



**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**Agentes Fitoquímicos como Radio-sensibilizadores na Terapêutica em  
Medicina Nuclear**

Nuno Duarte Rebelo de Andrade e Lemos

Pr.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> António Paulo, Investigador Principal da Unidade de Ciências  
Químicas e Radiofarmacêuticas do IST/ITN

Mestrado em Medicina Nuclear  
Área de Especialização em Radiofarmácia

Lisboa, 2013

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**  
**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**Agentes Fitoquímicos como Radio-sensibilizadores na Terapêutica em  
Medicina Nuclear**

Nuno Duarte Rebelo de Andrade e Lemos

Pr.<sup>o</sup> Dr.<sup>o</sup> António Paulo, Investigador Principal da Unidade de Ciências  
Químicas e Radiofarmacêuticas do IST/ITN

Pr.<sup>a</sup> Filipa Lucena

Pr.<sup>a</sup> Fernanda Marques

Pr.<sup>a</sup> Lina Vieira

Mestrado em Medicina Nuclear  
Área de Especialização em Radiofarmácia

Lisboa, 2013

Este projeto de mestrado foi realizado no âmbito do Mestrado de Medicina Nuclear com especialização na área de Radiofarmácia, organizado pela Escola Superior de Tecnologia e Saúde de Lisboa.

Este projeto não foi financiado por nenhum organismo, sem recebeu apoio de bolsas de investigação.

Cedo os direitos de publicação, arquivamento, divulgação ou reprodução deste projeto à Escola Superior de Tecnologia e Saúde de Lisboa, desde que seja mantido o crédito do autor e que seja usado com fins não comerciais e puramente educativos.



## **Dedicatória e Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao Professor António Paulo pela orientação fornecida e pela paciência que demonstrou comigo ao longo de todo este processo, Em segundo lugar desejava agradecer à professora Lina Vieira por todo o apoio oferecido ao longo do mestrado e os incentivos dados para seguir investigação nesta área.

Finalmente, mas mais importante, gostaria de agradecer à minha família que sempre me apoiaram em tudo o que precisei. Em particular gostaria de agradecer e dedicar este trabalho à minha mãe sem a qual nunca teria chegado onde cheguei.



## Resumo

$^{90}\text{Y}$ -Zevalin e  $^{131}\text{I}$ -Bexxar são os dois radiofármacos de eleição no tratamento de Linfoma Não-Hodgkin. Porém o tratamento com estes radiofármacos não é isento de efeitos secundários.

Uma das formas de se tentar diminuir esses efeitos é através da diminuição da dose administrada ao paciente. No entanto diminuir a dose administrada traz consigo uma redução da sua eficácia terapêutica. Manter ou aumentar os benefícios clínicos da radioimunoterapia e diminuir as doses de radiação só é possível caso a célula se encontre mais vulnerável aos efeitos radiotóxicos dos radiofármacos.

Agentes radiosensibilizadores começam a ser estudados tendo as farmacopeias tradicionais como ponto de partida. Os fitoquímicos tem-se mostrado promissores como radioprotetores, radiorecuperadores e/ou radiosensibilizadores. A curcumina é um fitoquímico presente no caril, com fortes efeitos radiosensibilizadores e atividade anti-tumorigénica comprovada.

No entanto possui uma fraca biobisponibilidade pelo que é necessário pensar em estratégias diferentes de garantir uma máxima ação radiosensibilizadora. Uma estratégia que começa a ser explorada consiste no encapsulamento da curcumina em nanopartículas.

Este projeto pretende estimular o interesse nessa área da terapêutica em Medicina Nuclear. O projeto consiste na preparação de nanopartículas contendo curcumina e funcionalizadas com anticorpos com afinidade para antígenos presentes nas células do Linfoma Não Hodgkin e na avaliação da influência da curcumina encapsulada nas nanopartículas nos efeitos citotóxicos dos radiofármacos com consequente estudos dos mecanismos celulares associados.



## Abstract

$^{90}\text{Y}$ -Zevalin and  $^{131}\text{I}$ -Bexxar are both radiopharmaceuticals of choice in the treatment of Non-Hodgkin lymphoma. However treatment with these radiopharmaceuticals is not without side effects.

One of the ways to try to reduce these effects is by reducing the dose administered to the patient. However decreasing the dose administered brings a reduction of its therapeutic effectiveness. Maintain or increase the clinical benefits of radioimmunotherapy and lower radiation doses is only possible if the cell finds itself more vulnerable to the effects of radiotoxic radiopharmaceuticals.

Radiosensitizers agents are beginning to be studied using the traditional pharmacopoeias as a starting point. Phytochemicals have proven themselves promising as radioprotective, radiorecovery and/or radiosensitizers agents. Curcumin is a phytochemical present in curries, with strong radiosensitizer effect and proven anti-tumorigenic activity.

However bioavailability has been weak so it's necessary to think of different strategies to ensure maximum radiosensibilization. A strategy that is beginning to be explored is the encapsulation of curcumin into nanoparticles.

This project aims to stimulate interest in this area of therapeutic nuclear medicine. The project consists of preparing nanoparticles containing curcumin and functionalized with antibodies having affinity for antigens present on cells of non-Hodgkin lymphoma and in the evaluation of the influence of curcumin nanoparticles to the cytotoxic effects of radiopharmaceuticals with consequent studies of associated cellular mechanisms.



## **Palavras Chave**

Agentes radiosensibilizadores

Radioimunoterapia

Linfoma Não-Hodgkin

Curcumina

Nanopartículas

## **Keywords**

Radiosensitizer agentes

Radioimmunotherapy

Non-Hdgkin Lymphoma

Curcumin

Nanoparticles



## Índice

1–Identificação do Projeto	1
2 – Instituições Envolvida	2
3 – Componente Científica	3
3.1 – summary/sumário	3
3.2 – Descrição Técnica	6
3.2.1 – Revisão da Literatura	6
3.2.2 – Objetivos	9
3.2.3 – Planos e Métodos	9
3.2.4 – Tarefas	11
3.2.5 – Calendarização e Gestão do Projeto	11
3.2.6 – Cronograma	20
4 – Equipa de Investigação	21
5 – indicadores previstos	22
6 – Orçamento	23
7 – Justificação do Orçamento	24
7.1 – Justificação dos recursos humanos	24
7.2 – Justificação das missões	24
7.3 – Justificação da aquisição de bens e serviços	24
7.4 – Justificação do equipamento	25
7.4.1 – Equipamento já disponível para a execução do projeto	25
7.4.2 – Discriminação do equipamento a adquirir	26
8 – Considerações Finais	27
9 – referências Bibliográficas	28
10 – Figuras	31





# 1. Identificação do projeto

## **Área científica principal**

Radioquímica e radiofarmácia

## **Área científica secundária**

Ciências da saúde – oncologia

## **Título do projeto**

Agentes Fitoquímicos como Radiosensibilizadores na Terapêutica em Medicina Nuclear

## **Financiamento solicitado**

## **Palavra-chave 1**

Agentes radiosensibilizadores

## **Palavra-chave 2**

Linfoma Não-Hodgkin

## **Palavra-chave 3**

Radioimunoterapia

## **Palavra-chave 4**

Curcumina

## **Data de início do projeto**

02.01.2014

## **2. Instituições envolvidas**

### **Instituição proponente**

Instituto Superior Técnico/Instituto Tecnológico e Nuclear

### **Instituição participante**

Escola Superior de Tecnologia e Saúde de Lisboa

## 3. Componente científica

### 3.1. Summary

The proposed theme "Phytochemical agents as radiosensitizers in radionuclide Therapy" is due to the great importance that phytochemicals have been gaining in the investigation of radio-sensitizers due to their pharmacological properties.

The use of phytochemical agents with radio-protective capabilities, or radio-sensitizing properties, has been a subject of much research developed in recent years.

Despite many studies to explore the potential of phytochemicals in radiotherapy through its radio-protective properties, the investigation of phytochemicals agents as radio-sensitizing applied to therapy in nuclear medicine is still in a nascent stage.

However, there are two promising studies that meet the objectives of this project. Yallapu and colleagues used the phytochemical agent curcumin to study his ability to radio-sensitize ovarian cancer cells resistant to radiation and chemotherapy. In this study, the authors developed nanoparticles functionalized with curcumin and a monoclonal antibody to increase the specificity and effectiveness of the effects of curcumin.

Moreover, Reilly et al. published a study where they used methotrexate as a radio-sensitizer to potentiate the radiotoxic action of the auger electrons emitting  $^{111}\text{In}$ .

Therapy in nuclear medicine is a complex and promising field of work wich explores different strategies, including the use of different radionuclides ( $\beta^-$  emitters,  $\alpha$  emitters, electrons of Auger emitters), different labelling strategies or a variety of biological vectors (monoclonal antibodies, peptides).

This project aims to evaluate the effect of the polyphenol curcumin in increasing the radiotoxicity of  $^{90}\text{Y}$ -Zevalin (ibritumomab tiuxetan) and  $^{131}\text{I}$ -Bexxar (tositumomab) radiopharmaceuticals, used to treat non-Hodgkin's lymphoma (NHL). To achieve this goal we will study the cytotoxic action of these radiopharmaceuticals in different human tumor lines in the presence or absence of curcumin.

Zevalin and Bexxar are monoclonal antibodies that recognize the CD20 antigen expressed on NHL cells and also in normal B cells. In this project three cell lines were selected (Hs Sultan, GA-10, ARH-77) that express CD20 and CD19 antigens, in order to compare the effects of curcumin radiosensitizers depending on the antibodies used for selective administration to tumor cells. Thus it is expected to draw conclusions about the potential effect of saturation of cellular antigens in cell toxicity caused by the radiopharmaceuticals.

The use of phytochemicals as radio-sensitizers may become an important strategy to improve therapeutic nuclear medicine having two potential advantages: reduced dose and increase the effectiveness of the treatment.

The general objectives of this study is to outline a research project that aims to demonstrate the relevance and potential advantages of using the phytochemical agent curcumin as a radio-sensitizing in the NHL therapy with radionuclides, exploring nanoparticles for delivery of the radio-sensitizer.

To achieve general goal of the proposed project initially the team will focus on the synthesis and characterization of nanoparticles of poly (lactic-co-glycolide) (PLGA) using polyethylene glycol (PEG) as a stabilizer and containing encapsulated curcumin and the fluorescent probe fluorescein isothiocyanate (FITC). These nanoparticles will be also functionalized with anti-CD20 and anti-CD19 antibodies (Nano-CUR-Ac) to ensure a specific supply of curcumin to tumor cells.

The team will then study the in vitro release of curcumin and cellular internalization of Nano-Cur and Nano-Cur-Ac, using fluorescence techniques and the Hs Sultan, ARH-10 and GA-77 cell lines.

Finally the team will perform cytotoxicity and genotoxicity studies, and study cell death mechanisms, for both radiopharmaceuticals using the cell lines mentioned above. These studies will be performed in the presence and absence of curcumin in order to evaluate its effect on the radiotoxicity enhancement of the radiopharmaceuticals. We will also study the influence of reactive oxygen species (ROS) in the cytotoxic action of the radiopharmaceuticals.

This work will provide scientific knowledge that is expected to allow for the design of innovative, more efficient and selective methodologies of radionuclide therapy.

### **3.1. Sumário**

O tema proposto “Agentes Fitoquímicos como Radio-sensibilizadores na Terapêutica em Medicina Nuclear” deve-se à grande importância que os fitoquímicos têm vindo a ganhar na investigação de radio-sensibilizadores<sup>1</sup> devido às suas propriedades farmacológicas<sup>2</sup>.

O uso de agentes fitoquímicos<sup>3</sup> com capacidades radio-protetoras<sup>4, 5, 6</sup> ou radio-sensibilizadoras<sup>1, 7</sup> tem sido um assunto de investigação muito desenvolvido nos últimos anos.

Apesar de existirem vários estudos a explorar o potencial de fitoquímicos em radioterapia através das suas propriedades radio-protetoras,<sup>4, 8</sup> a investigação de

agentes fitoquímicos como radio-sensibilizadores aplicados à terapêutica em medicina nuclear ainda se encontra numa fase incipiente.<sup>1</sup>

No entanto, existem dois estudos promissores que vão de encontro com os objetivos deste projeto. Yallapu e colegas usaram o agente fitoquímico curcumina (figura 2) para estudar a sua capacidade de radio-sensibilizar as células do cancro do ovário resistente a radiação e quimioterapia. Neste estudo, para aumentar a especificidade e eficácia dos efeitos da curcumina, os autores desenvolveram nanopartículas funcionalizadas com curcumina e com um anticorpo monoclonal.<sup>9</sup>

Por outro lado, Reilly et al. publicaram um trabalho onde usaram o metotrexato como radio-sensibilizador para potenciar a ação radiotóxica do emissor de elétrons Auger  $^{111}\text{In}$ .<sup>10</sup>

A terapêutica em medicina nuclear é um complexo e promissor campo de trabalho. É complexo na medida que explora diferentes estratégias, nomeadamente o uso de diferentes radionuclídeos (emissores  $\beta^-$ , emissores  $\alpha$ , emissores de elétrons de Auger), diferentes estratégias de marcação ou variedade de vetores biológicos (anticorpos monoclonais, péptidos).

Neste projeto pretende avaliar-se o efeito do polifenol curcumina<sup>7</sup> no aumento da eficácia dos radiofármacos  $^{90}\text{Y}$ -Zevalin (ibritumomab tiuxetan) e  $^{131}\text{I}$ -Bexxar (tosiumomab), usados para tratamento do linfoma não-hodgkin (LNH). Para tal estudar-se-á a ação citotóxica destes radiofármacos em diferentes linhas tumorais humanas na presença ou ausência da curcumina (figura 1).

O Zevalin e Bexxar são anticorpos monoclonais que reconhecem os antígenos CD20 expressos nas células do LNH e também nas células B normais. Neste projeto foram selecionadas 3 linhas celulares (Hs-sultan, GA-10, ARH-77), que expressam os antígenos CD20 e os antígenos CD19, de forma a comparar os efeitos radiosensibilizadores da curcumina em função dos anticorpos usados para a sua administração seletiva às células tumorais. Assim espera-se tirar conclusões acerca do potencial efeito da saturação dos antígenos celulares na toxicidade celular provocada pelos radiofármacos.

O uso de fitoquímicos radio-sensibilizadores pode tornar-se uma estratégia importante na potencialização da terapêutica em medicina nuclear apresentando duas potenciais vantagens: diminuição da dose administrada e aumento da eficácia do tratamento.

Apresenta-se como objetivos gerais deste trabalho delinear um projeto de investigação que pretende demonstrar a relevância e possíveis vantagens do uso do agente

fitoquímico curcumina como radio-sensibilizador na terapêutica com radionuclídeos do LNH, explorando nanopartículas para entrega do radio-sensibilizador.

Para atingir este objetivo geral, numa primeira fase a equipa irá focar-se na síntese, caracterização e estudo da estabilidade in vitro de nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA) (figura 3), usando polietileno glicol (PEG) (figura 4) como estabilizador e contendo curcumina e a sonda fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC) (figura 6). Estas nanopartículas (Nano-Cur) poderão ser funcionalizadas com anti-corpos anti-CD20 e anti-CD19 (Nano-CUR-Ac) de modo a assegurar uma entrega específica da curcumina às células tumorais.

De seguida será estudada a libertação in vitro da curcumina e a internalização celular do Nano-Cur e Nano-Cur-Ac, usando técnicas de fluorescência e as linhas celulares Hs-sultan, GA-10 e ARH-77.

Finalmente serão efetuados estudos de citotoxicidade, genotoxicidade e de mecanismos de morte celular para os dois radiofármacos em estudo usando as linhas celulares acima mencionadas. Esses estudos serão efetuados na presença e ausência de curcumina de modo a avaliar o seu efeito potenciador na radiotoxicidade dos radiofármacos. Será ainda estudado a influência de espécies reativas de oxigénio (ROS) na ação citotóxica do radiofármaco (figura 7).

Espera-se com a realização deste trabalho ganhar conhecimento no plano científico que permita contribuir para a conceção de metodologias de terapia com radionuclídeos inovadoras, mais eficientes e seletivas.

.....

## **3.2. Descrição Técnica**

### **3.2.1. Revisão da Literatura**

Os linfomas são cancros do sistema linfático, sendo o linfoma não-hodgkin (LNH) um dos mais comuns. O LNH pode ser classificado como indolente ou agressivo sendo determinado pelo tipo de células anómalas (células B ou T) envolvidas, aparência dos gânglios infetados ou os marcadores expressos à superfície das células anómalas. O LNH pode ocorrer em qualquer idade e manifesta-se em ambos os sexos.<sup>11</sup>

Uma das terapêuticas disponíveis consiste na radioimunoterapia (RIT) que envolve o uso de anticorpos monoclonais aos quais é conjugado um radionuclídeo. Encontram-se aprovados atualmente dois radiofármacos para terapêutica do LNH<sup>12</sup>: <sup>90</sup>Y-zevalin e o <sup>131</sup>I-bexxar.

$^{90}\text{Y}$ -zevalin (ibritumomab tiuxetan) é um anticorpo monoclonal quimérico (IgG1) anti-CD20 marcado com  $^{90}\text{Y}$ . É muito usado na terapêutica do linfoma Não-hodgkin (LNH) refratário e com relapso. Corresponde ao ibritumomab, análogo murino do rituximab, funcionalizado com tiuxetan (MX-DTPA) que funciona como agente quelante bifuncional e se encontra ligado ao anti-corpo através de uma ligação covalente tioureia. Este agente quelante proporciona uma complexação estável do  $^{90}\text{Y}$ . O seu alvo é o antígeno CD20 que é um alvo ideal para imunoterapia de células-B LNH porque é expresso na maioria dos casos de LNH. Apesar de ser expresso nos linfócitos B normais não se encontra expresso em células estaminais, células plasmáticas ou tecidos não hematopoiéticos. Por outro lado o antígeno CD20 não se liberta das células para formar formas livres de antígeno que poderiam competir com o anticorpo em circulação diminuindo a sua captação celular.<sup>11</sup> Produz resposta em aproximadamente 50% dos doentes com LNH refratário, relapsado ou folicular.<sup>13</sup>

O  $^{131}\text{I}$ -Bexxar é composto pelo anticorpo tositumomab de origem murina que é específico para o antígeno CD20 e que é marcado com  $^{131}\text{I}$  apresentando a capacidade de induzir apoptose celular.<sup>11, 13</sup> É composto por duas cadeias pesadas gama 2a de 451 aminoácidos cada e duas cadeias leves lambda de 220 aminoácidos cada.  $^{131}\text{I}$ -Bexxar é um derivado radioiodado do tositumomab.

Os radiofármacos selecionados possuem radionuclídeos diferentes. O  $^{90}\text{Y}$  é um emissor beta puro enquanto o  $^{131}\text{I}$  é um emissor beta e gama podendo ser usado para obter imagens. O  $^{131}\text{I}$  tem uma energia beta máxima mais baixa, ordem dos 600 KeV sendo mais aconselhado no tratamento de micrometástases. O  $^{90}\text{Y}$  por seu lado tem emissão beta mais elevada na ordem dos 2.28 MeV sendo aconselhado no tratamento de tumores com mais de 1 cm. O  $^{90}\text{Y}$  também possui a desvantagem de entregar maiores doses radioativas a órgãos normais o que limita a sua dose.

O uso destes radiofármacos faz-se acompanhar de efeitos secundários indesejáveis como anemia, neutropenia, trombocitopenia, astenia ou febre.<sup>14</sup> Uma forma de melhorar a eficácia clínica destes radiofármacos seria recorrer a um agente radiosensibilizador que permitisse aumentar a radiosensibilidade das células-alvo e consequentemente diminuir as doses radioativas usadas.

Atualmente existe um rico campo de investigação de novos agentes radioprotetores e radiosensibilizadores provenientes de farmacopeias tradicionais<sup>15</sup>. Existe muita investigação relativa ao seu uso como radioprotetores<sup>4</sup> ou radiosensibilizadores<sup>16</sup> em radioterapia externa. Pelo contrário, o estudo de radiosensibilizadores para melhorar a eficácia da terapêutica com radionuclídeos encontra-se menos explorada.<sup>10</sup>

Neste projeto pretende-se avaliar o interesse do uso de radiosensibilizadores na ação terapêutica dos radiofarmácios  $^{90}\text{Y}$ -zevalin e  $^{131}\text{I}$ -bexxar. Para esse fim, utilizar-se-á o polifenol curcumina (figura 2) como radiosensibilizador.<sup>17</sup> Vários estudos têm sido realizados com este polifenol com resultados extremamente interessantes, nomeadamente utilizando nanopartículas (figuras 3, 4, 5) como sistema de entrega de modo a melhorar a sua biodisponibilidade.

Os primeiros indícios do potencial terapêutico da curcumina foram provenientes de dados epidemiológicos que mostraram uma forte relação causal entre o consumo de curcumina e baixas taxas de cancro do cólon.<sup>7</sup>

Estudos pré-clínicos mostraram que a curcumina possui uma atividade antitumorigénica muito elevada nas fases inicial e promocional do crescimento tumoral.<sup>7</sup> São conhecidos diversos mecanismos que estão implicados na atividade anti-tumorigénica da curcumina incluindo combinações de efeitos anti-inflamatórios, anti-oxidantes, imunomodulatórios, pró-apoptóticos e anti-angiogénicos.<sup>17</sup> Outros estudos mostraram que a curcumina apresentava um potencial radiosensibilizante em linhas celulares de cancro da próstata e no carcinoma de células escamosas.

A curcumina também mostrou potencial clínico no tratamento de doenças malignas das células sanguíneas<sup>18</sup> mostrando que as células mielóides eram mais radiosensíveis que as células linfóides.<sup>19</sup> No entanto a curcumina apresenta uma farmacocinética desfavorável e baixa solubilidade em água além de ser rapidamente excretada e metabolizada pelo fígado e intestinos.<sup>9, 18, 20</sup>

As nanopartículas de metais, lípidos ou polímeros são consideradas extremamente promissoras no diagnóstico e terapia de neoplasias. As nanopartículas podem ser usadas como agentes radiosensibilizadores como acontece com nanopartículas de metais capazes de absorver raios X ou radiação gama aumentando os danos locais do DNA<sup>21</sup> ou então como um sistema de transporte para outros agentes radiosensibilizadores.

Uma equipa de investigadores mostrou que era possível encapsular curcumina e o agente quimioterápico doxorubicina em nanopartículas e ultrapassar a resistência multi-drogas.<sup>22</sup> Noutro artigo foram descritos nanodiscos funcionalizados com curcumina que permitiriam melhorar a sua capacidade de provocar apoptose celular em linfomas.<sup>21</sup>

Duas equipas independentes mostraram que a funcionalização de nanopartículas com curcumina aumentava a sua biodisponibilidade. A funcionalização de nanopartículas com curcumina aumentou a capacidade da curcumina inibir a proliferação celular de

células de cancro do ovário. Outro estudo mostrou que a funcionalização de nanopartículas (PLGA-PEG) com curcumina aumentava a sua captação celular, inibia a proliferação celular e induzia apoptose de células tumorais KBM-5, entre outros efeitos.<sup>9, 18</sup>

No âmbito da terapia com radionuclidos utilizando um sistema de entrega do tipo micelas copoliméricas mostrou-se ser possível transportar um agente radiosensibilizador (metotrexato) e um radionuclido emissor de elétrons Auger (<sup>111</sup>In) para o núcleo de células de cancro da mama das linhas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-361 e SK-BR-3. As micelas copoliméricas permitiram conduzir o radiosensibilizador e o emissor Auger ao alvo desejado.<sup>10</sup>

### **3.2.2. Objetivos**

A funcionalização de nanopartículas com agentes radiosensibilizadores e consequente conjugação com anticorpos para potencializar os efeitos da terapia em Medicina Nuclear é uma vertente pouco desenvolvida mas potencialmente promissora (figura 1). O objetivo deste projeto consiste no estudo das vantagens associadas ao uso de nanopartículas funcionalizadas com curcumina como radiosensibilizador para melhorar a eficácia do tratamento do LNH com os radiofármacos <sup>90</sup>Y-zevalin e <sup>131</sup>I-Bexxar.

Dentro deste objetivo mais geral também se pretende comparar o efeito de diferentes doses de Nano-Cur ou Nano-Cur-Ac para estabelecer qual a mais eficaz a potenciar os efeitos citotóxicos dos radiofármacos. Pretende-se ainda estudar a possível influência do tempo de administração da curcumina relativamente ao momento de administração dos radiofármacos.

Outro dos objectivos do projecto é esclarecer se a eventual saturação dos receptores, na sequência da administração do complexo Nano-Cur-Ac, poderá afectar a captação celular e acção citotóxica dos radiofármacos. Para esclarecer este aspeto, o Nano-Cur-Ac será funcionalizado com anticorpos anti-CD20 ou anti-CD19 e usar-se-ão 3 linhas celulares (Hs-sultan, GA-10 e ARH-77) que expressam os 2 antígenos, CD20 e CD19 (figura 7).

Também se pretende analisar o impacto que o uso do agente radio-sensibilizador, curcumina, terá na acção citotóxica dos radiofármacos estudando os mecanismos de morte celular, a genotoxicidade induzida e a influência das espécies reativas de oxigénio.

### **3.2.3. Planos e Métodos**

Um dos principais grupos de linfomas é designado por Linfoma-Não-Hodgkin. Em medicina nuclear são usados, em terapêutica, dois radiofármacos no tratamento destes linfomas. Ambos os radiofármacos,  $^{90}\text{Y}$ -zevalin e  $^{131}\text{I}$ -bexxar, apresentam como alvo o antígeno CD20.<sup>23</sup> Neste projeto pretende-se investigar se a utilização de curcumina, como radiosensibilizador e encapsulado em nanopartículas,<sup>18</sup> permite aumentar a eficácia terapêutica dos tratamentos do LNH com  $^{90}\text{Y}$ -zevalin e  $^{131}\text{I}$ -bexxar, conduzindo a uma diminuição das doses de radiação usadas e dos efeitos secundários.

A curcumina (figura 2) tem sido estudada como radiosensibilizador na radioterapia de diversos tumores, apresentando resultados muito promissores.<sup>24</sup> Devido à fraca biodisponibilidade e rápida eliminação da mesma tem sido encapsulada em nanopartículas de modo a garantir a ação anti-tumorigénica nas células alvo durante um tempo prolongado aumentando assim o seu efeito radiosensibilizador.

Até ao momento presente a maioria da investigação focou-se em tumores sólidos. No entanto existem estudos a mostrar a utilidade das propriedades terapêuticas da curcumina em linfomas.<sup>25</sup>

Este projeto pretende estudar a viabilidade de encapsular curcumina em nanopartículas PLGA-PEG (Nano-CUR) e de proceder à sua posterior conjugação a um anticorpo anti-CD19 (ABIN388314) e anti-CD20 (tositumomab ou ibritumomab-tiuxetan) formando o complexo Nano-Cur-Ac (figura 7). Com a conceção, síntese e utilização destas nanopartículas espera-se obter uma radiosensibilização mais eficiente das células alvo do LNH de modo a melhorar a resposta à ação citotóxica dos radiofármacos  $^{90}\text{Y}$ -zevalin e  $^{131}\text{I}$ -bexxar.

Também se pretende estudar o efeito de diferentes modalidades de administração das nanopartículas às diferentes linhas tumorais nos efeitos radiosensibilizadores da curcumina. Dessa forma a entrega de Nano-Cur-Ac será efetuada através das seguintes modalidades: *i* antes do uso dos radiofármacos; *ii* em simultâneo com os radiofármacos e *iii* através de uma combinação das duas modalidades *i* e *ii*. (figura 7) Por outro lado pretende-se estudar a influência de dois anticorpos diferentes (ABIN388314 para os antígenos CD19 e os anticorpos tositumomab ou ibritumomab para os antígenos CD20) de forma a avaliar a influência da potencial saturação dos antígenos na captação celular dos radiofármacos e no correspondente efeito radiotóxico.

O projeto será desenvolvido por uma equipa multidisciplinar com conhecimentos nas áreas de radiofarmácia, química radiofarmacêutica, nanotecnologia, bioquímica, biologia molecular, física das radiações e oncologia.

A equipa será constituída por 3 membros tendo 2 investigadores e 1 estudante. O estudo abarcará várias áreas pelo que deve envolver uma equipa multidisciplinar com 1 investigador da área da biologia molecular e 1 investigador da área das ciências radiofarmacêuticas que será o responsável pela coordenação do projeto.

O projeto terá uma duração de 2 anos. No primeiro ano será realizada a encapsulação da curcumina nas nanopartículas e a conjugação com os anticorpos, será estudada a captação celular do complexo Nano-Cur-Ac. No segundo ano será estudada a captação celular dos radiofármacos e citotoxicidade dos mesmos na presença e ausência de nanopartículas funcionalizadas com curcumina. Serão efetuados estudos sobre mecanismos de morte celular e genotoxicidade.

É um projeto pré-clínico que terá início com a síntese, caracterização e análise da estabilidade do Nano-CUR com e sem anticorpos conjugados. O encapsulamento da curcumina nas nanopartículas será realizado através da técnica de nanoprecipitação. Será realizada conjugação do anticorpo à Nano-Cur originando Nano-Cur-Ac e serão realizados estudos para verificar se o anticorpo mantém especificidade para o antigénio.

Será estudada a internalização celular do complexo Nano-CUR-Ac, usando técnicas de fluorescência, em 3 linhas celulares de LNH (Hs-sultan, GA-10, ARH-77) que expressam os dois antigénios CD20+ e CD19+. Usando a técnica de diálise também se irá analisar a libertação in vitro da curcumina.

De seguida serão estudados os efeitos citotóxicos e os mecanismos de morte celular provocados pela associação do Nano-Cur-Ac com o uso de radiofármacos, assim como os efeitos das variantes em estudo, nomeadamente a dose de radiofármaco, tempo de entrega do Nano-CUR-Ac e possível saturação dos antigénios CD19 e CD20. Os efeitos citotóxicos serão estudados utilizando o ensaio MTT enquanto a investigação dos mecanismos de morte celular compreenderão o estudo da inibição das proteínas Bcl-2 e da ativação das caspases, bem como da externalização da fosfatidilserina. Será ainda estudado a formação de quebras na cadeia de DNA e o papel das espécies reativas de oxigénio (ROS).

Espera-se através deste projeto conseguir resultados encorajadores acerca do potencial radiosensibilizador da curcumina na ação citotóxica dos radiofármacos em

células do LNH, assim como identificar os principais mecanismos envolvidos nesse efeito radiosensibilizador.

### 3.2.4. Tarefas

#### Tarefa 1: Síntese, caracterização e estabilidade *in vitro* do complexo Nano-CUR (com e sem conjugação de anticorpo anti-CD19 ou anti-CD20)

##### Descrição

Será usada a técnica de nanoprecipitação<sup>26</sup> para preparar nanopartículas de ácido poli(láctico-co-glicólido) (PLGA) contendo curcumina,<sup>27</sup> usando polietileno glicol (PEG) como estabilizador. A utilização destas nanopartículas deverá potenciar o efeito terapêutico da curcumina (figura 2), uma vez que esta apresenta baixa solubilidade em água e uma farmacocinética desfavorável.<sup>9, 18</sup>

O PLGA é um polímero biocompatível e biodegradável composto por ácido láctico e ácido glicólico (figura 3). Este polímero apresenta boa solubilidade em solventes orgânicos e tem uma degradação que pode ser facilmente controlada. O estabilizador PEG terá como função aumentar o tempo de circulação da nanopartícula e diminuir a resposta inflamatória do organismo.<sup>28</sup>

Serão preparadas nanopartículas contendo curcumina de acordo com os métodos descritos na literatura<sup>18</sup>. Utilizando a mesma metodologia estudar-se-á a possibilidade de preparar nanopartículas (PLGA-PEG) contendo simultaneamente curcumina e a sonda fluorescente isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para esse efeito o PLGA-PEG será misturado com curcumina ou curcumina e FITC em acetonitrilo. A mistura resultante será adicionada, gota a gota, a uma solução aquosa contendo um agente surfactante (*Pluronic F-68*). A dispersão de nanopartículas será evaporada sob vácuo para eliminar o solvente orgânico. As nanopartículas resultantes serão centrifugadas, lavadas com água destilada e liofilizadas utilizando sucrose como crioprotetor.

A determinação do tamanho das nanopartículas funcionalizadas com curcumina será efetuada através da técnica de dispersão dinâmica de luz (DLS) e por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), sendo o potencial eletrostático avaliado através da determinação do potencial zeta.<sup>26</sup>

A eficiência de encapsulação da curcumina nas nanopartículas PLGA-PEG será determinada por espectrofotometria UV-vis após separação da solução de curcumina livre das nanopartículas contendo curcumina encapsulada. Essa separação será efetuada por microfiltração recorrendo a filtro NANOSEP *spin filters*.<sup>18</sup>

A eficiência da encapsulação simultânea da curcumina e FITC nas nanopartículas será determinada recorrendo a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) após adequada separação destes compostos orgânicos como atrás mencionado. Tanto na determinação de eficiência por UV-vis como por HPLC usar-se-á o método da curva de calibração.

A conjugação de anticorpos ABIN388314 (anti-CD19) ou tositumomab e ibritumomab-tiuxetan (anti-CD20) a Nano-Cur, contendo curcumina ou curcumina e FITC, será efetuada usando um reagente bifuncional para formar ligações covalentes entre as nanopartículas e os anticorpos. As reações de conjugação serão efetuadas utilizando uma razão molar de 1:20 (Ac para Nano-Cur). O anticorpo anti-CD19 ou anti-CD20 livre será removido por ultracentrifugação.<sup>9</sup> Será usado um cross-link bifuncional NANOCS NHS-PEG-NHS (N-hydroysuccinimide) (figura 4) que apresenta duas terminações reativas para acoplamento às Nano-Cur e aos anticorpos, mediante reação com grupos amina terminais das nanopartículas e das proteínas (figura 5).<sup>29, 30</sup> A conjugação do anticorpo será confirmada por imunoblot recorrendo a anticorpos específicos fluorescentes disponíveis comercialmente e específicos para as proteínas em estudo.<sup>33</sup>

Para verificar se os anticorpos ligados às nanopartículas mantêm afinidade para o antígeno será usado o método descrito por Lindmo et al.<sup>32</sup> Nestes ensaios utilizar-se-ão concentrações constantes de Nano-Cur-Ac que serão incubadas com diferentes concentrações de células Hs-sultan, ARH-77 e Ga-10 que expressam respetivamente os antígenos CD19 e CD20.<sup>18</sup> A cultura de células será efetuada como descrito na tarefa 2.

### **Resultados Esperados**

- Utilizando a técnica da nanoprecipitação espera-se obter nanopartículas PLGA-PEG contendo curcumina ou curcumina e FITC com um diâmetro aproximado de 80nm e com um baixo valor de potencial zeta de forma a garantir a sua estabilidade. Espera-se obter uma eficiência de encapsulação da curcumina superior a 95%.
- Conjugação eficiente e estável dos anticorpos anti-CD19 e anti-CD20 às nanopartículas Nano-Cur sem perda da imunoreatividade dos anticorpos.

### **Membros da equipa de investigação nesta tarefa**

Investigador da área das ciências radiofarmacêuticas, 1 aluno de mestrado

### **Tarefa 2: Internalização celular das nanopartículas e libertação in vitro da curcumina**

## **Descrição**

Serão usadas as linhas celulares Hs-sultan, GA-10, ARH-77. Foram selecionadas estas linhas pois todas expressam os receptores CD20 e CD19. As linhas celulares Hs-sultan e GA-10 são células do tipo linfócitos B de linfomas de Burkitt enquanto a ARH-77 corresponde a células tipo linfoblasto B transformada pelo vírus Epstein-Barr e provocam leucemia de células plasmáticas. Todas as linhas serão cultivadas em meio de cultura adequado (RPMI-1640) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) e com os antibióticos penicilina/estreptomicina.<sup>10</sup>

As linhas celulares serão mantidas em cultura usando uma incubadora com atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. As linhas celulares serão transferidas de acordo com os procedimentos de transferência de linhas celulares cultivadas em suspensão. Neste procedimento as células são transferidas dos frascos de cultura para tubos de plástico e centrifugadas. Após este procedimento remove-se o sobrenadante e ressuspende-se o sedimento celular em novo meio de cultura.

Os ensaios de captação celular serão efetuados com as nanopartículas contendo curcumina e FITC (figura 6) utilizando a microscopia confocal de fluorescência em tempo real. Antes da realização destes ensaios de captação celular, a viabilidade das células será determinada recorrendo ao método de exclusão com o corante azul tripano.

Nos ensaios de captação celular, células viáveis serão colocadas numa placa de Petri e incubadas durante 24h. Ao fim deste tempo serão marcadas com dihidroetidio (DHE). O DHE difunde-se livremente através da membrana celular e é oxidado intracelularmente a brometo de etidio (fluorescência vermelha).<sup>34</sup> Após marcação com DHE as células serão lavadas e mantidas em meio de cultura adequado para os estudos de microscopia confocal em tempo real. Após adição de uma solução de Nano-Cur/FITC-Ac às células, serão adquiridas imagens a cada minuto durante uma hora, trabalhando comprimentos de onda e filtros adequados à emissão do DHE e FITC.

A libertação *in vitro* de curcumina encapsulada nas nanopartículas será estudada usando o método de diálise. A curcumina libertada será quantificada por espectrofotometria UV-*vis* como descrito na tarefa 1.<sup>10</sup>

## **Resultados Esperados**

- Confirmar em tempo real e por microscopia de fluorescência a captação celular das Nano-Cur/FITC-Ac.
- Estudar a velocidade de libertação da curcumina pelas nanopartículas.

### **Membros da equipa de investigação nesta tarefa**

Investigador da área das ciências radiofarmacêuticas, Investigador da área da biologia molecular, 1 aluno de mestrado

### **Tarefa 3: Síntese e caracterização dos radiofármacos**

#### **Descrição**

Nesta tarefa deverão ser obtidos os radiofármacos correntemente aprovados no tratamento do LNH,  $^{131}\text{I}$ -Bexxar (tositumomab) e  $^{90}\text{Y}$ -Zevalin (ibritumomab). O  $^{131}\text{I}$ -Bexxar é comercializado pronto a usar mas o  $^{90}\text{Y}$ -Zevalin deve ser preparado por marcação de um kit comercial.

O  $^{131}\text{I}$ -Bexxar é fornecido como uma solução límpida, livre de pirogénios, estéril e com cor ligeiramente amarelada. É fornecido em frascos de uso único, com pH aproximado de 7,2. Na dose terapêutica a solução de tositumomab é de 14 mg/mL e a concentração radioativa de  $^{131}\text{I}$  é de 5.6 mCi/mL.

O  $^{90}\text{Y}$ -Zevalin será preparado in loco de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, serão adicionados ao frasco de marcação uma solução de acetato de sódio, uma solução de cloreto de  $^{90}\text{Y}$  e Zevalin e a mistura será incubada durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após os 5 minutos de incubação, será adicionado o volume necessário de tampão de formulação. Os volumes a utilizar dos diferentes componentes serão calculados de acordo com as indicações do fabricante.

Após marcação, a pureza radioquímica será determinada por ITLC-SG utilizando NaCl 0.9% como eluente. Nestas condições o anticorpo marcado apresenta  $R_f=0$ . A pureza radioquímica deverá ser superior a 95%.

#### **Resultados Esperados**

- Obter os radiofármacos  $^{131}\text{I}$ - bexxar e  $^{90}\text{Y}$ -Zevalin, a utilizar nos estudos pré-clínicos subsequentes, com uma pureza radioquímica superior a 95%.

### **Membros da equipa de investigação nesta tarefa**

Investigador da área das ciências radiofarmacêuticas, 1 aluno de mestrado

### **Tarefa 4: Estudos de captação celular e citotoxicidade dos radiofármacos $^{131}\text{I}$ -bexxar ou $^{90}\text{Y}$ -zevalin**

#### **Descrição**

Pretende-se nesta tarefa estudar a captação celular dos radiofármacos,  $^{131}\text{I}$ -bexxar ou  $^{90}\text{Y}$ -zevalin, e a sua citotoxicidade na presença e ausência de Nano-Cur-Ac. As linhas

celulares a utilizar serão Hs-sultan, GA-10, ARH-77. A cultura destas linhas celulares será efetuada como descrito na tarefa 2.

Os estudos de captação celular dos radiofármacos serão efetuados após troca do meio de cultura por uma solução de radiofármacos diluídos em meio de cultura, em diferentes tempos. Após incubação o meio de cultura será removido, as células serão lavadas com PBS, mantidas em gelo, sendo finalmente lisadas. A atividade dos lisados será medida num contador gama e em seguida, calculada a percentagem de captação total.

Será estudada a citotoxicidade do Nano-Cur-Ac de modo a excluir a sua ação direta na morte celular, bem como a citotoxicidade dos radiofármacos na ausência do Nano-Cur-Ac. Nestes estudos celulares serão experimentadas várias possibilidades para entrega do Nano-Cur-Ac (figura 7), de modo a avaliar qual será o mais eficaz a potenciar a ação radiotóxica dos radiofármacos,  $^{131}\text{I}$ -bexxar ou  $^{90}\text{Y}$ -zevalin:

- 1 – administração de Nano-Cur-Ac a diferentes tempos antes da administração dos radiofármacos.
- 2 – Utilização de Nano-Cur-Ac funcionalizado com diferentes anticorpos (anti-CD19 e anti-CD20).

A ação citotóxica dos radiofármacos será avaliada utilizando diferentes doses dos radiofármacos e recorrendo ao ensaio MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). O MTT apresenta uma estrutura molecular em forma de anel e é clivado por uma enzima mitocondrial, a desidrogenase succínica, dando origem aos cristais de formazan de coloração violeta. As células que se mantêm viáveis reduzem o MTT a formazan, durante a respiração celular. A detecção da quantidade de formazan formado é uma indicação da integridade das mitocôndrias, e é directamente proporcional ao número de células viáveis.

### **Resultados Esperados**

- Estudar a captação dos radiofármacos nas linhas celulares.
- Observar alterações nos efeitos citotóxicos dos radiofármacos na presença e ausência de nanopartículas funcionalizadas com curcumina.
- Analisar a possível influência do uso de diferentes anticorpos para entrega das nanopartículas e do tempo de administração da Nano-Cur-Ac nos efeitos citotóxicos dos radiofármacos.

## **Membros da equipa de investigação nesta tarefa**

1 Investigador da área das ciências radiofarmacêuticas, 1 Investigador da área da biologia molecular, 1 aluno de mestrado

## **Tarefa 5: Mecanismos de morte celular**

### **Descrição**

Nesta tarefa pretende estudar os mecanismos de morte celular induzida pelos radiofármacos na presença ou ausência dos Nano-Cur-Ac, bem como avaliar os correspondentes efeitos genotóxicos.

Para esse efeito serão estudados diferentes processos associados a mecanismos de apoptose celular tais como:

- 1 – inibição das proteínas Bcl-2 e/ou ativação das caspases;
- 2 – externalização da fosfatidilserina;
- 3 – quebras na cadeia de DNA;
- 4 – papel de espécies reativas de oxigénio (ROS);

### **1 – Inibição das proteínas Bcl-2 e/ou ativação das caspases;**

O estudo da expressão de proteínas pró-sobrevivência (Bcl-2)<sup>34</sup> e pró-apoptose (caspases)<sup>9</sup> é importante no sentido de verificar se existe diminuição na concentração de proteínas pró-sobrevivência e aumento das proteínas pró-apoptose. O estudo da expressão destas proteínas permitirá verificar se o efeito radiosensibilizador do Nano-Cur-Ac promove a inibição de proteínas pró-sobrevivência e/ou ativação de proteínas pró-apoptose. Este estudo será feito através de uma técnica analítica usada para detetar proteínas num homogenato chamada imunoblot. Esta técnica utiliza eletroforese em gel para separar proteínas previamente desnaturadas de acordo com a sua massa. Em seguida as proteínas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose ou PVDF, onde as proteínas alvo são identificadas através do uso de anticorpos específicos.

### **2 – Externalização da fosfatidilserina;**

Um dos eventos associados à apoptose celular tem a ver com a externalização de fosfatidilserina (PS). A PS perde a sua simetria no início do processo de morte celular sendo translocada para o folheto extra-celular e marcando as células como alvos de fagocitose. A externalização da PS será avaliada por microscopia de fluorescência usando anexina V marcada com uma sonda fluorescente.

As anexinas são uma família de proteínas de ligação da membrana fosfolipídica e dependentes de cálcio ligando-se preferencialmente a fosfatidilserina (PS).

### **3 – Quebras na cadeia de DNA**

O DNA é uma molécula que se apresenta enrolada e compactada no estado normal. No entanto, na presença de agentes genotóxicos surgem quebras e alteração na sua estrutura. Utilizar-se-á o ensaio cometa para estudar possíveis danos no DNA decorrentes da ação dos radiofármacos, potenciada ou não pela presença de Nano-Cur-Ac.

O ensaio cometa é um ensaio com grande sensibilidade utilizado para analisar células individuais. As células são aplicadas num gel de agarose, as proteínas celulares são removidas por lise e o DNA é submetido a eletroforese. Com o uso de corantes específicos é possível observar a migração do DNA, semelhante a um cometa, utilizando microscopia de fluorescência. A capacidade de migração do DNA depende do tamanho da molécula e da existência de quebras. O tamanho da cauda aumenta consoante o número de danos existentes na cadeia de DNA. A intensidade da fluorescência da cauda em relação à do corpo do cometa também oferece informações acerca do número de quebras no DNA.

### **4 – Papel de espécies reativas de oxigénio (ROS)**

A radiação  $\beta$ - emitida pelos radiofármacos provoca processos de radiólise podendo levar ao aparecimento de espécies reativas de oxigénio no interior da célula. Nesta tarefa pretende-se averiguar se a ação radiosensibilizadora do Nano-Cur-Ac aumenta a presença de espécies reativas de oxigénio.

A presença destas espécies será detetada através de um ensaio ROS em que se utilizará o diacetato de 2', 7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) como sonda fluorescente e em que se recorrerá à microscopia de fluorescência.

A DCFH-DA atravessa a membrana celular e é desacetilada pelas esterases celulares, sendo oxidada a uma forma altamente fluorescente na presença de ROS. A intensidade de fluorescência é proporcional ao nível de espécies reativas no citosol celular. A oxidação destas sondas pode ser detetada monitorando o aumento de fluorescência com um microscópio de fluorescência.

### **Resultados Esperados**

- Observar alterações na expressão de proteínas pró-sobrevivência e pró-apoptose na sequência da exposição das células tumorais aos radiofármacos na presença ou ausência de Nano-Cur-Ac.
- Observar externalização da PS como molécula sinalizadora da apoptose celular induzida pelos radiofármacos.
- Avaliar o efeito da curcumina como radiosensibilizador na formação de espécies reativas de oxigênio e nos danos causados ao DNA.

**Membros da equipa de investigação nesta tarefa**

Investigador da área das ciências radiofarmacêuticas, 1 investigador da área da biologia molecular, 1 aluno de mestrado

.....

**3.2.5. Calendarização e Gestão do Projeto**

**3.2.5.a Descrição da estrutura de Gestão**

A equipa deste projeto é constituída por 1 investigador da área das ciências radiofarmacêuticas, 1 investigador da área de biologia molecular e 1 aluno de mestrado.

O investigador da área das ciências radiofarmacêuticas será o líder de equipa e irá garantir que o projeto respeita os custos e os objetivos a que se propõe. A responsabilidade de cada investigador será: 1 – coordenar o trabalho científico que lhe cabe tentando atingir os objetivos propostos respeitando os custos indicados. 2 – preparar relatórios de progresso a cada ano das atividades realizadas ao líder de equipa para este preparar o relatório final a enviar à fundação financiadora do projeto.

**3.2.5.b Lista de milestones**

<b>Data</b>	<b>Designação da milestone</b>
1/6/2014	Síntese e caracterização do complexo Nano-Cur-Ac e sua avaliação in vitro.

**Descrição**

Obtenção de nanopartículas com curcumina encapsulada e anticorpos anti-CD19 ou anti-CD20 conjugados, apresentando elevada estabilidade in vitro. Avaliação da sua capacidade de internalização em células tumorais humanas e da libertação in vitro da

curcumina.

<b>Data</b>	<b>Designação da milestone</b>
31/1/2015	Avaliação dos efeitos citotóxicos dos radiofármacos emissores $\beta^-$ , na presença ou na ausência de curcumina.

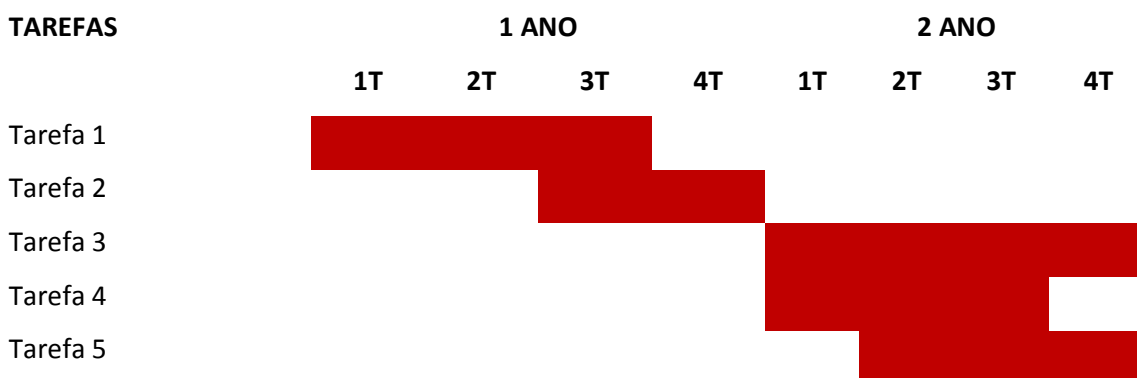
**Descrição**  
Marcação dos radiofármacos bexxar e zevalin.  
Realização de ensaios de captação celular dos radiofármacos e estudo da sua citotoxicidade.

<b>Data</b>	<b>Designação da milestone</b>
1/6/2015	Estudo dos mecanismos envolvidos na morte celular induzida pelos radiofármacos na presença ou ausência de curcumina.

**Descrição**  
Realização de ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade, ROS e estudos de mecanismos de morte celular.

.....

### 3.2.6. Cronograma



## 4. Equipa de Investigação

### 4.1. Lista de membros

<b>Nome</b>	<b>Função</b>	<b>Grau Académico</b>	<b>% Tempo</b>
Investigador da área das ciências radiofarmacêuticas	Inv. responsável	Doutoramento	45%
Investigador da área da biologia molecular	Investigador	Doutoramento	35%
Bolseiro de investigação	Bolseiro	Mestrado	100%

Total: 3

## 5 – Indicadores previstos

<b>Descrição</b>	<b>1 ano</b>	<b>2 ano</b>	<b>total</b>
<b>A - Publicações</b>			
Artigos em revistas internacionais	1	2	3
Artigos em revistas nacionais	0	0	0
<b>B - Comunicações</b>			
Comunicações em encontros científicos internacionais	1	1	2
Comunicações em encontros científicos nacionais	1	1	2
<b>C - Relatórios</b>	2	2	4
<b>D – Organização de seminários e conferências</b>	0	1	1

## 6 Orçamento

<b>Descrição</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>Total</b>
Recursos humanos	13.143,6	13.143,6	26.287,2
Missões	1000	1000	2000
Aquisição de bens e serviços	15.000	71.000	86.000
Gastos gerais	6.994,46	8.194,46	15.188,92
Equipamento	0	0	0
<b>TOTAL</b>	<b>36.138,06</b>	<b>93.338,06</b>	<b>139.476,12</b>

## 7 Justificação do Orçamento

### 7.1. Justificação dos Recursos Humanos

<b>Tipo</b>		<b>Nº de pessoas</b>
Bolsa de investigação		1
<b>Duração em meses</b>	<b>Custo envolvido</b>	<b>Outros custos (€)</b>
24	26.287,2€	

#### **Justificação do financiamento solicitado**

É necessário recrutar um bolseiro de investigação que deverá colaborar na síntese das nanopartículas, na preparação dos radiofármacos e nos estudos in vitro.

### 7.2. Justificação de missões

<b>Tipo</b>	<b>Nº de deslocações</b>
Participação em congressos	4
<b>Local</b>	<b>Custo envolvido (€)</b>
Europa e Estados Unidos	2000€

#### **Justificação do financiamento solicitado**

Apresentação dos resultados em congressos da área da química radiofarmacêutica, da área da medicina nuclear e da dosimetria de radiações.

### 7.3. Justificação de aquisição de bens e serviços

<b>Tipo</b>	<b>Custo (€)</b>
Materiais base do estudo	81.000

#### **Justificação do financiamento solicitado**

Aquisição de solventes e reagentes químicos, nomeadamente, PLGA, PEG e curcumina necessários para a concretização do projeto.

Aquisição de linhas celulares e meios de cultura.

Aquisição de radiofármacos.

Pagamento de serviços, nomeadamente estudos de microscopia de fluorescência.

## 7.4. Justificação do equipamento

### 7.4.1. Equipamento já disponível para a execução do projeto

<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ano</b>
Laboratórios para síntese química equipados com luvas, linhas de vácuo e evaporadores rotativos (IST/ITN)			2002
<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ano</b>
Laboratório equipado com hotte para manipulação de compostos radioativos (IST/ITN)			1983
<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ano</b>
Laboratório para estudos com linhas celulares (IST/ITN)			
<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ano</b>
HPLC/detetores gama e UV	Perkin Elmer	Series 200 lc pump	1999
<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ano</b>
Espectrofotómetro UV-vis	Perkin Elmer	Lamda 9	1992
<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ano</b>
Contador gama	Berthold	LB2723	1983
<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ano</b>
Calibrador de doses	Aloka	IGC-3	1985
<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ano</b>
Monitor de radiação	Thermo Eberline	Contamat	2002
<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ano</b>
Camara de fluxo laminar	Heraeus	Ks12	2005
<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ano</b>
Centrifuga	Beckman	J-6B	1985
<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ano</b>
Arca frigorífica	Kelvinator	Scientific	1985
<b>Tipo de equipamento</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Modelo</b>	<b>Ano</b>
Leitor de placas de 96 poços	Tecan	Model M100	2009

<b>Tipo de equipamento</b> Sistema para eletroforese proteica e blotting	<b>Fabricante</b> GE	<b>Modelo</b> SE260/TE 70 PWR	<b>Ano</b> 2006
<b>Tipo de equipamento</b> Radiocromatógrafo	<b>Fabricante</b> Berthold	<b>Modelo</b> LB2723	<b>Ano</b> 1983
<b>Tipo de equipamento</b> Estufas de CO <sub>2</sub>	<b>Fabricante</b> Heraeus	<b>Modelo</b> Hera Cell 150	<b>Ano</b> 2005
<b>Tipo de equipamento</b> Microscópio ótico	<b>Fabricante</b> Nikon	<b>Modelo</b> E600	<b>Ano</b> 2002

#### 7.4.2 Discriminação do equipamento a adquirir

Não vai ser adquirido novo equipamento. Os trabalhos envolvendo microscopia confocal serão efetuados no Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa que disponibiliza o acesso ao equipamento na forma de serviço pago.

## 8 Considerações Finais

Este trabalho teve como objetivo a elaboração de um projeto onde se pudesse estudar os efeitos de um agente fitoquímico radiosensibilizante, a curcumina no tratamento de LNH com radioimunoterapia, usando nanopartículas PLGA-PEG como sistema de transporte.

Apesar da curcumina apresentar propriedades anti-tumorigénicas promissoras também possui uma fraca biodisponibilidade. Uma das formas que se tem estudado para diminuir a sua fraca biodisponibilidade e melhorar a sua eficácia tem sido a encapsulação em nanopartículas. O encapsulamento da curcumina em nanopartículas e posterior conjugação das nanopartículas a anticorpos permite criar um veículo específico para determinados antígenos expressados em células tumorais.

O uso de agentes radiosensibilizadores poderá ter um impacto muito forte no futuro da terapêutica do cancro uma vez que permitirá reduzir as doses usadas e, simultaneamente, aumentar a eficácia da terapêutica e diminuir os efeitos secundários da mesma.

Apesar deste projeto se ter focado em 3 linhas celulares do LNH a estratégia delineada, (aumentar o efeito radiosensibilizante de fitoquímicos através de sistemas de nanotransporte), pode ser aplicada em qualquer tipo de cancro pelo que se perspectiva que as suas aplicações futuras em termos de investigação de novas terapias do cancro são diversificadas e em número elevado.

O projeto em si foi um desafio pessoal grande pelo tempo e por me obrigar a usar capacidades organizativas que eu tenho pouco desenvolvidas. Nesse sentido foi um desafio estimulante e creio ultrapassado com sucesso.

## 9 Referências Bibliográficas

1. Bonavida B. Sensitization of Cancer Cells for Chemo/Immuno/Radio-therapy. Los Angeles: Humana Press; 2008. Chapter 14, Natural Agents That Can Sensitize Tumor Cells to Chemotherapy and Radiation Therapy; p. 211-240.
2. Hemalswarya S, Doble M. Potential Synergism of Natural Products in the Treatment of Cancer. *Phytotherapy research*. 2006 Mar 26; 20(4):239-249.
3. Jia W, Gao W, Yan Y, Wang J, Xu Z, Zheng W, Xiao P. The Rediscovery of Ancient Chinese Herbal Formulas. *Phytotherapy Research*. 2004 Aug; 18(8): 681-686.
4. Arora R. Gupta D. Chawla R. Sagar R. Sharma A. Kumar R. Prasad J. Singh S. Samanta N. Sharma RK. Radioprotection by Plant Products: Present Status and Future Prospects. *Phytotherapy Research*. 2005 Mar 30; 19(1); 1-22.
5. Gandhi NM. Nair CK. Radiation protection by Terminalia chebula: Some mechanistic aspects. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2005 Sep 1; 277(1-2):43-48.
6. Goel HC. Prakash H. Ali A. Bala M. Podophyllum hexandrum modulates gamma radiation-induced immunosuppression in Balb/c mice: Implications in radioprotection. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 2007 Jan 1; 295(1-2):93-103.
7. Javvadi P, Segan A, Tuttle S, Koumenis C. The Chemopreventive Agent Curcumin Is a Potent Radiosensitizer of Human Cervical Tumor Cells via Increased Reactive Oxygen Species Production and Overactivation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. *Molecular Pharmacology*. 2008 Feb 5, 73(5): 1491-1501.
8. Jagetia CG. Ganapathi NG. Venkatesh P. Rao N. Baliga MS. Evaluation of the Radioprotective Effect of Liv52 in Mice. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2006 Jun 6; 47(7): 490-502.
9. Yallapu M, Maher D, Sundram V, Bell M, Jaggi M, Chauhan C. Curcumin induces chemo/radio-sensitization in ovarian cancer cells and curcumin nanoparticles inhibit ovarian cancer cell growth. *Journal of ovarian research*. 2010 Jan 3:11.
10. Hoang B, Reilly R, Allen C. Block Copolymer Micelles Target Auger Electron Radiotherapy to the Nucleus of HER2-Positive Breast Cancer Cells. *Biomacromolecules*. 2011 Dec 22; 13(2): 455-465.
11. Cheson B. Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas. *Blood Journal*. 2002 Sep 19; 101(2):391-398.
12. Hernandez M, Knox S. Radiobiology of radioimmunotherapy: targeting CD20 B-cell antigen in non-hodgkin lymphoma. *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 2004; 59 (5): 1274-1287.

13. Witzig TE, Gordon L, Cabanillas F, Czuczman MS, Emmanouilides C, Joyce R, Pohlman B, Bartlett N, Wiseman G, Padre N, Grillo-Lopez A, Multani P, White C. Randomized Controlled Trial of Yttrium-90-Labeled Ibritumomab Tiuxetan Radioimmunotherapy Versus Rituximab Immunotherapy for Patients With Relapsed or Refractory Low-Grade, Follicular, or Transformed B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2002 Apr 22; 20(10):2453-2463.
14. Lagaru A, Mittra E, Ganjoo K, Knox S, Goris M. <sup>131</sup>I-Tositumomab (Bexxar®) vs. <sup>90</sup>Y-Ibritumomab (Zevalin®) Therapy of Low-Grade Refractory/Relapsed Non-Hodgkin Lymphoma. *Academy of Molecular imaging*. 2010; 12:198-203.
15. Mehta R, Murillo G, Naithani R, Peng X. Cancer Chemoprevention by natural Products: How Far have We Come?. *Pharmaceutical Research*. 2010 Jun; 27(6):950-961.
16. Priego S, Feddi F, Ferrer P, Mena S, Benlloch M, Ortega A, Carretero J, Obrador E, Asensi M, Estrela J. Natural polyphenols facilitate elimination of HT-29 colorectal cancer xenografts by chemoradiotherapy: a Bcl-2- and superoxide dismutase 2-dependent mechanism. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2008 Oct; 7:3330-3342.
17. Neergheen V, Bahorun T, Taylor E, Jen LS, Aruoma O. Targeting specific cell signaling transduction pathways by dietary and medicinal phytochemicals in cancer chemoprevention. *Toxicology*. 2010 Dec 5; 278(2):229-241.
18. Anand P, Nair H, Sung B, Kunnumakkara A, Yadav V, Tekmal R, Aggarwal B. Design of Curcumin Loaded PLGA Nanoparticles Formulation with Enhanced Cellular Uptake, and Increased Bioactivity *in vitro* and Superior Bioavailability *in vivo*. *Biochem Pharmacol*. 2010 Feb. 1; 79(3):330-338.
19. Hu J, Wang Y, Chen Y. Curcumin-induced Histone Acetylation in Malignant Hematologic Cells. *J Huazhong Univ Sci Technol*. 2009 Feb; 29(1):25-28.
20. Ghosh M, Amareshwar T, Xu W, Sulchek T, Gordon L, Ryan R. Curcumin nanodisks: formulation and characterization. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011 Apr; 7(2):162-167.
21. Juzenas P, Chen W, Sun Y, Coelho M, Generalov R, Generalova N, Christensen I. Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Advanced Drugs Delivery Reviews*. 2008 Dec 14; 60(15):1600-1614.
22. Duan J, Mansour H, Zhang Y, Deng X, Chen Y, Wang J, Pan Y, Zhao J. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and curcumin in chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*. 2012 Apr 15; 426(1-2):193-201.

23. Nowakowsky G, Witzig T. Radioimmunotherapy for B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*. 2006 Mar; 4(3):225-231.
24. Wilken R, Veena M, Wang M, Srivatsan E. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*. 2001; 10(12):1-19.
25. Everett P, Meyers J, Makkinje A, Rabbi M, Lerner A. Preclinical Assessment of Curcumin as a Potential Therapy for B-CLL. *American Journal of Hematology*. 2006; 82:1-8.
26. Lee J, Hwang S, Lee D, Kim S, Kim D. Formation of Poly(ethylene glycol)-Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Nanoparticles via Nanoprecipitation. *Macromolecular Research*. 2009; 17(2):72-78.
27. Bischt S, Feldman G, Soni S, Ravi R, Karikar C, Maitra A, Maitra A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*. 2007 Apr 17; 5:3.
28. Nordstrom P. Formation of polymeric nanoparticles encapsulating and releasing a new hydrophobic cancer drug. Master's Thesis. Department of Chemical and Biological Engineering: Chalmers University of Technology; 2011. 50 p.
29. Townsend S, Evrony G, Gu F, Schulze M, Browen R, Langer R. Tetanus toxin C fragment conjugated nanoparticles for targeted drug delivery to neurons. *Biomaterials*. 2007 Dec; 28(34): 5176-5184.
30. Crafts C, Bailey B, Planet M, Acworth I. Analytical Methods to Qualify and Quantify and PEGylated Biopharmaceuticals. Thermo Fisher Scientific. Chelmsford 2012.
31. Algaer S, Mather S, Theobald A. Validation of an Analytical Method for Assay of Immunoreactivity of  $^{99m}\text{Tc}$ -radiolabelled Monoclonal Antibodies. *Pharmacy and Pharmacology Communications*. 2011 Mar 11; 4(6):279-282.
32. Tahtis K, Lee FT, Smyth F. Biodistribution Properties of  $^{111}\text{In}$ -labeled C-Functionalized *trans*-Cyclohexyl Diethylenetriaminepentaacetic Acid Humanized 3S193 Diabody and F(ab')<sub>2</sub> Constructs in a Breast Carcinoma Xenograft Model. *Clinical Cancer Research*. 2001 Apr; 7:1061-1072.
33. Esteves T, Marques F, Paulo A, Rino J, Nanda P, Smith CJ, Santos I. Nuclear Targeting with cell-specific multifunctional tricarbonyl M(I) (M is Re,  $^{99m}\text{Tc}$ ) complexes: synthesis, characterization, and cell studies. *J Biol Inorg Chem*. 2011 Jun 25; 16:1141-1153.
34. Adams J, Cory S. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. *Science*. 1998 AUG. 281: 1322-1326.

## 10 Figuras

**FIGURA 1 – Nanopartículas contendo curcumina (Nano-Cur) conjugadas com anticorpos específicos (Nano-Cur-Ac) para antígenos presentes no Linfoma Não-Hodgkin. No esquema seguinte a curcumina e o FITC são encapsulados simultaneamente nas nanopartículas.**

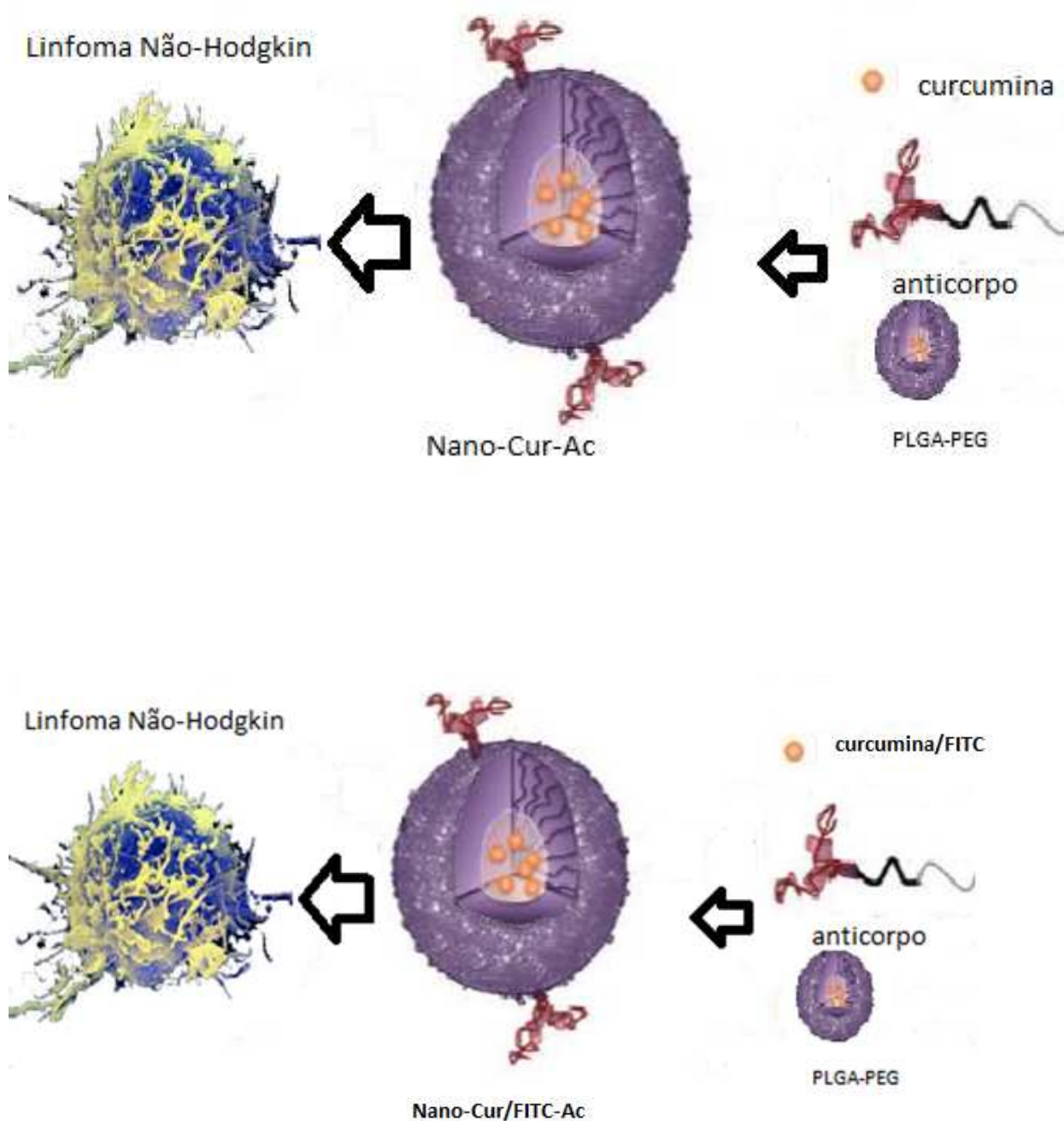


FIGURA 2 – Estrutura química da curcumina

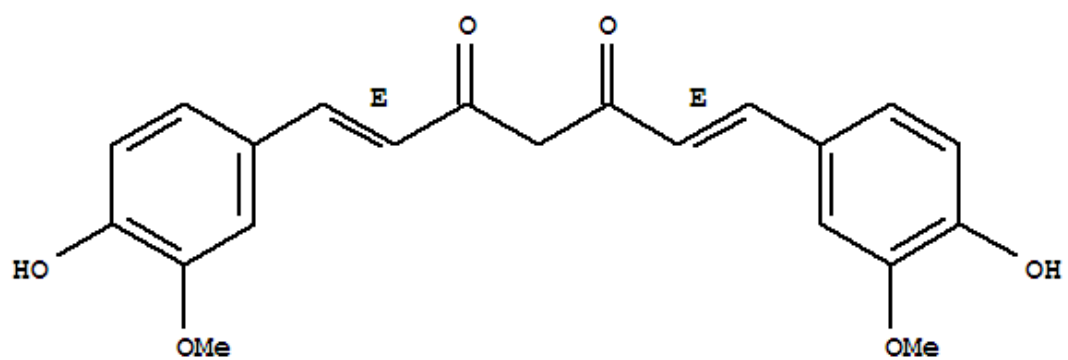
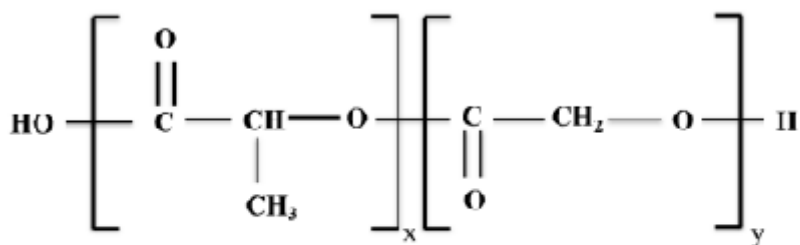


FIGURA 3 – Estrutura do polímero PLGA



ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA)

X indica a unidade correspondente ao ácido láctico e o Y ao ácido glicólico.

FIGURA 4 – Estrutura química de NHS-PEG-NHS

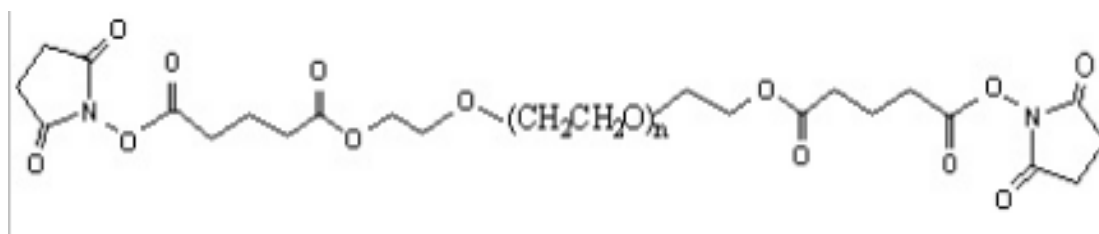
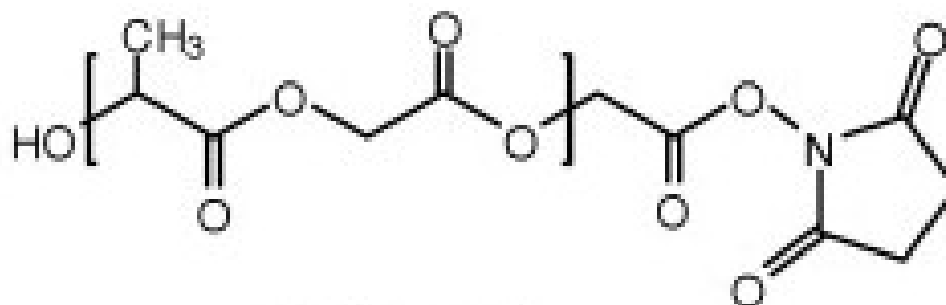
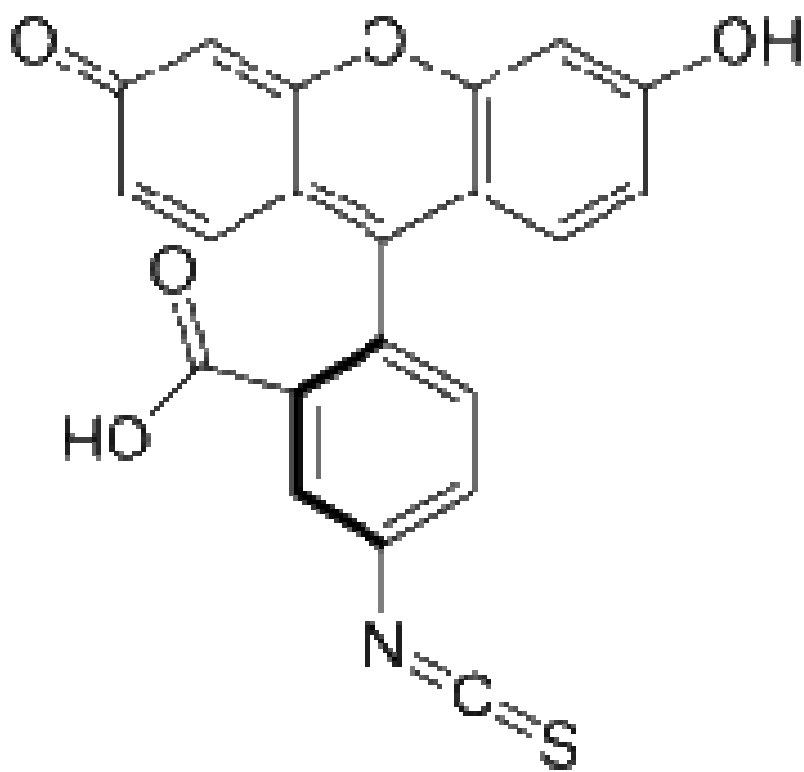


FIGURA 5 – Estrutura química do PLGA-NHS

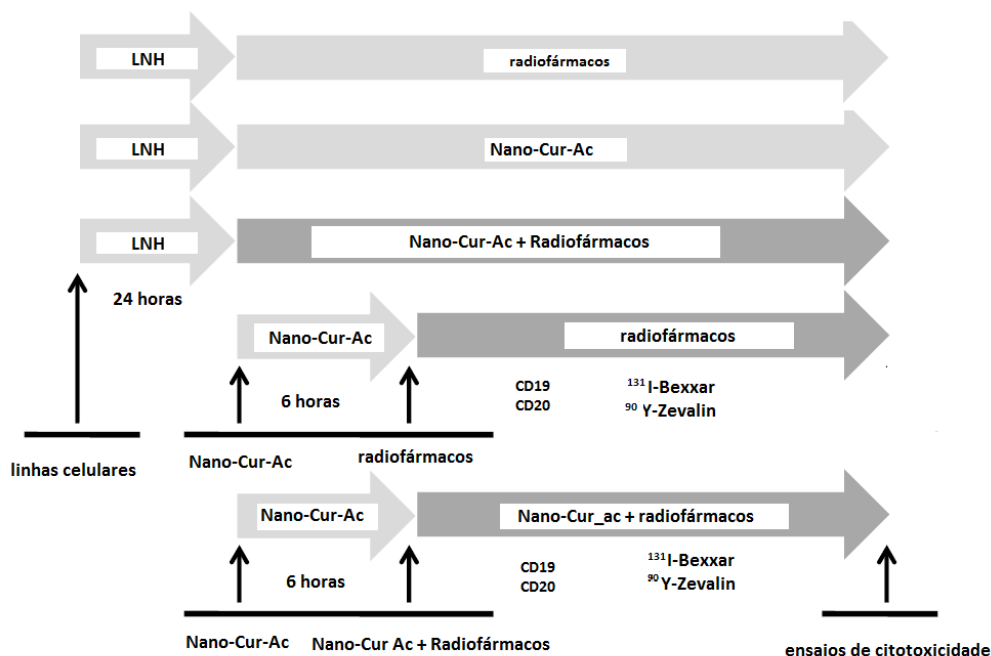


PLGA-NHS

FIGURA 6 – Estrutura química do FITC



**FIGURA 7 – Modalidades em análise no estudo de captação celular e citotoxicidade dos radiofármacos na presença e ausência de Nano-Cur-Ac**



Comparação de 3 grupos em estudo: radiofármacos, Nano-Cur-Ac e radiofármacos com nanopartículas.

Neste último grupo comparar variante tempo de administração administrando Nano-Cur-Ac 6 horas antes da administração dos radiofármacos em, comparação com administração de Nano-Cur-Ac 6 horas antes e simultaneamente com administração de radiofármacos.

Comparar variante recetores celulares usando dois anticorpos para os antígenos CD19 e CD20.

Comparar cada uma das variantes em causa para os dois radiofármacos selecionados.