

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Estudos de aterosclerose experimental utilizando tomografia por emissão de
pósitrons (PET-Scan)

Soraya Megumi Kazuma

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Fisiopatologia

Estudos de aterosclerose experimental utilizando tomografia por emissão de
pósitrons (PET-Scan)

Soraya Megumi Kazuma
Versão original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

K23e Kazuma, Soraya Megumi
Estudos de aterosclerose experimental utilizando tomografia
por emissão de pósitrons (PET-Scan) / Soraya Megumi
Kazuma. -- São Paulo, 2017.
149p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.
Orientador: Abdalla, Dulcineia Saes Parra

1. Bioquímica clínica 2. Arteriosclerose 3. Peptídeos I. T.
II. Abdalla, Dulcineia Saes Parra, orientador.

616.0756 CDD

Soraya Megumi Kazuma

Estudos de aterosclerose experimental utilizando tomografia por emissão de pósitrons
(PET-Scan)

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla

Orientador/presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2017.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ser tão abençoada em todos os aspectos, e por ele ter me dado forças para sempre continuar batalhando e nunca perder a fé.

Agradeço à minha orientadora, Dulcineia, por me conferir a oportunidade e por confiar à realização desse projeto inovador e desafiador.

Agradeço ao meu marido Dan, pelo apoio e amor incondicional, e por ser um grande companheiro com quem posso contar sempre. Agradeço a minha família, meus pais Jorge e Neuza, irmãos Leandro e Simone, cunhada Adriana (*in memoriam*), sobrinhos Lucas, Gabriel, Aya e Ryo e primos Adriana, Leonardo, Marcel, meus tios Eliza e Missao, meus sogros Kojiro e Naomi, sendo sempre meu grande suporte para todos os momentos.

Agradeço aos amigos de laboratório Marcela, que além da ajuda nos experimentos e trabalho, sempre dando grandes conselhos, servindo de ombro amigo sempre, ao especialista de laboratório Walter, pelo excelente profissionalismo e ajuda com todos os experimentos de microPET, ao Gustavo e Jacqueline, pela amizade, companheirismo com assuntos do lab, e principalmente pelos momentos espontâneos e engraçados. Agradeço também aos amigos que já trabalharam conosco mas que seguiram outros caminhos, Tanize, sempre um exemplo de pessoa e profissional, Felipe, Elaine e Martina, pela amizade e grande ajuda nos experimentos.

Agradeço ao Dr Liu e toda sua equipe de pesquisa, Debbie, Hannah, Lisa, Yongfeng e Meng por me receber de braços abertos em seu laboratório na Washington University in St Louis, e com muita paciência possibilitou que grande parte desse projeto fosse realizado. Agradeço ao Dr Liu também por ter me concedido a oportunidade de escrever uma revisão e pela confiança no meu trabalho. Agradeço imensamente à Dra Carmen Dence, que foi primeiro contato com a Washington University in St Louis e me colocou em contato com Dr Liu, me ajudou muito na minha chegada aos Estados Unidos, é uma excelente pessoa e profissional. Aos amigos brasileiros que conheci em St Louis, Luciana, Renata, José, Lilian, Gustavo e Denise, vocês foram fundamentais para amenizar a saudade do Brasil.

Agradeço também à equipe da Facility Pré-Clínica de Imagem da Washington University, ao pessoal da produção de ^{64}Cu Tom, Paul e Suzy.

Ao Dr Emerson e seus alunos, Renata, Sofia, Martha e Arian, pela ajuda nos experimentos e com o HPLC. Ao IPEN e seus funcionários, Dra Lorena, Dr Luis Alberto, ao pessoal do controle de qualidade Dra Neuza, Natanael, Jurandir e Carlos, às alunas Carla, Tânia e Dafne, pela ajuda e por disponibilizar o espaço para os experimentos de radioquímica e imagens.

Ao Prof. Ernani e ao especialista de laboratório Felipe, do Departamento de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelos experimentos de espectrometria de massas.

Ao técnico Ricardo Torquato, da UNIFESP, pela ajuda com experimentos e análises no equipamento do Biacore.

Aos meus amigos que trabalharam comigo no Centro de Genomas, e que mantenho a amizade até hoje: Shirlene, Priscila, Erica, Thais, Lucy, Elton, Diego, Eduardo pelos ótimos momentos que passamos no laboratório.

À agência de fomento e apoio à pesquisa, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da minha bolsa no país (número do processo 2013/02353-8) e no exterior através de bolsa BEPE (número do processo 2014/11135-7).

Aos demais amigos que conheci ao longo dessa jornada e aos demais familiares, pessoas especiais sempre deixam marcas e sem elas, não conseguimos realizar nada nessa vida.

RESUMO

KAZUMA, S.M. **Estudos de aterosclerose experimental utilizando tomografia por emissão de pósitrons**. 2017. 149f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A aterosclerose é caracterizada como uma doença imune-inflamatória crônica das artérias devido ao grande acúmulo de lipídios na íntima. Um dos fatores envolvidos na progressão da aterosclerose é a presença de uma subfração de partículas de lipoproteína de baixa densidade (LDL) com um grau mínimo de modificação, denominada LDL eletronegativa [LDL(-)], que possui propriedades pró-inflamatórias, apresenta maior retenção na íntima das artérias e maior tempo de permanência na circulação sanguínea, gerando respostas imuno-inflamatórias. Epítomos de anticorpos monoclonais importantes no reconhecimento das partículas de LDL(-) foram mapeados por phage display, gerando peptídeos mimotopos (P1A3 e P2C7) com potencial para acompanhamento da progressão da aterosclerose, sendo excelentes candidatos como radiotraçadores marcados com emissores de pósitrons para obtenção de imagens moleculares por tomografia por emissão de pósitrons (PET) associada à tomografia computadorizada (PET/CT). O peptídeo P1A3 foi radiomarcado com ^{64}Cu através da complexação com o quelante DOTA, obtendo-se imagens por PET/CT da captação do peptídeo na região do arco aórtico de camundongos knockout para a apolipoproteína E ($\text{ApoE}^{-/-}$) comparados com animais controle sem lesões ateroscleróticas. Antes da obtenção das imagens PET/CT, os peptídeos radiomarcados foram validados através de estudos de estabilidade e biodistribuição, acumulando-se rapidamente nos rins. Também foi sintetizado um nanocluster de ouro, marcado com ^{64}Cu e funcionalizado com P1A3 em sua superfície, observando-se o maior direcionamento dos nanoclusters de ouro ligados ao P1A3 para a região das lesões ateroscleróticas do arco aórtico de camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$, comparado ao nanocluster controle. Os peptídeos P1A3 e P2C7 radiomarcados com ^{68}Ga , foram também avaliados por imagens PET/CT em camundongos knockout para o gene do receptor da LDL ($\text{LDLr}^{-/-}$) tratados ou não com dieta hipercolesterolêmica. As imagens PET/CT mostraram que os peptídeos marcados com ^{68}Ga tiveram um aumento de captação na região do arco aórtico de camundongos $\text{LDLr}^{-/-}$ hipercolesterolêmicos em relação ao controle. Além disso, P2C7 foi radiomarcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e sua biodistribuição demonstrou uma relação maior de % atividade injetada (AI)/órgão da aorta/coração nos camundongos hipercolesterolêmicos, em concordância com a imagem obtida por SPECT (tomografia computadorizada por emissão de fóton único) que revelou maior captação no arco aórtico.

Palavras-chave: aterosclerose, peptídeos mimotopos, radiomarcção, imagem molecular, tomografia por emissão de pósitrons.

ABSTRACT

KAZUMA, S. M. **Studies of experimental atherosclerosis using positron emission tomography (PET-Scan)**. 2017. 149f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Atherosclerosis is characterized as a chronic immune-inflammatory disease of the large arteries due to the accumulation of lipids in the intima. One of the factors involved in the progression of atherosclerosis is the presence of a subfraction of low-density lipoprotein (LDL) particles with a minimum degree of modification, called electronegative LDL [LDL (-)], which has proinflammatory properties, retention in the intima of the arteries and longer residence time in the blood circulation, generating immune-inflammatory responses. Epitopes of monoclonal antibodies important for the recognition of LDL(-) particles were mapped by phage display, generating mimotope peptides (P1A3 and P2C7) with potential to monitor the progression of atherosclerosis. These peptides are excellent candidates as radiotracers labeled with positron emitters to obtain molecular images by positron emission tomography (PET) associated with computed tomography (PET/CT). The P1A3 peptide was radiolabeled with ^{64}Cu by complexation with the DOTA chelator to obtain PET/CT images of the peptide uptake in the aortic arch of apolipoprotein E knockout mice ($\text{ApoE}^{-/-}$) compared to control animals without atherosclerotic lesions. Prior to PET/CT imaging, radiolabeled peptides were validated by stability and biodistribution studies that indicated rapid accumulation in the kidneys. It was also synthesized a gold nanocluster, labeled with ^{64}Cu and functionalized with P1A3 on its surface, observing the greater targeting of gold nanoclusters bound to P1A3 in the region of the atherosclerotic lesions of the aortic arch of $\text{ApoE}^{-/-}$ mice, compared to control nanocluster. The P1A3 and P2C7 peptides radiolabeled with ^{68}Ga were also evaluated by PET imaging in LDL receptor gene knockout mice ($\text{LDLR}^{-/-}$) treated or not with a hypercholesterolemic diet. PET/CT images showed that the ^{68}Ga -labeled peptides had increased uptake in aortic arch of $\text{LDLR}^{-/-}$ hypercholesterolemic mice in relation to the control. Furthermore, the biodistribution of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -radiolabeled P2C7 showed a higher %ID (injected dose)/organ ratio of aorta/heart in hypercholesterolemic mice that was in accordance to SPECT (*single photon emission computed tomography*) imaging showing its higher uptake in the aortic arch.

Keywords: atherosclerosis, mimotope peptides, radiolabeling, molecular imaging, positron emission tomography.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alvos de imagem funcional em aterosclerose.....	36
Tabela 2. Composição da dieta hipercolesterolêmica para camundongos LDLR ^{-/-}	44
Tabela 3. Composição da dieta hipercolesterolêmica para camundongos Apoe ^{-/-}	45
Tabela 4. Parâmetros avaliados na padronização da radiomarcção manual com ⁶⁸ Ga.....	47
Tabela 5. Parâmetros modificados realizados na marcação em módulo automatizado.....	48
Tabela 6. Condições avaliadas na conjugação do peptídeo aos nanoclusteres de ouro.....	56
Tabela 7. Condições de radiomarcção de NOTA-peptídeos com ¹⁸ F.....	60
Tabela 8. Dados de constantes de afinidade e dissociação obtidos a partir das curvas de concentração de peptídeos.....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estágios de desenvolvimento de uma lesão aterosclerótica segundo AHA.....	20
Figura 2. Figura ilustrativa demonstrando o início do desenvolvimento de uma lesão aterosclerótica.....	23
Figura 3. Esquema representando dois tipos de lesão aterosclerótica com suas características, sintomas e manejo do tratamento.....	27
Figura 4. Localização do peptídeo P2C7 em lesão aterosclerótica humana.....	32
Figura 5. Imagem por tomografia por emissão de pósitron.....	37
Figura 6. Cromatograma em sistema CLAE com injeção do peptídeo P1A3 em coluna C18.....	67
Figura 7. Cromatograma em sistema CLAE com coluna C18 injetada com o peptídeo P2C7.....	67
Figura 8. Espectro de massas do pico coletado referente ao peptídeo P1A3.....	67
Figura 9. Espectro de massas referente ao pico coletado do peptídeo P2C7.....	68
Figura 10. Espectro de massas do peptídeo P1A3 após ser submetido às condições de radiomarcção com pH 4,0 e aquecimento a 95°C.....	68
Figura 11. Espectro de massas do peptídeo P2C7 mediante às condições de radiomarcção.....	68
Figura 12. Cromatogramas do sistema CLAE de amostras "frias" coletadas pelas etapas da purificação em cartucho Sep-Pak C18.....	69
Figura 13. Espectro de massas do pico coletado do sistema CLAE da etapa de eluição do cartucho Sep-Pak C18.....	70
Figura 14. Avaliação da estabilidade de ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3 marcado manualmente.....	71
Figura 15. Avaliação da estabilidade de ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3 marcado no módulo de síntese automatizado....	71
Figura 16. Avaliação da estabilidade do radiotraçador ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3, marcado no módulo automatizado, por CLAE.....	72
Figura 17. Avaliação da influência da quantidade de massa de peptídeo sobre a radiomarcção com ⁶⁸ Ga...	72
Figura 18. Avaliação da pureza radioquímica de ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3 marcado de modo manual.....	73
Figura 19. Avaliação da pureza radioquímica de ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3 marcado no módulo de síntese automatizado.....	73
Figura 20. Cromatograma de CLAE com injeção de ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3 sem purificação.....	73
Figura 21. Cromatograma de CLAE com injeção do peptídeo DOTA-P1A3 "frio".....	74
Figura 22. Cromatograma em coluna C18 com injeção de uma amostra do peptídeo DOTA-P1A3.....	74
Figura 23. Espectro de massas do pico coletado de 5,7 minutos.....	75
Figura 24. Espectro de massas do pico de 6 minutos de retenção.....	75
Figura 25. Cromatograma de CLAE de ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3 após incubação em soro humano a 37°C por 1 h.....	76
Figura 26. Biodistribuição de ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3 em camundongos controle LDLR ^{-/-}	77
Figura 27. Biodistribuição de ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3 em camundongos hipercolesterolêmicos.....	77

Figura 28. Relação alvo/background de % AI/g em camundongos controle e hipercolesterolêmicos com ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3.....	78
Figura 29. Imagens PET/CT, na visão coronal, adquirida de camundongos LDLR ^{-/-} injetados com ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3.....	79
Figura 30. Porcentagens de captação em LDLR ^{-/-} controle e hipercolesterolêmico injetados com ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3.....	79
Figura 31. Imagens representativas CT, PET e a sobreposta PET/CT dos camundongos LDLR ^{-/-} controle e hipercolesterolêmico que receberam ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3.....	80
Figura 32. Imagens PET de camundongos LDLR ^{-/-} controle e hipercolesterolêmico injetados com ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3.....	80
Figura 33. Gráficos de porcentagens de captação de ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3 nos diferentes órgãos comparando os camundongos LDLR ^{-/-} hipercolesterolêmico em relação ao controle.....	81
Figura 34. Cromatograma de CLAE do radiotraçador ⁶⁸ Ga-DOTA-P2C7.....	82
Figura 35. Cromatograma de CLAE do peptídeo "frio" DOTA-P2C7.....	82
Figura 36. Cromatograma de CLAE de ⁶⁸ Ga-DOTA-P2C7 após incubação em soro humano a 37°C por 1 h.....	82
Figura 37. Imagens PET, CT e sobrepostas PET/CT com camundongos LDLR ^{-/-} controle e hipercolesterolêmico que receberam injeção de ⁶⁸ Ga-DOTA-P2C7.....	83
Figura 38. Quantificação da captação de ⁶⁸ Ga-DOTA-P2C7 na região do arco aórtico nos camundongos LDLR ^{-/-} controle e hipercolesterolêmico.....	84
Figura 39. Imagens dinâmicas representativas PET/CT adquiridas em um protocolo de até 30 min após injeção do radiotraçador nos camundongos LDLR ^{-/-} controle e hipercolesterolêmico.....	85
Figura 40. Cromatograma de análise do radiotraçador ^{99m} Tc-HYNIC-P2C7 demonstrando 100% de pureza radioquímica.....	86
Figura 41. Cromatograma de análise do peptídeo "frio" HYNIC-P2C7 com 20 µg injetados no equipamento CLAE.....	87
Figura 42. Cromatograma de análise de ^{99m} Tc-HYNIC-P2C7 após incubação em soro humano a 37° C por 1 h.....	87
Figura 43. Biodistribuição de camundongos LDLR ^{-/-} controle (n=3) que receberam ^{99m} Tc-HYNIC-P2C7 (0,33-6,5MBq).....	88
Figura 44. Biodistribuição de camundongos LDLR ^{-/-} hipercolesterolêmicos (n=3) injetados com ^{99m} Tc-HYNIC-P2C7 (0,33-6,5MBq).....	89
Figura 45. Relações das taxas aorta/sangue, aorta/coração e coração/sangue nos camundongos LDLR ^{-/-} controle e hipercolesterolêmico 60 e 90 min após a injeção de ^{99m} Tc-HYNIC-P2C7.....	89
Figura 46. Fotografias representativas demonstrando o coração e a aorta de camundongos LDLR ^{-/-} controle e hipercolesterolêmico no estudo de biodistribuição.....	90
Figura 47. Imagens SPECT/CT de camundongos LDLR ^{-/-} controle e hipercolesterolêmico injetados com ^{99m} Tc-HYNIC-P2C7.....	91
Figura 48. Quantificação de captação na região do arco aórtico a partir de dados obtidos das imagens SPECT/CT representadas pela porcentagem de atividade injetada por grama (% AI/g).....	91

Figura 49. Dados de captação dos radiotraçadores ⁶⁸ Ga-DOTA-P2C7 e ^{99m} Tc-HYNIC-P2C7 em camundongos LDLR ^{-/-} hipercolesterolêmicos como %AI/g na região do arco aórtico dos animais a partir de imagens PET e SPECT.....	92
Figura 50. Análises dos radiotraçadores ⁶⁴ Cu-DOTA-P1A3 e ⁶⁴ Cu-DOTA-P2C7 por CLAE.....	93
Figura 51. Análise de DOTA-P2C7 por CLAE.....	93
Figura 52. Teste de radiólise de DOTA-P2C7 demonstrado por CLAE.....	94
Figura 53. Radio-cromatograma de ⁶⁴ Cu-NOTA-P1A3 demonstrando a pureza radioquímica.....	94
Figura 54. Pureza radioquímica de ⁶⁴ CuAuNC-P1A3 ao final do processo de síntese e conjugação.....	95
Figura 55. Biodistribuição de ⁶⁴ CuAuNC-P1A3 em camundongos CD-1.....	96
Figura 56. Estudo de eliminação com ⁶⁴ CuAuNC-P1A3 em camundongos CD-1.....	96
Figura 57. Biodistribuição de ⁶⁴ Cu-DOTA-P1A3 e ⁶⁴ Cu-NOTA-P1A3 em camundongos CD-1.....	97
Figura 58. Relação de porcentagem de atividade injetada por grama do coração/sangue no tempo de 60 min após a injeção do radiotraçador no camundongo CD-1.....	98
Figura 59. Imagens PET/CT na visão axial de camundongos Apoe ^{-/-} com 6 semanas de dieta hipercolesterolêmica e camundongos C57Bl/6N.....	99
Figura 60. Imagens PET/CT na visão axial de monitoramento da aterosclerose em camundongos Apoe ^{-/-} com 9 semanas de dieta hipercolesterolêmica comparado à camundongos C57Bl/6.....	100
Figura 61. Imagens PET/CT na visão axial de camundongos Apoe ^{-/-} (7 semanas de dieta hipercolesterolêmica) e C57Bl/6 injetados com ⁶⁴ Cu-DOTA-P1A3 e ⁶⁴ Cu-NOTA-P1A3.....	101
Figura 62. Imagens PET/CT na visão axial de camundongos Apoe ^{-/-} e C57Bl/6 injetados com ⁶⁴ Cu-NOTA-P1A3.....	102
Figura 63. Marcação "fria" de NOTA-P1A3 e NOTA-P2C7 sob condições de marcação com ¹⁸ F.....	103
Figura 64. Cromatogramas demonstrando o sinal radioativo da marcação de NOTA-P2C7 com ¹⁸ F.....	103
Figura 65. Internalização dos peptídeos em macrófagos RAW (A) e primários (B) após tratamento com 50, 25, 12.5 e 6.25 µg/mL durante 16 horas de incubação.....	104
Figura 66. Microscopia confocal das células HAEC tratadas com FITC-P1A3/P2C7.....	105
Figura 67. Imunofluorescência de lesões ateroscleróticas de camundongos Apoe ^{-/-} utilizando FITC-P1A3 e FITC-P2C7.....	107
Figura 68. Cromatogramas de CLAE usando coluna C18 para análises de Alexa Fluor 647, P1A3 e seus conjugados.....	108
Figura 69. Imunofluorescência de aortas usando Alexa Fluor 647-P1A3.....	110
Figura 70. Ensaio de ELISA com peptídeos conjugados com DOTA reconhecidos pelos anticorpos anti-LDL(-) 1A3 e 2C7.....	110
Figura 71. Sensograma de ressonância de superfície plasmônica da interação entre P1A3 e anticorpo monoclonal 1A3.....	112
Figura 72. Sensograma ajustado no modelo de transferência de massa utilizando P1A3.....	112
Figura 73. Sensograma ajustado no modelo de transferência de massa utilizando DOTA-P1A3.....	113

LISTA DE ABREVIATURAS

%AI	porcentagem de atividade injetada
%AI/g	porcentagem de atividade injetada por grama
%AI/órgão	porcentagem de atividade injetada por órgão
2D	bidimensional
3D	tridimensional
apoB-100	apolipoproteína B 100
BHT	hidroxitolueno butilado
CABG	ponte de safena
CAD	doença arterial coronariana
CCD	cromatografia em camada delgada
CCL2	quimiocina (motivo C-C) de ligante 2
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CT	tomografia computadorizada
DOTA	1,4,7,10 tetrazaciclododecano-1,4,7,10-ácido tetraacético
EDC	cardiimida 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil)
FDG	fluorodesoxiglicose
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FMISO	fluoromisonidazol
FPLC	fast protein liquid chromatography
GM-CSF	fator estimulante de colônia de monócito-granulócito
GRO	oncogene relacionado ao crescimento
HAEC	células endoteliais de artéria humana
HUVEC	células endoteliais de cordão umbilical humano
HYNIC	ácido hidrazinonicotínico
ICAM-1	molécula de adesão interceular-1
IGF-II	fator II de crescimento como insulina
IL-1 β	interleucina 1 β
IL-8	interleucina 8
IVUS	ultrassonografia intravascular
LDLr	receptor de lipoproteína de baixa densidade
LDL	lipoproteína de baixa densidade

LDL(-)	lipoproteína de baixa densidade eletronegativa
LDLm	lipoproteína de baixa densidade modificada
LDLmm	lipoproteína de baixa densidade minimamente modificada
LDLox	lipoproteína de baixa densidade oxidada
LPC	fosfolipase C
M-CSF	fator estimulante de colônia de macrófago
MDA-LDL	malondialdeído-lipoproteína de baixa densidade
MMP	metaloproteinase
MRI	ressonância magnética
NADPH	fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida oxidase
NEFA	ácidos graxos não-esterificados
NOTA	1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-ácido triacético
PAF-AH	acetilhidrolase do fator ativador de plaquetas
PAMP	padrão molecular associado à patógenos
PDGF	fator de crescimento de plaqueta
PRR	receptor de reconhecimento padrão
PET	tomografia por emissão de pósitrons
PMSF	fluoreto de fenilmetanossulfonil
PTCA	angioplastia coronária transluminal percutânea
ROI	região de interesse
ROS	espécies reativas de oxigênio
SPECT	tomografia de emissão de simples fóton
SR	receptor scavenger
SUV	valor padronizado de captação
VCAM-1	molécula de adesão de células vasculares
VOI	volume de interesse
TNF-	fator de necrose tumoral α
TLR	receptor toll-like

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Início da lesão.....	21
1.2. Progressão da doença.....	22
1.3. Complicações	24
1.4. Papel da LDL(-) na aterogênese	27
1.5. Peptídeos mimotopos: mimetização de epitopos.....	30
1.6. Peptídeos como agentes de imagem	32
1.7. Uso de métodos de diagnóstico por imagem na aterosclerose	35
1.7.1. Tomografia de emissão de pósitrons (PET)	36
1.7.2. Radiotraçadores utilizados em imagem molecular de aterosclerose	38
2. OBJETIVOS.....	42
2.1. Objetivo principal.....	42
2.2. Objetivos específicos.....	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1. Células	43
3.2. Animais.....	43
3.3. Peptídeos.....	44
3.4. Isolamento de LDL(-).....	45
3.5. ⁶⁸ Ga.....	46
3.5.1. Análise por espectrometria de massas	46
3.5.3.1. Marcação de DOTA-P1A3 manual	47
3.5.3.2. Marcação de DOTA-P1A3 no módulo automatizado	47
3.5.4. Avaliação da pureza radioquímica por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)	48
3.5.5. Avaliação da pureza radioquímica por CCD (Cromatografia em camada delgada)	48
3.5.6. Estudo de estabilidade in vitro.....	49
3.5.7. Influência da massa	49

3.5.8. Avaliação da ligação às proteínas do plasma	49
3.5.9. Teste de estabilidade em soro	50
3.5.10. Biodistribuição de ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3 em camundongos sadios e com aterosclerose	50
3.5.11. Imagens PET/CT com ⁶⁸ Ga-DOTA-P1A3	50
3.5.12. Marcação de DOTA-P2C7	51
3.5.13. Imagens PET/CT com ⁶⁸ Ga-DOTA-P2C7	52
3.6. ^{99m} Tc	52
3.6.1. Marcação de HYNIC-P2C7	52
3.6.2. Biodistribuição de ^{99m} Tc-HYNIC-P2C7 em camundongos LDLR ^{-/-} controle e hipercolesterolêmicos	53
3.6.3. Imagens SPECT/CT	53
3.7. ⁶⁴ Cu	54
3.7.1. Marcação de DOTA-P1A3	54
3.7.2. Estudo de estabilidade de ⁶⁴ Cu-DOTA-P1A3	55
3.7.3. Marcação de DOTA-P2C7	55
3.7.4. Purificação por CLAE	55
3.7.5. Teste de radiólise	55
3.7.6. Síntese de nanoclusteres de ouro marcados com ⁶⁴ Cu (⁶⁴ CuAuNC)	56
3.7.6.1. Conjugação de nanoclusteres de ouro com peptídeos	56
3.7.6.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)	57
3.7.6.3. Fast performance liquid chromatography (FPLC)	57
3.7.6.4. Quantificação de peptídeos conjugados ao AuNC	57
3.7.7. Biodistribuição de ⁶⁴ Cu-radiotraçadores	57
3.7.8. Imagens PET/CT	58
3.7.8.1. ⁶⁴ Cu-DOTA-P1A3 e ⁶⁴ Cu-NOTA-P1A3	58
3.7.8.2. ⁶⁴ CuAuNC-P1A3	58
3.7.9. Autoradiografia	59
3.8. Marcação com ¹⁸ F	59
3.8.1. Marcação "fria"	59
3.8.2. Marcação de NOTA-P1A3 e NOTA-P2C7	59

3.9. Análise da interação dos peptídeos com componentes da lesão aterosclerótica	60
3.9.1. Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea.....	60
3.9.1.1. Obtenção de meio condicionado	60
3.9.1.2. Extração de células da medula óssea.....	60
3.9.1.3. Caracterização de macrófagos diferenciados de células da medula óssea	61
3.9.2. Ensaio de internalização de peptídeos em macrófagos	62
3.9.3. Cultura de células HAEC (human aortic endothelial cells) para microscopia confocal	62
3.9.4. Imunofluorescência	63
3.9.4.1. FITC-P1A3 e FITC-P2C7	63
3.9.4.2. Conjugação dos peptídeos com o fluoróforo Alexa Fluor 647 (Life Technologies)	63
3.9.4.3. AF647-P1A3.....	64
3.9.5. Ensaio de ELISA com peptídeos conjugados com DOTA.....	64
3.9.6. Análise de interação de P1A3 por ressonância de superfície plasmônica.....	64
3.10. Análise estatística	65
4. RESULTADOS	66
4.1. ^{68}Ga	66
4.1.1. Espectrometria de massa	66
4.1.3. Biodistribuição em camundongos LDLR ^{-/-} com ^{68}Ga -DOTA-P1A3	76
4.1.4. Imagens PET/CT com ^{68}Ga -DOTA-P1A3	78
4.1.5. Padronização da marcação de DOTA-P2C7 com ^{68}Ga	81
4.1.6. Imagens PET/CT com ^{68}Ga -DOTA-P2C7	82
4.2. $^{99\text{m}}\text{Tc}$	85
4.2.1. Padronização de marcação de HYNIC-P2C7	85
4.2.2. Biodistribuição de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-P2C7.....	87
4.2.3. Imagens SPECT/CT	90
4.3. ^{64}Cu	92
4.3.1. Marcação de DOTA-P1A3 e DOTA-P2C7	92
4.3.2. Marcação de NOTA-P1A3	94
4.3.3. Síntese e conjugação de ^{64}Cu AuNC-P1A3.....	95

4.3.4. Biodistribuição	95
4.3.5. Imagens PET/CT	98
4.4. ¹⁸ F	102
4.5. Análise de interação com componentes da lesão aterosclerótica	103
4.5.1. Internalização dos peptídeos.....	103
4.5.2. Microscopia confocal com células endoteliais	104
4.5.3. Imunofluorescência	106
4.5.4. Ensaio de ELISA com peptídeos conjugados com DOTA.....	110
4.5.5. Análise de interação por ressonância de superfície plasmônica.....	110
5. DISCUSSÃO	114
6. CONCLUSÃO.....	127
7. REFERÊNCIAS	128
ANEXO A	141
ANEXO B	142
ANEXO C	143
ANEXO D	144
ANEXO E.....	145
ANEXO F.....	148

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as doenças cardiovasculares são as causas de mortes ocorridas no mundo (MENDIS; PUSKA; NORRVING, 2011), podendo permanecer como líder de causas até o ano de 2030, segundo projeções relatadas em estudo realizado por Mather e Loncar (2006). O desenvolvimento de doenças cardiovasculares está relacionado a fatores genéticos assim como outros fatores de risco adquiridos ao longo da vida, incluindo hipercolesterolemia, tabagismo, diabetes mellitus e hipertensão (MIZUNO; JACOB; PRESTON MASON, 2011). A aterosclerose é uma das principais causas das doenças cardiovasculares e pode ser caracterizada como uma doença crônica inflamatória da parede arterial, cuja origem é regulada pela participação tanto da imunidade inata quanto da adaptativa que tem por objetivo a remoção de antígenos de microrganismos e estruturas endógenas modificadas (NILSSON; HANSSON, 2008). É uma doença que se inicia na primeira década de vida e progride pelos anos seguintes silenciosamente até que seu avanço possa ocluir o lúmen das artérias e dificultar a passagem do fluxo sanguíneo, sendo este o estágio clinicamente mais importante (LUSIS, 2000). A ausência dos sintomas clínicos durante a progressão da aterosclerose surge como uma necessidade por novos métodos mais precisos de diagnóstico para prevenir futuros danos irreversíveis ao organismo. Neste contexto, métodos de imagem molecular apresentam vantagens por serem altamente sensíveis, específicos e não invasivos, considerando que os agentes de imagem identificam processos biológicos importantes dentro do processo aterogênico.

O Comitê de Lesões Vasculares da *American Heart Association* (AHA) publicou um grande estudo que definia os estágios encontrados durante o desenvolvimento da lesão aterosclerótica, seguindo um fluxo temporal e baseando-se em dados histológicos encontrados nas lesões, que foram associados com estudos clínicos de imagem e correlacionados com os sintomas encontrados nos pacientes (figura 1) (STARY et al., 1994, 1995). Assim, o desenvolvimento de uma lesão aterosclerótica se divide em cinco estágios numerados da seguinte forma:

I: aumento do número de macrófagos na íntima e o surgimento de algumas esparsas células espumosas;

II: formação de estrias gordurosas com camadas de células espumosas derivadas de macrófagos, células musculares lisas contendo gotículas de lipídeos, as quais também se encontram espalhadas no meio extracelular;

III: representam morfologicamente e quimicamente a ponte entre o estágio II e a lesão avançada. Apresentam uma grande quantidade de lipídeo extracelular, além de todos os componentes encontrados no estágio II;

IV: mais conhecido como ateroma, o qual é o tipo de lesão potencialmente capaz de gerar algum sintoma clínico. Possui maior núcleo e confluentes de lipídeo extracelular;

V: surge no início da quarta década de vida e apresentam um núcleo lipídico contendo camadas de tecido conectivo fibroso. Algumas lesões são calcificadas (Vb) e outras lesões possuem tecido fibroso com pouco ou nenhum acúmulo de lipídeo ou cálcio (Vc).

VI: possuem uma fissura, hematoma e um trombo.

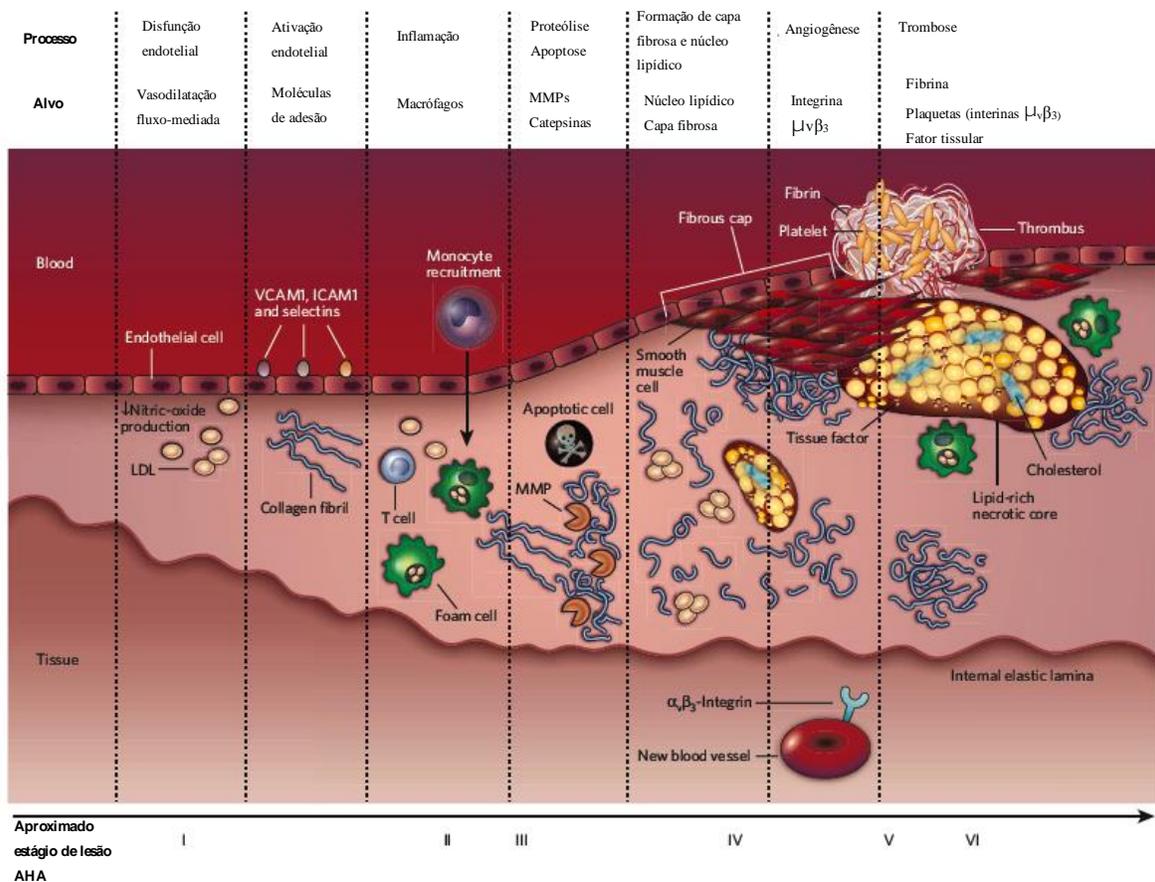


Figura 1. Estágios de desenvolvimento de uma lesão aterosclerótica segundo AHA. Figura adaptada de referência (SANZ; FAYAD, 2008).

1.1. Início da lesão

Locais preferenciais de formação da lesão aterosclerótica ocorre em regiões propensas, ou seja, onde as forças biomecânicas no endotélio ou o formato da árvore arterial como por exemplo regiões de bifurcação ou curvaturas dos vasos alteram o fluxo sanguíneo que resultam na disfunção endotelial. Esta disfunção ativa o endotélio que se torna mais permeável à retenção da lipoproteína de baixa densidade (*low-density lipoprotein* - LDL) que sofre modificações (TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015; TABAS; WILLIAMS; BORÉN, 2007). A LDL se acumula na região subendotelial, onde as células da parede arterial podem modificá-las por oxidação lipídica via enzimas ou espécies reativas de oxigênio (ROS), gerando a LDL modificada pró-inflamatória (LDLm) (WITZTUM; STEINBERG, 1991). Tamanho, carga elétrica e conteúdo de colesterol são algumas das características que determinam a susceptibilidade das lipoproteínas à retenção subendotelial na parede da artéria (BERNEIS; KRAUSS, 2002).

Dentre as diversas teorias sobre o fator desencadeante da aterogênese a hipótese da oxidação pressupõe que a oxidação (principalmente da LDL) e seus produtos oxidativos são as causas do início e desenvolvimento da lesão aterosclerótica, o que é fortemente suportado pelos efeitos pró-aterogênicos (quimiotaxia, expressão de moléculas de adesão e apoptose) de lipoproteínas oxidadas *in vitro* (JESSUP; KRITHARIDES; STOCKER, 2004). Modificações oxidativas da LDL ocorrem tanto no plasma quanto na parede arterial, podendo ser derivadas da ação de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) e de nitrogênio (*reactive nitrogen species* – RNS) em ambas as porções protéica ou lipídica da partícula; ou podem sofrer oxidação mediada por células, onde enzimas como NADPH oxidase, mieloperoxidase e óxido nítrico sintase, que possuem o potencial químico para modificar lipídeos na LDL e apolipoproteína B-100 (apoB-100), produzem uma lipoproteína aterogênica (URSINI et al., 2002). ROS e radicais centrados em enxofre iniciam peroxidação lipídica dependente de íons metálicos gerando aldeídos que interagem com resíduos de lisina da ApoB-100, resultando na oxidação da LDL (VIRELLA; LOPES-VIRELLA, 2012). As modificações da LDL classificam as partículas de acordo com o seu grau de alteração, definidas como LDL minimamente modificada (LDLmm) e extensivamente modificadas como a LDL oxidada (LDLox) mas que podem ser diferenciadas pelos receptores que as reconhecem: embora a LDLmm seja quimicamente

diferente da LDL nativa, ainda é parcialmente reconhecida pelo receptor de LDL e capaz de se ligar a alguns dos receptores *scavenger*; enquanto que a LDLox é reconhecida por uma variedade de receptores scavenger mas não pelo receptor de LDL (LEVITAN; VOLKOV; SUBBAIAH, 2010).

Em resposta à LDL modificada (figura 2), células endoteliais tornam-se ativadas e produzem moléculas de adesão, como a molécula de adesão de células vasculares (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), e células musculares lisas liberam quimiocinas e quimioatraentes como a quimiocina (motivo C-C) de ligante 2 (*chemokine C-C motif ligand 2* - CCL2) e a interleucina-8 (IL-8), promovendo o recrutamento de monócitos e células T para a região de inflamação (YAN; HANSSON, 2007). VCAM-1 expressa sobre células endoteliais se liga à leucócitos através da molécula VL-4 encontrada na superfície de leucócitos. Os monócitos transmigram para a camada íntima da artéria, proliferam e se diferenciam em macrófagos, na presença do fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF), e captam grandes quantidades de LDL modificada, transformando-se em células espumosas (LUSIS, 2000). O depósito dessas células espumosas com acúmulo de LDL modificada na região da íntima é considerado como lesão inicial aterosclerótica, mais conhecida como estria gordurosa devido ao seu aspecto de cor amarelada (ROSS, 1995).

1.2. Progressão da doença

O recrutamento de leucócitos para a íntima arterial e sua ativação estabelecem o estágio de progressão da aterosclerose. Durante a migração, monócitos podem secretar as metaloproteinases (MMPs), tais como a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), que degradam colágeno do tipo IV, permitindo sua entrada em direção à lesão intimal (AMORINO; HOOVER, 1998). Macrófagos proliferam-se amplificando a resposta inflamatória através da secreção de fatores de crescimento e citocinas, como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-1 β (IL-1 β), que induzem a expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, quimiocinas como MCP-1, fatores de crescimento como M-CSF e proteases por células efectoras presentes nas lesões ateroscleróticas (PACKARD; LICHTMAN; LIBBY, 2009). Macrófagos expressam receptores de reconhecimento padrão (PRRs), que reconhecem regiões preservadas de patógenos

denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Dentre estes receptores que reconhecem a LDL modificada destacam-se os receptores *scavenger* (SRs), considerados como endocíticos, pois medeiam a remoção de lipoproteínas modificadas, fragmentos de células apoptóticas, além da internalização de antígenos para processamento e sua apresentação por células apresentadoras de antígenos (LUNDBERG; HANSSON, 2010). Entretanto, os receptores *scavenger* não são inibidos pelo excesso de colesterol intracelular, ao contrário do clássico receptor de LDL, gerando o acúmulo de LDL modificada (GOLDSTEIN et al., 1979).

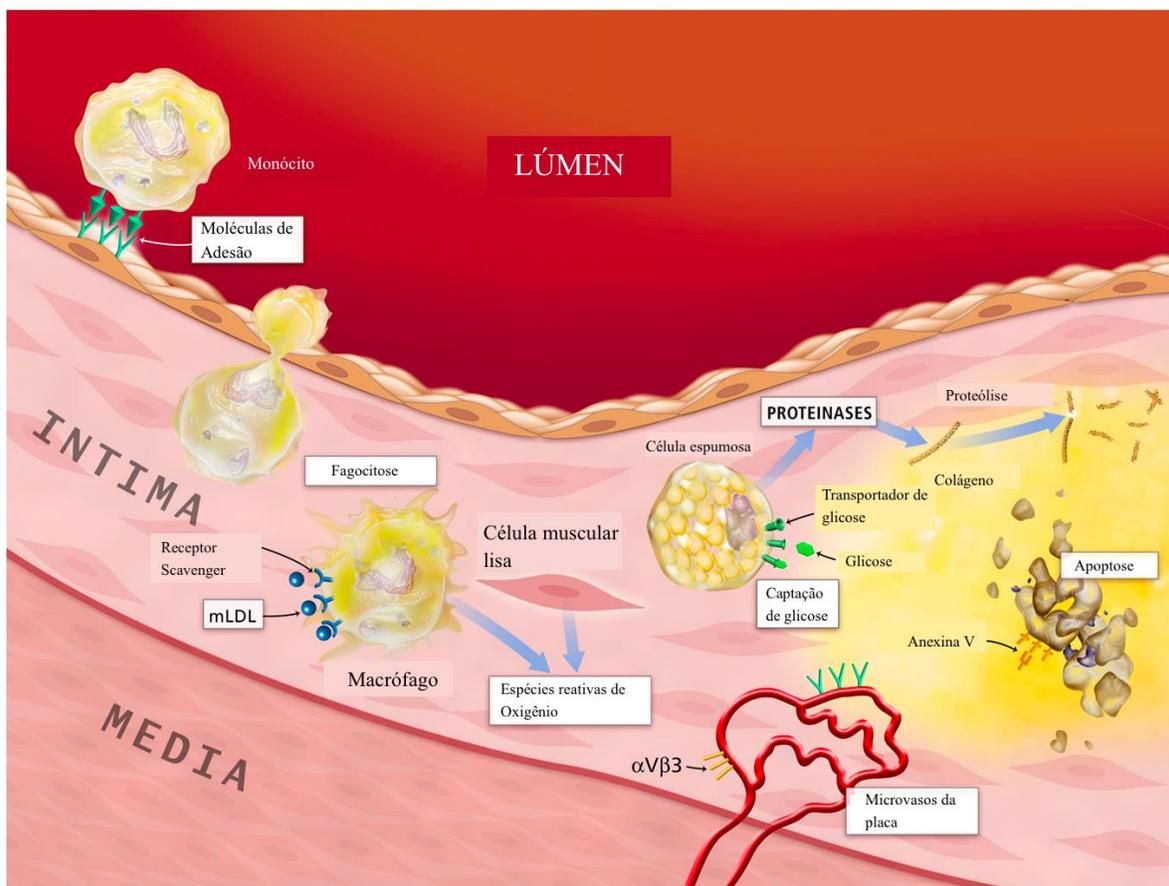


Figura 2. Figura ilustrativa demonstrando o início do desenvolvimento de uma lesão aterosclerótica. Processos patológicos do desenvolvimento da aterosclerose podem ser identificados por técnicas de imagem molecular usando agentes específicos. A aterosclerose se inicia como recrutamento de monócitos circulantes são atraídos que se ligam ao endotélio ativado por quimiocinas e moléculas de adesão. Partículas de LDL migram para a íntima, onde ficam retidas e sofrem modificações. Monócitos também migram para a região da íntima da parede arterial, onde se diferenciam em macrófagos e reconhecem partículas de LDL modificadas. Macrófagos internalizam excessivamente LDL modificada, gerando células espumosas que se acumulam e formam as estrias gordurosas. Alguns desses processos biológicos estão representados na figura pelas caixas brancas e são alvos moleculares como as moléculas de adesão altamente expressas por células endoteliais ativadas, partículas de LDL modificadas captadas por macrófagos, a captação de glicose por células espumosas, a

alta expressão de integrinas em novos microvasos a partir de neovascularização de regiões profundas da lesão e a anexina V presente em células apoptóticas (LIBBY; DICARLI; WEISSLEDER, 2010).

Outra classe de PRRs expressos por macrófagos são os receptores *toll like* (TLRs), cuja ligação induz uma cascata de sinalização intracelular direcionada à ativação do fator de transcrição NF- κ B, aumentando a expressão de genes responsivos (LUNDBERG; HANSSON, 2010). A captação de LDL modificada e a intensa ação pró-inflamatória de macrófagos ativados na lesão aterosclerótica são os responsáveis pela ampliação da inflamação e evolução dessas lesões em condições mais avançadas.

O acúmulo de lipoproteínas, ativação endotelial e respostas inflamatória durante a progressão de lesões ateroscleróticas culminam na proliferação de células musculares lisas que migram da camada média induzida pela liberação de fatores como PDGF (*platelet-derived growth factor*) por macrófagos. Normalmente, células musculares lisas diferenciadas são quiescentes e com baixo poder contrátil, mas estas podem alterar o seu fenótipo através da redução na expressão de marcadores de diferenciação celular como ACTA-2 (*smooth muscle α -actin*) e Myh11 (*smooth muscle myosin heavy chain*), aumentando desta forma a taxa de replicação e migração dessas células nas lesões ateroscleróticas, assim como a síntese de componentes da matriz extracelular em resposta ao dano vascular, comparando-se com um tecido em condições normais (ALEXANDER; OWENS, 2012). Com a intensa multiplicação das células musculares lisas, algumas células começam a sofrer apoptose induzida por citocinas pró-inflamatórias secretadas por macrófagos (LIBBY, 2001). Nesta fase, células musculares lisas também secretam grandes quantidades de componentes da matriz extracelular como elastina, proteoglicanos e colágeno, este sendo o principal componente da capa fibrosa, que se forma neste estágio, e protege o conteúdo da lesão aterosclerótica de entrar em contato com componentes do sangue (LO; PLUTZKY, 2012). Estímulos pró-inflamatórios reduzem a síntese de colágeno por células musculares lisas ao mesmo tempo que estimulam a produção de enzimas que degradam colágeno como as colagenases intersticiais de metaloproteinase de matriz, causando, assim, o estreitamento da capa fibrosa (TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015).

1.3. Complicações

Uma característica das lesões avançadas é a presença de um núcleo necrótico lipídico formado por ésteres de colesterol, cristais de colesterol e debris celulares liberados

de células espumosas que sofreram apoptose. A remoção de macrófagos apoptóticos por fagócitos (eferocitose) é insuficiente e contribui para o aumento do conteúdo do núcleo lipídico e instabilidade da lesão aterosclerótica (TABAS, 2010). Além disso, em lesões avançadas de modelos murinos de aterosclerose, a proliferação de macrófagos é um processo importante para o acúmulo dessas células (ROBBINS et al., 2013). Muitas das características pró-aterogênicas dos macrófagos em lesões avançadas incluem o contínuo influxo de monócitos, a pobre eferocitose e o persistente estado inflamatório que impedem a resolução da inflamação que em condições fisiológicas normais pode ser facilmente resolvida (TABAS; GARCÍA-CARDEÑA; OWENS, 2015).

À medida que macrófagos e células musculares lisas se proliferam na lesão, algumas destas células começam a sofrer apoptose pela fragmentação de DNA no caso das células musculares lisas e pelo acúmulo excessivo de lipídeos intracelulares nas células espumosas (LIBBY, 2001). Células em processo de apoptose expõem em sua superfície a fosfatidilserina que é um ligante reconhecido por Anexina V, o qual é uma proteína que tem afinidade pela fosfatidilserina, é muito utilizada como radiotraçador em estudos de imagem molecular no direcionamento de células apoptóticas (DE SAINT-HUBERT et al., 2014; ISOBE et al., 2006). Nos macrófagos, além da apoptose contribuir com a formação do núcleo lipídico, seus corpos apoptóticos podem gerar micropartículas trombogênicas, induzindo uma trombose na placa aterosclerótica (LIBBY; DICARLI; WEISSLEDER, 2010).

Além da participação da imunidade inata no desenvolvimento da aterosclerose, a imunidade adaptativa também atua através da ação de linfócitos T e B. Estudos demonstram a presença de auto-anticorpos e células T específicos com reatividade à LDLox em placas ateroscleróticas (STEMME et al., 1995; YLÄ-HERTTUALA et al., 1994). Neste contexto, diversos antígenos candidatos que desencadeiam o processo inflamatório na aterosclerose têm sido identificados como alguns componentes bacterianos e virais (PAMPs), assim como a LDL oxidada (LDLox) ou LDL artificialmente modificada como malondialdeído-LDL (MDA-LDL) ou CuSO₄ LDLox (Cu-LDLox). Estas modificações da LDL principalmente oriundas de oxidação formam epítomos imunodominantes (WICK; KNOFLACH; XU, 2004). Respostas imunes induzidas durante uma infecção viral ou bacteriana podem produzir células T de reação cruzada contra patógenos e antígenos

próprios (como LDL modificada) em um processo denominado mimetismo molecular (LUDEWIG; KREBS; SCANDELLA, 2004).

As células T CD4+ são as mais abundantes encontradas na lesão aterosclerótica e o seu subtipo Th1 é conhecido por produzir citocinas pró-inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ) que ativa monócitos/macrófagos e células dendríticas, podendo também inibir a proliferação de células musculares lisas e reduzir a produção de colágeno, além de induzir a expressão de metaloproteinases, contribuindo para o adelgaçamento da capa fibrosa (MALLAT et al., 2009). Células Th1 são mais predominantes nas lesões ateroscleróticas (BUONO et al., 2005; LAURAT et al., 2001; SCHULTE; SUKHOVA; LIBBY, 2008), enquanto que células Th2 são raramente encontradas em áreas de lesão aterosclerótica (MALLAT et al., 2009).

Em estágio mais avançado da lesão, inicia-se a angiogênese de microvasos que surgem da vaso vasorum da adventícia nas regiões mais profundas da lesão que sofrem com a falta de perfusão sanguínea pois se tornaram muito distantes do lúmen devido ao crescimento da lesão aterosclerótica (BARGER et al., 1984; MOULTON, 2006). Hipóxia e angiogênese são processos intimamente correlacionados no desenvolvimento da placa aterosclerótica, pois a falta de oxigênio induz o crescimento de microvasos (SLUIMER et al., 2008).

O desfecho clínico mais agravante das lesões avançadas ateroscleróticas, que em humanos chamam-se ateromas ou placas ateroscleróticas, é a ruptura dessas lesões que desencadeia o processo trombótico e o extravasamento do conteúdo do núcleo necrótico lipídico para o lúmen, induzindo a formação do trombo e o impedimento da passagem sanguínea. Basicamente, a ruptura depende da complexidade da composição das lesões e resulta de placas vulneráveis (propensas à ruptura). As placas ateroscleróticas consideradas não vulneráveis ou estáveis são aquelas em que não há o risco de ruptura. Ainda dentro da problemática de placas vulneráveis, existem 2 tipos morfológicos que representam extremos de placas ateroscleróticas coronarianas: lesões estenóticas e não-estenóticas. Por um lado, as lesões estenóticas apresentam menor núcleo lipídico, mais fibrose, calcificação, capa fibrótica espessa e menor mecanismo de remodelamento positivo, sendo portanto, mais estáveis. No entanto, lesões não-estenóticas são instáveis, apresentando maior núcleo lipídico, capa fibrosa fina e maior remodelamento positivo, podendo ser subestimado

quanto ao tamanho da lesão por imagens de angiografia, com maior risco de ruptura e trombose (figura 3). Por isso que o diagnóstico de risco de susceptibilidade à ruptura de lesões ateroscleróticas instáveis baseado apenas na visualização de estenose não é seguro suficiente para prevenção de eventos fatais como o infarto do miocárdio, sendo uma das grandes dificuldades nos métodos diagnósticos atuais para a identificação de placas instáveis (LIBBY; DICARLI; WEISSLEDER, 2010).

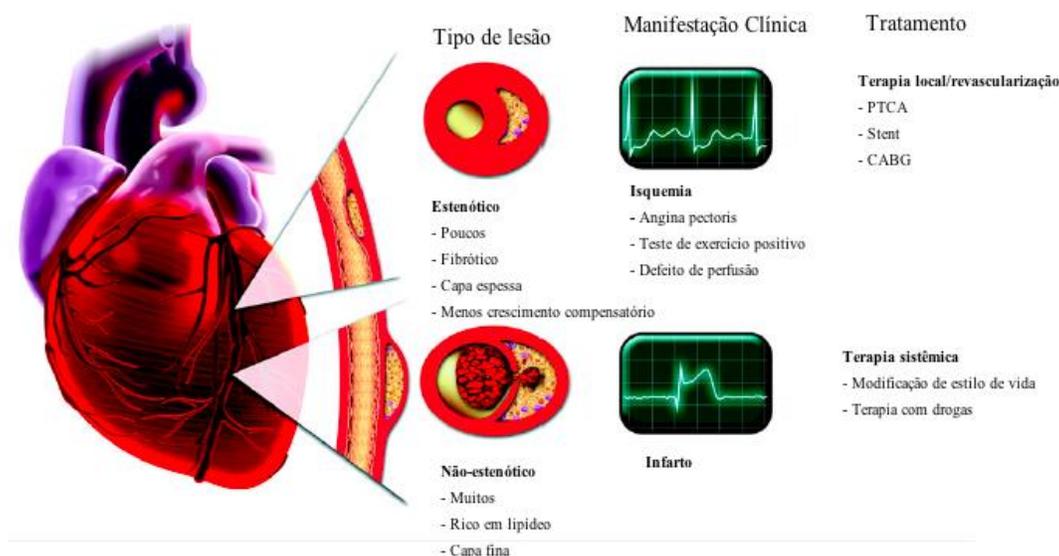


Figura 3. Esquema representando dois tipos de lesão aterosclerótica com suas características, sintomas e manejo do tratamento. As tradicionais modalidades de imagem para diagnóstico de risco somente detectam lesões estenóticas que não revelam o verdadeiro risco de ruptura de placa, um perigoso evento clínico que provoca angina instável ou infarto agudo do miocárdio. Figura modificada da referência (LIBBY; DICARLI; WEISSLEDER, 2010). PTCA = *percutaneous transluminal coronary angioplasty*; CABG = *coronary artery bypass graft*.

1.4. Papel da LDL(-) na aterogênese

Em 1988, foi descrita pela primeira vez uma subfração da LDL encontrada no plasma, a LDL eletronegativa [LDL(-)], com maior carga elétrica negativa em comparação com a LDL nativa (LDL_n) (AVOGARO; BON; CAZZOLATO, 1988). Os níveis de LDL(-) presentes no plasma podem ser de 0,1 a 5% da concentração de LDL total em normocolesterolêmicos, podendo variar muito mediante diversas condições (URSINI et al., 2002) como hipercolesterolemia familiar (BENÍTEZ et al., 2003; SÁNCHEZ-QUESADA et al., 1999, 2002, 2003), diabetes tipo 2 (BENÍTEZ et al., 2007; MORO et al., 1998), uremia (ZIOUZENKOVA; SEVANIAN, 2000), doença renal crônica associada à

hemodiálise (LOBO et al., 2011, 2012; MAFRA et al., 2009; ZIOUZENKOVA et al., 1999), síndrome coronariana aguda (OLIVEIRA et al., 2006) e após exercícios físicos intensos (BENÍTEZ et al., 2002). A LDL(-) apresenta algumas características específicas como maior conteúdo de ácidos graxos não-esterificados (NEFA) (BENÍTEZ et al., 2002), maior atividade da acetilhidrolase do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) (BENÍTEZ et al., 2003) e de fosfolipase C (LPC) (BANCELLS et al., 2008), maior susceptibilidade à agregação (SÁNCHEZ-QUESADA et al., 2003), maior afinidade a proteoglicanos (BANCELLS et al., 2009), e menor ligação ao receptor de LDL (BENÍTEZ et al., 2004b).

Células endoteliais de cordão umbilical humano (HUVEC - *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), quando estimuladas por LDL(-), além de apresentar citotoxicidade (DEMUTH et al., 1996), produzem citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento como IL-8, MCP-1, oncogene relacionado ao crescimento (GRO), fator estimulante de colônia de monócito-granulócito (GM-CSF) que atuam em vários estágios do desenvolvimento da aterosclerose como recrutamento leucocitário, proliferação e indução celular de um estado sistêmico pró-inflamatório (BENÍTEZ et al., 2006). Em células endoteliais de artéria humana (HAEC - *Human Aortic Endothelial cells*), além da liberação das citocinas encontradas em HUVEC, a LDL(-) foi capaz de liberar o fator PDGF- β (DE CASTELLARNAU et al., 2007). Em 2012, um estudo demonstrou que os níveis de LDL(-) estão associados à doença arterial coronariana (CAD), porém a ausência de correlação com os níveis de LDL total sugere que o papel pró-aterogênico da LDL possa ser mediado preferencialmente por uma de suas frações (NICCOLI et al., 2012).

A mudança na composição lipídica da partícula afeta a conformação da apoB e consequentemente, a ligação ao receptor B/E (SÁNCHEZ-QUESADA et al., 2003). A ligação da LDL nativa ao seu receptor é mediada pelos resíduos de lisina positivamente carregados na apoB que possuem afinidade por resíduos de cisteína de carga negativa no domínio de ligação do receptor, o que provavelmente é prejudicado pela eletronegatividade e o baixo número de resíduos de lisina acessíveis na superfície da LDL(-) (BENÍTEZ et al., 2004a). A menor afinidade da LDL(-) pelo receptor B/E aumenta o seu período de permanência na circulação, que consequentemente, continua induzindo respostas inflamatórias que contribuem com a progressão da aterosclerose. Quando as partículas de LDL tornam-se mais modificadas, estas são rapidamente removidas por receptores

scavenger do sistema retículo-endotelial. No entanto, no espaço subendotelial, partículas como LDL(-) provavelmente tornam-se massivamente oxidadas pela ação de enzimas pró-oxidantes liberadas no local por células do sistema imune como macrófagos (PARASASSI et al., 2001). Apesar de não ser reconhecida pelos receptores *scavenger*, a LDL(-) pode aumentar o número de células espumosas por induzir a expressão de CD36 por macrófagos, receptor que reconhece e endocita LDL oxidada (LDLox) (PEDROSA et al., 2010). Mais recentemente, em monócitos humanos, foi encontrado que a via de entrada intracelular da LDL(-) ocorre através do receptor TLR4 e seu co-receptor CD14 (ESTRUCH et al., 2013), também sendo capaz de induzir a ativação do inflamassoma via NLRP3 como estímulo primário e pela liberação de IL-1 β em monócitos/macrófagos humanos (ESTRUCH et al., 2015).

A retenção da LDL nativa no espaço subintimal acontece devido à ligação entre resíduos positivamente carregados da apoB-100 e os grupos carboxil e sulfato carregados negativamente nas cadeias glicosaminoglicanas de proteoglicanos da matriz (CAMEJO et al., 1988; CARDIN; WEINTRAUB, 1989; IVERIUS, 1972; WEISGRABER; RALL, 1987). No entanto, a LDL(-) apresenta maior ligação aos proteoglicanos da matriz extracelular na região intimal, comparada à LDL nativa, pelo aumento na agregação da partícula, o que pode forçar a conformação da apoB-100 a expor regiões carregadas positivamente que estabeleçam um novo sítio de ligação aos proteoglicanos (BANCELLS et al., 2009).

LDL(-) induz uma resposta da imunidade adaptativa, através da produção de auto-anticorpos anti-LDL(-) (FAULIN et al., 2012; SANTO FAULIN et al., 2008b). LDL(-) e anticorpos anti-LDL(-) também já foram encontrados em amostras de plasma e lesões ateroscleróticas humanas e de coelhos (DAMASCENO et al., 2006) e já foram correlacionados com doenças como diabetes mellitus tipo 2 (APOLINARIO et al., 2006) e síndrome coronariana aguda (OLIVEIRA et al., 2006). Além disso, imunização passiva de camundongos LDLR^{-/-} hipercolesterolêmicos com anticorpos anti-LDL(-) conferiu ateroproteção à esses animais (GROSSO et al., 2008). Esses dados sugerem que auto-anticorpos anti-LDL(-) podem ser importantes biomarcadores auxiliando na avaliação de risco cardiovascular.

1.5. Peptídeos mimotopos: mimetização de epítomos

A técnica de phage display tem sido utilizada como ferramenta para mapeamento de epítomos reconhecidos por uma ampla variedade de anticorpos, a fim de se identificar a região específica do alvo molecular. Pensando na interação antígeno-anticorpo, inúmeras indústrias farmacêuticas utilizam deste conceito para produção de biofármacos. A possibilidade de se utilizar apenas a porção ligante ao alvo, ao invés da proteína inteira, representa uma vantagem em relação à sua produção, armazenamento e segurança como, por exemplo, respostas imunes indesejadas, podendo apresentar aplicações na área biológica como a produção de vacinas e de reagentes diagnósticos (MELOEN; PUIJK; SLOOTSTRA, 2000). Particularmente, peptídeos apresentam considerável expectativa como substitutos de baixo peso molecular de antígenos naturais (MONZAVI-KARBASSI et al., 2002). Estes peptídeos são considerados mimotopos, pois são capazes de mimetizar o epítomo reconhecido pelo anticorpo correspondente, seja na sequência linear ou na estrutura conformacional, sendo muitas vezes avaliado como imunógeno.

Devido à grande importância da LDL(-) no desenvolvimento da aterosclerose e do seu papel na perpetuação da inflamação nesta doença, surgiu uma preocupação com relação à pesquisa de novos métodos diagnósticos que possam medir os níveis de LDL(-), permitindo, desta forma, avaliar as associações entre os níveis de LDL(-) e o risco cardiovascular. Esta linha de raciocínio estimulou o desenvolvimento e produção de anticorpos monoclonais anti-LDL(-) através da imunização de camundongos Balb/c com LDL(-), gerando os anticorpos 1A3 e 2C7 (ABDALLA; APOLINÁRIO; DAMASCENO, 2004). Esses anticorpos permitiram o desenvolvimento da técnica de ELISA para detecção de LDL(-), seus auto-anticorpos e imunocomplexos a partir de amostras de plasma humano (FAULIN et al., 2012; SANTO FAULIN et al., 2008b). Apesar de que foi comprovado que estes anticorpos não reconhecem a LDL nativa, a que não apresenta nenhuma modificação, e sim apenas a LDL(-), seria necessário identificar as regiões reconhecidas por estes anticorpos a fim de melhorar o entendimento com relação ao tipo de modificação da LDL(-) que é reconhecido por esses anticorpos. Então, a partir desses dois anticorpos monoclonais, os epítomos de LDL(-) foram mapeados pela técnica de phage display utilizando bibliotecas de peptídeos com sequências aleatórias (MICHALOSKI et al., 2016), em colaboração com o Prof. Dr Ricardo José Giordano do Departamento de Bioquímica do

Instituto de Química da Universidade de São Paulo (número de patente BR1020130106313).

Phage display é um eficiente sistema de seleção de proteínas e peptídeos específicos a um alvo obtidos a partir de um grande número de candidatos, onde um vírus filamentosos infecta a bactéria *Escherichia coli*. O DNA contendo a sequência exógena é inserido dentro da região codificadora da proteína do capsídeo no genoma do vírus, consequentemente sendo apresentada sobre a superfície da partícula viral e, portanto, podendo interagir com diversos alvos moleculares (MATSUBARA, 2012). Nesta seleção, foram utilizadas uma biblioteca de fagos que apresentavam peptídeos com 6 aminoácidos na forma linear e uma outra biblioteca com peptídeos cíclicos de 8 aminoácidos que se fecham com uma ponte dissulfeto formada através da interação entre 2 cisteínas adicionais presentes nas regiões C e N-terminal do peptídeo. O método era semelhante ao ELISA, onde os anticorpos monoclonais foram adsorvidos em uma placa, permitindo-se a interação com os peptídeos aleatórios apresentados pelos fagos. Os fagos que se ligavam no primeiro ciclo, eram selecionados para interagir novamente com os anticorpos adsorvidos, selecionando assim os peptídeos que apresentassem maior força de ligação. Estes ciclos de seleção foram repetidos por mais duas vezes, selecionando-se ao final apenas dois peptídeos circulares, um correspondente ao anticorpo 1A3 e outro ao 2C7, denominados P1A3 e P2C7 (informação verbal)¹.

A estratégia de mapeamento de epítipo pode identificar peptídeos que apresentam sequências de aminoácidos que estão próximos na estrutura conformacional, mas distantes na sequência linear, como ocorrem nos peptídeos cíclicos. A forma cíclica restringe as possibilidades conformacionais que os peptídeos possam assumir, o que os força a apresentar uma estrutura terciária, que não acontece com os peptídeos lineares que possuem uma ampla gama de conformações. Por isso, os peptídeos cíclicos apresentam uma estrutura mais uniforme do que os lineares, tornando-os mais adequados para mapeamento de epítipos (DENISOVA; DENISOV; BRAMSON, 2010). Em nossos estudos preliminares, o peptídeo P2C7 foi localizado em corte de lesão aterosclerótica humana, utilizando-se o anticorpo monoclonal 2C7 na análise imunohistoquímica (figura 4).

¹ FAULIN et al. Identification of electronegative LDL-related peptides and their effects on macrophages. 2017. Dados em fase de publicação.

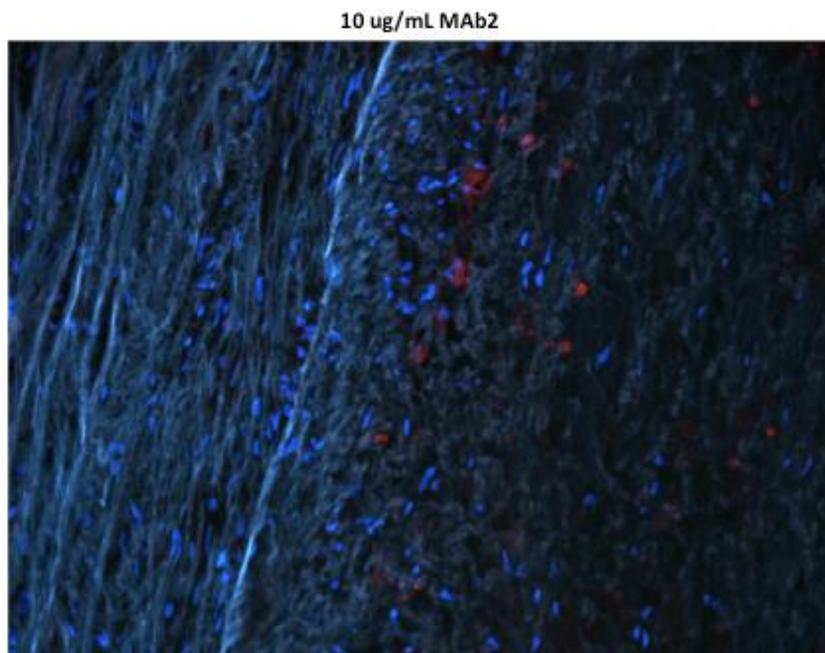


Figura 4. Localização do peptídeo P2C7 em lesão aterosclerótica humana. A imunohistoquímica foi realizada com o anticorpo monoclonal 2C7 e anti-IgG de camundongo marcado com o corante fluorescente Dylight 594 (vermelho). Em azul observa-se o DNA celular marcado com o corante fluorescente DAPI (dados não publicados).

Teoricamente, peptídeos são rapidamente removidos da circulação, dessa forma, melhorando a localização do alvo (placa aterosclerótica) com baixa intensidade do sinal de fundo (sangue) nos estudos de imagem (ELKHAWAD; RUDD, 2009). Hardoff et al. (1993) foi o primeiro grupo a utilizar peptídeos da porção apoB da LDL com radiomarcagem para estudos de aterosclerose experimental, demonstrando significativa captação na região da lesão.

1.6. Peptídeos como agentes de imagem

Inúmeras tecnologias recentes que emergiram na área de imagem molecular possuem o objetivo de produzir novas sondas de imagem. Dentro dessa área, os peptídeos se destacam imensamente por sua alta especificidade e afinidade, e rápida remoção da circulação. Peptídeos de alta afinidade a receptores celulares, principalmente com maior expressão em células tumorais, apresentam rápida ligação específica às células alvo, enquanto possuem menor tempo de retenção em tecidos não alvos (OKARVI, 2004). Além disso, a interação entre peptídeo e receptor celular podem induzir a sua internalização na

célula, desta forma melhorando a captação do radiofármaco dentro do tecido alvo e possivelmente sua imagem.

Com o objetivo de se obter imagens nucleares, peptídeos têm sido marcados com radionuclídeos como ^{99m}Tc , para imagens SPECT, e com ^{18}F , ^{68}Ga e ^{64}Cu para imagens PET em diferentes estratégias. Uma delas consiste no uso de quelantes que mediante condições específicas conseguem se ligar à radiometais de forma estável, além de serem métodos extremamente simples em termos de radiomarcção. ^{99m}Tc possui meia-vida de 6h, decai 100% por transição isomérica, e emite energia de 140 keV; ^{18}F possui meia-vida de 109,8 min; decai 97% por emissão de β^+ e 3% por captura eletrônica e emite energia de 635 keV; ^{68}Ga possui 67,7 min de meia-vida, decai 90% por emissão de β^+ e 10% por captura eletrônica, emitindo energia de 1900 keV; já ^{64}Cu possui meia-vida de 12,7 h, decai 18% por emissão de β^+ , 37% por emissão de β^- e 45% por captura eletrônica, emitindo energia de 655 keV (KAZUMA et al., 2015).

A bioconjugação de peptídeos com agentes quelantes (1,4,7,10-tetrazaciclododecano-1,4,7,10-ácido tetraacético – DOTA; 1,4,7-triazaciclono-nano-1,4,7-ácido triacético – NOTA; ácido hidrazinonicotínico – HYNIC) por meio de inserção de espaçadores e a derivatização com nanopartículas, além de possuírem a capacidade de permanecerem estáveis mesmo em condições às vezes extremas de marcação com radioisótopos, os tornam excelentes agentes de imagem. A propriedade quelante do agente DOTA utiliza suas 4 funções carboxílicas para coordenar quimicamente o radiometal em seu interior. Uma destas funções carboxílicas geralmente é ocupada com uma ligação com um grupamento amino do peptídeo ou espaçador. Além disso, quelantes DOTA conjugados a aminoácidos como fenil-alanina e lisina são produtos de quebra e apresentam pouca difusão celular, o que aumentaria o seu tempo de retenção intracelular, direcionando o seu uso para peptídeos com propostas de internalização celular (ALOJ; MORELLI, 2004). A estrutura química de NOTA resulta em complexos estáveis termodinamicamente, onde todos os grupos de nitrogênio e carboxílicos dos ligante permanecem envolvidos na formação do complexo (N_3O_3), com uma rápida cinética de complexação na incorporação do radiometal, o que é extremamente importante no caso de radioisótopos emissores de pósitrons com meia-vidas curtas (ANDRÉ et al., 1998; LIU et al., 2009; VELIKYAN; MAECKE; LANGSTROM, 2008). Já HYNIC consegue coordenar um metal em sua

estrutura química utilizando apenas dois de seus grupos doadores (hidrogênios piridil e hidrazina), restam outros grupos doadores que precisam de um co-ligante para se completar os outros grupos da esfera de coordenação. O uso de um co-ligante é vantajoso pois permite maior versatilidade na aplicação deste sistema bifuncional, e dentre os co-ligantes mais comuns está a tricina (MESZAROS et al., 2010).

A sequência de aminoácidos de um peptídeo fornece informações sobre sua solubilidade (hidrofobicidade e hidrofiliidade), polaridade, carga elétrica, as quais são importantes para determinar o método de radiomarcagem e qual radionuclídeo a ser utilizado. Peptídeos naturalmente são degradados enzimaticamente por peptidases, e sua estabilidade pode ser melhorada por meio da introdução de D-aminoácidos não naturais, incorporação de aminoácidos hidrofílicos ou hidrofóbicos, ou mesmo através de ciclização (LEE; XIE; CHEN, 2010). Outras características determinam a forma de excreção do radiofármaco, como o aumento da lipofiliidade resulta em rápida remoção pelo fígado, enquanto que maior hidrofiliidade aumenta a remoção pelos rins.

O uso da nanobiotecnologia para aplicações médicas tem crescido fortemente nos últimos anos, inclusive no estudo da aterosclerose. A observação de processos fisiológicos por meio de interações manipuladas em nível molecular fornecem conhecimentos únicos de uma disfunção em um determinado organismo, o que pode ser observado com o advento das nanopartículas como agentes de imagem, permitindo acesso aos dados de especificidade, perfis farmacocinéticos, biodistribuição e eficácia terapêutica (MULDER et al., 2009). A possibilidade de se ligar anticorpos, proteínas, peptídeos ou outros ligantes à superfície de uma nanopartícula pode direcioná-la para um único ou múltiplos sítios que estão presentes sobre uma placa aterosclerótica, devido à sua variedade de componentes celulares e não celulares como a matriz extracelular e lipídeos (LOBATTO; FUSTER, 2011).

Certas características das nanopartículas, tais como multi-funcionalidade, multi-valência e a capacidade de transportar diversos compostos as tornam alvo de muita pesquisa. As nanopartículas podem produzir alta intensidade de sinal em relação ao sinal de fundo, o que contribui para reduzir o contraste das imagens, permitindo a formação de múltiplas modalidades como agentes de contraste simultaneamente ao carregamento de uma molécula terapêutica (CHOI; FRANGIONI, 2010). Parâmetros importantes para a

funcionalidade dessas nanopartículas são meia-vida na circulação, captação e ligação inespecífica baixas, eliminação efetiva do organismo e pouca ou nenhuma toxicidade (CHOI; FRANGIONI, 2010).

1.7. Uso de métodos de diagnóstico por imagem na aterosclerose

Um grande desafio na área cardiológica é identificar adequadamente pacientes de maior risco de ocorrência de eventos cardiovasculares agudos. Neste contexto, o uso integrado e racional das diversas ferramentas diagnósticas, como os métodos invasivos angiografia por ultrassom, ultrassonografia intravascular (*intravascular ultrasound* - IVUS), e os métodos não invasivos tomografia computadorizada (*computed tomography* - CT), ressonância magnética (*magnetic resonance imaging* - MRI), tomografia por emissão de pósitrons (*positron emission tomography* - PET), tomografia de emissão de fóton único (*single-photon emission computed tomography* - SPECT), nos permite alcançar esse objetivo (LUSIS, 2000; SCHOENHAGEN; TUZCU, 2008). Os métodos invasivos fornecem imagens de alta resolução da lesão aterosclerótica com dados valiosos da morfologia, no entanto, a baixa sensibilidade requer a injeção de agentes de contraste. Já os métodos não invasivos como PET e SPECT permitem a aquisição de imagens altamente sensíveis a ponto de serem quantificáveis enquanto a baixa resolução requer o seu co-registro com outros métodos como CT e MRI (KAZUMA et al., 2015).

A imagem molecular é uma modalidade que tem sido amplamente empregada na área biomédica, principalmente em pesquisas com o foco no diagnóstico precoce e progressão de doenças como câncer e desordens neurodegenerativas que, devido à fragilidade dos portadores destas doenças, tornou necessária a visualização de eventos moleculares de modo não-invasivo, monitorando-se a progressão da doença repetidamente e continuamente (NOLTING et al., 2012). Atualmente, modalidades tradicionais de análise de imagem de placas ateroscleróticas são capazes de informar apenas sobre as características anatômicas e o estreitamento luminal, limitando os dados sobre vulnerabilidade e risco de ruptura da placa. Apenas o reconhecimento da estenose não é um fator preditivo para riscos de eventos vasculares, por isso é importante avaliar novas estratégias de diagnóstico precoce para detectar sítios de inflamação arterial para prevenção ou auxílio no tratamento da doença (NAHRENDORF et al., 2009). Além disso, um método

de imagem que permita a avaliação sistêmica da condição do paciente pode identificar eventos agudos em múltiplas placas de ateroma (JOSHI et al., 2011).

A expectativa para obtenção de imagens que demonstrem a real condição da placa aterosclerótica é de que uma molécula radiomarcada com isótopos radioativos, mais conhecida como radiofármaco, possa identificar processos celulares ou moleculares que se co-localizam no interior da placa (ELKHAWAD; RUDD, 2009). Diversos processos moleculares podem ser identificados por seus alvos biológicos por agentes de imagem na aterosclerose (tabela 1).

Tabela 1. Alvos de imagem funcional em aterosclerose.

Alvo	Exemplos
Ativação endotelial	Moléculas de adesão, moléculas de histocompatibilidade de classe II
Acúmulo e ativação celular	Leucócitos do sangue (principalmente monócitos), células musculares lisa
Visualização de mediadores inflamatórios	Fractalcinas, receptores de quimiocina
Atividade metabólica de células dentro da placa aterosclerótica	Transporte de glicose
Apoptose dentro da placa aterosclerótica	Fosfatidilserina
Atividade procoagulante da placa	Fator tissular, fator XIII
Enzimas proteolíticas	Catepsina K, metaloproteinase de matriz: gelatinases e colagenases
Espécies reativas de oxigênio	Ânion superóxido (O ₂ ⁻), ácido hipocloroso
Marcadores de angiogênese	$\alpha_v\beta_3$ Integrina

Fonte: LIBBY; DICARLI; WEISSLEDER (2010).

1.7.1. Tomografia de emissão de pósitrons (PET)

A tomografia por emissão de pósitrons, ou PET, é um mapa da distribuição de um radiofármaco emissor de pósitrons em uma determinada parte do corpo (figura 5). Essa técnica consiste na injeção de uma substância radioativa (radiotraçadores, os quais possuem afinidade por um tipo de célula ou metabolismo celular) e posteriormente na obtenção das imagens de sua distribuição (LOBATTO; FUSTER, 2011). Os radioisótopos possuem átomos com radionuclídeos que sofrem um decaimento radioativo, emitindo um pósitron.

O fenômeno de emissão de pósitron (partícula anti-matéria para um elétron), ocorre quando o isótopo instável perde parte da sua carga positiva, transformando o átomo em uma forma atômica mais estável. No momento em que um pósitron é emitido, este se move

por uma pequena distância, ditada pela quantidade de energia que a partícula emitiu a partir de sua origem e encontra um elétron. Quando isso ocorre, as duas partículas se destroem uma à outra em um processo denominado aniquilação, convertendo a massa total de ambos, pósitron e elétron, na forma de 2 fótons de 511 kiloeletrons Volt (keV) que se direcionam em direções opostas, distanciando-se em 180 graus um do outro e são captados por pares de detectores (NOLTING et al., 2012). Após a captação de determinado número de eventos de decaimento, um programa de computador transforma a informação obtida dentro de imagens, onde a cor de cada pixel representa a concentração de radioatividade (SÖRENSEN, 2012).

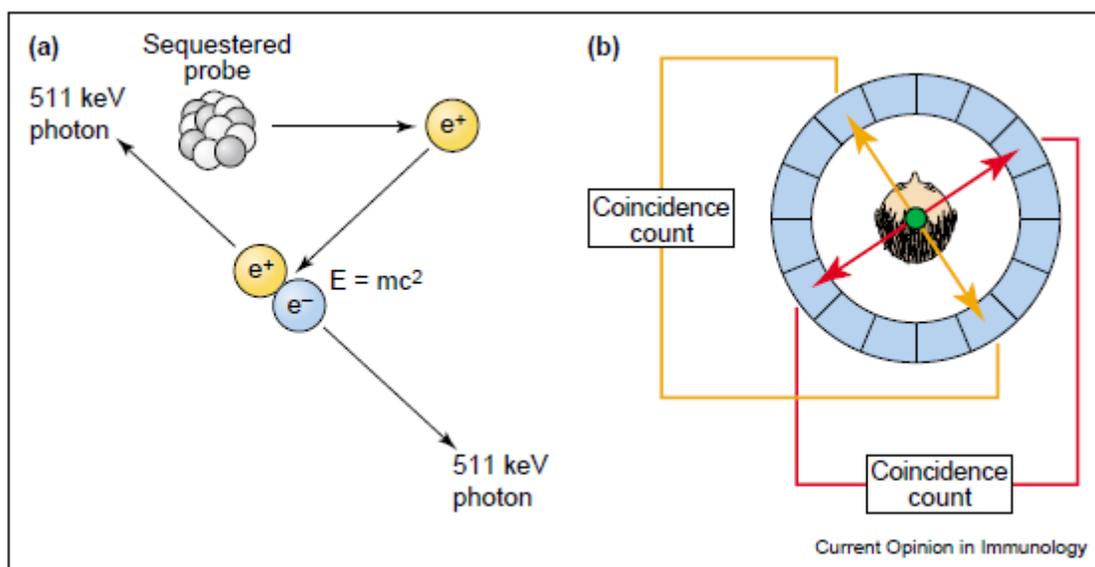


Figura 5. Imagem por tomografia por emissão de pósitron. Um ligante para um alvo molecular marcado com um radioisótopo emissor de pósitron é injetado na circulação. Esta sonda radiomarcada se distribui pela vasculatura, ganhando acesso aos tecidos e células. A: Pósitrons emitidos a partir da sonda colidem com elétrons, resultando na aniquilação do pósitron e elétron, e suas massas são convertidas em 2 fótons de 511 keV, de acordo com a relação $E=mc^2$ (A). Os dois fótons que atingem os detectores opostos em tempos quase idênticos são registrados como um evento coincidente (B). Existem muitas combinações de pares de detectores que registram os eventos; a intersecção dos vetores que demonstram estes eventos coincidentes define a localização espacial da origem das emissões (HERSCHMAN, 2003).

Scanners PET utilizam pares de detectores para medir a interação dos fótons de 511 keV. Os pares de detectores estão normalmente dispostos em formas aproximadamente de um círculo em 2D e de um cilindro em 3D, com a linha que os conecta chamada de linha de resposta, onde de 0 a 100 eventos são capturados e transformados em uma imagem que representa parte do objeto no plano do círculo detector por meio de algoritmos matemáticos

de reconstrução de imagem tomográfica (HUTCHINS et al., 2008). Os dados coletados em diversos ângulos, ao longo do eixo do corpo do paciente, são utilizados para reconstruir as imagens nas projeções axial, lateral e coronal da distribuição da atividade da área de interesse (DIAS, 2005).

Em geral, os fótons não são emitidos em ângulos exatos de 180° e este desvio prejudica o desenho do sistema. Por isso, ambos os fótons precisam ser detectados em coincidência, ou seja, devem estar dentro de um período de tempo pré-determinado chamado janela de tempo de coincidência, onde são enquadrados o depósito de energia dos fótons e uma linha de resposta com um ângulo aceitável para minimizar a detecção de imagens embaçadas que não demonstram a origem da aniquilação (KLAUSEN et al., 2012). Outros fatores que limitam a resolução são principalmente variação do pósitron, atenuação e outros eventos randômicos (KAGADIS et al., 2010). Considerando isto, os melhores detectores PET são os mais rápidos que reduzem a janela de tempo de coincidência e a taxa de eventos randômicos e, portanto, melhoram a precisão do evento localizado na linha de resposta (TOWNSEND, 2008).

PET apresenta similaridades com a técnica de SPECT, pois ambas utilizam a injeção de um radiofármaco e a detecção de fóton. O equipamento SPECT detecta fótons γ utilizando uma gama câmera e um colimador de chumbo ou tungstênio que seleciona fisicamente os fótons definindo o ângulo de incidência dos raios γ . No entanto, a aquisição de projeção de dados é mais eficiente na tecnologia PET uma vez que este coleta dados em todas as projeções simultaneamente, a câmera do sistema SPECT precisa se locomover para coletar os dados a partir de cada um dos ângulos de projeção, aumentando a sensibilidade do PET (KAGADIS et al., 2010).

1.7.2. Radiotraçadores utilizados em imagem molecular de aterosclerose

Os radioisótopos utilizados para esta técnica emitem pósitrons com energia baixa, taxa de emissão alta e possuem meia-vida curta. As substâncias marcadas pelos radioisótopos incluem substratos do metabolismo celular, fármacos, anticorpos, neurotransmissores e outras moléculas biologicamente ativas.

Existem alguns radiotraçadores que estão sendo avaliados atualmente para imagem molecular de aterosclerose, muitos ainda em fase pré-clínica, que conseguem identificar

processos biológicos específicos encontrados na patofisiologia da aterosclerose, de forma que quando traduzidos para a imagem clínica, possam quantificar o processo identificado dentro da lesão para futura estratificação de risco do paciente, direcionamento e acompanhamento do tratamento.

Fluordesoxiglicose (FDG) é um análogo de glicose que é intensamente captado e acumulado por células metabolicamente ativas como células inflamatórias (ROSS, 1999). Uma vez dentro da célula através dos transportadores de glicose, o FDG é metabolizado pela hexoquinase para FDG-6-fosfato, e se acumula nesse formato porque, ao contrário da glicose-6-fosfato, não é futuramente metabolizado (GALLINO et al., 2012). Este radiotraçador é o mais amplamente utilizado, principalmente na área de oncologia (ROHREN; TURKINGTON; COLEMAN, 2004). Vários estudos têm correlacionado os sinais obtidos com ^{18}F -FDG por PET com número de células inflamatórias encontradas na lesão aterosclerótica (FAYAD et al., 2011; MATTER et al., 2006a; RUDD et al., 2002). Entretanto, o consumo de radioatividade pelas células de tecido circundante às placas vulneráveis, incluindo as células sanguíneas, impede a visualização das placas. Por isso, a avaliação da sua real utilidade para a imagem de placas vulneráveis requer mais estudos com relação à fatores biológicos da captação de ^{18}F -FDG por lesões ateroscleróticas (OGAWA et al., 2004; RUDD; FAYAD, 2008).

Além de ^{18}F -FDG, existem outros radiotraçadores de inflamação sendo avaliados em imagens de aterosclerose, como ^{68}Ga -DOTATATO e $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ -colina. A colina sendo um componente estrutural da formação e sinalização celular das membranas, é incorporada nas membranas de macrófagos ativadas, demonstrando seu acúmulo em regiões de lesões ateroscleróticas (LAITINEN et al., 2010; MATTER et al., 2006b). ^{68}Ga -DOTATATO possui alta afinidade por receptores de somatostatina, os quais apresentam expressão aumentada também em macrófagos e tem apresentado maior captação em regiões de artérias, sendo correlacionados com ocorrência de eventos cardiovasculares (ROMINGER et al., 2010).

O RGD é um marcador peptídico que se liga com alta especificidade à $\alpha_v\beta_3$ integrina, uma glicoproteína de superfície celular altamente expressa durante a neoangiogênese. Nas lesões ateroscleróticas, os macrófagos e células endoteliais ativadas podem expressar níveis elevados de alfa beta integrina. Portanto, a radiomarcagem de RGD

fornece um marcador potencial da inflamação e da neoangiogênese em lesões ateroscleróticas avançadas (LAITINEN et al., 2009).

O Fluoromisonidazol (*Fluoromisonadazole* - FMISO) tem uma estrutura química de 1-(2-nitro-1-imidazolil)-3-fluoro-2-propranol e é um derivado do grupo nitroimidazol, que tem sido investigado como sensibilizador de células hipóxicas. Em doses não farmacológicas o FMISO foi marcado com ^{18}F para identificar tecidos hipóxicos através de imagem PET (LEE; SCOTT, 2007). O radiotraçador ^{18}F -FMISO entra nas células por difusão passiva, onde é reduzido por nitro-redutases e fica retido em células de tecidos com baixa concentração de oxigênio. Em células saudáveis, as quais são normalmente oxigenadas, o ^{18}F -FMISO é rapidamente regenerado por reoxidação e os metabólitos não se acumulam. No entanto, em células hipóxicas, a baixa pressão parcial de oxigênio impede a reoxidação dos metabólitos ^{18}F -FMISO, resultando em seu acúmulo em células hipóxicas. Estudos pré-clínicos (MATEO et al., 2014) e clínicos (JOSHI et al., 2013) tem avaliado a eficácia de ^{18}F -FMISO para a localização de hipóxia em lesões ateroscleróticas.

A microcalcificação é um processo que ocorre somente em lesões em estágio avançado e em humanos e pode ser monitorada utilizando ^{18}F -NaF como radiotraçador PET. Este é incorporado pela hidroxiapatita durante osteogênese e é altamente captado por tumores ósseos (TARKIN et al., 2015). ^{18}F -NaF foi estudado para identificação de microcalcificação em lesões encontradas em pacientes que sofreram infarto do miocárdio (JOSHI et al., 2014).

Com o objetivo de analisar a possibilidade de radiomarcagem dos peptídeos P1A3 e P2C7 foi inserido um espaçador com um aminoácido de lisina livre para permitir a bioconjugação aos agentes quelantes DOTA, NOTA, HYNIC e ainda a derivatização com nanocluster de ouro.

Baseado em dados publicados anteriormente destacando o valor diagnóstico da LDL(-) e seus auto-anticorpos anti-LDL(-) e considerando que os peptídeos P1A3 e P2C7 mimetizam microdomínios da apo B-100 da LDL(-), nossa hipótese de trabalho é que os possíveis alvos desses peptídeos dentro da lesão aterosclerótica podem ser auto-anticorpos anti-LDL(-), o que poderia fornecer informações sobre a evolução da doença, enquanto que outros potenciais alvos poderiam ser identificados pela interação com células predominantes na lesão como os macrófagos. Considerando: 1º - o envolvimento da LDL(-)

) na progressão da aterosclerose como um estímulo pró-inflamatório contínuo e 2º - o reconhecimento dos peptídeos P1A3 e P2C7 por anticorpos anti-LDL(-) ou a possível interação com macrófagos localizados na lesão aterosclerótica, neste trabalho investigou-se o uso desses peptídeos mimotopos de LDL(-) como radiotraçadores PET para visualização e monitoramento de lesões ateroscleróticas em modelos murinos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo principal

Utilizar os peptídeos mimótopos de LDL(-), P1A3 e P2C7, isotopicamente marcados como radiotraçadores para imageamento de lesões ateroscleróticas em murinos utilizando tomografia de emissão de pósitrons.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Padronizar métodos de radiomarcção dos peptídeos mimótopos de LDL(-) P1A3 e P2C7 com os radionuclídeos ^{68}Ga , ^{64}Cu , $^{99\text{m}}\text{Tc}$;
- ✓ Avaliar a biodistribuição desses radiotraçadores;
- ✓ Comparar imagens PET obtidas com radiotraçador baseado em nanopartícula de ouro funcionalizada ou não com P1A3;
- ✓ Avaliar imagens PET utilizando os radiotraçadores P1A3 e/ou P2C7 para semi-quantificação da captação nas lesões ateroscleróticas ;
- ✓ Avaliar a interação dos peptídeos mimótopos com possíveis alvos de ligação na lesão aterosclerótica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Células

Linhagem RAW 264.7 são macrófagos derivados de células leucêmicas de monócitos e macrófagos de camundongo descritas por Raschke et al (1978). Esta linhagem foi adquirida pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (código 0212) e utilizada para avaliação do efeito dos peptídeos. Células endotélias de artéria humana (*human aortic endothelial cell* - HAEC) foram adquiridas da Thermo Fisher Scientific (código C0065C). Fibroblastos da linhagem L-929 também foram adquiridos do Banco de Células do Rio de Janeiro (código 0188) e como são capazes de secretar para o meio de cultura os fatores de crescimento macrophage colony-stimulating factor e granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (M-CSF e GM-CSF, respectivamente), foram utilizadas para obtenção do meio condicionado de diferenciação dos monócitos em macrófagos primários.

3.2. Animais

Macrófagos diferenciados de culturas primárias foram obtidas a partir de extração de células da medula óssea de camundongos knockout para o gene do receptor da LDL (LDLR^{-/-}), machos, com aproximadamente 60 dias de idade.

Camundongos LDLR^{-/-} foram utilizados para biodistribuição e aquisição de imagens PET/CT e SPECT/CT com radiotraçadores de peptídeos marcados com ⁶⁸Ga e ^{99m}Tc e foram fornecidos pelo biotério do Conjunto das Químicas. Todos os estudos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Para desenvolvimento da aterosclerose, os animais foram tratados com uma dieta hipercolesterolêmica, produzida pela empresa Rhoster (tabela 2).

Camundongos knockout para o gene da apolipoproteína E (ApoE^{-/-}) e camundongos C57Bl/6N foram adquiridos de Taconic e Charles River Laboratories, respectivamente, e foram utilizados para aquisição de imagens PET/CT injetados com radiotraçadores marcados com ⁶⁴Cu. Camundongos CD-1 (Charles River Laboratories) foram utilizados apenas para estudos de biodistribuição de radiotraçadores marcados com ⁶⁴Cu. Os camundongos ApoE^{-/-} também foram tratados com uma dieta hipercolesterolêmica,

comercializada por Harlan laboratories (tabela 3). Os camundongos Apoe^{-/-}, C57Bl/6N e CD-1 foram mantidos no biotério da Washington University in St Louis e os estudos foram previamente aprovados pelo Comitê de Estudos Animais da mesma universidade.

3.3. Peptídeos

Todos os peptídeos P1A3 e P2C7 assim como seus conjugados foram sintetizados pela empresa Chinese Peptide Company com 95% de pureza e liofilizados. Os peptídeos foram ressuspensos em água (1mg/mL), aliquotados e armazenados a -20°C. Os conjugados incluem os peptídeos sintetizados com espaçadores peptídicos (uma sequência de 3 aminoácidos de glicina e um de serina repetidos por 3 vezes com um aminoácido de lisina na extremidade para ligação ao quelante). DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético) para marcação com ⁶⁸Ga e ⁶⁴Cu, NOTA (ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético) para marcação com ¹⁸F e HYNIC (hidrazinonicotinamida) para marcação com ^{99m}Tc.

Tabela 2. Composição da dieta hipercolesterolêmica para camundongos LDLR^{-/-}.

Nutrientes	Quantidade (%)
Carboidratos (*)	52,45
Fonte protéica (**)	16,50
Lipídios (***)	20,00
Celulose	5,00
Mistura mineral(+)	3,50
Mistura vitamínica (+)	1,00
L-cistina	0,30
Bitartarato de colina	0,25
Ácido cólico	0,50
Colesterol	0,50

(*) Carboidratos = amido (56,86%), amido dextrinizado (26,34%) e sacarose (18,68%).

(**) Fonte protéica = caseína comercial (> 85% de proteína).

(***) Lipídios = gordura de coco (70,10%), óleo de soja (29,40%), mantendo a proporção dos ácidos linoleico e linolênico em 5:1 (LEE et al., 1989).

(+) Misturas mineral e vitamínica formulada segundo recomendação da AIN-93.

Tabela 3. Composição da dieta hipercolesterolêmica para camundongos Apoe^{-/-}.

Nutrientes	Quantidade (%)
Caseína	19.5
DL-Metionina	0.3
Sacarose	34.14
Amido de Milho	15.0
Gordura de leite anidro	21.0
Colesterol	0.15
Celulose	5.0
Mistura mineral, AIN-76 (170915)	3.5
Carbonato de Cálcio	0.4
Mistura vitamínica, Tekland (40060)	1.0
Etoxiquina	0.004

Peptídeos com apenas o espaçador e a lisina livre foram utilizados para acoplamento à superfície de nanoclusteres de ouro e ao fluoróforo Alexa Fluor 647. Peptídeos conjugados com fluoróforo FITC (isotiocianato de fluoresceína) também foram sintetizados pela mesma companhia para os estudos de análises de interação dos peptídeos com componentes da lesão aterosclerótica.

3.4. Isolamento de LDL(-)

O sangue obtido de voluntários normocolesterolêmicos foi coletado em tubos contendo EDTA e imediatamente centrifugado a 1500 rpm por 10 minutos e a 4°C. Ao plasma obtido foi adicionado uma solução contendo benzamidina 400mM, fluoreto de fenilmetanossulfonil (PMSF) 200mM e hidroxitolueno butilado (BHT) 4mM. Em seguida, o plasma foi submetido à ultracentrifugação sequencial para obtenção da LDL utilizando-se uma ultracentrifuga Sorvall®, modelo Ultra Pro 80, com um rotor T-1270. A LDL isolada foi dialisada contra tampão Tris-HCl pH 7,4 contendo EDTA, a 4°C e durante 4 horas com trocas sucessivas do tampão a cada hora. O isolamento da LDL (-) foi realizada por FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) utilizando coluna UNO Q-12 (BioRad®). O procedimento foi iniciado com a lavagem da coluna com 300mL do tampão B e depois equilibrada com 300mL de tampão A. A LDL foi dializada contra o tampão A, sendo então injetada na coluna. No procedimento cromatográfico estabeleceu-se num fluxo de 4mL/min em diferentes gradientes: a) 0 a 100 mL: 0% tampão B; b) 100 a 200 mL gradiente contínuo: 0 a 10% tampão B; c) 200 a 400 mL: 22% tampão B; d) 400 a 600mL: 50%

tampão B; e) 600 a 800 mL: 100% tampão B (De Castellarnau et al., 2000). A confirmação do isolamento da LDL(-) foi obtida pela migração eletroforética em gel de agarose utilizando-se kit comercial (CELMGEL®) onde foram aplicados 0,5mL de cada fração de LDL separada por FPLC utilizando como tampão de corrida Tris pH 9,5. O gel foi corado em Amido Black (Sigma®) e descorado em ácido acético 5%.

3.5. ⁶⁸Ga

Os estudos com os radionuclídeos ⁶⁸Ga e ^{99m}Tc foram realizados em colaboração com o Centro de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em colaboração com o Dr. Luis Alberto Pereira Dias, Dr. Emerson Bernardes e Dra Lorena Pozzi. Os radionuclídeos também foram produzidos e fornecidos pelo IPEN.

3.5.1. *Análise por espectrometria de massas*

As análises por espectrometria de massas foram realizadas em colaboração com o Prof. Ernani Pinto Junior, pelo especialista de laboratório Felipe Augusto Dörr do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Essas análises foram primeiramente realizadas para confirmar a integridade dos peptídeos mediante as adversas condições de marcação com ⁶⁸Ga que dependem basicamente de baixos valores de pH e altas temperaturas que podem alterar a estrutura dos peptídeos como circulares para permanecerem reconhecidos.

Primeiramente, o peptídeo DOTA-P1A3 foi injetada em uma coluna de captura C18 em CLAE. Após a captura da amostra pela coluna e dessalinização (lavagem com água ácida), o peptídeo foi eluído da coluna com uma solução de água/acetoneitrila (30:70%) para prosseguimento da análise em espectrômetro de massa. O pico coletado no CLAE com a coluna C18 foi avaliado por espectrometria de massas com ionização por electrospray no modo positivo. Após essa primeira análise, os peptídeos P1A3 e P2C7 foram submetidos às condições requeridas para radiomarkação com ⁶⁸Ga como aquecimento e baixo valor de pH e então avaliados por espectrometria de massas. Também foi avaliado se o peptídeo P1A3 seria eluído do cartucho Sep-Pak C18 (Waters) utilizado para purificação do produto marcado ao final do processo de radiomarkação, avaliando-se amostras de rejeito (solução coletada na primeira injeção), lavagem (solução de salina usada para remover componentes

inespecíficos ao C18) e da eluição com etanol absoluto (onde o peptídeo deve estar contido).

3.5.3.1. Marcação de DOTA-P1A3 manual

Cartucho Strata X-C (Phenomenex) foi previamente condicionado com 1mL de HCl 4M e 4mL de água Chellex. Após o condicionamento, o cartucho foi acoplado diretamente ao gerador de decaimento $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ com 10mL de HCl 0,1M para eluição do ^{68}Ga . Algumas alterações foram feitas para a padronização da obtenção do peptídeo radiomarcado, como demonstra a tabela 4. No entanto, basicamente, a reação de marcação foi feita com 2mL de tampão acetato 0,2M pH4,0, 800 μL de ^{68}Ga e 50 μg de peptídeo DOTA-P1A3. A reação foi aquecida a 95°C por 7 minutos. Após o aquecimento, salina foi adicionada para resfriar a reação. Em seguida, o cartucho Sep-Pak tC18 (Waters) para purificação do produto marcado foi condicionado com 5mL de etanol 50% e 5mL de salina. Então, o produto foi injetado no cartucho tC18, que em seguida foi eluído com etanol 50%.

Tabela 4. Parâmetros avaliados na padronização da radiomarcção manual com ^{68}Ga .

Atividade de ^{68}Ga (MBq)	Quantidade de peptídeo (μg)	Purificação em Sep-Pak C18	TLC (%)	HPLC (%)
555	50	Sim	97,95	*
557,2	50	Sim	83,29	*
2109	50	Não	74	*
1920,3	50	Sim	*	54,03

*Não foi realizado. As atividades mais altas eluídas do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ foram obtidas com um gerador novo adquirido pelo IPEN.

3.5.3.2. Marcação de DOTA-P1A3 no módulo automatizado

A radiomarcção no módulo foi realizada no sistema automatizado Lab-PharmTracer (Eckert & Ziegler). Neste sistema, o módulo de marcação é acoplado ao computador onde se mantêm as condições necessárias para a radiomarcção. O método utilizado foi baseado no protocolo de produção de ^{68}Ga -DOTATATO pelo Centro de Radiofarmácia do IPEN (COLTURATO et al., 2011; PUJATTI, 2012). O ^{68}Ga foi eluído do gerador em solução de HCl 0,1M e purificado em cartucho de troca catiônica com HCl 0,2M/acetona. 50 μg de peptídeo DOTA-P1A3 (19,2 ηmol) foi adicionado ao ^{68}Ga

purificado e aquecidos a 95°C por 7 minutos. Após o aquecimento, o produto foi purificado em cartucho Sep-Pak C18, eluído com etanol 50% sendo diluído em salina. As análises de pureza radioquímica foram realizadas pelas técnicas de CLAE ou CCD. A tabela 5 demonstra algumas modificações avaliadas na marcação realizada no módulo.

Tabela 5. Parâmetros modificados realizados na marcação em módulo automatizado.

Atividade de ⁶⁸ Ga (MBq)	Quantidade peptídeo (µg)	Purificação em Sep-Pak C18	TLC (%)	HPLC (%)
1258	50	Sim	95,31	70,93
1258	50	Sim	89,41	100
1480	50	Sim	90,12	97,01

3.5.4. Avaliação da pureza radioquímica por CLAE (Cromatografia líquida de alta eficiência)

Para avaliar a pureza radioquímica, uma amostra de 50µL do radiotraçador ⁶⁸Ga-DOTA-P1A3 com 20µCi de atividade foi injetada no sistema de CLAE 1260 *Infinity* (Agilent). Para análise do peptídeo "frio", foi injetado apenas 20µg (7,7 ηmol) de massa. A coluna analítica utilizada foi X Terra RP18 (Agilent, 5µm de tamanho de partícula, 4,6x150mm de dimensões, 125Å de tamanho de poro). As condições de corrida foram: 90% de tampão A (0,1% de ácido trifluoroacético em água MilliQ) e 10% de tampão B (0,1% de ácido trifluoroacético em acetonitrila) de 0 a 20 minutos, 60% de tampão A e 40% de tampão B de 20 a 25 minutos, retornando para 90% de tampão A e 10% de tampão B de 25 a 30 minutos, em um fluxo de 1mL/min, com leitura de absorvância no comprimento de onda de 214nm.

3.5.5. Avaliação da pureza radioquímica por CCD (Cromatografia em camada delgada)

5µL de ⁶⁸Ga-DOTA-P1A3 foi pipetado na fita *Instant Thin-Layer Chromatography* (ITLC, Agilent) com 10x1cm de tamanho, feita de microfibras de vidro impregnada em sílica gel. A fita foi mantida em uma cuba de vidro contendo uma solução de 1M de acetato de amônio/metanol 1:1 na posição vertical, permitindo-se assim a migração do solvente pela fita cromatográfica. Após a migração e a secagem da fita, esta foi cortada em 10 partes

cada uma contendo 1cm e a radioatividade foi medida em contagens por minuto (cpm) no contador gama (Perkin Elmer, Cobra II ES5002).

3.5.6. Estudo de estabilidade in vitro

Foi analisado a estabilidade do radiotraçador ^{68}Ga -DOTA-P1A3 quanto ao tempo (1, 2, 3 e 4 horas pós-radiomarcção) por CLAE ou CCD, comparando-se a marcação manual com a do módulo automatizado.

3.5.7. Influência da massa

A influência da massa de DOTA-P1A3 sobre a radiomarcção com ^{68}Ga foi avaliada utilizando-se duas diferentes quantidades de massa de peptídeo. 22,2MBq de ^{68}Ga eluído e purificado em cartucho Strata X foi adicionado à 100 μg /38,4 ηmol ou 50 μg /19,2 ηmol de DOTA-P1A3 em 2mL de tampão acetato de sódio 0,2M pH4,0, aquecidos a 95°C por 10 minutos. Após o aquecimento, o produto radiomarcado, sem a purificação em cartucho Sep-Pak C18, foi analisado apenas pela técnica de CCD.

3.5.8. Avaliação da ligação às proteínas do plasma

5 mL de sangue humano foi coletado em tubos contendo EDTA e centrifugado a 1400xg por 5 minutos para obtenção do plasma. Então, 37 MBq do radiotraçador foi adicionado à 1mL do plasma e incubados a 37°C durante 1 hora. Após a incubação, foi adicionado etanol absoluto (1:1 v/v) à mistura e centrifugados a 9720xg por 5 minutos para precipitação das proteínas plasmáticas. O sobrenadante foi coletado e medida a atividade no precipitado e no sobrenadante para o cálculo de porcentagem de ligação do radiotraçador às proteínas plasmáticas (MASSICANO, 2015), conforme fórmula abaixo:

$$\%LP = \frac{\text{Atividade_precipitado}}{\text{Atividade_precipitado} + \text{Atividade_sobrenadante}} \quad \text{EQ.1}$$

3.5.9. Teste de estabilidade em soro

Após a radiomarcagem do peptídeo DOTA-P1A3 com ^{68}Ga , incubou-se uma amostra deste radiomarcador com soro humano a 37°C durante 1h. Após esse período, a amostra foi centrifugada como no item anterior 3.5.8 para separação das proteínas plasmáticas para análise seguinte por CLAE.

3.5.10. Biodistribuição de ^{68}Ga -DOTA-P1A3 em camundongos saudáveis e com aterosclerose

Após a radiomarcagem do peptídeo DOTA-P1A3 com ^{68}Ga no módulo semi-automatizado, foi confirmada sua pureza radioquímica por CLAE. Uma dose aproximada de 2,22 MBq (60 μCi) do radiotraçador foi injetada pelo plexo orbital em cada camundongo (n=3, 7-8 meses de idade, camundongos LDLR^{-/-} com dieta normal para controle, e camundongos LDLR^{-/-} tratados por 4 meses com dieta hipercolesterolêmica). Uma dose padrão foi separada com a mesma atividade da dose injetada para os cálculos de porcentagem de distribuição pelos órgãos, considerando como 100% a dose padrão. Os camundongos foram eutanasiados 30 e 60 minutos após a injeção do radiotraçador e então, o sangue e os órgãos foram coletados, pesados e a radioatividade contada em contador automático gama. Então, os dados foram calculados para serem apresentados na forma de porcentagem de atividade injetada por órgão (% AI) e atividade injetada por grama de órgão (% AI/g) (MASSICANO, 2015), conforme as fórmulas abaixo:

$$\% AI = \frac{\text{cpm}_{\text{órgão}}}{\text{cpm}_{\text{padrão}}} \times 100 \quad \text{EQ.2}$$

$$\% AI / g = \frac{\text{cpm}_{\text{órgão}}}{\text{peso}_{\text{órgão}}(g) \times \text{cpm}_{\text{padrão}}} \times 100 \quad \text{EQ.3}$$

3.5.11. Imagens PET/CT com ^{68}Ga -DOTA-P1A3

O radiotraçador ^{68}Ga -DOTA-P1A3 foi marcado com ^{68}Ga usando o módulo automatizado e sua pureza radioquímica foi determinada pela técnica de CLAE antes da injeção nos animais. Para a aquisição de imagens PET/CT (Sistema de Imagem Pré-Clínico

PET/SPECT/CT Albira Carestream Healthcare) foram utilizados camundongos LDLR^{-/-} (macho, 12 meses de idade, tratado por 4 meses com dieta hipercolesterolêmica) e LDLR^{-/-} (macho, 12 meses de idade, dieta normal). Os camundongos foram anestesiados com mistura de 2% de isoflurano (Isoforine, Cristália) em oxigênio medicinal com fluxo de 2,5 L.min⁻¹. Uma dose de 1,2-5,8MBq de ⁶⁸Ga-DOTA-P1A3 foi injetada e imagens dinâmicas PET foram adquiridas logo após a injeção do radiotraçador em um protocolo de 0-30 minutos com aquisição de seis imagens com: 1) 2 min, 2) 3 min, 3) 5 min, 4) 5 min, 5) 5 min e 6) 10 min ou em um protocolo mais curto de apenas 10 min de aquisição. Após a aquisição das imagens PET, cada animal recebeu uma dose de 200µL de agente de contraste Omnipaque ioexol (GE Healthcare) em um protocolo de 15 minutos de aquisição de imagens CT para a localização anatômica dos animais. Todas as imagens obtidas foram reconstruídas utilizando software fornecido pelo fabricante (Albira Reconstructor 5.6) antes de serem analisadas pelo software PMOD (PMOD Technologies, versão 3.3).

3.5.12. Marcação de DOTA-P2C7

Cartucho Strata X-C (Phenomenex) foi previamente condicionado com 1mL de HCl 4M e 4mL de água Chellex. Após o condicionamento, o cartucho foi acoplado diretamente ao gerador de decaimento ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga com 10 mL de HCl 0,1 M para eluição do ⁶⁸Ga. A reação de marcação foi feita com 2mL de tampão acetato 0,2 M pH 4,0, 800 µL de ⁶⁸Ga (1202-892 MBq), 50 µg (20 ηmol) de peptídeo DOTA-P2C7, 1 mM de ácido ascórbico e 1 mM de ácido genticônico e 200 µL de etanol absoluto. A reação foi aquecida a 95°C por 7 minutos. Após o aquecimento, salina foi adicionada para resfriar a reação. Em seguida, o cartucho Sep-Pak tC18 (Waters), previamente condicionado com 5mL de etanol 50% e 5mL de salina, foi utilizado para purificar a reação de marcação a fim de se remover a porção livre de ⁶⁸Ga. Antes de eluir o cartucho com etanol absoluto, o cartucho foi lavado com 1mL de salina para remoção de possíveis impurezas. As atividades no frasco de marcação, no rejeito de purificação, na lavagem com salina, no cartucho, na seringa, e no produto eluído foram medidas em dosímetro (Capintec) para somar o total de atividade e assim calcular a porcentagem do rendimento da marcação baseado na atividade que foi recuperada na eluição. Um teste de estabilidade em soro foi realizado conforme o item 3.5.9.

3.5.13. Imagens PET/CT com ^{68}Ga -DOTA-P2C7

Para a aquisição de imagens PET/CT (Sistema de Imagem Pré-Clínico PET/SPECT/CT Albira Carestream Healthcare) foram utilizados camundongos LDLR^{-/-} (macho, 12 meses de idade, tratado com dieta hipercolesterolêmica por 7-8 meses, n=3) e camundongos LDLR^{-/-} (macho, 12 meses de idade, dieta normal, n=3) como animal controle. Primeiramente, camundongos foram anestesiados com mistura de 2% de isoflurano (Isoforine, Cristália) em oxigênio medicinal com fluxo de 2,5 L.min⁻¹. Os camundongos LDLR^{-/-} receberam doses de 6,9-7,2 MBq de ^{68}Ga -DOTA-P2C7. Imagens dinâmicas PET foram adquiridas logo após a injeção do radiotraçador em um protocolo de 0-30 minutos com aquisição de imagens nos seguintes tempos: 1) 2 min, 2) 3 min, 3) 5 min, 4) 5 min, 5) 5 min e 6) 10 min. Após a aquisição das imagens PET, cada animal recebeu uma dose de 20µL de agente de contraste Aurovist (Nanoprobes) em um protocolo de 15 minutos de aquisição de imagens CT para a localização anatômica dos animais. Todas as imagens obtidas foram reconstruídas utilizando software fornecido pelo fabricante (Albira Reconstructor 5.6). As imagens foram analisadas pelo software PMOD (PMOD Technologies, versão 3.3). Cada região de interesse foi delimitada para obtenção de valores de captação do radiotraçador denominada de volume de interesse (volumn of interest - VOI). Vários VOIs foram delimitados para cada órgão ou região do arco aórtico em cada aquisição e uma porcentagem de captação foi calculada com base na atividade injetada no animal através do software PMOD.

3.6. ^{99m}Tc

3.6.1. Marcação de HYNIC-P2C7

Para a marcação com ^{99m}Tc , foram previamente preparadas três soluções: HCl 2M, cloreto de estanho (SnCl_2) diluído em HCl 2M, tricina diluído em água MilliQ, HCl 2M e SnCl_2 . Após a eluição do gerador de ^{99}Mo , ^{99m}Tc (666-1147MBq) foi adicionado 50µg (22.7 ηmol) de HYNIC-P1A3, 50µL da solução de tricina e SnCl_2 . A mistura foi homogeneizada e mantida em repouso por 60 min. Após esse período de incubação, a reação foi purificada em cartucho Sep-Pak C18 como descrito no item 3.6 e uma amostra do produto final foi coletada para análise por CLAE conforme descrito no item 3.5.4, no entanto, a coluna utilizada foi µBondapak C18 (Waters, 10µm de tamanho de partícula,

7,8x300mm de dimensões, 125Å de tamanho de poro). As soluções utilizadas para a análise foram as mesmas anteriores citadas com um gradiente que se iniciava com 50% de ambas as soluções até 10 min, e então com 90% de solução A de 10 min até 20 min, onde o gradiente chegava a 60% de solução A e retornando a 90% de solução A em 30min, com um fluxo de 1mL/min. Um teste de estabilidade em soro foi realizado conforme item 3.5.9 antes da administração *in vivo* do radiotraçador.

3.6.2. Biodistribuição de ^{99m}Tc-HYNIC-P2C7 em camundongos LDLR^{-/-} controle e hipercolesterolêmicos

Camundongos LDLR^{-/-} (n=3, 10-12 meses de idade, tratados por 4 meses de dieta hipercolesterolêmica e como controle foram utilizados camundongos de 10-12 meses de dieta tratados com dieta normal) receberam uma injeção de ^{99m}Tc-HYNIC-P2C7 (4,1-6,5MBq para contagens lidas no dia seguinte e 0,33-0,44MBq para contagens lidas no mesmo dia) pelo plexo orbital e os animais foram sacrificados 60 e 90 min após a injeção e seus órgãos e sangue foram coletados, pesados e contados em contador automático (Perkin Elmer, Cobra II ES5002). Os cálculos realizados para obtenção dos dados de porcentagem de dose injetada por grama foram realizados conforme as equações citadas no item 3.5.9.

3.6.3. Imagens SPECT/CT

Camundongos foram anestesiados com mistura de 2% de isoflurano (Isoforine, Cristália) em oxigênio medicinal com fluxo de 2,5 L.min⁻¹. ^{99m}Tc-HYNIC-P2C7 foi injetado no plexo ocular direito e o animal foi imediatamente colocado em decúbito ventral no equipamento Albira MicroSPECT (Oncovision). Foram adquiridas imagens de SPECT em 2D (planares), a cada 5 minutos, entre 10 e 60 minutos após a administração do radiotraçador. Ao final da aquisição planar, 60 minutos após injeção do radiotraçador, foi feita uma aquisição SPECT 3D com 30 segundos de captura em cada projeção, em um total de 60 projeções. Em ambas as imagens SPECT foi utilizado colimador com um único orifício (*pinhole*) fornecido pelo fabricante. Finalmente, após a aquisição SPECT 3D, foi feita uma aquisição CT, com 45 Kv e 0,4mA e 400 projeções.

Todas as imagens obtidas por SPECT 2D foram reconstruídas utilizando software fornecido pelo fabricante (Albira Reconstructor 5.6). Durante o processo de reconstrução

de imagens de SPECT, foi utilizado algoritmo OSEM (Ordered subset expectation maximization) com 2 interações, resultando em pixel isométrico com dimensões de 0,25 mm. Ao fim dessa etapa do processo, foram obtidas 10 imagens, sendo uma imagem referente a cada intervalo de 5 minutos entre 10 e 60 minutos após administração do radiofármaco em imagens 2D e uma imagem 3D obtida após 60 minutos de aquisição. A imagem de tomografia computadorizada foi reconstruída com o mesmo software (Albira Reconstructor 5.6) utilizando algoritmo FBP. A análise dessas imagens foi feita em PMOD 3.307 (PMOD Technologies). Inicialmente, foi utilizada a opção “Merge files” para que todas as imagens fossem reunidas em único arquivo com 10 frames de tempo. Neste ponto, a região do coração foi selecionada, através da construção de uma ROI inicialmente retangular, seguido do uso da ferramenta de isocontorno para seleção dos pixels de maior valor. Finalmente, cada arquivo foi alimentado com dados de peso, atividade administrada e hora da administração de cada animal para cálculo de atividade detectada na ROI previamente selecionada. Em relação a imagens 3D, a foi selecionada região do arco aórtico na imagem de tomografia computadorizada, a qual foi sobreposta (coregistrada) com imagem SPECT 3D, permitindo, dessa forma, calcular a atividade do radiofármaco nessa região de interesse.

3.7. ^{64}Cu

Os estudos com ^{64}Cu e ^{18}F foram realizados no Departamento de Radiologia da Washington University in Saint. Louis, em colaboração com o Dr. Yongjian Liu.

3.7.1. *Marcação de DOTA-PIA3*

Foram adicionados 50 μL de tampão de acetato de amônio 0,1 M pH 5,5 a 2-5 μg de DOTA-PIA3 (1-2 ηmol) e 37 MBq de ^{64}Cu . O radiomarcamento foi incubado a 45°C durante 1 hora, a 950 rpm. Após o tempo de incubação, uma amostra foi coletada e desafiada com 5 μL de EDTA 10 mM em tampão de fosfato de sódio 50 mM e incubou-se a 45°C durante 5 minutos a 950 rpm para quelar o restante de ^{64}Cu livre. O rendimento e a pureza do radiomarcador foram analisados por radio-CLAE Dionex Ultimate 3000 RS Pump (Dionex®) utilizando uma coluna analítica C-18 (Vydac® TP, tamanho de poro 300 Å, 4,6 x 250 mm, tamanho de partícula 5 μm). As soluções utilizados foram: A (0,1% de ácido trifluoroacético em água MilliQ) e B (0,1% de ácido trifluoroacético em acetonitrila),

em fluxo de 1 mL/min, em um programa de 40 minutos. O gradiente se iniciava a partir de 100% de solução A para 100% de solução B no tempo de 32,5 minutos e depois retornava para 100% de tampão A até 40 minutos.

3.7.2. Estudo de estabilidade de ^{64}Cu -DOTA-P1A3

Após a radiomarcção do peptídeo DOTA-P1A3 com ^{64}Cu , incubou-se uma amostra deste radiomarcador com soro de rato a 37° C durante 1 h e analisou-se por radio-CLAE.

3.7.3. Marcação de DOTA-P2C7

A marcação DOTA-P2C7 foi feita e analisada da mesma forma que para radiomarcção DOTA-P1A3, mas observou-se degradação deste peptídeo. Foram testadas diferentes temperaturas e tempos de incubação (45° C durante 30 min, 80° C durante 15 e 30 min) na reação. A marcação a frio com cobre não radioativo foi avaliada utilizando 20 µg de DOTA-P2C7, 200 µl de tampão 0,1 M de acetato de amônio pH 5,5 e 4,4 µl de CuCl_2 100 ηM, com incubação a 45° C e temperatura ambiente por 1 h . Após incubação, fez-se desafio com tampão EDTA 10 mM, e a marcação foi analisada por CLAE.

3.7.4. Purificação por CLAE

Devido à degradação de ^{64}Cu -DOTA-P2C7 após a radiomarcção, uma separação do primeiro pico correspondente à parte degradada foi feita por CLAE, utilizando um programa diferente e mais longo com 60 min no total. O gradiente começa com 100% de solução A passando a 40% de solução B em 30 min até 100% em 40 min, em seguida, em 45 min, a percentagem de solução B diminuiu até 50% atingindo 0% com 50 min, mantendo-se até 60 min. Depois de aumentar o tempo entre o primeiro e segundo pico de ^{64}Cu -DOTA-P2C7, o segundo pico foi isolado e re-injetado no equipamento CLAE.

3.7.5. Teste de radiólise

A determinação da causa da degradação de DOTA-P2C7 durante a reação na presença de ^{64}Cu após a radiomarcção foi avaliada por análise por CLAE. DOTA-P2C7

foi radiomarcado conforme o item 3.7.3, mas a análise por CLAE foi realizada após 0, 2 e 4 h após radiomarcção e no último momento com e sem adição de 15 mM ácido ascórbico.

3.7.6. Síntese de nanoclusteres de ouro marcados com ^{64}Cu ($^{64}\text{CuAuNC}$)

A síntese foi realizada num frasco de vidro com uma barra de agitação magnética, adicionando 300 μL de água, 50 μL de 10 mM cloreto de ouro (HAuCl_4), 225 μL de 2,5 mM ácido tioico-polietilenoglicol 750-O'-metilpolietilenoglicol (TA-PEG750-OMe), 19 μL de 10 mM de ácido tnico-polietilenoglicol 750-COOH (TA-PEG750-COOH), 148 MBq de ^{64}Cu e 87,5 μL de 40 mM boro-hidreto de sódio. A mistura foi agitada durante 4 h a temperatura ambiente. Após incubação, o nanocluster de ouro foi purificado por ultracentrifugação com um filtro Amicon (Millipore) com poro de 10 kDa adicionando-se 2 mL de PBS e centrifugado a 10.000 xg durante 15 min por 3 vezes.

3.7.6.1. Conjugação de nanoclusteres de ouro com peptídeos

Para a conjugação, o $^{64}\text{CuAuNC}$ foi adicionado a 200 μL de água e um excesso de concentração de 100 vezes para cardiidimida 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil) (EDC) e 200 vezes para sulfo-NHS. A suspensão foi incubada durante 20 min a 950 rpm a temperatura ambiente. Depois disso, a solução foi purificada por ultracentrifugação e foram adicionados 140 μg (54 ηmol) de peptídeo P1A3-espçador em PBS ao nanocluster de ouro, incubados a 950 rpm e temperatura ambiente *overnight*. Algumas modificações no procedimento de conjugação foram testadas como descrito na tabela 6.

Tabela 6. Condições avaliadas na conjugação do peptídeo aos nanoclusteres de ouro.

Tampão	rpm	tempo	purificação
MES pH 6.0	950	overnight	ultracentrifugação com PBS
água	300	2 h	ultracentrifugação com PBS
água	300	2 h	ultracentrifugação com água
água	300	2 h	ultracentrifugação com 5 mM de borohidrato de sódio e água

O passo seguinte incluiu a purificação por ultracentrifugação 3 vezes utilizando 500 μL de tampão tris 1 M pH 7,4. O $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ foi analisado por cromatografia por CCD e FPLC.

3.7.6.2. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Uma amostra contendo 1,5 µl de ⁶⁴CuAuNC-P1A3 foi pipetada na origem de uma fita de fibra de vidro (*instant thin layer chromatography* - ITLC-SG - Papel de cromatografia de microfibras de vidro impregnado, Agilent Technologies) com 2 cm de largura e 11,5 cm de comprimento. A origem da fita era uma linha com 1,5 cm de distância desde o início. A fita foi inserida num recipiente de vidro com uma solução de 10% acetato de amônio/metanol como fase móvel.

3.7.6.3. Fast performance liquid chromatography (FPLC)

A pureza radioquímica de ⁶⁴CuAuNC-P1A3 foi analisada por FPLC (AKTA, GE) utilizando um detector UV (254 nm), um detector de radioisótopos (Beckman 179) e uma coluna de exclusão de tamanho superose 12 (GE Healthcare Life Science). O tampão utilizado foi 50 mM fosfato de sódio e 300 mM cloreto de sódio pH 6,8 a um de fluxo de 0,8 mL/min.

3.7.6.4. Quantificação de peptídeos conjugados ao AuNC

Após a síntese, a quantidade de peptídeos conjugados sobre a superfície de ⁶⁴CuAuNC foi avaliada pelo kit de quantificação de proteínas microBCA (Pierce Technologies), utilizando a mesma quantidade de AuNC para descontar o sinal oriundo do nanocluster de ouro em si (FANG et al., 2010). O protocolo foi feito de acordo com as instruções do fabricante, excepto que a curva padrão utilizada foi feita com concentrações de peptídeo em vez da proteína BSA. A razão molar peptídeo /nanocluster foi calculada com base nesta técnica, uma vez que foi conhecida a concentração de peptídeo em µg/mL, a qual foi transformada em quantidade de peptídeo em mol, dividida pela quantidade de nanocluster conhecida em mol.

3.7.7. Biodistribuição de ⁶⁴Cu-radiotraçadores

Camundongos CD-1 (macho, 6-8 semanas de idade, n=3) receberam injeção na veia caudal de ⁶⁴Cu-DOTA-P1A3, ⁶⁴Cu-NOTA-P1A3 ou ⁶⁴CuAuNC-P1A3 (0,37 MBq). Os animais foram eutanasiados (1 h após a injeção para radiotraçadores peptídicos e 1, 3, 24 e

48 h para $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$), e seus órgãos foram coletados, pesados e a radioatividade foi medida por contador automático (Beckman 8000). Uma amostra padrão de cada radiotraçador foi separada para correção do decaimento para contagem no contador gama. Além disso, para análise da via de eliminação do nanocluster de ouro, as fezes e urina foram coletados em gaiolas metabólicas (4, 24 e 48 h após a injeção) e a radioatividade foi medida.

3.7.8. *Imagens PET/CT*

3.7.8.1. $^{64}\text{Cu-DOTA-P1A3}$ e $^{64}\text{Cu-NOTA-P1A3}$

Em um primeiro segmento de aquisições de imagens PET, camundongos $\text{Apoe}^{-/-}$ (macho, 6-8 semanas de idade, $n = 4$, com 7 semanas de dieta hipercolesterolêmica) e camundongos controle C57Bl/6N (macho, 5-6 semanas de idade, $n=2$) receberam 3,7 MBq de $^{64}\text{Cu-DOTA-P1A3}$ e $^{64}\text{Cu-NOTA-P1A3}$. Para agilizar a aquisição das imagens PET/CT, quatro animais foram escaneados simultaneamente, mantidos em uma cama semelhante a um hotel. As imagens dinâmicas foram adquiridas com 30-60 min após 1 h de injeção. As imagens de CT (Inveon, Siemens) foram obtidas para localização anatômica antes da aquisição de imagens PET (Focus 220, Siemens). A captação dos radiotraçadores na região de interesse (ROI, no arco aórtico) foi analisada através de imagens reconstruídas maximum a posteriori (MAP). Após 3 semanas, o monitoramento do desenvolvimento da aterosclerose foi acompanhado por imagens PET dos mesmos animais $\text{Apoe}^{-/-}$ ($n = 3$) com 10 semanas de dieta hipercolesterolêmica, injetando-se 3,7 MBq de $^{64}\text{Cu-NOTA-P1A3}$, em comparação com camundongos C57Bl/6N controle ($n=4$). Um bloqueio também foi realizado com uma injeção de um excesso de NOTA-P1A3 "frio" 100 vezes mais concentrado, comparando-se com as imagens obtidas de camundongos controle C57Bl/6N. O protocolo de imagem estática foi o mesmo que mencionado anteriormente para $^{64}\text{Cu-DOTA-P1A3}$ e $^{64}\text{Cu-NOTA-P1A3}$. As imagens foram analisadas utilizando o software Inveon Research Workplace (Siemens).

3.7.8.2. $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$

Para aquisição de imagens PET/CT com os radiotraçadores $^{64}\text{CuAuNC}$, camundongos $\text{Apoe}^{-/-}$ (macho, 6-8 semanas de idade, $n = 4$, 6 e 9 semanas de dieta

hipercolesterolêmica) receberam 3,7 MBq de $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ e $^{64}\text{CuAuNC}$ como nanocluster controle e camundongos C57Bl/6N (macho, 5- 6 semanas de idade, n = 4) como animais controle foram injetados com 3,7 MBq de $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$. As imagens CT em Inveon (Siemens) foram adquiridas antes da imagem PET. Imagens PET estáticas foram adquiridas em 1 h (20 min), 3-4 h (30 min), 24 h (45 min) e 48 h (60 min) após injeção em microPET Focus F220 (Siemens). Novamente, quatro animais foram escaneados simultaneamente, mantidos no hotel. A captação dos radiotraçadores na região de interesse (ROI, no arco aórtico) foi analisada através de imagens reconstruídas maximum a posteriori (MAP). As imagens foram analisadas utilizando o software Inveon Research Workplace (Siemens).

3.7.9. Autoradiografia

Após as imagens PET/CT, foram coletados as aortas dos camundongos $\text{Apoe}^{-/-}$ e C57Bl/6N e imagens foram adquiridas pelo equipamento de autoradiografia eletrônica InstantImager (InstantImager, Packard) por 24h, sendo analisadas pelo software Image (Packard).

3.8. Marcação com ^{18}F

3.8.1. Marcação "fria"

Antes da marcação inicial ^{18}F , foi feita uma marcação "fria" para verificar a estabilidade dos peptídeos em condições de marcação radioactiva como temperatura, pH, tempo de incubação. A reação foi feita utilizando 12 mM de cloreto de alumínio dissolvido em 0,5 M de acetato de sódio pH 4,0; 12 mM de fluoreto de sódio e 4,8 μmol de NOTA-P1A3 e 5 nmol de NOTA-P2C7 . O sistema de marcação foi incubado a 99° C durante 15 min, analisado por CLAE.

3.8.2. Marcação de NOTA-P1A3 e NOTA-P2C7

O radiomarcamento com ^{18}F foi baseado em um método primeiro publicado em 2009 (MCBRIDE et al., 2009), utilizando os peptídeos NOTA-P1A3 e NOTA-P2C7 . ^{18}F utilizado nas reações era previamente purificado por troca aniônica a partir da produção de ciclotron, para evitar a contaminação com outros íons na reação de radiomarcção. Os

peptídeos foram previamente dissolvidos em tampão de acetato de sódio 0,5 M e pH 4,0. As condições avaliadas neste método utilizando fluoreto de alumínio (AlF) 2 mM e diferentes atividades de ^{18}F estão listadas na tabela 7.

Tabela 7. Condições de radiomarcção de NOTA-peptídeos com ^{18}F .

Quantidade de peptídeo (ηmol)	^{18}F (MBq)	Tampão acetato de sódio (μl)	Acetonitrila (%)	Temperatura de incubação ($^{\circ}\text{C}$)	Tempo de reação (min)
2	7.4-36.6	3-6	---	99	15
26	11	50	---	99	15
4	20.8	50	33	microondas	5
4	34.6	50	24	100	15
62.5	7.2	5	72	100	30
30	12.3	5	74	100	45
20	26.9	5	62	100	40
30	119	5	74	100	30
30	740	20	86	100	30

3.9. Análise da interação dos peptídeos com componentes da lesão aterosclerótica

3.9.1. Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea

3.9.1.1. Obtenção de meio condicionado

Células da linhagem L-929 foram cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm^2 em meio DMEM-high glucose com 10% de soro fetal bovino durante 6 dias em estufa a 37° C com 5 % de CO_2 , sendo feitas passagens de garrafa a cada 2 dias. Na terceira passagem, as células foram plaqueadas a $4,7 \times 10^5$ em cada garrafa de 75 cm^2 contendo 55 mL de meio DMEM-high glucose com 10 % de soro fetal bovino e incubadas em estufa a 37° C com 5 % de CO_2 durante 7 dias. No 7° dia, o meio de cultura foi coletado, filtrado em uma membrana com poro de 0,45 μm , aliquoteado e armazenado a -20°C.

3.9.1.2. Extração de células da medula óssea

O animal primeiramente foi sacrificado por injeção intramuscular dos anestésicos cloridrato de xilasina e cloridrato de quetamina (5 mg/Kg e 10 mg/Kg, respectivamente), seguido por eutanásia por deslocamento cervical. Após o sacrifício, álcool 70 % foi borrifado sobre o animal e com o auxílio de uma tesoura cirúrgica e pinça foi retirada a pele

ao redor da perna do animal. Um corte próximo aos ossos até a localização da espinha medular foi realizado, e então o fêmur e a tíbia foram separados para permitir melhor a limpeza dos ossos, removendo o músculo e o tecido adiposo. Os ossos mergulhados em álcool 70 % em uma placa de petri foram levados ao interior do fluxo laminar, onde as epífises foram cortadas. Uma seringa contendo 10 mL de meio de cultura RPMI é inserida no interior do osso, de forma que este foi lavado deixando que o meio atravessasse todo o comprimento do osso e coletando as células em tubo falcon estéril. A suspensão de células foi decantada por 5 min para separação de partes de tecido e então, foi centrifugado a 300 xg por 8 min, a 4° C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de tampão de lise, adicionando-se depois 4 mL de tampão de lise. As células em tampão de lise foram novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores. As células foram ressuspensas em 1 mL de meio RPMI e contadas em câmara de Neubauer diluídas em azul de tripan na proporção de 1:10. Preparar a solução de meio contendo 10 % de soro fetal bovino, 30 % de meio condicionado de células da linhagem L-929 (contendo os fatores de crescimento GM-CSF e M-CSF para diferenciação de macrófagos), de forma que $1,0$ a $2,0 \times 10^6$ células em uma placa de petri de cultura (Falcon, #351029) em um volume final de 12,5 mL de meio de cultura. O meio RPMI com meio condicionado foi trocado a cada 2-3 dias até o 7° dia de tratamento. Após a confirmação da diferenciação por citometria de fluxo, as células foram utilizadas para os ensaios de tratamento com peptídeos.

3.9.1.3. Caracterização de macrófagos diferenciados de células da medula óssea

Após 7 dias de tratamento das células com meio condicionado, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas com 3 mL de PBS gelado. As células da placa de petri foram removidas adicionando-se 3 mL de tripsina-EDTA 0,25 % e incubadas em estufa a 37° C por 5 min. Após isso, a tripsina foi neutralizada adicionando-se 6 mL de soro fetal bovino. As células da placa de petri foram homogeneizadas com o pipetador e transferidas para um tubo falcon estéril. A contagem de células foi realizada utilizando uma diluição em azul de tripan (1:10) na câmara de Neubauer. 2×10^5 células foram utilizadas para marcação com o anticorpo murino F4/80-PE-Cy5 (Ebioscience, #15-4801-82, diluído 1:1000). As células com o anticorpo foram incubadas em estufa a 37° C durante 30 min. Um tubo com a

mesma quantidade de células sem anticorpo foi utilizado para controle na análise por citometria de fluxo. Ambos os tubos de citometria foram centrifugados a 300 xg durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µl de PBS, procedendo-se leitura no citômetro de fluxo FACSCanto (BD Biosciences).

3.9.2. Ensaio de internalização de peptídeos em macrófagos

Macrófagos RAW foram mantidos em meio RPMI suplementado com 2mM de L-glutamina, 100g/mL de estreptomicina e 100U/mL de penicilina. Macrófagos RAW e macrófagos primários foram plaqueados 1×10^5 células por poço. Após a aderência à placa, as células foram carenciadas em meio RPMI com 1 % de soro fetal bovino durante 16 h. As células foram incubadas com diferentes concentrações de peptídeos FITC-P1A3 e FITC-P2C7 (50, 25, 12,5 e 6,25 µg/mL) em estufa a 37° C com 5 % de CO₂ durante 16 h. Após esse período, as células foram removidas da placa com 500 µL de PBS gelado e transferidas para tubos de citometria, sendo centrifugadas a 300 xg durante 5 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS, procedendo as amostras para a leitura no citômetro de fluxo. Os sinais captados pelo citômetro foram analisados por meio da medida da mediana de intensidade de fluorescência em escala logarítmica.

3.9.3. Cultura de células HAEC (human aortic endothelial cells) para microscopia confocal

Células HAEC foram cultivadas em meio de cultura 200 (Life Technologies, para cultura de células endoteliais de grandes vasos humanos) suplementado especial com pouco soro (Life Technologies, 2 % de soro fetal bovino, 1 µg/mL de hidrocortisona, 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal humano, 3 ng/mL de fator básico de crescimento de fibroblasto e 10 µg/mL de heparina) em estufa a 37° C em ar humidificado com 5 % de CO₂. As células foram cultivadas em garrafa de cultura de 75 cm³ até atingir aproximadamente 100 % de confluência. Para a análise de microscopia confocal, 2×10^5 células por compartimento foram plaqueadas em uma placa de cultura com fundo de vidro com 35 mm de diâmetro e 4 compartimentos (Greiner Bio-One). Após 24 h do plaqueamento, as células foram carenciadas com meio 200 contendo 1 % de soro fetal

bovino por 16 h antes do tratamento. Para o tratamento, os quatro compartimentos foram divididos em: 1- nenhum tratamento, 2- PBS, 3- 50 µg/mL de FITC-P1A3 e 4- 50 µg/mL de FITC-P2C7. O núcleo das células foi corado com Hoechst 33342 (Life Technologies) na concentração final de 8 µM por 5-10 minutos protegidos da luz. Para a aquisição de imagens no microscópio confocal LSM 780-NLO (Zeiss) acoplado à uma câmara que mantém a temperatura a 37° C com 5 % de CO₂, 3 diferentes posições de cada compartimento foram observadas durante 20 h. Uma imagem foi adquirida a cada 10 min em um aumento de 20 x.

3.9.4. Imunofluorescência

3.9.4.1. FITC-P1A3 e FITC-P2C7

Amostras de aorta parafinizada contendo lesões ateroscleróticas de camundongos Apoe^{-/-} (19 semanas de dieta hipercolesterolêmica) foram analisadas quanto à especificidade de P1A3 e P2C7 conjugados com o fluoróforo de isotiocianato de fluoresceína (FITC). As lâminas foram primeiro desparafinizadas com xilol durante 5 min, etanol a 100% durante 5 min, etanol a 95% durante 5 min, etanol a 85% durante 5 min, etanol a 70% durante 5 min, etanol a 50% durante 5 min e etanol 30% por 5 min. Em seguida, a recuperação de antígenos foi feita com panela de pressão durante 10 min em tampão 10 mM de citrato de sódio pH 6,0. Após o esfriamento das lâminas, as amostras foram bloqueadas com BSA a 5 % em PBS durante 30 min a temperatura ambiente. A incubação com FITC-P1A3 foi testada em concentrações de 15 e 30 ηmol, com um bloqueio de um excesso de concentração de 100 vezes apenas para o peptídeo P1A3 durante 1 h a temperatura ambiente. Após a lavagem das lâminas com PBS, adicionou-se 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI) a 10 µg/mL para coloração do núcleo.

3.9.4.2. Conjugação dos peptídeos com o fluóroforo Alexa Fluor 647 (Life Technologies)

P1A3 (2 mg/mL) foi dissolvido em tampão bicarbonato de sódio 0,15 M pH 8,5 e então adicionado a 0,5 mg de Alexa Fluor 647 diluído em solvente de dimetilformamida (DMF). A mistura foi homogeneizada e protegida da luz, incubada *overnight* a 4°C. O peptídeo conjugado foi analisado e purificado por CLAE.

3.9.4.3. AF647-P1A3

Como o fluoróforo FITC mostrou muita autofluorescência neste tecido, Alexa Fluor 647 foi utilizado para reduzir o sinal de fundo. A imunofluorescência dos tecidos da aorta de camundongos Apoe^{-/-} (19 semanas de dieta hipercolesterolêmica) foi realizada como previamente mencionado no item 3.9.4.1 para FITC-P1A3 e FITC-P2C7. Diferentes concentrações foram testadas (0,5, 2,8 e 5,5 η M), assim como diferentes tecidos tais como a aorta de camundongos C57Bl/6N e LDLR^{-/-}, em dieta normal, como controle negativo. As lâminas foram também incubadas a temperatura ambiente durante 1 h. As imagens das lâminas foram realizadas utilizando o microscópio Leica DM5000B com o software Leica Application Suite X.

3.9.5. Ensaio de ELISA com peptídeos conjugados com DOTA

Placa de ELISA High Binding (Costar, #3590) foi sensibilizada com 100000-0.0001 η g/mL ou 400000-6250 η g/mL de DOTA-P1A3 e DOTA-P2C7 diluídos com PBS ou tampão carbonato de sódio 100 mM pH 9.5 durante 16 h a 4° C. A placa foi então lavada 3 vezes com 200 μ L de PBS-tween 0.05% e bloqueada com 150 μ L de solução de 2% de leite desnatado diluído em PBS durante 1 h e 30 min a 37° C. Seguiu-se mais uma etapa de lavagem e depois uma incubação com soluções dos anticorpos monoclonais 1A3 e 2C7 a uma concentração final de 10 μ g/mL diluído em 1 % de leite desnatado em PBS a 37° C durante 1 h e 30 min. O anticorpo secundário foi IgG de cabra anti-mouse conjugado com peroxidase (Goat anti-mouse HRP diluído 1:800, BioRad, #170-6516), adicionado a 50 μ L por poço, incubado por 1 h a 37° C. Antes da revelação, a placa foi lavada e o reagente TMB foi adicionado (50 μ L por poço) e mantida a 37° C por aproximadamente 8 min. A reação de revelação foi parada com uma solução de 0.2 M ácido sulfúrico e em seguida, a leitura da absorbância a 450 nm foi realizada em um espectrofotômetro.

3.9.6. Análise de interação de P1A3 por ressonância de superfície plasmônica

A interação entre o anticorpo monoclonal 1A3 e seu respectivo peptídeo P1A3 assim como DOTA-P1A3 foi avaliada pela técnica de ressonância de superfície plasmônica (Biacore T200, GE Healthcare Life Sciences). O equipamento utilizado Biacore T200 se encontra instalado no prédio de pesquisa da UNIFESP (Projeto multiusuários, FAPESP

2009/53844-6), sob manutenção do responsável técnico Ricardo Torquato. O anticorpo monoclonal 1A3 foi imobilizado no chip CM5 da Série S (#BR-1005-30, GE Healthcare Life Sciences) diluído em tampão acetato pH 5,0 a uma concentração de 30 µg/mL, utilizando níveis diferentes de imobilização em três das quatro células de fluxo do chip, sendo que a primeira célula foi considerada um branco sem nenhum anticorpo imobilizado. O primeiro nível de imobilização cobriu toda a superfície do chip com o máximo de “ligante” (anticorpo 1A3), no segundo nível foi determinado para uma imobilização de até 1000 resonance units (RUs) e no terceiro nível foi imobilizado o ligante até o limite de 5000 RUs. Em todas as análises de interação, foi utilizado o primeiro nível de imobilização. A interação do anticorpo 1A3 imobilizado com o peptídeo P1A3, na nomenclatura do Biacore chamado de “analito”, foi realizada nos seguintes condições: 500 s de tempo de contato com o analito peptídeo em um volume total de 150 µL de analito a 10 µL/min de fluxo com tampão PBS pH 7,4; sendo que o peptídeo ligado foi removido com o tampão de regeneração glicina 2,0 M pH 2,0 antes do início da próxima interação. As concentrações de peptídeos utilizadas para a realização da curva para o experimento de cinética foram: 0, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280 µM de peptídeo P1A3. A interação do peptídeo sem modificação P1A3 foi comparada à do peptídeo conjugado DOTA-P1A3, a fim de se confirmar a manutenção da afinidade pelo anticorpo 1A3. As concentrações testadas de DOTA-P1A3 para avaliação da sua afinidade pelo anticorpo foram as seguintes: 0; 0,037; 0,188; 0,377; 1,885; 3,770; 11,31; 22,62; 37,70; 75,39; 113,1; 226,2 µM. As outras condições do experimento foram as mesmas utilizadas para o peptídeo P1A3. Todos os experimentos de interação foram realizados a 37 °C. A interação dos peptídeos com a superfície do chip com o anticorpo 1A3 imobilizado foi avaliado por gráficos de sensogramas, onde foram medidas RUs. A partir das curvas obtidas com as diferentes concentrações de peptídeos e baseado na massa molecular dos peptídeos foi calculado o valor de constante de equilíbrio de dissociação (K_D), a qual é definida como a relação da constante de dissociação (k_d) pela associação (k_a).

3.10. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± DP e analisados utilizando o software GraphPad Prism (versão 5.0, Software GraphPad). Para comparações das quantificações

SUV com o nanocluster de ouro, utilizou-se ANOVA two-way seguido por pós-testes de Bonferroni. Para análise da variação entre as imagens de PET comparando-se as imagens com os peptídeos, foi utilizado teste t-Student não emparelhado. O nível de significância foi considerado como um valor p inferior a 0,05 para todas as análises.

4. RESULTADOS

4.1. ⁶⁸Ga

4.1.1. *Espectrometria de massa*

Primeiramente, as massas moleculares referentes aos peptídeos sintéticos P1A3 e P2C7 conjugados com o agente quelante DOTA foram avaliadas por espectrometria de massa. Após a captura dos peptídeos em coluna C18 por sistema CLAE (figuras 6 e 7), foram confirmadas as respectivas massas na análise após ionização por electrospray no modo positivo (figuras 8 e 9). O espectro de massas de ambos os peptídeos P1A3 e P2C7 demonstraram as relações m/z com os números de cargas pelos quais os peptídeos se encontravam ionizados. Multiplicando-se as relações m/z pelo número de cargas e em seguida subtraindo-se as cargas, foram obtidas as mesmas massas moleculares que constavam nas análises apresentadas pela companhia que os sintetizou. Após esse primeiro teste, os peptídeos foram avaliados se mediante as condições de radiomarcção em baixo pH e alta temperatura poderiam interferir sobre suas massas de alguma forma. Novamente, os picos referentes aos peptídeos foram coletados para análise por espectrometria (figuras 10 e 11), demonstrando que as massas não apresentaram alteração mesmo após serem submetidas às condições de radiomarcção. Considerando todas as etapas de radiomarcção, a purificação dos peptídeos radiomarcados em cartuchos Sep-Pak C18 também foi avaliada para verificar se o peptídeo P1A3, inicialmente, seria eluído corretamente do cartucho (figura 12) e se sua massa correspondia à mesma antes da purificação (figura 13).

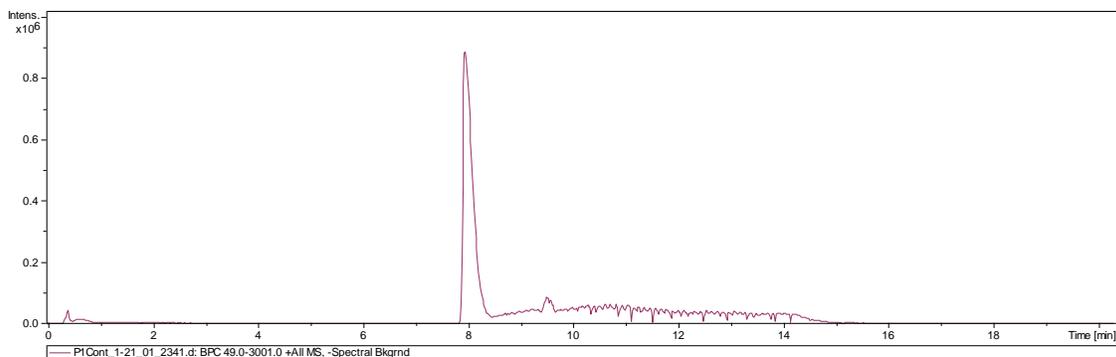


Figura 6. Cromatograma em sistema CLAE com injeção do peptídeo P1A3 em coluna C18. O único pico em 8 minutos de retenção na coluna representa o peptídeo que foi coletado para análise no espectrômetro de massa.

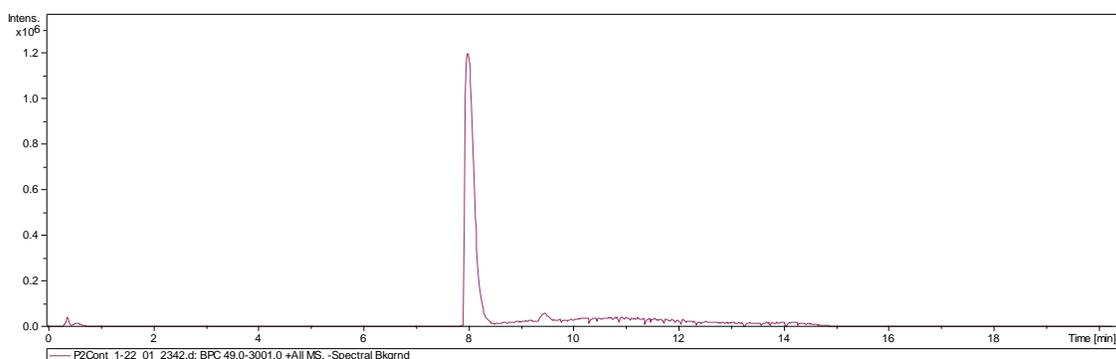


Figura 7. Cromatograma em sistema CLAE com coluna C18 injetada com o peptídeo P2C7. O pico com 8 minutos de retenção referente ao peptídeo foi eluído da coluna para análise posterior de sua massa.

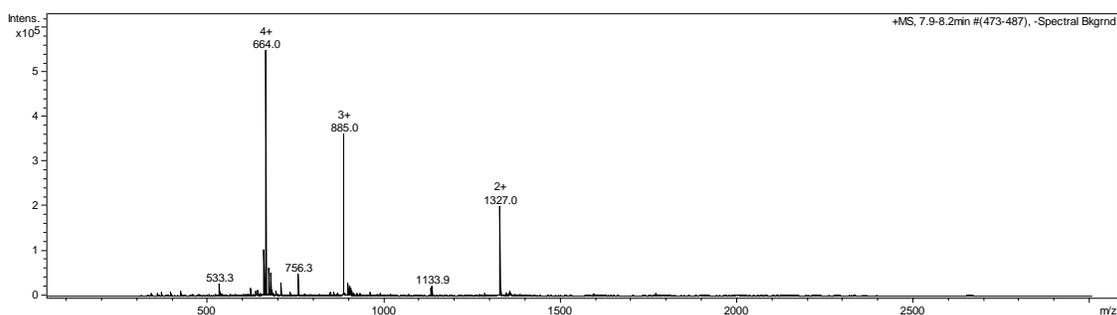


Figura 8. Espectro de massas do pico coletado referente ao peptídeo P1A3. Acima de cada pico estão os estados de carga, indicando os números de cargas pelo qual o peptídeo se encontra ionizado, resultando na massa molecular de 2652 daltons.

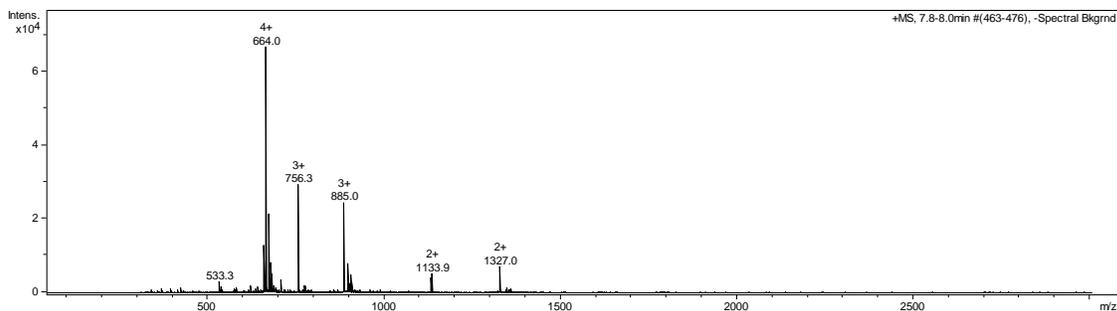


Figura 9. Espectro de massas referente ao pico coletado do peptídeo P2C7. O cálculo considerando os estados de carga dos picos apresentados no espectro resulta em uma massa molecular de 2507 daltons.

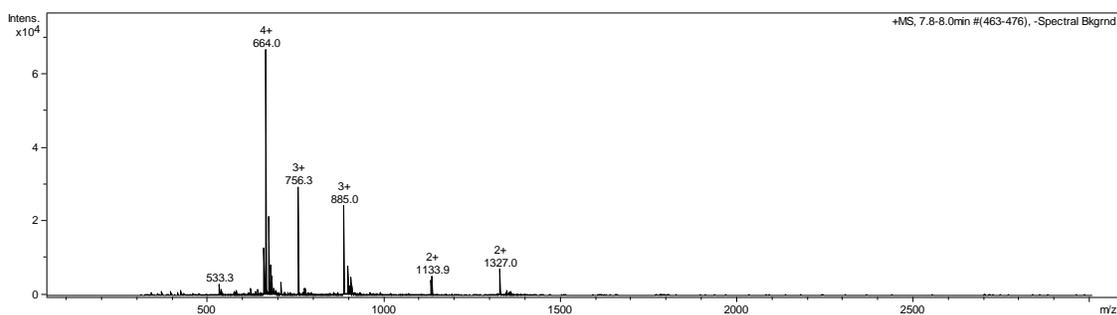


Figura 10. Espectro de massas do peptídeo P1A3 após ser submetido às condições de radiomarcagem com pH 4,0 e aquecimento a 95°C. A massa molecular não sofreu alteração nessas condições.

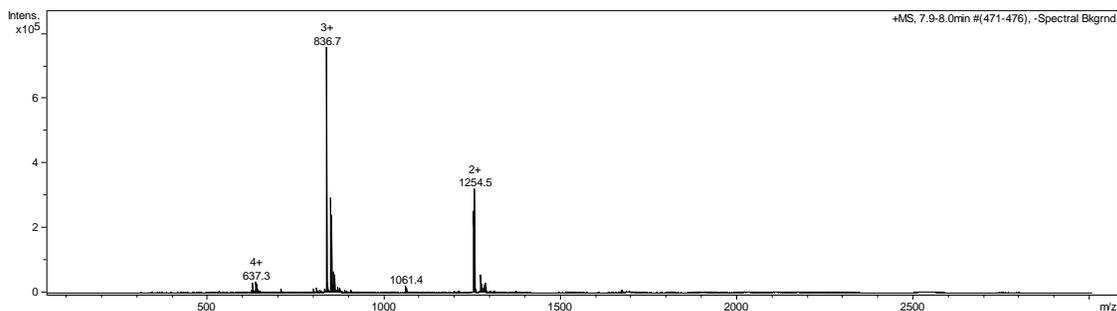
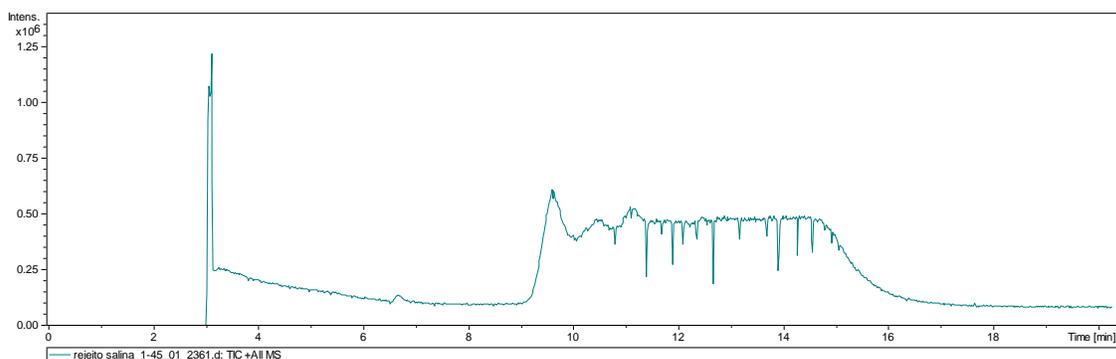
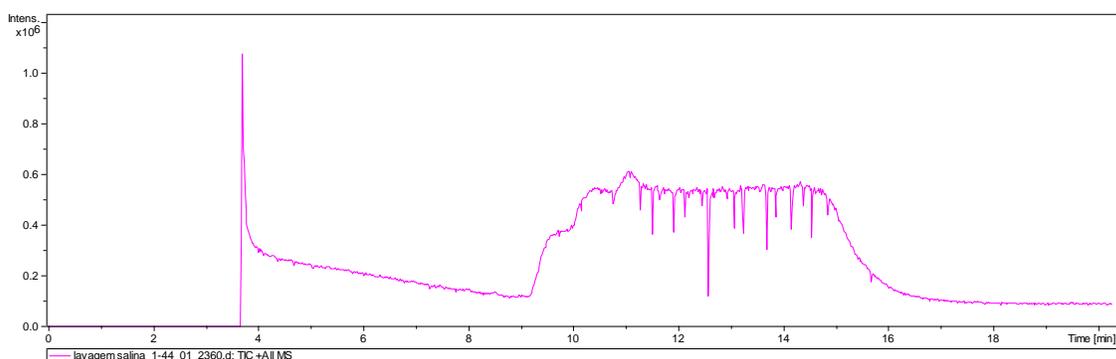


Figura 11. Espectro de massas do peptídeo P2C7 mediante às condições de radiomarcagem. Nenhuma alteração na massa molecular do peptídeo foi observada nessa análise.

A



B



C

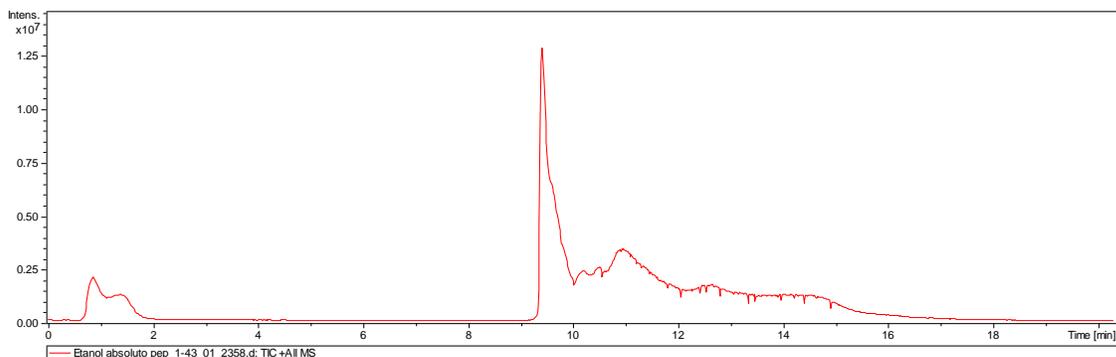


Figura 12. Cromatogramas do sistema CLAE de amostras "frias" coletadas pelas etapas da purificação em cartucho Sep-Pak C18. Foram avaliados os cromatogramas a partir de amostras coletadas do rejeito da purificação referente ao material que passou direto pelo cartucho C18 (A), da lavagem do cartucho com salina (B) e do material eluído (C). Somente nesta última etapa confirmou-se a presença de um pico semelhante ao do peptídeo P1A3.

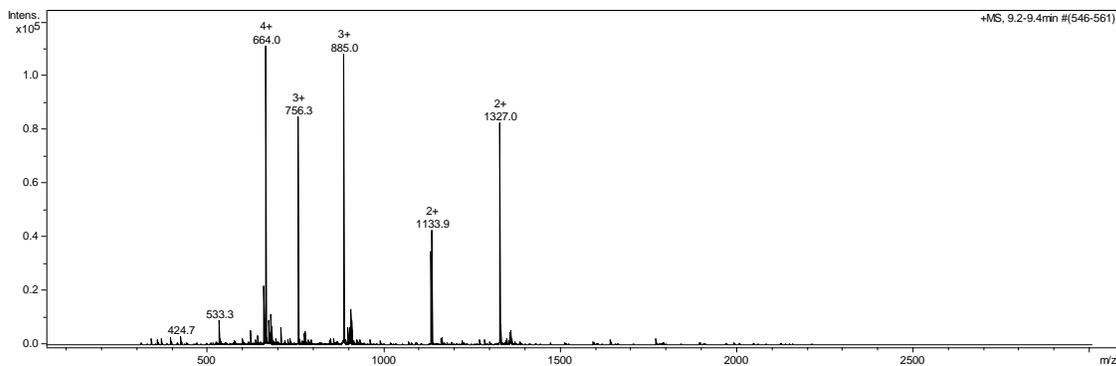


Figura 13. Espectro de massas do pico coletado do sistema CLAE da etapa de eluição do cartucho Sep-Pak C18. A massa molecular observada pelo espectro referente aos picos mais proeminentes indica nenhuma alteração.

4.1.2. Padronização da marcação com ^{68}Ga

Para a padronização das condições de radiomarkação, foram avaliados dois tipos de radiomarkação: manualmente, podendo alterar a maioria das condições, e automatizada feita no módulo de marcação com parâmetros pré-determinados. A estabilidade do radiotraçador ^{68}Ga -DOTA-P1A3 com o aumento do tempo após a marcação foi comparado no modo manual ou automatizado. Aproximadamente 74% do produto radiomarcado sem purificação em Sep-Pak C18 foi observado por CCD, mantendo-se estável por 2 horas após a radiomarkação (figura 14). Devido ao sistema automatizado do sistema de radiomarkação no módulo, o peptídeo é sempre purificado em cartucho C18 após a radiomarkação, sendo o eluído analisado por CCD e CLAE, como mostram as figuras 15 e 16. As purezas radioquímicas foram de aproximadamente 95% por CCD e 70% por CLAE. O peptídeo radiomarcado e purificado apresentou-se estável por 4 horas, determinado pelas duas técnicas, apesar da pureza radioquímica determinada por CLAE ter sido menor em relação à avaliação por CCD. Quanto à ligação do radiotraçador às proteínas plasmáticas, foi encontrado que apenas 12,6% se manteve ligado à essas proteínas após 1 h de incubação a 37°C . A quantidade de massa de peptídeo DOTA-P1A3 também foi avaliada quanto à eficiência de marcação pela determinação da pureza radioquímica por CCD, como demonstra a figura 17. Apesar da radiomarkação de DOTA-P1A3 com maior massa de peptídeo aumentar a porcentagem de pureza radioquímica, sua atividade específica automaticamente diminuía, o que não compensaria utilizar o dobro de massa nas próximas radiomarcações, continuando com 19,2 μmol de massa.

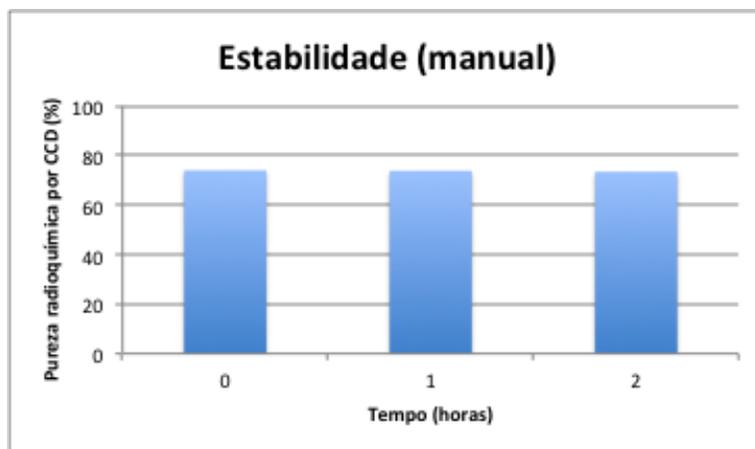


Figura 14. Avaliação da estabilidade de ⁶⁸Ga-DOTA-P1A3 marcado manualmente. O peptídeo radiomarcado sem purificação em cartucho Sep-Pak C18 foi avaliado por fita cromatográfica por CCD.

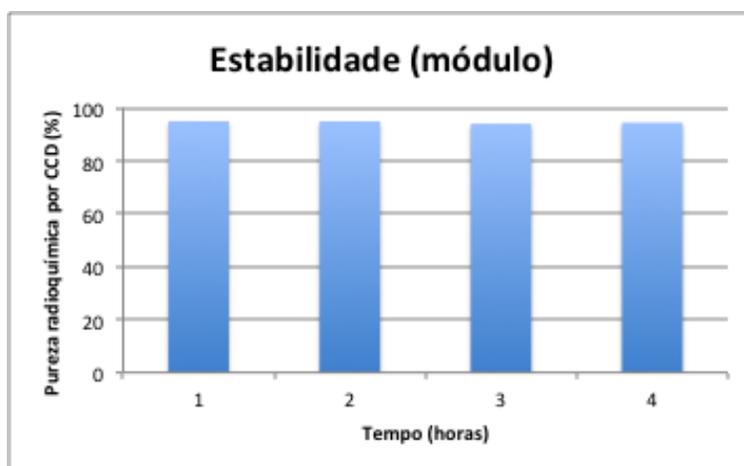


Figura 15. Avaliação da estabilidade de ⁶⁸Ga-DOTA-P1A3 marcado no módulo de síntese automatizado. O peptídeo radiomarcado e purificado em cartucho C18 foi analisado por CCD para determinação de pureza radioquímica e estabilidade pós-marcação por até 4 horas.

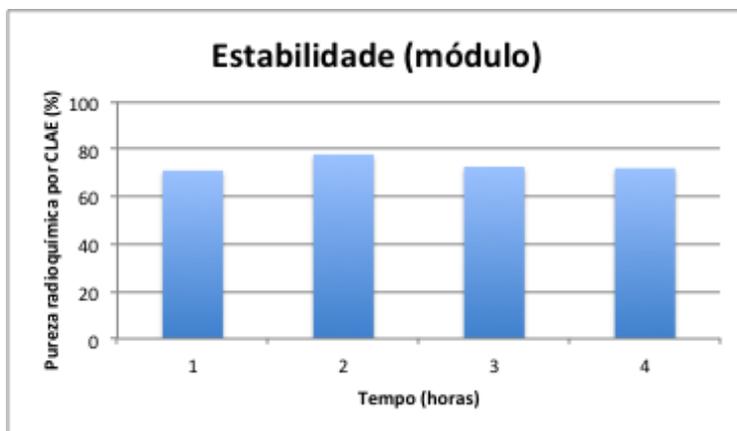


Figura 16. Avaliação da estabilidade do radiotraçador ^{68}Ga -DOTA-P1A3, marcado no módulo automatizado, por CLAE. O peptídeo radiomarcado e purificado apresentou estabilidade ao longo de 4 horas após radiomarcção pela análise por CLAE.

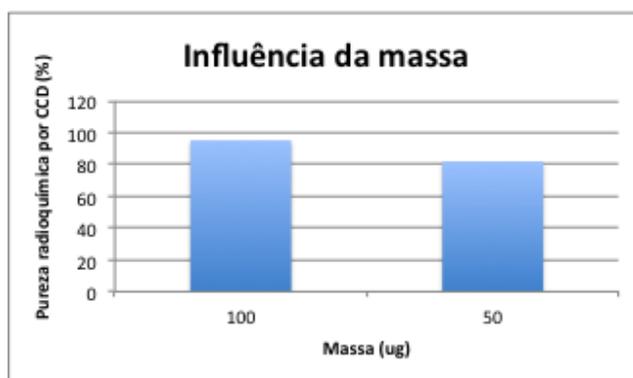


Figura 17. Avaliação da influência da quantidade de massa de peptídeo sobre a radiomarcção com ^{68}Ga .

Utilizando-se um gerador novo de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ com capacidade para eluir maior atividade de ^{68}Ga , foram feitas comparações de radiomarcção manual e automatizada através de análise da pureza radioquímica por CLAE (figuras 18 e 19). No caso da radiomarcção feita de modo manual, a atividade inicial utilizada foi de 1920MBq de ^{68}Ga com atividade final do peptídeo radiomarcado do cartucho C18 de 394MBq, enquanto que no modo automatizado a radiomarcção se iniciou com uma atividade de 1480MBq, resultando em uma atividade de 349MBq de peptídeo radiomarcado e purificado. Apesar de ambas marcações terem sido realizadas em modos diferentes, a pureza radioquímica avaliada por CLAE demonstrou que o modo automatizado apresentou um produto final mais puro, considerando que as atividades finais do peptídeo radiomarcado foram muito próximas.

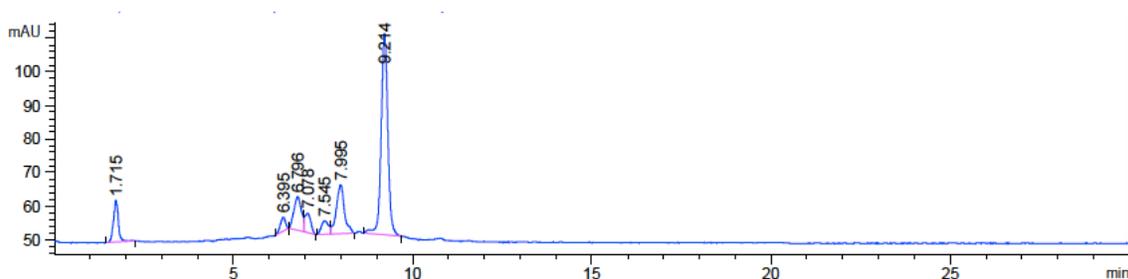


Figura 18. Avaliação da pureza radioquímica de ^{68}Ga -DOTA-PIA3 marcado de modo manual. O cromatograma demonstrou um pico proeminente com 9,2 minutos de tempo de retenção, com a presença de alguns picos menores, reduzindo a pureza radioquímica para 54%.

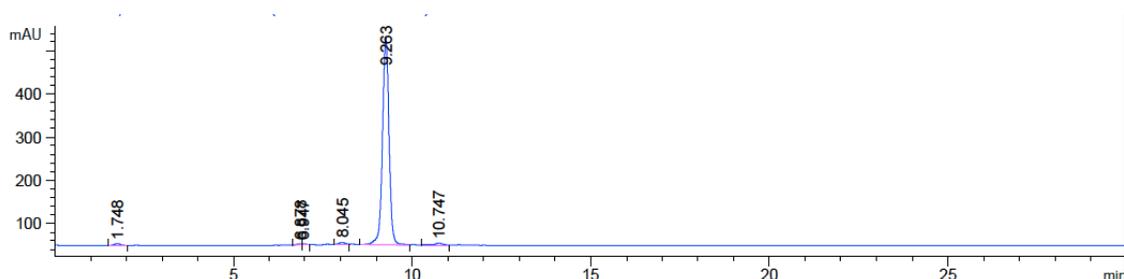


Figura 19. Avaliação da pureza radioquímica de ^{68}Ga -DOTA-PIA3 marcado no módulo de síntese automatizado. O peptídeo radiomarcado e purificado apresentou tempo de retenção de 9,2 minutos pelo sistema CLAE com 97% de pureza radioquímica.

No entanto, a radiomarcagem do peptídeo utilizando o gerador antigo de $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ com menor atividade de ^{68}Ga eluído demonstrou um produto radiomarcado com tempo de retenção diferente (figura 20) do peptídeo "frio" analisado por CLAE (figura 21). Em análises anteriores de pureza radioquímica por CLAE, o peptídeo radiomarcado no mesmo gradiente e com os mesmas fases móveis apresentava um pico com aproximadamente 9 minutos de tempo de retenção. Na análise da figura 20, o produto de radiomarcagem com ^{68}Ga apresenta 14,6 minutos de tempo de retenção.

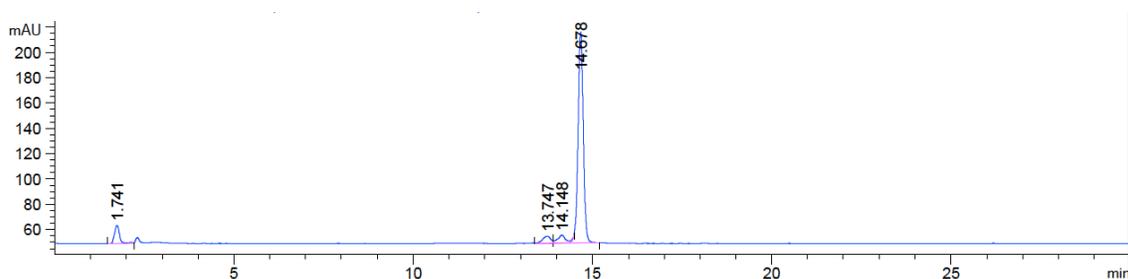


Figura 20. Cromatograma de CLAE com injeção de ^{68}Ga -DOTA-PIA3 sem purificação. O cromatograma apresenta somente um pico com um tempo de retenção de 14,6 minutos.

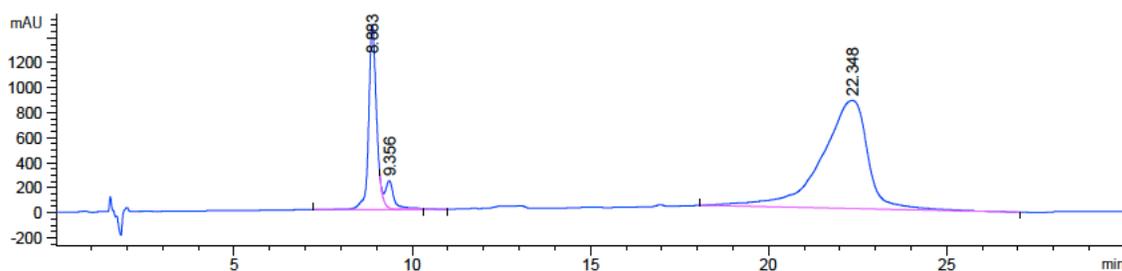


Figura 21. Cromatograma de CLAE com injeção do peptídeo DOTA-P1A3 "frio". Nesta análise, foram injetados 20µg de peptídeo e um pico proeminente foi observado com 8,8 minutos de tempo de retenção e um pico menor com 9,3 minutos de retenção.

Dado esses resultados divergentes quanto ao tempo de retenção do peptídeo radiomarcado e "frio", foi realizado uma nova análise de espectrometria de massa para verificar a possibilidade de degradação do peptídeo. Primeiramente, foi realizada uma cromatografia em coluna C18 no HPLC acoplado ao espectrômetro de alta resolução (figura 22).

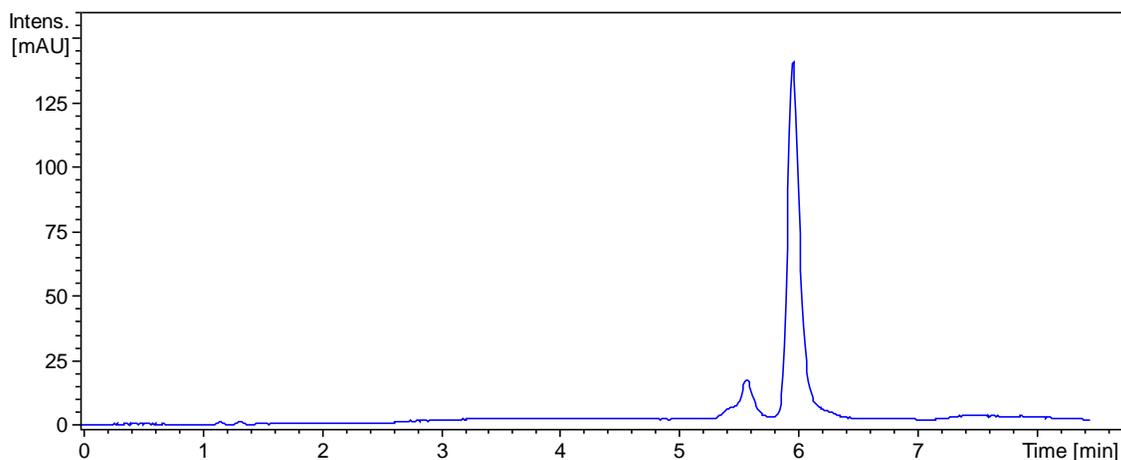


Figura 22. Cromatograma em coluna C18 com injeção de uma amostra do peptídeo DOTA-P1A3. A presença de 2 picos foram detectadas neste cromatograma, o primeiro pico com 5,7 minutos e o segundo com 6 minutos de tempo de retenção.

Devido à presença desses 2 picos no cromatograma, cada pico foi coletado e seus espectros de massa foram analisados posteriormente, como mostram as figuras 23 e 24. O primeiro pico com 5,7 minutos de retenção parece ser referente ao peptídeo sem o quelante DOTA, dado que DOTA possui uma massa molecular de apenas 404 daltons, o que seria aproximadamente a massa que falta a este pico que apresenta 2261,9 daltons, enquanto que

o segundo pico apresenta massa molecular de 2648 daltons, mais próximo das análises anteriores de 2652 daltons. Subtraindo-se a massa do segundo pico pelo do primeiro pico existe uma diferença de 386 daltons, que pode ser referente ao DOTA livre. As análises confirmaram que existe uma pequena degradação do peptídeo DOTA-P1A3 e que ocorreu devido à perda de ligação do peptídeo ao quelante DOTA. Por isso, uma nova síntese desses peptídeos foi solicitada à Chinese Peptide Company e os todos os seguintes experimentos foram realizados com novos peptídeos sintéticos.

Após a radiomarcagem e antes de injetar o radiotraçador nos camundongos, foi avaliado a estabilidade em soro humano (figura 25). Aproximadamente 80% de pureza radioquímica do radiotraçador se manteve após esse período de incubação.

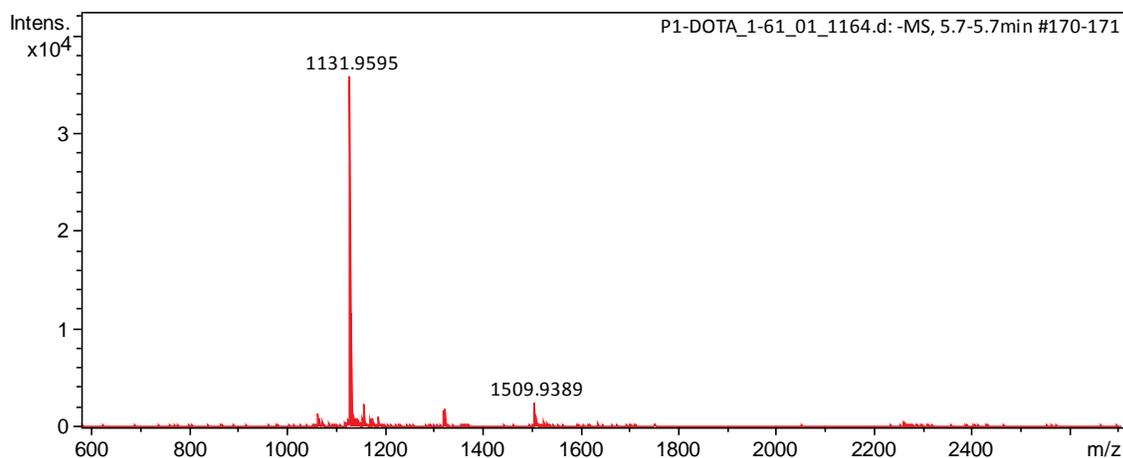


Figura 23. Espectro de massas do pico coletado de 5,7 minutos. A massa encontrada para este pico demonstra ter 386 daltons a menos do que o peptídeo DOTA-P1A3.

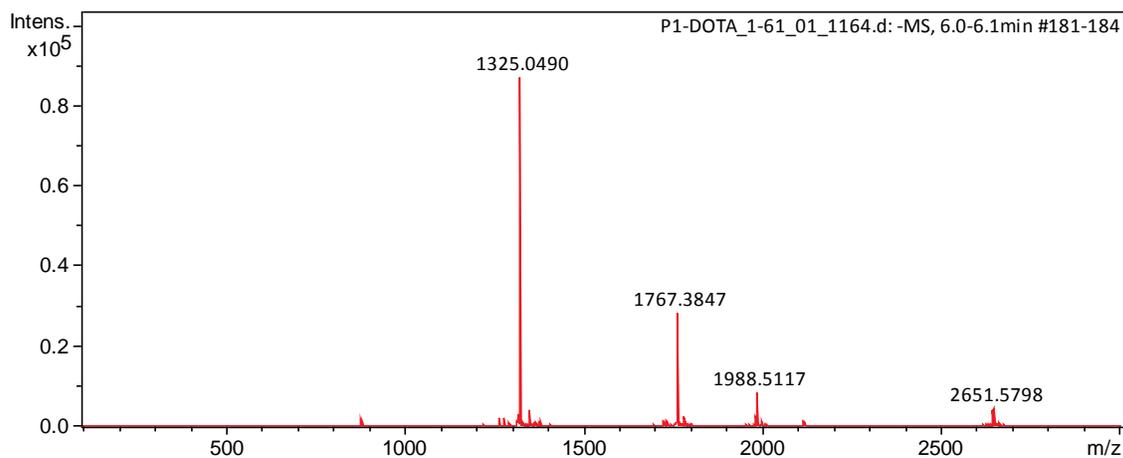


Figura 24. Espectro de massas do pico de 6 minutos de retenção. A massa do maior pico encontrado foi de 2648 daltons, o que provavelmente corresponde ao peptídeo com DOTA.

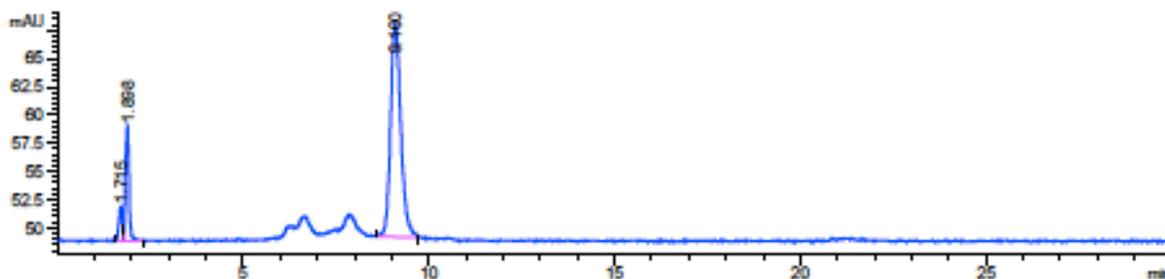


Figura 25. Cromatograma de CLAE de ^{68}Ga -DOTA-P1A3 após incubação em soro humano a 37°C por 1 h. O pico correspondente ao peptídeo marcado ^{68}Ga -DOTA-P1A3 de 9,1 min apresentou 80% de pureza radioquímica após o período de incubação em soro por 1h.

4.1.3. Biodistribuição do ^{68}Ga -DOTA-P1A3 em camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$

Estudos de biodistribuição do radiotraçador ^{68}Ga -DOTA-P1A3 foram realizados em camundongos $\text{LDLR}^{-/-}$ controle (figura 26) e em camundongos tratados com dieta hipercolesterolêmica (figura 27). Com os dados obtidos, foram calculados as porcentagens de atividade injetada (% AI) e de dose injetada por grama de tecido (% AI/g) que estão demonstrados nos gráficos abaixo. Além disso, para descontar as porcentagens de atividade do radiotraçador que estão apenas na circulação e ainda não atingiram o seu alvo molecular (sinal de background), foram calculadas as relações alvo/background: aorta/sangue, aorta/coração e coração/sangue, demonstradas nas figuras 28A, 28B e 28C, respectivamente. Embora as relações encontradas no tempo de 60 min apresentaram uma pequena diferença, foi possível observar que há um pequeno aumento em todas as relações no animal hipercolesterolêmico comparado ao controle.

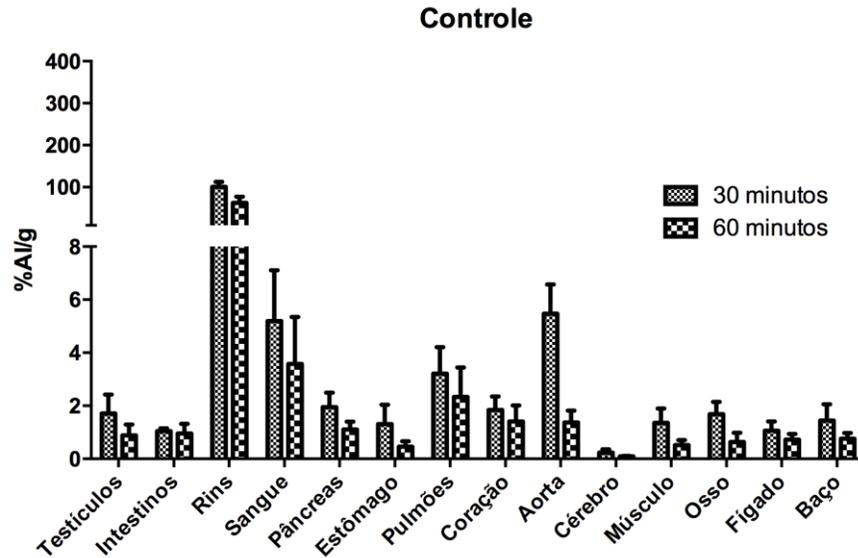


Figura 26. Biodistribuição de ^{68}Ga -DOTA-P1A3 em camundongos LDLR^{-/-} controle. O peptídeo DOTA-P1A3 radiomarcado com ^{68}Ga foi injetado (2,22MBq) em camundongos LDLR^{-/-} (sem dieta hipercolesterolêmica).

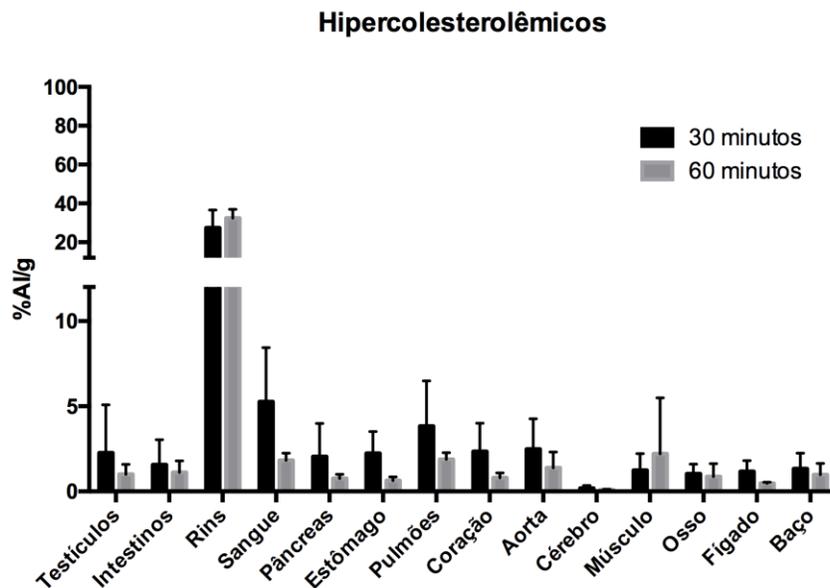


Figura 27. Biodistribuição de ^{68}Ga -DOTA-P1A3 em camundongos hipercolesterolêmicos. Após a radiomarcagem, uma dose de 2,22MBq foi injetada em camundongos LDLR^{-/-} que receberam dieta hipercolesterolêmica por 4 meses.

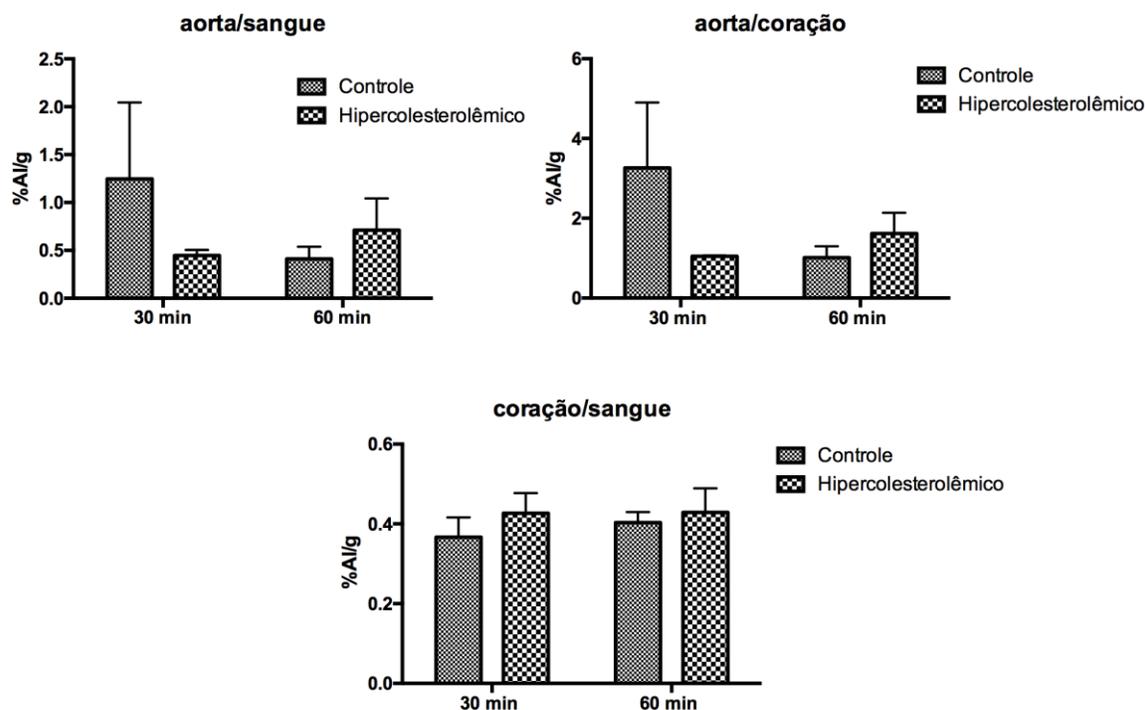


Figura 28. Relação alvo/background de % AI/g em camundongos controle e hipercolesterolêmicos com $^{68}\text{Ga-DOTA-P1A3}$. Com base nas porcentagens de atividade injetada por grama, as médias de captação do radiotraçador na aorta, 30 e 60 min após a injeção, foram divididas pelas médias obtidas para o sangue, o mesmo foi feito para a relação aorta/coração e coração/sangue.

4.1.4. Imagens PET/CT com $^{68}\text{Ga-DOTA-P1A3}$

A captação do radiotraçador $^{68}\text{Ga-DOTA-P1A3}$ nos camundongos LDLR^{-/-} controle e hipercolesterolêmico foram analisadas através da aquisição de imagens PET/CT e PET como mostra a figura 29. A região do arco aórtico foi delimitada e a captação do radiotraçador foi calculada usando a medida das VOIs (figura 30). Os dados de %AI/g e %AI/g máximo (considerando o valor mais alto como 100%) indicam que a captação na região do arco aórtico para o camundongo hipercolesterolêmico é mantida por mais tempo em relação ao camundongo controle. Em outra imagem, foram delimitadas VOIs para alguns órgãos (figuras 31 e 32) e partir da média desses VOIs foram calculadas a porcentagem de captação em cada órgão, como segue apresentado nos gráficos da figura 33. Segundo os dados de porcentagens de captação, é possível observar somente uma pequena diferença de captação no coração do animal hipercolesterolêmico em relação ao controle.

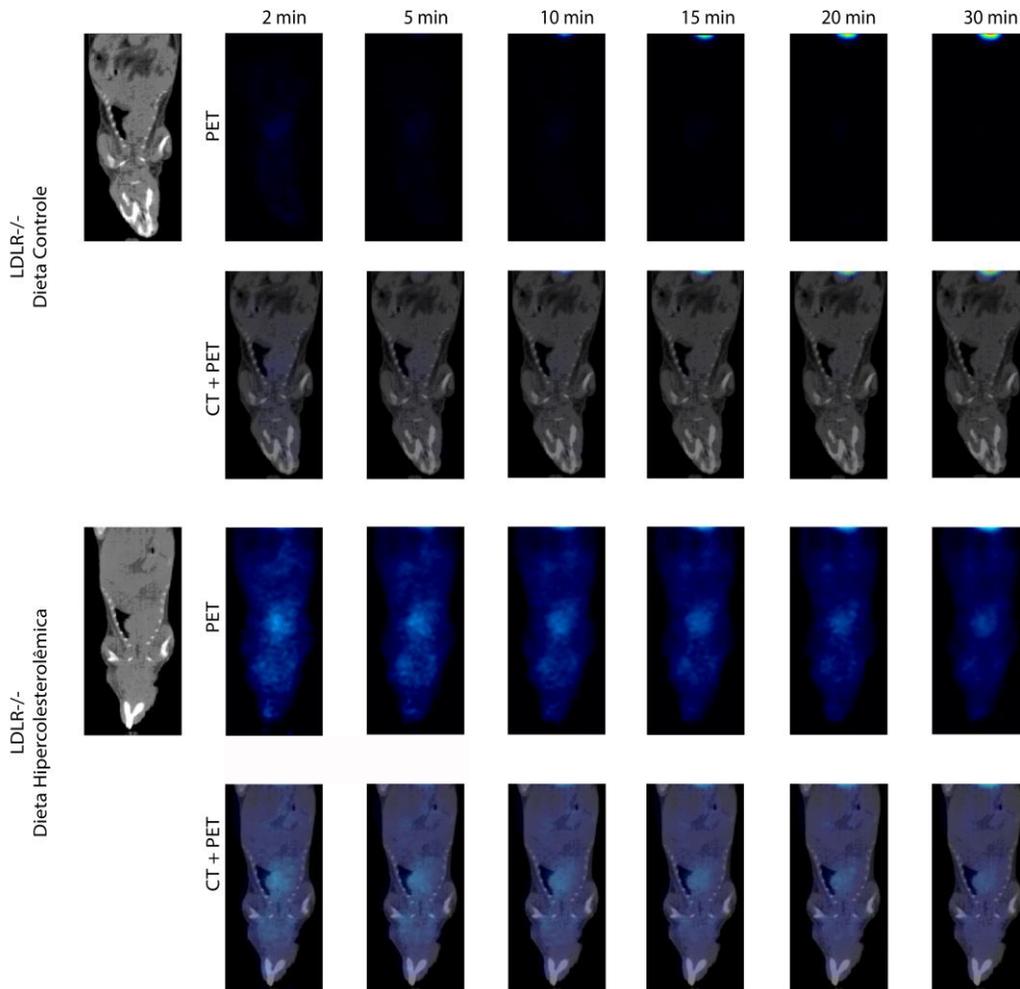


Figura 29. Imagens PET/CT, na visão coronal, adquirida de camundongos LDLr^{-/-} injetados com ⁶⁸Ga-DOTA-P1A3. Após a injeção do radiotraçador, imagens dinâmicas foram adquiridas demonstrando sua captação na região do arco aórtico.

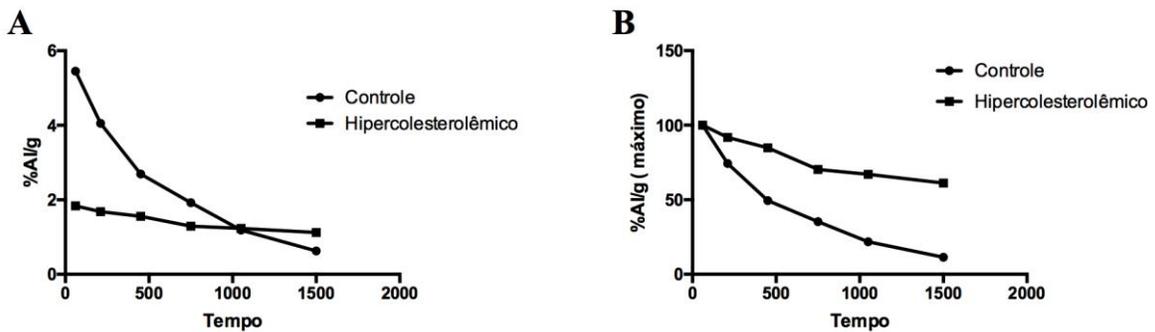


Figura 30. Porcentagens de captação em camundongos LDLr^{-/-} controle e hipercolesterolêmico injetados com ⁶⁸Ga-DOTA-P1A3. Os dados de captação estão representados como %AI/g (A). Considerando o valor mais alto de captação como 100%, foram calculados os dados de %AI/g máximo (B).

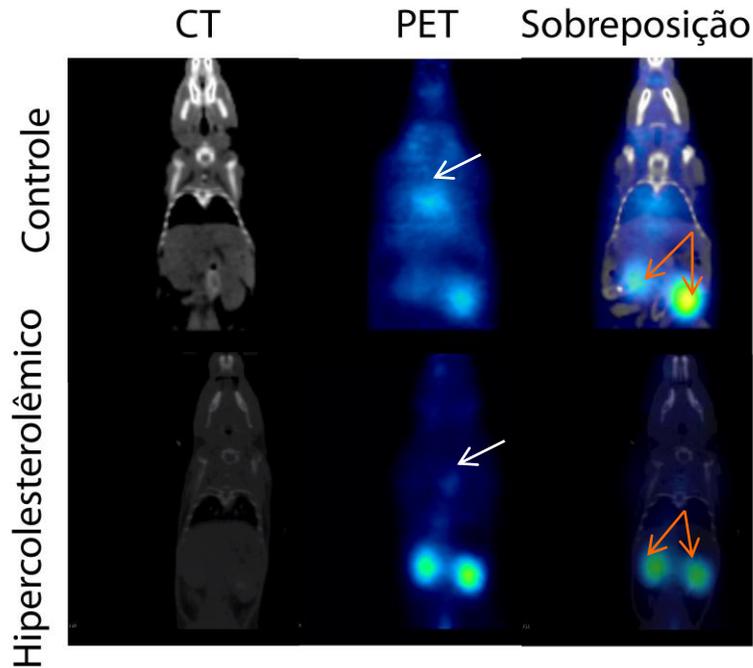


Figura 31. Imagens representativas CT, PET e a sobreposta PET/CT dos camundongos LDLR^{-/-} controle e hipercolesterolêmico que receberam ⁶⁸Ga-DOTA-P1A3. Imagens na visão coronal foram adquiridas em protocolo de 10 min de aquisições, demonstrando a eliminação renal do radiotraçador indicado pelas setas vermelhas. A seta branca indica a região do coração.

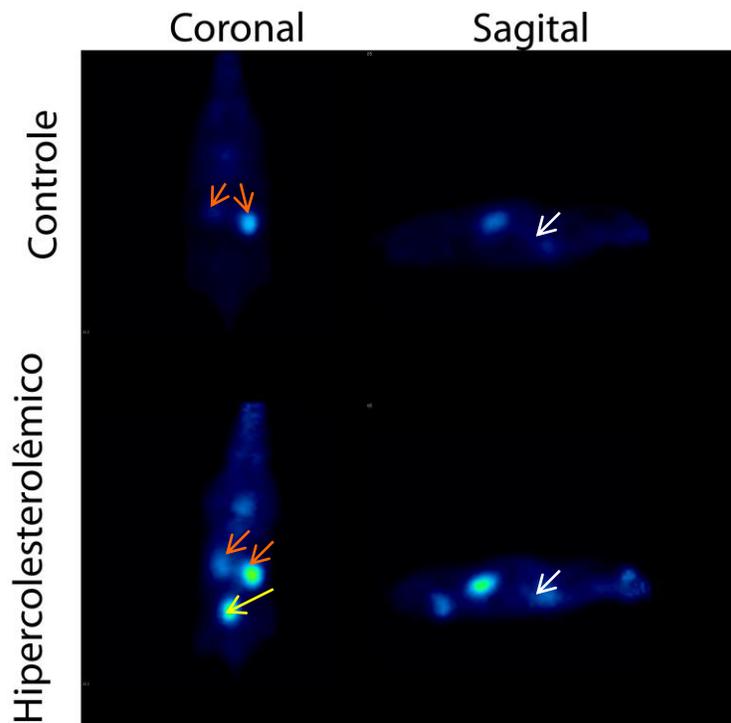


Figura 32. Imagens PET de camundongos LDLR^{-/-} controle e hipercolesterolêmico injetados com ⁶⁸Ga-DOTA-P1A3. Imagens representativas de aquisições PET nas visões coronal e sagital demonstram a captação

do radiotraçador, sendo que os rins estão indicados pelas setas vermelhas, a bexiga pela seta amarela e o coração pela seta branca.

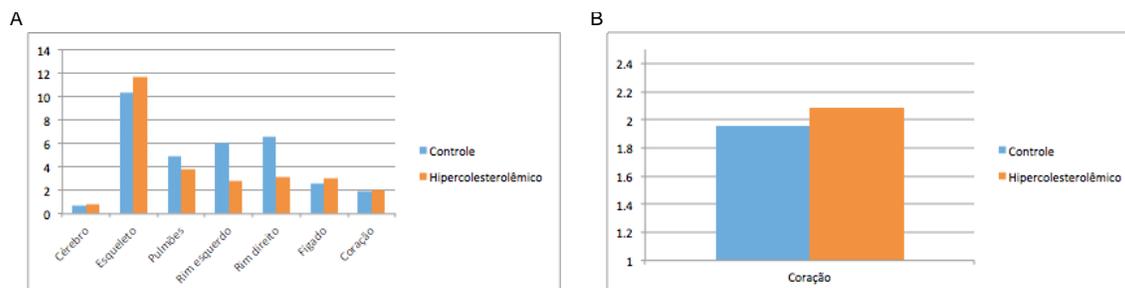


Figura 33. Gráficos de porcentagens de captação de ^{68}Ga -DOTA-P1A3 nos diferentes órgãos comparando os camundongos LDLR^{-/-} hipercolesterolêmico em relação ao controle. Através da delimitação de VOIs para cada órgão, foram calculadas porcentagens de captação no cérebro, esqueleto, pulmão, rins, fígado e coração (A). Em detalhe está a captação apenas no coração nos camundongos controle e hipercolesterolêmico (B).

Assim como foi observado no estudo de biodistribuição, as imagens PET demonstram a eliminação rápida, através de filtração renal em ambos os camundongos, pois as aquisições de imagem foram de apenas 10 minutos.

4.1.5. Padronização da marcação de DOTA-P2C7 com ^{68}Ga

Utilizando peptídeos adquiridos a partir de uma nova síntese, foi realizada a radiomarkação de DOTA-P2C7 no método manual em condições similares ao realizado para o peptídeo DOTA-P1A3, purificando-se o produto radiomarcado em Sep-Pak C18 e avaliando-se sua pureza radioquímica do produto final obtido (figura 34). Nesta radiomarkação, não foi observada nenhuma degradação com este peptídeo, e principalmente após a purificação em cartucho Sep-Pak e com a adição de ácido ascórbico e ácido gentísico, o produto final apresentou uma pureza radioquímica de 97,3%. O peptídeo "frio" DOTA-P2C7 também foi analisado por CLAE a fim de se comparar os tempos de retenção com o radiomarcado (figura 35). Os tempos de retenção encontrados para o radiotraçador e peptídeo "frio" foram de 12,7 e 10,8 minutos, respectivamente. As pequenas diferenças nos tempos de retenção podem ser devido à presença de resíduos de etanol absoluto utilizado para purificação em Sep-Pak no peptídeo radiomarcado que podem alterar a hidrofobicidade do composto, aumentando assim seu tempo de retenção. Além disso, as porcentagens obtidas com relação ao rendimento da marcação foram de 53,7-59,9% (n=2). O estudo de estabilidade em soro humano demonstrou que cerca de

apenas 16% da pureza radioquímica se perdeu após o período de incubação de 1h (figura 36).

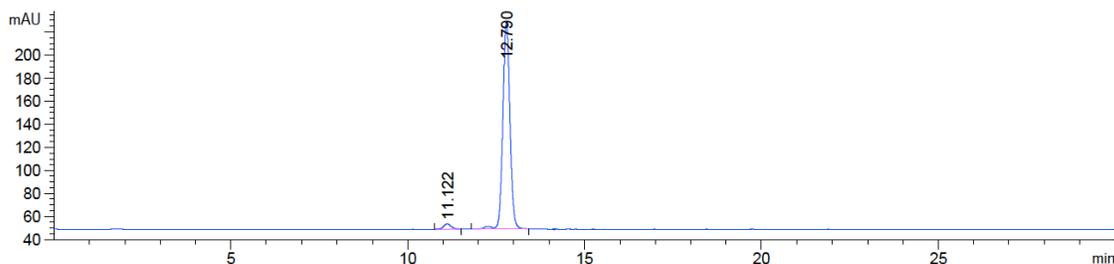


Figura 34. Cromatograma de CLAE do radiotraçador ^{68}Ga -DOTA-P2C7. A pureza radioquímica do radiotraçador foi avaliada por CLAE, demonstrando mais de 95% de pureza pelo cromatograma.

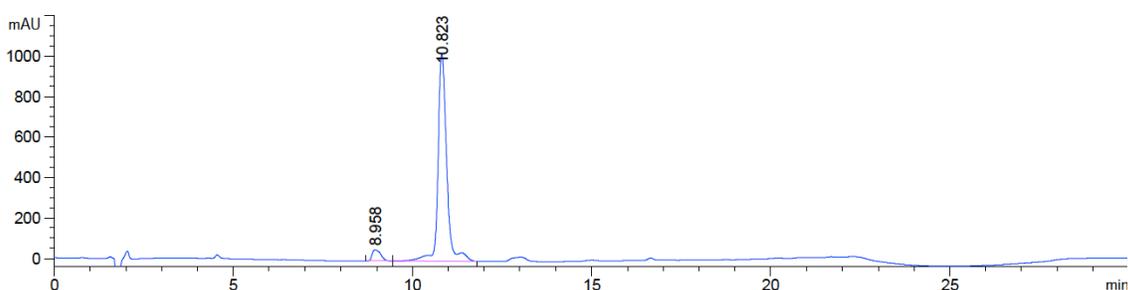


Figura 35. Cromatograma de CLAE do peptídeo "frio" DOTA-P2C7. Aproximadamente 20 μg de peptídeo foi injetado para análise por CLAE, demonstrando a integridade do peptídeo de nova síntese.

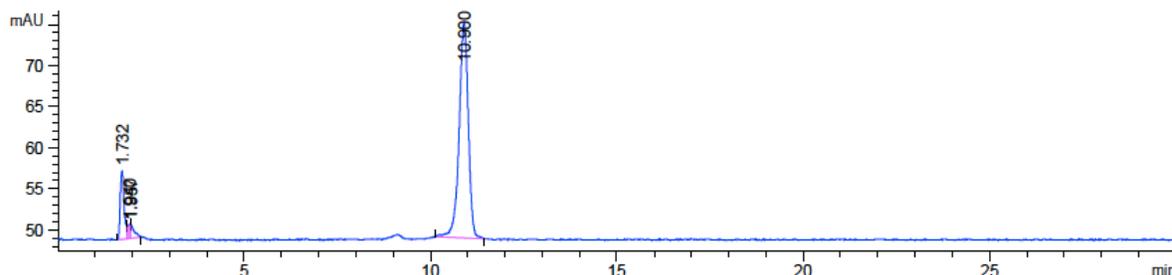


Figura 36. Cromatograma de CLAE de ^{68}Ga -DOTA-P2C7 após incubação em soro humano a 37°C por 1 h. Aproximadamente 84% de pureza radioquímica de ^{68}Ga -DOTA-P2C7 foi encontrado pela análise por CLAE após incubação em soro a 37 °C por 1h. O pico de 1,7 min corresponde ao ^{68}Ga livre.

4.1.6. Imagens PET/CT com ^{68}Ga -DOTA-P2C7

A confirmação da marcação de DOTA-P2C7 com ^{68}Ga , gerando um produto final com mais de 95% de pureza radioquímica permitiu a continuidade do estudo com este radiotraçador, avaliando a captação nos camundongos LDLR^{-/-} controle e hipercolesterolêmico por imagens PET/CT. As imagens PET/CT demonstraram que a captação no coração foi aparentemente maior do que no animal controle no mesmo órgão. Através da aquisição das imagens, também foi quantificada a captação do radiotraçador na

região do arco aórtico que foi anatomicamente localizado na imagem CT co-registrado com PET (figura 37).

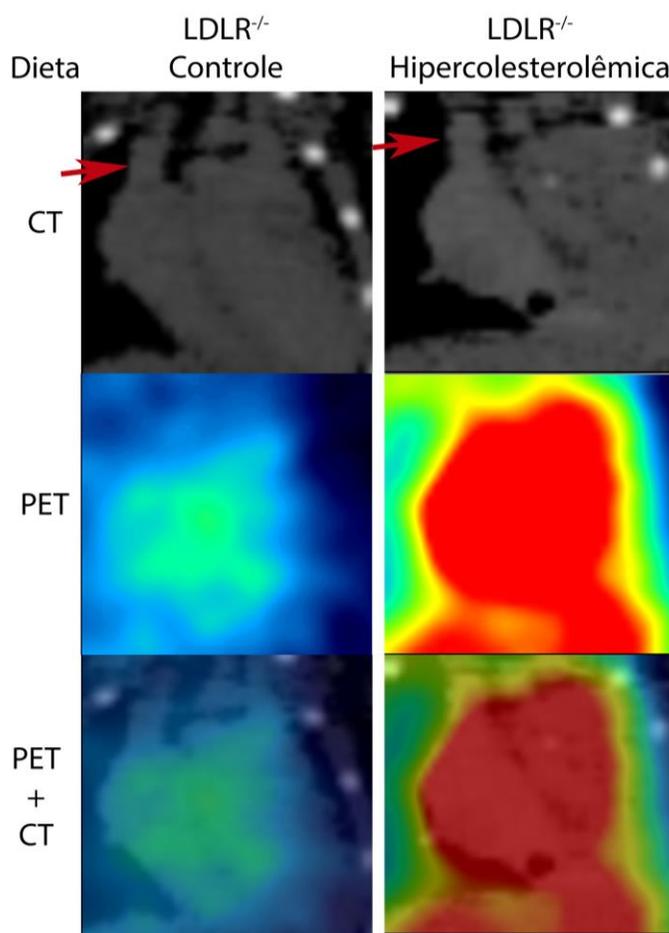


Figura 37. Imagens PET, CT e sobrepostas PET/CT com camundongos LDLR^{-/-} controle e hipercolesterolêmico que receberam injeção de ⁶⁸Ga-DOTA-P2C7. Imagens dinâmicas foram adquiridas a partir de 2 min até 30 min após a injeção do radiotraçador. As setas vermelhas indicam a região do arco aórtico.

A quantificação demonstrou maior captação no camundongo hipercolesterolêmico desde os primeiros frames de aquisição dinâmica e esta tendência foi apenas aumentando a diferença de captação até o último tempo, conforme o gráfico demonstra na figura 38A com dados de porcentagem de atividade injetada por grama e na figura 38B, com o gráfico considerando o valor máximo como 100% comparando-se aos outros tempos analisados. No gráfico da figura 38B, diferença significativa foi observada nos tempos de 750 a 1500 s de aquisição, enquanto que na figura 38A a única diferença significativa foi encontrada para o tempo de 1050 s de aquisição de imagem PET. Os frames adquiridos até 30 min após

a injeção do radiotraçador durante a aquisição dinâmica no camundongo LDLR^{-/-} hipercolesterolêmico foi comparado com o camundongo controle (figura 39).

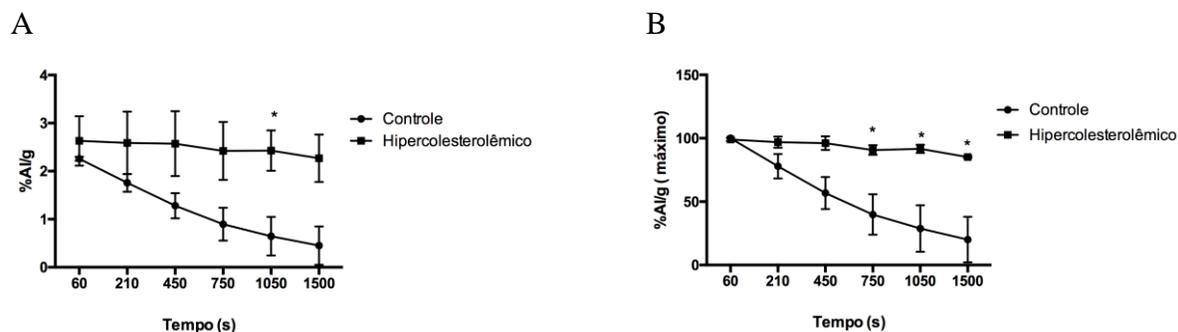


Figura 38. Quantificação da captação de ⁶⁸Ga-DOTA-P2C7 na região do arco aórtico nos camundongos LDLR^{-/-} controle e hipercolesterolêmico. A porcentagem de atividade injetada por grama (%AI/g) durante os tempos de aquisição dinâmica demonstrou maior captação no camundongo hipercolesterolêmico (A). O valor máximo considerado como a porcentagem de 100% comparado ao restante dos tempos adquiridos pelas imagens dinâmicas manteve o aumento da diferença com o aumento do tempo (B). *p<0,05

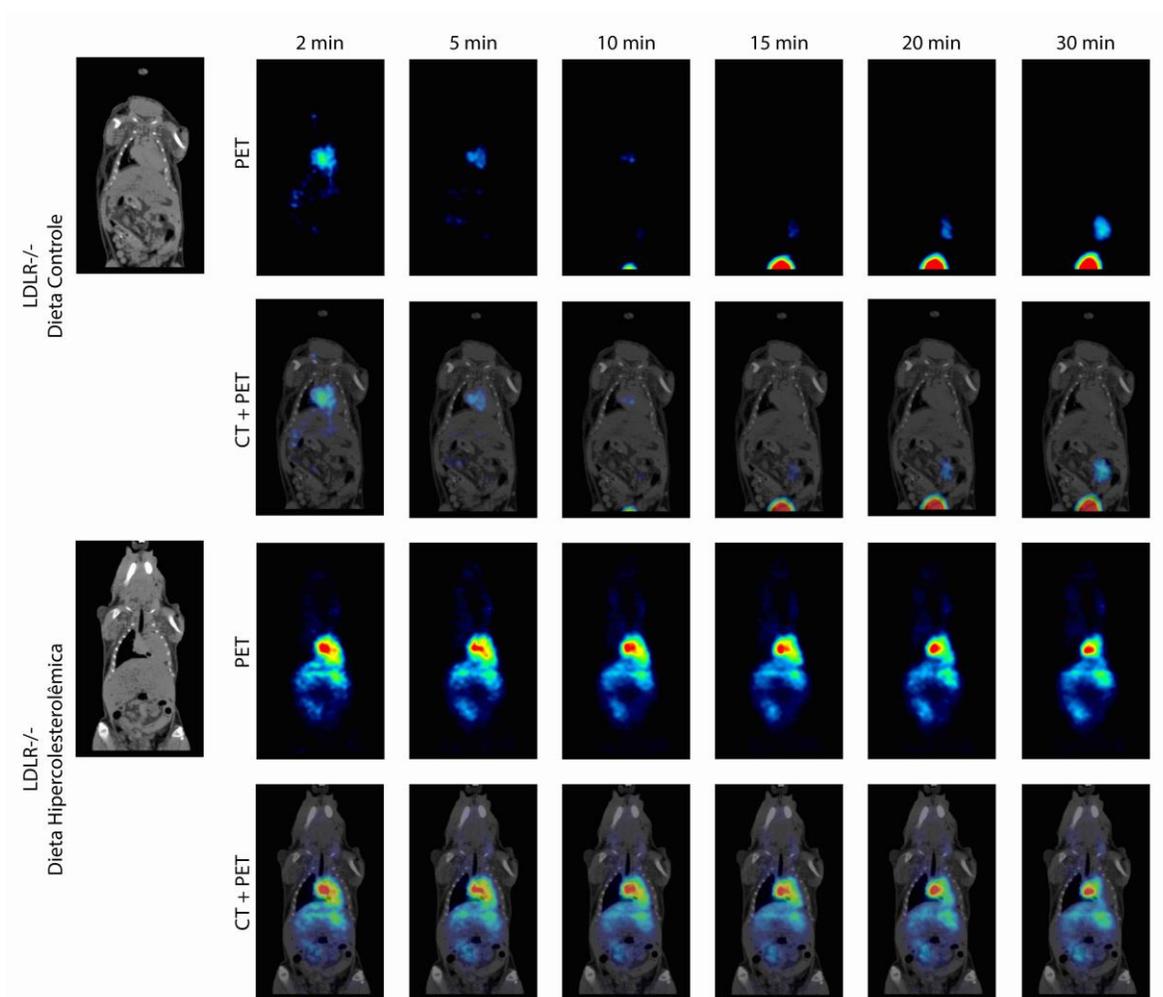


Figura 39. Imagens dinâmicas representativas PET/CT adquiridas em um protocolo de até 30 min após injeção do radiotraçador nos camundongos LDLR^{-/-} controle e hipercolesterolêmico.

4.2. ^{99m}Tc

4.2.1. Padronização de marcação de HYNIC-P2C7

Como atualmente existe um único gerador de ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga que é utilizado para produção dos radiofármacos comercializados pelo IPEN e para a pesquisa, surgiram algumas dificuldades de disponibilidade de acesso ao radioisótopo ⁶⁸Ga do gerador para marcação. Isso dificultou a realização dos estudos de biodistribuição para o peptídeo P2C7, uma vez que a marcação só era possível a partir da última eluição do dia a partir das 14h, horário do qual impossibilitava a contagem em contador automático que deveria ser utilizado até às 16 h e a meia-vida curta do ⁶⁸Ga não permitia a contagem dos órgãos no dia posterior. Por isso, optou-se por se concentrar na marcação de P2C7 com ^{99m}Tc que possui

6h de meia-vida, do qual sua disponibilidade independe de eluições destinadas para produção. Foi observado que o peptídeo HYNIC-P2C7 em solução é rapidamente degradado (ou agregado) e perde a eficiência de marcação, por isso, as marcações realizadas para o estudo de biodistribuição utilizaram peptídeos solubilizados apenas no dia da marcação. Ácido gálico e ácido ascórbico a uma concentração final de 1mM foram adicionados às reações na tentativa de se reduzir a porção degradada no produto final marcado (já purificado em Sep-Pak C18), mas não apresentaram nenhum efeito. A atividade específica do produto final foi aproximadamente 20 MBq/ηmol e o rendimento resultou em uma média de 51,7% (n=4). O peptídeo foi marcado com cloreto de estanho e tricina como co-ligante, purificado em Sep-Pak C18 para remoção do ^{99m}Tc livre solúvel e em formato de colóide. O ^{99m}Tc solúvel livre é facilmente removido na lavagem do cartucho com salina e o ^{99m}Tc colóide permanece retido no cartucho e não é eluído com etanol absoluto. Então, o ^{99m}Tc -HYNIC-P2C7 foi analisado por CLAE conforme demonstra a figura 40, com 100% de pureza radioquímica, tendo um tempo de retenção muito próximo ao peptídeo "frio" (figura 41). Além disso, um teste de estabilidade *in vitro* em soro humano a 37°C durante 1 h demonstrou que 97% do peptídeo radiomarcado se manteve estável nessas condições (figura 42).

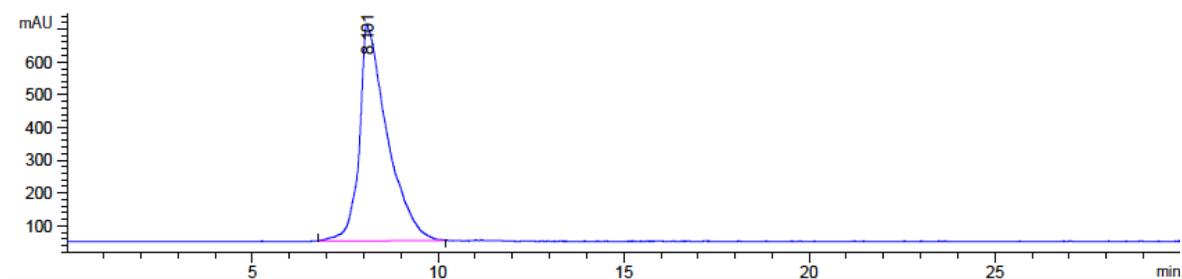


Figura 40. Cromatograma de análise do radiotraçador ^{99m}Tc -HYNIC-P2C7 demonstrando 100% de pureza radioquímica. O produto foi analisado utilizando a coluna C18 μ Bondapak preparativa, demonstrando um único pico com 8,1 min de retenção correspondente ao radiotraçador ^{99m}Tc -HYNIC-P2C7.

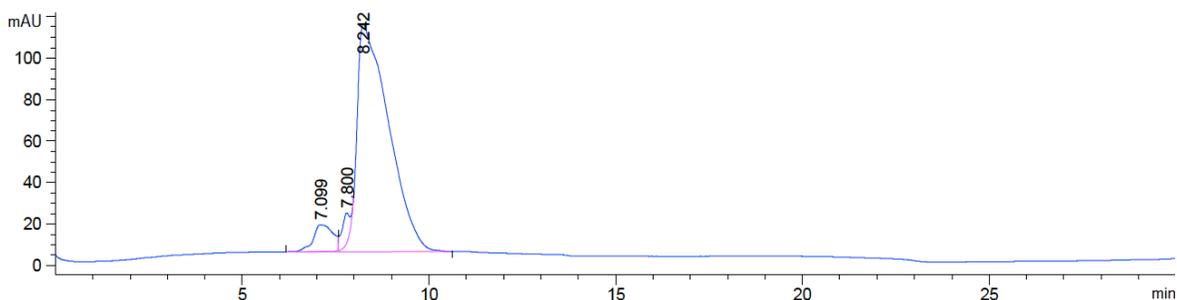


Figura 41. Cromatograma de análise do peptídeo "frio" HYNIC-P2C7 com 20 µg injetados no equipamento CLAE. O peptídeo "frio" apresentou um tempo de retenção de 8,2 min, correspondendo à aproximadamente 90% da área do pico principal.

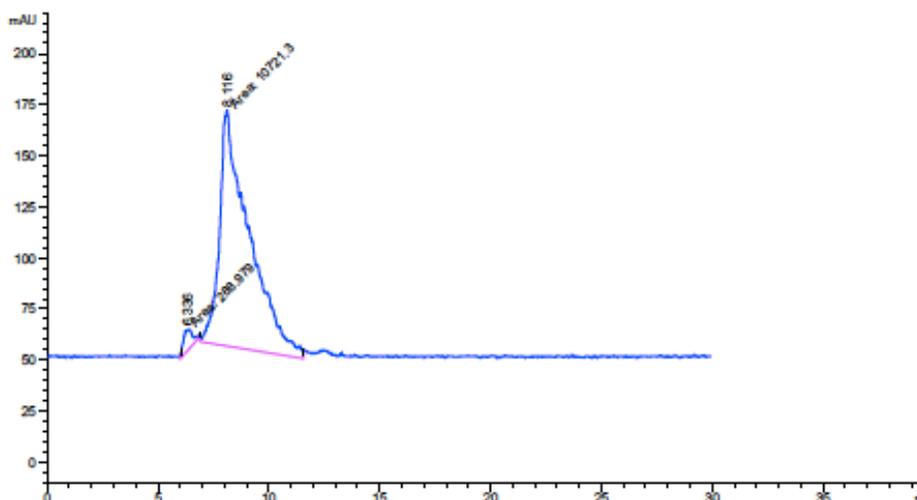


Figura 42. Cromatograma de análise de ^{99m}Tc -HYNIC-P2C7 após incubação em soro humano a 37° C por 1 h. Após o período de incubação em soro, o radiotraçador ^{99m}Tc -HYNIC-P2C7 manteve 97% da pureza radioquímica.

4.2.2. Biodistribuição de ^{99m}Tc -HYNIC-P2C7

Devido aos resultados previamente obtidos de biodistribuição de ^{68}Ga -DOTA-P1A3, observou-se um leve aumento nas relações aorta/sangue, aorta/coração e coração/sangue apenas no tempo 60 min após a injeção, no estudo de biodistribuição de ^{99m}Tc -HYNIC-P2C7 foram avaliados os tempos de 60 e 90 min após a injeção em camundongos LDLR^{-/-} controles (figura 43) e hipercolesterolêmicos (figura 44). Por isso, como no estudo de biodistribuição com ^{68}Ga -DOTA-P1A3, foram avaliadas a interferência do sinal de fundo através das relações de captação de ^{99m}Tc -HYNIC-P2C7 na aorta/sangue, aorta/coração e coração/sangue (figura 45). Nenhuma diferença significativa foi observada nessas relações com os dados de %AI/g, mas quando foi avaliada as relações utilizando

%AI/órgão, diferença foi observada apenas para a relação aorta/coração, o que foi significativamente maior no tempo de 90 min após a injeção do radiotraçador. Além disso, após a coleta de alguns órgãos, fotografias apenas do coração e aorta de um camundongo LDLR^{-/-} controle e um hipercolesterolêmico foram capturadas (figura 46), onde é possível visualizar uma região branca no arco aórtico provavelmente devido à formação de lesão aterosclerótica, considerando que o camundongo recebeu dieta hipercolesterolêmica durante 4 meses.

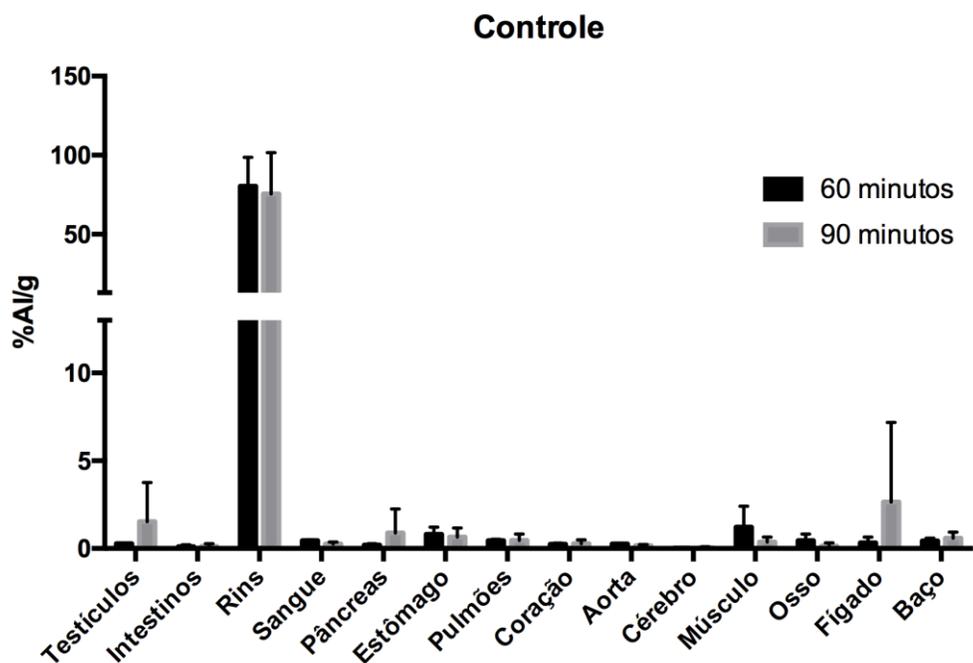


Figura 43. Biodistribuição de camundongos LDLR^{-/-} controle (n=3) que receberam ^{99m}Tc-HYNIC-P2C7 (0,33-6,5MBq). Camundongos foram eutanasiados 60 e 90min após a injeção do radiotraçador, seus órgãos foram coletados, pesados e contados. Os dados estão apresentados como porcentagem de atividade injetado por grama de órgão.

Hipercolesterolêmicos

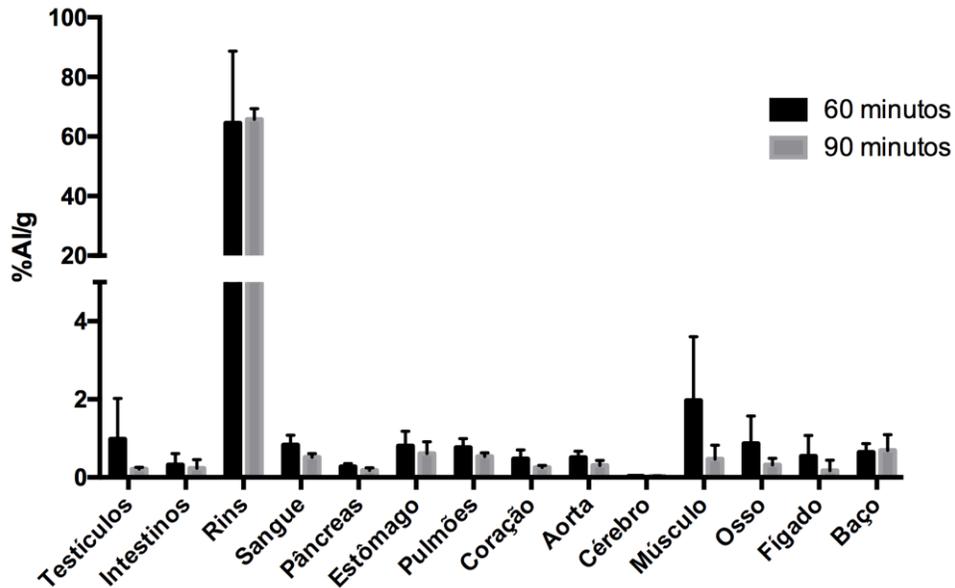


Figura 44. Biodistribuição de camundongos LDLR^{-/-} hipercolesterolêmicos (n=3) injetados com ^{99m}Tc-HYNIC-P2C7 (0,33-6,5MBq). Camundongos foram eutanasiados em 2 pontos de tempo (60 e 90 minutos) onde seus órgãos foram coletados, pesados e contados. Os dados estão apresentados em porcentagem de atividade injetada por grama de órgão.

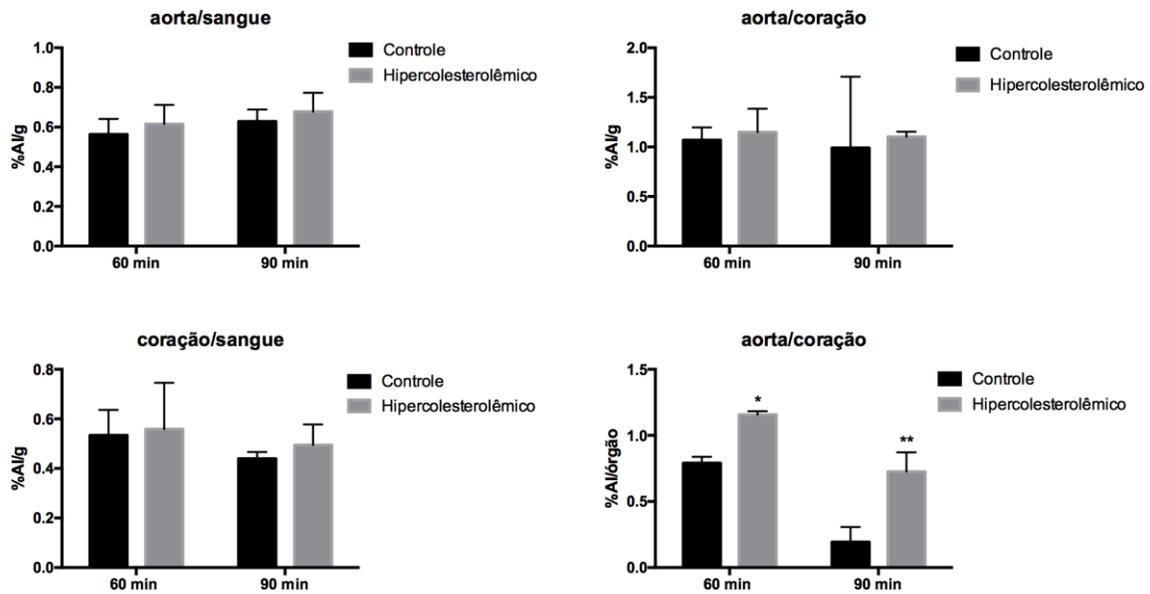


Figura 45. Relações das taxas aorta/sangue, aorta/coração e coração/sangue nos camundongos LDLR^{-/-} controle e hipercolesterolêmico 60 e 90 min após a injeção de ^{99m}Tc-HYNIC-P2C7. Os dados estão apresentados como relações dos dados de porcentagem de atividade injetada por grama para aorta/coração, aorta/sangue e coração/sangue e apenas como porcentagem de atividade injetada por órgão (%AI/órgão) para a relação aorta/coração, onde diferença significativa foi encontrada. **p<0,01, *p<0,05

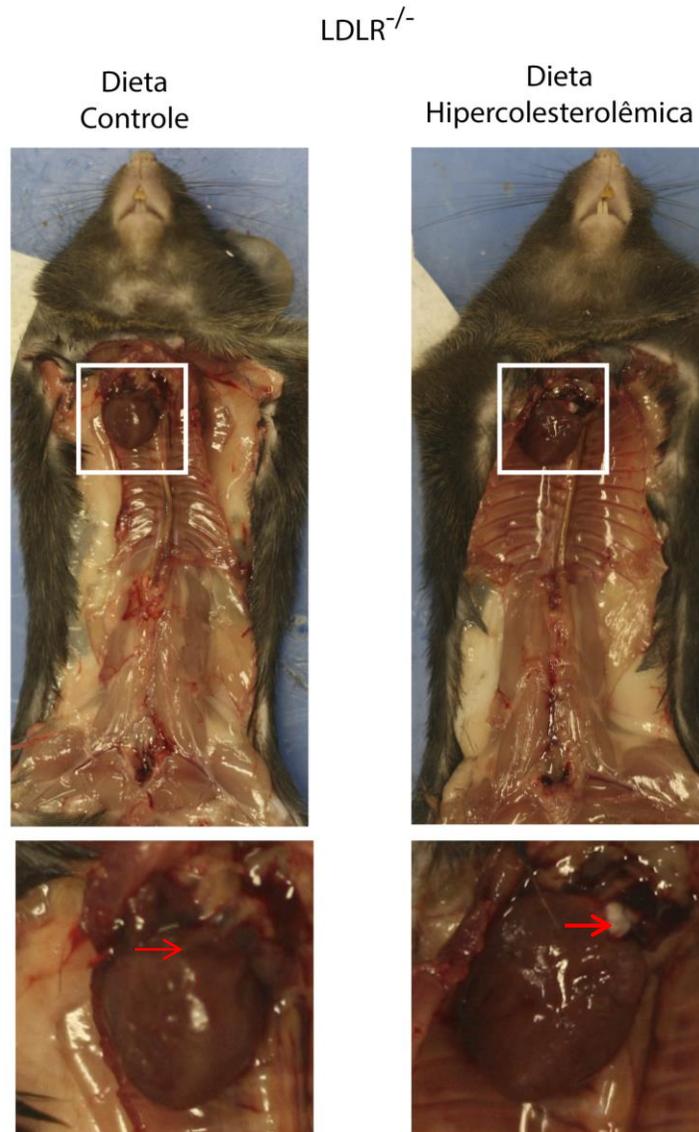


Figura 46. Fotografias representativas demonstrando o coração e a aorta de camundongos LDLR^{-/-} controle e hipercolesterolêmico no estudo de biodistribuição. As fotografias em detalhe demonstrando apenas o coração com o arco aórtico apontado pela seta vermelha, onde é possível visualizar no camundongo hipercolesterolêmico uma grande porção esbranquiçada.

4.2.3. *Imagens SPECT/CT*

Após o estudo de biodistribuição usando ^{99m}Tc-HYNIC-P2C7, foi injetada uma dose em camundongos LDLR^{-/-} controle e hipercolesterolêmico para obtenção de imagens SPECT/CT (figura 47), a fim de se avaliar a captação na região do arco aórtico (figura 48). Pelas imagens SPECT/CT, a eliminação pelos rins foi claramente observada em todos os

animais. Já a quantificação na região do arco aórtico demonstrou grande diferença de captação no camundongo hipercolesterolêmico em relação ao controle.

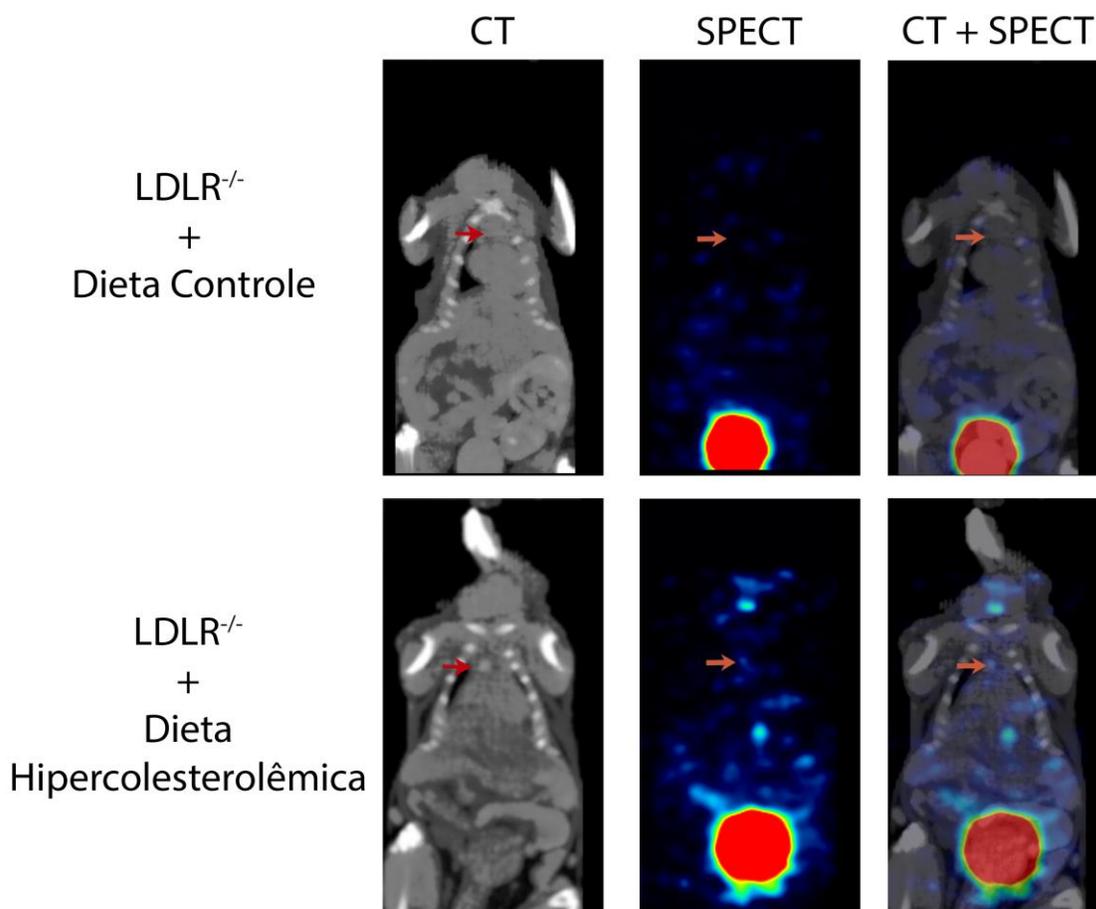


Figura 47. Imagens SPECT/CT de camundongos LDLR^{-/-} controle e hipercolesterolêmico injetados com ^{99m}Tc-HYNIC-P2C7. As setas vermelhas indicam a região do arco aórtico.

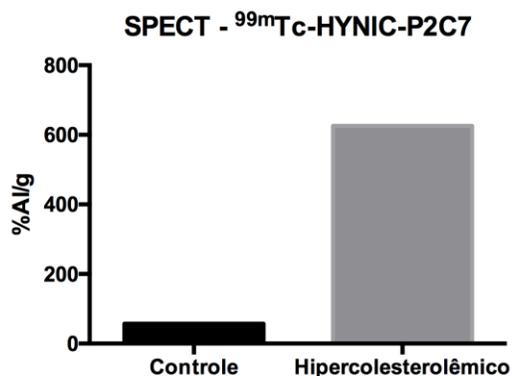


Figura 48. Quantificação de captação na região do arco aórtico a partir de dados obtidos das imagens SPECT/CT representadas pela porcentagem de atividade injetada por grama (%AI/g).

Através dos dados de captação em %AI/g na região do arco aórtico dos camundongos LDLR^{-/-} hipercolesterolêmicos, foi realizada uma comparação entre os resultados obtidos da imagem PET com os obtidos de imagem SPECT, demonstrando a captação em aquisições dinâmicas de acordo com o tempo (figura 49). De acordo com os dados de %AI/g, maior captação na região do arco aórtico foi observada com o radiotraçador ⁶⁸Ga-DOTA-P2C7 nos tempos de 750 a 1500 s de aquisição de imagens.

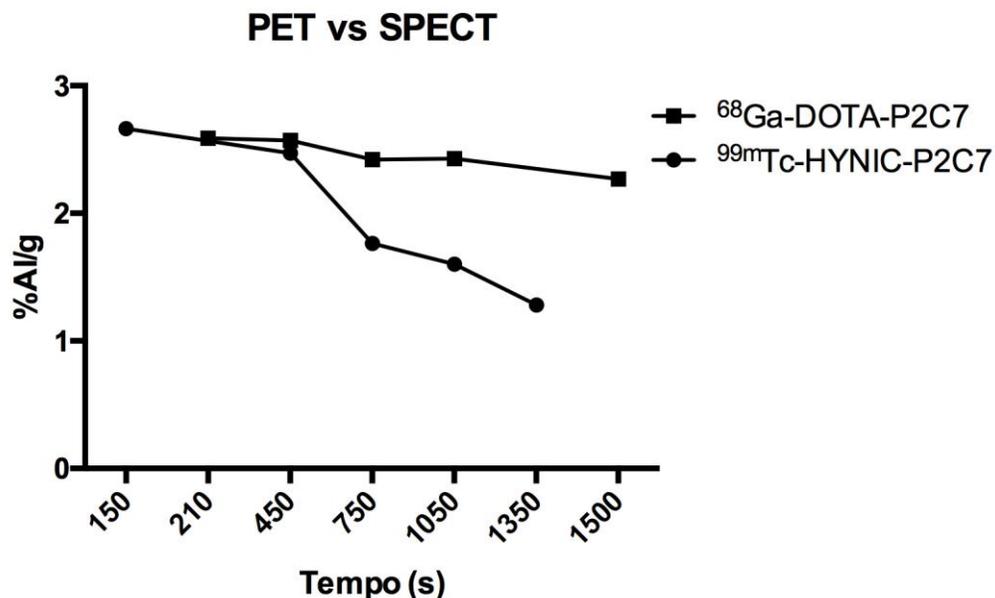


Figura 49. Dados de captação dos radiotraçadores ⁶⁸Ga-DOTA-P2C7 e ^{99m}Tc-HYNIC-P2C7 em camundongos LDLR^{-/-} hipercolesterolêmicos como %AI/g na região do arco aórtico dos animais a partir de imagens PET e SPECT.

4.3. ⁶⁴Cu

4.3.1. Marcação de DOTA-P1A3 e DOTA-P2C7

Inicialmente, o peptídeo P1A3 foi marcado com ⁶⁴Cu através da formação do complexo com agente quelante DOTA e analisado por CLAE (figura 50), mostrando 100% de pureza radioquímica. No entanto, quando o peptídeo DOTA-P2C7 foi marcado para ⁶⁴Cu, foi degradado por radiólise observada por dois picos no cromatograma de CLAE (figura 50), o primeiro com aproximadamente 16% de área do pico do sinal radioquímico. Alterações no tempo e temperaturas de incubação não reduziram a degradação (os dados não mostrados). A marcação "fria" de DOTA-P2C7 mostrou a integridade do peptídeo em condições de radiomarkação, em comparação com o peptídeo puro (figuras 51A e 51B).

Assim, o teste de radiólise de DOTA-P2C7 foi comprovado por análise de CLAE 2 e 4 horas após radiomarcagem e na presença de ácido ascórbico (figura 52). De acordo com o estudo de estabilidade em soro de rato, DOTA-P1A3 mostrou 100 % de estabilidade a 37° C durante 60 min (dados não mostrados). A atividade específica foi de 37 MBq/ηmol para ⁶⁴Cu-DOTA-P1A3, demonstrando a eficácia da marcação peptídica por ⁶⁴Cu.

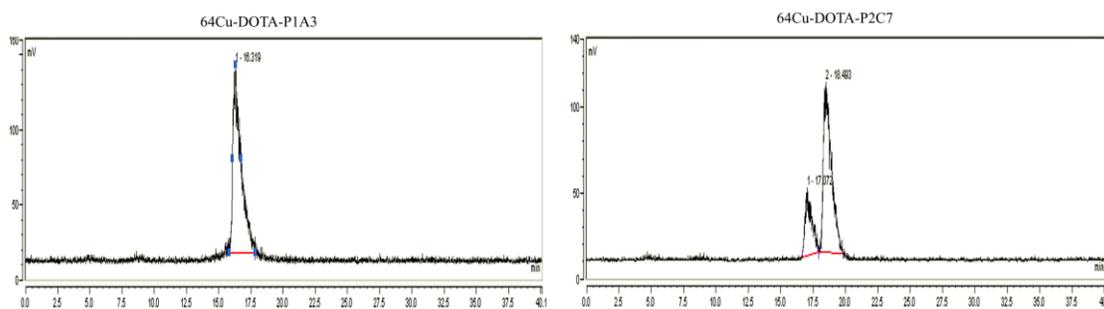


Figura 50. Análises dos radiotraçadores ⁶⁴Cu-DOTA-P1A3 e ⁶⁴Cu-DOTA-P2C7 por CLAE. Cromatogramas de CLAE demonstram a pureza radioquímica pela detecção do sinal radioativo do produto final da marcação com ⁶⁴Cu utilizando DOTA-P1A3 e DOTA-P2C7.

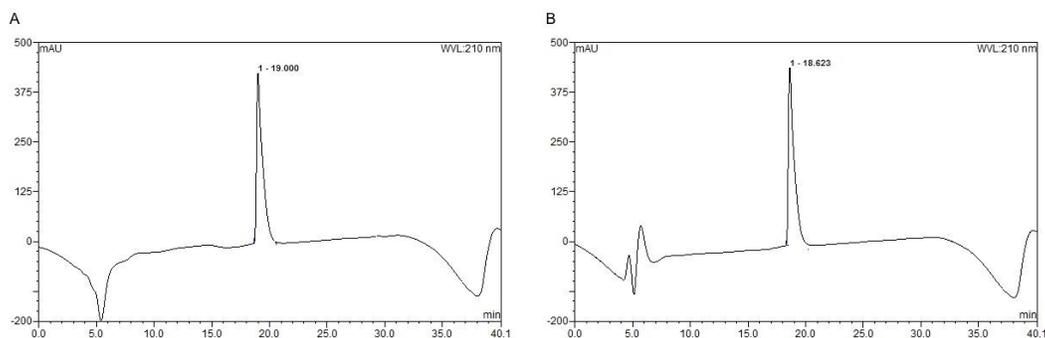


Figura 51. Análise de DOTA-P2C7 por CLAE. Cromatograma de DOTA-P2C7 puro (A). Marcação "fria" de DOTA-P2C7 utilizando CuCl₂ (B), nas mesmas condições de marcação com o radioativo ⁶⁴Cu, demonstrando que não há alteração no peptídeo mediante estas condições.

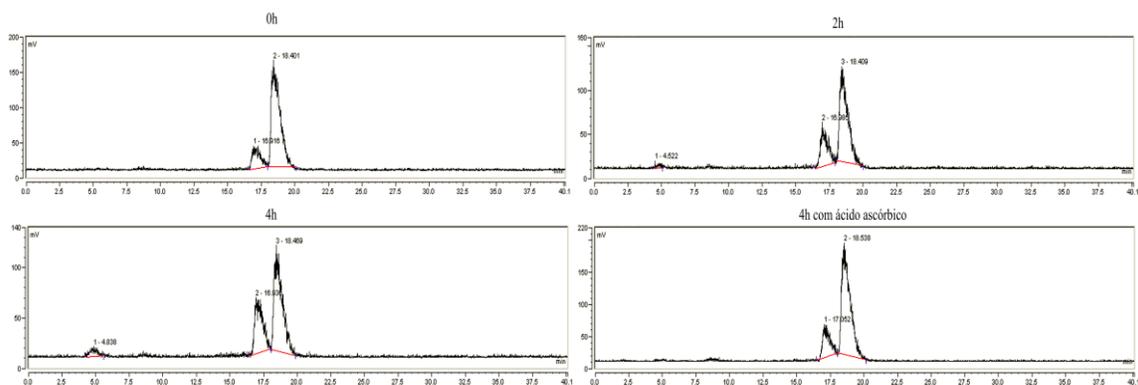


Figura 52. Teste de radiólise de DOTA-P2C7 demonstrado por CLAE. Amostras de ^{64}Cu -DOTA-P2C7 em 0, 2, 4h (com ou sem ácido ascórbico), confirmando que a presença deste agente antioxidante reduziu a porcentagem de radiólise de 33 para 18% em 4h após a marcação.

4.3.2. Marcação de NOTA-P1A3

Devido à presença de radiólise no peptídeo P2C7 radiomarcado com ^{64}Cu , do qual foi comprovado ser contínuo mesmo após purificação em CLAE, uma opção seria focar na radiomarcagem peptídeo P1A3, utilizando outro quelante muito utilizado na radiomarcagem de peptídeos com radiometais, NOTA, como forma de comparação. Por isso, foi realizada a marcação de NOTA-P1A3 com ^{64}Cu utilizando o mesmo protocolo para DOTA-P1A3 (figura 53).

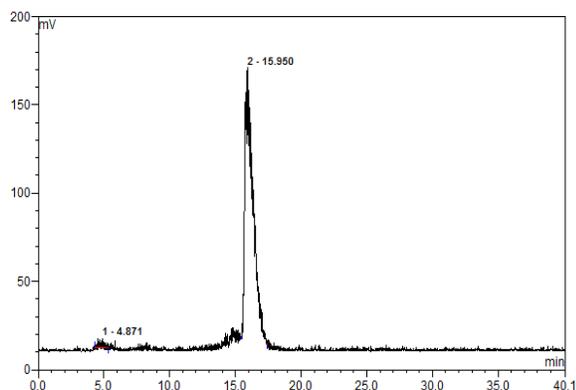


Figura 53. Radio-cromatograma de ^{64}Cu -NOTA-P1A3 demonstrando a pureza radioquímica. NOTA-P1A3 foi marcado nas mesmas condições de DOTA-P1A3, demonstrando mais de 95% de pureza radioquímica.

4.3.3. Síntese e conjugação de $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$

Após a síntese de $^{64}\text{CuAuNC}$, o peptídeo P1A3 foi acoplado à superfície do nanocluster, em uma relação molar de 19 peptídeos por nanocluster, de acordo com a quantificação pelo método de BCA, utilizando o próprio peptídeo P1A3 para gerar a curva padrão baseado em um protocolo descrito por Fang et al (2010). A pureza radioquímica de $^{64}\text{CuAuNC}$ foi avaliada por duas técnicas, FPLC e CCD (figura 54). É interessante observar que o cromatograma obtido por FPLC demonstram dois sinais, radioativo e ultravioleta, coincidentes, confirmando a pureza do nanocluster sintetizado e radiomarcado.



Figura 54. Pureza radioquímica de $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ ao final do processo de síntese e conjugação. Cromatograma da análise por FPLC de $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$, demonstrando ambos sinais ultravioleta e radioativo (A). Análise por CCD do nanocluster demonstrando 100% de pureza radioquímica (B).

4.3.4. Biodistribuição

Camundongos CD-1 (6-7 semanas de idade, $n=3$) foram utilizados para analisar o acúmulo de cada radiotraçador marcado com ^{64}Cu ($^{64}\text{Cu-DOTA-P1A3}$, $^{64}\text{Cu-NOTA-P1A3}$ e $^{64}\text{CuAuNc-P1A3}$). O estudo de biodistribuição para $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ foi demonstrado nos tempos 1, 3, 24 e 48 h após a injeção do radiotraçador (figura 55). A diferença entre o acúmulo no fígado e rins diminuíram com o tempo ($12,41 \pm 2,22$ para fígado e $6,19 \pm 0,67$ para os rins em 3h comparado ao tempo de 48h: $7,26 \pm 0,63$ para fígado e $5,60 \pm 0,20$ para os rins), indicando uma via renal de excreção. Também, as relações de captação coração/sangue com $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ aumentou em 24 e 48 h (1,84 e 2,10, respectivamente) comparado à 1 e 3 h (0,44 e 0,40, respectivamente).

Ao mesmo tempo, foi realizado um estudo da análise de via de eliminação do nanocluster, coletando fezes e urina dos animais nos mesmos pontos de tempo (figura 56), demonstrando que a atividade encontrada nas fezes foi aumentando com o tempo, indicando que a via de eliminação provavelmente ocorre pelas fezes (via intestinal).

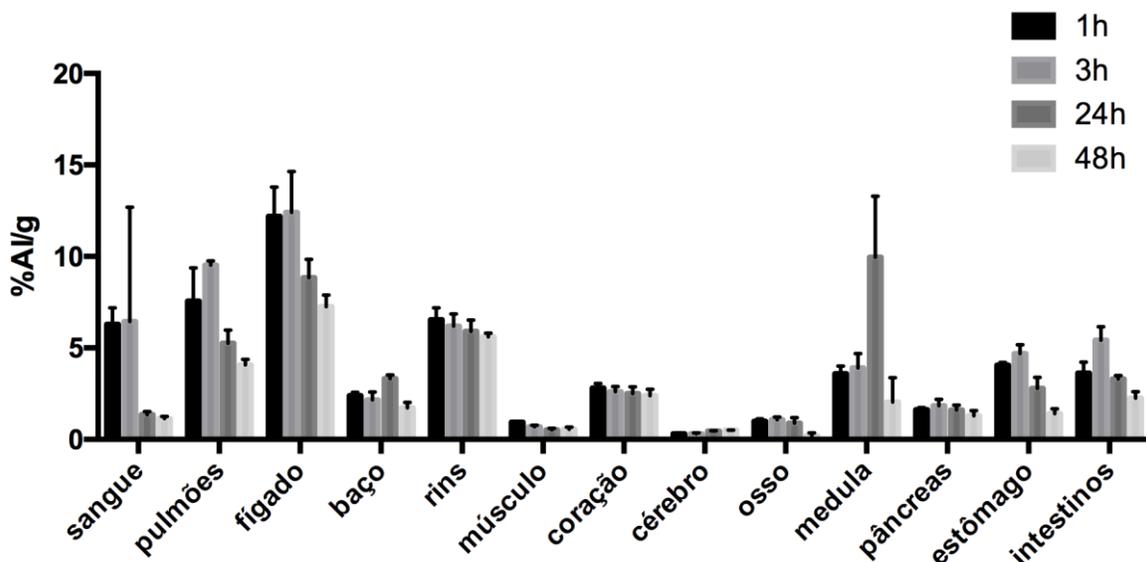


Figura 55. Biodistribuição de $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ em camundongos CD-1. Camundongos (n=3) injetados com o radiotraçador foram eutanasiados 1, 3, 24 e 48h após a injeção, seus órgãos coletados para contagem gama. Os dados estão apresentados como porcentagem de atividade injetada por grama.

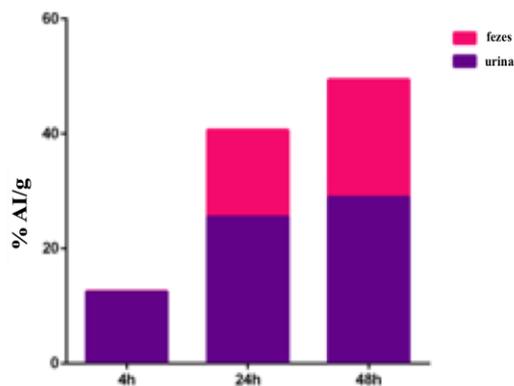


Figura 56. Estudo de eliminação com $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ em camundongos CD-1. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas e fezes e urina foram coletados em determinados pontos de tempo (4, 24 e 48h).

Na biodistribuição dos peptídeos (figura 57), a eliminação dos radiotraçadores claramente foi pelos rins 1 h após a injeção nos camundongos. O quelante DOTA apresentou maior retenção do que NOTA em quase todos os órgãos inclusive nos rins ($32,94 \pm 3,20$ versus $30,54 \pm 2,86$) e no coração ($0,50 \pm 0,08$ para DOTA e $0,27 \pm 0,01$ para

NOTA). Por último, foram comparadas as relações de %AI/g de coração/sangue entre os 3 radiotraçadores (figura 58). Nesta comparação, os radiotraçadores peptídicos foram mais eficazes na maior captação no coração em relação ao background circulante no sangue, enquanto que dentre todos o ^{64}Cu -DOTA-P1A3 apresentou a maior relação.

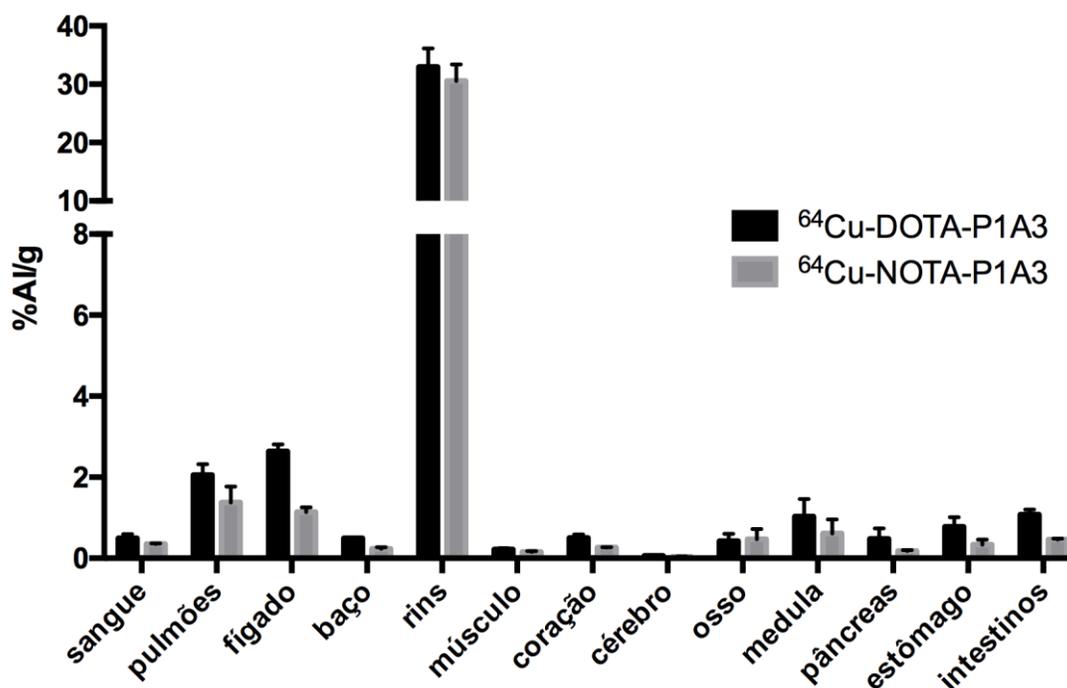


Figura 57. Biodistribuição de ^{64}Cu -DOTA-P1A3 e ^{64}Cu -NOTA-P1A3 em camundongos CD-1. Amostras de sangue e órgãos dos camundongos eutanasiados 1h após a injeção do radiotraçador foram coletados.

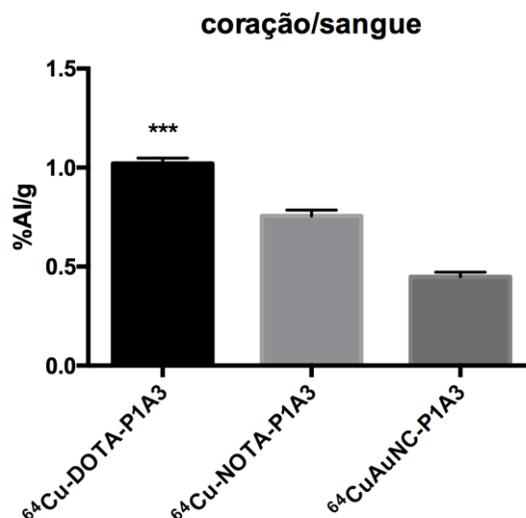


Figura 58. Relação de porcentagem de atividade injetada por grama do coração/sangue no tempo de 60 min após a injeção do radiotraçador no camundongo CD-1. Os dados de %AI/g no coração dos camundongos que receberam o radiotraçador marcado com ^{64}Cu foram divididos por dados de %AI/g encontrados no sangue dos animais após 60 min de injeção. *** $p < 0,001$

4.3.5. Imagens PET/CT

Camundongos $\text{Apoe}^{-/}$ (n=4/radiotraçador) foram injetados com 3,7 MBq de $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ e controle $^{64}\text{CuAuNC}$ enquanto que camundongos C57Bl/6N (n=4) receberam uma dose de 3,7 MBq de $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ como animais controle. As imagens PET/CT foram realizadas em quatro pontos de tempo: 1, 3-4, 24 e 48 h após a injeção. Primeiro, as imagens foram feitas em camundongos $\text{Apoe}^{-/}$ com 6 semanas de dieta hipercolesterolêmica (figura 59) e o acompanhamento da progressão aterosclerótica foi feito nos mesmos camundongos com 9 semanas de dieta hipercolesterolêmica (figura 60). A semi-quantificação SUV de captação do radiotraçador demonstrou significante maior captação de sinal com $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ ($2,48 \pm 0,10$) em 1 h no camundongo $\text{Apoe}^{-/}$ do que camundongo controle ($1,43 \pm 1,67$) e nanocluster controle $^{64}\text{CuAuNC}$ ($1,81 \pm 0,12$), sendo que esta diferença ainda foi encontrada em 3h ($^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$: $0,93 \pm 0,11$; camundongo controle: $0,68 \pm 0,02$; $^{64}\text{CuAuNC}$: $0,73 \pm 0,04$), mas nos pontos de tempo 24 e 48 h, nenhuma diferença na captação foi observada entre $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ e $^{64}\text{CuAuNC}$.

Quando foi avaliado os dois pontos de tempo (1 e 3 h) para monitoramento da progressão da aterosclerose entre os camundongos com 6 e 9 semanas de dieta hipercolesterolêmica, nenhuma diferença foi encontrada. Além disso, o SUV calculado a

partir das imagens PET em camundongos $ApoE^{-/-}$ com 9 semanas de dieta hipercolesterolêmica demonstraram uma similar semi-quantificação com aquele encontrado nos animais com 6 semanas de dieta hipercolesterolêmica. Maior captação foi encontrado em 1h ($^{64}CuAuNC-P1A3$ em camundongos $ApoE^{-/-}$: $2,32\pm0,16$; $^{64}CuAuNC$ em camundongos $ApoE^{-/-}$: $1,70\pm0,21$; $^{64}CuAuNC-P1A3$ em camundongos C57Bl/6N: $1,99\pm0,10$) e significativa diferença ainda foi observado em 4 h ($^{64}CuAuNC-P1A3$ em camundongos $ApoE^{-/-}$: $0,85\pm0,10$; $^{64}CuAuNC$ em camundongos $ApoE^{-/-}$: $0,60\pm0,10$; $^{64}CuAuNC-P1A3$ em camundongos C57Bl/6N: $0,12\pm0,04$), mas nenhuma diferença foi encontrada em 24 e 48 h na captação de $^{64}CuAuNC-P1A3$ e $^{64}CuAuNC$ em camundongos $ApoE^{-/-}$, somente em comparação ao camundongo controle C57Bl/6N.

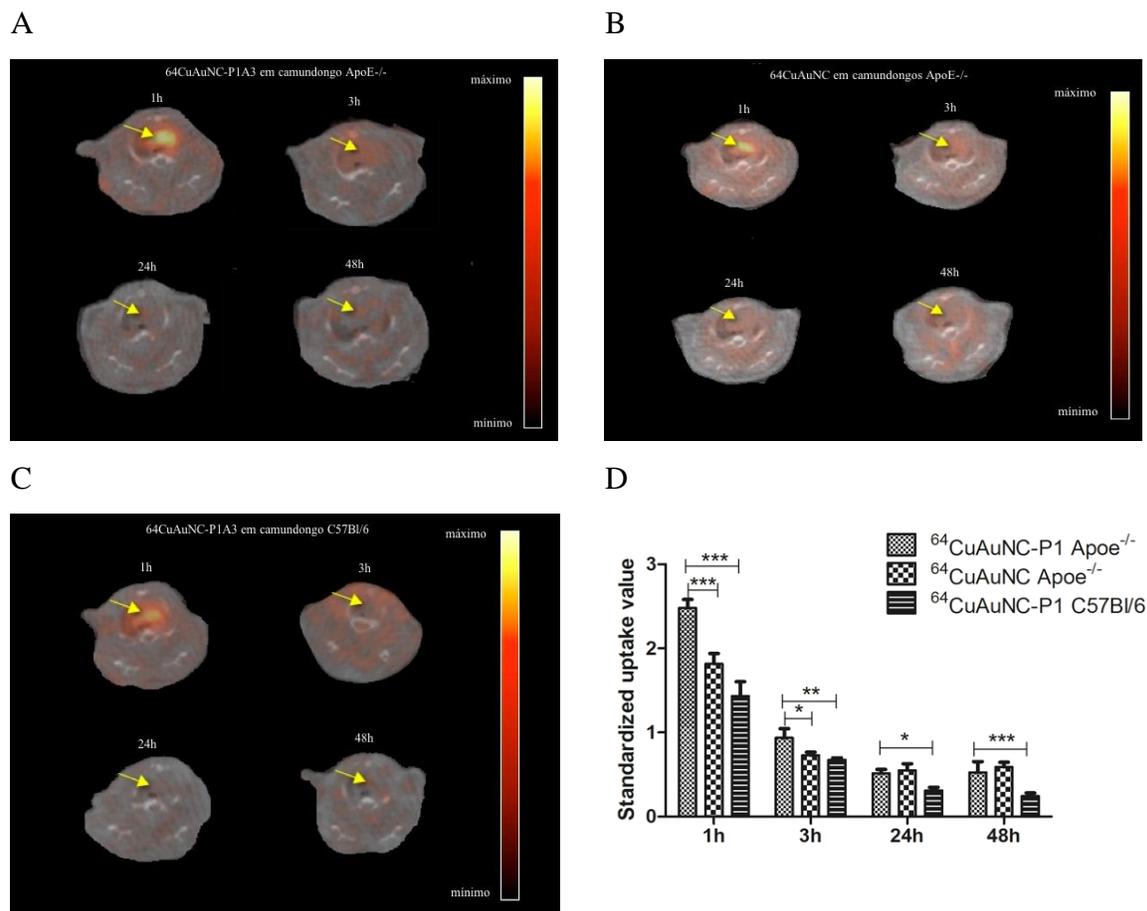


Figura 59. Imagens PET/CT na visão axial de camundongos $ApoE^{-/-}$ com 6 semanas de dieta hipercolesterolêmica e camundongos C57Bl/6N. Imagens PET/CT de camundongos $ApoE^{-/-}$ injetados com $^{64}CuAuNC-P1A3$ (A), $^{64}CuAuNC$ (B) e de camundongos C57Bl/6N injetados com $^{64}CuAuNC-P1A3$ (C). Análise semi-quantitativa pelo cálculo SUV do sinal de captação dos radiotraçadores em ambos os camundongos $ApoE^{-/-}$ e C57Bl/6N, expressos como média \pm DP, demonstrando a mais alta captação de

$^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ em camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ em 1 h após a injeção. Setas amarelas indicam a região do arco aórtico. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,0$

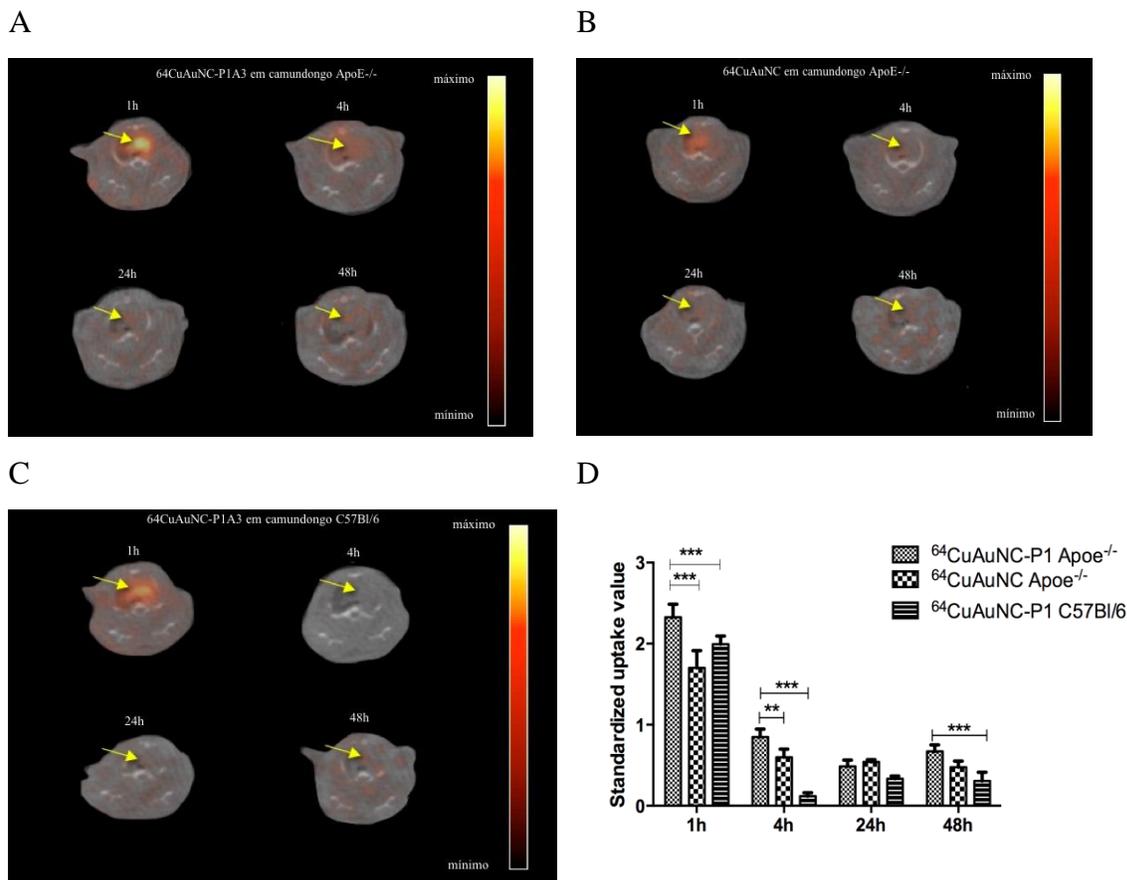
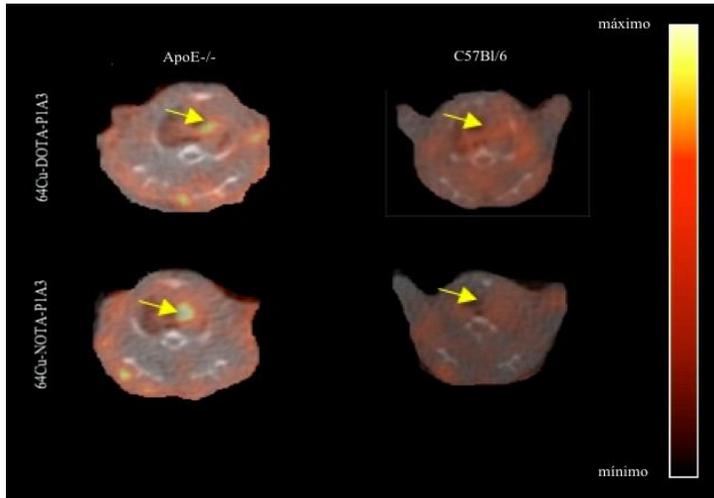


Figura 60. Imagens PET/CT na visão axial de monitoramento da aterosclerose em camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ com 9 semanas de dieta hipercolesterolêmica comparado à camundongos C57Bl/6 . Camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ foram injetados com $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ (A) ou $^{64}\text{CuAuNC}$ (B) e aquisições PET foram realizadas 1, 4, 24 e 48 h após a injeção. Camundongos C57Bl/6 receberam $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ (C). Semi-quantificação SUV da captação dos radiotraçadores foram realizadas na região do arco aórtico, demonstrando maior sinal de $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ em camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ em 1 h após a injeção, sendo ainda significativa em 48 h comparado aos camundongos controle C57Bl/6 . Setas amarelas indicam a região do arco aórtico. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$

Imagens PET/CT foram também realizadas com os radiotraçadores $^{64}\text{Cu-DOTA-P1A3}$ e $^{64}\text{Cu-NOTA-P1A3}$ em camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ ($n=4$) tratadas por 7 semanas com dieta hipercolesterolêmica, comparada ao camundongo controle C57Bl/6 ($n=2$), demonstrado na figura 61. A semi-quantificação SUV demonstrou maior captação dos radiotraçadores em camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ em relação ao camundongo C57Bl/6 , mas uma pequena diferença significativa foi encontrada somente com $^{64}\text{Cu-NOTA-P1A3}$, indicando sua eficácia para aquisição de imagens PET na região do arco aórtico neste modelo animal.

A



B

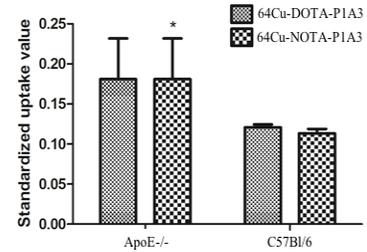


Figura 61. Imagens PET/CT na visão axial de camundongos ApoE^{-/-} (7 semanas de dieta hipercolesterolêmica) e C57Bl/6 injetados com ⁶⁴Cu-DOTA-P1A3 e ⁶⁴Cu-NOTA-P1A3. Imagens PET/CT foram adquiridas 60 min após a injeção dos radiotraçadores em um protocolo de aquisição de imagens dinâmicas (A). Semi-quantificação SUV demonstrou significativa maior captação apenas com ⁶⁴Cu-NOTA-P1A3. Setas amarelas indicam a região do arco aórtico. *p<0,05

Por isso, ⁶⁴Cu-NOTA-P1A3 foi escolhido como radiotraçador para acompanhamento por imagem PET da aterosclerose dos camundongos ApoE^{-/-} (n=3) com 10 semanas de dieta hipercolesterolêmica. Além disso, foi realizada um estudo de afinidade por bloqueio utilizando um excesso de 100 vezes de P1A3 "frio" co-injetado com ⁶⁴Cu-NOTA-P1A3 e comparando-se com o camundongo C57Bl/6 (n=4) (figura 62). Além disso, após a aquisição das imagens PET, aortas foram dissecadas para realização de autoradiografia (figura 62C).

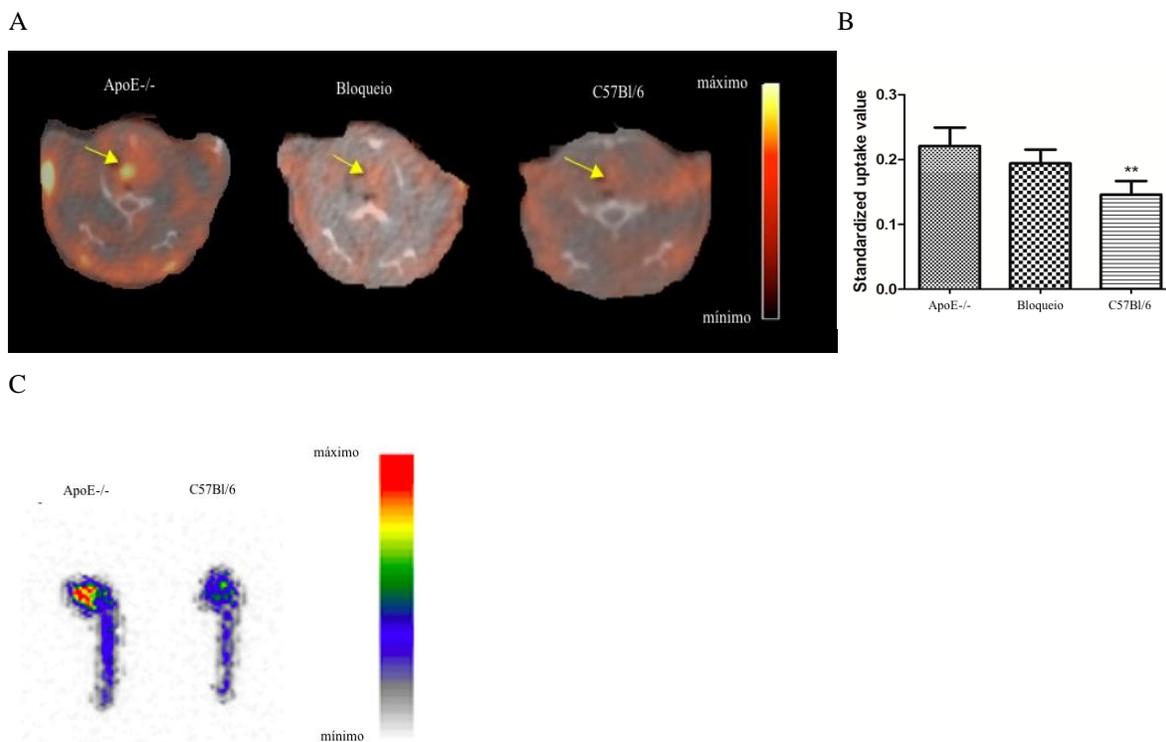


Figura 62. Imagens PET/CT na visão axial de camundongos ApoE^{-/-} e C57Bl/6 injetados com ⁶⁴Cu-NOTA-P1A3. Imagens PET/CT da região do arco aórtico de camundongos ApoE^{-/-} tratados com dieta hipercolesterolêmica por 10 semanas injetados com ⁶⁴Cu-NOTA-P1A3, co-injetado com "frio" NOTA-P1A3 como bloqueio e em camundongos C57Bl/6 (A). Semi-quantificação do sinal SUV de dados de imagens PET demonstrando a diferença somente de camundongos ApoE^{-/-} e C57Bl/6 (B). Autoradiografia de aortas dissecadas de camundongos ApoE^{-/-} e C57Bl/6 com 24 h de exposição, demonstrando acúmulo no arco aórtico. Setas amarelas indicam a região do arco aórtico.

4.4. ¹⁸F

Primeiramente, uma marcação "fria" com fluoreto de sódio (NaF) foi realizada sob as mesmas condições para verificar a integridade dos peptídeos nestas condições tais como altas temperaturas e pH ácido (figura 63). Como demonstrado pelo cromatograma do CLAE, os peptídeos foram estáveis nestas condições, tornando essa abordagem de marcação viável. Para a padronização, somente um dos peptídeos radiomarcados com ¹⁸F porque uma vez que as condições serem padronizadas para um deles, o protocolo provavelmente será o mesmo para o outro peptídeo, sendo que os dois peptídeos são similares em estrutura. Por isso, NOTA-P2C7 foi radiomarcado com ¹⁸F a 100°C por 30 min, o qual é considerado longo tempo em típicas reações de complexação com metais, resultando em mais de 95% de pureza radioquímica (figura 64A). No entanto, como a

atividade específica encontrada foi de apenas 0,115 MBq/ηmol, outros testes foram realizados a fim de que a atividade específica aumente, utilizando 119 MBq, resultando em 57% de ^{18}F livre na reação (figura 64B).

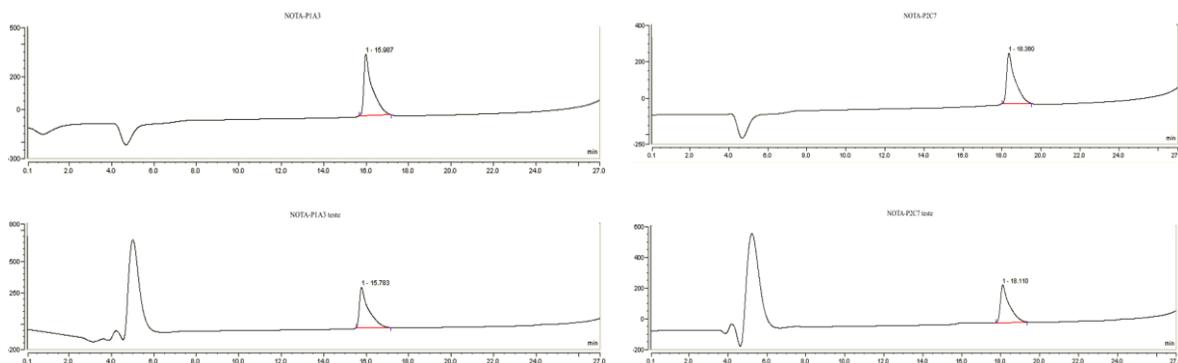


Figura 63. Marcação "fria" de NOTA-P1A3 e NOTA-P2C7 sob condições de marcação com ^{18}F . Cromatogramas de NOTA-P1A3 e NOTA-P2C7 antes e depois de serem submetidos a aquecimento a 99°C em pH4,0 por 15 minutos, demonstrando a integridade dos peptídeos.

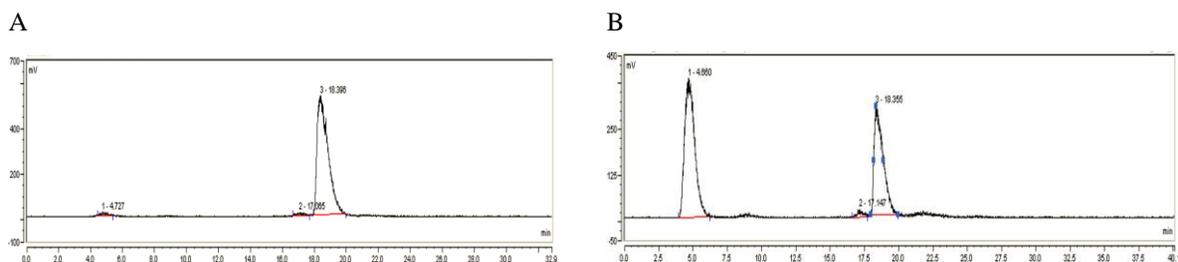


Figura 64. Cromatogramas demonstrando o sinal radioativo da marcação de NOTA-P2C7 com ^{18}F . O peptídeo NOTA-P2C7 foi marcado com ^{18}F resultando em uma baixa atividade específica (A). Um outro teste de marcação utilizou maior atividade de ^{18}F , demonstrando a redução na pureza radioquímica (B).

Devido ao fato de que não foi possível aumentar a atividade específica com ^{18}F utilizando NOTA como quelante, esta estratégia não permitiu a continuidade do estudo utilizando o peptídeo marcado como um radiotraçador, objetivando a obtenção de imagens PET/CT.

4.5. Análise de interação com componentes da lesão aterosclerótica

4.5.1. Internalização dos peptídeos

Peptídeos FITC-P1A3 e FITC-P2C7 foram utilizados para avaliar a sua internalização por macrófagos por citometria de fluxo através da medida da mediana da fluorescência dos diferentes tratamentos. Em macrófagos RAW, foi observada a

internalização de ambos os peptídeos, mais evidenciada nas maiores concentrações (50 e 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FITC-P1A3 em relação à FITC-P2C7) e reduzindo de acordo com a concentração (figura 65A). Macrófagos de cultura primária também internalizaram peptídeos, sendo maior nas mais altas concentrações. No entanto, observou-se efeito maior com as células tratadas com o peptídeo P2C7, principalmente na concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figura 65B).

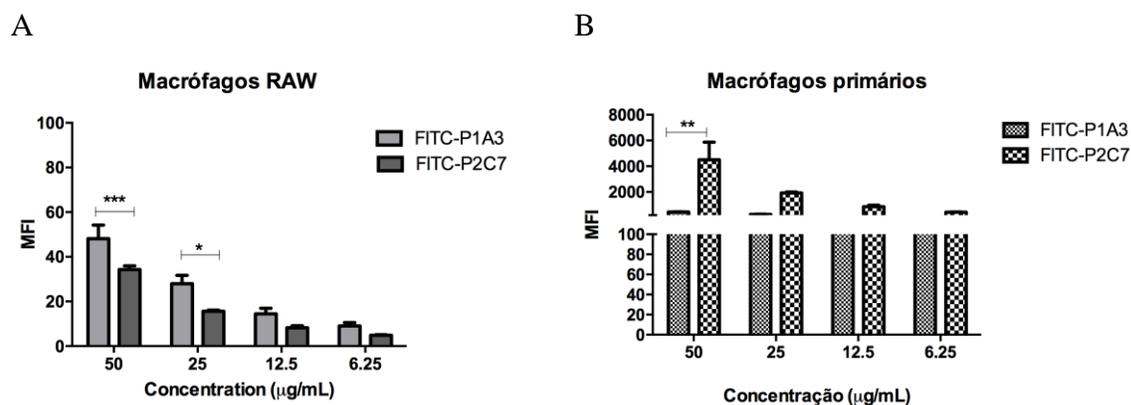


Figura 65. Internalização dos peptídeos em macrófagos RAW (A) e primários (B) após tratamento com 50, 25, 12.5 e 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 16 horas de incubação. * $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$**

4.5.2. Microscopia confocal com células endoteliais

Células HAEC foram tratadas com os peptídeos P1A3 e P2C7 conjugados com FITC na concentração final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e imagens por microscopia confocal foram adquiridas por 20 horas (Figura 66). Nas imagens, é possível visualizar a interação dos peptídeos FITC-P1A3 e FITC-P2C7 com as células endoteliais e a internalização pelas mesmas. Apesar de alguma fluorescência estar presente no meio de cultura que circundavam as células, algumas destas foram capazes de internalizar os peptídeos marcados com FITC.

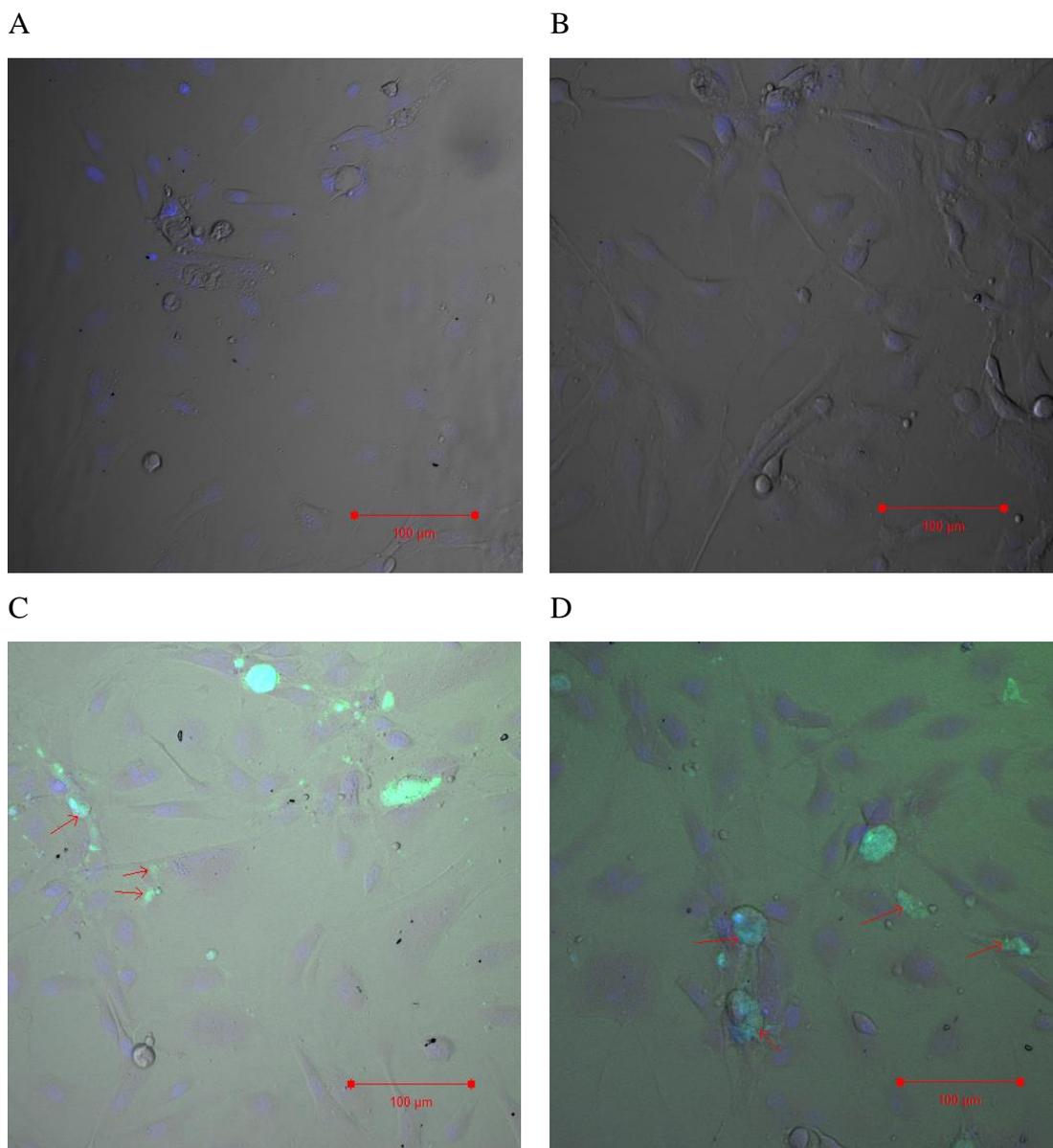


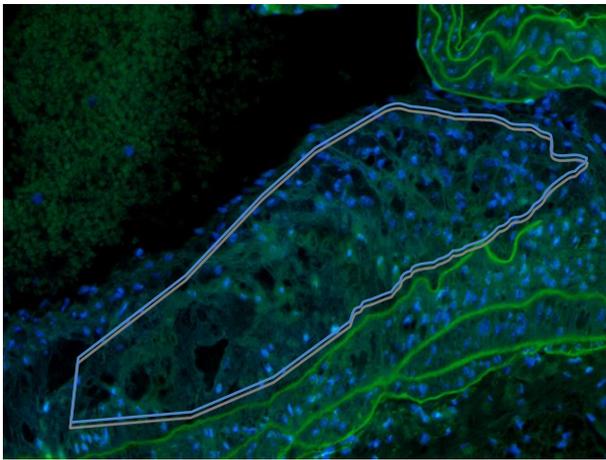
Figura 66. Microscopia confocal das células HAEC tratadas com FITC-P1A3/P2C7. Após o careciamento, células HAEC foram incubadas sem nada (A), com PBS (B) e com as sondas FITC-P1A3 (C) ou FITC-P2C7 (D), sendo que imagens de microscopia confocal foram capturadas por 20 horas, em um aumento de 20x. As setas vermelhas as regiões de interação do FITC-P1A3/FITC-P2C7 com as células HAEC.

As imagens acima demonstram as células com 10 horas de aquisição, na posição do eixo z de 6 µm para todas as condições de tratamento.

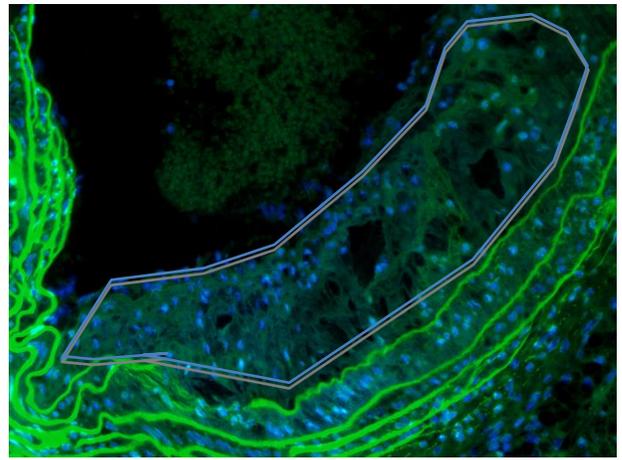
4.5.3. Imunofluorescência

Peptídeos conjugados com FITC em diferentes concentrações foram utilizados como sondas em lesões ateroscleróticas parafinizadas de camundongos *Apoe^{-/-}* com 19 semanas de dieta hipercolesterolêmica (figura 67). Concentrações de 15 e 30 η mol de peptídeos foram testadas, assim como um prévio bloqueio com excesso molar de 300 η mol de peptídeos não marcados com FITC antes da incubação com 30 η mol de FITC-peptídeos, a fim de se demonstrar a especificidade da ligação das sondas à lesão aterosclerótica.

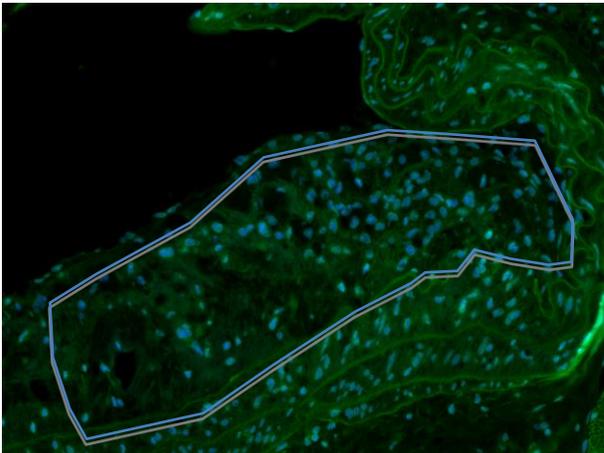
A



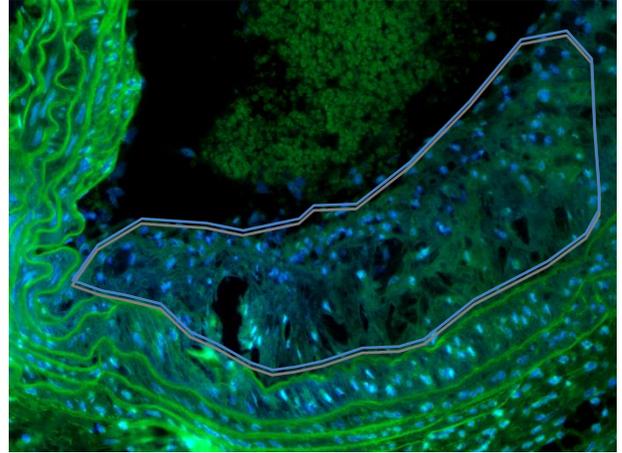
B



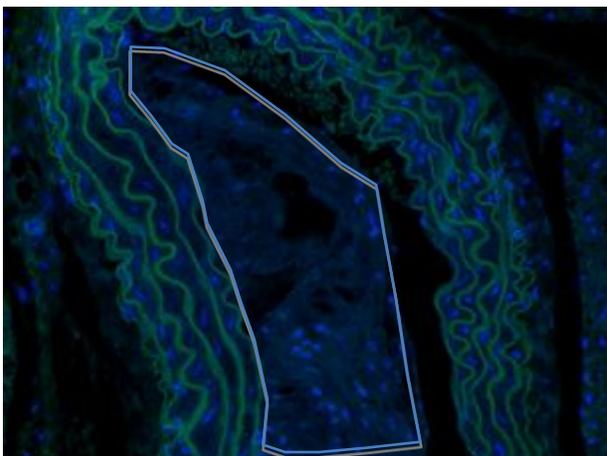
C



D



E



F

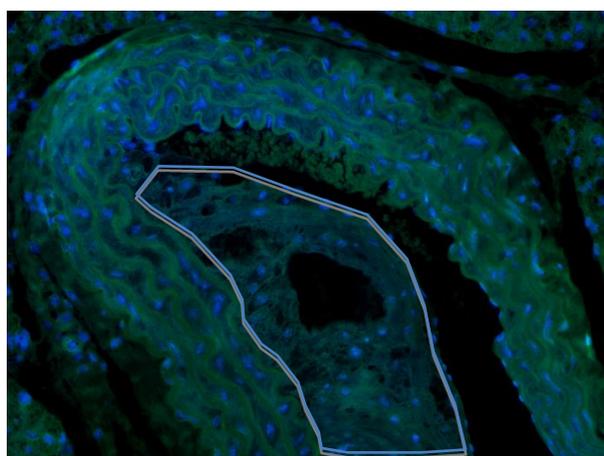


Figura 67. Imunofluorescência de lesões ateroscleróticas de camundongos *Apoe*^{-/-} utilizando FITC-P1A3 e FITC-P2C7. As lâminas, após desparafinização, foram incubadas com 15 e 30 η mol de FITC-P1A3 (A-B), e FITC-P2C7 (C-D). Para bloqueio, as lâminas foram bloqueadas com 300 η mol de peptídeos sem FITC antes de incubar com 30 η mol de FITC-P1A3 (E) e FITC-P2C7 (F). O sinal verde demonstra FITC-peptídeos e o sinal azul representa o núcleo corado com DAPI. A linha azul delinea regiões relacionadas às lesões ateroscleróticas.

No entanto, a sonda com FITC demonstrou muita autofluorescência oriunda das lesões ateroscleróticas, por isso, um fluórofo que emite em comprimentos de onda mais elevados como Alexa Fluor 647 foi utilizada para produzir novas sondas. Foi realizada a marcação de Alexa Fluor 647 com P1A3 de acordo com as instruções do fabricante e para se confirmar a conjugação, amostras de P1A3 e Alexa Fluor 647 foram avaliadas separadamente e comparadas com o cromatograma obtido com o conjugado (figura 68). De acordo com o fabricante, a massa molecular de Alexa Fluor 647 contém aproximadamente 1200 Daltons, enquanto que o peptídeo P1A3 com espaçador (linker) tem 2266,4 Daltons. Baseado nos resultados de CLAE, Alexa Fluor 647 demonstrou menor tempo de retenção do que o peptídeo P1A3, enquanto que o conjugado permaneceu por mais tempo retido na coluna porque a marcação pode ter aumentado a sua hidrofiliicidade. Amostras do pico referente ao conjugado foram purificadas por CLAE e liofilizadas.

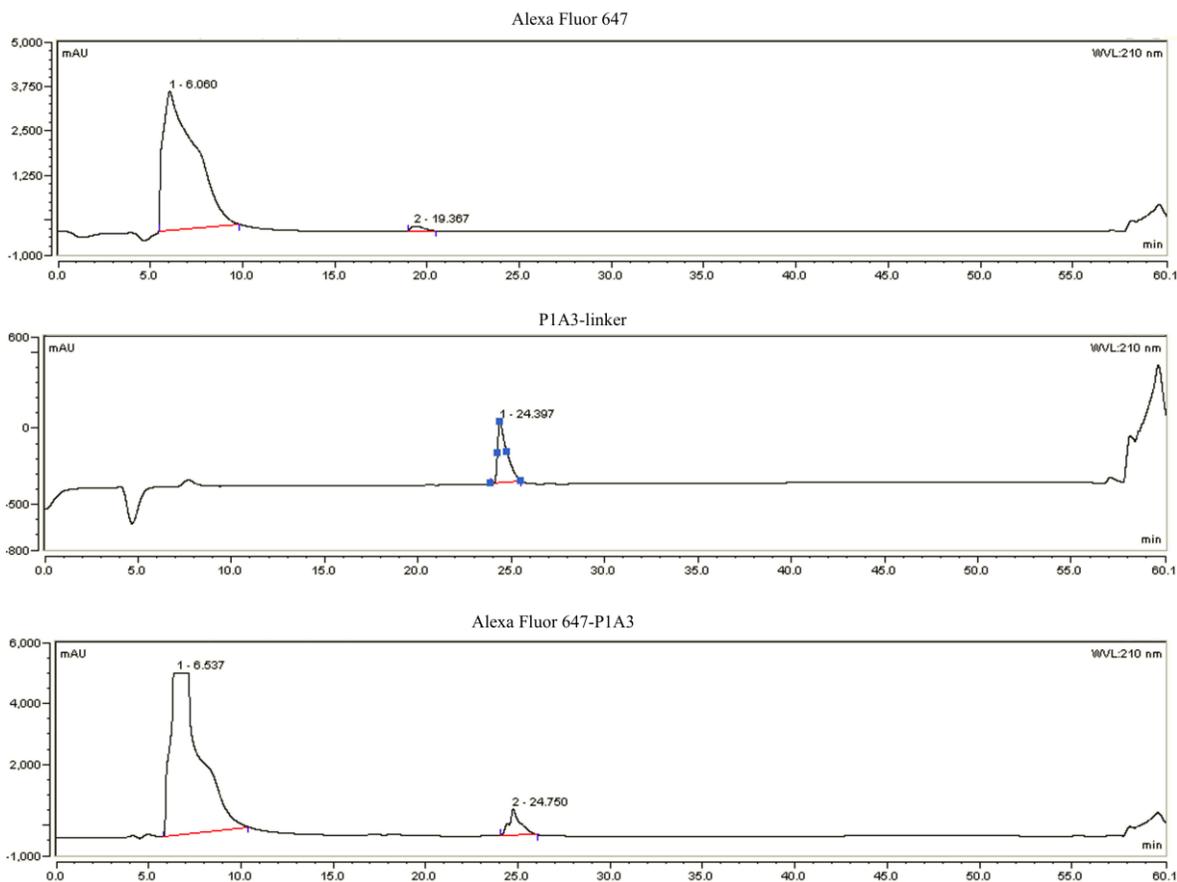
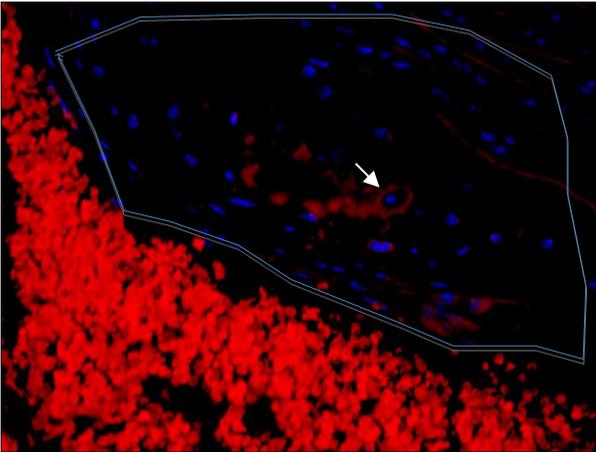


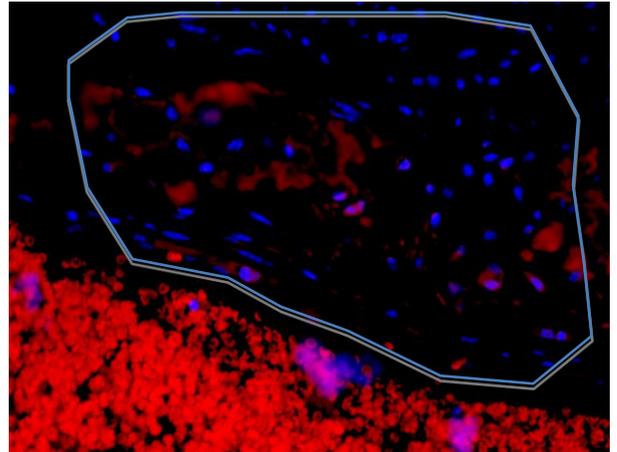
Figura 68. Cromatogramas de CLAE usando coluna C18 para análises de Alexa Fluor 647, P1A3 e seus conjugados.

Então, com a nova sonda para imunofluorescência, AF 647-P1A3, foi realizado um novo teste com diferentes concentrações (0,5; 2,8 e 5,5 η M) mas menores que as utilizadas com os peptídeos marcados com FITC, a fim de se reduzir o sinal de autofluorescência (figura 69). Utilizando a nova sonda Alexa Fluor 647-P1A3, as comparações foram feitas apenas com tecidos controle como aortas de camundongos C57Bl/6 e LDLR^{-/-} (dieta normal), os quais não possuem lesão aterosclerótica, demonstrando apenas sinal de fundo.

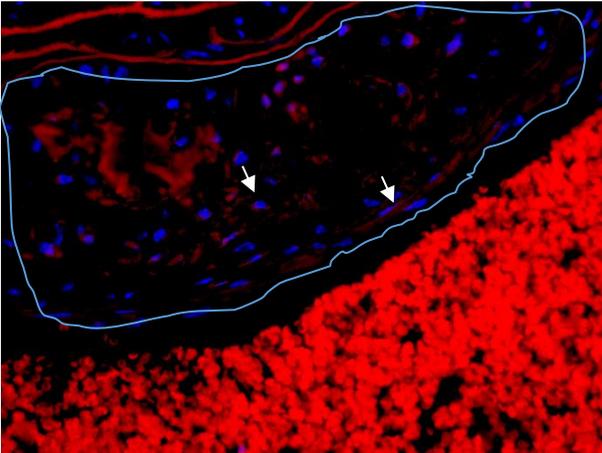
A



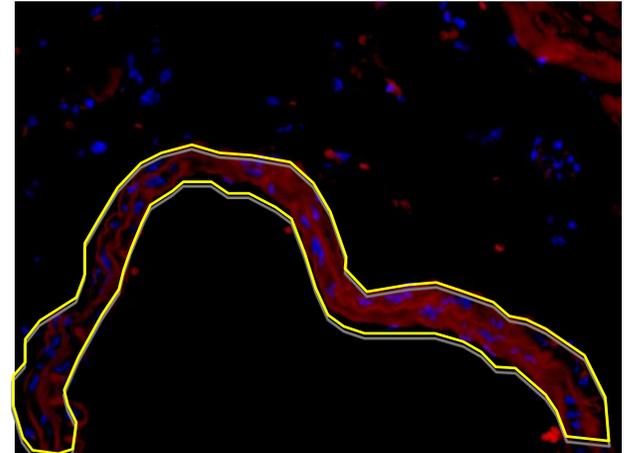
B



C



D



E

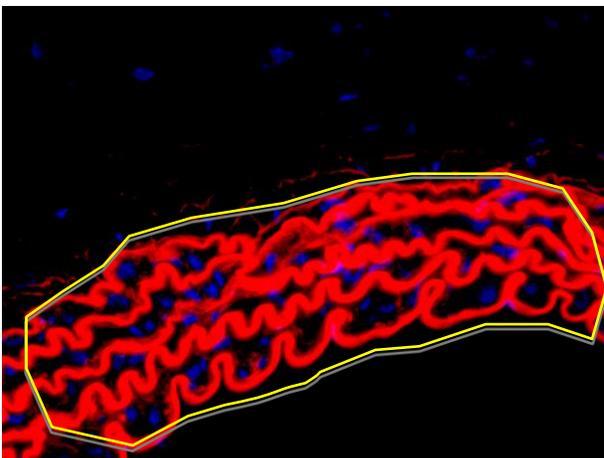


Figura 69. Imunofluorescência de aortas usando Alexa Fluor 647-P1A3. Lesões ateroscleróticas de camundongos Apoe^{-/-} foram incubados com 0,5 (A), 2,8 (B) e 5,5 ηmol (C) de Alexa Fluor 647-P1A3. Aortas de camundongos LDLr^{-/-} (D) e C57Bl/6 (E) foram usados como controle negativo. Todas as imagens foram adquiridas em 40X de ampliação. Setas brancas indicam possíveis regiões de sinal positivo. As linhas azuis circundam regiões relacionadas às lesões e as linhas amarelas indicam a parede arterial.

4.5.4. Ensaio de ELISA com peptídeos conjugados com DOTA

Para comprovar o reconhecimento dos peptídeos mimotopos que foram conjugados com espaçador e o agente quelante DOTA, ensaio de ELISA foi realizado com duas faixas de concentrações de peptídeos: 100000-0.0001 $\eta\text{g/mL}$ ou 400000-6250 $\eta\text{g/mL}$, demonstrado na figura 70. Mesmo após as modificações, os peptídeos ainda foram reconhecidos pelos anticorpos monoclonais 1A3 e 2C7, mas apenas nas concentrações mais altas, sendo maior com o peptídeo P1A3 reconhecido pelo anticorpo 1A3.

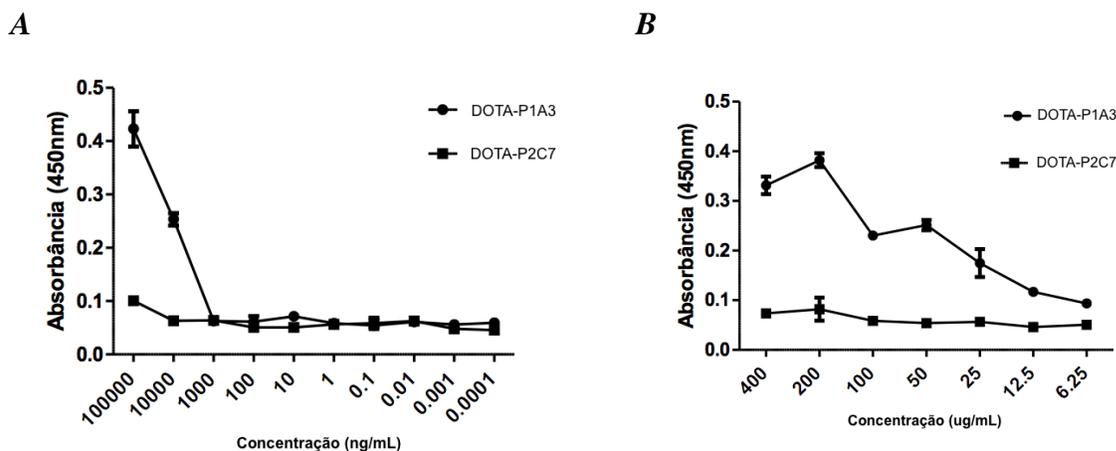


Figura 70. Ensaio de ELISA com peptídeos conjugados com DOTA reconhecidos pelos anticorpos anti-LDL(-) 1A3 e 2C7. (A) ELISA com reconhecimento dos peptídeos em uma faixa maior de concentração de 100000-0.0001 $\eta\text{g/mL}$, e (B) em uma faixa de concentração menor de 400-6.25 $\mu\text{g/mL}$.

4.5.5. Análise de interação por ressonância de superfície plasmônica

A técnica de ressonância de superfície plasmônica avalia uma interação entre moléculas (ligante imobilizado pelo seu respectivo analito em solução) através do uso de um chip sensor. Basicamente, o princípio da técnica consiste na medida das alterações de índice de refração (de até 150 nm) na superfície do chip sensor, causadas por interações entre as biomoléculas, que quando se ligam por afinidade aumentam a massa total na superfície do chip, causando uma mudança no ângulo de índice de refração que é proporcional ao aumento da massa (interação ligante-analito). Um ligante (anticorpo) é

imobilizado na superfície desse chip e submetido a um fluxo contínuo de tampão contendo o analito (antígeno ou peptídeo), resultando em gráficos de sensogramas que mostram o aumento de unidades de ressonância por unidades de tempo. A partir desses sensogramas, obtém-se as constantes de afinidade e de dissociação, as quais são utilizadas para o cálculo da constante de equilíbrio de dissociação (K_D).

Com os dados obtidos a partir de sensogramas de análise de interação entre anticorpo 1A3 e peptídeo P1A3 foi possível calcular um valor de K_D e comparar esse dado com o obtido para o conjugado DOTA-P1A3 (tabela 8). Além dos valores de constantes, sensogramas demonstrando as curvas de concentração de peptídeos P1A3 (figura 71) e DOTA-P1A3 foram utilizados para cálculos de constantes de afinidade e dissociação, fornecendo dados de força dessas interações. O modelo de análise foi o de interação de transferência de massa 1:1, que considera que 1 anticorpo se ligará a apenas um antígeno que neste caso é o peptídeo. Para isso, foi necessário ajustar os dados a esse modelo 1:1, conforme demonstram os sensogramas ajustados nas figuras 72 e 73 para P1A3 e DOTA-P1A3, respectivamente. As constantes de cinética de equilíbrio de dissociação K_D de P1A3 e DOTA-P1A3 demonstraram valores de concentração muito próximos, na escala micromolar, sugerindo que a conjugação não alterou sua afinidade ao anticorpo 1. As curvas demonstram que as unidades de ressonância aumentavam proporcionalmente de acordo com o aumento da concentração do analito peptídico adicionado ao sistema (tanto P1A3 quanto DOTA-P1A3). Considerando que os valores da constante de equilíbrio de dissociação (K_D) é a relação entre a constante de dissociação (k_d) pela constante de associação (k_a), significa que quanto maior o valor de K_D , mais peptídeo está dissociando do que se associando ao anticorpo, por isso, as concentrações aqui encontradas na escala micromolar para ambos P1A3 e DOTA-P1A3 podem apresentar uma força de interação mediana.

Tabela 8. Dados de constantes de afinidade e dissociação obtidos a partir das curvas de concentração de peptídeos.

	k_a (1/ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
P1A3	9,148	$4,70 \times 10^{-5}$	$5,14 \times 10^{-6}$
DOTA-P1A3	12,69	$1,55 \times 10^{-5}$	$1,23 \times 10^{-6}$

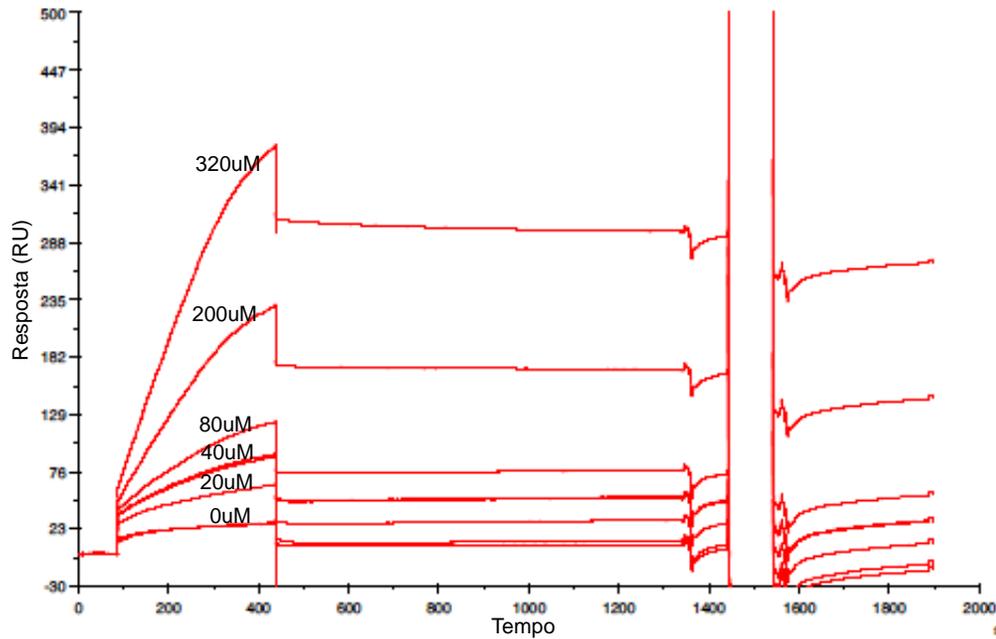


Figura 71. Sensograma de ressonância de superfície plasmônica da interação entre P1A3 e anticorpo monoclonal 1A3. Curva de concentração de P1A3 de 0-320 μM interagiu com o anticorpo imobilizado 1A3, demonstrando o aumento de RUs com aumento da concentração. A célula de fluxo utilizada para a análise continha aproximadamente 10000 RUs de imobilização e a interação foi descontada da célula de fluxo sem imobilização utilizada como branco.

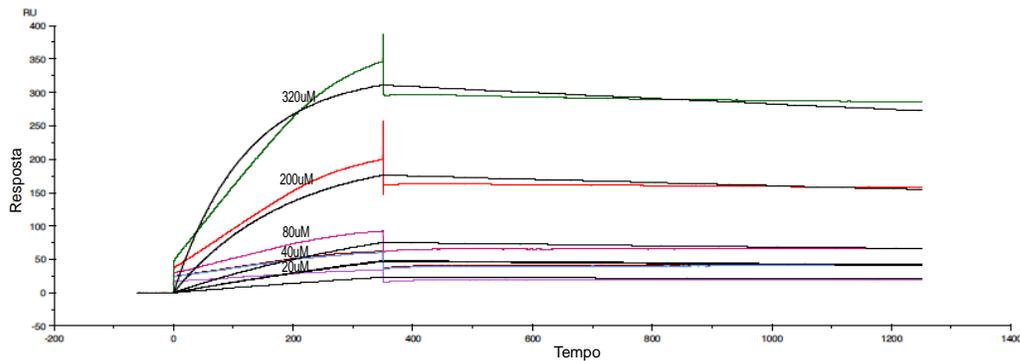


Figura 72. Sensograma ajustado no modelo de transferência de massa utilizando P1A3. Dados estão demonstrados como curvas ajustadas ao modelo 1:1 de interação. As curvas em preto são as interações consideradas matematicamente ideais para o modelo 1:1, sendo que as curvas coloridas são as reais curvas obtidas no experimento.

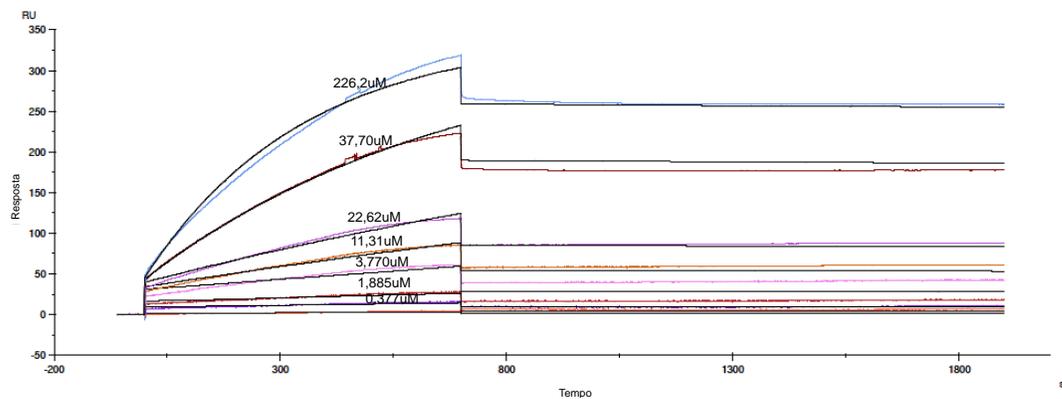


Figura 73. Sensograma ajustado no modelo de transferência de massa utilizando DOTA-P1A3. Dados estão demonstrados como curvas ajustadas ao modelo 1:1 de interação. As curvas em preto são as interações consideradas matematicamente ideais para o modelo 1:1, sendo que as curvas coloridas são as reais curvas obtidas no experimento.

5. DISCUSSÃO

A LDL(-) é uma forma modificada *in vivo* da partícula de LDL por diferentes mecanismos que resultam em um aumento de sua carga eletronegativa. Sua importância e atividade dentro do processo aterosclerótico tem sido constantemente objeto de discussão entre os pesquisadores, sendo recentemente reforçado a forte relação entre o aumento do índice de eletronegatividade da LDL e a sua correlação com o aumento do risco cardiovascular (IVANOVA; BOBRY SHEV; OREKHOV, 2015). Uma hipótese sobre os processos que ocorrem dentro da placa aterosclerótica descreve que a modificação da LDL pode ocorrer tanto na circulação quanto no espaço subendotelial, por oxidação ou outros processos, gerando partículas de LDL(-) que são fagocitadas por macrófagos. Estes apresentam epítomos aos linfócitos B que produzem anticorpos específicos para a LDL(-), que também formam imunocomplexos, sendo que ambos podem migrar para a circulação ou permanecer no local de lesão. O processo descrito é o único que é extremamente específico, ao contrário das outras formas mais extensivamente modificadas de LDL, sabendo-se que deve ocorrer somente no local de lesão (MELLO et al., 2011). Esta hipótese reforça a importância da LDL(-) na indução da resposta imune inata e adaptativa na progressão da aterosclerose. Conforme mencionado anteriormente, está comprovado que LDL(-) é uma lipoproteína pró-inflamatória e pró-aterogênica (FAULIN; CAVALCANTE; ABDALLA, 2010; SÁNCHEZ-QUESADA; VILLEGAS; ORDÓÑEZ-LLANOS, 2012; TEIXEIRA DAMASCENO et al., 2007), além de ser propensa à agregação, interagindo com proteoglicanos da matriz extracelular (SÁNCHEZ-QUESADA; VILLEGAS; ORDÓÑEZ-LLANOS, 2012). Por isso, um imunoenensaio diagnóstico para detecção das concentrações plasmáticas de LDL(-) foi desenvolvido e validado, utilizando os anticorpos monoclonais anti-LDL(-) 1A3 e 2C7 (FAULIN et al., 2012; SANTO FAULIN et al., 2008a). Posteriormente, epítomos da LDL(-), reconhecidos pelos anticorpos 1A3 e 2C7 foram identificados por phage display (FAULIN et al, manuscrito em preparação).

O mapeamento de epítomos tem sido muito utilizado para identificação de regiões reconhecidas por anticorpos e estudar o papel que desempenham em uma determinada resposta imunológica. O mapeamento é possível por diversas técnicas, sendo que a mais comum é o phage display, que consiste no uso de bibliotecas de peptídeos aleatórios

apresentados sobre a superfície de fagos filamentosos. Moléculas que conseguem induzir uma resposta imunológica muito similar ao epítipo natural são consideradas miméticas, ou seja, mimetizam a função deste epítipo. Através da técnica de phage display, foram identificadas as regiões reconhecidas pelos anticorpos monoclonais 1A3 e 2C7 com o uso de bibliotecas de peptídeos conformacionais. Isto é relevante porque maioria dos epítipos reconhecidos por anticorpos são do tipo descontínuos, ou seja, não correspondem a uma sequência primária da proteína, mas sim a uma conformação específica de um microdomínio da proteína que permite o reconhecimento pelo anticorpo. Baseado em uma seleção por phage display com uma biblioteca de peptídeos circulares, selecionou-se dois peptídeos, chamados de P1A3 e P2C7 (FAULIN et al, manuscrito em preparação). Neste trabalho, foi investigado o potencial desses peptídeos como uma ferramenta de imagem molecular para o mapeamento das lesões ateroscleróticas em modelos animais, utilizando PET/CT. Primeiramente, foi padronizada a radiomarcagem dos peptídeos com os diferentes radionuclídeos (^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e ^{64}Cu), para que em seguida, os radiotraçadores fossem avaliados em estudos de biodistribuição e imagens PET/SPECT/CT.

Os experimentos de marcação com radionuclídeos prosseguiram utilizando-se ^{68}Ga eluído do gerador $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$. As atividades específicas para as marcações de DOTA-P1A3 realizadas manualmente e no módulo automatizado foram 16,9 MBq/ ηmol e 10,6 MBq/ ηmol , respectivamente. No entanto, resultados de porcentagem de pureza radioquímica obtidos por CLAE demonstraram que o peptídeo P1A3 quando radiomarcado pelo módulo de síntese automatizado apresentava um produto final mais puro comparado ao modo de marcação manual que demonstrou radiólise do radiotraçador mesmo após a purificação em cartucho C18. Além disso, outros fatores que podem ter interferido na atividade específica do produto final radiomarcado inclui uma pequena degradação que o peptídeo P1A3 sofreu perdendo o seu quelante DOTA. Por isso, as próximas marcações foram realizadas utilizando apenas peptídeos oriundos de uma nova síntese, com as radiomarcações realizadas no módulo de síntese automatizado. A atividade específica de um composto radiomarcado é definida como a taxa de atividade do radioisótopo pela massa total contida no meio de reação e não deve ser muito baixa, pois se houver uma fração muito grande de composto não ligado ao radioisótopo estas moléculas não marcadas podem

competir com as moléculas radiomarcadas impedindo sua ligação ao alvo e reduzindo o sinal captado na imagem (HOESCHEN; RAFECAS; ASPELMEIER, 2011).

Com os novos peptídeos sintéticos, também foi avaliada a possibilidade de realizar marcações de DOTA-P2C7 com ^{68}Ga , de modo manual, mas adicionando-se ácido gálico e ácido ascórbico, a fim de reduzir o aparecimento de radiólise, o que foi realizado com sucesso. Agentes com poder antioxidante como ácido ascórbico e ácido gálico podem prevenir radiólise de peptídeos (SOSABOWSKI; MATHER, 2006) e a adição de solventes orgânicos hidrofílicos como acetonitrila, etanol e dimetilformamida reduzem a força iônica da reação (LAVERMAN et al., 2012). A atividade específica para ^{68}Ga -DOTA-P2C7 foi de 20,1 MBq/ μmol , o que foi um pouco maior quando comparado ao DOTA-P1A3, e ainda se manteve relativamente estável em soro humano, permitindo-se o seu uso como radiotraçador para aquisição de imagens PET.

Existem algumas dificuldades em analisar a captação de um radiotraçador principalmente no caso de estruturas muito pequenas como o arco aórtico de um camundongo, problema que já foi relatado anteriormente devido à pobre resolução espacial do PET (NIE et al., 2016). Por isso, é necessário a injeção de uma substância que possa melhorar o contraste nas imagens de localização anatômica por CT. Neste estudo, um camundongo LDLR^{-/-} tratado com dieta hipercolesterolêmica apresentou maior captação de ^{68}Ga -DOTA-P1A3 na região do arco aórtico comparado ao animal controle. Os dados de captação do radiotraçador foram todos calculados baseados na concentração encontrada em um voxel (delimitado para a região de interesse de captação), que na realidade é referente a um pixel de imagem mas considerando a dimensão em termos de volume. Então, vários voxels foram desenhados para cada órgão avaliado e uma média da captação em todos os voxels foi calculada para resultar em dados de porcentagem de captação. Maior retenção de ^{68}Ga -DOTA-P1A3 no arco aórtico foi observada no camundongo hipercolesterolêmico do que no controle, sendo ainda mais longa, indicando a capacidade de direcionamento dos peptídeos para o local de lesão aterosclerótica. No entanto, como os dados obtidos para cálculos de %AI/g e %AI/g máximo foram de um experimento com apenas um animal hipercolesterolêmico e outro controle (n=1), não foi possível ainda realizar a análise estatística desse resultado. Porém, futuros experimentos visam aumentar o número amostral da análise do radiotraçador ^{68}Ga -DOTA-P1A3.

A avaliação de ligação do radiotraçador às proteínas plasmáticas é importante principalmente para ^{68}Ga que é um radiometal devido ao processo de transquelação que pode ocorrer no sangue, onde há uma troca entre íons metálicos do quelante com a proteína transferrina do plasma. A transferrina apresenta dois sítios de ligação com forte afinidade à este radiometal e, por isso, o complexo radiomarcado com ^{68}Ga deve ter mais afinidade do que o complexo formado pela transferrina, ou ser altamente inerte na circulação, de modo que evite acúmulo do complexo ^{68}Ga -transferrina nos pulmões e fígado, o que normalmente ocorreria nestes casos (FANI; ANDRÉ; MAECKE, 2008). Portanto, devido à baixa porcentagem de 12,6 % de ligação às proteínas plasmáticas para ^{68}Ga -DOTA-P1A3 e 20 % para ^{68}Ga -DOTA-P2C7, não houve interferência na estabilidade cinética deste radiotraçador, considerando-se que foi abaixo do percentual encontrado para ^{68}Ga -DOTA, onde 25% desse complexo se ligou às proteínas plasmáticas (AUTIO et al., 2014). No estudo de biodistribuição, foram comparadas as captações do radiotraçador nos camundongos controle e hipercolesterolêmico em dois tempos diferentes, demonstrando que somente após 60 minutos as relações aorta/sangue, aorta/coração e coração/sangue permanecem mais altas nos camundongos hipercolesterolêmicos comparados ao controle. Este dado é interessante para radiotraçadores, pois o aumento do tempo após a injeção e o acúmulo em certos órgãos apenas demonstram a especificidade e preferência de captação destes radiotraçadores, uma vez que já haveria tempo suficiente de circulação para sua eliminação.

Imagens PET/CT de camundongos hipercolesterolêmico e controle injetados com ^{68}Ga -DOTA-P2C7 apresentaram um aumento significativo de captação na região do arco aórtico em relação ao animal controle somente no tempo de 17,5 min, segundo os dados de %AI/g. No entanto, quando se analisou a %AI/g máximo, as diferenças significativas foram encontradas nos tempos de 12,5; 17,5 e 25 min de aquisição de imagens PET. Esses resultados são extremamente interessantes, uma vez que os primeiros minutos de aquisição demonstram apenas a circulação do radiotraçador, e por isso, a captação do sinal é inespecífica, sendo portanto, os últimos minutos a partir de 17,5 min que a captação no arco aórtico se torna mais específica e duradoura. Em um estudo com humanos, de grupos de alto e baixo risco cardiovascular, foi comparada a captação em grandes artérias, utilizando ^{68}Ga -DOTATATO e ^{18}F -FDG, demonstrando que as relações alvo/background foram

significativamente maiores em mais segmentos da aorta para ^{68}Ga -DOTATATO no grupo de alto risco, principalmente na aorta abdominal e nas artérias ilíacas, quando comparado ao ^{18}F -FDG, onde não se observou diferenças entre os grupos de alto e baixo risco cardiovascular (LI et al., 2012). Outro estudo comparou a aplicabilidade de três radiotraçadores ligantes de receptores de somatostatina, dois marcados com ^{68}Ga (^{68}Ga -DOTATATO e ^{68}Ga -DOTANOC) e um marcado com ^{18}F (^{18}F -FDR-NOC) para visualização de lesões ateroscleróticas em camundongos IGF-II/LDLR^{-/-} ApoB^{100/100} (lesões calcificadas). Observou-se que ambos os radiotraçadores de ^{68}Ga foram mais captados na aorta no estudo de biodistribuição *ex vivo*, mas nas imagens PET/CT *in vivo*, apenas ^{68}Ga -DOTANOC apresentou maior captação na aorta (RINNE et al., 2016). Esses dados demonstram o potencial de radiotraçadores marcados com ^{68}Ga para visualização das lesões ateroscleróticas por PET.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ apresenta muitas vantagens em termos de radionuclídeos SPECT pois emite raios gama com energia ótima de 140 keV, para o qual a maioria dos detectores SPECT foram aperfeiçoados. Além disto, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ tem uma meia-vida relativamente longa de 6 h, sendo eluído de geradores $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ que podem ser facilmente transportados para o local de uso (ARANO, 2002). Alguns radiotraçadores marcados com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ para diferentes alvos tem sido avaliados quanto à captação em lesões ateroscleróticas (BOZÓKY et al., 2004; BROISAT et al., 2014; DIMASTROMATTEO et al., 2013; GLAUDEMANS et al., 2014; LEES et al., 1988; SUN YOO et al., 2015). O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ neste estudo foi utilizado inicialmente para a marcação do peptídeo P2C7 para avaliar a biodistribuição, uma vez que a obtenção de ^{68}Ga a partir do gerador foi mais difícil devido à sua indisponibilidade de horário e também pelas facilidades mencionadas anteriormente. No entanto, a possibilidade de se comparar a aquisição de imagens PET com SPECT é extremamente interessante, apesar de que ambos possuem um poder de sensibilidade de detecção semelhantes, os radionuclídeos utilizados são diferentes e, portanto, a resolução da imagem também é diferente. Ressalta-se que o estudo de biodistribuição demonstrou que apenas a relação de %AI/órgão da aorta/coração foi significativamente maior nos dois tempos após injeção analisados, e ainda maior após 90 min, sendo que esta diferença não foi encontrada em nenhuma das relações com o radiotraçador ^{68}Ga -DOTA-P1A3 nos tempos de 30 e 60 min. Ainda, através da imagem SPECT 3D, o dado de %AI/g no arco aórtico foi maior no camundongo

hipercolesterolêmico do que no controle. No entanto, comparando a captação *in vivo* do mesmo peptídeo P2C7 entre PET e SPECT, foi encontrado maior %AI/g com ^{68}Ga -DOTA-P2C7 do que $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-P2C7. Talvez essa diferença se deva à demora que os colimadores no SPECT levam para se movimentarem a fim de detectar os sinais emitidos pelo radiotraçador, ao passo que a detecção pelo PET é feita quase simultaneamente.

Marcações com o radiometal ^{64}Cu também foram realizadas através de complexação por meio dos quelantes DOTA e NOTA. DOTA-P1A3 foi marcado com sucesso com ^{64}Cu , resultando em um produto final com 100 % de pureza radioquímica com atividade específica de 37 MBq/ ηmol , mas DOTA-P2C7 apresentou degradação quando marcado com ^{64}Cu , sendo que 15-20% dos picos detectados eram produtos degradados, de acordo com a análise por CLAE. Pelo fato dos produtos de radiólise estarem muito próximos ao pico principal, a degradação poderia ocorrer em parte da sequência responsável pela conformação do peptídeo. Por isso, as causas para esta degradação foram investigadas. Uma explicação seria que a radiólise atacaria apenas um dos aminoácidos que compõem o P2C7, o que pode ser confirmado por CLAE, onde foram comparados cromatogramas de diferentes tempos após a marcação e na presença de ácido ascórbico. Outra prova de que essa radiólise era contínua foi que mesmo após a purificação do pico principal por CLAE, a porção purificada foi reanalisada e demonstrou-se que a radiólise continuava ocorrendo.

Para a marcação com ^{18}F , a estratégia escolhida foi baseada na complexação indireta entre alumínio-fluoreto e o quelante NOTA de forma muito semelhante ao que acontece com os radiometais (MCBRIDE et al., 2009). O alumínio é o metal com maior afinidade de ligação ao fluoreto, com a formação de três possíveis pontes para formar um complexo metálico (BRUCE MARTIN, 1996). Sua geometria química permite a complexação com NOTA, em um método fácil e rápido, em relação aos métodos tradicionais de marcação de peptídeos com ^{18}F que normalmente é um processo laborioso que demanda muitas etapas e certa habilidade por parte do profissional que realiza o procedimento devido ao risco intrínseco de manipulação de material radioativo. Apesar da praticidade desta técnica, a atividade específica obtida utilizando-se esta estratégia foi extremamente baixa porque a reação necessitava de baixa atividade de ^{18}F e grandes quantidades de peptídeo, sendo inaceitável como um radiotraçador para imagens PET quando comparado a outros estudos com o mesmo quelante e mesma estratégia

(HAUSNER; BAUER; SUTCLIFFE, 2014; LAVERMAN et al., 2010; MCBRIDE et al., 2010). Entretanto, estes estudos utilizaram altas atividades de ^{18}F e concentração elevada de peptídeo a fim de se obter a desejada atividade específica. Além disso, NOTA-P2C7 foi marcado com ^{18}F em um sistema incubado a 100°C por 30-40 minutos, tempo mais longo do que os 15 minutos descritos anteriormente (MCBRIDE et al., 2009), o que pode alterar podendo a estrutura dos peptídeos circulares. Devido ao alto preço dos peptídeos não foi possível utilizar a mesma quantidade de peptídeo como nos outros estudos descritos, tendo sido avaliado e apenas o aumento da atividade de ^{18}F que poderia aumentar a atividade específica do peptídeo marcado, o que não ocorreu. Como a atividade específica já foi definida anteriormente, baixos valores de atividade específica não são interessantes para nenhum radiotraçador, resultando em baixa resolução das imagens PET. Uma explicação para a baixa atividade específica está no quelante NOTA, pois o terceiro grupo carboxílico presente em NOTA desloca a ligação do alumínio ao ^{18}F (SHETTY et al., 2011). Por esta razão, optou-se por focar na marcação de NOTA-P1A3 com ^{64}Cu como um novo radiotraçador na comparação de imagens PET entre os quelantes DOTA e NOTA, considerando que P2C7 demonstrou radiólise na marcação com ^{64}Cu . Deste modo, a marcação de NOTA-P1A3 foi realizada com sucesso com atividade específica muito similar ao obtido com DOTA-P1A3.

Outra estratégia de marcação com ^{64}Cu foi baseada no uso de um nanocluster de ouro. Existem muitos tipos de nanopartículas de ouro com características particulares que dependem de seu tamanho e formato, para uso diagnóstico ou terapêutico. A química do ouro permite a síntese de muitos diferentes tipos de nanopartículas como o nanorod, nanocubo, nanoshell, nanostar, nanoesfera e o nanocluster. No entanto, uma grande preocupação com relação à essas nanopartículas é a sua toxicidade, devido à sua característica de metal pesado, que resulta no acúmulo hepático através de fagocitose específica pelo sistema fagocítico mononuclear, muitas vezes relacionado também ao tamanho da nanopartícula (GARCÍA et al., 2014). Neste cenário, o nanocluster de ouro apresenta grande vantagem sendo que é classificado como algo entre o ouro molecular e uma nanopartícula, porque é formado por centenas de átomos de ouro, reduzindo em alguns milímetros o seu tamanho (THAKOR et al., 2011). A estrutura do nanocluster de ouro é caracterizado por apresentar seus átomos com a camada de valência totalmente preenchida

com elétrons. Como solução para a toxicidade, um novo nanocluster de ouro formando uma liga metálica com ^{64}Cu foi desenvolvido com a proposta de obtenção de imagens baseadas em radionuclídeos (ZHAO et al., 2014b). A via de eliminação destes nanoclusteres de ouro demonstraram ser extremamente vantajosas devido ao seu pequeno tamanho, que é o limite do poro de filtração renal, permitindo que o nanocluster seja rapidamente eliminado do organismo, o que reduz sua toxicidade por acúmulo em outros órgãos. Além disso, o nanocluster de ouro de liga metálica com ^{64}Cu é um radiotraçador muito estável pois ^{64}Cu se torna parte da composição do nanocluster, onde se localiza no interior da sua estrutura, evitando o processo de transquelação à proteínas que normalmente ocorre com reações com ^{64}Cu baseadas na complexação metal-quelante (ZHAO et al., 2014a). Considerando essas vantagens, o nanocluster de ouro foi escolhido para ser funcionalizado com o peptídeo P1A3 como outra abordagem de radiotraçador, podendo prolongar o seu tempo de circulação, além da possibilidade de comparação com os radiotraçadores baseados em peptídeos (^{64}Cu -DOTA-P1A3 e ^{64}Cu -NOTA-P1A3), em termos de desempenho como agentes de imagem PET.

A biodistribuição do $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ demonstrou acúmulo no fígado após 1 e 3 horas, observando-se então o aumento da captação nos rins. Resultados prévios com o controle $^{64}\text{CuAuNC}$, utilizando-se polietilenoglicol de 750 Daltons, demonstraram um tamanho hidrodinâmico muito semelhante ao limite de filtração renal de 5,5 ηm e por isso este tamanho de PEG foi o escolhido para a síntese do nanocluster (ZHAO et al., 2014b). A análise de via de eliminação demonstrou maior concentração do radiotraçador nas fezes em 24 e 48 hs do que nas primeiras 4 hs, enquanto que a concentração na urina foi reduzindo-se, corroborando com dados anteriores de biodistribuição com $^{64}\text{CuAuNC}$ (ZHAO et al., 2014b). Entranto, o mecanismo responsável por esta eliminação ainda não está totalmente esclarecido e deve ser melhor investigado. Avaliação da biodistribuição dos radiotraçadores ^{64}Cu -DOTA-P1A3 e ^{64}Cu -NOTA-P1A3 demonstrou claramente que são eliminados pelos rins, o que é normal para radiotraçadores peptídicos pois estes são muito pequenos, sendo removidos do organismo pela filtração glomerular renal.

Utilizando-se imagens PET avaliou-se os radiotraçadores marcados com ^{64}Cu nos camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ com diferentes tempos de dieta hieprcolesterolêmica (6, 7, 9, e 10 semanas). Camundongos $\text{ApoE}^{-/-}$ desenvolvem espontaneamente aterosclerose e se tornam

severamente hipercolesterolêmicos quando alimentados com dietas ricas em gordura (PLUMP et al., 1992; VAN REE et al., 1994). Portanto, utilizando animais com diferentes tempos de dieta hipercolesterolêmica e considerando que isto representaria o estagiamento diferenciado na progressão da aterosclerose, avaliamos se a captação dos radiotraçadores poderia ser maior em algum dos tempos avaliados. Neste estudo, nenhuma diferença na captação para o acompanhamento da progressão da aterosclerose por imagem PET foi encontrada, sugerindo que o alvo desses radiotraçadores pode estar presente na lesão aterosclerótica em uma mesma intensidade nos períodos de tempo avaliados (6-10 semanas de dieta hipercolesterolêmica). Neste caso, a captação do radiotraçador foi calculada a partir de dados obtidos da imagem PET através do SUV (*standardized uptake value*) pela taxa de concentração de atividade do radiotraçador na região de interesse (ROI - *region of interest*) e pela dose injetada dividida pelo peso do animal (HOESCHEN; RAFECAS; ASPELMEIER, 2011). O SUV é considerado como uma semi-quantificação e é utilizado para suplementar uma interpretação visual das imagens PET (THIE, 2004). A ROI para este estudo foi o arco aórtico dos camundongos onde a lesão aterosclerótica se instala. Imagens PET com $^{64}\text{CuAuNC-P1A3}$ demonstrou sua habilidade para se direcionar à região do arco aórtico de camundongos $\text{Apoe}^{-/-}$ com 6 e 9 semanas de dieta hipercolesterolêmica somente nas aquisições de imagens 1 e 3-4 h após a injeção do radiotraçador. Pelo fato dos nanoclusteres de ouro terem um tamanho ao redor de 5nm , esses são rapidamente eliminados do organismo, indicando que as moléculas em sua superfície devem ter alta afinidade pelo seu alvo para permitir que os nanoclusteres tenham tempo suficiente para atingir o órgão de interesse.

Comparando-se $^{64}\text{Cu-DOTA-P1A3}$ e $^{64}\text{Cu-NOTA-P1A3}$ com relação à captação por imagem PET, $^{64}\text{Cu-NOTA-P1A3}$ apresentou maior captação no camundongo $\text{Apoe}^{-/-}$ (7 semanas de dieta) quando comparado com o camundongo controle C57Bl/6. De acordo com Zhang et al. (2011), NOTA possui características superiores à DOTA, pois apresenta melhor contraste em imagens PET, além da circulação mais longa na corrente sanguínea, tornando-o mais disponível para se ligar ao alvo de interesse. Apesar de não ter havido diferença significativa em reduzir sua captação no bloqueio com o peptídeo "frio" NOTA-P1A3 , a captação no arco aórtico sem o bloqueio ainda foi maior. Dados de autoradiografia das aortas dissecadas após a obtenção das imagens PET demonstraram elevada

radioatividade no arco aórtico do camundongo *Apoe^{-/-}* que recebeu ⁶⁴Cu-NOTA-P1A3, comparado com a aorta do camundongo controle, consistente com os dados de SUV. Esses dados reforçam a especificidade do radiotraçador em se ligar à região do arco aórtico, local de formação de lesão aterosclerótica.

Estudos de interação com o radioligante são importantes para caracterizar um novo radiotraçador como radiofármaco, devendo-se avaliar a força de interação com o alvo de interesse com afinidade alta suficiente para aumentar a razão sinal-background captado em imagens de medicina nuclear, fornecendo contraste que permita a identificação do local de interesse na imagem (MATTHEWS et al., 2012). Inicialmente, foi avaliada a interação dos peptídeos mimotopos com células endoteliais de artéria humana HAEC, revelando internalização destes pela análise de microscopia confocal, sugerindo que células endoteliais presentes em lesões ateroscleróticas podem ser um alvo de interesse em aterosclerose experimental. O ensaio de internalização demonstrou que os peptídeos são captados tanto por macrófagos RAW como por macrófagos primários, indicando um possível alvo de ligação que poderia ocorrer na lesão aterosclerótica. A presença de uma grande quantidade de macrófagos que se acumulam na placa aterosclerótica é explicada pela menor capacidade de migração e de resolução da inflamação destas células no local da lesão (MOORE; SHEEDY; FISHER, 2013). Nos resultados de internalização, diferenças foram encontradas entre os tipos de células com maior captação do P2C7 em relação ao P1A3 nos macrófagos primários e efeito inverso em macrófagos RAW, apesar das células primárias captarem níveis mais elevados de peptídeos em comparação com células da linhagem RAW. Isso se deve ao fato de que as células primárias podem apresentar o metabolismo mais ativo do que as células de linhagens imortalizadas.. Além disso, os peptídeos apresentam sequências diferentes de aminoácidos, portanto o reconhecimento e captação destes pelos macrófagos podem não ocorrer da mesma forma. Apesar de o mecanismo de internalização não ter sido identificado, a captação dos peptídeos por macrófagos é importante pois sugere um dos possíveis alvos de ligação dos radiotraçadores na lesão.

Para melhor investigação da interação entre os peptídeos e os componentes da lesão aterosclerótica, imunofluorescência de lesões obtidas de camundongos *Apoe^{-/-}* foi avaliada usando primeiramente sondas FITC-P1A3/P2C7 e posteriormente peptídeos marcados com

Alexa Fluor 647. Além da fluorescência no verde visualizada nas lesões, havia forte autofluorescência, principalmente do colágeno presente na camada adventícia onde é possível visualizar o seu contorno fortemente em verde, e por isso, tornando mais difícil diferenciar-se da ligação específica das sondas. Então, no intuito de superar esse problema, outro fluoróforo foi testado para minimizar a autofluorescência que permita a visualização de um sinal real. Alexa Fluor 647 foi escolhido por causa das suas características como os comprimentos de onda de excitação em 651nm e emissão em 672nm, os quais estão muito distantes dos comprimentos de onda do FITC (excitação em 495nm e emissão em 519nm) (FLUOROPHORES.ORG, 2005). Alguns sinais fluorescentes foram observados em poucas células dentro das lesões ateroscleróticas, sugerindo a presença do alvo molecular da sonda Alexa Fluor 647-P1A3 que poderia estar presente na superfície das células. Autofluorescência ainda foi encontrada nas lâminas de lesão aterosclerótica mesmo com esta nova sonda, mas comparando com as aortas dos controles negativo de camundongos LDLr^{-/-} e C57Bl/6 sem lesão, o sinal está localizado somente na camada adventícia e provavelmente em regiões ricas em colágeno. Portanto, o sinal visualizado com Alexa Fluor 647-P1A3 deve ser mais específico pois se encontra no interior da lesão aterosclerótica e a intensidade do sinal fluorescente foi proporcional às diferentes concentrações da sonda. No entanto, estes foram apenas dados preliminares sobre o alvo molecular dos peptídeos e por isso, deve ser identificado com técnicas moleculares mais aprimoradas e sensíveis. Isto já foi descrito anteriormente onde o alvo ligante de um peptídeo derivado da ApoB-100 foi identificado utilizando eletroforese bidimensional e Western Blot com uma sonda fluorescente-peptídeo, seguido por uma análise por espectrometria de massa e por bioinformática, buscando-se em banco de dados a identificação da proteína ligante (WANG, 2014). Após a identificação do alvo molecular, este deve ser avaliado quanto ao nível de expressão no órgão ou tecido de interesse para que este dado seja associado ao nível de captação do radiotraçador, desta forma é possível saber quanto o radiotraçador pode ser eficiente na identificação de um processo molecular de uma doença. Vários estudos tem realizado este tipo de associação (GOLESTANI et al., 2013; LIU et al., 2011, 2013; LUEHMANN et al., 2016; NAHRENDORF et al., 2009; SU et al., 2014).

O ensaio de ELISA confirmou que os peptídeos continuam sendo reconhecidos pelos anticorpos monoclonais 1A3 e 2C7, após a derivatização com os quelantes, indicando que a inserção do espaçador e do agente quelante não impediram a sua ligação aos anticorpos. Apesar de ter havido maior internalização do peptídeo P2C7 em macrófagos primários, o ensaio de ELISA indica que a ligação aos anticorpos monoclonais é maior entre P1A3 e o anticorpo 1A3. Além de macrófagos, outro possível alvo de imagem molecular seriam os autoanticorpos anti-LDL(-) também encontrados na placa aterosclerótica (DAMASCENO et al., 2006). Autoanticorpos anti-LDL(-) no interior da placa aterosclerótica também podem formar imunocomplexos com LDL(-) e estes podem se ligar à macrófagos da placa via interação com receptores Fc- γ , representando uma outra possível via de reconhecimento dos peptídeos na placa aterosclerótica (FAULIN; CAVALCANTE; ABDALLA, 2010). Conforme citado anteriormente, os níveis de autoanticorpos anti-LDL(-) já foram relacionados ao risco de ocorrência de eventos coronários em pacientes com doença coronariana aguda e crônica, revelando que os níveis desses autoanticorpos foram mais elevados em pacientes com doença coronariana aguda em comparação com os pacientes crônicos com angina estável (OLIVEIRA et al., 2006). Esses dados reforçam o uso desses peptídeos como biomarcadores uma vez que os níveis de autoanticorpos podem fornecer informações sobre a progressão da aterosclerose.

Por último, a avaliação de força de afinidade por ressonância de superfície plasmônica definiu o nível de afinidade do radioligante ao anticorpo monoclonal 1A3. Alguns estudos já avaliaram a interação de peptídeos mimotopos com seus correspondentes anticorpos através de ressonância de superfície plasmônica (FERRIÈRES et al., 2000; HAJDÚ et al., 2014; MANI; MARCHI; CUCUROU, 1994). Portanto, resultados de interação entre o anticorpo anti-LDL(-) 1A3 e o peptídeo P1A3 e seu conjugado DOTA-P1A3 demonstraram que as constantes de equilíbrio de dissociação se encontram na escala micromolar, sendo muito semelhantes para o peptídeo sozinho e o conjugado, confirmando que a conjugação com DOTA não alterou sua afinidade. Esses dados são importantes para definir a força de interação do peptídeo P1A3 com seu possível alvo molecular na lesão aterosclerótica que pode ser anticorpos anti-LDL(-). Como até o dado momento, o alvo molecular ainda não foi identificado, podemos prever qual a afinidade de P1A3 à lesão aterosclerótica, através do reconhecimento por auto-anticorpos anti-LDL(-), com os valores de K_D . A constante de

afinidade (k_a) para o anticorpo 1A3 e LDL(-) foi definida como 7,4 μM , o que não difere muito do valor de K_D encontrado para o peptídeo P1A3 (FAULIN, 2010).

Similarmente, um peptídeo com afinidade ao receptor de epinefrina tirosina quinase, altamente expresso em tumores sólidos, foi radiomarcado com ^{64}Cu , através de complexação com DOTA, avaliando-se sua interação através da mesma técnica, tendo-se encontrado valores de K_D de 3,06 e 23,3 ηM para o peptídeo sem e com DOTA, respectivamente (XIONG et al., 2011). Neste caso, a conjugação com DOTA reduziu a afinidade do peptídeo ao receptor em uma casa decimal, diferente ao encontrado com o peptídeo P1A3 e DOTA-P1A3, este último com uma afinidade levemente maior em relação ao peptídeo não conjugado.

Futuramente, quando for definido o real alvo molecular desses peptídeos dentro da lesão aterosclerótica, será possível utilizar a ferramenta da ressonância de superfície plasmônica para medir essa interação.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, foi possível investigar a potencialidade de dois peptídeos mimotopos de LDL(-) para interagir com componentes da lesão aterosclerótica, localizando-a no modelo animal murino de aterosclerose. Foram avaliadas marcações com 3 diferentes radionuclídeos: ^{64}Cu , ^{68}Ga e $^{99\text{m}}\text{Tc}$, que permitiram a comparação entre imagens adquiridas por modalidades diferentes como PET e SPECT. Todas as estratégias utilizadas para a quantificação da captação dos peptídeos no local de formação de lesão, o arco aórtico, demonstraram o potencial desses peptídeos como marcadores da lesão aterosclerótica.

Além disso, resultados preliminares indicaram que os peptídeos são internalizados por células endoteliais e macrófagos, importantes na formação da lesão aterosclerótica, além de se localizarem próximos às células da lesão aterosclerótica, conforme resultados de imunofluorescência. Uma vez definido o alvo biológico reconhecido pelos peptídeos, esse dado deverá ser correlacionado ao estadiamento da aterosclerose como ferramenta auxiliar na avaliação do prognóstico da doença.

Portanto, os resultados indicam a potencialidade de uso futuro destes peptídeos mimotopos como agentes de imageamento da aterosclerose.

7. REFERÊNCIAS

ABDALLA, D. S. P.; APOLINÁRIO, E.; DAMASCENO, N. R. T. **Anticorpo monoclonal anti-ldl eletronegativa (ldl-)**Brasil, 2004.

ALEXANDER, M. R.; OWENS, G. K. Epigenetic Control of Smooth Muscle Cell Differentiation and Phenotypic Switching in Vascular Development and Disease. **Annual Review of Physiology**, v. 74, n. 1, p. 13–40, 2012.

ALOJ, L.; MORELLI, G. Design, synthesis and preclinical evaluation of radiolabeled peptides for diagnosis and therapy. **Current pharmaceutical design**, v. 10, n. 24, p. 3009–31, 2004.

AMORINO, G. P.; HOOVER, R. L. Interactions of monocytic cells with human endothelial cells stimulate monocytic metalloproteinase production. **The American Journal of Pathology**, v. 152, n. 1, p. 199–207, 1998.

ANDRÉ, J. P. et al. 1, 4, 7-Triazacyclononane-1-succinic acid-4, 7-diacetic acid (NODASA): a new bifunctional chelator for radio gallium-labelling of biomolecules. **Chemical Communications**, n. 12, p. 1301–1302, 1998.

APOLINARIO, E. et al. Minimally modified (electronegative) LDL–and Anti-LDL–autoantibodies in diabetes mellitus and impaired glucose tolerance. **Int J Atheroscler**, v. 1, n. 1, p. 42–47, 2006.

ARANO, Y. Recent advances in 99mTc radiopharmaceuticals. **Annals of Nuclear Medicine Vol**, v. 16, n. 2, p. 79–93, 2002.

AUTIO, A. et al. Assessment of blood flow with (68)Ga-DOTA PET in experimental inflammation: a validation study using (15)O-water. **American journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 4, n. 6, p. 571–9, 2014.

AVOGARO, P.; BON, G. B.; CAZZOLATO, G. Presence of a modified low density lipoprotein in humans. **Arteriosclerosis**, v. 8, n. 1, p. 79–87, 1988.

BANCELLS, C. et al. Novel phospholipolytic activities associated with electronegative low-density lipoprotein are involved in increased self-aggregation. **Biochemistry**, v. 47, n. 31, p. 8186–8194, 2008.

BANCELLS, C. et al. High binding affinity of electronegative LDL to human aortic proteoglycans depends on its aggregation level. **Journal of lipid research**, v. 50, n. 3, p. 446–55, 2009.

BARGER, A. C. et al. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis. **The New England journal of medicine**, v. 310, n. 3, p. 175–177, 1984.

BENÍTEZ, S. et al. Changes in low-density lipoprotein electronegativity and oxidizability after aerobic exercise are related to the increase in associated non-esterified fatty acids.

Atherosclerosis, v. 160, n. 1, p. 223–232, 2002.

BENÍTEZ, S. et al. Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase Is Mainly Associated With Electronegative Low-Density Lipoprotein Subfraction. **Circulation**, v. 108, n. 1, p. 92–96, 8 jul. 2003.

BENÍTEZ, S. et al. Impaired binding affinity of electronegative low-density lipoprotein (LDL) to the LDL receptor is related to nonesterified fatty acids and lysophosphatidylcholine content. **Biochemistry**, v. 43, n. 50, p. 15863–15872, 2004a.

BENÍTEZ, S. et al. Effect of simvastatin in familial hypercholesterolemia on the affinity of electronegative low-density lipoprotein subfractions to the low-density lipoprotein receptor. **American Journal of Cardiology**, v. 93, n. 4, p. 414–420, 13 jun. 2004b.

BENÍTEZ, S. et al. Wide proinflammatory effect of electronegative low-density lipoprotein on human endothelial cells assayed by a protein array. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, n. 9, p. 1014–1021, 2006.

BENÍTEZ, S. et al. Electronegative low-density lipoprotein subfraction from type 2 diabetic subjects is proatherogenic and unrelated to glycemic control. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 23, n. 1, p. 26–34, 2007.

BERNEIS, K. K.; KRAUSS, R. M. Metabolic origins and clinical significance of LDL heterogeneity. **Journal of lipid research**, v. 43, n. 9, p. 1363–1379, 2002.

BOZÓKY, Z. et al. Preparation and investigation of ^{99m}Tc-labeled low-density lipoproteins in rabbits with experimentally induced hypercholesterolemia. **European Biophysics Journal**, v. 33, n. 2, p. 140–145, 2004.

BROISAT, A. et al. ^{99m}Tc-cAbVCAM1-5 Imaging Is a Sensitive and Reproducible Tool for the Detection of Inflamed Atherosclerotic Lesions in Mice. 2014.

BRUCE MARTIN, R. Ternary complexes of Al³⁺ and F⁻ with a third ligand. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 149, p. 23–32, maio 1996.

BUONO, C. et al. T-bet deficiency reduces atherosclerosis and alters plaque antigen-specific immune responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1596–1601, 2005.

CAMEJO, G. et al. identification of Apo B-100 segments mediating the interaction of low density lipoproteins with arterial proteoglycans. **Arteriosclerosis**, v. 8, n. 4, p. 368–77, 1988.

CARDIN, A. D.; WEINTRAUB, H. J. Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. **Arteriosclerosis (Dallas, Tex.)**, v. 9, n. 1, p. 21–32, 1989.

CHOI, H. S.; FRANGIONI, J. V. Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation. **Molecular imaging**, v. 9, n. 6, p. 2010–7290, 2010.

COLTURATO, M. T. et al. **Development the new radiopharmaceutical ⁶⁸Ga-DOTATATE in IPEN-CNEN/SPXXIII Congresso de ALASBIMN. Anais...2011**

DAMASCENO, N. R. T. et al. Detection of electronegative low density lipoprotein (LDL-)

in plasma and atherosclerotic lesions by monoclonal antibody-based immunoassays. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 28–38, 2006.

DE CASTELLARNAU, C. et al. Atherogenic and inflammatory profile of human arterial endothelial cells (HUAEC) in response to {LDL} subfractions. **Clinica Chimica Acta**, v. 376, n. 1–2, p. 233–236, 2007.

DE SAINT-HUBERT, M. et al. In vivo molecular imaging of apoptosis and necrosis in atherosclerotic plaques using MicroSPECT-CT and MicroPET-CT Imaging. **Molecular Imaging and Biology**, v. 16, n. 2, p. 246–254, 2014.

DEMUTH, K. et al. A Cytotoxic Electronegative LDL Subfraction Is Present in Human Plasma. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 16, n. 6, p. 773 LP-783, 1 jun. 1996.

DENISOVA, G. F.; DENISOV, D. A.; BRAMSON, J. L. Applying bioinformatics for antibody epitope prediction using affinity-selected mimotopes – relevance for vaccine design. **Immunome Research**, v. 6, n. Suppl 2, p. S6, 2010.

DIAS, C. R. DE B. R. **ESTUDO DE MARCAÇÃO DOS ANTICORPOS MONOCLONAIS IOR-CEA-1 E IOR-EGF/R3 COM**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2005.

DIMASTROMATTEO, J. et al. In Vivo Molecular Imaging of Atherosclerotic Lesions in Apoe^{-/-} Mice Using VCAM-1-Specific, 99mTc-Labeled Peptidic Sequences. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 54, n. 8, p. 1442–1449, 1 ago. 2013.

ELKHAWAD, M.; RUDD, J. H. F. Radiotracer Imaging of Atherosclerotic Plaque Biology. **Cardiology Clinics**, v. 27, n. 2, p. 345–354, 2009.

ESTRUCH, M. et al. CD14 and TLR4 mediate cytokine release promoted by electronegative LDL in monocytes. **Atherosclerosis**, v. 229, n. 2, p. 356–362, 2013.

ESTRUCH, M. et al. Electronegative LDL induces priming and inflammasome activation leading to IL-1 β release in human monocytes and macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 11, p. 1442–1449, 2015.

FANG, C. et al. Functionalization of iron oxide magnetic nanoparticles with targeting ligands: their physicochemical properties and in vivo behavior. **Nanomedicine (London, England)**, v. 5, n. 9, p. 1357–1369, 2010.

FANI, M.; ANDRÉ, J. P.; MAECKE, H. R. **68Ga-PET: A powerful generator-based alternative to cyclotron-based PET radiopharmaceuticals** *Contrast Media and Molecular Imaging*, 2008.

FAULIN, T. DO E. S. **Desenvolvimento de imunoensaios e biossensores para determinação de LDL eletronegativa**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2010.

FAULIN, T. DO E. S. et al. Development of immunoassays for anti-electronegative LDL autoantibodies and immune complexes. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 1–2, p. 291–297, 2012.

FAULIN, T. DO E. S.; CAVALCANTE, M. F.; ABDALLA, D. S. P. Role of

electronegative LDL and its associated antibodies in the pathogenesis of atherosclerosis. **Clinical Lipidology**, v. 5, n. 5, p. 719–729, 1 out. 2010.

FAYAD, Z. A. et al. Safety and efficacy of dalcetrapib on atherosclerotic disease using novel non-invasive multimodality imaging (dal-PLAQUE): a randomised clinical trial. **The Lancet**, v. 378, n. 9802, p. 1547–1559, 2011.

FERRIÈRES, G. et al. Affinity for the cognate monoclonal antibody of synthetic peptides derived from selection by phage display. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 6, p. 1819–1829, 2000.

GALLINO, A. et al. “In vivo” imaging of atherosclerosis. **Atherosclerosis**, v. 224, n. 1, p. 25–36, 2012.

GARCÍA, K. P. et al. Zwitterionic-Coated “Stealth” Nanoparticles for Biomedical Applications: Recent Advances in Countering Biomolecular Corona Formation and Uptake by the Mononuclear Phagocyte System. **Small**, v. 10, n. 13, p. 2516–2529, 1 jul. 2014.

GLAUDEMANS, A. W. J. M. et al. In vivo and in vitro evidence that ^{99m}Tc-HYNIC-interleukin-2 is able to detect T lymphocytes in vulnerable atherosclerotic plaques of the carotid artery. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 41, n. 9, p. 1710–1719, 2014.

GOLDSTEIN, J. L. et al. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 1, p. 333–337, 1979.

GOLESTANI, R. et al. Feasibility of vascular endothelial growth factor imaging in human atherosclerotic plaque using ⁸⁹Zr-bevacizumab positron emission tomography. **Molecular imaging**, v. 12, n. 4, p. 2012–7290, 2013.

GROSSO, D. M. et al. Antibodies against electronegative LDL inhibit atherosclerosis in LDLr^{-/-} mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 12, p. 1086–1092, 2008.

HAJDÚ, I. et al. Monoclonal antibody proteomics: use of antibody mimotope displaying phages and the relevant synthetic peptides for mAb scouting. **Immunology letters**, v. 160, n. 2, p. 172–7, ago. 2014.

HARDOFF, R. et al. External imaging of atherosclerosis in rabbits using an ¹²³I-labeled synthetic peptide fragment. **J Clin Pharmacol**, v. 33, n. 11, p. 1039–1047, 1993.

HAUSNER, S. H.; BAUER, N.; SUTCLIFFE, J. L. In vitro and in vivo evaluation of the effects of aluminum [¹⁸F]fluoride radiolabeling on an integrin $\alpha\beta_6$ -specific peptide. **Nuclear medicine and biology**, v. 41, n. 1, p. 43–50, 2014.

HERSCHMAN, H. R. **Micro-PET imaging and small animal models of disease** *Current Opinion in Immunology*, 2003.

HOESCHEN, C.; RAFECAS, M.; ASPELMEIER, T. Radiation Physics for Nuclear Medicine. p. 211–232, 2011.

HUTCHINS, G. D. et al. Small animal PET imaging. **ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources**, v. 49, p. 54–65, 2008.

ISOBE, S. et al. Noninvasive imaging of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E-deficient and low-density-lipoprotein receptor-deficient mice with annexin A5. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 47, n. 9, p. 1497–505, 2006.

IVANOVA, E. A.; BOBRY SHEV, Y. V.; OREKHOV, A. N. **LDL electronegativity index: A potential novel index for predicting cardiovascular disease** **Vascular Health and Risk Management**, 2015.

IVERIUS, P.-H. The Interaction between Human Plasma Lipoproteins and Connective Tissue Glycosaminoglycans. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 8, p. 2607–2613, 25 abr. 1972.

JESSUP, W.; KRITHARIDES, L.; STOCKER, R. Lipid oxidation in atherogenesis: an overview. **Biochemical Society transactions**, v. 32, p. 134–138, 2004.

JOSHI, F. et al. **Vascular imaging with positron emission tomography** **Journal of Internal Medicine**, 2011.

JOSHI, F. R. et al. Imaging of hypoxia and inflammation in carotid atherosclerosis with 18F-fluoromisonidazole and 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. **Circulation**, v. 128, n. Suppl 22, p. A14673–A14673, 2013.

JOSHI, N. V et al. 18 F-fluoride positron emission tomography for identification of ruptured and high-risk coronary atherosclerotic plaques: a prospective clinical trial. **The Lancet**, v. 383, n. 9918, p. 705–713, 2014.

KAGADIS, G. C. et al. In vivo small animal imaging: Current status and future prospects. **Medical Physics**, v. 37, n. 12, p. 6421–6442, 2010.

KAZUMA, S. M. et al. Recent Advances of Radionuclide-based Molecular Imaging of Atherosclerosis. **Current pharmaceutical design**, p. 5267–5276, 2015.

KLAUSEN, T. L. et al. Innovations in PET/CT. **Q J Nucl Med Mol Imaging**, v. 56, n. June, p. 268–79, 2012.

LAITINEN, I. et al. Evaluation of $\alpha\beta 3$ integrin-targeted positron emission tomography tracer 18F-galacto-RGD for imaging of vascular inflammation in atherosclerotic mice. **Circulation: Cardiovascular Imaging**, v. 2, n. 4, p. 331–338, 2009.

LAITINEN, I. E. K. et al. Uptake of 11C-choline in mouse atherosclerotic plaques. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 5, p. 798–802, 2010.

LAURAT, E. et al. In vivo downregulation of T helper cell 1 immune responses reduces atherogenesis in apolipoprotein E-knockout mice. **Circulation**, v. 104, n. 2, p. 197–202, 2001.

LAVERMAN, P. et al. A novel facile method of labeling octreotide with (18)F-fluorine. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 3, p. 454–461, 2010.

- LAVERMAN, P. et al. Optimized labeling of NOTA-conjugated octreotide with F-18. **Tumor Biology**, v. 33, n. 2, p. 427–434, 2012.
- LEE, J. H. et al. The interrelated effects of n-6/n-3 and polyunsaturated/saturated ratios of dietary fats on the regulation of lipid metabolism in rats. **The Journal of nutrition**, v. 119, n. 12, p. 1893–9, 1989.
- LEE, S. T.; SCOTT, A. M. Hypoxia Positron Emission Tomography Imaging With 18F-Fluoromisonidazole. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 37, n. 6, p. 451–461, nov. 2007.
- LEE, S.; XIE, J.; CHEN, X. Peptide-based probes for targeted molecular imaging. **Biochemistry**, v. 49, n. 7, p. 1364–1376, 2010.
- LEES, A. M. et al. Imaging Human Atherosclerosis with To-labeled Low Density Lipoproteins. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 8, n. 5, p. 461–470, 1 set. 1988.
- LEVITAN, I.; VOLKOV, S.; SUBBAIAH, P. V. Oxidized LDL: diversity, patterns of recognition, and pathophysiology. **Antioxidants & redox signaling**, v. 13, n. 1, p. 39–75, 2010.
- LI, X. et al. 68Ga-DOTATATE PET/CT for the detection of inflammation of large arteries: correlation with 18F-FDG, calcium burden and risk factors. **EJNMMI research**, v. 2, n. 1, p. 52, 2012.
- LIBBY, P. The Vascular Biology of Atherosclerosis, Chapter 30. In: ZIPES, D. P.; BRAUNWALD, E.; LIBBY, P. (Eds.). . **Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine. Sixth Edition**. [s.l.] W.B.Saunders, 2001. p. 995–1009.
- LIBBY, P.; DICARLI, M.; WEISSLEDER, R. The vascular biology of atherosclerosis and imaging targets. **J Nucl Med**, v. 51 Suppl 1, p. 33S–37S, 2010.
- LIU, Y. et al. Targeting angiogenesis using a C-type atrial natriuretic factor-conjugated nanoprobe and PET. **Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 52, n. 12, p. 1956–63, dez. 2011.
- LIU, Y. et al. PET imaging of chemokine receptors in vascular injury-accelerated atherosclerosis. **Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 54, n. 7, p. 1135–1141, 2013.
- LIU, Z. et al. 68Ga-labeled NOTA-RGD-BBN peptide for dual integrin and GRPR-targeted tumor imaging. **European journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 36, n. 9, p. 1483–1494, 2009.
- LO, J.; PLUTZKY, J. **The biology of atherosclerosis: General paradigms and distinct pathogenic mechanisms among HIV-infected patients** **Journal of Infectious Diseases**, 2012.
- LOBATTO, M.; FUSTER, V. Perspectives and opportunities for nanomedicine in the management of atherosclerosis. **Nature Reviews Drug ...**, p. 835–852, 2011.
- LOBO, J. C. et al. Increased electronegative LDL and decreased antibodies against electronegative LDL levels correlate with inflammatory markers and adhesion molecules in

- hemodialysed patients. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 19–20, p. 1788–1792, 2011.
- LOBO, J. C. et al. Association Between Circulating Electronegative Low-Density Lipoproteins and Serum Ferritin in Hemodialysis Patients: A Pilot Study. **Journal of Renal Nutrition**, v. 22, n. 3, p. 350–356, 16 jun. 2012.
- LUDEWIG, B.; KREBS, P.; SCANDELLA, E. Immunopathogenesis of atherosclerosis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, n. 2, p. 300–306, 2004.
- LUEHMANN, H. P. et al. PET/CT Imaging of Chemokine Receptors in Inflammatory Atherosclerosis Using Targeted Nanoparticles. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 57, n. 7, p. 1124–1129, 1 jul. 2016.
- LUNDBERG, A. M.; HANSSON, G. K. **Innate immune signals in atherosclerosis** **Clinical Immunology**, 2010.
- LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 233–41, 2000.
- MAFRA, D. et al. Alpha-tocopherol supplementation decreases electronegative low-density lipoprotein concentration [LDL(-)] in haemodialysis patients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 24, n. 5, p. 1587–1592, 1 maio 2009.
- MALLAT, Z. et al. The role of adaptive T cell immunity in atherosclerosis. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Suppl, p. S364–S369, 19 abr. 2009.
- MANI, J.-C.; MARCHI, V.; CUCUROU, C. Effect of HIV-1 peptide presentation on the affinity constants of two monoclonal antibodies determined by BIAcore™ technology. **Molecular Immunology**, v. 31, n. 6, p. 439–444, abr. 1994.
- MASSICANO, A. V. F. **Desenvolvimento farmacotécnico de um radioimunoconjugado para terapia de Linfoma não-Hodgkin**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.
- MATEO, J. et al. Noninvasive assessment of hypoxia in rabbit advanced atherosclerosis using 18F-fluoromisonidazole PET imaging. **Circulation: Cardiovascular Imaging**, p. CIRCIMAGING-113, 2014.
- MATHERS, C. D.; LONCAR, D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 11, p. 2011–2030, 2006.
- MATSUBARA, T. Potential of Peptides as Inhibitors and Mimotopes: Selection of Carbohydrate-Mimetic Peptides from Phage Display Libraries. v. 2012, 2012.
- MATTER, C. M. et al. 18F-choline images murine atherosclerotic plaques ex vivo. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 26, n. 3, p. 584–589, 2006a.
- MATTER, C. M. et al. 18F-choline images murine atherosclerotic plaques ex vivo. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 3, p. 584–589, mar. 2006b.
- MATTHEWS, P. M. et al. Positron emission tomography molecular imaging for drug development. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 175–186, 2012.
- MCBRIDE, W. J. et al. A novel method of 18F radiolabeling for PET. **Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 50, n. 6, p. 991–998,

2009.

MCBRIDE, W. J. et al. Improved ^{18}F labeling of peptides with a fluoride-aluminum-chelate complex. **Bioconjugate Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1331–1340, 2010.

MELLO, A. P. Q. et al. Electronegative low-density lipoprotein: Origin and impact on health and disease. **Atherosclerosis**, v. 215, n. 2, p. 257–265, 2011.

MELOEN, R. H.; PUIJK, W. C.; SLOOTSTRA, J. W. Mimotopes: Realization of an unlikely concept. **Journal of Molecular Recognition**, v. 13, n. 6, p. 352–359, 2000.

MENDIS, S.; PUSKA, P.; NORRVING, B. Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. **World Health Organization**, p. 2–14, 2011.

MESZAROS, L. K. et al. Hydrazinonicotinic acid (HYNIC) – Coordination chemistry and applications in radiopharmaceutical chemistry. **Inorganica Chimica Acta**, v. 363, n. 6, p. 1059–1069, 2010.

MICHALOSKI, J. S. et al. Discovery of pan-VEGF inhibitory peptides directed to the extracellular ligand-binding domains of the VEGF receptors. **Science Advances**, v. 2, n. 10, p. e1600611, 28 out. 2016.

MIZUNO, Y.; JACOB, R. F.; PRESTON MASON, R. Inflammation and the development of atherosclerosis - Effects of lipid-lowering therapy. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 18, n. 5, p. 351–358, 2011.

MONZAVI-KARBASSI, B. et al. Peptide mimotopes as surrogate antigens of carbohydrates in vaccine discovery. v. 20, n. 5, p. 207–214, 2002.

MOORE, K. J.; SHEEDY, F. J.; FISHER, E. A. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 10, p. 709–721, out. 2013.

MORO, E. et al. Electronegative low density lipoprotein subform (LDL-) is increased in type 2 (non-insulin-dependent) microalbuminuric diabetic patients and is closely associated with LDL susceptibility to oxidation. **Acta Diabetologica**, v. 35, n. 3, p. 161–164, 1998.

MOULTON, K. S. Angiogenesis in atherosclerosis: gathering evidence beyond speculation. **Current opinion in lipidology**, v. 17, n. 5, p. 548–55, 2006.

MULDER, W. J. M. et al. Nanoparticulate assemblies of amphiphiles and diagnostically active materials for multimodality imaging. **Accounts of chemical research**, v. 42, n. 7, p. 904–914, 2009.

NAHRENDORF, M. et al. ^{18}F -4V for PET-CT Imaging of VCAM-1 Expression in Atherosclerosis. **JACC: Cardiovascular Imaging**, v. 2, n. 10, p. 1213–1222, 2009.

NICCOLI, G. et al. Impact of electronegative low-density lipoprotein on angiographic coronary atherosclerotic burden. **Atherosclerosis**, v. 223, n. 1, p. 166–170, 2012.

NIE, X. et al. Imaging of hypoxia in mouse atherosclerotic plaques with ^{64}Cu -ATSM. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 43, n. 9, p. 534–542, 21 jan. 2016.

NILSSON, J.; HANSSON, G. K. **Autoimmunity in atherosclerosis: A protective**

response losing control? *Journal of Internal Medicine*. **Anais...**2008

NOLTING, D. D. et al. Molecular imaging probe development: a chemistry perspective. **American journal of nuclear medicine and molecular imaging**, v. 2, n. 3, p. 273–306, 2012.

OGAWA, M. et al. ¹⁸F-FDG accumulation in atherosclerotic plaques: immunohistochemical and PET imaging study. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 45, n. 7, p. 1245–1250, 2004.

OKARVI, S. M. **Peptide-Based Radiopharmaceuticals: Future Tools for Diagnostic Imaging of Cancers and Other Diseases** *Medicinal Research Reviews*, 2004.

OLIVEIRA, J. A. et al. Minimally modified electronegative LDL and its autoantibodies in acute and chronic coronary syndromes. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 7, p. 708–714, 2006.

PACKARD, R. R. S.; LICHTMAN, A. H.; LIBBY, P. **Innate and adaptive immunity in atherosclerosis** *Seminars in Immunopathology*, 2009.

PARASASSI, T. et al. Loss of apoB-100 secondary structure and conformation in hydroperoxide rich, electronegative LDL-. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 1, p. 82–89, 2001.

PEDROSA, A. M. C. et al. Electronegative LDL induction of apoptosis in macrophages: Involvement of Nrf2. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1801, n. 4, p. 430–437, 2010.

PLUMP, A. S. et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, n. 2, p. 343–353, 1992.

PUJATTI, P. B. **Marcadores moleculares derivados da Bombesina para diagnóstico de tumores por SPECT e PET**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

RINNE, P. et al. Comparison of Somatostatin Receptor 2-Targeting PET Tracers in the Detection of Mouse Atherosclerotic Plaques. **Molecular Imaging and Biology**, v. 18, n. 1, p. 99–108, fev. 2016.

ROBBINS, C. S. et al. Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. **Nature medicine**, v. 19, n. 9, p. 1166–72, 2013.

ROHREN, E. M.; TURKINGTON, T. G.; COLEMAN, R. E. Clinical Applications of PET in Oncology. **Radiology**, v. 231, n. 2, p. 305–332, 1 maio 2004.

ROMINGER, A. et al. In vivo imaging of macrophage activity in the coronary arteries using ⁶⁸Ga-DOTATATE PET/CT: correlation with coronary calcium burden and risk factors. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 51, n. 2, p. 193–197, 2010.

ROSS, R. Cell biology of atherosclerosis. **Annual review of physiology**, v. 57, p. 791–804, 1995.

ROSS, R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. **New England journal of medicine**,

v. 340, n. 2, p. 115–126, 1999.

RUDD, J. H. F. et al. Imaging atherosclerotic plaque inflammation with [18F]-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. **Circulation**, v. 105, n. 23, p. 2708–2711, 2002.

RUDD, J. H. F.; FAYAD, Z. A. Imaging atherosclerotic plaque inflammation. **Nature clinical practice Cardiovascular medicine**, v. 5, p. S11–S17, 2008.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Effect of simvastatin treatment on the electronegative low-density lipoprotein present in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. **American Journal of Cardiology**, v. 84, n. 6, p. 655–659, 17 jan. 1999.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Density distribution of electronegative LDL in normolipemic and hyperlipemic subjects. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 5, p. 699–705, 1 maio 2002.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L. et al. Electronegative LDL of FH subjects: chemical characterization and induction of chemokine release from human endothelial cells. **Atherosclerosis**, v. 166, n. 2, p. 261–270, 2003.

SÁNCHEZ-QUESADA, J. L.; VILLEGAS, S.; ORDÓÑEZ-LLANOS, J. Electronegative low-density lipoprotein. A link between apolipoprotein B misfolding, lipoprotein aggregation and proteoglycan binding. **Current opinion in lipidology**, v. 23, n. 5, p. 479–86, 2012.

SANTO FAULIN, T. D. E. et al. Validation of a novel ELISA for measurement of electronegative low-density lipoprotein. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 12, p. 1769–1775, 2008a.

SANTO FAULIN, T. D. E. et al. Validation of a novel ELISA for measurement of electronegative low-density lipoprotein. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 46, n. 12, p. 1769–1775, 1 jan. 2008b.

SANZ, J.; FAYAD, Z. A. Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 953–957, 21 fev. 2008.

SCHOENHAGEN, P.; TUZCU, E. M. Métodos por imagem da aterosclerose em estudos de progressão/regressão: marcador substituto ou janela direta para o processo patológico da aterosclerose? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 91, n. 6, p. 418–431, dez. 2008.

SCHULTE, S.; SUKHOVA, G. K.; LIBBY, P. Genetically programmed biases in Th1 and Th2 immune responses modulate atherogenesis. **The American journal of pathology**, v. 172, n. 6, p. 1500–8, 2008.

SENSOR, G. A. **Fluorophores.org**. Disponível em: <<http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/252>>.

SHETTY, D. et al. Stable aluminium fluoride chelates with triazacyclononane derivatives proved by X-ray crystallography and (18)F-labeling study. **Chemical communications (Cambridge, England)**, v. 47, n. 34, p. 9732–9734, 2011.

SLUIMER, J. C. et al. Hypoxia, Hypoxia-Inducible Transcription Factor, and Macrophages in Human Atherosclerotic Plaques Are Correlated With Intraplaque Angiogenesis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 51, n. 13, p. 1258–1265, 2008.

SÖRENSEN, J. **How does the patient benefit from clinical PET?Theranostics**, 2012.

SOSABOWSKI, J. K.; MATHER, S. J. Conjugation of DOTA-like chelating agents to peptides and radiolabeling with trivalent metallic isotopes. **Nat. Protocols**, v. 1, n. 2, p. 972–976, ago. 2006.

STARY, H. C. et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. **Circulation**, v. 89, n. 5, p. 2462 LP-2478, 1 maio 1994.

STARY, H. C. et al. **A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association.****Circulation**, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7648691>>

STEMME, S. et al. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 9, p. 3893–7, 1995.

SU, H. et al. Atherosclerotic plaque uptake of a novel integrin tracer 18 F-Flotegatide in a mouse model of atherosclerosis. 2014.

SUN YOO, J. et al. SPECT/CT Imaging of High-Risk Atherosclerotic Plaques using Integrin-Binding RGD Dimer Peptides. **Scientific Reports**, v. 5, p. 11752, 30 jun. 2015.

TABAS, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 1, p. 36–46, 2010.

TABAS, I.; GARCÍA-CARDEÑA, G.; OWENS, G. K. **Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis****Journal of Cell Biology**, 2015.

TABAS, I.; WILLIAMS, K. J.; BORÉN, J. Subendothelial Lipoprotein Retention as the Initiating Process in Atherosclerosis. **Circulation**, v. 116, n. 16, p. 1832 LP-1844, 15 out. 2007.

TARKIN, J. M. et al. PET imaging of atherosclerosis. **Future cardiology**, v. 11, n. 1, p. 115–131, 2015.

TEIXEIRA DAMASCENO, N. R. et al. Soy isoflavones reduce electronegative low-density lipoprotein (LDL⁻) and anti-LDL⁻ autoantibodies in experimental atherosclerosis. **European Journal of Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 125–132, 2007.

THAKOR, A. S. et al. Gold nanoparticles: A revival in precious metal administration to patients. **Nano Letters**, v. 11, n. 10, p. 4029–4036, 2011.

THIE, J. A. Understanding the standardized uptake value, its methods, and implications for usage. **Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine**, v. 45, n. 9, p. 1431–1434, 2004.

TOWNSEND, D. W. Positron Emission Tomography/Computed Tomography. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 38, n. 3, p. 152–166, maio 2008.

URSINI, F. et al. Atherosclerosis: Another protein misfolding disease? **Trends in Molecular Medicine**, v. 8, n. 8, p. 370–374, 17 jan. 2002.

VAN REE, J. H. et al. Diet-induced hypercholesterolemia and atherosclerosis in heterozygous apolipoprotein E-deficient mice. **Atherosclerosis**, v. 111, n. 1, p. 25–37, 5 jan. 1994.

VELIKYAN, I.; MAECKE, H.; LANGSTROM, B. Convenient preparation of ⁶⁸Ga-based PET-radiopharmaceuticals at room temperature. **Bioconjugate chemistry**, v. 19, n. 2, p. 569–573, 2008.

VIRELLA, G.; LOPES-VIRELLA, M. F. The pathogenic role of the adaptive immune response to modified LDL in diabetes. 2012.

WANG, Y. **Innate Immune Modulation In Atherosclerosis - With Focus on ApoB100 Derived Danger Associated Signal 1 (APOBDS-1)**. [s.l.] Karolinska Institutet, 2014.

WEISGRABER, K. H.; RALL, S. C. Human apolipoprotein B-100 heparin-binding sites. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 23, p. 11097–11103, 1987.

WICK, G.; KNOFLACH, M.; XU, Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. **Annual review of immunology**, v. 22, p. 361–403, 2004.

WITZTUM, J. L.; STEINBERG, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. **The Journal of clinical investigation**, v. 88, n. 6, p. 1785–1792, 1991.

XIONG, C. et al. In vivo small-animal PET/CT of EphB4 receptors using ⁶⁴Cu-labeled peptide. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 52, n. 2, p. 241–248, 2011.

YAN, Z. Q.; HANSSON, G. K. **Innate immunity, macrophage activation, and atherosclerosis** *Immunological Reviews*, 2007.

YLÄ-HERTTUALA, S. et al. Rabbit and human atherosclerotic lesions contain IgG that recognizes epitopes of oxidized LDL. **Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology / American Heart Association**, v. 14, n. 1, p. 32–40, 1994.

ZHAO, Y. et al. Copper-64-alloyed gold nanoparticles for cancer imaging: Improved radiolabel stability and diagnostic accuracy. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 53, n. 1, p. 156–159, 2014a.

ZHAO, Y. et al. Facile synthesis, pharmacokinetic and systemic clearance evaluation, and positron emission tomography cancer imaging of ⁶⁴Cu–Au alloy nanoclusters. **Nanoscale**, v. 6, n. 22, p. 13501–13509, nov. 2014b.

ZIOUZENKOVA, O. et al. Oxidative Cross-linking of ApoB100 and Hemoglobin Results in Low Density Lipoprotein Modification in Blood: Relevance to Atherogenesis caused by Hemodialysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 27, p. 18916–18924, 2 jul. 1999.

ZIOUZENKOVA, O.; SEVANIAN, A. Oxidative modification of low-density lipoprotein

(LDL) in HD patients: role in electronegative LDL formation. **Blood Purification**, v. 18, n. 3, p. 169–176, 2000.

ANEXO A

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Pharmaceutical Design, 2015, 21, 5267-5276

5267

Recent Advances of Radionuclide-Based Molecular Imaging of Atherosclerosis

Soraya M. Kazuma^{1,2}, Deborah Sultan¹, Yongfeng Zhao¹, Lisa Detering¹, Meng You¹, Hannah P. Luehmann¹, Dulcinea S.P. Abdalla² and Yongjian Liu^{1*}

¹Mallinckrodt Institute of Radiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, 63110, United States; ²Department of Clinical Analysis, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

Abstract: Atherosclerosis is a systemic disease characterized by the development of multifocal plaque lesions within vessel walls and extending into the vascular lumen. The disease takes decades to develop symptomatic lesions, affording opportunities for accurate detection of plaque progression, analysis of risk factors responsible for clinical events, and planning personalized treatment. Of the available molecular imaging modalities, radionuclide-based imaging strategies have been favored due to their sensitivity, quantitative detection and pathways for translational research. This review summarizes recent advances of radiolabeled small molecules, peptides, antibodies and nanoparticles for atherosclerotic plaque imaging during disease progression.



Soraya M. Kazuma

Keywords: Atherosclerosis, molecular imaging, PET, SPECT, nanoparticle, peptide, radionuclide.

INTRODUCTION

Biology of Atherosclerosis

Atherosclerosis, the leading cause of morbidity and mortality in Westernized societies, is a progressive disease characterized by the development of lipid-rich plaque lesions within vessel walls and extending into the vascular lumen. It is the underlying basis of cardiovascular diseases including myocardial infarction, stroke, and peripheral arterial disease [1]. Several factors, including hypertension, lifestyle choices (smoking, diet, sedentary habits), and genetic predisposition increase the risk of developing atherosclerosis. The disease begins with the accumulation of low-density lipoproteins (LDL) on the arterial wall which triggers an inflammatory process through modifications including oxidation, glycation, acetylation and carbamylation [2]. Tissue undergoing the initiation of atheroma becomes more permeable to leukocytes which are recruited by molecules in the vascular endothelium. Adhesion molecules, containing vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and intercellular adhesion molecule (ICAM-1), and selectins, containing P-selectin and E-selectin, are overexpressed by endothelial cells [3]. The activated endothelium produces monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), a chemokine for leukocyte recruitment, in addition to growth factors such as macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) [4]. Reactive oxygen species (ROS), which are produced by activated macrophages, endothelial cells and smooth muscle cells (SMCs), generate the most important modification in LDL – oxidation [5]. Cells of the innate immune system express pattern-recognition receptors (PRRs) such as scavenger receptors, especially CD36 and SRA (scavenger receptor A, CD204) [6]. These are known as endocytic type receptors for recognizing and capturing oxidized LDL (oxLDL), the main process responsible for the formation of foam cells. Signaling receptors are also PRRs playing key roles in the activation of proinflammatory factors [7].

In early atherosclerotic lesions, foam cells containing large amounts of LDL undergo apoptosis and are removed from the lesion. With the progression of the plaque the apoptotic process slows down. Accumulating foam cell deposits in the lesion lead to

the formation of a necrotic core [8]. Moreover, neoangiogenic processes in the plaque provide supplemental oxygen while facilitating the mobilization of leukocytes for plaque development. In advanced plaque, these fragile microvessels are prone to break, resulting in thrombus formation which can collaborate with the inflammatory process and inhibit macrophage migration. Interestingly, with the formation of necrotic core and plaque progression, the plaque tends to be hypoxic which correlates with inflammation, angiogenesis and apoptosis [9], and has been demonstrated in a recent study showing that the reversal of hypoxia could decrease necrotic core formation and prevent apoptotic cell accumulation in atherosclerotic plaques in LDLR^{-/-} mice [10].

Adaptive immune response participates in the progression of atherosclerosis through interactions between antigen-presenting cells and T-cells. CD4⁺ T-cell is a subtype found in the atherosclerotic lesion that presents epitopes bound to the major histocompatibility complex class II (MHC II) [11]. These T-cells can also differentiate into proinflammatory T-helper 1 (Th-1) cells which secretes interferon gamma (IFN- γ) to decrease collagen synthesis, narrow the thickness of fibrotic cap, and perpetuate the Th-1 inflammatory response [12]. The antigens exposed by antigen-presenting cells are presented to adaptive immunity cells, activating T-cells and inducing antibody production by B-cells. The association between autoantigens produced during atherogenesis and their respective autoantibodies has been studied as a target for atherosclerosis imaging [13-15].

The stability of atherosclerotic lesions depends on the balance between inflammatory response and those mechanisms that stimulate extracellular matrix synthesis. When the fibrotic cap thins and tensile strength decreases the chance of rupture increases. The mechanism that elicits this clinical consequence involves the process of thrombosis resulting from the extravasation of the necrotic lipid core and subsequent contact with proteins of the coagulation cascade [16]. Important clinical outcomes of thrombosis and disruptions of the plaque include acute myocardial infarction and unstable angina.

Challenges in Clinical Diagnosis

Clinical challenges in CVD include predicting when a plaque may rupture and managing treatment to avoid associated fatal consequences. The need for early diagnosis is critical since atherosclerosis is a silent disease that progresses slowly over years. Factors

*Address correspondence to this author at the Mallinckrodt Institute of Radiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, Missouri, 63110, United States; Tel: (314) 362-8431; E-mail: liuyo@mir.wustl.edu

ANEXO B



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 562013

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) CERTIFICA que o Projeto de Pesquisa "**Estudos de aterosclerose experimental utilizando tomografia por emissão de pósitrons (PET-SCAN)**" (Protocolo CEUA/FCF/417), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Soraya Megumi Kazuma**, sob orientação/supervisão do(a) **Profa. Dra. Dulcineia Saes Parra Abdalla**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 13 de maio de 2013.

São Paulo, 11 de junho de 2013.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

ANEXO C



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comitê de Ética em Pesquisa

Ofício CEP/FCF/15/2011

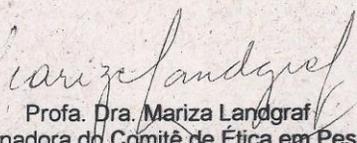
São Paulo, 01 de março de 2011.

Ilmo(a). Sr(a).
Profa. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
FBC

Senhora Professora,

Vimos informar que de acordo com o ofício nº 251/2011/CONEP/CNS/MS, referente ao projeto intitulado "Efeito da imunização passiva com fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa na aterosclerose experimental" (Protocolo CEP nº 557), a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP delegou a esta Faculdade, a aprovação ética do projeto em questão. Portanto, deve-se considerar, apenas, o parecer de aprovação do CEP/FCF emitido em 27/09/2010.

Atenciosamente,


Prof. Dra. Mariza Landgraf
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FCF/USP

ANEXO D



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança



Of.CIBio/0042013/FCF

5ão Paulo, 27 de março de 2013

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que em reunião da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas realizada no dia 26 de março p.p., o Projeto **Estudos de aterosclerose experimental utilizando tomografia por emissão de pósitrons (PET-SCAN)**, foi aprovado.

Lembramos que, quando da elaboração do Relatório Anual a ser encaminhado à Comissão Interna de Biossegurança esta Comissão solicitará a V.Sa. comprovante de participação em treinamentos de Biossegurança de sua equipe para manutenção do credenciamento.

Atenciosamente,

Prof. Dr. MARIO HIROYUKI HIRATA
Presidente da CIBio

Ilma. Sra.

Profa. Dra. DULCINÉIA SAES PARRA ABDALLA

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP

NESTA

ANEXO E

about:blank

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9142 - 6343021/1 - Soraya Megumi Kazuma

Email: soraya.kazuma@usp.br
Data de Nascimento: 17/03/1984
Cédula de Identidade: RG - 8.498.965 7 - PR
Local de Nascimento: Estado do Paraná
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Biologia - Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Paraná - Brasil - 2007
Mestrado: Mestre em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2010

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 01/02/2013
Início da Contagem de Prazo: 01/02/2013
Data Limite para o Depósito: 01/02/2017
Orientador: Prof(a). Dr(a). Dulcineia Saes Parra Abdalla - 10/08/2016 até o presente.
Email: dspa@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 01/02/2013
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 15/08/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 01/02/2013

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2016

Impresso em: 24/01/2017 16:28:42



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 6343021/1 - Soraya Megumi Kazuma

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMA5887-2/3	Princípios de Tomografia Computadorizada e Ressonância Magnética Aplicados à Anatomia (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	19/03/2013	27/05/2013	30	2	90	A	N	Concluída
FBC5780-2/1	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	20/05/2013	30/06/2013	90	6	90	B	N	Concluída
MCP5840-2/4	Informática Aplicada a Imagens Médicas (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	07/08/2013	10/09/2013	45	3	100	A	N	Concluída
BMF5869-2/1	Processo Inflamatório em Doenças Cardiovasculares e Metabólicas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	04/09/2013	05/11/2013	90	6	100	A	N	Concluída
MCP5853-1/4	Métodos para Pesquisa em Dislipidemia e Prevenção da Aterosclerose (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	07/10/2013	27/10/2013	45	3	89	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	20
Estágios:			
Total:	0	20	20

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2016

Impresso em: 24/01/2017 16:28:42

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 6343021/1 - Soraya Megumi Kazuma

Comissão julgadora da tese de doutorado:			
NUSP	Nome	Vínculo	Função
2083139	Dulcineia Saes Parra Abdalla	FCF - USP	Presidente

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 13/07/2016

Impresso em: 24/01/2017 16:28:42

ANEXO F



English

0mg
0,01

Dados gerais Formação Atuação Produção Educação e Popularização de C.B.T. Eventos +



Soraya Megumi Kazuma

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/526792804620542>

Última atualização do currículo em 24/01/2017

Graduada em Bacharelado em Biologia pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná (2007) e Mestre em Farmácia (Análises Clínicas) pela Universidade de São Paulo (2010). Tem experiência na área de Biologia Geral, com ênfase em Biologia Molecular, Bioquímica e Imunologia. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome

Soraya Megumi Kazuma

Nome em citações bibliográficas

KAZUMA, S. M.; KAZUMA, SORAYA M.; KAZUMA, SORAYA; KAZUMA, SORAYA NEGLINE

Endereço

Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacéuticas,
Avenida Professor Lineu Prestes, 580
Butantã
05508-000 - São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 30913637

Formação acadêmica/titulação

2013

Doutorado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Concurso CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Estudos de ateroesclerose experimental utilizando tomografia por emissão de pósitrons (PET-SCAN).
Orientador: Dulcineia Saes Parra Abdalla.
Palavras-chave: ateroesclerose; LDL eletronegativa; tomografia por emissão de pósitrons; peptídeos mimotópicos; radiofármacos.
Grande Área: Ciências da Saúde
Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico.

2008 - 2010

Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Concurso CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Expressão de fragmentos variáveis de cadeia simples anti-LDL eletronegativa (sdFv) em Placa Pastoris e seu efeito sobre a formação de células espumosas. Ano de Obtenção: 2010.
Orientador: Dulcineia Saes Parra Abdalla.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
Grande Área: Ciências Biológicas
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Farmácia / Subárea: Análises Clínicas.
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.

2003 - 2007

Graduação em Bacharelado em Biologia.
Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC/PR, Brasil.
Título: Avaliação de duas metodologias de Indução de lesão para estudos de atividade cicatrizante: cortes circulares e cortes em linha reta.
Orientador: Patrícia Maria Stuelo Campelo.

Formação Complementar

2009 - 2009

Novas tecnologias em vacinas recombinantes. (Carga horária: 30h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

2009 - 2009

Aplicações da PCR real time.
Life Technologies, LIFE TEC, Brasil.

2007 - 2007

Programa de Atualização. (Carga horária: 400h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Atuação Profissional

Centro de Genomas, CATG, Brasil.

Vínculo institucional

2010 - 2012

Vínculo: Celetista, Enquadramento Funcional: Analista de laboratório Pfen, Carga horária: 44

Outras informações

Realização dos exames do setor de doenças genéticas e infecciosas, desde a etapa de separação de amostras, extração de DNA e RNA, preparação de reações e análise nos equipamentos até a liberação de resultados.

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Vínculo institucional

2008 - 2010

Vínculo: Livre, Enquadramento Funcional: Mestranda, Regime: Dedicção exclusiva.

Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUC/ PR, Brasil.

Vínculo institucional

2006 - 2007

Vínculo: livre, Enquadramento Funcional: estagiária, Carga horária: 20

Outras informações

Projeto de pesquisa realizado na Instituição: Avaliação cicatrizante do tratamento tópico com extratos de Nasturtium officinale em lesões circulares.

Áreas de atuação

1.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral.

2.

Grande área: Ciências Biológicas / Área: Bioquímica.

Idiomas

Inglês

Compreende Bem, Fala Pouco, Lê Bem, Escreve Pouco.

Prêmios e títulos

2007

Prêmio Marcelino Champagnat, Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Produções

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

Ordenar por

Ordem Cronológica

1.

CAVALCANTE, MARCELA FROTA ; **KAZUMA, SORAYA MEGUMI** ; BENDER, EDUARDO ANDRÉ ; ADORNE, MÁRCIA DUARTE ; ULLIAN, MAYARA ; VERAS, MARIANA MATERA ; SALDIVA, PAULO HILÁRIO NASCIMENTO ; MARANHÃO, ANDREA QUEIROZ ; GUTERRES, SILVIA STANISCUASKI ; POHLMANN, ADRIANA RAFFIN ; ABDALLA, DULCINEIA SAES PARRA . A nanoformulation containing a scFv reactive to electronegative LDL inhibits atherosclerosis in LDL receptor knockout mice. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **JCR**, v. 107, p. 120-129, 2016.

2.

KAZUMA, SORAYA; SULTAN, DEBORAH ; ZHAO, YONGFENG ; DETERING, LISA ; YOU, MENG ; LUEHMANN, HANNAH ; ABDALLA, DULCINEIA ; LIU, YONGJIAN . Recent Advances of Radionuclide-Based Molecular Imaging of Atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design (Print)* **JCR**, v. 21, p. 5267-5276, 2015.

3.

★ **KAZUMA, SORAYA M**; CAVALCANTE, MARCELA F ; TELLES, ANDRÉIA ER ; MARANHÃO, ANDREA QUEIROZ ; ABDALLA, DULCINEIA SP . Cloning and expression of an anti-LDL(-) single-chain variable fragment, and its inhibitory effect on experimental atherosclerosis. *MABS-AUSTIN* **JCR**, v. 5, p. 763-775, 2013.

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1.

★ **KAZUMA, S. M.**; FAULIN, T. E. S. ; GARCIA, M. C. C. ; **MARANHAO, A.** ; **ABDALLA, D. S. P.** . Production of single chain fragment variable (scFv) with functional activity against electronegative low-density lipoprotein. In: XXXIV Congress of Brazilian Society for Immunology and X International Symposium on Allergy and Clinical Immunology, 2009, Salvador. Livro de Resumos da Sociedade Brasileira de Imunologia, 2009.

Resumos publicados em anais de congressos

1.

KAZUMA, S. M.; CAVALCANTE, M. F. ; TURATO, W. M. ; DIAS, L. A. P. ; **ABDALLA, D. S. P.** . Biodistribution of 68Ga-LDL(-)-derived peptide in atherosclerotic and non-atherosclerotic mice. In: XXX Congresso Brasileiro de Medicina Nuclear, 2016, São Paulo. XXX Congresso Brasileiro de Medicina Nuclear, 2016.

2.

KAZUMA, S. M.; CAVALCANTE, M. F. ; **ABDALLA, D. S. P.** ; LIU, Y. . Development of electronegative LDL mimotope peptide based tracers for atherosclerosis PET imaging. In: 21st International Symposium on Radiopharmaceutical Sciences, 2015, Columbia. J Label Compd Radiopharm. Columbia, 2015. v. 58. p. 575-5411.

3.

KAZUMA, S. M.; FAULIN, T. E. S. ; CAVALCANTE, M. F. ; **MARANHAO, A.** ; **ABDALLA, D. S. P.** . ScFv with functional activity against electronegative low-density lipoprotein. In: Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2011, Keystone. Antibody as Drugs, 2011.

4.

★ FAULIN, T. E. S. ; HERING, V. R. ; **KAZUMA, S. M.** ; GARCIA, M. C. C. ; POLITI, M. J. ; **ABDALLA, D. S. P.** . Recombinant GFP-scFv Anti-LDL(-): A Useful Tool to Investigate Cardiovascular Risk. In: 2nd Annual International Congress of Antibodies, 2010, Beijing. BIT Life Sciences/2nd Annual International Congress of Antibodies, 2010. v. 1. p. 490-490.

5.

HERING, V. R. ; FAULIN, T. E. S. ; **KAZUMA, S. M.** ; GARCIA, M. C. C. ; **ABDALLA, D. S. P.** ; POLITI, M. J. . Anti-LDL(-) fluobody to investigate cardiovascular risk. In: Biosensors, 2010, Glasgow. Biosensors, 2010.

6.

KAZUMA, S. M.; CAVALCANTE, M. F. ; DIAZ, C.A. ; MARQUES, D.V. ; CASTRO, F.G.S. ; RUDNICK, M. ; FAULIN, T. E. S. ; CESAR, F. A. ; PESSOA JUNIOR, A. ; **ABDALLA, D. S. P.** . Inhibitory activity of single chain variable fragment anti-LDL(-) on the formation of foam cells. In: XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010, São Paulo. XV Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology, 2010.

7.

★ FAULIN, T. E. S. ; HERING, V. R. ; GARCIA, M. C. C. ; **KAZUMA, S. M.** ; POLITI, M. J. ; **ABDALLA, D. S. P.** . Cloning and expression of fluorescent anti-LDL(-) single chain fragment variable. In: XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. v. 45. p. 3-3.

8.

★ **KAZUMA, S. M.**; FAULIN, T. E. S. ; GARCIA, M. C. C. ; **MARANHAO, A.** ; **ABDALLA, D. S. P.** . Production of single chain fragment variable (scFv) with functional activity against electronegative low-density lipoprotein. In: XIV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2009, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009. v. 45. p. 3-3.

Apresentações de Trabalho

1.

KAZUMA, S. M.; CAVALCANTE, M. F. ; **ABDALLA, D. S. P.** ; LIU, Y. . Development of electronegative LDL mimotope peptide based tracers for atherosclerosis PET imaging. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

2.

KAZUMA, S. M.; FAULIN, T. E. S. ; CAVALCANTE, M. F. ; MICHALOSKI, J. ; GIORDANO, R. J. . 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras