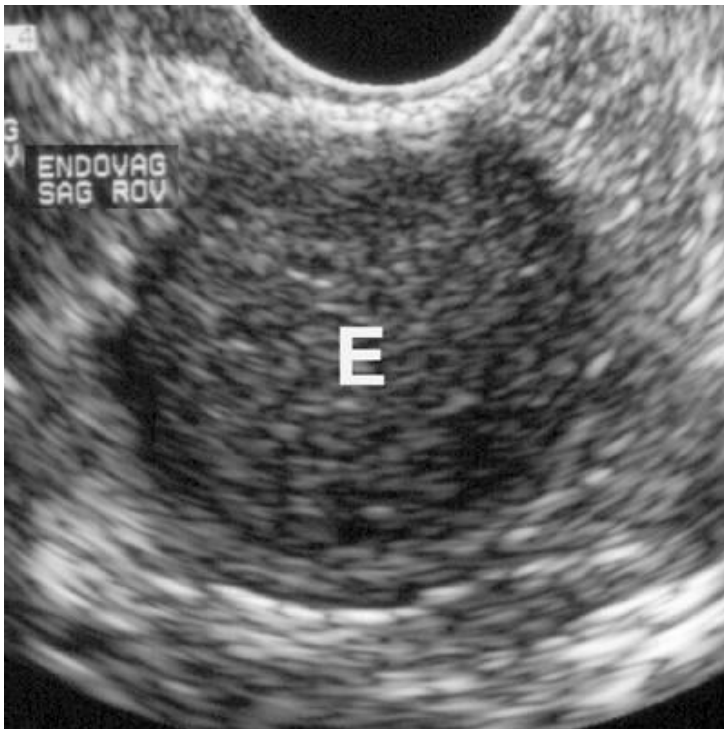


Figura 5 - Ultrassom de endometriose (Fonte: <http://emedicine.medscape.com/article/403435-overview>).



Figura 6 - Ressonância Magnética de Endometriose (Fonte: <http://emedicine.medscape.com/article/403435-overview>).

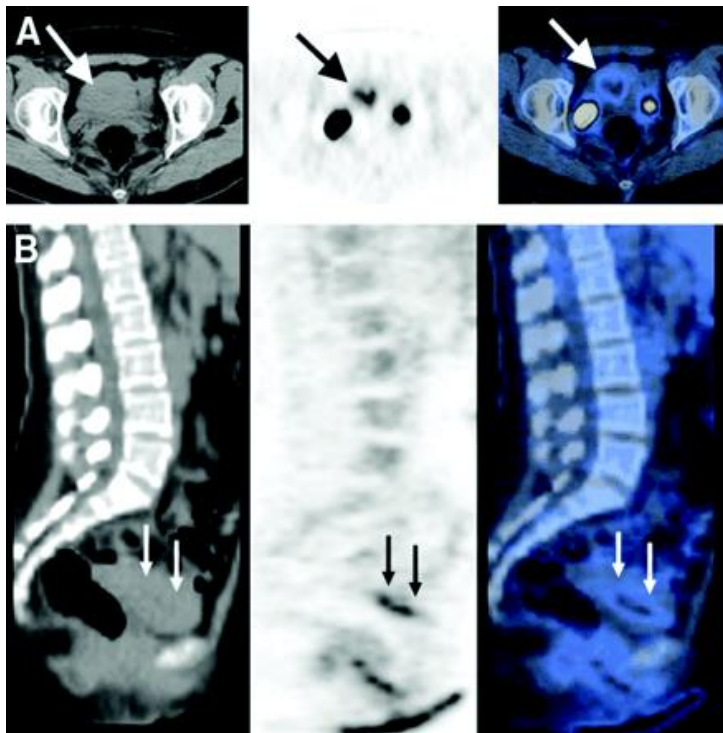
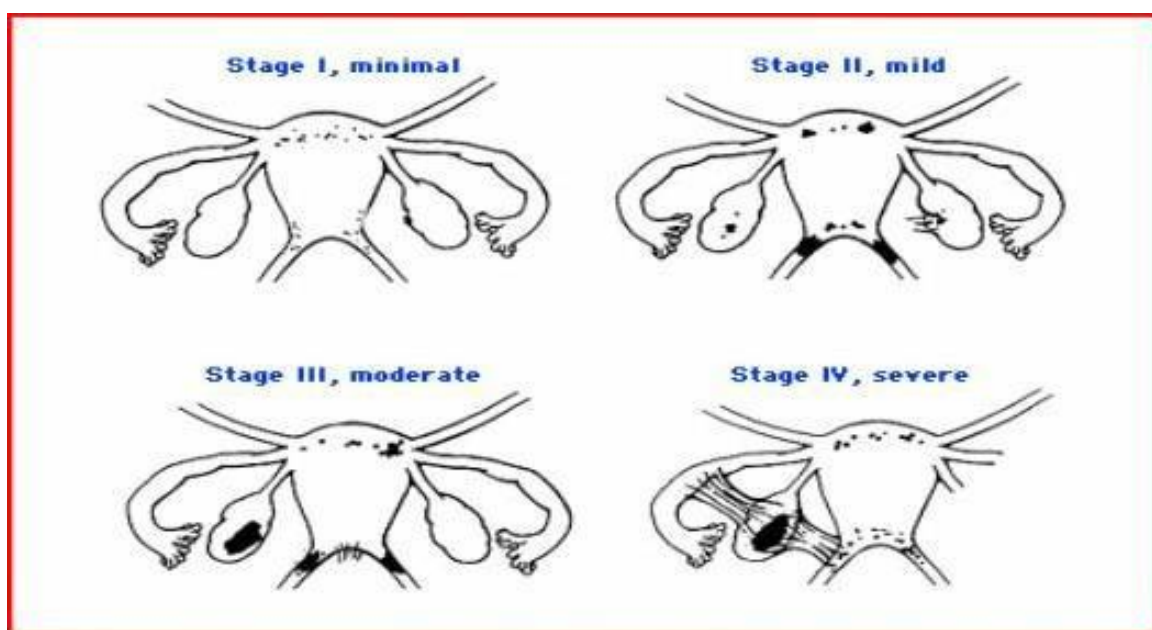


Figura 7 - Tomografia PET de endometriose (Fonte: LERMAN, 2004).

### 2.1.6 Classificação

A videolaparoscopia histopatológica é o exame padrão que fornece o diagnóstico definitivo da endometriose. Durante o procedimento é coletada uma amostra do foco endometriótico e neste é feita a biópsia; assim sendo, é possível fazer a classificação histológica dos implantes com a localização anatômica da doença: peritônio, ovário ou septo retovaginal, ou pela extensão da doença sobre os órgãos pélvicos. A classificação mais comumente usada é da American Society of Reproductive Medicine (ASRM) – revisada em 1996. Nesta classificação a endometriose é graduada em mínima, leve, moderada ou grave (figura 8) pela extensão da doença no peritônio e ovários, bem como pela presença de aderências tubo-ovarianas e bloqueio da parede peritoneal. É uma classificação bem útil no tratamento pós-cirúrgico, apesar de ser um tanto limitada (SPRITZER e NÁCUL, 2010).



**Figura 8 - Classificação da endometriose segundo a American Society of Reproductive Medicine: A) Endometriose de Grau I (mínima); B) Endometriose de Grau II (leve); C) Endometriose de Grau III (moderada) e D) Endometriose de Grau IV (severa) (Fonte: American Society of Reproductive Medicine, 1997).**

Outra classificação empregada por alguns autores é a que relaciona as características morfológicas presentes nas lesões e divide a endometriose em três categorias: endometriose peritoneal superficial, endometriose ovariana cística (endometrioma ovariano) e endometriose infiltrante profunda. Esta classificação é eficiente em relacionar os sintomas clínicos, sobretudo a dismenorreia, com a profundidade e localização das lesões e em grande parte das pacientes é comum a presença de mais de um tipo de lesão (FEBRASGO, 2010).

### **2.1.7 Tratamento**

O tratamento da endometriose depende da queixa e do tipo da paciente: dor ou infertilidade, e muitas vezes estas duas queixas associadas. O tratamento pode ser cirúrgico ou medicamentoso (SPRITZER e NÁCUL, 2010). O tratamento medicamentoso tem como objetivo a atrofia do endométrio ectópico hormônio dependente, enquanto a cirurgia visa destruir permanentemente os focos ectópicos. A duração do tratamento medicamentoso é limitada devido aos seus efeitos colaterais. As cirurgias de repetição podem ser prejudiciais à fertilidade da paciente (SEPULCRI e AMARAL, 2007).

#### **2.1.7.1 Tratamento Cirúrgico**

O tratamento cirúrgico da endometriose tem como objetivo o alívio da dor e a restauração da fertilidade através da retirada da maior quantidade de tecido afetado possível e o restabelecimento da anatomia normal da pelve (NAVARRO *et al.*, 2006).

A cirurgia deve ser preconizada apenas para pacientes que não respondem ao tratamento medicamentoso, podendo ser de dois tipos: conservadora, que é indicada na endometriose de grau leve ou moderado e em mulheres jovens e que desejam engravidar espontaneamente; ou radical, neste caso é indicada para



mulheres mais idosas e que não pensem em engravidar (SPRITZER e NÁCUL, 2010).

A intervenção cirúrgica pode ser feita com laparotomia ou laparoscopia. A cirurgia videolaparoscópica proporciona o diagnóstico definitivo de endometriose e pode ser realizada através de eletrocautério, eletrocoagulação, vaporização, a laser, com ablação ou ressecção da endometriose da forma menos invasiva e mais eficaz possível (SEPULCRI e AMARAL, 2007).

### **2.1.7.2 Tratamento Medicamentoso**

O tratamento definitivo da endometriose só é possível com a remoção total das lesões. Entretanto, tratamentos paliativos podem ser utilizados antes da opção cirúrgica, visando a dor e a redução dos focos endometrióticos. O objetivo do tratamento medicamentoso antes da intervenção cirúrgica é diminuir a inflamação dos implantes, permitindo que o procedimento seja menos traumático e mais efetivo. Entretanto, a diminuição dos focos endometrióticos (tanto em tamanho como em volume), pode ocasionar um procedimento cirúrgico incompleto, visto que estes podem passar despercebidos durante o procedimento (FEBRASGO, 2010).

O tratamento farmacológico da endometriose se baseia em tratamentos hormonais hipoestrogênicos que são basicamente similares em eficácia, sendo diferentes somente em relação aos efeitos colaterais e custos. Entre os tratamentos medicamentosos disponíveis destacam-se os anticoncepcionais hormonais orais (ACHOs); os progestogênios isolados; os análogos do GnRH (aGnRH); o danazol e a gestrinona (PETTA e PELOGGIA, 2012).

Em relação à infertilidade, os resultados não são muito animadores, pois não existe até o momento evidências de que o tratamento com medicamentos aumente a fecundidade, assim sendo, o tratamento hormonal supressivo não possui benefício como adjuvante nos casos de infertilidade. Nesses casos, podem ser indicados tratamentos de reprodução assistida como fertilização *in vitro* e inseminação artificial (SPRITZER e NÁCUL, 2010).

O tratamento da endometriose baseado em terapias hormonais é eficaz em tratar os sintomas da doença, contudo não elimina completamente os focos



endometrióticos. Estudos em animais, apontam a possibilidade de um novo tratamento que emprega drogas angiostáticas, que através da inibição da angiogênese, são capazes de interferir no crescimento e na manutenção dos implantes endometrióticos já estabelecidos. A terapia antiangiogênica utiliza drogas como *antihuman vascular endothelial growth factor-A* (anti-hVEGF), TNP-470, endostatina e anginex. O anticorpo monoclonal anti-VEGF humanizado bevacizumabe, utilizado em algumas terapias antitumorais, tem sido com sucesso, objeto de estudos como provável abordagem terapêutica no tratamento da endometriose (NAP *et al*, 2004).

## 2.2 BEVACIZUMABE

Bevacizumabe é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante IgG1 específico com alta afinidade pelo Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor) (KRÄMER e LIPP, 2007). O mecanismo de ação do Bevacizumabe consiste em se ligar ao VEGF e impedir que o mesmo se ligue aos seus receptores tirosina quinase Flt-1 (VEGFR-1) e KDR (VEGFR-2), na superfície das células endoteliais, reduzindo assim a vascularização dos tumores e inibindo o crescimento tumoral (ANVISA, 2014).

Produzido pelo laboratório Roche sob o nome comercial de Avastin® (ANVISA, 2014), Bevacizumabe foi aprovado em fevereiro de 2004 pelo FDA (Food and Drug Administration) para o tratamento de primeira linha do câncer colorretal metastático, depois que resultados de estudos demonstraram aumento na sobrevivência dos pacientes tratados com Bevacizumabe em combinação com outros agentes quimioterápicos (FERRARA *et al.*, 2005). Suas indicações são: câncer colorretal metastático (CCRM) em combinação com quimioterapia à base de fluoropirimidina; câncer de pulmão de não pequenas células localmente avançado, metastático ou recorrente em combinação com quimioterapia à base de platina; câncer de mama metastático ou localmente recorrente (CMM) em combinação com paclitaxel; câncer de células renais metastático e/ou avançado (mRCC) em combinação com alfa interferona 2a e câncer epitelial de ovário, tuba uterina e peritoneal primário (ANVISA, 2014).

A apresentação de Avastin® existente no mercado é a forma injetável para infusão intravenosa, com apresentações de 100 mg com 1 ampola de 4 mL ou 400 mg com uma ampola de 16 mL (25mg/mL) (ANVISA, 2014).

Os efeitos adversos mais comuns do Bevacizumabe são hipertensão, fadiga ou astenia, diarreia e dor abdominal; Síndrome da Encefalopatia Posterior Reversível (SEPR); neutropenia; insuficiência cardíaca congestiva; proteinúria, reações de hipersensibilidade e insuficiência ovariana/fertilidade (que pode causar problemas na fertilidade feminina). Outros eventos mais graves que podem ocorrer são: perfurações gastrintestinais; hemorragia, incluindo hemorragia pulmonar/hemoptise, mais comum em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células e tromboembolismo arterial. Podem acontecer alterações no processo de cicatrização e mais raramente fasciite necrosante, uma infecção rara nas camadas profundas da pele (ANVISA, 2014).

O VEGF desempenha um papel essencial na angiogênese fisiológica e patológica; tem a capacidade de promover o crescimento das células endoteliais vasculares derivadas de artérias, veias e vasos linfáticos e aumentar a permeabilidade vascular (FERRARA *et al.*, 2005). Pacientes portadoras de endometriose possuem maior quantidade de VEGF no fluido peritoneal, além de uma maior expressão do VEGF nos endométrios eutópico e ectópico. O crescimento tumoral e angiogênese do implante endometrial sofrem ação direta do VEGF que é produzido pelos implantes endometriais e pelos macrófagos peritoniais, o que parece ser essencial para a sua sobrevivência e desenvolvimento em uma localização ectópica (RICCI *et al.*, 2011).

Experimentos feitos com inibidores da angiogênese e outros ligantes do VEGF estão sendo realizados em animais a fim de se estabelecer uma relação entre a angiogênese patológica da endometriose e o VEGF. Em todos eles foi observada diminuição do número de implantes endometriais (RICCI *et al.*, 2011).

No estudo realizado por Ricci *et al.*, (2011) foi induzida endometriose experimental em ratos camundongos “BALB/c” fêmeas, com 2 meses de idade e iniciado tratamento 2 semanas antes da cirurgia e continuado por mais 2 semanas após a cirurgia. Os ratos foram divididos em dois grupos: o primeiro recebeu Bevacizumabe e o segundo solução salina, ambos por via intraperitoneal. Após duas semanas de tratamento os animais foram sacrificados e os resultados desse estudo revelaram que o grupo tratado com Bevacizumabe apresentou significativa

redução do tamanho das lesões, aumento dos níveis de apoptose em células epiteliais das lesões endometrióticas, diminuição dos níveis de VEGF no fluido peritoneal e redução da densidade vascular nas lesões. No entanto, não foi observado efeito significativo de Bevacizumabe sobre o número de lesões.

Em outro estudo realizado por Soysal *et al.*, (2014), ratas *WISTAR* foram divididas em três grupos: o primeiro grupo recebeu leuprolide depot, um agonista do GnRH, em injeção subcutânea dose única; o segundo grupo recebeu Bevacizumabe injeção intraperitoneal e o terceiro grupo recebeu solução salina. Após três semanas do tratamento, os ratos passaram por uma laparotomia, as lesões foram analisadas e os resultados demonstraram que o bevacizumabe em relação ao leuprolide possui efeitos similares, ambos foram capazes de diminuir o crescimento dos implantes endometrióticos e aumentar os níveis de apoptose em relação ao grupo controle. Apesar dos agonistas do GnRH serem atualmente um dos agentes mais usados no tratamento da endometriose, o mesmo não pode ser usado por longos períodos por causa de seus efeitos colaterais como sintomas de climatério e problemas com perda de densidade óssea, neste estudo fica comprovado a possibilidade do uso do Bevacizumabe como tratamento opcional, no entanto é necessário ressaltar que este também inibe o VEGF fisiológico, causando efeitos colaterais como problemas gastrointestinais, cardiovasculares e hemorragia pulmonar.

O uso de anticorpos monoclonais radiomarcados com propósito diagnóstico não é um conceito novo dentro da área de medicina nuclear, há muito se utiliza este recurso. O anticorpo monoclonal é chamado assim porque deriva da proliferação e secreção de um único clone que é obtido a partir da fusão celular entre células de baço obtidas de um camundongo imunizado e células de um mieloma de rato para formar um hibridoma, que dá imortalidade à linhagem de célula. A melhor linhagem de célula de anticorpo produzida no hibridoma é selecionada e as células híbridas resultantes possuem as mesmas características das células de origem, sintetizando anticorpos e se mantendo por tempo indeterminado em cultura (DIAS, 2005). Na **figura 9**, o esquema de produção de anticorpos monoclonais é explicado mais detalhadamente:

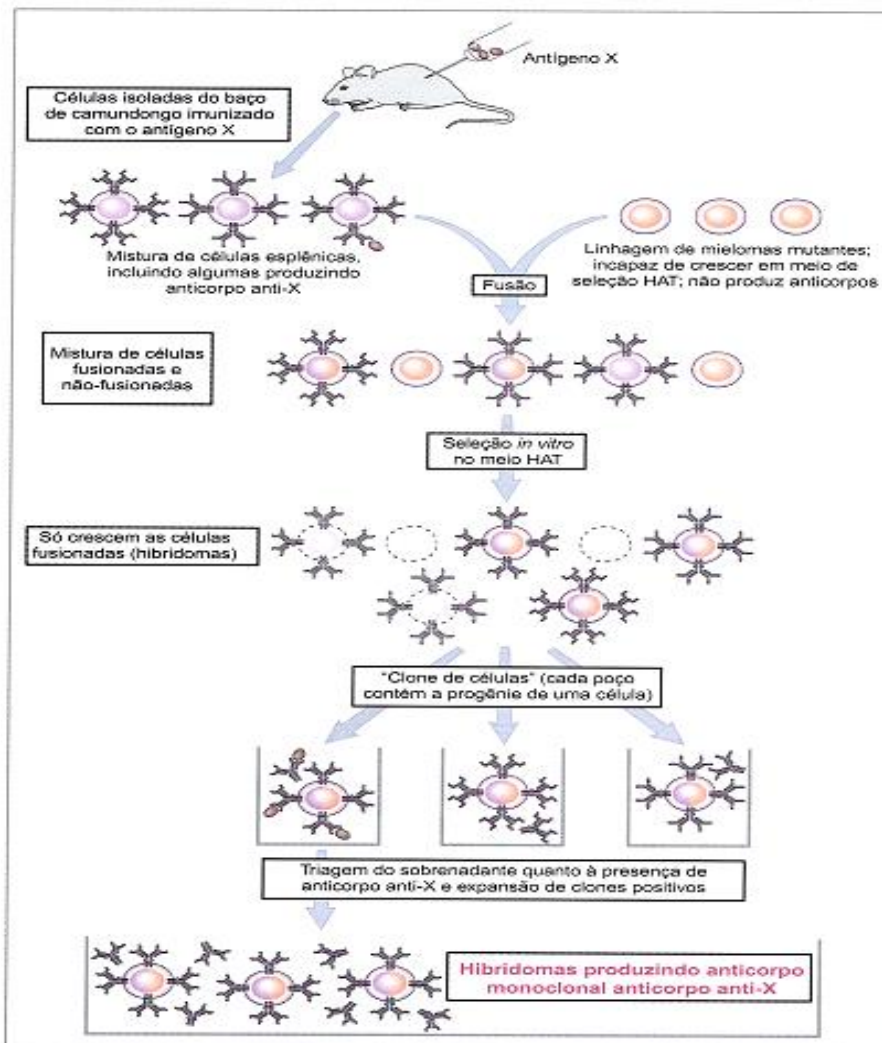


Figura 9 - Ciclo de produção de anticorpos monoclonais (Fonte: Kuby, 2002).

A tecnologia de hibridomas permitiu a produção de anticorpos monoclonais com alta especificidade para antígenos associados à tumores e outras patologias. Esta característica permite que eles sejam usados como carreadores de radionuclídeos altamente específicos para células e órgãos. Os principais isótopos empregados para a marcação de anticorpos para diagnóstico são: iodo-131 e Iodo-123, Índio-111 e tecnécio-99m (DIAS, 2005). Atualmente mais de 80% dos radiofármacos usados em medicina nuclear utilizam o tecnécio-99m como marcador diagnóstico. A marcação de biomoléculas com  $^{99m}\text{Tc}$  pode ser feita através de dois métodos: o método indireto e o método direto de marcação. No método indireto, são usados agentes quelantes bifuncionais que fazem a ligação da biomolécula com o radionuclídeo. Já no método direto, não há necessidade de um agente intermediário, neste caso é empregado um agente redutor que promove a redução e a quebra das

pontes dissulfeto dos anticorpos, permitindo assim a ligação do radionuclídeo. (MORORÓ, 2012).

O estudo realizado por Machado *et al.* (2015), demonstra o uso do bevacizumabe como procedimento diagnóstico não invasivo de endometriose. Os autores trabalharam com ratas *W1STAR*, que foram submetidas à procedimento cirúrgico de indução de endometriose peritoneal. Após três semanas do procedimento as mesmas receberam o bevacizumabe injetável via intra-ocular marcado com tecnécio-99m. Os testes demonstraram que a imagem das lesões se revelou bem definida com bevacizumabe, confirmando a possibilidade deste ser usado como método diagnóstico não invasivo de endometriose.

### 2.3 RADIOFÁRMACOS

De acordo com Araujo *et al.* (2008): “radiofármacos são substratos que contém em sua estrutura um átomo radioativo e que por sua forma farmacêutica podem ser usados com fins diagnósticos ou para tratamento de diversas patologias. São vetores sem ação farmacológica e possuem afinidade por determinado órgão ou função fisiológica ou fisiopatológica”.

**Ou ainda, segundo a Resolução RDC 63 da ANVISA de 18 de dezembro de 2009:**

*“Radiofármacos: são preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contêm um ou mais radionuclídeos. Compreendem também os componentes não-radioativos para marcação e os radionuclídeos, incluindo os componentes extraídos dos geradores de radionuclídeos”.*

O primeiro radionuclídeo foi usado em humanos no ano de 1927, quando Blumgart e Yens mediram a circulação humana injetando uma solução salina exposta ao radônio. Em 1938, foi usado pela primeira vez o IODO-131 através dos estudos de Hertz, Roberts e Evan sobre a função da tireóide, marcando desta forma

o início do uso sistêmico de radionuclídeos em clínica médica. (SANTOS-OLIVEIRA *et al*, 2008 e CARNEIRO-LEÃO, 2008).

No Brasil, uma parceria entre a Universidade de São Paulo (USP) e o Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) em 1956, deu origem ao Instituto de Energia Atômica (IEA) onde em 1957 foi inaugurado o primeiro reator nuclear, o IEA-R1 que veio a produzir o IODO-131, primeiro radioisótopo produzido no país. Em 1999, o IEA, atualmente denominado Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), produziu o seu primeiro radioisótopo PET: o Flúor-18 (CARVALHO, 2014).

A pesquisa, desenvolvimento e produção de radiofármacos no Brasil é controlada e regulamentada pela Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN). Até 2006, a CNEN teve o monopólio total sobre todos os radiofármacos existentes no país, entretanto a Emenda Constitucional Nº 49 de fevereiro de 2006, determinou que radioisótopos com meia-vida igual ou inferior a duas horas e utilização de radioisótopos para pesquisas e usos médicos, agrícolas e industriais, pudessem ser produzidos e comercializados pelo setor privado (CARVALHO, 2014).

Araujo *et al.* (2008), definem medicina nuclear como sendo a “especialidade médica que utiliza substâncias radioativas e suas propriedades nucleares para fazer pesquisas médicas, diagnósticos fisiológicos e anatômicos e tratamentos terapêuticos”. Os equipamentos de detecção empregados em medicina nuclear utilizam os fótons emitidos para gerar imagens, são eles: câmaras gama ou tomógrafos para emissão de fótons, SPECT (Single Photon Emission Computer tomography) e PET (Positron Emission Tomography).

Em medicina nuclear, os radiofármacos podem ser empregados em diagnóstico ou terapia de doenças. Em diagnóstico, são utilizados os radiofármacos que possuem em sua constituição radionuclídeos emissores de radiação  $\gamma$  ou  $\beta^+$  (pósitrons), estes tipos de radionuclídeos decaem emitindo radiação eletromagnética penetrante capaz de atravessar os tecidos e ser detectada pelo meio externo. Os radiofármacos de diagnóstico se dividem em radiofármacos de perfusão ou de primeira geração e radiofármacos específicos ou de segunda geração. Os de perfusão são aqueles que são transportados no sangue até o órgão alvo através do fluxo sanguíneo normal e os específicos são direcionados de forma seletiva por moléculas biologicamente ativas que se ligam a receptores celulares ou são

transportados para o interior das células, como por exemplo: anticorpos ou peptídeos (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os radiofármacos utilizados em terapia são compostos por radiações  $\alpha$  ou  $\beta^-$ , capazes de destruir os tecidos de forma seletiva e com pouca penetração. São usados no tratamento do câncer e outras patologias. O radioisótopo deve ser escolhido de acordo com as características do órgão afetado, do alvo terapêutico e do radiofármaco (CARVALHO, 2014).

A produção de radionuclídeos é feita de maneira artificial em reatores ou aceleradores de partículas. Nos reatores são produzidos os radionuclídeos que decaem por emissão de partículas  $\beta^-$ , por fissão do  $^{235}\text{U}$  ou por captura de nêutrons e nos cíclotrons são produzidos os radionuclídeos que decaem por captura eletrônica ou emissão de partículas  $\beta^+$  (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os radiofármacos se dividem em geradores de radionuclídeos, kits reativos liofilizados para marcar com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  e os precursores de radiofármacos.

Os geradores de radionuclídeos são sistemas em que um radionuclídeo de meia-vida longa decai em outro radionuclídeo e este é extraído ou eluído para a preparação do radiofármaco. Os kits liofilizados são preparações para serem reconstituídas e/ou combinadas com radionuclídeos na preparação final do radiofármaco. Por fim, os precursores de radiofármacos compreendem qualquer radionuclídeo produzido na radiomarcagem de uma substância (ALMEIDA, 2013).

O radioisótopo mais usado em medicina nuclear é o tecnécio-99m, utilizado em 90% dos procedimentos diagnósticos de medicina nuclear. Seu uso massivo se deve às suas características físico-químicas favoráveis: meia-vida física de 6,01 horas, decaimento por emissão de radiação  $\gamma$  com fótons de 140 keV, possibilidade do metal em atingir estados de oxidação e coordenação e dar origem à vários radionuclídeos diferentes, baixos índices de reações adversas, facilidade em se obter através dos geradores de  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  (Molibdênio-99/Tecnécio-99 metaestável) (figura 10) e a simplicidade na sua reconstituição através dos kits liofilizados (BRAGA, )2015).



Figura 10 - Geradores de tecnécio-99m. O da esquerda, com plástico transparente, permite a observação de parte do sistema de eluição e da blindagem (Fonte: Mengatti, 2010).

Nos últimos anos foram desenvolvidos vários reagentes liofilizados para marcação com tecnécio-99m (ALMEIDA, 2013). Estes reagentes estão descritos na tabela 1:

<b>KITS REAGENTES LIOFILIZADOS USADOS PARA DIAGNÓSTICO E MARCAÇÃO COM TECNÉCIO-99m</b>	
<b>ALBUMINA</b>	Estudo do sistema linfático
<b>DEXTRAN 500</b>	Linfocintilografia, pesquisa de linfonodo sentinela
<b>DISIDA (disofenina)</b>	Cintilografia hepatobiliar
<b>DMSA (ácido dimercaptusuccínico)</b>	Cintilografia renal
<b>DPTA (ácido dietilenodiaminotetracético)</b>	Cintilografia renal, ventilação pulmonar, cerebral
<b>EC (etileno dicisteína)</b>	Estudo da função renal
<b>ECD (etileno dicisteína dietil éster)</b>	Cintilografia cerebral
<b>ESTANHO COLOIDAL</b>	Cintilografia esplênica
<b>FITATO</b>	Cintilografia hepática e linfocintilografia
<b>GLUCOHEPTONATO</b>	Cintilografia renal e cerebral
<b>MAA</b>	Cintilografia pulmonar e roll
<b>MDP</b>	Cintilografia óssea
<b>MIBI (metoxi-isobutil-isonitrila)</b>	Cintilografia miocárdica, mamária e paratireoide
<b>PIRO (pirofosfato)</b>	Cintilografia óssea, miocárdica, marcação de hemácias

Tabela 1 - Kits de reagentes liofilizados usados para diagnóstico e marcação com Tecnécio-99m (Fonte: Manual de especificações técnicas dos radiofármacos, IPEN, 2013).



## 2.4 NANORRADIOFÁRMACOS

Os nanorradiofármacos são radiofármacos desenvolvidos em escala nanométrica (BRAGA, 2015), que podem ser obtidos de duas formas: através da encapsulação de um radiofármaco radioativo ou através da encapsulação de um fármaco não radioativo e posterior incorporação de um radionuclídeo como o tecnécio por exemplo (SANTOS-OLIVEIRA, 2011).

Santos-Oliveira (2011), afirma que os avanços em nanotecnologia são responsáveis pelo surgimento de uma nova ciência chamada nanomedicina e que os nanorradiofármacos representarem o futuro dentro da área de medicina nuclear.

Partículas em escala nano e micro, melhoram o desempenho dos radiofármacos, otimizando sua penetrabilidade e especificidade. O atual progresso dentro da área de nanotecnologia farmacêutica tem permitido a concepção de nano e micropartículas capazes de agir de forma cada vez mais seletiva no tratamento e no diagnóstico de patologias, sobretudo dentro da área de oncologia. A combinação de vários tipos de nanocarreadores de fármacos com métodos nucleares de imagem cada vez mais modernos e eficientes como o PET /CT (Tomografia por Emissão de Pósitrons) e SPECT / CT (Sistema de Tomografia Computadorizada de Fóton Único Combinado) representam a possibilidade de detectar doenças de maneira cada vez mais precoce e mais eficiente (PATRICIO *et al*, 2013).

## 2.5 NANOTECNOLOGIA

Durán *et al.* (2006), definem nanotecnologia como sendo a tecnologia usada para manipular estruturas muito pequenas, tornando possível a criação de estruturas impossíveis de serem criadas utilizando tecnologia convencional. A palavra nanotecnologia vem do prefixo grego “nano” que significa “anão” e se relaciona com a unidade de medida “nanômetro” que corresponde a um bilionésimo do metro ou um milésimo de milímetro. Fazendo uma comparação com a espessura de um fio de cabelo, este possui cerca de 100.000 nm de espessura.

A nanotecnologia é a aplicação tecnológica de objetos que tenham ao menos uma de suas dimensões físicas medindo entre 0,1 e 100 nanômetros, ou seja, aproximadamente  $10^{-9}$  metros ou 1 bilionésimo de metro (FAHNING e LOBÃO, 2011). Os nanocarreadores podem ser classificados: em microparticulados quando apresentam diâmetro superior a 1  $\mu\text{m}$  ou nanoparticulados quando possuem diâmetro entre 10 e 1000 nm (ASSIS, 2007).

A nanotecnologia é um campo científico multidisciplinar que abrange várias áreas do conhecimento como a química, física, biologia e engenharia. É revolucionária, porque controla fenômenos que seriam inconcebíveis no mundo macro, no entanto possuem grande importância a nível nanométrico (DURÁN *et al.*, 2006). Materiais na escala nanométrica, apresentam propriedades químicas, físico-químicas e comportamentais diferentes daquelas apresentadas em escalas maiores, a nanotecnologia se aproveita destas novas propriedades para desenvolver produtos com diferentes tipos de aplicações tecnológicas (FAHNING e LOBÃO, 2011).

O termo nanotecnologia surgiu em 1959 na Califórnia, em uma palestra intitulada “*There’s plenty of room at the bottom*” (*Há muito espaço lá em baixo*), onde Richard Phillips Feynman, Prêmio Nobel de Física de 1965, sugeriu que em um futuro próximo, os engenheiros poderiam manipular os átomos e criar novas propriedades, desde que não violassem as leis da natureza. Ou seja, manipular os átomos e criar novos materiais que não ocorram naturalmente na natureza.

Em 1974, Norio Taneguchi, pesquisador da universidade de Tóquio, utilizou pela primeira vez o termo “nanotecnologia” para descrever a fabricação precisa de novos materiais com escalas nanométricas (FAHNING e LOBÃO, 2011).

A criação dos microscópios de tunelamento por Binnig e Rohrer nos anos 80 foi um grande marco no desenvolvimento da nanotecnologia, já que possibilitou não só enxergar, como também manipular na escala nanométrica (FAHNING e LOBÃO, 2011).

A partir da década de 1980, a palavra nanotecnologia se popularizou com o lançamento do livro *Engines of Criaton: The coming era of nanotechnology*, de Eric Drexler (1986), na obra o cientista sugeria a construção de máquinas em escala molecular de alguns nanômetros: como braços de robôs, motores e até computadores menores que uma célula. Drexler foi desacreditado e passou dez anos trabalhando em seus aparelhos a fim de provar que não se tratava de ficção científica.

Vários outros estudos vieram a partir do trabalho de Drexler, entre eles as descobertas sobre as ligações químicas entre dois átomos de carbono adjacentes. Em 1985, Kroto *et al*, desenvolveram os fulerenos, estruturas nanométricas altamente simétricas, com formato esférico formado por hexágonos interligados por pentágonos, o que lhe confere uma estrutura tridimensional. Depois destas descobertas, em 1991, Sumio Iijima desenvolveu os nanotubos de carbono, uma estrutura em formato tubular fechado (NOVO, 2013).

No início da década de 1990, muitos cientistas já trabalhavam na área de nanotecnologia, porém esta tecnologia só passou a ter repercussão mundial a partir de 2001, quando os Estados Unidos lançaram o programa americano "National Nanotechnology Initiative" (NNI). No mesmo ano a China lançou seu programa, criando o Comitê Nacional para Nanociência e Nanotecnologia (NSCNN) e publicando o programa "National Nanotechnology Development Strategy 2001-2010", semelhante ao NNI, apesar de o país já financiar ações específicas de nanociência e nanotecnologia desde o início da década de 1990 (PLENTZ e FAZZIO, 2013).

Os países que mais investem em nanotecnologia são os Estados Unidos, a Europa e o Japão, representando cerca da metade dos investimentos do mundo. Cada um destes países investe aproximadamente um bilhão de dólares ao ano. Outros países como a Rússia, a China, a Índia e o Brasil também têm feito investimentos significativos nos últimos anos, apenas o governo brasileiro já investiu R\$ 140 milhões entre 2001 e 2006 em redes de pesquisa e projetos na área de nanotecnologia (ROSSI-BERGMANN, 2008).

As iniciativas do governo brasileiro em nanotecnologia se iniciaram em 2001 através do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e com a criação de quatro redes cooperativas de pesquisa e quatro institutos virtuais (milênios) que permitiram o mapeamento das competências nacionais. Entre 2002 e 2005 as redes envolveram 300 pesquisadores, 77 instituições de ensino e pesquisa, 13 empresas, publicaram mais de 1000 artigos científicos e depositaram mais de 90 patentes.

Em 2004 foi implementado o Programa "Desenvolvimento da Nanociência e Nanotecnologia", no âmbito do Plano Pluri Anual (PPA) 2004 – 2007, que assegurou o apoio à pesquisa básica, à pesquisa entre Instituto de Ciência e Tecnologia (ICT) e

empresas, fortalecendo as redes existentes e a infraestrutura laboratorial (NANOTECNOLOGIA,2006). Este programa foi elaborado com base nas recomendações de um grupo de trabalho instituído via Portaria MCT nº 252, de 16.05.2003. Em 2005, o presidente da República, Luiz Inácio Lula da Silva, e o ministro da Ciência e Tecnologia, Sérgio Rezende, lançaram um Programa Nacional de Nanotecnologia que contou com recursos do PPA e recursos dos fundos setoriais, elevando o patamar de investimentos do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) em nanotecnologia e possibilitando a ampliação do número de iniciativas nesse setor (PLENTZ e FAZZIO, 2013).

Qualquer estrutura pode ser reduzida. Um dos maiores benefícios da nanotecnologia é o aumento da área de superfície dos materiais na escala nano fazendo com que estes materiais se tornem bem mais reativos. Os chamados nanomateriais não precisam ser feitos exclusivamente de nanopartículas, no entanto devem contêm estruturas nanométricas em sua composição, permitindo portanto a obtenção de novas propriedades e aplicações. Desta forma a principal vantagem da nanotecnologia é a descoberta de novas propriedades, que pode ser a partir do efeito da redução do tamanho; da junção de diferentes materiais nanos ou derivadas do efeito quântico (DURÁN *et al.*, 2006).

FIGUEIRAS *et al.* (2014), destacam, que outros benefícios importantes da liberação controlada do fármaco incluem a diminuição de efeitos colaterais em relação às terapias convencionais; a redução da concentração do fármaco no organismo; melhorados perfis farmacocinético e farmacodinâmico; possibilidade de administração intravenosa de alguns fármacos com o aumento da sua solubilidade; redução da perda do fármaco no seu ciclo e aumento da sua concentração no sítio-alvo; melhora da estabilidade e diminuição da degradação do fármaco e uma maior captação (*uptake*) celular e intracelular.

### **2.5.1 Métodos de preparação de nanomateriais**

Existem dois métodos empregados na preparação de nanomateriais (figura 11): bottom up (de baixo para cima) e top down (de cima para baixo).

Dúran *et al.* (2006), definem estes dois métodos da seguinte maneira:

“O método *top down* (“de cima para baixo”) refere-se à diminuição do material de sua forma volumosa (*bulk*) para dimensões nanométricas por técnicas de litografia. Esse método, no entanto, tem encontrado limitações sendo pouco utilizada”.

“O método *bottom up* (“de baixo para cima”), abordado inicialmente por Richard Feymann, refere-se à construção de dispositivos a partir de átomos ou moléculas ligados quimicamente. Nesse caso, as estruturas são vistas como versáteis “blocos de construção” para a obtenção de dispositivos nanométricos, por exemplo, a funcionalização de um substrato com moléculas de propriedades e funções específicas”.

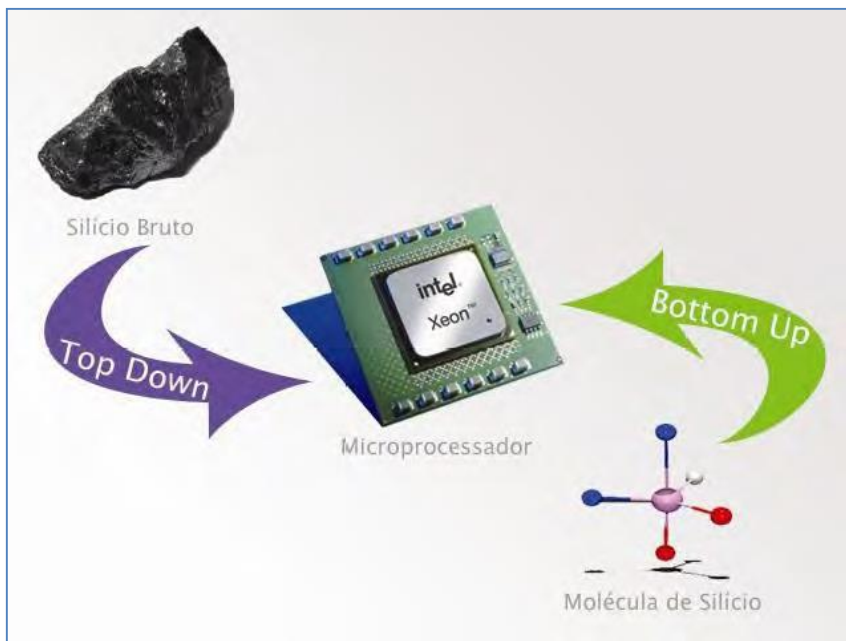


Figura 11 - Abordagens utilizadas para desenvolvimento de Nanoestruturas (Fonte: ALVES, 2010).

### 2.5.2 Aplicações da nanotecnologia

A aplicação dos nanomateriais vai desde o desenvolvimento de um simples vidro à prova de arranhões até sistemas precisos de carregamento e liberação de fármacos. Estimativas sugerem que em 2015 todo o setor de semicondutores e a metade do setor farmacêutico dependerão da nanotecnologia, com um mercado mundial girando em torno de US\$ 1 trilhão (ROSSI-BERGMANN, 2008).

Os setores em maior relevância no âmbito da nanotecnologia são: tecnologia da informação, energia, ciência ambiental, medicina, segurança interna, segurança alimentar e transporte, entre outros.

A indústria farmacêutica tem desenvolvido novos materiais baseados em nanoestruturas: sistemas de difusão de medicamentos que atinjam pontos específicos no corpo humano; próteses biocompatíveis com órgãos e fluídos humanos; materiais para a regeneração de ossos e tecidos; produtos para recuperação da pele; kits de autodiagnóstico, que podem ser utilizados em casa; sensores laboratoriais construídos sobre chips; produtos contendo cores físicas (índice de refração); protetores solares e produtos para maquiagem (FAHNING e LOBÃO, 2011).

Entre as várias aplicações da Nanotecnologia, algumas das mais promissoras e com maior potencial para produzir impacto direto na vida das pessoas estão relacionadas com as ciências biomédicas. As Nanociências e a Nanotecnologia têm criado e transformado uma grande variedade de produtos e serviços passíveis de melhorarem a prática clínica e a saúde pública (FIGUEIRAS *et al.*, 2014).

### 2.5.3 Nanobiotecnologia

Nanobiotecnologia é descrita por DURÁN *et al.* (2006), como sendo o estudo, processamento, fabricação e desenho de dispositivos orgânicos, nanomateriais para atuação biológica ou biomateriais, em que pelo menos um componente funcional possui tamanho nanométrico. A nanobiotecnologia é a aplicação da nanotecnologia nas ciências da vida.

As áreas mais importantes da nanobiotecnologia são: a nanomedicina (biologia molecular e genética); a física-médica (diagnóstico); a nanocosmectútica (cosméticos com efeitos farmacológicos consideráveis); o uso de sistemas biológicos como moldes (*templates*) no desenvolvimento de produtos novos na nanoescala e o desenvolvimento de nanofármacos (fármacos encapsulados). A nanobiotecnologia possibilita que o diagnóstico das doenças seja feito de forma mais precoce, melhorando assim o tratamento. Também se mostra promissora em aumentar a eficiência do processo de desenvolvimento de fármacos. (DURÁN *et al.*, 2006).

#### 2.5.4 Nanocarreadores de fármacos

Nanocarreadores são ferramentas terapêuticas, fabricados em escala nano, que são desenvolvidos para se acumularem especificamente em locais do organismo e são necessários para atingir uma melhor resposta farmacoterapêutica. O fármaco é ligado ao nanocarreador e assim consegue se ligar ao seu sítio alvo de forma mais eficaz e com menos toxicidade.

Existem diversos processos usados para a conjugação do fármaco com o nanocarreador. A estratégia de direcionamento é muito importante para o sucesso da terapia. O fármaco pode ser adsorvido, ligado covalentemente à superfície do transportador, ou encapsulado por este. A ligação covalente tem a vantagem de possibilitar controlar o número de compostos terapêuticos que se ligam. A entrega em um alvo específico é alcançada utilizando mecanismos ativos ou passivos. Após a chegada do conjugado fármaco-nanocarreador ao tecido alvo, os agentes terapêuticos são liberados através de alterações no ambiente fisiológico, tais como temperatura, pH, osmolaridade ou atividade enzimática (FIGUEIRAS *et al.*, 2014).

### 3.0 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- O objetivo principal deste trabalho é realizar uma avaliação comparativa entre os resultados obtidos dos testes de biodistribuição de duas formulações para diagnóstico por imagem da endometriose: o Bevacizumabe radiomarcado com tecnécio-99m na forma convencional e o Bevacizumabe radiomarcado na forma de nanopartícula.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar o procedimento de marcação da nanopartícula de bevacizumabe com tecnécio-99m, utilizando a técnica de marcação direta e empregando cloreto estanoico como agente redutor;
- Repetir o estudo de Machado *et al*, 2015, utilizando a nanopartícula de bevacizumabe marcada com tecnécio-99m em ratas *W/STAR* com endometriose peritoneal induzida em modelo experimental;
- Analisar o estudo de biodistribuição das formulações destacando os pontos positivos e negativos de cada apresentação.



## 4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Materiais

- Bevacizumabe (Avastin®) 25mg/mL, fabricado pelo laboratório Roche®, Lote: B6026B02, Validade: 03/2015;
- Cloreto Estanoso ( $\text{SnCl}_2$ ), fabricado pelo laboratório Sigma Aldrich®;
- Tecnécio 99-metaestável ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) IPEN/CNEN, fornecido pela Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ);
- Cetamina 10g/100mL, fabricado pela Syntec®, Lote: 005/14, Validade: 06/2016;
- Xilazina 2g/100mL, fabricado pela Syntec®, Lote: 003/14, Validade: 04/2016.

#### 4.1.1 Equipamentos

- Balança Ay220, Shimadzu;
- Contador gama Perkin Elmer, modelo Wizard® 2470
- Calibrador de dose CRC®25R, Capintec;

#### 4.1.3 Animais

- Duas ratas *WISTAR* adquiridas do Biotério da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO). Os animais receberam cuidados conforme os protocolos do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEZO).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Modelo experimental de endometriose em ratas *WISTAR*

A endometriose foi induzida em duas ratas *WISTAR* sadias, operadas pelo Doutor Daniel Escorsim Machado, de acordo com o método descrito por Vernon and Wilson (1985), descrito mais detalhadamente em (MACHADO, 2009; MACHADO *et al.*, 2010). O procedimento cirúrgico (figura12) foi realizado da seguinte maneira: primeiro as ratas foram anestesiadas com cetamina e xilazina via intramuscular. O abdômen foi aberto através de uma incisão mediana de 3 cm a fim de expor o útero. A seguir foi feita ligadura e secção do corno uterino direito. O segmento foi colocado em solução salina tamponada com fosfato a 37°C e dividido longitudinalmente; o endométrio foi então seccionado em fragmentos de 5 x 5 mm. Os implantes foram, em seguida, fixados no peritônio do lado direito da parede abdominal ventral, utilizando fio de sutura de polipropileno (Prolene 6-0, Ethicon, Piscataway, NJ). O abdômen foi fechado e os animais liberados para se recuperarem da anestesia.

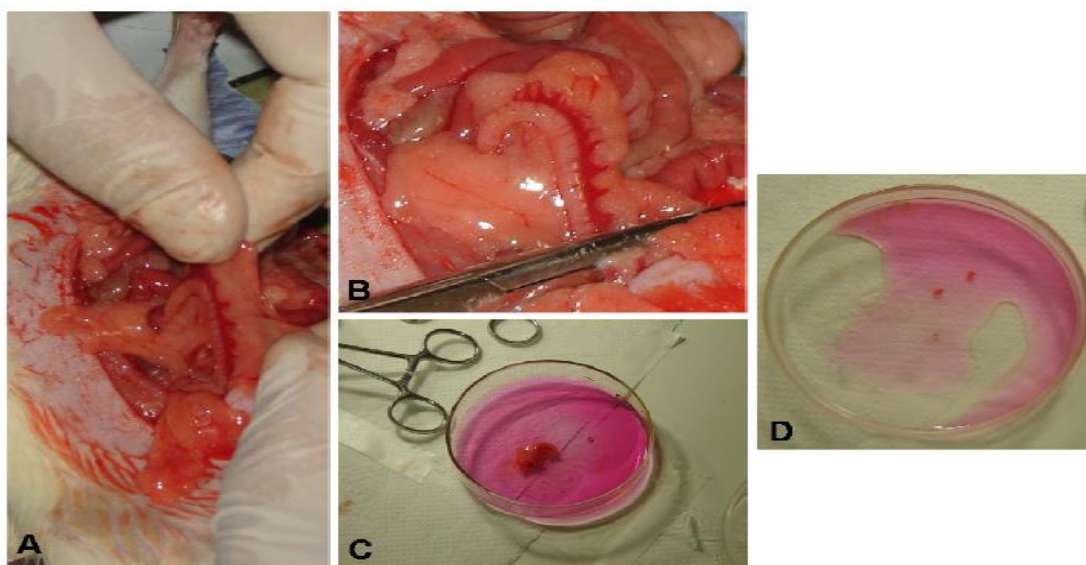


Figura 12 - Procedimento cirúrgico para o estabelecimento das lesões endometrióticas em ratas. (A) Região peritoneal aberta e útero localizado; (B e C) Corno uterino retirado e colocado em meio de cultura (D) Fragmentos de endométrio coletados após abertura longitudinal do corno uterino (Fonte: MACHADO, 2009).

#### 4.2.2 Obtenção da nanopartícula de Bevacizumabe

As nanopartículas de ácido poli-lático, álcool poli-vinílico e bevacizumabe a 2% (PLA/PVA/BEVACIZUMABE) utilizadas no experimento, foram preparadas e cedidas por BRAGA (2015), utilizando o método de dupla emulsificação seguido pela evaporação do solvente, segundo o protocolo descrito por Patrício e colaboradores (2014).

O processo de obtenção das nanopartículas se divide em quatro etapas descritas a seguir:

##### **1ª Etapa: Preparação da Emulsão Água/Óleo (a/o):**

Em 2 mL de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) foram dissolvidos 50 mg de ácido poli-lático (PLA). Esta solução foi vertida sobre 200  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa a 2% Bevacizumabe (Avastin®) e 0,1% de álcool poli-vinílico (PVA). Em seguida foi realizado ultrassonicação a 55 W (2 ciclos de 30 segundos com intervalos de 10 segundos de parada) (Ultrasonic processor - GEX600). No final desse processo obteve-se uma emulsão a/o (figura 13).

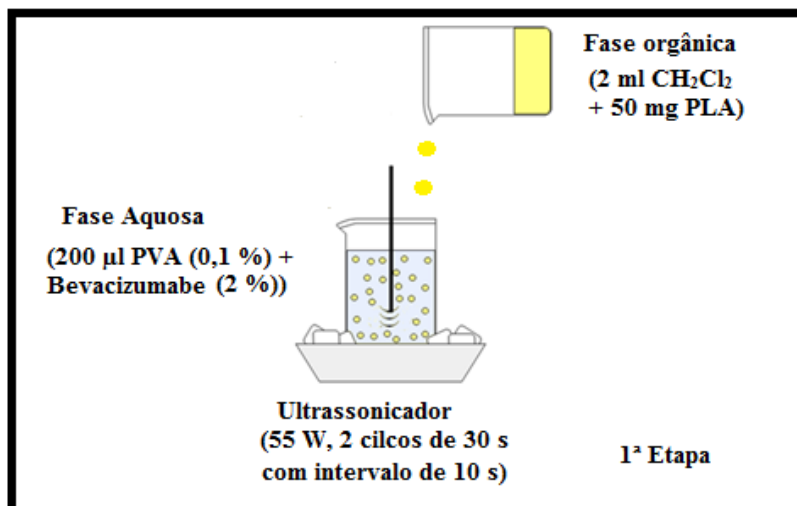


Figura 13 - Preparação da Emulsão Água/Óleo (a/o) com 2% de Bevacizumabe. (Fonte: BRAGA, 2015).

## 2ª Etapa: Preparação da Emulsão Água/Óleo/Água (a/o/a):

Em seguida, 4 mL de uma solução aquosa de 0,7% de PVA, foi gotejada sobre a primeira emulsão obtida. Ao término do gotejamento foi realizado a ultrassonicação a 55 W (2 ciclos de 30 segundos com intervalos de 10 segundos de parada), obtendo-se por fim, uma emulsão a/o/a (figura 14).

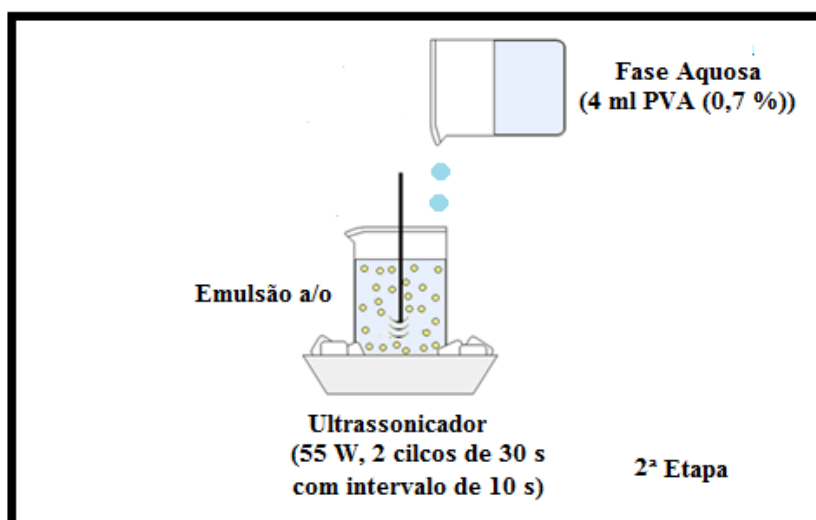


Figura 14 - Preparação da Emulsão Água/Óleo/Água (a/o/a) com 2% de Bevacizumabe. (Fonte: BRAGA, 2015).

### 3ª Etapa: Evaporação do Solvente Orgânico:

A emulsão final foi evaporada no rotaevaporador (Fisatann - MFP - 3D-BIOTM) sob vácuo à temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) durante 20 minutos a 60 rpm para eliminação do excesso de diclorometano (figura 15).

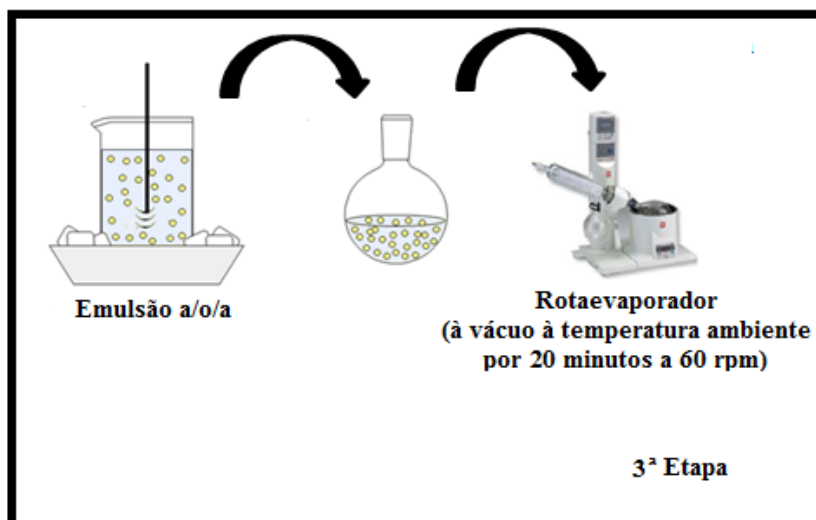


Figura 15 - Evaporação do Solvente Orgânico da Emulsão Água/Óleo/Água (a/o/a) com 2% de Bevacizumabe. (Fonte: BRAGA, 2015).

### 4ª Etapa: Retirada do Excesso de resíduos:

O conteúdo final foi então centrifugado (Beckman TL-100 ultracentrifuge) a 20238 x g, 2000 rpm, a 25°C por 10 minutos. Ao término da ultracentrifugação as nanopartículas foram resuspensas em água purificada e re-centrifugadas mais duas vezes, obtendo-se no fim, nanopartículas a 2% de Bevacizumabe (PLA/PVA/BEVACIZUMABE) (figura 16).

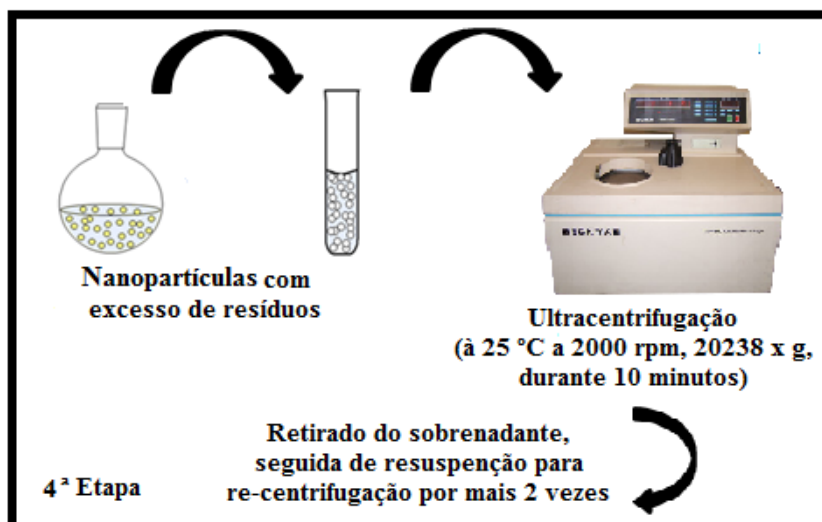


Figura 16 - Retirada do Excesso de resíduos das nanopartículas de PLA/PVA/BEVACIZUMABE. (Fonte: BRAGA, 2015).

#### 4.2.3 Marcação do Bevacizumabe na forma convencional e na forma de nanopartícula com $^{99m}\text{Tc}$

O bevacizumabe, tanto o convencional quanto a nanopartícula, foram marcados utilizando a técnica de marcação direta e empregando cloreto estanooso como agente redutor (BRAGA, 2015; MACHADO *et al.*, 2015). Em um tubo de ensaio foram adicionados 10mL de cloreto de sódio (CINa) e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cloreto estanooso (CISn<sub>2</sub>). Logo em seguida foi retirada desta solução 1mL e acrescentado 9mL de CINa + 150 $\mu\text{L}$  da nanopartícula; esta nova solução foi incubada por 10 minutos e dela retirado 150 $\mu\text{L}$  e colocado em um novo tubo de ensaio onde foram acrescentados 300 $\mu\text{L}/100\mu\text{Ci}$  de pertecnetato de sódio (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) e incubado por mais 10 minutos (figura 17).

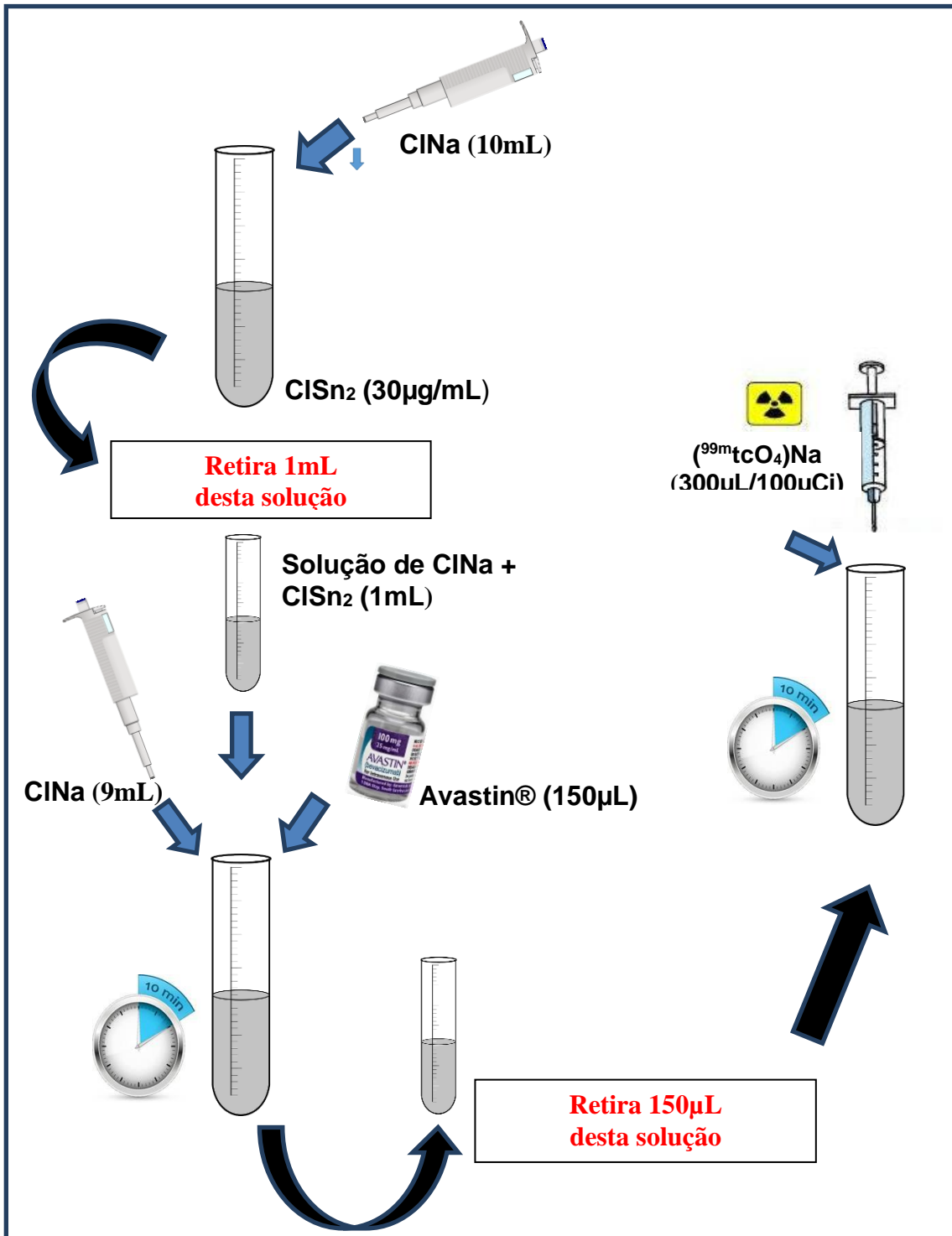


Figura 17: Esquema de marcação direta do Avastin® utilizando cloreto estano como agente redutor.

#### 4.2.4 Estudo de biodistribuição do Bevacizumabe radiomarcado com $^{99m}\text{Tc}$ (convencional e nanopartícula)

O estudo de distribuição do Bevacizumabe, na forma livre e na forma de nanopartícula, foi realizado na em ratas *WISTAR* do biotério da Universidade da Zona Oeste (UEZO). Os animais foram tratados de acordo com os protocolos aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEZO.



**Figura 18 - Dissecção da rata *WISTAR* para retirada dos órgãos após sacrifício na câmara de gás dióxido de carbono**

No estudo reproduzido de acordo com o método descrito por MACHADO *et al.* (2015) e BRAGA (2015), foram usadas duas ratas *WISTAR* portadoras de endometriose já induzida previamente e anestesiadas com cetamina (200 $\mu\text{L}$ ) e xilazina (100 $\mu\text{L}$ ) via intramuscular. Uma das ratas, com o peso de 266,7 gramas recebeu 150 $\mu\text{L}$  da solução contendo a nanopartícula do Bevacizumabe marcado



com  $^{99m}\text{Tc}$  e a outra rata, pesando 243,7 gramas, recebeu a mesma dosagem de Bevacizumabe (150 $\mu\text{L}$ ), também marcado com  $^{99m}\text{Tc}$ , só que na forma convencional. Após uma hora, as ratas foram sacrificadas com  $\text{CO}_2$  por asfixia, seus órgãos, sangue e lesões endometrióticas removidos (figura 18), colocados em tubos identificados e levados ao contador gama (figura 19) para que a radioatividade fosse quantificada.



**Figura 19 - Contador Gama Perkin Elmer modelo Wizard® 2470 utilizado no experimento para quantificar a radiação.**

## 5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo de biodistribuição do Bevacizumabe radiomarcado com $^{99m}\text{Tc}$

Os resultados obtidos no contador Gama foram expressos em forma de gráficos, onde são demonstradas as concentrações do Avastin® nos órgãos, sangue e lesões.

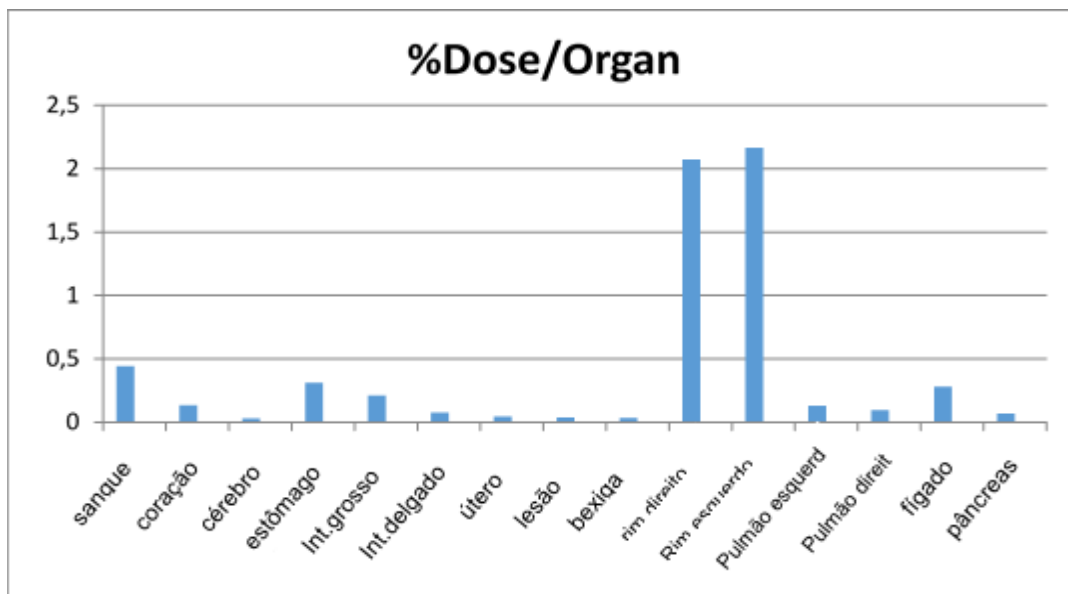


Figura 20 - Biodistribuição do bevacizumabe (Avastin®).

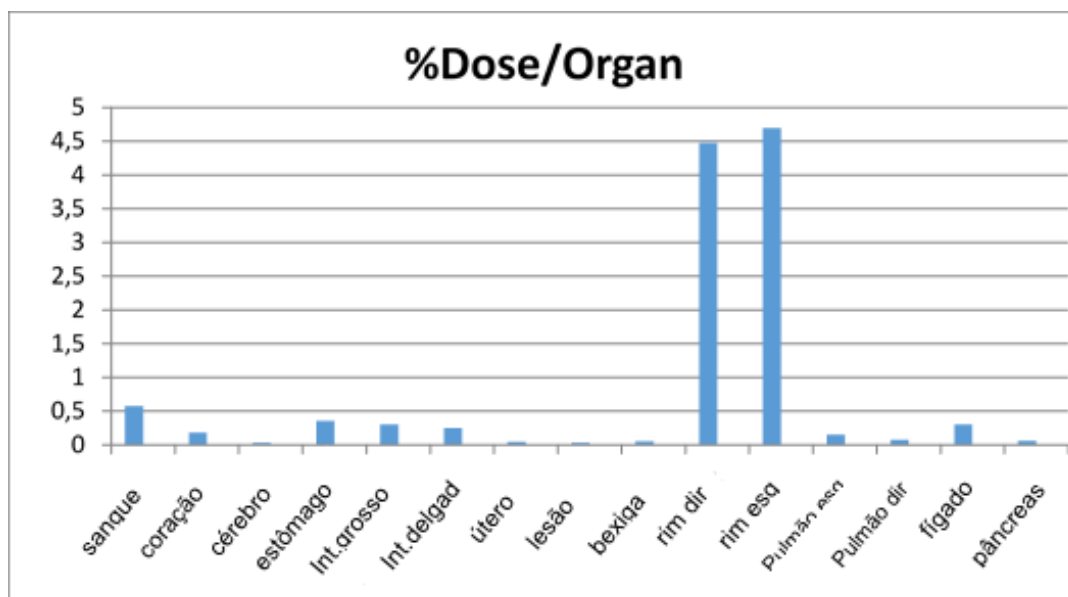


Figura 21 – Biodistribuição da nanopartícula de bevacizumabe (Nano-Avastin®).

Os gráficos (figuras 20 e 21), demonstram os resultados dos testes de biodistribuição e são expressos em porcentagem de dose por órgão. Através dos resultados obtidos, é possível verificar uma elevada absorção de ambas as formulações nos rins, bem maior do fármaco livre em comparação com a nanopartícula. Essa expressiva biodistribuição renal se deve à elevada taxa de clearance sanguíneo do radiofármaco, uma característica bastante desejável, pois minimiza os efeitos da radiação sobre o organismo do paciente. A meia-vida biológica do Avastin® é longa, 18 dias para o paciente feminino e 20 dias para o paciente masculino (ANVISA, 2014), porém a meia-vida do radionuclídeo tecnécio é curta, 6,01 horas (BRAGA, 2015), deste modo, a combinação destes dois parâmetros forma a meia-vida efetiva do radiofármaco, que deve ser relativamente curta para evitar a exposição do paciente, porém suficientemente longa para que seja possível adquirir e processar as imagens (OLIVEIRA, 2006).

Afim de se obter uma melhor visualização da biodistribuição do bevacizumabe nos órgãos e lesões, os mesmos gráficos são apresentados sem a biodistribuição nos rins.

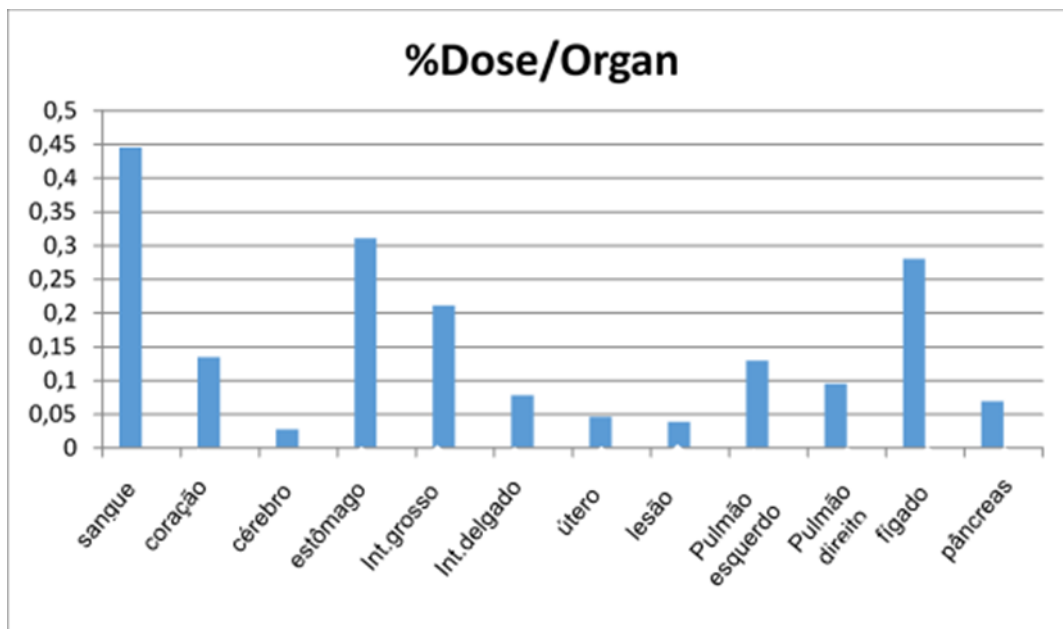


Figura 22 - Biodistribuição do Avastin sem a biodistribuição renal.

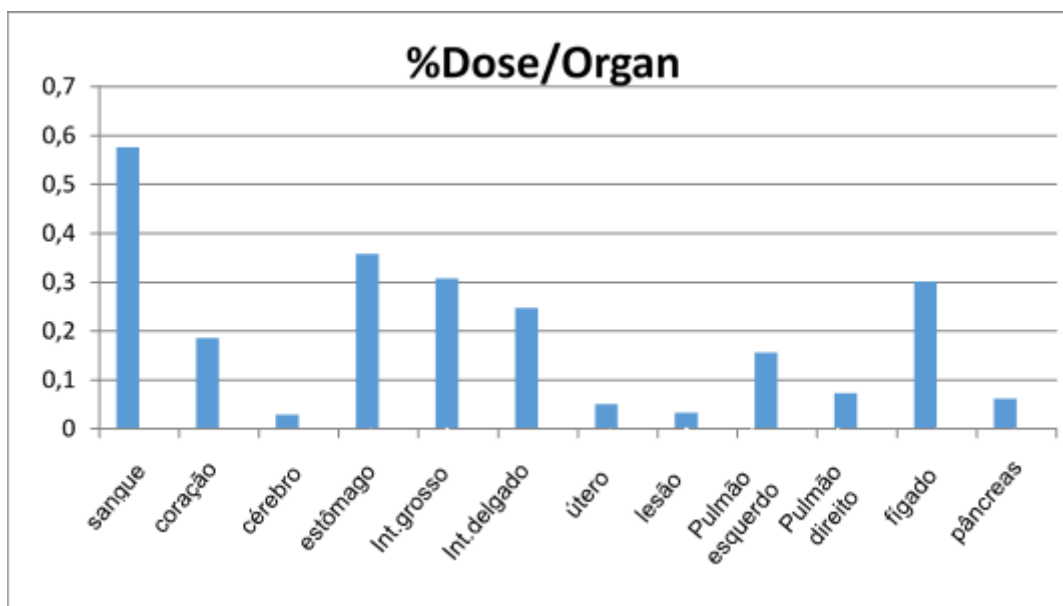


Figura 23 - Biodistribuição do nano avastin sem a biodistribuição renal.

Nos gráficos (figuras 22 e 23), sem a biodistribuição renal, fica mais evidente a biodistribuição nas lesões e órgãos. A taxa de biodistribuição no sangue é bastante elevada em ambas as formulações, no entanto a nanopartícula possui uma maior concentração sanguínea em relação à forma livre, isso ocorre porque as nanopartículas hidrofóbicas são rapidamente recobertas por proteínas do soro, facilitando seu reconhecimento por macrófagos e neutrófilos e também devido à forte ligação com as proteínas plasmáticas, sobretudo a albumina (BRAGA, 2015), essa característica diminui a captação da droga pelo fígado e pelo baço e favorece a perfusão sanguínea de outros órgãos e do sitio-alvo, neste caso a lesão de endometriose.

Os resultados evidenciam uma ampla absorção do fármaco pelo fígado, isso acontece devido à rápida metabolização da droga, o que é deveras importante em se tratando de procedimentos diagnósticos. A nanopartícula demonstra uma menor distribuição no fígado em comparação ao fármaco livre, sendo mais efetiva em diminuir o efeito de primeira passagem do radiofármaco.

A ocorrência de absorção no baço, pulmão e intestinos grosso e delgado se deve à intensiva expressão do VEGF nestes órgãos (MACHADO *et al.*, 2015). Uma boa expressão do fármaco nos intestinos representa uma condição ideal para o diagnóstico da endometriose intestinal. No estômago e no intestino, a nanopartícula apresenta absorção inferior à do fármaco livre, o que acarreta uma redução da

quantidade de efeitos adversos indesejados, como distúrbios gastrointestinais comuns ao fármaco, entre eles: perfurações intestinais e fístulas (ANVISA, 2014), além do comprometimento na visualização das imagens (BRAGA, 2015).

O cérebro é um órgão que não deve ser afetado pela droga, sobretudo devido ao risco de eventos cerebrais como a Síndrome de Encefalopatia Posterior Reversível<sup>4</sup> (SEPR), que pode causar eventos como convulsões (BRAGA, 2015). Os resultados demonstraram que a distribuição da droga no cérebro é ínfima, sobretudo na nanopartícula, que possui uma absorção cerebral inferior à do fármaco livre.

No coração, a concentração do fármaco é praticamente insignificante, possuindo a nanopartícula uma concentração inferior à da droga livre neste órgão; este fato colabora para redução de reações adversas consideráveis, especialmente distúrbios cardiovasculares como tromboembolismo arterial e venoso, insuficiência cardíaca congestiva e hipertensão (ANVISA, 2014).

A concentração pulmonar do avastin® obteve resultados bastante expressivos e já existem estudos que ressaltam que o VEGF é essencial para o desenvolvimento do pulmão e manutenção dos alvéolos no pulmão adulto (McGrath-Morrow *et al.*, 2005). A nanopartícula apresenta uma ligeira diminuição na concentração pulmonar, o que pode representar uma vantagem em relação à droga livre, visto que o avastin® pode causar hemorragia pulmonar/hemoptise, principalmente em pacientes com câncer de pulmão de não pequenas células (ANVISA, 2014).

A biodistribuição do fármaco no útero foi satisfatória e bem evidente, principalmente em se tratando da nanopartícula comparada com a droga livre, essa característica é importante por ser o útero um órgão importante e diretamente envolvido na patologia; além disso na lesão também a concentração da avastin® foi considerável, em ambas as formulações, o que habilita sua função como radiofármaco para diagnóstico de endometriose. Neste caso também a nanopartícula leva vantagem em relação ao fármaco livre, apresentando uma concentração bem mais definida.

---

<sup>4</sup> N.A.: SEPR – Síndrome de encefalopatia posterior reversível é uma síndrome aguda caracterizada por cefaleias, alteração do estado de consciência, convulsões, manifestações visuais, e alterações imagiológicas generalizadas de predomínio posterior, reversíveis. Causada pelo uso de certos medicamentos, hipertensão grave e eclâmpsia.

## 6.0 CONCLUSÃO

A endometriose é uma patologia que acomete milhões de mulheres em todo o mundo, causando um quadro de dor e tristeza em suas pacientes, por não ter cura e por ser de difícil resolução. O diagnóstico da doença é muitas vezes tardio e a videolaparoscopia é o método diagnóstico definitivo, porém é um procedimento cirúrgico e invasivo. Em busca de um método menos invasivo, foi proposto o uso do anticorpo monoclonal bevacizumabe marcado com o radionuclídeo tecnécio-99m, como método de diagnóstico por imagem. O presente trabalho, estabelece uma comparação entre duas formulações do bevacizumabe: a forma livre e a forma de nanopartícula.

Os resultados obtidos demonstraram que, a nanopartícula possui uma melhor metabolização no fígado do que a forma livre, além de uma maior eliminação renal, esses parâmetros farmacocinéticos são importantes em se tratando de um radiofármaco de diagnóstico, que precisa ser prontamente metabolizado e também, rapidamente excretado, para evitar a ação da radiação sobre o organismo do paciente.

A absorção da nanopartícula no cérebro, no coração, no estômago e nos intestinos, foi inferior à absorção do fármaco livre, representando assim, uma vantagem do nanorradiofármaco, pois este reduz mais efetivamente os diversos efeitos colaterais do fármaco nestes órgãos.

No sangue e no útero, a nanopartícula obteve uma concentração bem superior à forma livre. No sangue, a elevada captação, propiciou maior tempo de circulação da droga no organismo e maior disponibilidade desta para atingir o sítio alvo. A concentração no útero, é relevante, por este ser um órgão diretamente ligado à fisiologia da doença. A biodistribuição de ambas as formulações do bevacizumabe na lesão peritoneal, é suficiente para fornecer o diagnóstico por imagem da endometriose, no entanto a nanopartícula leva vantagem, por apresentar concentração superior à do fármaco convencional.

Diante dos resultados e considerações discutidos, é possível deduzir uma eminente vantagem da nanopartícula em relação ao fármaco livre: melhor metabolização hepática, distribuição sanguínea e eliminação renal; diminuição dos

efeitos colaterais, o que acarreta mais segurança para o paciente e ótima eficiência na identificação da lesão.

## 7.0 OBJETIVOS FUTUROS

- Aquisição de imagens afim de se avaliar o comportamento do radiofármaco em tempo real e também visualizar os focos endometriócos através dos equipamentos de diagnóstico por imagem de medicina nuclear.
- Utilização de outras drogas marcadas com tecnécio-99m no diagnóstico de endometriose. Podem ser utilizadas drogas antiangiogênicas como *antihuman vascular endothelial growth factor-A* (anti-hVEGF), TNP-470, endostatina e anginex.



## 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRÃO, Maurício Simões; PODGAEC, Sérgio; DIAS JR, João Antônio. Endometriose, a mulher moderna e o Brasil. **Prática hospitalar**, ano IX, n. 50, 2007.

ALMEIDA, Rodrigo dos Santos. Reações adversas com radiofármacos: ensaio clínico com metilenodifosfonato marcado com tecnécio-99m (MDP-99mTc) em pacientes com câncer de mama e próstata. 2013.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009, Resolução nº 63, de 18 de Dezembro de 2009, “Estabelece as Boas Práticas de Fabricação de Radiofármacos”, Brasília, DF.

ANVISA, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2014, “AVASTIN® – Bevacizumabe – Bula aprovada pela ANVISA em 17/10/2014”, Disponível em: [http://www.dialogoroche.com.br/content/dam/dialogo/pt\\_br/Bulas/A/Avastin/Bula-Avastin-Profissional.pdf](http://www.dialogoroche.com.br/content/dam/dialogo/pt_br/Bulas/A/Avastin/Bula-Avastin-Profissional.pdf). Acessado em 28/09/2015.

ARAÚJO, Elaine Bortoleti de; LAVINAS, Tatiana; COLTURATO, Maria Tereza; e MENGATTI, Jair. Garantia da qualidade aplicada à produção de radiofármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 1, 2008.

ASSIS, Danielle Nogueira de. Biodistribuição do fluconazol marcado com 99mtecnécio, livre e encapsulado em nanocápsulas, em um modelo experimental de infecção com *Candida albicans*. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

BARTKOWIAK, R; ZIENIEWICZ K.; KAMINSKI, P.; KRAVICZIK, M; MARIANOVISKI, L.; SZYMANSKA, K. Diagnosis and treatment of sigmoidal endometriosis: a case report. **Med Sci Monit**, v. 6, n. 4, p. 787-90, 2000.

BECK, Ricardo Theodoro; TOREJANE, Denise; GHIGGI, Rodrigo Fernando. Endometriose-Aspectos Correlatos. **Femina**, v. 34, n. 10, p. 674, 2006.

BELLELIS, Patrick; JÚNIOR, João Antônio Dias; PODGAEC, Sérgio; GONZALES, Midgley; BARACAT, Edmund Chada; ABRÃO, Maurício Simões. Aspectos epidemiológicos e clínicos da endometriose pélvica: uma série de casos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 4, p. 467-71, 2010.

BELLELIS, Patrick; PODGAEC, Sergio; ABRÃO, Maurício Simões. Fatores ambientais e endometriose. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 4, p. 456-461, 2011.

BRAGA, Thaís Ligiéro. Desenvolvimento de nanorradiofármaco à base de bevacizumabe marcado com tecnécio-99m para diagnóstico precoce do tumor estromal gastrointestinal. 2015.

BURNEY, Richard O.; GIUDICE, Linda C. Pathogenesis and pathophysiology of endometriosis. **Fertility and sterility**, v. 98, n. 3, p. 511-519, 2012.

CAMPOS, Cláudia; NAVALHO, Márcio; CUNHA, Teresa Margarida. Endometriose– Epidemiologia, Fisiopatologia e Revisão Clínica e Radiológica. **Acta Radiológica Portuguesa**, v. 20, n. 80, p. 67-77, 2008.

CARDOSO, Érica P. de Souza; ANSELMO, Neriane Magalhães; MIGUEL Katia Jacqueline; Silva, Alessandra B. Cheraim. Endometriose em diferentes faixas etárias: perspectivas atuais no diagnóstico e tratamento da doença. **Revista Ciência et Praxis**, v.4, n. 8, p. 53, 2011.

CARVALHO, Érico Bennemann. Revisão dos principais radiofármacos utilizados no Brasil e suas aplicações na detecção e terapia de patologias. 2014.

DA MATTA, Adriana Zanona; MULLER, Marisa Campio. Uma análise qualitativa da convivência da mulher com sua endometriose. **Psicologia, Saúde e Doenças**, v. 7, n. 1, p. 57-72, 2006.

DIMER, Frantiescoli A; FRIEDRICH, Rossana B.; BECK, Ruy C.R.; GUTERRES, Sílvia. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

DURÁN, Nelson; MORAIS, Paulo Cezar de; MATTOSO, Luiz Henrique Capparelli. Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de **nanomateriais e exemplos de aplicação. Artliber, 2006.**

FAGUNDES, Paula Zulian; BELLELIS, Patrick; PODGAEC, Sérgio. Contracepção hormonal e sexualidade. Endometriose. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 69, p. 14-18, 2012.

FAHNING, Bárbara Mathias; LOBÃO, Elyomar Brambati. Nanotecnologia aplicada a fármacos. 2011.

FEBRASGO - Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia. Manual de orientação endometriose. São Paulo, SP: FEBRASGO, 2010.

FERRERO, S.; RAGNI, N.; REMORGIDA, V. Antiangiogenic therapies in endometriosis. **British Journal of Pharmacology**, v. 149, p. 133-135, 2006.

FERRARA. N.; HILLAN, K.J.; NOVOTNY, W. Bevacizumab (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 333, p. 328-335, 2005.

FIGUEIRAS, Ana Rita Ramalho; COIMBRA, André Brito; VEIGA, Francisco José Baptista. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 14, 2014.

KRÄMER, I.; LIPP, H.-P. Bevacizumabe, a humanized anti-angiogenic monoclonal antibody for the treatment of colorectal cancer. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 32, n. 1, p. 1-14, 2007.

KRATKA, Patrícia Camargos. O Enigma da Endometriose. 2002.

LAGOS, A.C. *et al.* Endometriose Recto-Sigmoideia. **Rev Port Coloproct**, 7(2), p.74-77, 2010.

LERMAN, Hedva; METSER, Ur; GRISARU, Dan; FISHMAN, Ami; LIEVSHITZ, Gennady; EVEN-SAPIR, Einat. Normal and abnormal 18F-FDG endometrial and ovarian uptake in pre-and postmenopausal patients: assessment by PET/CT. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 45, n. 2, p. 266-271, 2004.

MACHADO, Daniel Escorsim. Estudo do processo de angiogênese na endometriose experimental: papel do fator de crescimento endotelial vascular (vegf) e de inibidores de ciclooxigenase-2 (cox-2). 2009. 146 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfológicas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Ciências Biomédicas, 2009.

MACHADO, Daniel Escorsim; BERARDO, Plínio T.; PALMERO, Célia Y.; NASCIUTTI, LE. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases. **J Exp Clin Cancer Res**. 2010; 29:4.

MACHADO, Daniel Escorsim; PERINI, Jamila Alessandra; ORLANDO, Margarida Maria Camões; SANTOS-OLIVEIRA, Ralph. Developing a Noninvasive Procedure Using Labeled Monoclonal Antibody Anti-VEGF (Bevacizumabe) for Detection of Endometriosis. 2015.

McGRATH-MORROW, Sharon A.; CHO, Cecília; CHO, Chung; ZHEN, Ligie; HICKLIN, Daniel J.; TUDER, Rubin M. Vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade disrupts postnatal lung development. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 32, n. 5, p. 420-427, 2005.

MENDONÇA, Marcos; PAULA, Liv Braga de; MORO, Luciana. Apoptose no endométrio humano e endometriose. **J. bras. med**, v. 101, n. 6, 2013.

MEYER, Joana Ladeira. Avaliação do padrão de metilação de regiões promotoras dos genes ESR1, ESR2 e PGR na endometriose profunda intestinal. 2011.

MORORÓ, Jânio da Silva. Estudo de marcação do anticorpo monoclonal Anti-PBP2a com 99mTc. 2012.

NANOTECNOLOGIA, Relatório. Investimentos, Resultados e Demandas. 2006.

NAP, A.W.; GROOTHUIS, P.G.; DEMIR, A.Y.; EVERS, J.L.H.; DUNSELMAN, G.A.J. Pathogenesis of endometriosis. **Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol**. 18(2), p. 233-244, 2004.

NAVARRO, Paula Andrea de Albuquerque Salles; BARCELOS, Ionara Diniz Santos; SILVA, Júlio César Rosa e. Tratamento da endometriose. **Revista Brasileira de ginecologia e obstetrícia**, v. 28, n. 10, p. 612-623, 2006.

NOVO, Magda Suzana. NANOCIÊNCIAS, NANOTECNOLOGIA: uma visão desde seu nascimento até apresentação das temáticas à sociedade. 2013.

OLIVEIRA, Rita; SANTOS, Delfim; FERREIRA, Domingos; COELHO, Pedro; VEIGA, Francisco. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.

PATRICIO, B. F. de Carvalho; ALBERNAZ, Marta de S.; SANTOS-OLIVEIRA, Ralph. Development of Nanoradiopharmaceuticals by Labeling Polymer Nanoparticles with Tc-99m. **World Journal of Nuclear Medicine**, v. 12, n. 1, p. 24-26, 2013.

PERINI, Jamila A.; CARDOSO, Jéssica V.; BERARDO, Plínio T.; VIANNA-JORGE, Rosane; NASCIUTTI, Luiz E.; BELLODI-PRIVATO, Marta; MACHADO Daniel E.; ABRÃO, Maurício S. Role of vascular endothelial growth factor polymorphisms (-2578C > A, -460 T > C, -1154G > A, +405G > C and +936C > T) in endometriosis: a case-control study with Brazilians. **BMC Women's Health**, p. 114-117, 2014.

PETTA, Carlos Alberto; PELOGGIA, Alessandra. Benefícios da contracepção contínua combinada na endometriose. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 69, p. 3-6, 2012.

PLENTZ, Flávio; FAZZIO, Adalberto. Considerações sobre o Programa Brasileiro de Nanotecnologia. **Ciência e Cultura**, v.65, n.3, p. 23-27, 2013.

PODGAEC, Sérgio ABRÃO, Maurício Simões. Endometriose: aspectos atuais do diagnóstico e tratamento. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 61, n. 1/2, p. 41-6, 2004.

PODGAEC, Sergio. **Endometriose: Coleção Febrasgo**. Elsevier Brasil. Cap. 14, p.274, 2015.

RICCI, Analia Gabriela; OLIVARES, Carla Noemi; BILOTAS, Marielaa Andrea; MARESMAN, Gabriela Fabiana e BARAÑAO, Rosa Inés. Effect of vascular endothelial growth factor inhibition on endometrial implant development in a murine model of endometriosis. **Reproductive Sciences**, v. 18, n. 7, p. 614-622, 2011

ROSSI-BERGMANN, Bartira. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 54-57, 2008.

SANTOS-OLIVEIRA, Ralph; CARNEIRO LEÃO, Ana Maria dos Anjos. História da radiofarmácia e as implicações da Emenda Constitucional N. 49. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, 2008.

SANTOS-OLIVEIRA, Ralph. Nanoradiopharmaceuticals: is that the future for nuclear medicine?. **Current Radiopharmaceuticals**, v. 4, n. 2, p. 140-143, 2011.

SEPULCRI, Rodrigo de Pinho; AMARAL, Vivian Ferreira do. Endometriose pélvica em adolescentes: novas perspectivas. **Femina**, v. 35, n. 6, 2007.

SOUZA, Jayme Vital Santos; CARMEL, Ana Paula Wiering; SILVANY, Anibal Muniz. Tratamento cirúrgico da endometriose intestinal. **Rev. bras. colo-proctol**, v. 16, n. 4, p. 232-4, 1996.

SOYSAL Dokuz; KIZILDAğ Sefa; SAATLI B.; POSACI C.; SOYSAL S.; KOYUNCUOđLU M.; DOđAN Ö.E. A novel angiogenesis inhibitor bevacizumab induces apoptosis in the rat endometriosis model. **Balkan Journal of Medical Genetics**, v. 17, n. 2, p. 73-80, 2014.

SPRITZER, Poli Mara; NÁCUL, Andrea Prestes. Aspectos atuais do diagnóstico e tratamento da endometriose. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 6, p. 298-307, 2010.

ZANETTI-RAMOS, Betina Giehl; CRECZYNSKI-PASA, Tânia Beatriz. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 2, p. 95-101, 2008.

**ANEXO A****Carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UEZO)**

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



Parecer n° 001

Pesquisador Responsável: Prof. Ralph Santos Oliveira

Tipo de Pesquisa: Pesquisa.

Instituição onde será desenvolvido: UEZO

Prazo do Projeto: 01/09/2013 até 01/12/2015

Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: “**Desenvolvimento de nanorradiofarmacos**”, considero que o projeto se encontra adequado e satisfatório de acordo com as exigências das Resoluções que regem esta Comissão.

Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável a realização do projeto classificando-o como **APROVADO**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Norma de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão da Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste.

Rio de Janeiro, 05 de novembro de 2013

Prof. Michel Alexandre Villani Gantus

Coordenador da CEUA-UEZO