

Capítulo 1

Introdução

1.1: Hipóxia Tumoral

O oxigénio é um elemento químico essencial no metabolismo e na cadeia transportadora de electrões nas mitocôndrias das células vivas. Qualquer desequilíbrio nos níveis normais de O_2 nos tecidos, provoca modificações nos metabolismos celulares conduzindo a alterações patofisiológicas ⁽¹⁻²⁾.

O oxigénio é transportado pelo sangue ligado à hemoglobina; a afinidade da hemoglobina para o O_2 é afectada por várias condições fisiológicas, entre as quais as mais importantes são o aumento da pressão parcial de dióxido de carbono (PCO_2) e conseqüentemente a diminuição de pH, o aumento da temperatura, aumento de fosfato orgânico e da concentração de 2,3-difosfoglicerato. Todos estes factores diminuem a afinidade da hemoglobina com o oxigénio, facilitando a libertação deste para o tecido ⁽³⁾.

A concentração intracelular de O_2 é mantida num estreito limite. O excesso de oxigénio conduz a um estado de hiperoxia, e a insuficiência deste a um estado de hipóxia (4).

A hipóxia é o estado de reduzida pressão parcial de oxigénio nas células e é uma característica de várias condições patofisiológicas, como, por exemplo, o cancro, algumas doenças vasculares e insuficiência respiratória. A diminuição da pressão parcial de oxigénio compromete o normal funcionamento celular, reduzindo a produção de ATP e o consumo de oxigénio mitocondrial, este “stress” causado no ambiente celular é característico dos tumores sólidos (5-6).

A demonstração da presença de zonas hipóxicas em tumores sólidos humanos foi feita pela primeira vez na década de 50 do século XX e os resultados publicados em 1955 (7). Na grande maioria dos tumores sólidos, a hipóxia desenvolve-se devido à incapacidade do sistema vascular de fornecer as quantidades adequadas de oxigénio para as massas tumorais em crescimento, o que, ao contrário do que ocorre nos tecidos normais, leva a uma microvascularização heterogénea, grande variabilidade na disponibilidade de oxigénio (intra e intertumoral), stress oxidativo, pH baixo e concentrações de glicose reduzidas. Este tipo de ambiente induz uma variedade de mudanças biológicas nas células cancerígenas, incluindo mudanças metabólicas e de expressão genética (7-8).

Tendo como base a hipóxia tumoral, muitos tratamentos anti-cancerígenos tinham como objectivo impedir o crescimento dos vasos sanguíneos tumorais, eliminando o seu fornecimento de oxigénio e, conseqüentemente, provocando a sua morte. Contudo, estudos recentes contrariam o anteriormente exposto, demonstrando que as células tumorais que sobrevivem ao estado de hipóxia podem usar esta falta de oxigénio a seu favor, verificando-se a existência de uma causa-efeito entre a hipóxia e a deficiente resposta aos tratamentos anti-cancerígenos (9).

Investigadores conseguiram relacionar a hipóxia e a progressão acelerada dos tumores, por meio de uma via molecular precisa. Os níveis baixos de oxigénio permitem a activação de enzimas específicas e proteínas que, posteriormente,

levam à estimulação da divisão celular, migração e mudanças morfológicas de vários tipos, o que pode tornar o tumor mais agressivo e capaz de invadir outros tecidos, formando metástases ⁽⁹⁻¹⁰⁾.

Durante a última década, o estado de hipóxia dos tumores sólidos tem sido alvo de estudo e tem-se tornado evidente que a hipóxia altera os padrões da expressão genética de diversas formas, nomeadamente o potencial de malignidade dos tumores, levando a características mais agressivas de sobrevivência. Pode-se assim afirmar que tumores hipóxicos são mais difíceis de tratar, tendo maior resistência à terapia por radiação ⁽¹¹⁾.

Actualmente os tratamentos mais usados para o combate do cancro são a quimioterapia e a radioterapia, mas estas técnicas têm mostrado ser pouco eficientes no tratamento de tumores com regiões hipóxicas, isto porque a hipóxia está relacionada com a radiorresistência e com a ineficácia dos tratamentos, assim como condiciona o sucesso dos tratamentos pós-cirúrgicos e da quimioterapia. As primeiras publicações sobre estes factos remontam aos anos vinte do século passado e o seu reconhecimento definitivo consta no artigo de Mottram et al., de 1936, sendo este assunto generalizado a partir dos anos cinquenta. Estas primeiras publicações revelaram-se ser importantes por chamarem a atenção para o facto de que para uma morte celular equivalente, sob condições de hipóxia são necessárias doses superiores de radiação, ou seja, para um mesmo efeito em condições hipóxicas é necessário uma dose de irradiação 2,5 a 3,5 vezes superior à que seria necessária em condições de oxigenação normais.

Só na última década foi possível demonstrar, a nível clínico, uma clara relação entre hipóxia e radiorresistência, uma vez que até então a medição em tecidos vivos num hospedeiro não era possível pela inexistência de instrumentos de medição adequados ⁽¹²⁻¹⁴⁾.

Assim sendo, é fundamental a quantificação da extensão da hipóxia, pois tem implicações na resposta às terapias, determinando o modo e tipo de terapia mais adequado. Para tal são necessários métodos capazes de determinar a extensão da hipóxia com boa resolução espacial e temporal, isto é, é importante que o método escolhido para a medição de hipóxia no tumor permita obter medições

repetidas e reprodutíveis da região de interesse, de modo a detectar mudanças na oxigenação, durante um período de tempo ⁽¹⁵⁾.

A medição de hipóxia deverá ser rápida, não invasiva e sem efeitos secundários. O desenvolvimento das técnicas de medicina nuclear, abriu o campo para a utilização de marcadores inócuos, para a detecção de hipóxia por imagiologia funcional de forma não invasiva ⁽¹⁶⁾. Foi descrita pela primeira vez em 1981, a administração a doentes de fármacos com emissores de radiação ⁽¹⁷⁾. Estes, ao serem incorporados em vias metabólicas específicas, interagem com espécies que são características de uma determinada situação patológica, e permitem obter informação funcional imagiológica de forma não invasiva. Com esta metodologia evita-se a execução de biopsias e todos os problemas de reprodutibilidade pois analisa-se o tumor como um todo, obtendo-se assim informação sobre a sua extensão e heterogeneidade.

1.2: Métodos de Detecção de Hipóxia

Existem vários métodos para detecção de hipóxia tumoral, estes são escolhidos de acordo com a viabilidade das abordagens disponíveis, o grau de resolução necessária, a invasão do método, necessidade de medição de parâmetros directos ou indirectos e também de acordo com considerações financeiras ⁽¹⁸⁾. A hipóxia tumoral pode ser avaliada por métodos directos e indirectos: utilizando eléctrodos de oxigénio, utilizando traçadores imunohistoquímicos para os traçadores exógenos e endógenos de hipóxia ou por espectroscopia de ressonância magnética ^(11,18,19).

A utilização de eléctrodo de oxigénio em Eppendorf, método polarográfico, tem sido considerado o método-padrão para a medição da pressão parcial de oxigénio nos tumores, este método foi aplicado durante décadas e era o único que podia efectuar tais medições directamente, contudo há variações na medição da pressão parcial de oxigénio e os resultados obtidos dependem de variáveis

como o laboratório em que se realizam. Para além disso, este método não consegue medir a oxigenação em determinadas micro regiões, ao longo do tempo, uma vez que utiliza oxigénio no processo de medição, entre outras desvantagens. Os eléctrodos de Eppendorf constituem um método de medição extracelular e, se for pretendida informação intracelular, terão que ser utilizados outros métodos ^(15,18).

As técnicas imunohistaminicas, no que diz respeito à sua aplicação na detecção de hipóxia tumoral, constituem um método que consegue distinguir o grau de hipóxia, assim como a fracção de células tumorais neste estado, e fornece, também uma medida mais precisa da hipóxia. Contudo, este método é invasivo e limitado quanto à identificação das células hipóxicas terapeuticamente relevantes ⁽¹⁵⁾.

A coloração imunohistoquímica surge como opção, esta é uma técnica intracelular com resolução espacial, neste método é usada coloração de marcadores de hipóxia endógenos (produtos de genes) e exógenos (químicos, fármacos), que têm como vantagem fornecer informação da distribuição espacial da hipóxia nos tumores a um nível micro-regional. Comparativamente com a sonda de eppendorf, este método fornece informação essencial do ambiente intracelular a um nível individual, enquanto que a sonda de Eppendorf dá informação relativamente a um volume de 500 células ^(15,20).

Todos os métodos anteriormente referidos são de carácter informativo mas, no entanto, são invasivos. A medição de hipóxia deverá ser rápida, económica, acessível, não invasiva e sem efeitos secundários. O que até agora não tem acontecido, visto que todos os métodos desenvolvidos são dependentes de biopsias, pelo que são deficientes devido à heterogeneidade e à distribuição da hipóxia no tumor. Consequentemente, pode não haver reprodutibilidade do método ⁽²¹⁾.

Assim como consequência, surgem as técnicas imagiológicas que permitem uma avaliação da hipóxia de uma forma não invasiva, fornecendo, também informação sobre a heterogeneidade do tumor. De uma forma geral, estes métodos que permitem obter uma imagem da concentração de oxigénio nos

tecidos podem ser classificados segundo diferentes grupos, nomeadamente: métodos ópticos, que incluem espectroscopia de infravermelho próximo e imagiologia fosforescente; métodos baseados em ressonância magnética; tomografia computadorizada e métodos baseados em medicina nuclear ⁽¹⁵⁾.

Alguns dos critérios que se desejam seguir para o sucesso da imagiologia do grau de oxigenação em sistemas vivos, são: a técnica não ser invasiva, capacidade para se fazerem medições repetidas, acessibilidade à região de interesse, precisão e robustez da medida, resolução da imagem, utilidade do parâmetro relatado e sua utilidade clínica, ruído de fundo da imagem, tempo de aquisição da imagem, disponibilidade da instrumentação, entre outros ⁽²²⁾.

A observação da extensão da hipóxia neste projecto, parte do desenvolvimento de técnicas de medicina nuclear.

Os procedimentos da medicina nuclear, incluindo emissão de positrão e emissão de fóton simples, utilizam fármacos que tenham sido marcados com radionuclídeos emissores de radiação, esta técnica difere, assim, dos outros métodos imagiológicos pois esta demonstra a função fisiológica do órgão, ou sistema, sob investigação ⁽¹⁵⁾.

A tomografia de emissão de positrão (PET) é a que permite as medições *in vivo* e a quantificação de processos fisiológicos, por meio de radiofármacos emissores de positrão de tempo de vida curto. A PET permite, assim, localizar a região tumoral hipóxica *in vivo*, com uma resolução anatómica adequada, tal como possibilita a monitorização da terapia ⁽²²⁾, nesta técnica têm sido utilizados vários radiotraçadores para determinar a hipóxia tumoral ⁽²³⁾. Mas tem-se verificado que a tomografia de emissão de fóton simples (SPECT) é mais vantajosa do que a PET, uma vez que está mais disponível e com menores custos operacionais ⁽²¹⁾.

Os ligados, sintetizados neste projecto serão posteriormente utilizados em SPECT.

1.3: Marcadores de Hipóxia Tumoral

O desenvolvimento de marcadores com propriedades óptimas, de forma a que a sua utilização seja generalizada no prognóstico do adenocarcinoma colo-rectal, requer um esforço interdisciplinar. O grupo de orgânica do Departamento de Química da FCTUC desenvolve e sintetiza ligandos com diferentes funcionalidades que a equipa de medicina nuclear da Faculdade de Medicina de Coimbra testará, quanto à sua capacidade de complexação com ^{99m}Tc . Serão seleccionados os ligandos que mais eficazmente formarem marcadores estáveis, e estes serão estudados *in vitro*, a fim de ser determinada a relação da captação pelas células em condições de hipóxia/normóxia. Os marcadores que mostrarem melhores características passarão à fase de estudos *in vivo* e *ex vivo* para avaliar a biodistribuição e a captação Tumoral.

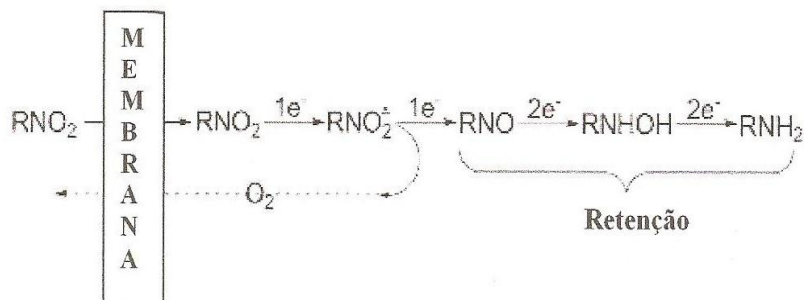
O ^{99m}Tc é usado em mais de 80% dos testes de diagnóstico, a sua vasta aplicação deve-se às suas características, tais como a sua energia de emissão máxima ser ideal para a utilização de câmara-gama ($E_\gamma = 140 \text{ Kev}$), a sua semi-vida é de 6 h que é a ideal para a preparação do radiofármaco, também minimizando a dose de radiação para o paciente ⁽²⁴⁾.

O radionuclídeo (^{99m}Tc), encontra-se na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{Tc}^{\text{VII}}\text{O}_4$). Este na presença de um agente redutor adequado, forma a espécie $[\text{}^{99m}\text{Tc}^{\text{VI}}\text{O}]$ e neste estado de oxidação, o tecnécio pode complexar com quatro átomos doadores de um ligando, ou seja, complexa de forma tetradentada ^(25,26).

A maioria dos marcadores, que surgem na literatura com o objectivo de detectar a hipóxia tumoral, tem diversas formas estruturais mas muitos têm um aspecto em comum, a existência de pelo menos um grupo nitroimidazole que se considera essencial para a retenção do fármaco nos tecidos hipóxicos ⁽²⁷⁾. Com base nas observações de Nakamura, em 1955, que mostraram que este grupo possuía actividade contra algumas infecções associadas a ambientes hipóxicos,

surgiram vários estudos de ligandos com grupos nitroimidazole marcados com tecnécio ⁽²⁸⁾. Assim, devido aos comportamentos característicos dos nitroimidazóis em ambientes desprovidos de oxigénio, prosseguiram-se vários estudos no que toca à sua aplicação na detecção da hipóxia, ao longo dos últimos 20 anos. Porém, só recentemente é que as aplicações práticas destes compostos vieram a ser desenvolvidas.

Muitos organismos são capazes de reduzir compostos nitro-aromáticos, por meio de enzimas nitro-reductases. O grupo nitroimidazole, dentro da célula, sofre reduções sucessivas (Esquema 1.2.1). Pensa-se que a redução leva à formação de um anião radical nitro, bastante reactivo perante o oxigénio, seguido da formação dos respectivos compostos nitroso e hidroxilamina e, por fim, a amina. Os intermediários destas reduções têm maior afinidade pelas células hipóxicas do que pelas células normais, deste modo, os complexos dos compostos marcados com ^{99m}Tc são retidos selectivamente nas células hipóxicas ⁽¹⁵⁾.



Esquema 1.2.1: Representação da redução do grupo nitro que permite a sua retenção nas células hipóxicas.

Mais recentemente, tem-se verificado que existem ligandos sem o grupo nitroimidazole que são eficientes marcadores de hipóxia, não sendo ainda conhecido o seu mecanismo de actuação ⁽¹⁵⁾. Mas um marcador não pode ser bom só na capacidade de detectar a hipóxia tumoral, tem também de ser

facilmente depurado da corrente sanguínea e dos restantes tecidos, e apresentar um alto nível de excreção por via renal ⁽²⁹⁻³¹⁾.

Actualmente, um dos marcadores com grupo nitroimidazol mais promissores para a detecção de hipóxia, é o BMS-181321 (Figura 1), um marcador com características lipofílicas favoráveis. Os estudos *in vitro* com este marcador mostraram uma alta captação de hipóxia celular, mas os estudos *in vivo* revelaram que este marcador demora muito tempo a ser removido da corrente sanguínea e a maior parte da sua eliminação é feita pela via gastrointestinal ^(27,28).

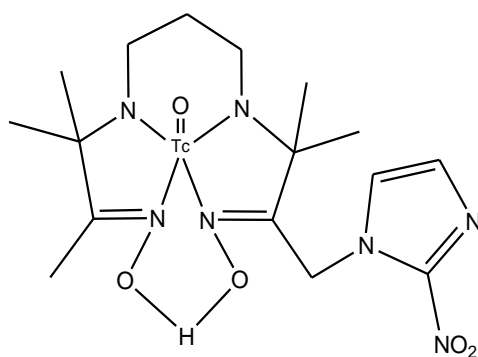


Figura 1: Marcador de Hipóxia BMS-181321

Foram sintetizados outros ligandos semelhantes ao BMS-181321, com grupo nitroimidazole incorporado, com o intuito de detectar a hipóxia e de alcançar melhores resultados no que toca à sua eliminação do organismo. A maioria destes ligandos difere do BMS-181321 na estrutura da unidade diamínica e/ou na posição do grupo nitroimidazole. Existem derivados de 1,4-diaminobutano e de 1,5-diaminopentano, possuindo uma ou duas unidades de nitroimidazole ^(32,33,36), ligado ao esqueleto diamínico ou à unidade cloronitroso. Um exemplo é o BRU59-21 (Figura 2), derivado do diaminopropano, em que o grupo nitroimidazole se encontra ligado à unidade diamínica.

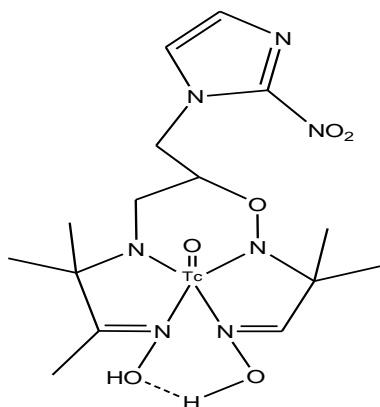


Figura 2: Marcador de hipóxia BRU59-21

Comparado com o BMS-181321 nos estudos *in vitro*, demonstra uma alta captação de hipóxia celular e relativamente aos estudos *in vivo*, mostra ser rapidamente removido do sangue por excreção hepatobiliar e só 10% do composto é eliminado pelo sistema urinário ^(34, 35). Estudos clínicos, tem sido realizados com este marcador com o objectivo de avaliar a sua capacidade de detecção de hipóxia em pacientes com tumores no pescoço e na cabeça ⁽³¹⁾.

Um outro composto que contém o grupo nitroimidazole, é o ligando denominado de Cyclam AK 2123 (Figura 3), que após complexação com ^{99m}Tc foi também testado como marcador de hipóxia. Devido aos resultados positivos observados, este composto tem sido usado numa fase inicial de tratamentos clínicos de alguns tipos de cancro. AK 2123 é considerado muito eficiente por imagiologia, sendo por si só radiosensibilizador. Quando injectado este composto sozinho, e sujeito a radiação gama, observou-se apoptose em alguns tumores. Ligandos similares a este, com diferentes substituintes nos átomos de nitrogénio, foram também estudados. Contudo, até agora os resultados não são muito promissores ⁽³⁷⁾.

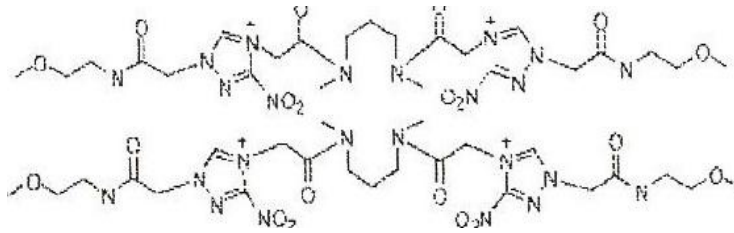


Figura 3: Marcador de hipóxia AK 2123

Ligandos com oxigénio e azoto como átomos quelantes, salans, são também descritos na literatura como potenciais detectores de hipóxia, o ^{99m}Tc -BAPC é um exemplo desta classe de marcadores (Figura 4).

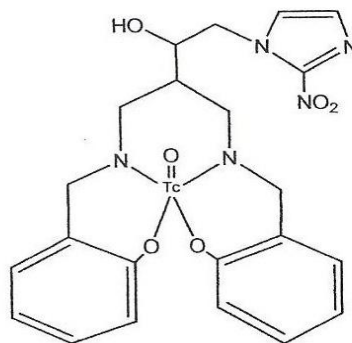


Figura 4: Marcador de hipóxia ^{99m}Tc -BAPC

Como já foi referido anteriormente, um outro tipo de marcadores de hipóxia estudados são os que não tem na sua estrutura grupos nitroimidazole. O marcador de maior relevo desta categoria é o HL-91. O complexo ^{99m}Tc -HL-91 (Figura 5) e outros semelhantes são conhecidos por possuírem propriedades biorreductivas intrínsecas, permitindo a sua retenção nos tecidos hipóxicos. O mecanismo exacto de acção destes marcadores ainda não é conhecido ⁽²⁷⁾.

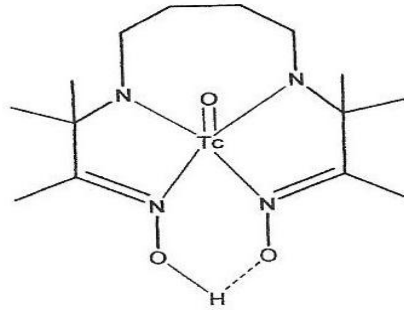


Figura 5: Marcador de hipóxia ^{99m}Tc -HL-91

Existem vários estudos em que este marcador revela capacidade de detectar células hipóxicas. Quando usado em testes *in vivo* demonstra uma acumulação muito maior em células hipóxicas do que em células saudáveis (15,45). Este é um importante factor, pois permite distinguir o estado de oxidação de tecidos tumorais. O ^{99m}Tc -HL-91 também tem sido usado em estudos clínicos, como um potencial detector de hipóxia no enfarte de miocárdio. A informação do estado de hipóxia dada pelo marcador, correlacionada com os parâmetros do sangue, permite medir a gravidade do estado de hipóxia (38-39). Este marcador é um ligando tetradentado de nitrogénio que apresenta uma baixa lipofilicidade e uma elevada estabilidade química, o que aumenta a sua actividade na relação hipóxia/normóxia em cerca de nove vezes e diminui o ciclo hepatobiliar. A baixa lipofilicidade favorece a sua rápida depuração sanguínea e dos restantes tecidos, apresentando aproximadamente 50% de excreção por via renal (40).

Outro tipo de potenciais marcadores de hipóxia, análogos aos salan, são os que possuem quatro átomos quelantes de nitrogénio, em que os grupos substituintes ligados ao nitrogénio podem ser grupos carboxílicos ou grupos fosfóricos entre outros (Figura 6), (41).

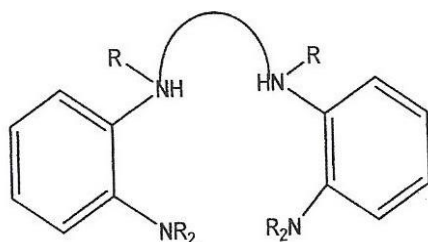


Figura 6: Potencial detector de hipóxia, salan

Estes ligados podem ser facilmente obtidos por redução dos respectivos salen, e há já trabalhos efectuados no grupo, no sentido de criar alguns, de modo a testar a sua capacidade de complexação com o ^{99m}Tc , para posteriormente serem analisados quanto à sua capacidade de detecção de células hipóxicas tumorais.

Apesar de na literatura serem referidos muitos marcadores como potenciais detectores de hipóxia, poucos são usados actualmente ou estão em fases mais avançadas de estudos clínicos. Entre estes estão os já referidos anteriormente, ^{99m}Tc -HL-91 e BRU59-21. Contudo, é ainda necessário efectuar mais estudos a fim de se desenvolverem novos marcadores com características ideais para a detecção de hipóxia ⁽¹⁵⁾.

A síntese de um marcador semelhante a ^{99m}Tc -HL-91 é um dos objectivos deste trabalho. Esta síntese envolve a reacção de uma diamina com 2-cloro-2-metil-3-nitrosobutano, originando o ligando, que posteriormente é complexado com ^{99m}Tc obtendo-se o marcador ⁽⁴²⁾.