

Universidade do Porto

FEUP Faculdade de
Engenharia

Avaliação Cintigráfica da Resposta Terapêutica de Tumores Pulmonares Não Operáveis

Lídia Alexandra dos Santos Cunha

Licenciada em Medicina Nuclear

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Dissertação Submetida para Satisfação Parcial dos Requisitos do

Grau de Mestre em Engenharia Biomédica

Área de Especialização: Análise e Processamento de Sinal e Imagem

Dissertação Realizada sob a Supervisão de

Professora Doutora Maria Filomena Botelho

IBILI – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Professor Doutor António Sousa Pereira

IEETA – Universidade de Aveiro

Porto, Março de 2006

Avaliação Cintigráfica da Resposta Terapêutica de Tumores Pulmonares Não Operáveis

Lídia Alexandra dos Santos Cunha

Licenciada em Medicina Nuclear

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Dissertação Realizada sob a Supervisão de

Professora Doutora Maria Filomena Botelho

IBILI – Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Professor Doutor António Sousa Pereira

IEETA – Universidade de Aveiro

O Sonho

Pelo Sonho é que vamos,
comovidos e mudos.
Chegamos? Não chegamos?
Haja ou não haja frutos,
pelo Sonho é que vamos.

Basta a fé no que temos.
Basta a esperança naquilo
que talvez não teremos.
Basta que a alma demos,
com a mesma alegria,
ao que desconhecemos
e ao que é do dia-a-dia.

Chegamos? Não chegamos?

- Partimos. Vamos. Somos.

Sebastião da Gama

RESUMO

A principal razão para o insucesso do tratamento de patologias oncológicas é consensualmente reconhecida como sendo a presença de doença disseminada e resistente à terapia. A resistência aos agentes anti-tumorais pode surgir em qualquer altura, podendo estar já presente desde o início da doença ou desenvolver-se quer durante os tratamentos, quer numa situação de recidiva. Deste modo, a identificação precoce da ausência de resposta a estes tratamentos poderá ser extremamente importante na correcta selecção dos protocolos ou regimes quimioterapêuticos. O objectivo deste trabalho é avaliar, *in vivo*, a resposta terapêutica de doentes com tumores pulmonares não operáveis, através da utilização de ^{99m}Tc -sestamibi, procurando estabelecer uma relação entre a captação, retenção e eliminação deste agente por parte do tumor e a resposta à quimioterapia, tentando ainda inferir se os tumores estão ou não a desenvolver mecanismos de resistência aos citostáticos.

Foram estudados 12 doentes com idades compreendidas entre 44 e 75 anos, com tumores pulmonares em estadio IIIB ou IV, tendo-se realizado duas avaliações: a primeira antes do início da quimioterapia e a segunda após o 3º ciclo de tratamento. Foram adquiridas imagens estáticas em projecções anterior e posterior aos 5 e 65 minutos após a injeção endovenosa de ^{99m}Tc -sestamibi. Com base nas imagens adquiridas, foram calculados diversos indicadores: coeficientes de captação precoce e tardio, coeficiente de retenção, índice de retenção e a taxa de eliminação por hora. Para a análise dos resultados, os doentes foram divididos em 2 grupos de acordo com a resposta à quimioterapia, tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas no coeficiente e no índice de retenção e na taxa de eliminação entre os doentes que responderam e os que não responderam à terapia, na primeira avaliação. Na segunda avaliação, não foram encontradas diferenças nos valores dos diversos indicadores entre ambos os grupos.

O ^{99m}Tc -sestamibi constitui uma ferramenta útil na previsão da resposta dos tumores pulmonares à quimioterapia. Contudo, ainda não está estabelecida a sua utilidade na monitorização dessa resposta durante os tratamentos, sendo necessários mais estudos, idealmente multicêntricos, com amostras de maiores dimensões.

Palavras-chave: tumores pulmonares, ^{99m}Tc -sestamibi, quimiorresistência, Pgp, MRP, Bcl-2, apoptose.

ABSTRACT

The main reason for chemotherapy failure in cancer is nowadays identified as the presence of disseminated disease resistant to therapy. Resistance to anti-cancer drugs is a process that can overcome at any time. It can be present since the very beginning of the disease or it might appear during therapy. Therefore early identification of lack of treatment response could play a central role in the correct selection of therapeutic regimens. The goal of this work is to assess therapeutic tumor response in patients with non-surgically treated lung cancer, through the use of ^{99m}Tc -sestamibi. It had been tried to study and to establish relationships between radiopharmaceutical uptake, retention and elimination by the tumor and the chemotherapeutic response. Also, it had been studied the possibility to predict if tumors are developing multidrug resistance. Twelve patients (ages between 44 and 75 years old) with lung cancer (stages IIIB or IV) were examined twice: before and after the 3rd chemotherapeutic cycle. Anterior and posterior projections of the chest were acquired 5 and 65 minutes after ^{99m}Tc -sestamibi intravenous injection. Early and delayed uptake ratio, were calculated based on the regions of interest drawn in the images. In order to analyze the results, patients were divided in two groups according chemotherapy response. We found statistical significant differences in the retention coefficient, retention index and washout rate between responders and non-responders at pre-chemotherapy examination. At post-chemotherapy examination we didn't found differences between groups.

As a conclusion, it can be said that ^{99m}Tc -sestamibi is a useful tool to predict the chemotherapy response. However, its value in monitoring chemotherapy response during treatment is still not yet established. It will be needed to study a larger number of patients, preferentially in a multicenter approach.

Keywords: lung cancer, ^{99m}Tc -sestamibi, multidrug resistance, Pgp, MRP, Bcl-2, apoptosis.

AGRADECIMENTOS

O trabalho prático subjacente a esta Dissertação foi realizado no Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina de Coimbra. Várias pessoas prestaram o seu contributo de formas diversas, de modo a que este trabalho se tornasse uma realidade. A elas expresso a minha gratidão:

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, Directora do Instituto de Biofísica e Biomatemática da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, por ter tornado este trabalho possível, por se ter disponibilizado para orientar esta Dissertação, pelo seu esforço, dedicação e empenho, atento e permanente, ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor António Sousa Pereira, Director do Instituto de Engenharia Electrónica e Telemática da Universidade de Aveiro, por ter aceite supervisionar este trabalho e pela disponibilidade sempre demonstrada.

Ao Professor Doutor Manuel Fontes Baganha, Director do Departamento de Doenças Pneumológicas e Alergológicas dos Hospitais da Universidade de Coimbra e à Dra. Maria Alcide Marques, pela disponibilidade e interesse na selecção e estudo dos doentes incluídos neste trabalho.

Ao Professor Luís Metello, Director do Curso de Medicina Nuclear da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, por sempre ter acompanhado de perto a evolução deste trabalho, pela colaboração prestada na realização da parte prática, pela leitura atenta e análise crítica e reflexiva dos manuscritos, pelo seu incentivo sempre presente.

À Dra. Ana Margarida Abrantes pelo precioso apoio na realização da parte prática deste trabalho, pelo auxílio prestado na pesquisa bibliográfica, e por estar sempre disponível para responder a qualquer solicitação.

À Professora Pilar Baylina pela enorme disponibilidade e empenho demonstrados e pelo auxílio prestado na análise estatística dos resultados obtidos.

À Dra. Mónica Martins, colega de Curso e amiga pessoal, pelo auxílio na recolha de dados dos doentes e pelo seu incentivo caloroso.

Ao Dr. Bruno Ferreira e Dr. André Nunes, colegas de trabalho e amigos pessoais, pelo seu incentivo e disponibilidade permanentes, por partilharem responsabilidades profissionais, mesmo quando isso implicou um acréscimo de trabalho, sem nunca esmorecerem o sorriso.

Ao Senhor José Carlos Peres, Director Comercial da FarmaAPS, em nome pessoal e em representação da instituição, pelo apoio assíduo neste e noutros projectos, pela amizade, como pela confiança permanente, pela competência e simpatia sempre demonstradas.

A todos, os que de algum modo contribuíram para a presente Dissertação e que não foram especificamente designados, mas que nem por isso foram esquecidos.

Por último, mas não menos importante, um agradecimento especial à minha família, não só pelo seu apoio incondicional e permanente, mas também pela sua compreensão pelas poucas horas que lhe tenho dedicado.

PREFÁCIO

A principal razão para o insucesso do tratamento dos doentes com patologias do foro oncológico é consensualmente reconhecida como sendo a presença de doença disseminada e resistente à terapia. Esta resistência aos agentes anti-tumorais pode surgir em qualquer altura, podendo estar já presente desde o início da doença ou desenvolver-se quer durante os tratamentos, quer numa situação de recidiva [1].

Apesar de em muitos doentes se verificar a completa remissão do tumor graças aos tratamentos precoces com associações de diversos agentes citostáticos, em muitos outros ocorrerá a continuação da evolução da doença ou até recidiva, após aparente remissão, com resistência a um amplo conjunto de citostáticos. Desde o início da aplicação dos primeiros agentes anti-tumorais que se tem procurado conhecer qual o grau de importância que a resistência a estes fármacos desempenha no insucesso dos tratamentos e qual a forma de circunscrever esta situação. Pelo facto de se conhecer que as células de quase todos os tipos de tumores podem desenvolver mecanismos de resistência a inúmeros fármacos ou substâncias, (processo ou conjunto de processos normalmente designados, na sua globalidade, por *Multidrug Resistance* – MDR), distintos quer na sua estrutura química, quer nos seus mecanismos de acção nas células, uma das novas abordagens consiste na administração de um conjunto de fármacos diferentes, no sentido de procurar minimizar o problema da MDR tornando o tratamento o mais eficaz possível [1,2].

É intrinsecamente difícil estudar os mecanismos de desenvolvimento de resistência em doentes, contudo os estudos levados a cabo *in vitro*, apesar das limitações que apresentam, têm ajudado os investigadores a entender os fundamentos bioquímicos e moleculares destes processos. Actualmente, já se realizam estudos *in vivo*, nomeadamente através da aquisição de imagens com radiofármacos que constituem substratos para os transportadores celulares responsáveis pela existência de MDR. O objectivo destes estudos é identificar quais os mecanismos específicos que podem ser farmacologicamente ultrapassados ou modificados no sentido de tornar sensíveis (aos agentes citostáticos) as células resistentes [2]. Estes estudos têm permitido identificar diversas vias pelas quais as células malignas adquirem resistência a várias classes de agentes citostáticos. De entre estas, a mais bem estudada consiste na sobre-expressão da glicoproteína P (Pgp), uma proteína de transporte presente na membrana celular, responsável pela extrusão dos agentes

citotóxicos para fora da célula, anulando ou minimizando o seu efeito (este e outros mecanismos de MDR serão abordados pormenorizadamente ao longo do capítulo 2).

Por se tratar de um procedimento invasivo, não é comum realizar-se mais que uma biopsia a um tumor. Por este motivo, não é possível obter informações (durante e após o tratamento) acerca da evolução de aspectos específicos das células tumorais relacionados com o seu micro-ambiente, nomeadamente se estão a desenvolver mecanismos de resistência ao tratamento, particularmente se se verifica um aumento na expressão das referidas proteínas transportadoras. Além disso, a determinação dos níveis de expressão das proteínas, ou dos genes que as codificam, envolvidas nos mecanismos de resistência das células tumorais aos citostáticos, como por exemplo, a Pgp e a MRP (*Multidrug Resistance-associated Protein*) pode não fornecer informações acerca da dinâmica da função da bomba de efluxo associada a essas proteínas. *Bailly et al.* num estudo com células mieloblásticas provaram precisamente o que acaba de ser dito. No referido estudo, foram utilizadas células mieloblásticas em diferentes fases do processo de maturação, nomeadamente células com processo de maturação completo e células imaturas. O primeiro grupo de células apresentava elevados níveis de expressão de Pgp, contudo não transportavam substratos desta proteína. Ao invés, o grupo de células imaturas apresentava níveis mais baixos de expressão da Pgp, contudo transportavam substratos da Pgp em maior escala [3]. Com base nestes resultados, parece evidente que o principal factor para o desenvolvimento de MDR mediado pela Pgp não é a quantidade de proteína presente nas células tumorais, mas antes a sua capacidade funcional de transporte de agentes citotóxicos. Por este motivo, é vantajoso estudar a funcionalidade destas proteínas de transporte através de técnicas que permitem a avaliação *in vivo* da sua dinâmica. Isto é possível através de avaliação cintigráfica, utilizando para tal agentes radioactivos emissores simples de fótons ou emissores de positrões que marcam moléculas que constituem substratos para as referidas proteínas.

O objectivo deste trabalho é avaliar, *in vivo*, a resposta terapêutica de doentes com tumores pulmonares não operáveis (estadio IIIB e IV), através da utilização de ^{99m}Tc -sestamibi, procurando estabelecer uma relação entre a captação, retenção e eliminação deste agente por parte do tumor e a resposta à quimioterapia, tentando ainda inferir se os tumores estão a desenvolver mecanismos de MDR mediados pela Pgp ou pela MRP. Apesar de a Pgp ser o mecanismo mais bem conhecido, diversos estudos comprovaram que o ^{99m}Tc -sestamibi também constitui um substrato da MRP [4-6]. De salientar que nos tumores pulmonares pode haver sobre-expressão de ambas as proteínas. Para tal, os doentes foram sujeitos a duas avaliações, uma antes de iniciar o tratamento e outra após o terceiro ciclo quimioterapêutico. O facto de este estudo incluir apenas doentes com tumores

pulmonares em estadio não operável (IIIB e IV) e de serem necessárias duas avaliações, com um desfasamento temporal de dois a três meses, levanta sérios problemas no que diz respeito ao tamanho da amostra, dado que muitos doentes falecem antes de realizar a segunda avaliação. Por este motivo, os doentes que realizaram apenas a primeira avaliação, não serão considerados para efeitos da discussão dos resultados.

Outro problema adicional que surgiu na realização deste trabalho relaciona-se com a impossibilidade de efectuar a determinação dos níveis de expressão da Pgp e da MRP nas células tumorais, dado que a amostra de tecido retirada na biopsia foi sistematicamente muito reduzida, tendo sido utilizada na totalidade para a análise histológica do tumor, pelo que não foi possível a comparação dos níveis de expressão destas proteínas com os diversos indicadores calculados (coeficiente de captação, coeficiente de retenção, índice de retenção e taxa de eliminação). Contudo, este facto revestir-se-á de uma importância muito relativa dado que, de acordo com *Bailly et al.* os níveis de expressão destas proteínas não se relacionam com a funcionalidade das bombas de efluxo das mesmas [3]. Esta dificuldade está igualmente descrita noutros estudos realizados no âmbito dos tumores pulmonares [7,8].

ÍNDICE

RESUMO	4
ABSTRACT	5
AGRADECIMENTOS	6
PREFÁCIO	8
ÍNDICE.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS	13
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO 2 – BIOLOGIA TUMORAL	22
2.1 Introdução.....	23
2.2 Desenvolvimento Tumoral	24
2.2.1 Características das Células Tumerais.....	27
2.3 Tumores Pulmonares	29
2.3.1 Manifestações Clínicas	29
2.3.2 Anatomopatologia	30
2.2.3 Etiologia	34
2.3.4 Diagnóstico e Estadiamento.....	36
2.3.5 Tratamento.....	40
2.4 Desenvolvimento de Resistência a Múltiplos Fármacos.....	42
2.4.1 MDR provocada pela diminuição da acumulação dos fármacos nas células	45
2.4.1.1 Expressão da Pgp em tecidos e células normais.....	48
2.4.1.2 Significado da MDR mediada pela Pgp no tratamento de tumores.....	50
2.4.1.3 MDR mediada pela Multidrug Resistance-associated Protein (MRP)	53

2.4.1.4 MDR mediada pela Lung Resistance-related Protein (LRP)	55
2.4.2 Resistência mediada pelos mecanismos de desintoxicação celular	56
2.4.3 MDR mediada por alterações dos alvos dos fármacos ou pelo aumento da reparação desses alvos	56
2.4.4 MDR mediada por genes que controlam a apoptose das células tumorais	58
2.5 MDR em Tumores Pulmonares	61
2.6 Mecanismos de Localização dos Radiofármacos	62
2.7 Detecção funcional de MDR	63
2.8 Caracterização do ^{99m} Tc-sestamibi e respectiva utilização na detecção de MDR	66
 <i>CAPÍTULO 3 – DOENTES, MATERIAL e MÉTODOS</i>	 73
 <i>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS e DISCUSSÃO</i>	 79
Avaliação pré-quimioterapia	82
Avaliação posterior ao 3º ciclo de quimioterapia	87
Análise da resposta terapêutica, de acordo com as informações obtidas através da TC	91
Algumas considerações adicionais	95
 <i>CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES</i>	 102
 <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	 107
 <i>ANEXO A</i>	 118
 <i>ANEXO B</i>	 130

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH – Hormona Adrenocorticotrófica
ADN – Ácido Desoxiribonucleico
AJCC - *American Joint Committee on Cancer*
ARN – Ácido Ribonucleico
ARNm – Ácido Ribonucleico mensageiro
ATP – Adenosina Trifosfato
AVP – Arginina-vasopressina
CR – Coeficiente de Retenção
FNA – Factor Natriurético Auricular
IASLC - *International Association for the Study of Lung Cancer*
IR – Índice de Retenção
IUAC - *International Union Against Cancer*
LRP – *Lung Resistance-related Protein*
MDR – *Multidrug Resistance*
MRP – *Multidrug Resistance-associated Protein*
OMS – Organização Mundial de Saúde
PET – *Positron Emission Tomography*
Pgp – Glicoproteína P
PTH – Paratormona
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
ROI – *Region of Interest*
RT-PCR - *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*
SPECT – *Single Photon Emission Computed Tomography*
T/PC_{prec} - Coeficiente de Captação Precoce tardio (T/PC_{tard})
T/PC_{tard} - Coeficiente de Captação Tardio
TC – Tomografia Computorizada
TE – Taxa de Eliminação
TNM – Tumor, Nódulos linfáticos, Metástases

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Desde as primeiras aplicações de agentes citostáticos no tratamento de tumores que se verifica que os resultados não são tão eficazes como seriam de esperar. Acredita-se que este acontecimento se deve ao facto de as células tumorais desenvolverem mecanismos de resistência aos agentes citotóxicos, sendo esta a principal causa de insucesso no tratamento de muitos tumores. Vários mecanismos celulares podem contribuir para o desenvolvimento de MDR, sendo a sua compreensão um factor fundamental para tentar ultrapassar este problema e procurar melhorar os resultados obtidos na aplicação de citostáticos no tratamento de tumores. Alguns dos mecanismos já identificados incluem o aumento do transporte extracelular de fármacos mediado por proteínas transmembranares através de um processo dependente de energia (sob a forma de adenosina trifosfato - ATP), o aumento do processo de desintoxicação celular através do sistema da glutatona, alterações nos níveis ou na actividade de alvos dos citostáticos, como por exemplo, as topoisomerases e alterações no controlo da apoptose e nos sinais de sobrevivência celular [9]. De entre os mecanismos mencionados, o que está melhor estudado é a MDR mediada por proteínas de transporte transmembranar, particularmente a Pgp e a MRP. No âmbito da Medicina Nuclear têm sido estudados muitos tipos de tumores através da aplicação de diversas técnicas e agentes radioactivos, no sentido de procurar conhecer a dinâmica de funcionamento destas proteínas e qual a sua influência real no mecanismo de MDR e, conseqüentemente, na eficácia do tratamento com citostáticos.

Após *Muller et al.* terem observado que o ^{99m}Tc -sestamibi, um agente inicialmente desenvolvido para estudos de perfusão do miocárdio, também se acumulava em tumores pulmonares [10], inúmeros estudos se têm sucedido no âmbito da avaliação de diferentes tipos de tumores, com base não só na utilização deste agente, mas também de outros, nomeadamente, a ^{99m}Tc -tetrofosmina, a ^{99m}Tc -furifosmina e o tálio-201 (igualmente utilizados em estudos de perfusão do miocárdio). Estudos preliminares com ^{99m}Tc -sestamibi datados dos finais da década de 80 realizados *in vivo* em humanos, indicavam que havia uma diferença significativa entre a captação deste agente por parte dos tecidos normais *versus* tecidos tumorais (captação superior a 50% nos tumores), não se verificando captação deste composto em lesões benignas [10,11].

Piwnicka-Worms et al., num estudo realizado com ratos nudos, demonstraram que o ^{99m}Tc -sestamibi constitui um substrato da Pgp. Neste estudo, as células que expressavam elevados níveis do gene *MDR1* (gene que codifica a Pgp) apresentaram uma acumulação de ^{99m}Tc -sestamibi cerca de 2 a 2,5 vezes inferior comparativamente com as células com reduzida expressão do gene. No mesmo trabalho, foi efectuado um estudo cintigráfico com duplo isótopo, através da utilização

adicional de tálio-201, tendo-se observado que ambos os tipos de células acumulavam igual quantidade deste agente, reflectindo uma perfusão tumoral semelhante [12]. Num estudo efectuado com ratos nudos, foram implantadas células humanas de tumor da mama em ambos os flancos; no flanco esquerdo, as células tumorais não expressavam a Pgp, mas no direito apresentavam sober-expressão da proteína, tendo-se verificado que estas células eram cerca de 200 a 300 vezes mais resistentes à terapia com paclitaxel que as primeiras. A realização de um estudo de biodistribuição com ^{99m}Tc -sestamibi revelou que nas células que não expressavam a Pgp, a captação do radiofármaco era cerca de 2,2 a 2,5 vezes maior comparativamente com as células que expressavam [13]. Estes resultados são comparáveis aos do estudo referido anteriormente [12].

Num estudo prospectivo realizado em doentes com tumores pulmonares (20 doentes com tumor de pequenas células e 26 doentes com carcinoma escamoso) foram avaliadas a taxa de eliminação (*washout*) e a acumulação de ^{99m}Tc -sestamibi relativamente à expressão da Pgp. A expressão da proteína foi avaliada em todos os tumores por imunohistoquímica. Neste estudo, verificou-se que havia diferenças na taxa de captação do radiofármaco entre os três grupos de doentes (expressão de Pgp negativa, baixa e elevada). Pelo contrário, não foram encontradas diferenças na taxa de eliminação do ^{99m}Tc -sestamibi em todos os grupos de doentes. A taxa de eliminação foi definida como a razão entre a diferença de actividade no tumor aos 30 e aos 180 minutos e a actividade no tumor aos 30 minutos a multiplicar pelo intervalo de tempo decorrido entre a aquisição das imagens [14]. O problema deste estudo poderá estar relacionado com os tempos de aquisição das imagens, dado que o transporte do ^{99m}Tc -sestamibi mediado pela Pgp é um mecanismo relativamente rápido, sendo possível que aos 30 minutos já estivesse completo [15]. *Dirlik et al.* tiveram exactamente o mesmo problema, pois realizaram a aquisição de imagens aos 30 e 120 minutos após a administração de ^{99m}Tc -sestamibi, não tendo encontrado uma correlação entre o coeficiente de captação e o índice de retenção e a resposta à quimioterapia [16]. Um trabalho realizado por *Kao et al.* vem demonstrar o que acaba de ser dito, pois num estudo em doentes com tumores pulmonares de não pequenas células, adquiriram-se imagens aos 10 minutos após a injeção de ^{99m}Tc -sestamibi, tendo-se verificado que a relação entre a actividade tumor/tecido normal em doentes que apresentaram boa resposta à terapia com paclitaxel, era significativamente mais elevada que nos doentes cujos tumores não responderam bem à quimioterapia. Os autores sugeriram que as imagens adquiridas aos 10 minutos após a administração do radiofármaco são suficientes para prever a resposta dos tumores à quimioterapia [17]. Quando se pretende estudar a funcionalidade das proteínas transmembranares envolvidas no mecanismo de MDR, é necessário adequar os tempos de aquisição das imagens ao tipo de tumor, pois, como se pode ver através do

estudo realizado por *Kostakoglu et al.*, a dinâmica da bomba de efluxo em células de tumores pulmonares, é muito rápida. No entanto, existem outros tumores, como por exemplo os da mama, em que esta dinâmica parece ser mais lenta. *Ciarmiello et al.* testaram a hipótese de saber até que ponto a depuração (*clearance*) do ^{99m}Tc -sestamibi do tumor podia ser utilizado como um indicador da resposta terapêutica à quimioterapia neoadjuvante com epirubicina em 39 doentes com tumor da mama com extensão loco-regional. Em 17 doentes, uma rápida depuração do ^{99m}Tc -sestamibi, com uma semi-vida de depuração ($t_{1/2}$) inferior a 204 minutos, correlacionou-se com a ausência de resposta à quimioterapia, comprovado por um elevado número de células tumorais residuais na histologia. Os 8 doentes em que a depuração do ^{99m}Tc -sestamibi foi lenta ($t_{1/2} > 204$ minutos), possuíam apenas resíduos do tumor na análise histológica. Os autores sugeriram que este estudo demonstrava que uma rápida depuração do ^{99m}Tc -sestamini do tumor e, portanto, que um aumento da actividade da bomba de efluxo da Pgp se correlaciona com o insucesso da quimioterapia [18]. Num estudo realizado em 30 doentes com tumores malignos do osso e tecidos moles, observou-se uma elevada captação de ^{99m}Tc -sestamibi em 24 doentes, 15 minutos após a injeção. Nestes, as imagens precoces não mostraram diferenças significativas na perfusão e na taxa de captação entre tumores com elevada ou reduzida expressão de Pgp. Pelo contrário, as imagens tardias (adquiridas 3 horas após a administração do radiofármaco) mostraram uma captação significativamente menor e uma taxa de eliminação aumentada nos tumores com sobre-expressão da Pgp [19]. Num grupo de 16 doentes com tumores cerebrais não tratados, a taxa de captação inicial de ^{99m}Tc -sestamibi mostrou uma correlação significativa com o grau de malignidade (mesmo na ausência de níveis detectáveis de Pgp), tendo esta captação diminuído nas imagens tardias [20]. Tendo em conta estes estudos, surge a dúvida sobre qual será o tempo óptimo para proceder à aquisição de imagens de modo a estudar o desenvolvimento de MDR na prática clínica e distinguir os tumores sensíveis dos resistentes aos citostáticos. *Del Vecchio et al.* sugerem que a captação do radiofármaco na fase tardia deve ser avaliada e comparada com a captação numa fase precoce, para ser possível aceder à função da bomba da Pgp. Nesse sentido, segundo os mesmos autores (e apesar de até à data não existir nenhum estudo que tenha avaliado o tempo óptimo para efectuar a aquisição de imagens), as primeiras imagens devem ser adquiridas aos 10 minutos e as imagens tardias aos 120 minutos após a administração do radiofármaco [21]. Por outro lado, *Piwnica-Worms et al.* num estudo realizado *in vitro* com tumores de diversas linhagens celulares, verificaram que o ^{99m}Tc -sestamibi atingia o pico de acumulação no interior das células num período de 15 minutos, mantendo uma retenção estável por um período de 2 horas. O nível máximo de captação do radiofármaco relacionava-se

inversamente com a expressão da Pgp, facto consistente com o aumento da extrusão celular do agente [22].

Consoante já foi referido anteriormente (e será explicado em maior detalhe no capítulo 2), alterações no controlo da apoptose celular também podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de MDR. Estas alterações podem ser igualmente estudadas através de técnicas cintigráficas, com a utilização de ^{99m}Tc -sestamibi. Uma vez que este radiofármaco se localiza na mitocôndria e tendo em conta que estes organelos desempenham um papel fulcral na apoptose através da integração de sinais de morte pelos membros da família Bcl-2, a captação inicial de ^{99m}Tc -sestamibi pode ser afectada por alterações nas vias de apoptose celular [23]. *Del Vecchio et al.* determinaram o coeficiente de captação do ^{99m}Tc -sestamibi em 33 doentes com tumores da mama 10 minutos após a injeção, tendo encontrado uma correlação inversa entre o coeficiente de captação aos 10 minutos e a expressão da Bcl-2 [24]. Estes autores sugerem que a captação inicial do ^{99m}Tc -sestamibi em tumores da mama é afectado pelos níveis de Bcl-2. Elevados níveis desta proteína, apesar da estabilização dos potenciais da membrana mitocondrial, podem prevenir a permeabilização desta membrana e, consequentemente, a acumulação de ^{99m}Tc -sestamibi nas células tumorais [23].

Outra vertente deste tipo de estudos consiste na avaliação de antagonistas que podem potencialmente inibir a função da Pgp, contribuindo para o desenvolvimento de novos agentes. Além disso, a avaliação funcional do estado da bomba de efluxo da Pgp, poderá ajudar a seleccionar os doentes que, eventualmente beneficiarão da inclusão de um inibidor no regime quimioterapêutico. *Luker et al.* avaliaram a expressão da Pgp em órgãos normais como o fígado e os rins (órgãos conhecidos por expressarem Pgp), através do uso de ^{99m}Tc -sestamibi, antes e após o tratamento com vaslapodar, tendo verificado que ocorreu uma rápida depuração do radiofármaco do fígado e dos rins, relativamente ao coração, em condições basais. Após a administração do inibidor da Pgp, verificou-se uma retenção selectiva do ^{99m}Tc -sestamibi no fígado e nos rins [25]. *Tatsumi et al.* testaram um novo inibidor da Pgp (MS-209) em ratos, tendo verificado que este agente conduzia a um aumento da acumulação de ^{99m}Tc -sestamibi nos tumores que expressavam esta proteína. Estes autores sugerem que a administração de MS-209 antes da quimioterapia e a aquisição de imagens com ^{99m}Tc -sestamibi pode ajudar a definir o esquema de tratamento em doentes com tumores resistentes à quimioterapia [26].

Apesar do ^{99m}Tc -sestamibi ser o radiofármaco mais amplamente utilizado e clinicamente validado para este tipo de estudos, a utilização de outros agentes já referidos anteriormente, também é possível. À semelhança do ^{99m}Tc -sestamibi, a ^{99m}Tc -tetrofosmina também é um composto lipofílico catiónico, constituindo por isso, um substrato para a Pgp [27]. Existem alguns trabalhos

publicados que tiveram por base a utilização deste agente. Um estudo realizado *in vitro* com células de tumor gástrico e da mama revelou que, à semelhança do ^{99m}Tc -sestamibi, a captação da ^{99m}Tc -tetrofosmina é menor nas células resistentes. Após a adição de verapamil, a acumulação deste radiofármaco aumentou apenas neste grupo de células [28]. *Utsunomiya et al.* compararam, *in vitro*, a acumulação e a cinética de efluxo do ^{99m}Tc -sestamibi e da ^{99m}Tc -tetrofosmina numa linha de células de carcinoma da nasofaringe, tendo verificado que ambos os radiofármacos apresentaram taxas de acumulação e de efluxo similares; contudo, a captação máxima de ^{99m}Tc -sestamibi foi cerca de duas vezes superior comparativamente com a de ^{99m}Tc -tetrofosmina [29]. Estes resultados são comparáveis aos obtidos por *Ballinger et al.* que observaram uma acumulação substancialmente maior do ^{99m}Tc -sestamibi em comparação com a ^{99m}Tc -tetrofosmina em células de tumor da mama com sobre-expressão da Pgp [27]. Resultados semelhantes foram obtidos por *Yeh et al.* em doentes com tumores pulmonares de pequenas células [30]. Existe ainda uma série de outros trabalhos no âmbito de diversos tumores que tiveram por base a utilização da ^{99m}Tc -tetrofosmina para avaliar a resposta terapêutica desses tumores [31-33].

Outro agente que tem sido utilizado no diagnóstico de patologias oncológicas e, em menor extensão, na avaliação da resposta terapêutica é o tálio-201. Este radiofármaco, originalmente desenvolvido para estudos de perfusão do miocárdio, é um análogo do ião potássio e como tal, entra nas células por transporte activo, via bomba $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$. Alguns autores sugerem que este agente é um bom indicador da viabilidade tumoral, mas a sua utilização na avaliação da resposta à terapia em tumores pulmonares ainda não está clinicamente validada [34]. Contudo, existem estudos a demonstrar a sua utilidade neste contexto. *Tokuchi et al.* utilizaram tálio-201 para clarificar a relação entre a sua captação e a resposta à quimioterapia com derivados da platina numa amostra de 21 doentes com tumores pulmonares de pequenas células, tendo concluído que este radiofármaco é um bom indicador da resposta destes tumores à terapia com derivados da platina [35]. Num estudo comparativo entre o tálio-201 e o ^{99m}Tc -sestamibi na avaliação da resposta à quimioterapia de tumores pulmonares de pequenas células, *Yamamoto et al.* verificaram a superioridade do ^{99m}Tc -sestamibi neste contexto, dado não terem encontrado uma correlação entre a razão da actividade tumor/pulmão normal e a resposta à terapia quando utilizaram o tálio-201 [36]. Os mesmos resultados foram obtidos por *Nishiyama et al.* na avaliação da resposta à radioterapia em doentes com tumores pulmonares de não pequenas células [8]. Além das características biológicas apontadas nestes estudos, o tálio-201 apresenta características físicas menos favoráveis comparativamente com os agentes tecneciados, pelo que a sua utilização como agente imagiológico tem vindo a diminuir.

Num estudo realizado em células em cultura e em ratos, *Bernard et al.* compararam o ^{99m}Tc -sestamibi, a ^{99m}Tc -tetrofosmina e a ^{99m}Tc -furifosmina, tendo observado que o primeiro apresentava uma maior captação por parte das células tumorais, seguido da ^{99m}Tc -tetrofosmina e da ^{99m}Tc -furifosmina. Relativamente à relação de actividade tumor/*pool* sanguíneo (parâmetro avaliado às 4 horas após a injeção), o agente que apresentou a razão mais elevada foi o ^{99m}Tc -sestamibi (18,6), seguido pela ^{99m}Tc -tetrofosmina (1,49) e finalmente pela ^{99m}Tc -furifosmina (1,34). Estes autores concluíram que o ^{99m}Tc -sestamibi parece ser o agente mais adequado para a avaliação de tumores *in vivo* [37]. No presente trabalho, optou-se pela utilização do ^{99m}Tc -sestamibi, o que vem de encontro com a opinião dos autores que efectuaram estudos comparativos entre os agentes disponíveis para a avaliação de tumores *in vivo* [8,29,36,37].

Hoje em dia não faz sentido falar de Oncologia sem abordar a técnica de aquisição de imagens com radiofármacos emissores de positrões (designada por PET – *Positron Emission Tomography*), pelo que será apresentada aqui apenas uma breve referência. Esta técnica tem vindo a ganhar importância crescente, uma vez que permite avaliar a taxa metabólica quer de tecidos normais, quer de tecidos patológicos, nomeadamente através da utilização de radiotraçadores como o carbono-11 e o flúor-18. No estudo de tumores, a fluordesoxiglucose marcada com flúor-18 (^{18}F -FDG) é avidamente captada pelas células tumorais, dado que estas consomem uma elevada quantidade de glucose como fonte de energia (devido ao aumento da taxa metabólica característica destas células). A captação de FDG reflecte aspectos como a diferenciação celular, o potencial proliferativo, a agressividade e o prognóstico em doentes com tumores pulmonares [38]. No âmbito dos tumores pulmonares, a técnica FDG-PET tem tido um papel fundamental no esclarecimento de questões que surgem em quatro etapas principais, nomeadamente, no diagnóstico, permitindo diferenciar a natureza de lesões únicas com padrão em forma de moeda, no estadiamento, permitindo detectar com precisão nódulos hilares e mediastínicos (que constitui uma grande limitação das técnicas convencionalmente utilizadas, como por exemplo, a TC), no re-estadiamento, através da avaliação de tumores recidivantes, de nódulos linfáticos ou de metástases à distância e, finalmente na avaliação da resposta dos tumores à terapia, permitindo identificar alterações metabólicas nos tumores durante o tratamento [39]. Até ao presente, a ^{18}F -FDG tem sido o radiofármaco mais utilizado para a avaliação de tumores em PET, no entanto, em alguns casos, este agente pode apresentar uma especificidade relativamente baixa [39]. Por este motivo, estão a ser desenvolvidos outros radiofármacos marcados com carbono-11, que ao marcar aminoácidos, poderão apresentar maior especificidade e sensibilidade (particularmente, nos casos de tumores com crescimento lento e que apresentam uma taxa metabólica de glucose muito reduzida). *Higashi*

et al. realizaram um estudo comparativo entre o ^{11}C -acetato, a ^{18}F -FDG e o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi na avaliação de tumores pulmonares, tendo verificado a superioridade da ^{18}F -FDG não só na identificação destes tumores, mas também na determinação do seu grau de malignidade (o ^{11}C -acetato e o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi não reflectem o grau de malignidade dos tumores) [38]. No âmbito dos estudos de MDR em PET, têm sido realizados trabalhos, *in vitro*, com citostáticos e inibidores da Pgp, normalmente utilizados em quimioterapia, marcados com emissores de positrões, particularmente o carbono-11. *Elsinga et al.* estudaram a função da Pgp *in vitro* com ^{11}C -daunorubicina (citostático substrato da Pgp) e ^{11}C -verapamil (inibidor da Pgp), tendo verificado que a acumulação destes agentes foi, respectivamente, cerca de 16 e 5 vezes maior nas células sem expressão de Pgp que nas células que apresentavam sobre-expressão da proteína. Por outro lado, nestas células, a acumulação de ^{11}C -daunorubicina aumentou após a adição de verapamil [40].

Após uma revisão sobre alguns dos trabalhos desenvolvidos anteriormente no âmbito do estudo de tumores, particularmente os pulmonares, e a sua resposta aos tratamentos quimioterapêuticos, de seguida, far-se-á uma breve apresentação dos restantes capítulos deste trabalho. O capítulo 2, sob a designação de biologia tumoral, inicia com a explicação do desenvolvimento da patologia tumoral e as características gerais das células malignas, particularizando depois para o caso dos tumores pulmonares (estatística associada, manifestações clínicas, etiologia, classificação e tratamento). Ainda neste capítulo será abordada a questão da MDR, nomeadamente, quais os principais mecanismos de MDR, a sua detecção funcional e o desenvolvimento deste fenótipo em tumores pulmonares. Além disso, será apresentada a relação entre a avaliação de MDR em tumores e os princípios subjacentes à utilização de radiofármacos, particularmente o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi para esse fim. O capítulo termina com a caracterização do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi. No capítulo 3, serão caracterizados os doentes incluídos neste estudo, bem como o material e os métodos utilizados e no capítulo seguinte serão apresentados os resultados obtidos e a respectiva análise. Finalmente, no capítulo 5 serão apresentadas as conclusões e as limitações deste trabalho. Em anexo inclui-se a descrição dos procedimentos que foi necessário realizar previamente aos estudos clínicos com doentes, nomeadamente a preparação e controlo de qualidade do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi (Anexo A) e o controlo de qualidade da câmara gama (Anexo B).

CAPÍTULO 2

BIOLOGIA TUMORAL

2.1 Introdução

A patologia tumoral maligna resulta de uma falha nos mecanismos de regulação responsáveis pelo comportamento metabólico celular normal. Todos os anos, são diagnosticados dez milhões de novos casos em todo o mundo, causando a morte a cerca de cinco milhões de pessoas, fazendo desta patologia a segunda causa de morte nos países desenvolvidos (sendo a primeira devida a doenças cardiovasculares, como ilustra a figura 2.1). Existe mais de uma centena de diferentes tipos de tumores, sendo os mais comuns o do pulmão e cólon, responsáveis por 40% dos óbitos devidos a patologias oncológicas [41-43].

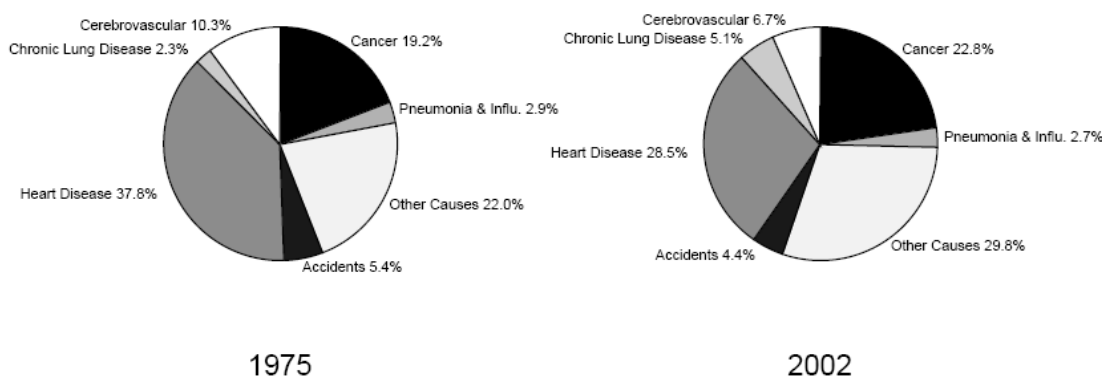


Figura 2.1 – Principais causas de morte, em percentagem, nos Estados Unidos em 1975 *versus* 2002

Fonte: Cancer Facts and Figures – 2005. American Cancer Society (ACS) 2005

A proliferação, diferenciação e a sobrevivência de células individuais nos organismos são processos finamente regulados no sentido de responder às necessidades do organismo como um todo. Nas células tumorais, este tipo de regulação perdeu-se e por isso crescem e dividem-se de forma descontrolada. De facto, a proliferação contínua e descontrolada das células tumorais constitui o factor fundamental para o desenvolvimento de patologias oncológicas. Este tipo de células em vez de responder apropriadamente aos sinais que controlam o comportamento celular normal, crescem e dividem-se de forma descontrolada, invadindo células e tecidos normais, podendo mesmo dispersar-se pelo organismo. O crescimento descontrolado que estas células apresentam é o resultado de anomalias em vários sistemas de regulação celular, sendo reflectido em diversos aspectos do seu comportamento celular, que é distinto do comportamento apresentado pelas células normais. Existem centenas de tipos de tumores cujo comportamento e resposta ao tratamento são variáveis.

O aspecto mais importante em termos de patologia tumoral é a distinção entre tumor benigno e maligno. O tumor benigno fica confinado ao seu local de origem, ou seja, não invade os tecidos normais circundantes, nem se dispersa para locais distantes do organismo. O tumor maligno poderá invadir não só os tecidos normais circundantes, como também dispersar-se para locais distantes do de origem através dos sistemas circulatório e linfático, originando metástases [42,45-47].

2.2 Desenvolvimento Tumoral

Uma das características mais importantes quando se fala de patologia oncológica é a clonalidade tumoral, ou seja, o desenvolvimento de tumores a partir de uma única célula que começa por apresentar uma proliferação anormal. O desenvolvimento de tumores constitui uma doença genética, cuja expressão ocorre ao nível celular, devido a alterações na cadeia do ácido desoxirribonucleico (ADN). A maioria dessas alterações envolve modificações sequenciais no ADN (ou seja, mutações), erros de replicação aleatórios, erros no processo de reparação da cadeia de ADN e exposição a agentes carcinogêneos (como por exemplo, radiação e alguns agentes químicos). Apesar de alguns tipos de tumores serem hereditários, a maior parte das mutações ocorre em células somáticas. Alguns indivíduos com patologia oncológica herdaram uma mutação na linhagem germinativa que os predispõe para a doença, mas mesmo assim serão necessárias mutações somáticas adicionais para que um tumor se desenvolva. De um modo geral, uma lesão num gene não é suficiente para induzir uma transformação neoplásica de uma célula. O fenótipo maligno só é adquirido após várias mutações (geralmente cinco a dez) que se desenvolvem durante anos. Uma alteração genética pode dar origem a alterações fenotípicas que se manifestam por exemplo, sob a forma de hiperplasia em tecidos epiteliais, que podem evoluir para adenoma e deste para displasia, que por sua vez pode transformar-se em carcinoma *in situ* que, em última análise, dá origem a um carcinoma invasivo (figura 2.2) [42,45-47].

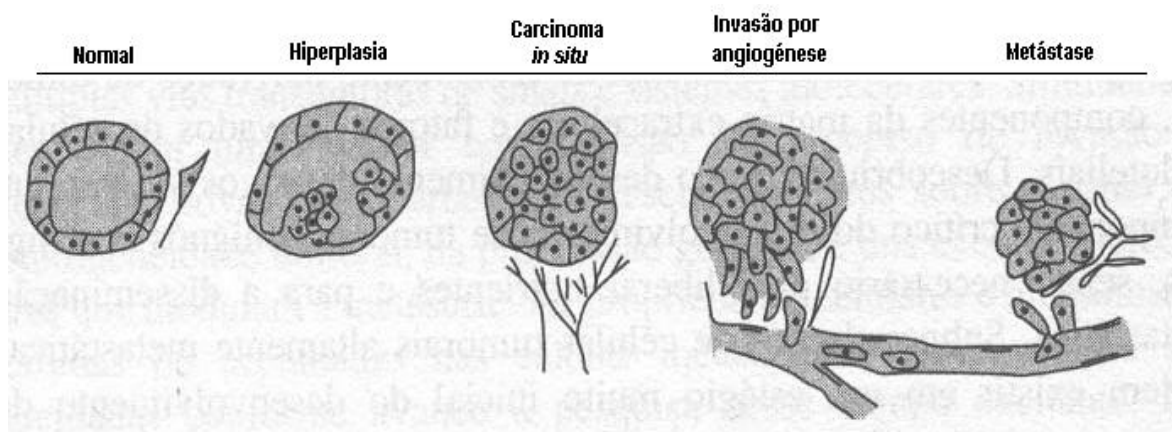


Figura 2.2 – Evolução fenotípica de uma alteração genética.

Fonte: <http://klinik.uni-frankfurt.de/tumorzentrum/>

Os genes que promovem o crescimento celular normal são designados de proto-oncogenes e a sua activação por mutação, amplificação ou desregulação, converte-os em oncogenes. Os genes que restringem o crescimento são designados como genes supressores tumorais. A consequência da perda de função destes genes é a proliferação celular descontrolada. A natureza diplóide das células dos mamíferos permite prever as consequências de mutações somáticas nos genes supressores tumorais. Não é de prever que, na maioria dos casos, a perda de um alelo tenha consequências significativas, dado que o alelo que resta será suficiente para manter a função dentro da normalidade. Além dos oncogenes e dos genes supressores tumorais, existe uma outra categoria de genes que poderão contribuir para o aparecimento de neoplasias malignas, nomeadamente os genes responsáveis pelos processos de reparação do ADN. Os processos de reparação são essenciais para proteger a integridade do genoma, uma vez que cada divisão celular implica a cópia de seis biliões de pares de bases de ADN. Assim, quando os sistemas de reparação não funcionam adequadamente devido a uma mutação (hereditária ou adquirida), a taxa de acumulação de mutações através do genoma aumenta à medida que ocorrem as divisões celulares. Deste modo, a probabilidade de aparecimento de neoplasias malignas aumenta de acordo com a extensão em que essas mutações envolvem oncogenes e genes supressores tumorais [42,45].

A origem clonal dos tumores não implica que a célula que dá origem ao tumor possua inicialmente todas as características das células tumorais. Bem pelo contrário, já que o desenvolvimento tumoral é um processo que ocorre por etapas, no qual as células vão, gradualmente adquirindo características malignas através de uma série de alterações sucessivas. Uma indicação do que acaba de ser dito é que grande parte dos tumores se manifesta em idades mais avançadas (cerca de dois terços dos casos ocorrem em pessoas com mais de 65 anos). A

probabilidade de desenvolver patologias oncológicas depende da idade: assim, desde o nascimento até aos 39 anos de idade, 1 em cada 58 homens e 1 em cada 52 mulheres irão desenvolver um tumor; entre os 40 e os 59 anos, a probabilidade será de 1 em cada 13 homens e 1 em cada 11 mulheres; dos 60 aos 79 anos, a doença manifestar-se-á em 1 em cada 3 homens e 1 em cada 4 mulheres. Este aumento enorme na incidência de patologias oncológicas com o avançar da idade sugere que a maioria dos tumores é o resultado de diversas anomalias que ocorrem e se desenvolvem ao longo de vários anos [45].

Ao nível celular, o desenvolvimento tumoral é um processo que se desenrola por etapas, durante as quais ocorrem processos de mutação e selecção celular, favorecendo as células que apresentam melhor capacidade de proliferação, sobrevivência, invasão e metastização. As principais etapas do desenvolvimento tumoral são: iniciação tumoral e progressão tumoral. Pensa-se que a primeira etapa (início do tumor) é o resultado de alterações genéticas que conduzem à proliferação anormal de uma célula. Esta proliferação conduz a um aumento da população de células tumorais, por clonagem celular. Na segunda etapa (progressão do tumor), ocorrem mutações adicionais nas células tumorais. De notar que estas mutações conferem vantagens selectivas às células, como por exemplo, um crescimento mais rápido, sendo que as descendentes de uma célula que sofreu este tipo de mutação tornar-se-á dominante na população de células do tumor. Este processo designa-se por selecção clonal, uma vez que um novo clone de células tumorais surgiu com base na sua taxa de crescimento aumentada ou noutras características (como por exemplo, a sobrevivência, a invasão ou a metastização) que lhes confere vantagens selectivas. A selecção clonal continua à medida que o tumor se vai desenvolvendo, por isso, as células tumorais vão crescendo mais rapidamente, sendo a sua malignidade também crescente [45,47].

O aparecimento de tumores é mais comum nos tecidos com renovação mais rápida, nos quais as células se dividem com maior frequência, como por exemplo os tecidos da pele, medula óssea e intestino. Nos tecidos com baixa taxa de renovação, o aparecimento de neoplasias é muito raro (miócitos, por exemplo). Uma rápida taxa de renovação, associada à exposição a agentes carcinogêneos e proliferação hormonalmente regulada, aumenta a probabilidade de ocorrência de danos ao nível genético. As alterações genéticas mais comuns envolvem a activação de proto-oncogenes ou a inactivação de genes supressores tumorais.

2.2.1 Características das Células Tumorais

Consoante já foi dito, o crescimento descontrolado das células tumorais é o resultado de múltiplas anomalias que afectam os mecanismos de regulação celular e que se reflectem em diversos aspectos do seu comportamento, distinguindo-as das células normais. Com efeito, a proliferação descontrolada das células tumorais *in vivo* é muito semelhante ao seu comportamento em meio de cultura. Uma distinção fundamental que é possível fazer entre as células tumorais e as células normais, é que nestas últimas, a inibição da proliferação celular é dependente da densidade celular. As células normais proliferam até atingir uma densidade celular finita, que é parcialmente determinada pela disponibilidade de factores de crescimento no meio de cultura. Deste modo, as células terminam o processo de proliferação, tornando-se inactivas na fase G_0 do ciclo celular. Pelo contrário, a proliferação da maioria das células tumorais não é dependente da densidade celular. Em vez de reponderem aos sinais que conduzem à cessação da proliferação celular e entrar na fase G_0 (fase em que as células apesar de permanecerem metabolicamente activas, não se replicam, a não ser que recebam sinais extracelulares adequados), as células tumorais continuam a crescer mesmo na presença de elevada densidade celular [42,45,47].

Uma outra diferença entre as células normais e as tumorais diz respeito ao facto de estas apresentarem necessidades menores de factores de crescimento extracelulares, resultando necessariamente numa proliferação celular descontrolada. Em alguns tipos de células, a disponibilidade de factor de crescimento constitui o principal determinante para a sua capacidade proliferativa. A necessidade de factor de crescimento está directamente relacionada com o fenómeno de inibição dependente da densidade, uma vez que a densidade à qual as células se tornam inactivas, é directamente proporcional à concentração de factor de crescimento [45].

Além disso, a necessidade de factor de crescimento por parte de muitas células tumorais são mais reduzidas comparativamente com as células normais, facto que também contribui para a proliferação tumoral. Em alguns casos, as células tumorais produzem factores de crescimento que estimulam a própria proliferação. Esta produção anormal de factor de crescimento conduz à estimulação contínua da divisão celular (estimulação de crescimento autócrina) e a uma menor dependência de factores de crescimento provenientes das fontes fisiológicas normais [45,47].

As células tumorais apresentam uma regulação menos restrita que as células normais para as interacções célula-célula e célula-matriz. A maior parte das células tumorais apresentam menor aderência que as células normais, muitas vezes resultado da expressão reduzida de moléculas de

adesão na superfície celular. Consequentemente, a interação das células tumorais com outras células ou componentes tecidulares é menor, contribuindo para que as células malignas invadam e metastizem noutros tecidos. A menor aderência das células tumorais também provoca alterações morfológicas: muitas são mais arredondadas que o normal, em parte porque estão menos ligadas quer à matriz extracelular, quer às células vizinhas [45,47].

Outra característica das células tumorais que afecta a sua interacção com as outras células, promovendo a invasão e metastização é que estas geralmente segregam proteases que digerem os componentes da matriz extracelular, permitindo a invasão dos tecidos normais adjacentes. Por exemplo, a secreção de collagenase parece desempenhar um importante papel na capacidade dos carcinomas (tumores das células epiteliais) digerirem e penetrarem através da lâmina basal para invadir o tecido conjuntivo subjacente [45,47].

Por outro lado, as células tumorais segregam factores de crescimento que promovem a formação de novos vasos sanguíneos – angiogénese. A formação destes novos vasos é necessária nos casos de tumores com cerca de um milhão de células ou mais para suprir as necessidades de oxigénio e nutrientes das células tumorais em proliferação. A formação destes novos vasos é importante não só no crescimento do próprio tumor, mas também na sua metastização, já que os novos vasos são facilmente penetrados pelas células tumorais, criando uma via de entrada no sistema circulatório [45,47].

Outra característica que pode ser atribuída às células tumorais é que elas não se diferenciam completamente. Esta característica também está relacionada com a proliferação anormal por parte destas células, pois contrariamente às células normais que se diferenciam completamente e não se dividem mais, aquelas ficam bloqueadas em estadios precoces do processo de diferenciação, facto que é consistente com a sua proliferação contínua.

A apoptose (ou morte celular programada) é a etapa final do processo de diferenciação de muitos tipos de células. Muitas células tumorais não atingem esta etapa, pelo que têm uma sobrevida superior às células normais. Como é óbvio, o facto de não sofrerem morte celular programada contribui significativamente para o desenvolvimento tumoral. A sobrevivência de muitas células normais está dependente dos sinais dos factores de crescimento ou da matriz extracelular que previne a apoptose. No entanto, as células tumorais por vezes podem sobreviver mesmo na ausência dos factores de crescimento que as células normais necessitam. O facto de algumas células tumorais não sofrerem apoptose mesmo na presença de sinais ambientais celulares normais, pode ser um aspecto importante não só para o desenvolvimento de tumores primários, mas também para a sobrevivência e para o crescimento de células metastáticas. Além disso, quando há danos na

cadeia de ADN, as células normais sofrem apoptose, ao contrário de algumas células tumorais, o que contribui para a sua resistência à quimio e à radioterapia.

2.3 Tumores Pulmonares

Os tumores pulmonares constituem a principal causa de morte por patologia oncológica nos Estados Unidos (EUA), quer em homens, quer em mulheres, provocando mais mortes que os tumores da mama, próstata, cólon e pâncreas combinados: cerca de 85% dos doentes que desenvolvem tumores pulmonares, morrem devido à doença [43]. Prevê-se que até ao final do ano de 2005 tenham sido diagnosticados cerca de 172 570 novos casos de tumores pulmonares nos EUA, provocando a morte a cerca de 163 510 pessoas [41,43,44,47-50]. A maior incidência desta doença ocorre entre os 55 e os 65 anos de idade. Na altura do diagnóstico, apenas 15% dos doentes apresentam doença localizada, em cerca de 25% dos casos, já há disseminação para gânglios linfáticos regionais e mais de 55% dos doentes apresentam metástases à distância. De um modo geral, a neoplasia pulmonar maligna é uma doença com mau prognóstico, dado que, mesmo nos doentes com doença localizada, a taxa de sobrevivência em cinco anos é de apenas 48%, enquanto que nos que apresentam doença regional, este valor desce para 18% [42-44,47-49].

2.3.1 Manifestações Clínicas

Os tumores pulmonares originam sintomas provocados pelo crescimento tumoral local, invasão ou obstrução de estruturas adjacentes, desenvolvimento em nódulos linfáticos regionais (devido a disseminação linfática), desenvolvimento em locais distantes do de origem (metastização por via hematogénea) ou efeitos remotos (síndrome paraneoplásico). Estes últimos são o resultado da secreção de hormonas peptídicas por parte do tumor ou de reacções imunitárias cruzadas entre o tumor e os antígenos tecidulares normais [47].

Apesar de cerca de 5 a 15% dos doentes serem diagnosticados sem apresentarem qualquer sintoma (geralmente através de uma radiografia torácica de rotina), a maioria já apresenta sintomas

na altura do diagnóstico. Alguns dos sinais e sintomas secundários ao crescimento central ou endobrônquico do tumor primário são: tosse, hemoptise, dispneia, sibilos e estridor. Quando o tumor se desenvolve numa posição mais periférica, os sinais e sintomas a ele associado incluem dor (devido ao comprometimento pleural ou da parede torácica), tosse, dispneia e sintomas de abscesso pulmonar resultante de cavitação tumoral. Os sinais e sintomas associados à disseminação regional do tumor no tórax (por crescimento contíguo ou metastização para nódulos linfáticos regionais) incluem obstrução traqueal, compressão esofágica com disfagia, paralisia do nervo faríngeo recorrente e com rouquidão, paralisia do nervo frénico com elevação do hemidiafragma e dispneia, síndrome da veia cava superior (devido a obstrução vascular), arritmia ou insuficiência cardíaca, obstrução linfática (com consequente derrame pleural e disseminação linfangítica através dos pulmões, com hipoxemia e dispneia) [47].

À necropsia, detectam-se metástases extra-torácicas em mais de 50% dos doentes com carcinoma epidermóide e em mais de 95% dos doentes com tumores de pequenas células. Estas metástases com origem em tumores pulmonares são encontradas praticamente em todos os órgãos. É por este motivo que muitos dos doentes com tumores pulmonares acabam por precisar de terapias paliativas, dado o grau de metastização e consequentes problemas secundários. Alguns dos problemas clínicos mais comuns são a metastização cerebral (que provoca *deficits* neurológicos), metastização óssea (que origina dores e fracturas patológicas), invasão da medula óssea (originando citopenias), metastização hepática (que provoca disfunções na bioquímica hepática, obstrução biliar e dor), metastização para os nódulos linfáticos da região supraclavicular e, por vezes, para as regiões axilar e inguinal. Também é possível observar manifestações sistémicas de anorexia, perda de peso (que ocorre em cerca de 30% dos doentes), febre e imunossupressão nos doentes com tumores pulmonares [47].

2.3.2 Anatomopatologia

Os sistemas de classificação constituem os alicerces para o diagnóstico e posteriores decisões terapêuticas relativos aos tumores. O sistema de classificação de tumores pulmonares criado pela Organização Mundial de Saúde (OMS ou *WHO - World Health Organization*) actualmente utilizado entrou em vigor em 1999, vindo substituir a versão anterior que datava de 1981. Esta versão actualizada é fruto da colaboração entre a OMS e a Associação Internacional para o Estudo

de Tumores Pulmonares (*International Association for the Study of Lung Cancer – IASLC*), sendo por isso designada de *WHO/IASLC Histological Classification of Lung and Pleural Tumours*. As principais diferenças entre esta versão e a anterior dizem respeito à criação de duas subcategorias adicionais na categoria principal de lesões pré-invasivas: além da displasia escamosa/carcinoma *in situ* (subcategoria já existente), foram criadas as seguintes categorias: hiperplasia adenomatosa atípica e hiperplasia idiopática difusa das células pulmonares neuroendócrinas. Outra alteração diz respeito à subclassificação de adenocarcinoma: a definição de carcinoma bronquioloalveolar restringe-se aos tumores não invasivos. À categoria de carcinoma de grandes células foram adicionadas diversas variantes, nomeadamente carcinoma neuroendócrino de grandes células e carcinoma basalóide, caracterizados por apresentarem mau prognóstico [51].

Em termos patológicos, a classificação proposta pela OMS identifica quatro principais tipos de tumores pulmonares: o adenocarcinoma, o carcinoma escamoso, o tumor de grandes células e o tumor de pequenas células [39,47,48,51]. Os três primeiros tipos são muitas vezes classificados em conjunto sob a designação geral de tumor de não pequenas células, uma vez que as abordagens de diagnóstico, de estadiamento, de prognóstico e tratamento são muito semelhantes. Por este motivo, é comum fazer a distinção de dois grandes tipos histológicos de neoplasias malignas do epitélio pulmonar: tumor de pequenas células (que inclui os subtipos: tumor de pequenas células, mistura de tumor de pequenas células e de grandes células e tumor de pequenas células combinado com componentes neoplásicos escamosos e/ou glandulares) e tumor de não pequenas células (neste grupo estão incluídos o carcinoma epidermóide ou carcinoma escamoso, o adenocarcinoma, o tumor de grandes células, o tumor adenoescamoso, os tumores com elementos pleomórficos e sarcomatóides e os tumores carcinóides) [39,47-51]. Os tumores de pequenas células representam cerca de 20% dos tumores pulmonares, sendo de um modo geral, tumores mais agressivos que os tumores de não pequenas células, devido ao seu crescimento mais rápido e metastização para outros órgãos. Os tumores de não pequenas células são os mais comuns, representando cerca de 80% dos tumores pulmonares. De um modo geral, apresentam um crescimento mais lento que os tumores de pequenas células [47].

Os tumores pulmonares também podem ser divididos de acordo com o local onde se desenvolvem. Deste modo, é possível distinguir as formas hilares ou centrais (que correspondem a cerca de 70% de todos os tumores) e as formas periféricas [39]. O carcinoma escamoso desenvolve-se sempre a partir do hilo. Inicia-se sob a forma de metaplasia escamosa que progride para vários graus de displasia. Depois, evolui para carcinoma *in situ*, e quando há invasão da membrana basal, transforma-se num tumor invasivo. No interior dos brônquios, apresenta um padrão de crescimento

intraluminal. Este tipo de tumor tem tendência a metastizar localmente e mais tardiamente comparativamente com os outros tipos histológicos. Na altura do diagnóstico, 50% dos casos apresentam apenas invasão intratorácica [39,48,51]. O adenocarcinoma é o tipo de tumor mais comum em muitos países. A nova classificação *WHO/IASL* é mais restritiva quanto à definição deste tipo de tumor, limitando-a apenas aos tipos não invasivos. De um modo geral, o adenocarcinoma localiza-se perifericamente, estando por vezes, associado a zonas cicatriciais. Histologicamente é constituído por elementos glandulares produtores de mucina. Na altura do diagnóstico, é frequente a existência de metástases à distância, sendo o seu prognóstico pior que o carcinoma escamoso [39,48]. O tumor de grandes células é o tipo histológico menos frequente, com uma frequência relativa de 15% de todos os tumores de não pequenas células. Caracteriza-se por apresentar células poligonais de grandes dimensões, com um núcleo vesicular. Os tumores de grandes células, normalmente têm origem periférica, com localização subpleural. Têm tendência a invadir o tecido pulmonar e o espaço pleural, não atingindo os brônquios. À semelhança do adenocarcinoma, o prognóstico associado a este tipo de tumores é, geralmente, mau [39,48]. O tumor de pequenas células, representa cerca de 20 a 25% dos tumores pulmonares e, como o próprio nome indica, é constituído por células de pequenas dimensões, com pouco citoplasma. O tumor desenvolve-se em grupos de células, normalmente a partir do hilo ou do mediastino [39,49-51].

O quadro 2.1 resume as principais diferenças entre os tumores de pequenas células e os tumores de não pequenas células.

Quadro 2.1 – Comparação entre tumores de pequenas células e tumores de não pequenas células

	Tumor de pequenas células	Tumor de não pequenas células
Histologia	Citoplasma escasso; Núcleos pequenos hiper cromáticos, com cromatina de padrão fino; Nucléolos indistintos;	Citoplasma abundante; Núcleos pleomórficos, com padrão de cromatina espessa; Predominância de nucléolos; Arquitetura glandular ou escamosa.
Propriedades neuroendócrinas gerais Grânulos de cerne denso Actividade da L-dopa descarboxilase Cromogranina Sinaptofisina Enolase neuroespecífica Isoenzima BB da creatinocinase Antígenos CD56 e CD57	Presente Elevada Presente Presente Elevada Elevada Presentes	Ausente Ausente Ausente Ausente Reduzida Reduzida Ausentes
Produção de hormona peptídica Produtos peptídicos génicos secretores de gastrina Outros neuropéptidos	Presentes ACTH, AVP, FNA, calcitonina	Ausentes PTH
Outros marcadores HLA, β_2 -microglobulina Neurofilamentos Receptores de opióides Receptores nicotínicos Mucina Proteínas associadas ao surfactante Antigénio carcinoembrionário	Reduzida ou ausente Presentes Presentes Presentes Ausente Ausentes Presente	Presente Ausentes Presentes Presentes Presente no adenocarcinoma Geralmente presentes
Gene supressor tumoral e anomalias alelotípicas Deleções em 3p Mutações em <i>rb</i> Mutações em p16/CDKN2 Mutações em p53 Perda em 5q, 8p, 11p e outros alelos	> 90% ~ 90% ~ 10% > 90% Presente	> 80% ~ 20% ~ 50% > 50% Presente
Anomalias no oncogene dominante Mutações em <i>ras</i> Sobre-expressão da família <i>myc</i> Sobre-expressão de <i>Bcl-2</i> Sobre-expressão da telomerase	< 1% > 50% > 75% > 90%	~ 30% > 50% > 50% > 90%
Resposta à radioterapia	Redução tumoral em 80 a 90% Em geral, resposta completa	Redução tumoral em 30 a 50% Raramente há uma resposta completa
Resposta à quimioterapia combinada Taxa de regressão global Taxa de regressão completa	90% 50%	30 a 40% 5%

Fonte: Minna J *et al.* Molecular Biology of Lung Cancer. In: Cancer – Principles and Practice of Oncology. 5th edition. Lippincott-Raven. 1997: 851

Abreviaturas: ACTH – hormona adrenocorticotrópica; FNA – factor natriurético auricular; AVP – arginina-vasopressina; PTH - paratormona

2.2.3 Etiologia

A maior parte dos tumores pulmonares é provocada por carcinogêneos e pela ingestão de promotores tumorais, como por exemplo, o fumo do tabaco. Cerca de 90% dos doentes com tumores pulmonares (de todos os tipos histológicos) são ou foram fumadores. O tabaco¹ também é responsável pela maior parte dos tumores da laringe, cavidade oral e faringe, esófago e bexiga [47,52]. Nos EUA, cerca de 28% dos homens e 25% das mulheres com idade superior a 18 anos, são fumadores. O risco relativo de desenvolver neoplasia pulmonar maligna é cerca de 7 a 25 vezes maior no caso de tabagismo activo (dependendo da quantidade de cigarros fumados) e cerca de 1,5 vezes no caso de exposição passiva prolongada ao fumo do tabaco [53]. Pensa-se que o fumo do tabaco, bem como alguns poluentes industriais possuem um efeito carcinogénico. De facto, há uma relação dose-resposta entre a taxa de morte por tumor pulmonar e o número total de cigarros fumados, de modo que o risco para um homem que fuma 40 cigarros por dia há 20 anos é de cerca de 60 a 70 vezes superior que para um não fumador. Por outro lado, a probabilidade de desenvolver a doença diminui quando a pessoa deixa de fumar, mas nunca atinge o risco de um não fumador [43,47,52-54]. Apesar de se verificar esta relação etiológica entre o tabaco e a patologia maligna do pulmão, o desenvolvimento desta doença em indivíduos que nunca fumaram e em ex-fumadores, bem como a ausência de desenvolvimento da doença em muitos fumadores compulsivos, são aspectos que ainda não estão esclarecidos. As complexas inter-relações entre os processos biológicos, genéticos e moleculares na modulação da resposta carcinogénica ao fumo do tabaco carecem mais investigação [43].

Apesar da exposição ao fumo do tabaco constituir o factor de risco mais importante para o desenvolvimento de tumores pulmonares, existem outros tipos de exposição ambiental que contribuem para o aumento desse risco. Os indivíduos que trabalham com asbestos têm um risco aumentado de desenvolver a doença e se forem fumadores, esse risco é ainda maior. Outras substâncias que estão também associadas a um risco aumentado de desenvolver neoplasias pulmonares malignas e que resultam de exposição ocupacional são o arsénico, o crómio, o níquel, o cloreto de vinil, o talco, o urânio e os fumos provenientes da exaustão de gasóleo e gasolina [47].

Embora a patologia pulmonar maligna não seja considerada uma doença genética, alguns estudos na área da genética molecular têm mostrado que as células destes tumores desenvolveram

¹ Por uma questão de facilidade de linguagem utilizam-se as palavras “tabaco” e “cigarro(s)”; contudo, sob esta designação incluem-se também o charuto, o cachimbo e outras drogas, como por exemplo marijuana.

inúmeras lesões genéticas, nomeadamente a activação de oncogenes dominantes e a activação de supressores tumorais ou oncogenes recessivos. No que diz respeito aos oncogenes dominantes, essas lesões incluem mutações pontuais nas regiões codificadoras da família *ras* de oncogenes, amplificação, rearranjo e/ou perda do controlo transcripcional da família *myc* (*c-*, *N-* e *L-myc*). A família *ras* de oncogenes desempenha um papel importante na transdução do sinal e na proliferação celular. No âmbito dos tumores pulmonares, mutações e sobre-expressão de oncogenes da família *ras* estão associados a uma diminuição da sobrevida (mais de 30% dos adenocarcinomas apresentam mutações no gene *K-ras*). A família *myc* codifica várias proteínas envolvidas na regulação transcripcional. No caso dos tumores pulmonares, o mecanismo geral de activação destes oncogenes é a amplificação que resulta na sua sobre-expressão. No tumor de não pequenas células, são comuns alterações no oncogene *c-myc*, enquanto no tumor de pequenas células, existem alterações em todos os membros da família *myc*. Mutações nos genes da família *ras* estão associadas a um mau prognóstico do tumor de não pequenas células, enquanto que a amplificação tumoral de *c-myc* está associada a um mau prognóstico do tumor de pequenas células. O gene *Bcl-2* é um regulador negativo de morte celular, inibindo a apoptose das células tumorais, contribuindo assim para a sua proliferação [39,45,55,56].

No que se refere aos genes supressores tumorais, análises citogenéticas e alelotipagem mostraram deleções (perda de alelo) envolvendo diversas regiões cromossómicas, nomeadamente 3p, 9p, 11p15, 13q14 (gene do retinoblastoma, *rb*) 16q e 17p13 (gene p53), entre outros locais. Em quase todos os tumores pulmonares existem deleções na região cromossómica 3p. São encontradas mutações nos genes p53 e *rb* (o p53 é um gene supressor tumoral que pode bloquear o ciclo celular) em cerca de 50 e 20%, respectivamente, dos tumores pulmonares do tipo de não pequenas células. Os mesmos genes sofrem mutações em mais de 90% dos tumores pulmonares de pequenas células (ver quadro 2.1) [39,45,55].

Os telómeros são elementos genéticos que existem nas extremidades dos cromossomas e que consistem em pares de sequências simples de ADN. Desempenham um papel importante na protecção dos cromossomas contra a degradação, recombinação ilegítima ou envelhecimento celular. Na maior parte das células tumorais, os telómeros apresentam-se mais alongados devido à actividade da enzima telomerase. A actividade desta enzima é fundamental para o crescimento sustentado, estando directamente relacionada com o fenótipo maligno e metastático de vários tumores sólidos [39,55,56].

Recentemente, um grupo de investigadores [57] descobriu um possível componente hereditário associado aos tumores do pulmão, identificando uma região susceptível num segmento

do cromossoma 6. Foram encontradas fortes evidências de que um ou vários genes susceptíveis para neoplasia pulmonar maligna são co-herdados com um marcador genético no cromossoma 6. Marcadores nos cromossomas 12, 14 e 20 também indicam uma possível ligação à susceptibilidade para tumor pulmonar, contudo os resultados não foram tão evidentes. O mesmo grupo investigou os efeitos do fumo do tabaco e o risco de desenvolver patologia pulmonar maligna para portadores e não portadores do gene familiar que provoca susceptibilidade para a doença, chegando à conclusão que nos não portadores do gene, quanto mais fumarem, maior será o risco de desenvolver tumor do pulmão. Por outro lado, nos portadores, o risco de desenvolver a doença está aumentado independentemente da quantidade que fumem. Esta descoberta sugere que mesmo fumando pouco, os indivíduos que herdaram a susceptibilidade podem desenvolver tumores pulmonares [57].

A compreensão destas anomalias pode, potencialmente, conduzir a um diagnóstico mais precoce e ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para os tumores pulmonares.

2.3.4 Diagnóstico e Estadiamento

Dos estudos realizados, não ficou demonstrada a efectividade do rastreio de pessoas assintomáticas com alto risco de desenvolver neoplasia pulmonar maligna (como por exemplo, homens com idade superior a 45 anos, que fumam 40 ou mais cigarros por dia), através de citologia da expectoração e radiografia torácica. Nestes estudos, foi encontrada uma prevalência de neoplasia pulmonar maligna de 4 a 8 casos por 1.000 pessoas. Noventa por cento dos triados que desenvolveram tumores pulmonares, eram assintomáticos, 62% possuíam tumores pulmonares ressecáveis e 53% de todos os novos casos, estavam no estadio I, com probabilidade de 45% de sobrevivência por 5 anos [58].

Existe um grande conjunto de requisitos oncológicos relacionados com os tumores pulmonares, nomeadamente a detecção das lesões malignas num estadio o mais precoce possível e da forma mais efectiva, a definição das características biológicas das lesões (proliferação, agressividade, diferenciação), a caracterização do estado do doente (função pulmonar residual e estadiamento), a avaliação do comportamento do tumor (resposta à terapia, ocorrência de recidiva, metastização) [39]. A partir do momento em que o doente apresenta sinais ou sintomas ou que tenha realizado exames de rotina que sugerem a presença de tumor pulmonar, é necessário estabelecer um diagnóstico fiável, para depois se instituir o tratamento mais adequado. A primeira

abordagem é sempre a radiografia torácica e a tomografia computadorizada (TC) surge logo de seguida. O doente poderá igualmente realizar uma ressonância magnética. A citologia da expectoração é também um exame muito comum e realiza-se com o objectivo de testar a presença de células tumorais na expectoração. De facto, existem diversos métodos para o diagnóstico da doença; contudo, o mais fiável é a biopsia tecidular invasiva. A obtenção de uma amostra de tecido é crucial, já que nenhum teste diagnóstico não invasivo será suficiente para definir inequivocamente um processo patológico como tumoral, dado que é fundamental conhecer o tipo histológico do tumor. É possível obter tecido tumoral através de diversos métodos: por biopsia brônquica ou transbrônquica, durante broncoscopia por fibra óptica, biopsia de nódulos linfáticos durante um procedimento de mediastinoscopia, obtenção de uma amostra de tecido no momento da ressecção cirúrgica, por biopsia percutânea de um nódulo linfático aumentado, por aspiração com agulha fina de massas tumorais torácicas ou extra-torácicas, com orientação por tomografia computadorizada. A avaliação histológica da amostra é então efectuada de modo a conhecer a gradação, invasividade do tumor, bem como outras informações moleculares como a expressão de marcadores celulares de superfície ou proteínas intracelulares. Na maioria dos casos, o Patologista consegue estabelecer um diagnóstico definitivo de tumor maligno e fazer a distinção crucial entre tumor de pequenas células e tumor de não pequenas células [47].

Após o estabelecimento do diagnóstico, a prioridade será determinar a extensão da doença, no sentido de tomar as opções terapêuticas mais adequadas. Na maioria dos casos, a avaliação da extensão da doença (estadiamento) efectua-se através do recurso a procedimentos diagnósticos invasivos e não invasivos (exame físico, radiografia, cintigrafia, tomografia computadorizada, ressonância magnética, cirurgia, ressecção de gânglios linfáticos regionais).

Através das informações do estadiamento, é possível saber se a doença se encontra localizada, ou seja, confinada ao local de origem, ou disseminada. O sistema de estadiamento mais amplamente utilizado é o TNM (Tumor, Nódulos linfáticos, Metástases), criado pelo *International Union Against Cancer* (IUAC) e pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). Este é um sistema de classificação essencialmente anatómico que classifica o tumor com base no tamanho da lesão tumoral primária (T1 a T4, em que T4 corresponde à lesão de maiores dimensões), no comprometimento dos nódulos linfáticos (N0 a N3, que indicam, a extensão do envolvimento de nódulos linfáticos) e na existência ou não de metástases (M0 e M1, que indicam, respectivamente, a ausência ou presença de lesões metastáticas). A combinação destes factores, permite classificar a extensão da doença em quatro grupos (estádios I, II, III e IV), como ilustra o quadro 2.2 [48].

Quadro 2.2 – Sistema de estadiamento TNM relativo aos tumores pulmonares

Estadio	Descrição TNM
IA	T1 N0 M0
IB	T2 N0 M0
IIA	T1 N1 M0
IIB	T2 N1 M0 T3 N0 M0
IIIA	T1 N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1 M0 T3 N2 M0
IIIB	Qualquer T N3 M0 T4 Qualquer N M0
IV	Qualquer T Qualquer N M1
Descrição do estado do tumor (T)	
T0	Sem evidências de tumor primário
TX	Não é possível localizar o tumor primário por técnicas de imagem por broncoscopia óptica, mas foram encontradas células malignas na citologia
TIS	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor < 3 cm de diâmetro
T2	Tumor > 3 cm de diâmetro ou presença de atelectasia distal que se estende para o hilo
T3	Tumor que se estende directamente para a pleura, parede torácica, diafragma ou pericárdio, que se situa a menos de 2 cm da carina ou causa atelectasia total
T4	O tumor invade o mediastino (coração, grandes vasos, traqueia, esófago, corpo vertebral, carina) ou há derrame pleural maligno
Descrição do comprometimento de nódulos linfáticos (N)	
N0	Sem comprometimento ganglionar
N1	Metástases nos nódulos linfáticos broncopulmonares ou hilares ipsilaterais e nos gânglios linfáticos intrapulmonares
N2	Metástases nos nódulos linfáticos mediastínicos ipsilaterais ou subcarinais
N3	Metástases nos nódulos linfáticos mediastínicos contralaterais ou hilares ou em quaisquer nódulos linfáticos supraclaviculares

Descrição de metástases à distância (M)	
MX	Não é possível a avaliação de metástases à distância
M0	Sem metástases à distância
M1	Existência de metástases à distância (M1 implica a existência de nódulos tumorais em lobos diferentes (ipsilaterais ou contralaterais))

Fonte: <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/healthprofessional/allpages> (Consulta em 12/07/2005)

Caracterizando um pouco melhor o que acaba de ser resumido no quadro acima, relativamente ao estadiamento tumoral, pode dizer-se que no estadio IA, o tumor mede menos de 3 cm de maior eixo e não se localiza nos brônquios principais nem invade quaisquer nódulos linfáticos. No estadio IB, o tumor não invade qualquer órgão, nem se localiza muito próximo da traqueia. Poderá localizar-se nos brônquios principais, mas não provoca obstrução pulmonar nem invade quaisquer nódulos linfáticos. No estadio IIA, o tumor mede menos de 3 cm de maior eixo, não se localiza nos brônquios principais, mas invade nódulos linfáticos ipsilaterais ao tumor. No estadio IIB, o tumor não invade qualquer órgão nem se localiza muito próximo da traqueia; se se localiza nos brônquios principais, não provoca obstrução pulmonar total, mas invade os nódulos linfáticos hilares ipsilaterais ao tumor. No estadio IIIA, o tumor pode invadir nódulos linfáticos diferentes dos tipos referidos no estadio II (nomeadamente nódulos mediastínicos ou subcarinais), mas estes são ipsilaterais ao tumor; não há invasão de órgãos vitais. No estadio IIIB, o tumor invade órgãos vitais adjacentes e/ou nódulos linfáticos contralaterais. No estadio IV, o tumor apresenta metastização à distância em órgãos vitais (cérebro, fígado, osso, etc.) [47,48].

De salientar que este sistema de classificação é o mais utilizado no caso de tumores de não pequenas células. No caso dos tumores de pequenas células, é mais comum a utilização de um sistema de classificação mais simples (desenvolvido pelo *Veterans Administration Lung Cancer Study Group*), que possui apenas dois estadios, nomeadamente, doença em estadio limitado (*limited-stage disease*) e doença em estadio extenso (*extensive-stage disease*). Quando a doença se encontra em estadio limitado, significa que o tumor está confinado ao hemitórax de origem (pulmão e nódulos linfáticos), pelo que poderá ser tratado por radioterapia. Quando a doença se encontra no estadio extenso, significa que o tumor já se dispersou para o hemitórax contralateral ao de origem (pulmão e nódulos linfáticos contralaterais) ou para outros órgãos distantes [47,49,50].

Além deste sistema de classificação, hoje em dia assumem cada vez maior importância as características biológicas do tumor, dado que estão relacionadas com o prognóstico da doença. Dentro destas, tem vindo a constatar-se que a expressão de determinados oncogenes, genes de resistência a fármacos, genes relacionados com a apoptose e genes envolvidos na metastização, influenciam a resposta à terapia e, consequentemente, o prognóstico. A presença de anomalias citogenéticas específicas pode influenciar a sobrevida. Tumores com elevadas taxas de crescimento, avaliada pela expressão de marcadores relacionados com a proliferação celular, como o antígeno nuclear de proliferação celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) apresentam um comportamento mais agressivo que os tumores com taxas de crescimento mais baixas [55,56]. Este assunto será desenvolvido com maior detalhe mais adiante, quando se abordar os mecanismos de resistência a múltiplos fármacos.

2.3.5 Tratamento

Consoante já foi referido anteriormente, a característica comum a todos os tumores é a proliferação descontrolada das células tumorais, que podem dispersar-se e invadir tecidos e órgãos normais, podendo provocar a morte do doente. Quando os tumores se encontram confinados a um determinado órgão, a cirurgia combinada com a radioterapia e/ou quimioterapia constituem formas de tratamento comuns mais ou menos eficazes de acordo com o tipo de tumor e com a existência ou não de metástases à distância. Nestes casos, a quimioterapia constitui a abordagem primária. Infelizmente, os agentes citostáticos disponíveis actualmente não são específicos para as células tumorais. Muitos actuam provocando danos na cadeia de ADN ou interferindo com a sua síntese e por isso, também matam células que se dividem rapidamente, como por exemplo, as células epiteliais que revestem o tracto gastrointestinal e as células da medula óssea que originam as células sanguíneas. Assim, a toxicidade resultante da aplicação destes fármacos, limita a sua eficácia. Muitas vezes, não é possível erradicar um tumor devido ao facto de as concentrações necessárias de citostáticos para o fazer não serem toleradas pelos doentes. Como consequência, cerca de metade dos doentes diagnosticados com patologia maligna, acabam por morrer da doença [45,47].

A maior parte dos doentes com tumor pulmonar de pequenas células, na altura do diagnóstico, já apresenta metastização, inviabilizando a abordagem cirúrgica, pelo que são tratados

com quimio e/ou radioterapia. Se não for tratado, o tumor de pequenas células, de todos os tumores pulmonares, é o que apresenta a evolução clínica mais agressiva, sendo o tempo médio de vida após o diagnóstico de apenas 2 a 4 meses. Comparativamente com os outros tumores, o tumor de pequenas células é o que apresenta maior tendência para metastizar; contudo, apresenta melhor resposta à quimio e radioterapia [47,49,50].

Na altura do diagnóstico, apenas um terço dos doentes com tumores de não pequenas células apresenta doença localizada, pelo que será possível efectuar uma abordagem curativa, através de cirurgia e/ou radioterapia (doentes classificados no estadio I ou II e alguns no estadio IIIA); um terço apresenta doença loco-regional (estadios IIIA e IIIB), sendo tratados por quimio e/ou radioterapia; o restante terço apresenta doença metastática à distância (estadio IV), sem qualquer possibilidade de cura, recebendo cuidados paliativos. Com efeito, os tumores de não pequenas células, se detectados precocemente, numa fase em que ainda estão localizados, são passíveis de serem removidos cirurgicamente e, portanto curados. Além disso, consoante já foi referido anteriormente, estes tumores não costumam apresentar uma boa resposta à quimioterapia [43,47-50].

Apesar de por vezes se efectuar a remoção cirúrgica dos tumores, existe sempre o risco de recidiva, uma vez que podem existir algumas células tumorais que o cirurgião não conseguiu remover. Por este motivo, os doentes são também sujeitos a quimioterapia. A quimioterapia está recomendada após a cirurgia em alguns doentes classificados no estadio I e na maior parte dos doentes no estadio II. Aos doentes no estadio IIIA, aplica-se uma terapia combinada de radioterapia e/ou quimioterapia e/ou cirurgia. Os doentes nos estadios IIIB e IV, geralmente são sujeitos apenas a quimioterapia, como tratamento paliativo. O momento e a forma como os tratamentos quimioterapêuticos devem ser aplicados estão protocolados de acordo com as recomendações dos grupos de trabalho na área oncológica. Existem muitos agentes quimioterapêuticos, sendo estes muitas vezes administrados em combinação, para serem mais eficazes. Os regimes quimioterapêuticos são aplicados consoante o objectivo e o alvo que se pretende atingir. Alguns dos agentes administrados são: etoposídeo, teniposídeo, cisplatina, carboplatina, ifosfamida, ciclofosfamida, vincristina, doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, vinorelbina. O quadro 2.3 resume alguns dos fármacos utilizados e respectivos alvos. Actualmente está em avaliação a combinação de tratamentos locais (cirurgia), com tratamentos regionais (radioterapia) e com tratamentos sistémicos (quimioterapia, imunoterapia) e o desenvolvimento de terapias sistémicas mais eficazes [39,47]. Infelizmente, as formas de tratamento actualmente aplicadas (quimioterapia, cirurgia e radioterapia) produzem apenas um efeito muito modesto na melhoria do estado do doente,

sendo os seus resultados muitas vezes referidos em termos de sobrevivência a curto prazo. Uma possível razão para isto é o desenvolvimento de resistência aos agentes citostáticos e à radioterapia por parte dos tumores, por mecanismos ainda mal conhecidos [43].

Quadro 2.3 – Principais famílias de fármacos utilizados em quimioterapia, respectivos alvos e mecanismos de acção.

Família	Exemplos de fármacos	Mecanismos de acção	Principais alvos
Agentes alquilantes	Melfalan, ciclofosfamida, clorambucil, derivados da platina	Ligação ao ADN, quebra e ligação inapropriada entre as hélices do ADN	Molécula de ADN
Antibióticos anti-tumorais	Dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina	Inibição da topoisomerase	Topoisomerase I e II
Fármacos derivados de plantas	Alcalóides vinca (vinblastina), podofilotoxinas (etoposideo), taxanos, irinotecano, topotecano	Despolimerização dos microtúbulos, danos na mitose	Microtúbulos citoplasmáticos, mitose Topoisomerase I e II
Antimetabolitos	Metotrexato, 5-fluorouracil, citozar, 5-azacitosina, 6-mercaptopurina, gemcitabina	Inibição da enzimas que participam na síntese do ADN e do ARN	Dihidrofolato sintetase, timidilato sintetase

Fonte: Stavrovskaya A. Cellular Mechanisms of Multidrug Resistance of Tumor Cells. *Biochemistry (Moscow)*. 2000; 65: 96

2.4 Desenvolvimento de Resistência a Múltiplos Fármacos

A resistência a múltiplos fármacos (*Multidrug Resistance - MDR*) é o termo que designa o mecanismo de protecção de uma população de células tumorais contra inúmeras substâncias ou fármacos em simultâneo, diversos na sua estrutura química e nos mecanismos de influência nas células, constituindo por isso, uma das principais causas de insucesso da quimioterapia [1,6,59-63]. Este fenótipo caracteriza-se por uma resistência a várias substâncias, pertencentes a várias famílias, não relacionadas entre si e com distintos mecanismos de acção – resistência cruzada [9,62].

Existem inúmeros mecanismos moleculares através dos quais a MDR se desenvolve, pois a resistência das células é mediada por diferentes mecanismos que actuam nas diversas etapas da acção citostática dos fármacos, desde a diminuição da sua acumulação na célula até à inibição da apoptose ou estimulação dos receptores de morte, induzida por substâncias químicas [1,9,61]. Alguns autores sugerem que a MDR pode ser o resultado de alterações hereditárias nas células tumorais que por sua vez conduzem à alteração dos níveis de proteínas específicas, ou proteínas mutantes, que permitem a sua sobrevivência mesmo na presença de diversos agentes citostáticos. Consoante já foi dito acima, estas alterações genéticas que conferem resistência aos citostáticos afectam a dinâmica do ciclo celular, a susceptibilidade das células à apoptose, a captação e a eliminação desses agentes, bem como o seu metabolismo celular, a reparação das lesões provocadas pelos citostáticos e a reparação do ADN [6, 9,64]. Um princípio fundamental que convém ter em conta quando se fala de MDR é que as células tumorais são geneticamente heterogéneas. Apesar do processo que resulta no crescimento descontrolado dos tumores favorecer a expansão clonal, as células tumorais que são expostas a agentes citostáticos serão seleccionadas pela sua capacidade de sobreviver e dividir-se na presença desses agentes. Assim, devido à referida heterogeneidade genética, numa população de células tumorais poderão existir diversos mecanismos de resistência a actuar simultaneamente, mas quase sempre há um que predomina [6]. Alguns dos mecanismos de MDR mais bem conhecidos são a activação de proteínas transmembranares que provocam o efluxo de diversas substâncias do interior das células (a glicoproteína P é a bomba de efluxo mais conhecida), a activação de enzimas do sistema de desintoxicação pela glutatona e as alterações nos genes e nas proteínas envolvidas no controlo da apoptose (particularmente nos genes *p53* e *Bcl-2*) e da morte celular [1,61].

O estudo das causas e dos efeitos da MDR é fundamental dado que esta constitui uma das causas de insucesso da quimioterapia. Os principais factores que conduzem ao desenvolvimento de resistências aos agentes anti-tumorais, estão relacionados com a chegada de uma quantidade reduzida destes agentes às células tumorais, que podem estar associados a factores inerentes à farmacocinética do próprio medicamento (por exemplo, a incapacidade do fármaco chegar à célula em quantidades suficientes na forma activa), má absorção dos fármacos administrados por via oral, aumento do metabolismo ou da eliminação desses agentes e os factores associados ao micro-ambiente do tumor [1,6,9]. Neste trabalho não serão abordados os factores relacionados com a farmacocinética, mas apenas os mecanismos de MDR desenvolvidos pelas células. A compreensão destes mecanismos é muito importante, pois como se pode ver no quadro 2.4, a célula é capaz de

desenvolver repostas para contrariar o efeito terapêutico dos agentes citostáticos em todas as fases da sua acção [1].

Quadro 2.4 – Principais mecanismos de resistência a fármacos por parte das células tumorais

Nº	Etapas da acção citostática dos fármacos	Alterações que resultam em resistência aos fármacos	Mecanismos de resistência (exemplos)
1	Captação do fármaco por parte da célula	Diminuição da acumulação do fármaco pela célula	Activação das proteínas de transporte (Pgp, MRP)
2	Activação ou preservação da actividade do fármaco no interior da célula	Desintoxicação do fármaco ou incapacidade dos sistemas de activação do fármaco	Activação das enzimas do sistema da glutatona, sequestração do fármaco em vesículas intracelulares
3	Lesão no alvo do fármaco	Alterações do alvo do fármaco, aumento da reparação do alvo danificado	Mutações nos genes que codificam as topoisomerasas, aumento da reparação do ADN
4	Paragem do ciclo celular e/ou morte da célula	Inibição da apoptose ou paragem do ciclo celular: alterações dos genes que controlam a apoptose	Mutações do gene <i>p53</i> , activação do gene <i>Bcl-2</i>

Fonte: Stavrovskaya A. Cellular Mechanisms of Multidrug Resistance of Tumor Cells. *Biochemistry (Moscow)*. 2000; 65: 96

Contudo, a MDR pode não surgir necessariamente apenas como resposta aos tratamentos com citostáticos, podendo as células apresentar MDR intrínseca. Esta expressão está associada com a diferenciação celular, com alterações genéticas ou com a localização das células no organismo. Um exemplo deste mecanismo intrínseco de MDR acontece nos tumores cerebrais que são resistentes à quimioterapia devido à barreira hematoencefálica. A resistência adquirida pode ser devida à quimioterapia, pois sob a influência dos agentes citostáticos, podem desenvolver-se células tumorais resistentes que apresentam variações genéticas, o que significa que o tumor inicialmente responde à quimioterapia, mas depois deixa de o fazer porque adquiriu resistência. As células resistentes podem dividir-se e proliferar se tiverem vantagens selectivas, que podem resultar quer da própria resistência aos citostáticos, quer de outros factores relacionados com as células, nomeadamente o aumento da taxa de proliferação, alterações na sensibilidade das células aos factores de crescimento, etc. Uma característica frustrante associada à resistência adquirida é o facto de os tumores se tornarem resistentes não só aos citostáticos administrados inicialmente para

os tratar, como também desenvolvem resistência cruzada a outros fármacos com mecanismos de acção diferentes. Calcula-se que a resistência aos citostáticos, quer seja intrínseca ou adquirida, conduz ao insucesso da quimioterapia em cerca de 90% dos doentes com patologia oncológica metastática [9]. Os principais mecanismos de MDR são a diminuição da acumulação dos fármacos nas células tumorais, a alteração dos mecanismos de desintoxicação celulares, alterações dos alvos dos fármacos, aumento dos mecanismos de reparação desses alvos e alterações dos genes que controlam a apoptose das células tumorais [1,6,9,61].

2.4.1 MDR provocada pela diminuição da acumulação dos fármacos nas células

A diminuição da acumulação dos fármacos nas células pode ser devida quer à diminuição do influxo (entrada), quer ao aumento do efluxo (saída) desses fármacos. Uma vez que muitos dos agentes citostáticos entram nas células por difusão passiva ou facilitada através da membrana plasmática, alterações no seu influxo podem ser devidas a alterações na estrutura da membrana. Estas alterações podem também influenciar as vias de sinalização que controlam a apoptose celular. Por outro lado, o efluxo dos agentes citostáticos é mediado por proteínas de transporte transmembranar – glicoproteína P (Pgp), por transportadores da família MRP (*Multidrug Resistance-associated Protein*) e também por outras proteínas. No quadro 2.5 são apresentados alguns exemplos de transportadores [1,59].

Quadro 2.5 – Exemplos de transportadores que medeiam a MDR (proteínas e genes que codificam os transportadores)

Proteína	Peso molecular (kD)	Gene humano	Localização cromossômica
Pgp	170	MDR1	7q21.1
MRP	190	MRP1	16p13.1
LRP	110	LRP	16p11.2
VMAT (Vesicular MonoAmine Transporter)	62	VMAT	10q26.1
ARX	72	ARX	1p22

Fonte: Stavrovskaya A. Cellular Mechanisms of Multidrug Resistance of Tumor Cells. *Biochemistry (Moscow)*. 2000; 65: 97

Dos mecanismos de MDR conhecidos, o mediado pela Pgp é dos que está melhor estudado, sendo também um dos que assume maior importância no contexto dos tumores pulmonares, pelo que será aqui descrito com maior pormenor.

A Pgp medeia a resistência celular a diversos fármacos anti-tumorais (antraciclinas, alcalóides, podofilotoxinas, taxanos, etc.) e a muitas outras substâncias (corantes fluorescentes, brometo de etídio, puromicina, gramicina D, etc.). A Pgp é uma glicoproteína transmembranar de grandes dimensões, com peso molecular de cerca de 170 kD, sendo constituída por duas metades muito semelhantes, cada uma delas com seis segmentos hidrofóbicos transmembranares (aos quais se ligam os substratos hidrofóbicos, que podem ser neutros ou carregados positivamente), o que indica que a Pgp atravessa a membrana plasmática doze vezes (figura 2.3) [1,6, 59,61-65].

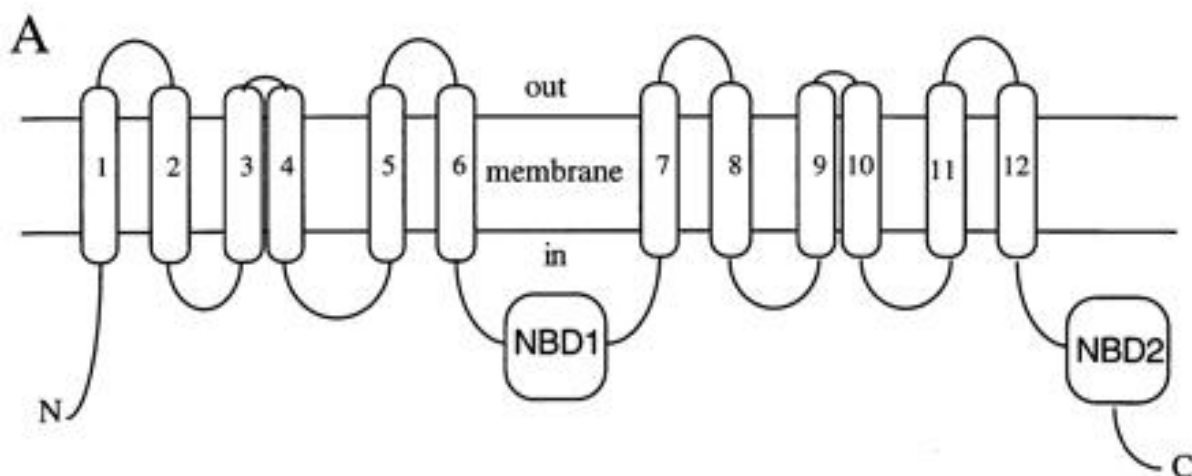


Figura 2.3 – Estrutura da Pgp e respectivos substratos e inibidores

Legenda: TM – domínios transmembranares

Fonte: Leonard G et al. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *Oncologist*. 2003; 8:413

Apesar de terem sido propostos diversos modelos para explicar o funcionamento da Pgp, ainda não se conhece claramente o que acontece ao nível molecular que provoca a diminuição da acumulação intracelular dos agentes anti-tumorais. Sabe-se que a actividade da Pgp é um processo dependente de energia, pois a molécula possui dois domínios de ligação à molécula de adenosina trifosfato (ATP). A ligação de um substrato a um local de elevada afinidade provoca a hidrólise do ATP, provocando alterações conformacionais que desloca o substrato para um local de ligação de menor afinidade, sendo depois libertado no espaço extracelular ou na camada exterior da bicamada lipídica [1,2,6,59,61,62,64]. Para suportar esta hipótese, verificou-se que os agentes citostáticos se ligam melhor às membranas das células resistentes que às membranas das células sensíveis. Através da marcação de algumas substâncias como, por exemplo, a vinblastina e corantes fluorescentes, que constituem substratos para a Pgp, verificou-se que estas foram expulsas mais rapidamente das células com maior expressão da Pgp. Pensa-se que esta glicoproteína pode funcionar como uma flípase que movimenta determinadas substâncias para a camada externa da célula ou para fora desta [1,66]. A interacção entre as duas metades da bicamada da Pgp é fundamental para o funcionamento coordenado da molécula [64].

A Pgp pertence à superfamília de transportadores ABC (*ATP – Binding Cassette*). Esta superfamília inclui mais de uma centena de proteínas de transporte, que existe em variadíssimas espécies, desde a *E. coli* até aos humanos [6,59,61,67].

As proteínas desta superfamília transportam substâncias muito diferentes, desde iões inorgânicos até polissacáridos e outras proteínas. A característica comum a estes transportadores reside na sua organização, pois possuem domínios transmembranares de ligação ao ATP (domínios ABC) (figura 2.3). Existem sete subfamílias dos transportadores ABC (de ABCA a ABCG) que são expressos quer nas células normais, quer nas células malignas. Normalmente, estão envolvidos no transporte de inúmeras substâncias, nomeadamente a excreção de toxinas do fígado, dos rins e do tracto gastrointestinal, limitando também a entrada de toxinas em estruturas vitais, como o cérebro e a placenta [6,59]. A Pgp é codificada pelo gene *MDR1* (membro da família MDR), localizado no cromossoma 7 (7q21.1). Nos humanos, existem dois genes que fazem parte da família MDR (*MDR1*, *MDR2* e *MDR3*). Contudo, verificou-se que apenas um dos genes está envolvido na MDR (o *MDR1*) [1,2].

Existe a possibilidade de a actividade da Pgp poder ser directamente influenciada pelos respectivos substratos. O gene *MDR1* possui duas regiões promotoras, a inferior e a superior. Nos tecidos e nas células em cultura, é comum a expressão do promotor inferior, sendo por isso considerado um elemento básico que regula a actividade deste gene. O aumento da transcrição do gene *MDR1* pode ser devido a diversos factores, nomeadamente ao efeito dos agentes citostáticos, mesmo aqueles que não constituem substratos para a Pgp. Contudo, é evidente que a indução do gene *MDR1* dependerá do contexto em que se encontra a célula, dado que diversos indutores em diferentes vias influenciam a actividade deste gene em diferentes células (indutores muito diferentes podem provocar MDR mediada pela Pgp) [1].

2.4.1.1 Expressão da Pgp em tecidos e células normais

A expressão da Pgp ocorre em diversos tecidos de forma muito diferente, desde níveis de expressão muito reduzidos (como por exemplo, nas células da epiderme e nos pneumócitos) até muito elevados (como acontece nas células do córtex das glândulas supra-renais, no rim e no cólon) [2,59-61,63]. Nas células epiteliais do tracto gastrointestinal inferior (jejuno, íleo e cólon) existem elevados níveis de Pgp apenas na face interna destes tecidos, o que sugere que esta proteína desempenha um papel importante na prevenção da captação de substratos e, eventualmente, na promoção da excreção através da mucosa do tracto gastrointestinal [2,64,65]. Os níveis de expressão do gene *MDR1* em alguns tecidos normais são apresentados no quadro 2.6. Parece

evidente que as doenças com origem em células que normalmente expressam a Pgp, apresentarão MDR intrínseca, enquanto que aquelas que surgem em células que não expressam a Pgp, não terão este tipo de resistência [1,61].

Quadro 2.6 – Expressão do gene MDR1 em tecidos normais (em humanos)

Tecido	Nível de ARNm
Pele, músculos	1
Jejuno	20
Pulmão	20
Fígado	25
Cólon	31
Rim	51
Supra-renal	160

Fonte: Stavrovskaya A. Cellular Mechanisms of Multidrug Resistance of Tumor Cells. *Biochemistry (Moscow)*. 2000; 65: 99

A especificidade tecidular da expressão da Pgp levanta a questão sobre qual será a sua função fisiológica no organismo. A partir de estudos em ratinhos em que se suprimiu a expressão do gene *MDR1*, foi possível concluir que a função da Pgp é uma das defesas do organismo contra agressões tóxicas. Esta proteína desempenha funções de barreira, protegendo as células de substâncias nocivas [1,59,61,68]. O padrão de expressão da Pgp e da MRP no plexo coroideu do cérebro sugere que estas proteínas possuem um papel importante na barreira hematoencefálica. Provavelmente, a elevada indutibilidade do mecanismo *MDR1*/Pgp está relacionada com as funções fisiológicas da Pgp [64,69].

Sintetizando, pensa-se que a Pgp desempenha funções importantes na absorção, distribuição e excreção de determinadas substâncias hidrofóbicas, anfipáticas. Assim, a Pgp pode servir de barreira à entrada de agentes tóxicos para o organismo, pode promover a remoção de substâncias da circulação, uma vez que estas entraram no organismo, pode prevenir que essas substâncias saiam da circulação para os tecidos que são especialmente sensíveis à sua toxicidade

e, ao nível celular, pode proteger as células no caso de as substâncias citotóxicas terem saído da circulação para entrar no espaço intersticial [64].

2.4.1.2 Significado da MDR mediada pela Pgp no tratamento de tumores

A expressão da Pgp (ou sobre-expressão do gene *MDR1*) em alguns tumores é detectada logo na altura do diagnóstico e de um modo geral está relacionada com o tipo de células a partir das quais o tumor se desenvolve. Neste caso, existe MDR intrínseca que está relacionada com o tipo de tecido de origem das células tumorais. Alguns dos tumores que apresentam elevados níveis de expressão do gene *MDR1* na altura do diagnóstico são os tumores do cólon, do rim, do pâncreas, os hepatomas, os tumores das glândulas supra-renais, os feocromocitomas, os tumores pulmonares de não pequenas células com propriedades neuroendócrinas, os tumores hematológicos, como por exemplo a leucemia mieloblástica aguda, a leucemia linfocítica crónica, os linfomas das células T adultas, entre outros [1,2,59,65,68]. Outros tumores apresentam níveis intermédios de expressão do gene *MDR1*, como os neuroblastomas, os sarcomas de tecidos moles, os tumores carcinóides e os linfomas. Por outro lado, os tumores com níveis relativamente baixos do gene na altura do diagnóstico são os tumores pulmonares de pequenas células e de não pequenas células, os carcinoma do esófago, os tumores do estômago, da cabeça e pescoço, do ovário e da mama [2]. No entanto, nem todos os tumores apresentam MDR intrínseca. O aumento do número de casos com sobre-expressão da Pgp após o início da terapêutica com citostáticos é um dos argumentos a favor do papel da MDR adquirida no insucesso da quimioterapia. Alguns estudos realizados no âmbito de tumores do pulmão, do ovário, da mama e em sarcomas sugerem a importância da MDR mediada pela Pgp no resultado dos tratamentos [65]. O papel da Pgp na MDR tem sido melhor estudado no âmbito dos tumores hematológicos. Em cerca de 30 a 50% dos casos de leucemia mieloblástica aguda, verificou-se expressão da Pgp, sendo esta proteína encontrada mais frequentemente após o início da quimioterapia em doentes resistentes ao tratamento [70]. O mieloma múltiplo é um bom exemplo para comprovar o desenvolvimento de MDR após o início do tratamento, pois num estudo realizado por *Marie et al.* em doentes com este tipo de tumor, apenas 6% dos doentes apresentavam expressão aumentada da Pgp na altura do diagnóstico; contudo, após o tratamento, mais de 85% dos doentes resistentes ao tratamento, começaram a expressar a Pgp [70]. Apesar de ser necessário algum cuidado quando se comparam os resultados dos diversos estudos nesta área,

pode dizer-se que provavelmente em alguns tumores malignos, a Pgp desempenha um papel importante na resposta dos doentes à terapêutica com citostáticos, pois a sobre-expressão da Pgp será um indicador de mau prognóstico da doença. Contudo, a Pgp por si só nem sempre determina a resistência aos tratamentos.

Devido ao impacto negativo da Pgp na resposta aos tratamentos, houve necessidade de desenvolver substâncias capazes de contrariar ou bloquear o efeito desta proteína, designadas de inibidores ou moduladores da Pgp (o quadro 2.7 apresenta alguns exemplos de substratos e de inibidores para esta proteína).

Quadro 2.7 – Exemplos de substratos e de inibidores da Pgp.

Exemplos de alguns substratos da Pgp		Exemplos de alguns inibidores da Pgp	
Adriamicina	Vincristina	Verapamil	Tariquidar
Daunorubicina	Vinblastina	Quinidina	GF-120918
Epirubicina	VP-16	Zosuquidar	VX-710
Paclitaxel	Mitoxantrona	Ciclosporina A	LY335979
Docetaxel	Dactinomicina	Vaslapodar (PSC 833)	R101933
		Dexaverapamil	XR9576
		Dexniguldipina	S-9788

Fonte: Leonard G et al. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *Oncologist*. 2003; 8:413

A investigação nesta área já tem mais de duas décadas de duração, tendo surgido muitos tipos de compostos inibidores da Pgp, tais como os bloqueadores dos canais de cálcio (ex: verapamil, nifeldipin), hipotensores (reserpina), antibióticos (cefalosporinas, gramicidina, puromicina), imunossuppressores (ciclosporina A e derivados) e muitos outros compostos lipofílicos [61,71]. Apesar de tão diversos, todos estes compostos possuem algumas características comuns, nomeadamente o facto de serem hidrofóbicos e de possuírem um baixo peso molecular. Existem já três gerações de inibidores da Pgp. Os inibidores de primeira geração, como por exemplo, o verapamil e a ciclosporina A, já não são utilizados actualmente, pois apresentavam actividade farmacológica própria, pois apenas eram capazes de inibir a Pgp se administrados em doses

elevadas, razão pela qual lhes estava associada uma elevada toxicidade. Os inibidores de segunda geração, como por exemplo, o dexaverapamil, o vaslapodar, e o dexniguldipine, constituem isómeros estereoquímicos ou análogos estruturais aos da primeira geração. Estes compostos apresentam interacções farmacocinéticas não esperadas, ocorrendo por isso diversos efeitos secundários. Além disso, são agentes pouco específicos para a Pgp, uma vez que se ligam também a outras proteínas. Apresentam a vantagem de possuir menor toxicidade comparativamente com os da primeira geração. Os inibidores de primeira e segunda geração ligam-se à molécula da Pgp, inibindo competitivamente a ligação ou transporte dos fármacos que são substratos da Pgp, com o objectivo de limitar o efluxo dos agentes citostáticos, aumentando assim a sua concentração intracelular (figura 2.4). Contudo, as primeiras gerações de inibidores da Pgp bloqueiam a bomba apenas por um curto período de tempo, pelo que as funções normais se recuperam rapidamente e os citostáticos são novamente removidos das células tumorais [9].

Mais recentemente, foram desenvolvidos os inibidores de terceira geração, como por exemplo, o zosuquidar, o tariquidar, o VX710, o S-9788 e o GF-120918, que ao contrário dos de primeira e segunda geração, se ligam de forma não competitiva à Pgp. De facto, estes inibidores possuem uma elevada afinidade para a Pgp, mas não constituem substratos, pelo que são eficazes mesmo a baixas concentrações (da ordem das nanomoles). Isto provoca alterações conformacionais na proteína, prevenindo a hidrólise do ATP e assim o transporte do agente citostático para fora da célula, o que faz aumentar a sua concentração intracelular (figura 2.5) [61].

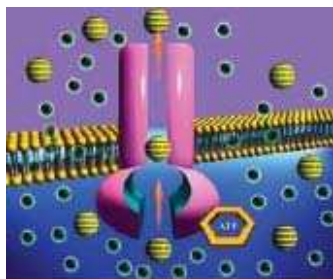


Figura 2.4 – Inibição competitiva do transportador da Pgp

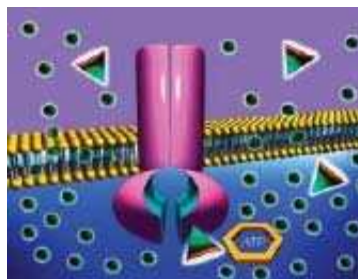


Figura 2.5 – Inibição não competitiva do transportador da Pgp

Fonte: Thomas H, Coley H. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein. *Cancer Control*. 2003; 10(2): 163

A reversão do efeito da Pgp é uma questão complexa, já que por vezes se consegue diminuir a resistência a um grupo de fármacos, mas a resistência a outros mantém-se, o que

constitui um problema, já que consoante foi referido anteriormente, hoje em dia, a quimioterapia utiliza associações sinérgicas de agentes citostáticos. Além disso, os agentes das primeiras gerações de inibidores da Pgp possuíam uma elevada toxicidade e reacções adversas graves. [1,61]. A nova geração de antagonistas da Pgp apresenta menor toxicidade, menos efeitos secundários e mecanismos de acção mais específicos, pelo que neles se depositam grandes esperanças. Os agentes mais promissores desta geração encontram-se actualmente em ensaios clínicos de fase III.

2.4.1.3 MDR mediada pela Multidrug Resistance-associated Protein (MRP)

A MRP foi descoberta em 1992, a partir de uma linha de células humanas de tumor pulmonar [1,59], sendo os seus mecanismos de acção menos bem conhecidos que os da Pgp. A MRP possui um peso molecular de aproximadamente 190 kD e confere resistência às células praticamente para os mesmos fármacos que a Pgp [1,59,72,73]. À semelhança da Pgp, esta proteína localiza-se na membrana plasmática, provocando o efluxo de compostos hidrofóbicos das células, contra o gradiente de concentração [72]. Comparativamente com a Pgp, a MRP possui 5 segmentos transmembranares adicionais, num total de 17, com dois sítios de ligação (figura 2.6) [6,59]. Tal como a Pgp, a MRP é dependente de energia (sob a forma de ATP), extruindo as substâncias tóxicas da célula.

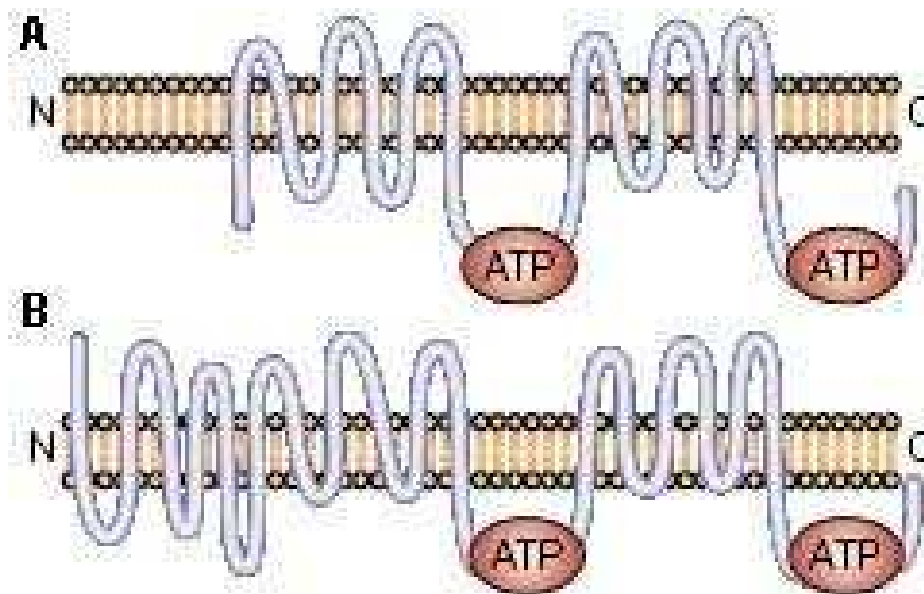


Figura 2.6 – Comparação entre a estrutura da Pgp (A) e da MRP (B)

Fonte: Gottesman M, Fojo T, Bates S. Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-dependent Transporters.

Nat Rev Cancer. 2002; 2 (1): 50

As semelhanças estruturais entre a MRP1 e a Pgp são acompanhadas por semelhanças nas substâncias que constituem seus substratos, que incluem também aniões orgânicos [6,59,63]. A MRP também pertence à superfamília de transportadores ABC, mas a sua actividade funcional é diferente da Pgp, pois para provocar o efluxo dos fármacos das células, a MRP precisa de glutathione, pois esta proteína é um dos transportadores da bomba de efluxo glutathione S-conjugada (designada por bomba GS-X), dependente da glutathione reduzida [1,59,73].

Genes e proteínas da família MRP existem em espécies muito diversas, desde as bactérias até ao Homem. Além da MRP1, existem outras proteínas deste grupo com especificidade para aniões orgânicos. A proteína cMOAT (*canalicular Multispecific Organic Anion Transporter*) ou MRP2, existe na face apical dos hepatócitos normais que revestem os canalículos biliares, estando associada ao transporte de bilirrubina. Também é um transportador da MRP1 e da cisplatina, conferindo resistência a estes agentes. Existem no fígado elevados níveis de MRP3, podendo esta proteína desempenhar um papel importante no efluxo de aniões orgânicos deste órgão para a corrente sanguínea na presença de obstrução biliar [59]. A MRP4 e a MRP5 são transportadores de análogos de nucleósidos, conferindo resistência às tiopurinas. Pensa-se que a MRP6 é uma bomba aniônica lipofílica, conferindo resistência a uma grande variedade de agentes citostáticos. Apesar de

já terem sido identificadas todas estas proteínas transportadoras, até à data só há evidências clínicas de MDR associada à MRP1 [59]. Apesar de os mecanismos de resistência da MRP serem muito semelhantes aos da Pgp, os padrões de resistência cruzada um pouco diferentes, pois as células que expressam a MRP possuem menor resistência cruzada ao taxol que as que expressam a Pgp. Nas células normais, a função da MRP é efectuar o transporte dos conjugados da glutathione, importantes para o normal funcionamento da célula, desempenhando também um papel preponderante na inflamação. A expressão da MRP encontra-se aumentada no epitélio brônquico, estando a sua sobre-expressão envolvida na patogénese da asma brônquica [6].

Ota et al. estudaram os níveis de expressão da MRP em 104 tumores pulmonares de não pequenas células, verificando que esta proteína se expressava em 32% destes tumores. Após avaliação da resposta dos doentes à quimioterapia, os mesmos investigadores chegaram à conclusão que os tumores que expressavam níveis moderados ou elevados de MRP apresentavam pior prognóstico que aqueles que não expressavam ou que apresentavam uma expressão muito reduzida desta proteína [74].

2.4.1.4 MDR mediada pela Lung Resistance-related Protein (LRP)

A proteína LRP foi descoberta em 1993. Possui um peso molecular de 110 kD, estando presente no citoplasma e na membrana nuclear, e não na membrana celular como a Pgp e a MRP [1,59,75]. Esta proteína é expressa pelas células epiteliais normais e pelas células dos tecidos expostos a substâncias tóxicas. A LRP é a principal proteína de partículas celulares de ribonucleoproteínas designadas “*vaults*”. A função destes organelos ainda não é conhecida, mas pensa-se que podem participar no transporte de substratos do núcleo para o citoplasma. Na célula, a LRP está muitas vezes associada a vesículas e lisossomas, facto que suporta a sua ligação à função de transporte de substâncias químicas e sua sequestração nas vesículas, processo após o qual se dará a sua expulsão da célula por exocitose [6,75,76]. A LRP pode provocar MDR no contexto de tumores do ovário e de leucemia mieloblástica aguda [1,75].

2.4.2 Resistência mediada pelos mecanismos de desintoxicação celular

O sistema da glutathione celular é um componente fundamental na desintoxicação dos citostáticos da célula. A glutathione é um potente antioxidante que inibe o *stress* oxidativo que pode lesar o ADN e o ARN (ácido ribonucleico). A glutathione é um tiol não proteico que pode interagir com os locais reactivos dos citostáticos através do seu grupo tiol, resultando na conjugação do fármaco com a glutathione. O conjugado é menos activo e mais hidrossolúvel, sendo expulso da célula por proteínas de transporte designadas GS-X (incluindo a MRP). Este mecanismo, catalizado por enzimas (as glutathione S-transferases), actua por inactivação destes compostos, diminuindo assim a quantidade de fármaco disponível para se ligar ao seu alvo intracelular. Por exemplo, a formação de conjugados entre a glutathione e os citostáticos derivados da platina (cisplatina, carboplatina, etc.) é crucial para a inactivação destes compostos. Os derivados da platina ligam-se, através de ligações covalentes, à glutathione, sendo o complexo resultante um substrato para as proteínas de transporte ABC, sendo por isso, extruído da célula, o que é comprovado pelos elevados níveis de glutathione encontrados nos tumores resistentes aos derivados da platina [9].

A resistência das células tumorais aos fármacos do grupo Pgp, como as antraciclinas ou a vincristina, pode estar relacionada com alterações no sistema da glutathione. Os inibidores da actividade da glutathione S-transferase são considerados os melhores modificadores deste tipo de resistência. À semelhança do que foi dito para a Pgp, as alterações no sistema da glutathione por si só não podem explicar o desenvolvimento de MDR [1].

2.4.3 MDR mediada por alterações dos alvos dos fármacos ou pelo aumento da reparação desses alvos

Alguns agentes citostáticos são inibidores das topoisomerases (I e II), pois estabilizam o complexo ADN-topoisomerase que, em circunstâncias normais, é facilmente decomposto. Deste modo, na presença de inibidores das topoisomerases, há um aumento acentuado na reparação do ADN [59,77]. Verificou-se que em linhas de células que expressam resistência a fármacos inibidores da topoisomerase II, a actividade ou a quantidade desta enzima se apresentava reduzida; foram encontradas mutações nos genes da topoisomerase II que deverão ser a causa desta resistência [77]. Este tipo de resistência ocorre na presença de adriamicina, daunorubicina, mitoxantrone,

etoposídeo, etc. Verifica-se assim que a maioria das substâncias que interage com a topoisomerase II também são substratos para a Pgp e para a MRP. Além disso, é possível que o aumento da reparação do ADN esteja também envolvido na resistência a fármacos que interagem com esta molécula.

Outro dos alvos dos citostáticos são os microtúbulos do citoesqueleto. Aqueles, são constituídos por 13 subunidades de tubulina e que desempenham um papel fundamental na manutenção da forma da célula, nas vias de sinalização celular, na divisão celular e no transporte de vesículas. A rápida polimerização e despolimerização dos microtúbulos são essenciais para a segregação cromossômica durante a mitose. Os taxanos e os alcalóides vinca suprimem a dinâmica de polimerização, o que resulta num abrandamento ou bloqueio da mitose entre a metáfase e a anáfase, situação que pode provocar a morte das células por apoptose. A relevância clínica deste mecanismo de resistência aos agentes anti-microtubulares ainda não está estabelecida [9].

Um outro mecanismo de MDR que pode ser incluído nesta secção diz respeito à reparação do ADN. A capacidade de uma célula tumoral para reparar o ADN pode determinar a resistência aos citostáticos que provocam quer danos directos (como por exemplo os derivados da platina), quer danos indirectos (como o 5-fluouracil ou os inibidores das topoisomerasas). A resposta da célula face a danos provocados no ADN poder ser a reparação da lesão ou a morte celular, tendo por isso uma grande influência na sensibilidade ou resistência do tumor à quimioterapia. As vias de sinalização são capazes de parar o ciclo celular após a ocorrência de lesões no ADN, no sentido de ganhar tempo para a sua reparação. Deste modo, a célula morrerá por apoptose apenas quando o processo de reparação ficou incompleto devido, por exemplo, a uma lesão demasiado extensa. Contudo, a relação entre a paragem do ciclo celular (que promove a reparação do ADN e a sobrevivência da célula) e a apoptose após a quimioterapia é complexa e depende quer dos citostáticos utilizados, quer do fenótipo molecular da célula tumoral. O gene *p53*, descrito na secção seguinte, desempenha um papel fulcral na regulação da paragem do ciclo celular e na morte celular [9].

2.4.4 MDR mediada por genes que controlam a apoptose das células tumorais

O gene supressor tumoral *p53* e outros genes regulados por este constituem elementos essenciais na resposta das células ao stress, incluindo a resposta celular na presença de agentes anti-tumorais. Normalmente, o gene *p53* é activado como resposta a diferentes danos celulares, resultando em paragem do ciclo celular ou apoptose. Deste modo, pode acontecer uma de duas coisas: ou as células com lesões são eliminadas da população ou reparam os seus danos no ADN. Nas células tumorais, é muito comum existirem alterações do gene *p53* ou mesmo a sua inactivação, cujas consequências são a redução ou a ausência da sua função. Desta maneira, as células tornam-se incapazes de morrer por apoptose ou de parar nos pontos de verificação do ciclo celular após a lesão. Contudo, quer ocorra a paragem do ciclo celular, quer ocorra apoptose, o objectivo do *p53* é sempre manter a integridade genómica, evitando que o ADN lesado seja transmitido às células filhas. Assim, alterações neste gene podem provocar alterações na sensibilidade das células tumorais a diversas substâncias, resultando em MDR [1,9,78]. Têm sido propostos alguns modelos para explicar como as células optam entre a paragem do ciclo celular mediada pelo *p53* e a apoptose. Um desses modelos sugere que danos mais profundos no ADN induzem uma maior e mais prolongada activação do *p53*, o que aumenta a probabilidade de ocorrer apoptose, em vez de paragem do ciclo celular.

Alguns estudos correlacionaram a existência de mutações no gene *p53* com a resistência a alguns citostáticos, como por exemplo, o etoposídeo, a adriamicina e o 5-fluorouracilo [78]. Além disso, a expressão do gene *MDR1* é regulada pelo gene *p53* mutante, pois este último estimula o promotor do primeiro. Assim, nos tumores malignos, a expressão da Pgp é activada pelo *p53* mutante [79].

Estudos sobre a regulação do *p53* revelam que o tipo de alterações que activam este gene é dependente do stress, do tecido, da espécie e do tipo de mutação nos aminoácidos que o constituem. As diferentes lesões activam o *p53* de modo distinto, através de diferentes vias de sinalização celular. Estas e outras particularidades na regulação do *p53* determinam diferenças significativas na resposta de diversas células tumorais ao mesmo tipo de lesão, bem como diferentes efeitos de vários agentes no *p53*. Alguns exemplos destes efeitos são a activação do *p53* devido a lesão no ADN que resulta em apoptose dos fibroblastos em humanos. Contudo, nos roedores, a proliferação dos fibroblastos sofre apenas um ligeiro atraso. A sobre-expressão de *p53* em células

pulmonares H1299 aumentam a citotoxicidade da cisplatina, mas protegem as células da acção tóxica da vepesida [80].

A proteína Bcl-2 é expressa na face externa das mitocôndrias das células normais e a sua função é prevenir a permeabilização da membrana mitocondrial e, consequentemente, a libertação do citocromo c. Na eventualidade de ocorrer uma lesão na célula, a Bcl-2 activa a proteína Bax que provoca um aumento na permeabilidade da mitocôndria, conduzindo à libertação do citocromo c, que por sua vez se liga à proteína Apaf-1 (*Apoptotic protease activating factor-1*). Estes complexos agregam-se para formar apoptosomas, ligando-se e activando a caspase-9, uma protease da família das caspases, que por sua vez activa as caspases 3 e 7, que criam uma cascata crescente de actividade proteolítica, conduzindo à digestão de proteínas estruturais do citoplasma, à degradação do ADN cromossómico e, finalmente, à fagocitose celular. Deste modo, os tumores que não são capazes de activar o mecanismo de apoptose em resposta a um sinal de morte são, potencialmente, resistentes aos tratamentos. Consoante ficou demonstrado, a apoptose é um processo regulado por múltiplas etapas, sendo que a mitocôndria desempenha um papel fundamental na cascata apoptótica. Um acontecimento chave no processo apoptótico é o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, cujo controlo é realizado pela família das proteínas Bcl-2, que inclui agonistas (Bax e Bak) e antagonistas de morte (Bcl-2 e Bcl-X). A sobre-expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 evita que as células sofram apoptose induzida por agentes citostáticos. Pensa-se que elevados níveis de expressão de proteína anti-apoptótica Bcl-2 estejam relacionados com a resistência dos tumores à quimio e à radioterapia [81].

A título de síntese desta secção sobre MDR, de referir que quando se pretende estudar os mecanismos de MDR nas células, é necessário ter em conta que, geralmente, diferentes mecanismos de resistência a fármacos estão a actuar na célula simultaneamente, apesar de poder haver um mecanismo predominante que assume maior importância sob a influência de um fármaco específico e/ou de um grupo de células em particular. Por exemplo, a resistência à cisplatina pode estar relacionada com a activação do sistema da glutathione, aumento da acção das bombas de efluxo da substância, alterações na regulação da apoptose e aumento da reparação do ADN [82]. Com efeito, nos últimos anos têm sido desenvolvidos inúmeros agentes anti-tumorais que actuam em diversos alvos da célula e mecanismos no sentido de limitar a proliferação das células malignas. Enquanto que em alguns casos as terapias com estes agentes têm sido bem sucedidas, como por exemplo no caso de leucemia mielocítica crónica, noutros casos, as taxas de sobrevivência mantêm-se praticamente inalteráveis, como acontece no caso dos tumores pulmonares de não pequenas células. A resposta dos tumores aos agentes anti-tumorais é muito diversa, com tumores que

capazes de entrar em remissão completa e, outros, que não respondem a nenhuma das terapêuticas possíveis. Existem ainda aqueles tumores que são quimiossensíveis no início do tratamento mas que rapidamente se expandem e se tornam resistentes a um enorme número de citostáticos, de grupos diferentes e sem qualquer relação entre si [59,68]. Os tumores pulmonares de pequenas células, são um exemplo de tumores que apresentam este tipo de comportamento. Parece evidente que a MDR possui um papel preponderante nesta tão grande heterogeneidade na resposta aos tratamentos com agentes citostáticos e na sua compreensão poderá estar a chave para responder à complexidade das questões que surgem no tratamento das patologias oncológicas. Com efeito, contrariamente ao que se acreditava há alguns anos atrás, considerando-se que a MDR era devida exclusivamente à sobre-expressão da Pgp, sabe-se hoje que a MDR é um processo multifactorial, que pode dever-se à sobre-expressão de outras proteínas resistentes, como a MRP, a LRP, a Bcl-2 que também provocam uma redução na acumulação e retenção de diversas substâncias nas células, mas também se deve a complexos mecanismos de regulação celular em que estão envolvidos processos como a reparação do ADN, a apoptose, a expressão de factores de crescimento que promovem a sobrevivência celular (figura 2.7).

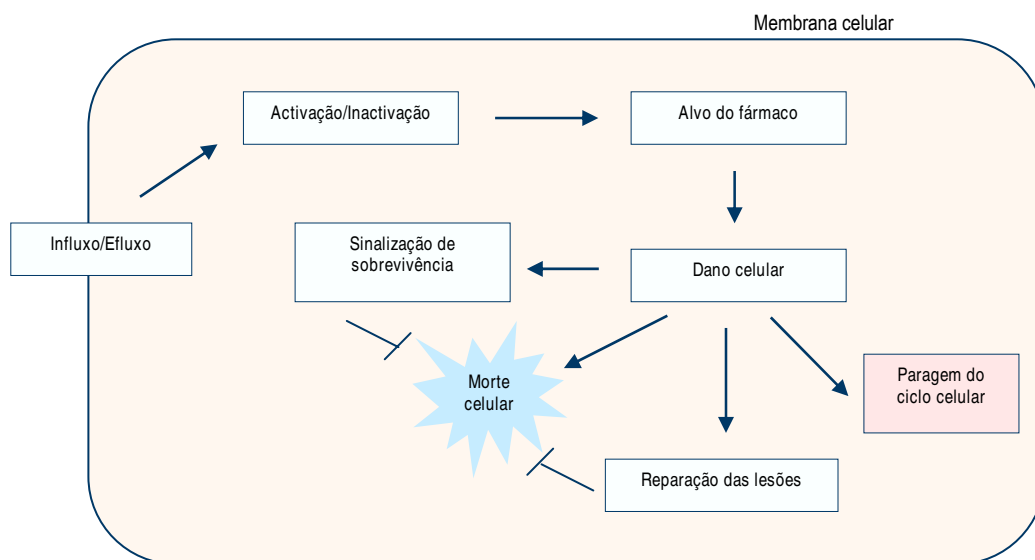


Figura 2.7 – Representação esquemática dos mecanismos de resistência específicos das células tumorais.

Fonte: Longley D, Johnston P. Molecular Mechanisms of Drug Resistance. *J Pathol.* 2005; 205: 276

2.5 MDR em Tumores Pulmonares

Apesar de, no contexto pulmonar, o tipo de MDR melhor caracterizado até à data ser o que é devido à amplificação do sistema *MDR1*-Pgp, a resistência que ocorre nas células dos tumores pulmonares é um processo multifactorial. De facto, podem existir outros mecanismos mais importantes que a Pgp. Infelizmente, a avaliação de MDR em tumores pulmonares pode ser muito complicada, pois a maioria das amostras de tecido é obtida por biopsia broncoscópica, correndo o risco de não representarem todas as características do tumor. A contaminação de amostras do tumor com células normais também é um grande problema quando se avalia e se pretende quantificar as amostras provenientes de biopsia. Além disso, a quantidade muito reduzida de tecido disponível torna impossível a medição e a comparação de diversos parâmetros, como por exemplo, os níveis de proteínas relacionadas com a MDR (Pgp, MRP, LRP) e os níveis de ARNm com uma só amostra.

Apesar de os tumores de pequenas células estarem associados a uma pobre resposta à quimioterapia, a prevalência da Pgp nos tumores pulmonares mantém-se praticamente constante. Diferentes métodos de detecção poderão estar na origem destas discrepâncias. Embora alguns investigadores tenham encontrado uma correlação entre a resposta à quimioterapia e os níveis de expressão da Pgp, de um modo geral, os níveis de expressão desta proteína nos tumores pulmonares são baixos [83-85], não tendo alguns investigadores encontrado diferenças significativas na expressão da Pgp antes e após a quimioterapia nos casos de tumores pulmonares de pequenas células, sugerindo que será pouco provável que a resistência aos tratamentos com citostáticos se deva à sobre-expressão da Pgp [86]. Além disso, há fortes indícios de que haverá outros mecanismos (que não a Pgp) que poderão ser responsáveis pela resistência dos tumores pulmonares, como por exemplo, a expressão do gene *MRP1*. Ainda não há evidências de que a função da MRP1 esteja relacionada com a bomba ATP, mas já foi demonstrado que esta proteína exporta compostos lipofílicos com a glutatona e outros resíduos aniónicos [87]. Cerca de 87% de todos os subtipos histológicos de tumores pulmonares de não pequenas células expressam a MRP1. Foram encontrados em diversos estudos elevados níveis de MRP em tumores pulmonares, com uma incidência de aproximadamente 80 e 100% em tumores pulmonares de pequenas células e de não pequenas células, respectivamente. A expressão do gene *MDR1* foi encontrada em cerca de 25% dos tumores pulmonares [6,59].

2.6 Mecanismos de Localização dos Radiofármacos

A captação e retenção dos radiofármacos por parte dos tumores envolve muitos mecanismos diferentes (como por exemplo, transporte através da membrana celular, ligação a receptores específicos, ligação específica a antígenos do tumor, adsorção físico-química, fagocitose, etc.) Devido ao facto de a maioria dos radiofármacos utilizados em Oncologia Nuclear não ser específico para tumores, a captação de um determinado radiotraçador pode implicar uma combinação de diversos mecanismos. Contudo, as propriedades químicas de cada radiofármaco determinam a forma como é transportado e retido no tumor [46].

As membranas celulares são constituídas por uma bicamada lipídica cuja função é controlar a composição do espaço que delimitam, excluindo uma grande variedade de moléculas e permitindo o movimento de moléculas específicas de um lado da célula para o outro através de sistemas de transporte selectivos. Os mecanismos básicos pelos quais as moléculas são transportadas através das membranas celulares são: difusão passiva, difusão facilitada e transporte mediado. De seguida, serão abordados sucintamente os mecanismos de transporte transmembranar que apresentam maior importância para este trabalho [46].

Transporte Activo

As membranas plasmáticas possuem sistemas de transporte (transportadores) que envolvem proteínas intrínsecas das membranas e que são responsáveis pela translocação de moléculas ou iões através da membrana aos quais se ligam e os fazem mover. Os transportadores são específicos para a substância a ser transportada, apresentam uma cinética própria e podem ser inibidos por mecanismos de acção competitiva ou não competitiva. O transporte activo implica a translocação de um soluto através da membrana celular contra o seu gradiente de concentração, envolvendo gasto de energia. O transporte activo pode ainda ser realizado quer através da hidrólise de ATP para ADP, quer através da utilização de um gradiente electroquímico de Na^+ ou H^+ através da membrana. Se a fonte de energia for inibida ou removida, o sistema de transporte não funcionará [46].

Difusão Simples e Difusão Facilitada

A direcção do movimento de solutos ocorre sempre dos locais de maior para os locais de menor concentração. A taxa inicial de difusão é directamente proporcional à concentração do soluto. O movimento de moléculas de um lado da célula para o outro irá continuar até que a concentração de cada lado atinja o equilíbrio químico. Por exemplo, a difusão de gases como o oxigénio e o dióxido de carbono ocorre rapidamente, dependendo apenas do gradiente de concentração. A taxa de difusão de uma substância lipofílica é directamente proporcional à sua solubilidade lipídica e ao coeficiente de difusão nos lípidos [46].

A difusão facilitada (ou transporte passivo) implica a translocação de um soluto através da membrana celular contra o gradiente de concentração, como ocorre no transporte activo, mas sem gasto de energia [46].

2.7 Detecção funcional de MDR

A quantificação exacta de um determinado marcador biológico é fundamental para avaliar o seu impacto no prognóstico da doença, permitindo prever a sua resposta à terapêutica. A avaliação da expressão de *MDR1*/ Pgp geralmente é efectuada por uma técnica designada de *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR), para avaliar a expressão de ARNm e por imunohistoquímica para avaliar a expressão proteica. Uma limitação intrínseca a estes métodos consiste na inclusão de erros devidos à contaminação do tecido tumoral com tecido normal e com estroma de tecido contendo capilares e linfócitos que podem expressar elevados níveis de Pgp endógena, baixa sensibilidade e especificidade e dificuldades de quantificação (particularmente no caso da imunohistoquímica) [2,59,63]. Variações nas técnicas utilizadas e nos reagentes dos diversos laboratórios complicam a análise dos dados e a sua comparação entre estudos e infelizmente ainda não se chegou a um consenso quanto à uniformização destes métodos de determinação, apesar de já terem sido publicadas recomendações nesse sentido [88]. Um aspecto importante na avaliação de MDR consiste na determinação exacta da expressão de Pgp nos tecidos tumorais e avaliar os efeitos da sua inibição. As determinações da actividade de transporte mediada pela Pgp têm a vantagem de quantificar directamente o potencial que esta proteína apresenta para

transportar substratos para fora das células tumorais, sem a interferência entre a quantidade de proteína ou de ARN e a actividade de transporte. As determinações funcionais quantificam directamente (*in vivo*) a acumulação de substratos fluorescentes ou radioactivos nas células tumorais como marcadores da actividade funcional da Pgp. Assim, é de esperar que a realização de imagens com um radiofármaco que é transportado pela Pgp permita identificar os tumores nos quais o transportador não só é expresso, mas também se encontra funcional. Além disso, a determinação *in vivo* do efeito dos inibidores de MDR nos tumores e nos tecidos não-alvo pode orientar a selecção de agentes quimioterapêuticos (dirigidos aos tumores) e prever a ocorrência de toxicidades que à partida não eram esperadas (nos tecidos não-alvo). Estas possibilidades podem, potencialmente, melhorar a eficácia da quimioterapia [63].

A detecção não invasiva da actividade da Pgp e da MRP baseia-se na utilização de agentes emissores de radiação gama, caracterizados como substratos para estas proteínas. Ao longo dos últimos anos têm sido sintetizados diversos radiofármacos que constituem substratos para a Pgp e para a MRP (quer emissores de fotão simples, quer emissores de positrões) [12,15,27,89-91]. Um radiofármaco pode ser considerado um bom substrato para a avaliação funcional da Pgp se possuir algumas das seguintes características, tais como reduzida ligação não-específica a células, membranas e regiões hidrofóbicas em preparações biológicas, distinção clara entre a captação do radiofármaco por parte das células sensíveis a citostáticos e a captação por parte das células que expressam a Pgp e um aumento acentuado na sua captação por parte das células resistentes após a administração de um inibidor da Pgp [15]. Dos agentes tecneciados, o ^{99m}Tc -sestamibi e a ^{99m}Tc -tetrofosmina são agentes lipofílicos e catiónicos, comercialmente disponíveis. Cada composto é um radiofármaco não metabolizável, com carga monocatiónica, à semelhança da maioria dos agentes citostáticos de primeira linha [63]. Os radiofármacos emissores de positrões que constituem substratos para a Pgp e portanto com potencial para serem aplicados nesta área estão ainda em desenvolvimento. Alguns destes agentes são substratos para a Pgp (como por exemplo a ^{11}C -daunorubicina) e outros são inibidores da Pgp (como por exemplo o ^{11}C -verapamil) [15,40,63].

Ao longo dos últimos anos, os mecanismos de captação e retenção do ^{99m}Tc -sestamibi e de outros agentes tecneciados têm sido estudados por diversos investigadores numa grande variedade de preparações celulares *in vitro*. Hoje sabe-se que o conteúdo celular destes agentes é o resultado de mecanismos como difusão passiva, devido ao gradiente electroquímico, e de extrusão mediada pela Pgp. A entrada na célula do ^{99m}Tc -sestamibi por difusão passiva (na ausência da Pgp) é possibilitada pelos potenciais transmembranares gerados nas células vivas [92,93]. Este complexo é sequestrado de modo reversível na mitocôndria por uma série de forças termodinâmicas existentes

entre a membrana plasmática com potencial negativo e os potenciais da membrana interna da mitocôndria [63]. Contudo, a Pgp opõe-se ao influxo passivo deste complexo. Nas células nas quais há expressão de Pgp, a acumulação do ^{99m}Tc -sestamibi encontra-se diminuída e é tanto menor quanto maior for a expressão desta proteína [12,22]. Quando se administram inibidores da Pgp (como o verapamil), verifica-se que o efluxo do ^{99m}Tc -sestamibi é menor (figura 2.8).

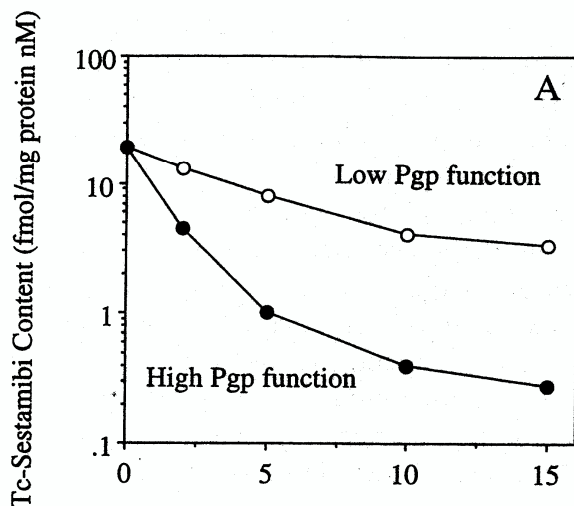


Figura 2.8 – Efluxo do ^{99m}Tc -sestamibi mediado pela Pgp *in vitro*.

As células V79 foram equilibradas (15 min.) com uma solução padrão contendo o radiofármaco e depois transferidas para uma solução sem radiofármaco na ausência (") e presença (|) de verapamil, nos tempos indicados. A actividade associada às células durante o efluxo é representada no gráfico.

Fonte: Piwnica-Worms D et al. Functional Imaging of Multidrug Resistant P-glycoprotein with an Organotechnetium Complex. Cancer Res. 1993; 53: 980

A adição de um inibidor de MDR que bloqueie selectivamente a função da Pgp e assim permite a acumulação do radiotraçador no interior das células, constitui a base para a abordagem funcional da avaliação da expressão da Pgp nos tumores (figura 2.9).

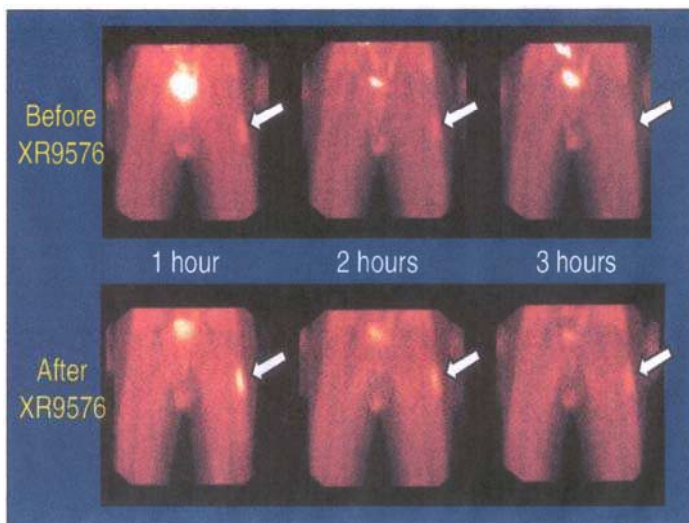


Figura 2.9 – Imagens realizadas com ^{99m}Tc -sestamibi antes e após a administração de XR9576, um inibidor da Pgp.

Após a administração do inibidor da Pgp, verificou-se um aumento de 263% na acumulação do ^{99m}Tc -sestamibi num tumor da coxa, indicando a presença de actividade funcional da Pgp.

Fonte: Leonard G et al. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. Oncologist. 2003; 8: 417

Estudos realizados mais recentemente indicam que o ^{99m}Tc -sestamibi além de ser transportado pela Pgp, também é reconhecido como um substrato pela MRP1 (nas células em cultura), sendo presumivelmente co-transportado com a glutatona [4-6]. *Moretti et al.* demonstraram que a acumulação do ^{99m}Tc -sestamibi em células tumorais humanas que expressam a MRP1 era menor que nas células controlo que não expressavam a proteína e que essa acumulação aumentava quando se reduzia os níveis de glutatona celular [5]. Contudo, a diferença na captação do ^{99m}Tc -sestamibi associada à expressão da MRP1 é significativamente menor que a diferença associada à expressão da Pgp, em condições semelhantes [4]. Assim, apesar da acumulação (e presumível efluxo) do ^{99m}Tc -sestamibi nos tumores poder ser potencialmente afectada pela expressão da MRP1, ela pode ainda depender dos níveis intrínsecos de glutatona nos tumores. De salientar que o impacto funcional da expressão da MRP1 na cinética do ^{99m}Tc -sestamibi nunca foi testada em doentes [63]. Como se pode verificar, a identificação funcional da Pgp e eventualmente da MRP1 pode fornecer informações importantes no sentido de orientar a selecção dos agentes quimioterapêuticos a administrar aos doentes com patologias oncológicas. Os radiofármacos utilizados em aplicações diagnósticas e que constituem substratos para a Pgp e para a MRP1 permitem a identificação funcional *in vivo* da resistência mediada por transportadores no âmbito de vários tumores.

2.8 Caracterização do ^{99m}Tc -sestamibi e respectiva utilização na detecção de MDR

O ^{99m}Tc -sestamibi [hexakis-2-metoxi-isobutil-isonitrilo de tecnécio (I)] é um composto lipofílico e catiónico, inicialmente desenvolvido para estudos de perfusão do miocárdio. Através de análise química, foi possível conhecer que este agente é um catião monovalente, no qual o átomo de tecnécio (Tc) ocupa uma posição central, rodeado por 6 ligandos alquil-isonitrilos, dispostos segundo uma geometria octaédrica (figura 2.10) [12]. Em 1987, *Muller et al.* observaram que este agente se acumulava em tumores pulmonares [10]. A partir daí, foram desenvolvidos diversos estudos com este e outros agentes lipofílicos e catiónicos (como por exemplo, a tetrofosmina e a furifosmina) no âmbito de diversos tumores (adenomas das paratiróides, tumores do cérebro, mama,

tiróide, osteossarcoma), com o objectivo de avaliar não só a existência, a localização e o desenvolvimento desses tumores, mas também a sua resposta aos tratamentos (procurando identificar o desenvolvimento de MDR, uma vez que muitos dos fármacos que interagem com a Pgp são também lipofílicos e catiónicos) [12].

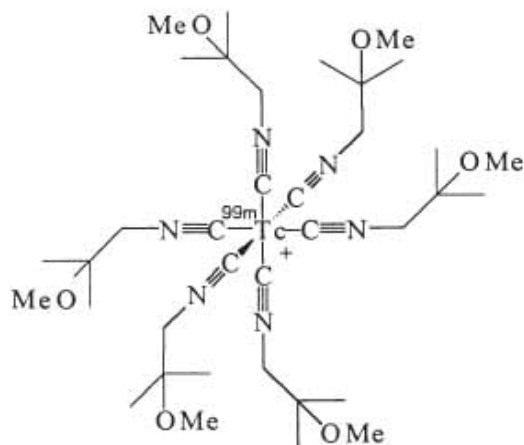


Figura 2.10 – Estrutura química do ^{99m}Tc -sestamibi

Fonte: Hendrikse N, Franssen E, van der Graaf W. Visualization of Multidrug Resistance *In Vivo*. *Eur J Nucl Med*. 1999; 26: 286

A maioria dos compostos que se localizam nos tumores utiliza o transporte membranar como mecanismo para a sua concentração nesses tumores. As substâncias lipofílicas, de um modo geral, atravessam facilmente a membrana plasmática. À medida que as células tumorais se dividem, a área de superfície membranar aumenta, tornando-se mais permeável a algumas substâncias.

Apesar de o ^{99m}Tc -sestamibi ser um composto catiónico semelhante ao tálio-201 (composto catiónico monovalente), o transporte deste agente através da membrana celular ocorre por difusão passiva (e não por transporte activo como o tálio-201) [93-95]. *Piwnicka-Worms et al.* verificaram, num estudo com miócitos de galinha, que a entrada do ^{99m}Tc -sestamibi na célula depende do metabolismo da mitocôndria e do potencial negativo da sua membrana interna, bem como dos potenciais da membrana plasmática [12,92]. Com efeito, a lipofilicidade e a carga catiónica do ^{99m}Tc -sestamibi desempenham um papel muito importante na sua acumulação e retenção nas células: a carga catiónica deste composto promove a interacção electrostática com a carga negativa do citosol e dos potenciais da membrana mitocondrial; a lipofilicidade e a estrutura da molécula favorecem a difusão passiva através da bicamada lipídica da membrana plasmática [96]. Outro factor que influencia a captação do ^{99m}Tc -sestamibi por parte do tumor é o grau de perfusão do mesmo. Os

mecanismos de captação do sestamibi, da tetrofosmina e da furifosmina foram comparados com os do tálio-201 em células tumorais. A captação do ^{99m}Tc -sestamibi e da ^{99m}Tc -tetrofosmina estão dependentes da temperatura, enquanto que a da furifosmina é menos influenciada por este parâmetro [37,95,97]. Enquanto que o tálio se localiza no citoplasma, os agentes tecnecizados localizam-se na mitocôndria [95,97]. Em estudos realizados *in vitro*, verificou-se que existem diferenças entre o sestamibi e a tetrofosmina no que diz respeito ao transporte através da membrana e à localização intracelular. A ouabaina, um inibidor da bomba Na^+/K^+ - ATPase não produziu nenhum efeito ou aumentou a captação do sestamibi, enquanto que no caso da tetrofosmina, a captação foi significativamente menor, o que sugere que cerca de 20 a 30% da captação deste agente é mediada por um processo de transporte activo. Relativamente ao tálio-201, houve uma redução de mais de 70% na sua captação na presença de ouabaina [46]. Estes estudos permitiram concluir que a captação de tálio-201 não traduz a actividade funcional da Pgp, mas traduz a perfusão do tumor.

Através do uso de nigericina (substância que provoca rotura da membrana celular, resultando num aumento do potencial da membrana interna da mitocôndria) verificou-se uma diminuição significativa na captação de tálio e um aumento na captação de sestamibi e de tetrofosmina [37,93,98]. Estudos realizados com um inibidor da fosforilação oxidativa (*Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazine*) que despolariza o potencial da membrana mitocondrial, demonstraram que cerca de 90% do sestamibi se localiza na mitocôndria, enquanto que a maior parte da tetrofosmina se localiza no citosol [37,93,98]. Os mesmos resultados foram obtidos por Carvalho *et al.* num estudo realizado com ratos, *in vivo* [99]. As células mortas não captam qualquer um dos agentes mencionados, o que sugere que a captação tumoral destes representa apenas células viáveis e metabolicamente activas. Num estudo com utilização de cobaias, Crane *et al.* demonstraram que o local de acumulação intracelular do ^{99m}Tc -sestamibi é precisamente na mitocôndria [100]. Maffioli *et al.* verificaram que o ^{99m}Tc -sestamibi se localiza em tecidos com elevados níveis de mitocôndrias, no sentido de suportar o aumento de metabolismo, com consequente aumento do potencial negativo da membrana mitocondrial, como ocorre nos tumores malignos e no miocárdio [92,95,101]. A figura 2.11 representa o mecanismo de captação do ^{99m}Tc -sestamibi e o local de acumulação celular.

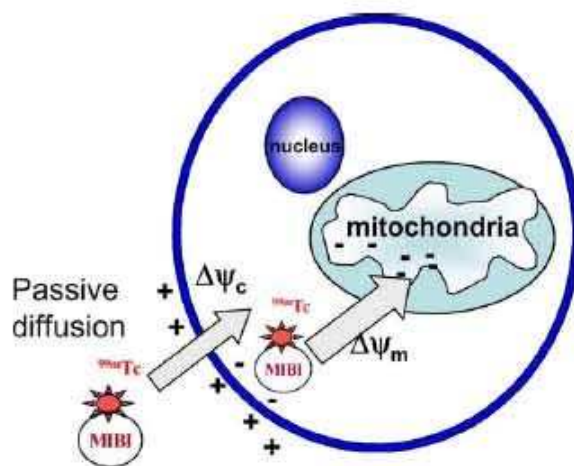


Figura 2.11 – Mecanismo de captação do ^{99m}Tc -sestamibi pelas células. Este mecanismo é conduzido pelo potencial transmembranar da membrana celular, $\Delta\psi_c$. Após a entrada na célula, o ^{99m}Tc -sestamibi acumula-se na mitocôndria em resposta ao potencial mitocondrial transmembranar, $\Delta\psi_m$.

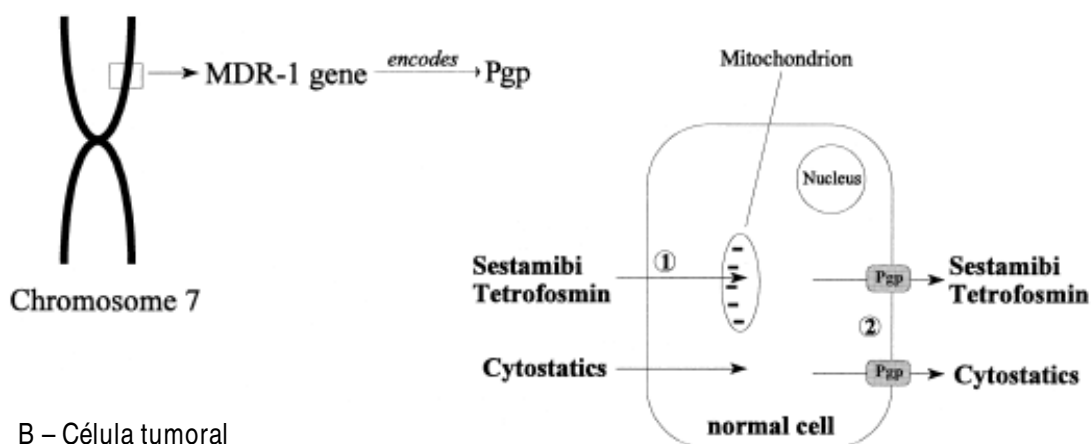
Fonte: Moretti J, Hauet N, Caglar M, et al. To Use or not to Use MIBI? That is the Question when Assessing Tumour Cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005; 32:837

Através da utilização modelos *in vitro* para o estudo da acumulação intracelular do ^{99m}Tc -sestamibi por parte das células tumorais, foi possível demonstrar que este processo ocorre de forma mais lenta comparativamente com o que acontece nos estudos *in vivo* (cerca de 40 a 60 minutos na situação *in vitro*, versus alguns minutos na situação *in vivo*) e que além disso, cada tipo de célula parece possuir um padrão de captação específico, ou seja, alguns tipos de células acumulam caracteristicamente melhor o ^{99m}Tc -sestamibi que outros, para as mesmas condições de concentração extracelular deste composto [94].

Por outro lado, a acumulação e retenção do ^{99m}Tc -sestamibi nas células tumorais também estão relacionadas com a saída do radiofármaco das células. Esta saída, consoante já foi referido, é mediada pela Pgp. Com efeito, *Maffioli et al.* propuseram que o mecanismo de extrusão responsável pelo transporte do ^{99m}Tc -sestamibi para fora das células tumorais está relacionado com a resistência a múltiplos fármacos, como por exemplo, as antraciclinas, alcalóides vinca, actinomicina D, etc. [101]. A partir das suas experiências, *Piwnicka-Worms et al.* encontraram diversas evidências que suportam a hipótese de que o ^{99m}Tc -sestamibi é um substrato reconhecido pela Pgp, nomeadamente: quer as células sensíveis, quer as resistentes acumularam rapidamente este composto, sendo o grau de acumulação inverso do grau de expressão da Pgp; diversos agentes conhecidos como sendo inibidores da Pgp, como o verapamil e a ciclosporina A, aumentaram a concentração de ^{99m}Tc -sestamibi nos tumores; a taxa de captação inicial de ^{99m}Tc -sestamibi foi

idêntica quer nas células sensíveis, quer nas resistentes, quando a Pgp foi inibida com verapamil (este facto indica a menor acumulação ou retenção nas células com maior expressão de Pgp é o resultado do aumento da extrusão do agente e não devido a um menor influxo do mesmo) [12]. Com base nestes resultados, têm sido desenvolvidos diversos trabalhos no sentido de utilizar a cintigrafia com ^{99m}Tc -sestamibi como uma ferramenta para avaliar o desenvolvimento de MDR nos tumores (ou procurar prever quais os tumores que irão desenvolver MDR), com o objectivo de ajudar a orientar o esquema quimioterapêutico desses doentes. A figura 2.12 ilustra os princípios subjacentes à utilização do ^{99m}Tc -sestamibi como agente imagiológico para a detecção de MDR.

A – Célula normal



B – Célula tumoral

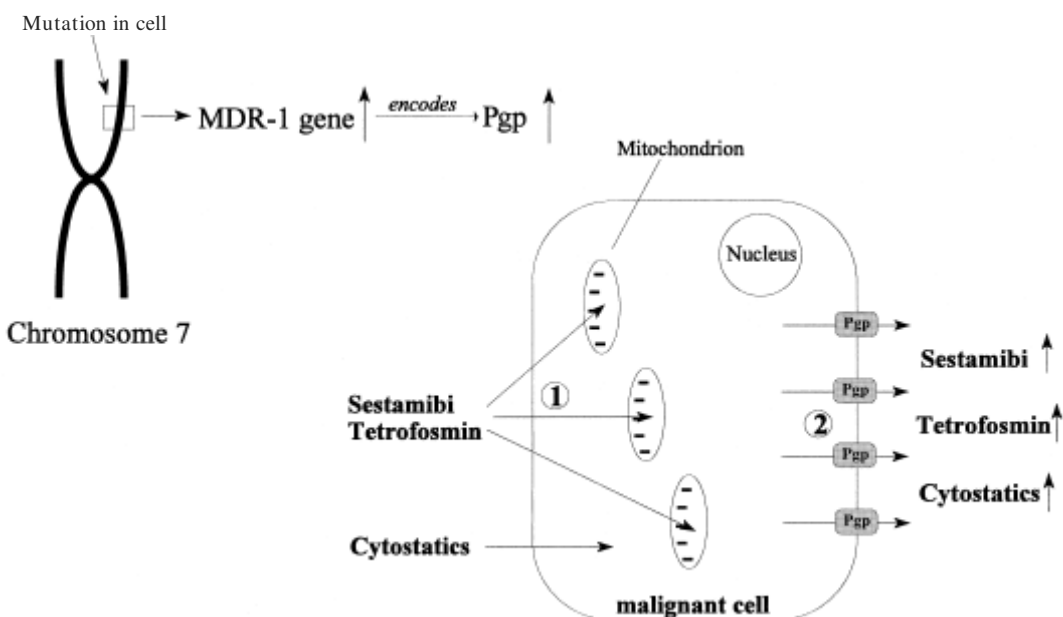


Figura 2.12 – Representação esquemática dos princípios subjacentes à utilização de ^{99m}Tc -sestamibi e de ^{99m}Tc -tetrofosmina como agentes imagiológicos para a detecção de MDR.

Em A: a captação do radiofármaco é devida ao potencial negativo da membrana das mitocôndrias. A acumulação nestes organelos ocorre por difusão. A Pgp é responsável pelo transporte de agentes citotóxicos para fora da célula.

Em B: Nos tumores há um aumento do número de mitocôndrias devido ao facto de o metabolismo de encontrar aumentado. Nos tumores há um aumento da expressão da Pgp, com consequente aumento da extrusão de agentes citotóxicos, originando MDR.

Fonte: Pauwels E, McCready V, Stoot J, van Deurzen D. The Mechanism of Accumulation of Tumour-localising Radiopharmaceuticals. *Eur J Nucl Med*. 1998; 25: 289

Alguns autores utilizaram o ^{99m}Tc -sestamibi para a avaliação de tumores pulmonares primários, tendo concluído que este agente é útil no estadiamento destes tumores, além de possuir um valor acrescido na avaliação de envolvimento mediastínico relativamente aos métodos radiológicos, cujas limitações nesta área são bem conhecidas, uma vez que avaliam a natureza dos nódulos linfáticos com base apenas nas suas dimensões.

Chiti et al. avaliaram a eficácia diagnóstica do ^{99m}Tc -sestamibi em doentes com tumores pulmonares de não pequenas células, que foram submetidos a outros exames para realizar o estadiamento (radiografia, TC e broncoscopia por fibra óptica). O envolvimento linfático foi demonstrado histologicamente. Neste estudo, a tomografia com ^{99m}Tc -sestamibi e a TC atingiram valores de sensibilidade e de especificidade de 91 e 84% versus 84 e 60%, respectivamente, demonstrando a utilidade da cintigrafia com ^{99m}Tc -sestamibi no estadiamento de tumores pulmonares. Os mesmos autores salientam que a eficácia diagnóstica aumenta quando se combina a cintigrafia com ^{99m}Tc -sestamibi com técnicas como a TC ou a RM [39].

Um outro estudo realizado por *Nosotti et al.* no sentido de determinar a possibilidade de utilizar a cintigrafia com ^{99m}Tc -sestamibi no diagnóstico e estadiamento de tumores pulmonares revelou que esta técnica possui uma especificidade de 100% na avaliação de malignidade [102].

No anexo A são apresentadas características adicionais deste radiofármaco, bem como os testes de controlo de qualidade que lhe dizem respeito.

CAPÍTULO 3

DOENTES, MATERIAL e MÉTODOS

Desde Novembro de 2004 até Janeiro 2006 foram efectuados exames a um total de 12 doentes, 7 do sexo masculino e 5 do sexo feminino, com idades compreendidas entre 44 e 75 anos (média $\pm$ desvio-padrão: 62,8 $\pm$ 10,6 anos). Todos os indivíduos incluídos neste estudo apresentavam como característica comum o diagnóstico de patologia pulmonar maligna de carácter inoperável, correspondendo portanto, a doentes classificados no estadio IIIB ou IV (ou doença disseminada, no caso de tumores de pequenas células): 10 doentes com tumores de não pequenas células (7 adenocarcinomas e 3 carcinomas epidermóides) e um doente com tumor de pequenas células. De salientar que um dos doentes (doente 11) foi diagnosticado inicialmente com tumor pulmonar de não pequenas células, tendo-se vindo a confirmar posteriormente que se tratava de um sarcoma, pelo que foi excluído do estudo.

Os doentes foram sujeitos a duas avaliações: a primeira antes do início da quimioterapia e a segunda cerca de uma a duas semanas após a conclusão do terceiro ciclo quimioterapêutico. A razão para a segunda avaliação se realizar nesta altura deve-se ao facto de coincidir com o momento em que os doentes são sujeitos a uma reavaliação completa da situação, de acordo com o protocolo estabelecido pelo Departamento de Doenças Pneumológicas e Alergológicas dos Hospitais da Universidade de Coimbra. Nesta altura, o doente além da avaliação cintigráfica, realiza também uma tomografia computadorizada no Serviço de Radiologia e avaliação clínico-laboratorial.

O desfasamento temporal entre as duas avaliações foi de dois a três meses. Durante o tempo que mediou as avaliações, ocorreram três óbitos (25% dos casos) entre os doze doentes que iniciaram o estudo, pelo que nestes casos, apenas se realizou a primeira avaliação. Pelo exposto, dos doze doentes restaram apenas oito, que constituirão a base de estudo deste trabalho. A título meramente informativo, já foram integrados no estudo mais três doentes, contudo até à presente data apenas realizaram a primeira avaliação, pelo que não serão considerados os respectivos resultados (devido ao facto de se encontrarem incompletos). O quadro 3.1 resume as principais características dos doentes estudados.

Quadro 3.1 – Principais características dos doentes estudados

Caso	Iniciais	Sexo	Idade	Histologia	Estadio	Classificação TNM
1	AC	F	66	Adenocarcinoma	IIIB	T4N3M0
2	AG (+)	M	69	Carcinoma epidermóide	IIIB	T4N2Mx
3	FF	M	75	Adenocarcinoma	IV	T4N0M1
4	RJ	F	55	Pequenas células	Doença extensa	-
5	LC	M	44	Carcinoma epidermóide	IIIB	T4N0M0
6	CC	F	51	Adenocarcinoma	IV	T1N3M1
7	EC (+)	M	47	Adenocarcinoma	IIIB	T4N0Mx
8	LL	F	74	Adenocarcinoma	IV	T4N0M1
9	SP	M	68	Carcinoma epidermóide	IIIB	T4N2M0
10	AP	M	68	Adenocarcinoma	IV	T4N2M1
11	AR	F	68	Diagnóstico inicial errado	-	-
12	JC (+)	M	69	Adenocarcinoma	IV	T4N3M1

Legenda: (+) - os doentes faleceram antes de poder realizar a segunda avaliação

No âmbito deste estudo, em acordo com as normas vigentes e de aplicação corrente em casos deste género, foi submetido o pedido de autorização à Comissão de Ética dos Hospitais da Universidade de Coimbra, tendo merecido a sua aprovação formal. Os doentes assinaram ainda, a título individual, um documento designado de Consentimento Informado, após lhes ter sido devidamente explicado todo o procedimento a que iriam ser sujeitos.

O radiofármaco utilizado foi o ^{99m}Tc -sestamibi (Cardiolite®, Bristol-Myers Squibb), tendo sido preparado de acordo com as normas aconselhadas pelo fabricante. Depois de preparado, o radiofármaco foi sistematicamente sujeito a testes de controlo de qualidade, nomeadamente a determinação do pH, da pureza química, da pureza radionuclídica e da pureza radioquímica (o protocolo de preparação e controlo de qualidade do ^{99m}Tc -sestamibi encontram-se no anexo A). Este programa de testes foi seguido exaustivamente e os resultados obtidos foram sempre favoráveis. De salientar que os valores de pureza radioquímica obtidos foram sempre superiores a 96% (sendo que o limite mínimo de aceitabilidade se situa nos 90%). Além dos testes de controlo de qualidade efectuados ao radiofármaco, também se realizaram sistematicamente testes de controlo de qualidade ao equipamento utilizado para a aquisição das imagens (câmara gama GE 400 AC),

nomeadamente, verificação do fotopico, teste de uniformidade do campo de visão, teste de resolução e linearidade espacial e determinação do centro de rotação, de acordo com a periodicidade aconselhada pelo fabricante (a explicação e descrição dos testes efectuados ao equipamento encontram-se no anexo B).

Após a explicação do procedimento e da obtenção do Consentimento Informado, o doente foi posicionado em decúbito dorsal na mesa de aquisição de imagens. O equipamento utilizado foi uma câmara gama da *General Electric*, modelo 400 AC, de campo de visão circular e um detector, equipado com um colimador de baixa energia e alta resolução, buracos paralelos.

Após o correcto posicionamento do doente procede-se à injeção de 740 MBq (20mCi) de ^{99m}Tc -sestamibi na veia antecubital do braço contralateral ao lado onde o tumor foi identificado. De salientar que no momento da avaliação cintigráfica, o doente fez-se acompanhar pelo processo clínico bem como pelo relatório da tomografia computadorizada, realizada previamente. A aquisição de imagens iniciou-se 5 minutos após a injeção na região do tórax. Foram adquiridas imagens estáticas com 5 minutos de duração em projecções posterior e anterior, numa matriz de 256 x 256 *pixels*. Aos 20 minutos, foi adquirida uma tomografia (SPECT – *Single Photon Emission Computed Tomography*) numa órbita de 360°, com 64 projecções, 30 segundos por projecção, numa matriz de 128 x 128 *pixels*. No final da aquisição do SPECT, repetiram-se as imagens estáticas, na mesma ordem e segundo as mesmas condições de aquisição que as primeiras, que tiveram lugar aos 60 e 65 minutos após a primeira série de imagens (65 e 70 minutos após a administração do radiofármaco).

A aquisição do SPECT teve como objectivo uma melhor caracterização da situação em cada caso, tendo sido realizada em todos os doentes. Esta aquisição revelou-se particularmente útil na detecção e localização de tumores presentes no lobo inferior do pulmão esquerdo, dada a sua proximidade com o coração. Contudo, dada a impossibilidade de realizar uma segunda aquisição SPECT devido a constrangimentos logísticos, decidiu-se pela utilização exclusiva da informação obtida através da análise das regiões de interesse (*Regions of Interest* – ROIs) delineadas nas imagens estáticas.

No que diz respeito ao processamento da informação obtida, utilizou-se como metodologia a delimitação de ROIs no tumor (T) e na região correspondente do pulmão normal contralateral (PC) para permitir a avaliação quantitativa dos dados obtidos. Foram delimitadas ROIs exactamente iguais nas projecções posterior e anterior. A ROI do tumor foi desenhada manualmente, tendo o cuidado de envolver estritamente a região tumoral. Através da técnica de “espelhamento” (*mirroring*), foi criada uma ROI no pulmão contralateral exactamente igual à ROI do tumor, sendo utilizada como

referência “normal”. Com os valores obtidos para cada ROI em cada projecção, calculou-se a média geométrica das contagens. Depois, foi calculada a razão T/PC utilizando a seguinte fórmula: (contagens médias da ROI tumoral na projecção posterior x contagens médias da ROI tumoral na projecção anterior)^{1/2} / (contagens médias da ROI no pulmão contralateral na projecção posterior x contagens médias da ROI no pulmão contralateral na projecção anterior)^{1/2}. As contagens médias dizem respeito ao quociente entre o número de contagens total e o número de *pixels* presentes na ROI. A razão T/PC calculada desta forma designa-se de coeficiente de captação precoce (T/PC_{prec}) ou tardio (T/PC_{tard}) de acordo com o momento em que as imagens foram adquiridas, aos 5 e 10 minutos ou 65 e 70 minutos, respectivamente. Na situação específica da determinação do coeficiente de captação tardio, utilizaram-se valores que foram previamente corrigidos em função do decaimento radioactivo para o tecnécio-99m. Foi também calculado o coeficiente de retenção, que corresponde à diferença entre o coeficiente de captação tardio e o coeficiente de captação precoce. O índice de retenção foi calculado de acordo com *Bom et al.*, utilizando a seguinte fórmula: IR(%) = [(T/PC_{tard}) / (T/PC_{prec})] x 100 [7]. A taxa de eliminação por hora foi calculada de acordo com *Kostakoglu et al.*, utilizando a seguinte fórmula: TE(%) = [(T/PC_{prec} - T/PC_{tard}) / (T/PC_{prec} x t)] x 100, onde t corresponde ao tempo, em horas, decorrido entre as aquisições de imagens estáticas [14], sendo neste caso de uma hora. Calcularam-se diversos indicadores, mas decidiu-se assentar as conclusões naqueles que foram considerados os mais sensíveis, nomeadamente, o índice de retenção e a taxa de eliminação por hora, ambos em percentagem, que se baseiam na análise da relação entre o coeficiente de captação precoce e tardio. Esta escolha foi sustentada igualmente pela maioria das fontes bibliográficas consultadas [7,8,14,103-108]. Sintetizando, os indicadores calculados e respectivas fórmulas foram os seguintes (tendo sempre por base a determinação da média geométrica das contagens entre as projecções posterior e anterior, de acordo com a fórmula referida anteriormente):

Coeficiente de captação precoce:

$$T/PC_{prec} = \text{Contagens médias ROI T}_{(5min)} / \text{Contagens médias ROI PC}_{(5 min)}$$

Coeficiente de captação tardio:

$$T/PC_{tard} = \text{Contagens médias ROI T}_{(60min)} / \text{Contagens médias ROI PC}_{(60 min)}$$

Coeficiente de retenção:

$$CR = T/PC_{tard} - T/PC_{prec}$$

Índice de retenção:

$$IR(\%) = (T/PC_{tard} / T/PC_{prec}) \times 100$$

Taxa de eliminação por hora:

$$TE(\%) = [(T/PC_{prec} - T/PC_{tard}) / (T/PC_{prec} \times t)] \times 100$$

Com o objectivo de efectuar a análise dos resultados obtidos, os doentes foram divididos em dois grupos, de acordo com a resposta à quimioterapia. Para verificar se existiam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, aplicou-se o teste de Mann-Whitney, que neste contexto, é o teste mais adequado. A opção por este teste não paramétrico relaciona-se com o reduzido tamanho da amostra ($n < 30$ elementos) e pelo facto de se compararem grupos independentes. Deste modo, foram primeiro calculados os valores dos indicadores acima mencionados para ambos os grupos, comparando-se depois a mediana e o intervalo inter-quartilico. O teste estatístico referido, foi efectuado para um grau de confiança de 95%.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Tendo-se procedido à análise dos dados recolhidos no sentido de averiguar se a resposta dos doentes à terapêutica (quantificada em termos de tempo de sobrevida) era influenciada ou não pelo sexo, idade, tipo histológico do tumor e respectivo estadio e regime quimioterapêutico, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) para estas variáveis (quadro 4.1).

Quadro 4.1 – Características dos doentes, respectivos tumores, regime quimioterapêutico e tempo de sobrevida após o diagnóstico da doença.

Caso	Sexo	Idade	Histologia	Estadio	Classificação TNM	Regime Quimioterap	Tempo Sobrevida (meses)
1	F	66	Adenocarcinoma	IIIB	T4N3M0	Carbo + Gem	5
2	M	69	Carcinoma epidermóide	IIIB	T4N2Mx	Carbo + Vino	2
3	M	75	Adenocarcinoma	IV	T4N0M1	Vino oral	12
4	F	55	Pequenas células	Doença extensa	-	Carbo + Etop	11
5	M	44	Carcinoma epidermóide	IIIB	T4N0M0	Carbo + Gem	9
6	F	51	Adenocarcinoma	IV	T1N3M1	Carbo + Gem	>11
7	M	47	Adenocarcinoma	IIIB	T4N0Mx	-	1
8	F	74	Adenocarcinoma	IV	T4N0M1	Carbo + Docet	>11
9	M	68	Carcinoma epidermóide	IIIB	T4N2M0	Carbo + Gem	Vivo
10	M	68	Adenocarcinoma	IV	T4N2M1	Carbo + Docet	8
11	F	68	Diagnóstico inicial errado	-	-	-	-
12	M	69	Adenocarcinoma	IV	T4N3M1	Carbo + Gem	1

Legenda: Carbo – Carboplatina; Gem – Gemcitabina; Vino – Vinorelbina; Etop – Etoposídeo; Docet – Docetaxel

Os doentes 2, 7 e 12 faleceram antes de poder realizar a segunda avaliação. O doente 7 faleceu com um enfarte agudo do miocárdio, não tendo iniciado a quimioterapia. As datas exactas de falecimento dos doentes 6 e 8 são desconhecidas.

Após o cálculo e análise de diversos indicadores, tais como os coeficientes de captação precoce e tardio, o coeficiente de retenção, o índice de retenção e a taxa de eliminação por hora, verificou-se que os mais sensíveis são os três últimos. Com efeito, estes indicadores traduzem relações entre os coeficientes de captação precoce e tardio, não sendo portanto tão influenciados por variáveis inerentes ao estudo e que podem constituir factores de erro, de que são exemplos as variações na actividade administrada, factores inerentes à administração endovenosa do

radiofármaco (por exemplo, lavagem mais ou menos efectiva da seringa, extravasão parcial de actividade), variações no posicionamento dos doentes, variações na distância doente – detector, etc. Por este motivo, na análise dos resultados será dada maior ênfase aos três indicadores referidos, concretamente ao coeficiente de retenção, ao índice de retenção e à taxa de eliminação do radiofármaco pelo tumor.

Para a análise dos resultados, optou-se por se dividir os doentes em 2 grupos, de acordo com a resposta à quimioterapia, baseada no tempo de sobrevida após o diagnóstico. Em termos objectivos, considerou-se que um tempo de sobrevida igual ou superior a 10 meses corresponde a uma boa resposta ao tratamento. Este limiar parece adequado, sobretudo se se tiver em conta o estadio avançado dos doentes estudados, nos quais a sobrevida é muito reduzida (sobrevida por 5 anos inferior a 5%) [42]. Assim, excluindo o doente 11, pelos motivos já referidos, e os doentes 2, 7 e 12 pelos motivos enunciados de seguida, pode dizer-se que 62,5% dos doentes (5/8) apresentaram uma boa resposta à quimioterapia. Uma sobrevida inferior a 10 meses corresponde a uma ausência de resposta à terapia, facto que se verificou em 37,5% dos casos.

Além do doente 11, serão então excluídos da análise dos resultados, os doentes 2, 7 e 12. No caso deste último, aquando da primeira avaliação ocorreu um problema técnico com a administração endovenosa do radiofármaco, tendo este facto impossibilitado o processamento das imagens adquirias. Além disso, este doente faleceu entretanto não havendo possibilidade de repetir o estudo. Os doentes 2 e 7 também faleceram sem realizar a segunda avaliação, facto que por si só não impediria a análise do primeiro estudo, realizado antes da quimioterapia. O óbice reside no facto de estes doentes terem falecido por motivos não relacionados com a patologia maligna aqui em estudo, sendo de que o doente 7 nem chegou a iniciar o tratamento. Pelos motivos expostos, a análise dos resultados ficará limitada aos 8 elementos restantes.

Antes de avançar para a análise dos valores, é importante relembrar qual o princípio que estará subjacente a essa análise. Sabe-se que o radiofármaco entra na célula através de um mecanismo semelhante ao dos citostáticos de primeira linha utilizados no tratamento de patologias malignas pois, à semelhança do ^{99m}Tc -sestamibi, são compostos lipofílicos e catiónicos. Assim, através da análise do comportamento do traçador radioactivo na célula, será possível prever o comportamento dos citostáticos e, deste modo, predizer se o doente irá responder ou não à quimioterapia. Se o tumor apresentar uma boa captação e uma retenção estável do ^{99m}Tc -sestamibi, isso significa que acontecerá o mesmo com os citostáticos. Se tal acontecer, é de esperar uma boa eficácia da quimioterapia. Ao invés, se o tumor captar o radiofármaco mas não apresentar uma boa retenção, significará que o citostático apesar de entrar na célula, não permanece lá o tempo

suficiente para produzir a sua acção. Nestes casos, pensa-se que a saída do radiofármaco e dos citostáticos será devida à acção de proteínas transmembranares, como a Pgp e a MRP1, que provocam a sua extrusão. Com efeito, diversos estudos comprovaram que o ^{99m}Tc -sestamibi é um substrato de ambas as proteínas [4-6] e que o grau de expressão destas determina a resistência a diversos citostáticos, reduzindo a sua retenção nas células malignas [12,23,31,103,105,109-111]. Isto indica que a captação do ^{99m}Tc -sestamibi e dos citostáticos por estas células está relacionado com os mesmos factores, nomeadamente a perfusão do tumor, metabolismo e viabilidade celular e a expressão de genes relacionados com a MDR, que na sua globalidade afectam a acção farmacológica dos últimos e, conseqüentemente, os resultados da quimioterapia. Com efeito, por vezes, o citostático não chega sequer a entrar na célula devido à impermeabilidade mitocondrial, provocada pela acção da família de proteínas Bcl-2, consoante foi explicado no capítulo 2 deste trabalho. Deste modo, o grau de captação e retenção do ^{99m}Tc -sestamibi nas células tumorais é o resultado do balanço de todos estes factores, podendo ser considerado uma ferramenta não invasiva para avaliar, *in vivo*, a quimiossensibilidade dos tumores [112].

Avaliação pré-quimioterapia

Nos quadros 4.2 e 4.3 são apresentados os valores dos diversos indicadores calculados, respectivamente relacionados com os doentes que respondem e com os doentes que não respondem à quimioterapia. Os valores em questão dizem respeito à primeira avaliação, realizada, portanto, antes de os doentes iniciarem a quimioterapia.

Quadro 4.2 – Primeira avaliação dos doentes que responderam à quimioterapia

Doente	Histologia	T/PC _{prec}	T/PC _{tard}	CR	IR (%)	TE (%)
3. FF	Adenoc	1,16	1,19	0,03	102,38	-2,38
4. RJ	PC	1,61	1,68	0,07	104,01	-4,01
6. CC	Adenoc	1,36	1,35	-0,01	98,91	1,09
8. LL	Adenoc	1,61	1,56	-0,05	96,99	3,01
9. SP	C epiderm	2,26	2,17	-0,09	95,97	4,03

Legenda: Adenoc – Adenocarcinoma; PC – Tumor de pequenas células; C epiderm – Carcinoma epidermóide

Quadro 4.3 – Primeira avaliação dos doentes que não responderam à quimioterapia

Doente	Histologia	T/PC _{prec}	T/PC _{tard}	CR	IR (%)	TE (%)
1. AC	Adenoc	1,44	1,32	-0,13	91,12	8,88
5. LC	C epiderm	1,93	1,7	-0,24	87,79	12,21
10. AP	Adenoc	1,42	1,29	-0,12	91,19	8,81

Legenda: Adenoc – Adenocarcinoma; C epiderm – Carcinoma epidermóide

Pelo facto de a amostra ser tão reduzida ($n = 8$), optou-se por efectuar a análise dos resultados de acordo com a mediana e o intervalo inter-quartilico (1º quartil – 3º quartil), dado que, à semelhança da média, a mediana é uma medida de tendência central, mas não é tão afectada pelos valores extremos que possam existir na distribuição.

Neste estudo, todos os tumores apresentaram positividade para a captação de ^{99m}Tc -sestamibi, ou seja, não houve nenhum caso em que o tumor fosse detectado na TC e não fosse visualizado na cintigrafia.

A mediana do T/PC_{prec} dos doentes que respondem em comparação com a dos que não respondem à quimioterapia é de 1,61 (1,36 – 1,61) *versus* 1,44 (1,43 – 1,69), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p = 0,964$). O coeficiente de captação precoce traduz a perfusão e a captação inicial do radiofármaco pelo tumor, reflectindo também o estado geral da mitocôndria em termos da permeabilidade e da preservação dos potenciais da membrana mitocondrial [113]. Dado não haver diferenças entre os grupos estudados, conclui-se que os tumores apresentam perfusão e metabolismo semelhantes, estando os potenciais de membrana preservados.

A mediana do T/PC_{tard} dos doentes que respondem comparativamente com a dos que não respondem à quimioterapia é de 1,56 (1,35 – 1,68) *versus* 1,32 (1,31 – 1,51), não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p = 0,786$), o que já era de esperar, visto também não se terem verificado diferenças em termos de coeficiente de captação precoce. O coeficiente de captação tardio traduz a quantidade de radiofármaco presente no tumor aos 65 minutos após a sua administração. Um valor de T/PC_{tard} reduzido em relação ao T/PC_{prec} significa que o radiofármaco está a ser eliminado do tumor, não apresentando uma retenção estável. É de esperar que o valor do T/PC_{tard} seja consideravelmente mais baixo quando comparado, para o

mesmo tumor, com o T/PC_{prec} nos doentes que não respondem à quimioterapia, o que indicará a existência de bombas de efluxo transmembranares funcionalmente activas (estas diferenças entre os coeficientes de captação serão explicadas de seguida).

A mediana do coeficiente de retenção dos doentes que respondem em relação aos que não respondem à quimioterapia é de -0,01 (-0,05 – 0,03) *versus* -0,13 (-0,19 – -0,13), havendo diferenças significativas entre os grupos estudados ($p = 0,036$). O CR traduz a diferença entre os coeficientes de captação tardio e precoce, o que significa que, em caso de eliminação do radiofármaco do tumor, este coeficiente assumirá valores negativos. No caso presente, a mediana deste coeficiente é negativa para ambos os grupos de doentes. Contudo, apresenta valores mais baixos (-0,13 *versus* -0,01) e sempre negativos no caso dos doentes que não respondem à quimioterapia. Esta observação sugere que, no grupo de doentes que não responde ao tratamento, poderão existir proteínas transmembranares, como a Pgp e a MRP1, funcionalmente activas, que estarão a provocar o efluxo do ^{99m}Tc -sestamibi para o exterior da célula, conduzindo a uma diminuição do T/PC_{tard} comparativamente com o T/PC_{prec} . Esta observação assume maior relevância no caso específico do doente 5, pois é aquele que apresenta o valor mais elevado, em módulo, da diferença entre o coeficiente de captação tardio e precoce, constituindo este facto, por si só, um indicador de mau prognóstico.

O índice de retenção traduz a fracção de radiofármaco que o tumor reteve face à quantidade que captou. Nos doentes que respondem à quimioterapia, será de esperar valores mais elevados comparativamente com aqueles que não respondem. De referir que a obtenção de valores superiores a 100% deve-se ao facto de o coeficiente de captação tardio ser superior ao coeficiente de captação precoce. Com efeito, neste estudo, este pressuposto verifica-se, dado que a mediana do índice de retenção é de 98,91% (96,99 – 102,38) nos doentes que respondem à quimioterapia e de 91,12% (89,46 – 91,16) nos doentes que não respondem, havendo diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p = 0,036$) (ver figura 4.1). Estes valores estão de acordo com os encontrados por outros autores, que sugerem que os doentes com índices de retenção mais elevados apresentam um bom prognóstico, sobrevivendo mais tempo que os doentes com índices de retenção mais baixos [113,114].

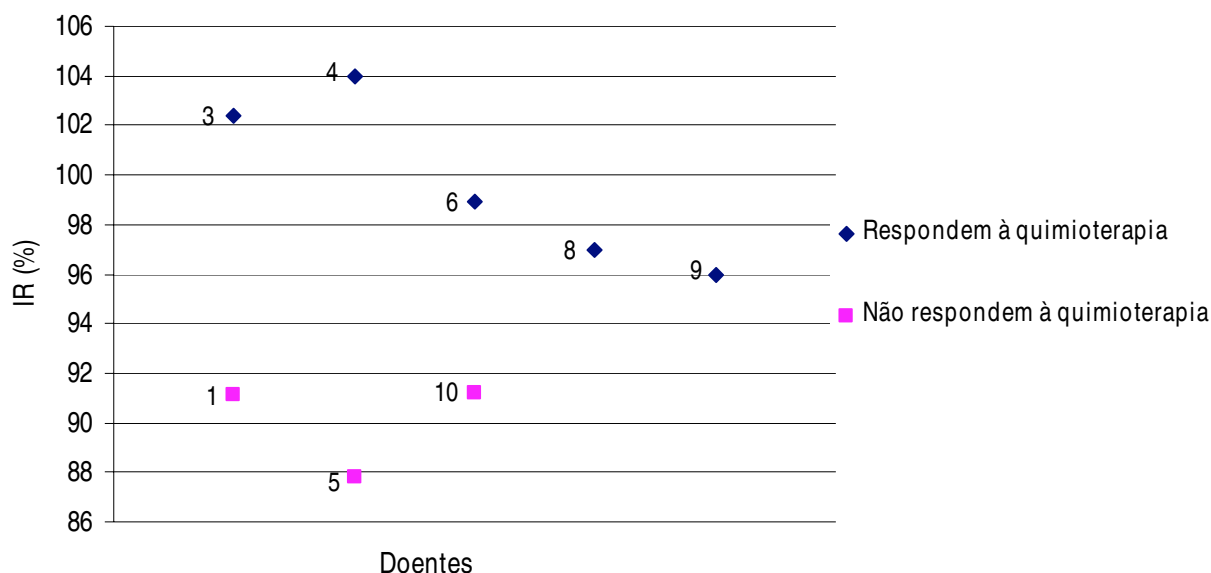


Figura 4.1 – Índice de retenção do ^{99m}Tc -sestamibi nos doentes que respondem e nos que não respondem à quimioterapia.

A taxa de eliminação está inversamente relacionada com o índice de retenção e corresponde à fracção de ^{99m}Tc -sestamibi que foi eliminado pelo tumor até aos 65 minutos após a sua administração. Ao contrário do que acontece com o índice de retenção, é de esperar que a taxa de eliminação apresente valores inferiores nos doentes que respondem à quimioterapia, o que de resto, é compatível com elevados valores de índice de retenção. A obtenção de valores negativos para a taxa de eliminação significa que o coeficiente de captação tardio é mais elevado que o coeficiente de captação precoce. Neste estudo, a mediana da taxa de eliminação foi de 1,09% (-2,38 – 3,01) nos doentes que responderam à terapia e de 8,88% (8,85 – 10,55) nos doentes que não responderam. À semelhança do que acontece com o índice de retenção, também aqui se verificam diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de doentes, com respostas distintas à quimioterapia ($p = 0,036$). A figura 4.2 evidencia as diferenças na taxa de eliminação do radiofármaco do tumor entre os doentes que respondem e os doentes que não respondem à quimioterapia.

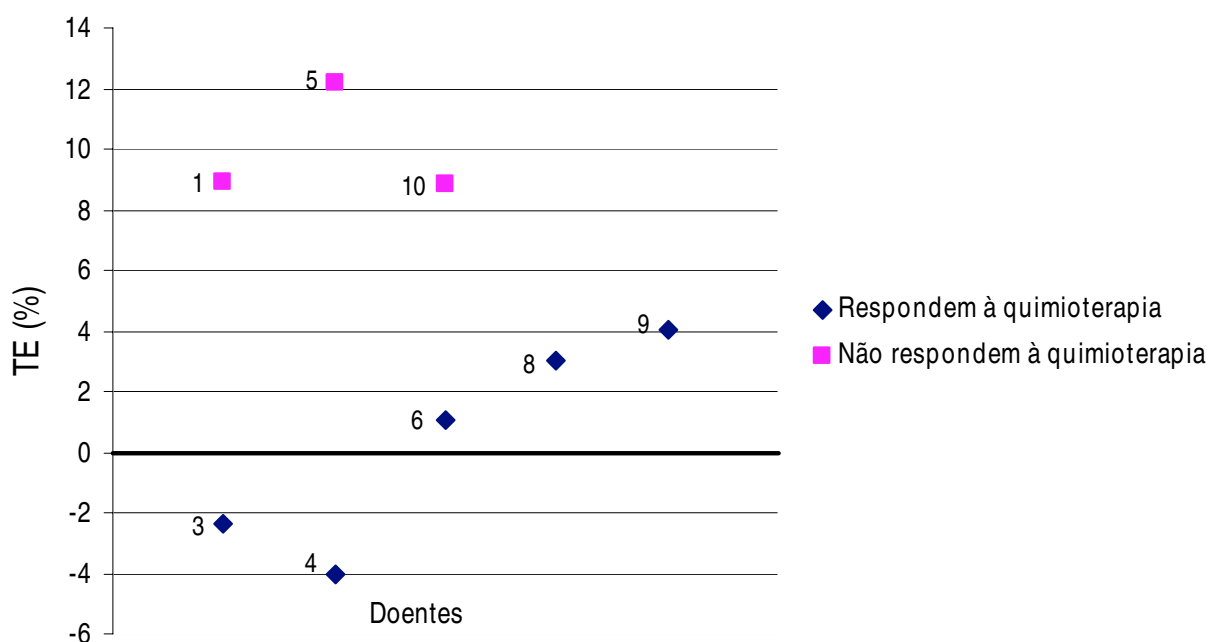


Figura 4.2 – Taxa de eliminação do radiofármaco nos doentes que respondem e nos que não respondem à quimioterapia

Após a análise dos resultados obtidos, postulou-se que, com a implementação de um limiar de 8% relativamente ao valor da taxa de eliminação por hora, é possível prever a resposta à quimioterapia em todos os doentes logo na primeira avaliação, com uma exactidão de 100%. Assim sendo, se o tumor apresentar uma taxa de eliminação superior a 8%, isso constituirá um mau indicador, pois significa que o doente não irá responder à quimioterapia. Ao invés, será considerado um bom indicador se o tumor apresentar uma taxa de eliminação inferior a 8%, pois isso significará que os citostáticos apresentam uma retenção estável no interior das células, potenciando aí a sua acção. De acordo com este limiar, verifica-se que os doentes 1, 5 e 10, que apresentam taxas de eliminação de 8,88%, 12,21% e 8,81%, respectivamente, não responderão à terapia, o que está de acordo com a respectiva sobrevida após o diagnóstico (5, 9 e 8 meses). Já os doentes 3, 4, 6, 8 e 9, que possuem taxas de eliminação inferiores a 8% (-2,38%; -4,01%; 1,09%; 3,01% e 4,03%, respectivamente), apresentaram uma sobrevida sempre superior a 10 meses, sendo que o doente 9 ainda se encontra vivo. De salientar o valor da taxa de eliminação do doente 4, que é o mais baixo de todos, facto este que está de acordo com a bibliografia consultada, pois que, tratando-se de um tumor de pequenas células, à partida apresentará melhor resposta à quimioterapia que os tumores de não pequenas células [47,49,50,55]. Este limiar parece vir de encontro aos valores obtidos em

estudos *in vitro*, que se aproximam dos 10% eliminação por hora [115] e *in vivo*, que se aproximam de 15% em duas horas [116].

Neste trabalho, como já foi amplas vezes referido, a amostra de doentes é muito reduzida, o que não poderá deixar de limitar, de alguma forma, a precisão dos resultados obtidos. Contudo, dado que esta linha de pesquisa irá continuar, acredita-se que, com uma amostra maior, este limiar se venha a precisar melhor, adquirindo assim um significado mais relevante.

Avaliação posterior ao 3º ciclo de quimioterapia

Nos quadros 4.4 e 4.5 são apresentados os valores dos diversos indicadores calculados, respectivamente relacionados com os doentes que respondem e com os doentes que não respondem à quimioterapia. Os valores aqui em questão dizem respeito à segunda avaliação, realizada, portanto, uma a duas semanas após os doentes terem concluído o 3º ciclo de quimioterapia (e cerca de dois a três meses após a primeira avaliação).

Quadro 4.4 – Segunda avaliação dos doentes que responderam à quimioterapia

Doente	Histologia	T/PC _{prec}	T/PC _{tard}	CR	IR (%)	TE (%)
3. FF	Adenoc	1,27	1,26	-0,02	98,77	1,23
4. RJ	PC	1,71	1,8	0,09	105,49	-5,49
6. CC	Adenoc	1,93	1,02	-0,91	52,94	47,06
8. LL	Adenoc	1,6	1,68	0,08	104,84	-4,84
9. SP	C epiderm	1,24	1,27	0,03	102,60	-2,60

Legenda: Adenoc – Adenocarcinoma; PC – Tumor de pequenas células; C epiderm – Carcinoma epidermóide

Quadro 4.5 – Segunda avaliação dos doentes que não responderam à quimioterapia

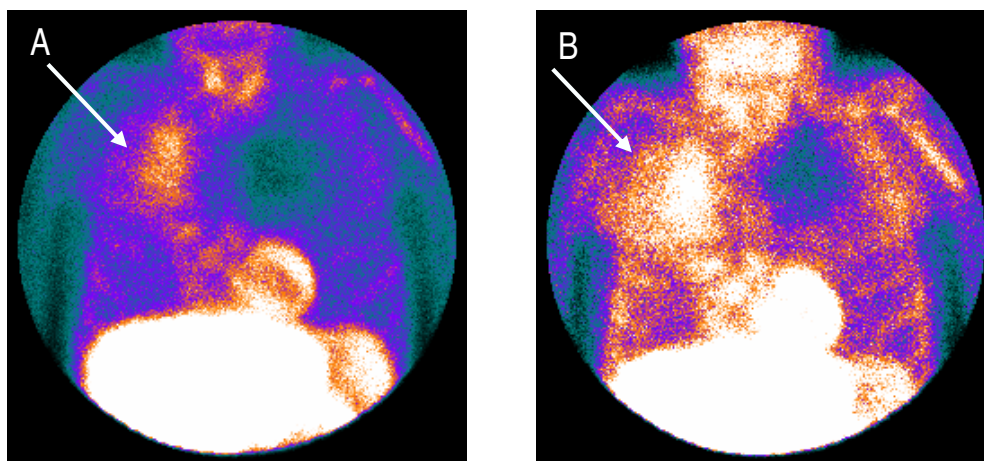
Doente	Histologia	T/PC _{prec}	T/PC _{tard}	CR	IR (%)	TE (%)
1. AC	Adenoc	1,65	1,52	-0,14	91,75	8,25
5. LC	C epiderm	2,49	1,9	-0,59	76,48	23,52
10. AP	Adenoc	1,71	2,05	0,33	119,45	-19,45

Legenda: Adenoc – Adenocarcinoma; C epiderm – Carcinoma epidermóide

A mediana do T/PC_{prec} dos doentes que respondem em relação aos que não respondem à quimioterapia é de 1,60 (1,27 – 1,71) *versus* 1,71 (1,68 – 2,10), não se tendo verificado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,286$). Consoante foi referido anteriormente, o coeficiente de captação precoce representa a perfusão e a captação inicial do radiofármaco pelo tumor, traduzindo assim, de alguma forma, o seu estado metabólico. Apesar das limitações (já referidas) que a comparação deste indicador apresenta, pela análise dos valores (não obstante não se terem verificado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos), constata-se que, de um modo geral, a captação precoce dos tumores que não respondem à quimioterapia, é superior à captação dos tumores que respondem, o que parece indicar que o metabolismo daqueles está em fase mais activa, facto que se encontra em concordância com a ausência de resposta ao tratamento. Além disso, dentro do grupo de doentes que não responde ao tratamento, verifica-se que o T/PC_{prec} aumenta em todos os casos entre a primeira e a segunda avaliação (doente 1: 1,44 vs. 1,65; doente 5: 1,93 vs. 2,49; doente 10: 1,42 vs. 1,71). Esta observação está de acordo com as referidas por outros autores [108].

Alguns autores encontraram uma diminuição significativa da captação inicial de ^{99m}Tc-sestamibi após a quimioterapia nos doentes com remissão parcial ou completa do tumor e um aumento ou conservação da captação nos doentes sem remissão tumoral [112,117]. No presente estudo, estas observações não foram tão evidentes, dado que na amostra de doentes estudados, apenas se verificaram alterações significativas nas dimensões do tumor em dois casos. No doente 9 (incluído no grupo dos que responderam à quimioterapia), houve uma redução acentuada da massa tumoral, entre a primeira e a segunda avaliação (de acordo com informações da CT e bem visíveis na cintigrafia – figura 4.3).

Avaliação pré-quimioterapia



Avaliação após o 3º ciclo de quimioterapia

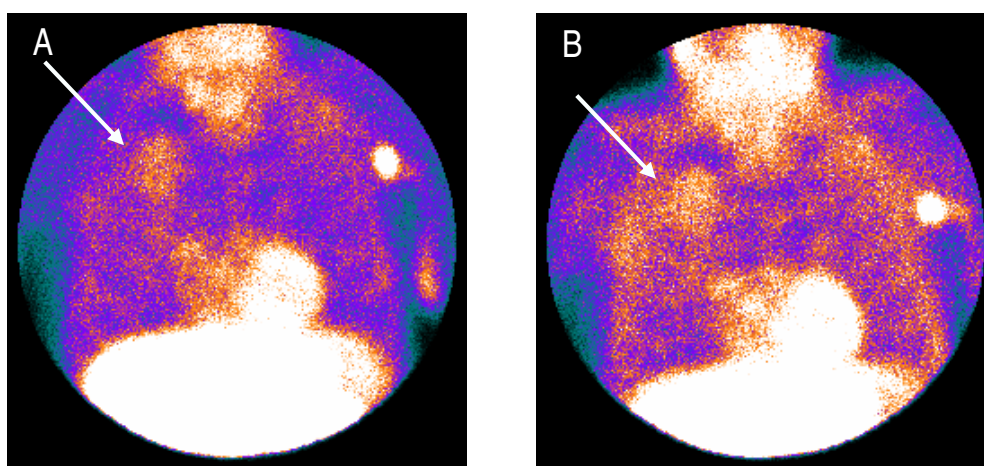


Figura 4.3 – Imagens adquiridas em projecção anterior, relativas à primeira e segunda avaliação do doente 9. Como se pode verificar, houve uma significativa redução do tumor entre as avaliações, comprovando a eficácia da quimioterapia neste doente.

A – imagens precoces; B – Imagens tardias

No doente 10 (incluído no grupo dos que não responderam à quimioterapia), de acordo com a TC, houve um aumento considerável das dimensões do tumor entre a primeira e a segunda avaliação. Ora, nestes dois casos confirmam-se as observações postuladas pelos trabalhos referidos, dado que no caso do doente 9, a redução da massa tumoral acompanhou a diminuição da captação precoce do radiofármaco entre as duas avaliações (2,26 vs. 1,24), acontecendo o inverso no caso do doente 10 (1,42 vs. 1,71). Com as devidas salvaguardas dos factores de erro (já referidos) subjacentes à comparação do coeficiente de captação precoce entre avaliações, estas

observações parecem lógicas, já que uma diminuição da massa tumoral, em princípio, é sinónimo de redução do número células viáveis e metabolicamente activas, pelo que deverá ser acompanhado por uma menor captação de ^{99m}Tc -sestamibi.

A mediana do $\text{T/PC}_{\text{tard}}$ dos doentes que respondem comparativamente com os que não respondem à quimioterapia é de 1,27 (1,26 – 1,68) *versus* 1,90 (1,71 – 1,98), não existindo diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos ($p = 0,143$). Nos doentes que não respondem à quimioterapia, seria de esperar que este valor fosse inferior ao coeficiente de captação precoce, o que significaria que o radiofármaco estaria a ser eliminado do tumor. Pela análise da mediana, tal não se verifica, dado que o doente 10 apresenta um valor de $\text{T/PC}_{\text{tard}}$ muito inflacionado. Trata-se, contudo, da única excepção, pois todos os outros apresentam uma diminuição na captação do ^{99m}Tc -sestamibi entre as imagens precoces e as imagens tardias (adiante serão avançadas possíveis explicações). O facto de o doente 10 apresentar um valor de $\text{T/PC}_{\text{tard}}$ tão elevado, irá condicionar a análise e comparação dos restantes indicadores, mencionados de seguida. A mediana do coeficiente de retenção dos doentes que respondem em relação aos que não respondem à quimioterapia é de 0,03 (-0,02 – 0,08) *versus* -0,14 (-0,37 – 0,10), não existindo diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 1,00$). No caso presente, o coeficiente de retenção não traduz a diferença que existe entre as respostas à terapia. A razão para isto já foi apontada, pelo menos parcialmente, quando se referiu o doente 10. Para além deste caso, o comportamento do tumor do doente 6 também parece algo contraditório, já que a diferença entre os coeficientes de captação tardio e precoce é consideravelmente negativa em relação aos outros (ver quadro 4.4), o que indicaria uma ausência de resposta à quimioterapia (de resto, coincidente com o aumento do valor do coeficiente de captação precoce entre a primeira e a segunda avaliação). Contudo, este doente após a realização da segunda avaliação sobreviveu ainda durante 8 meses, o que é muito comparável à dos outros doentes do mesmo grupo, cujos valores nesta segunda avaliação são compatíveis com uma boa resposta à quimioterapia. Mais uma vez se verifica o interesse de incrementar significativamente a amostra estudada, no sentido de poder sustentar de uma forma mais adequada a (tentativa de) formulação de conclusões.

A mediana do índice de retenção é de 102,60% (98,77 – 104,84) nos doentes que respondem à quimioterapia e de 91,75% (84,12 – 105,60) nos doentes que não respondem. Neste caso, também não existem diferenças estatisticamente significativas entre ambos os grupos estudados ($p = 1,00$). Apesar dos valores de mediana serem diferentes, nos intervalos inter-quartílicos há sobreposições, devido ao facto de os valores que dizem respeito aos doentes 6 e 10 serem muito diferentes dos restantes elementos que integram os respectivos grupos. O mesmo

acontece com os valores da taxa de eliminação, pelos mesmos motivos. Admite-se que a razão para estes resultados poderá residir na heterogeneidade celular que pode existir nos tumores, dado ser perfeitamente lícito considerar-se a coexistência de células com diferentes tipos de comportamento. Uma outra possibilidade que pode explicar o comportamento apresentado pelo tumor do doente 10 relaciona-se com a dimensão do próprio tumor. De facto, trata-se do tumor que atingiu as maiores proporções de entre todos, medindo cerca de 8 cm de maior eixo na altura da segunda avaliação. Um tumor com estas dimensões pode apresentar uma perfusão deficiente ou muito heterogénea [118], existindo concomitantemente zonas fracamente perfundidas (por exemplo no centro) e zonas ricamente vascularizadas (normalmente na periferia) o que poderá conduzir a que o radiofármaco não chegue em igualdade de circunstâncias a todas as regiões do tumor. Provavelmente, o que aconteceu neste caso foi que houve um atraso na chegada do radiofármaco às regiões do tumor fracamente perfundidas e por isso, nas imagens adquiridas aos 65 minutos após a administração do radiofármaco, ainda estaria a entrar ^{99m}Tc -sestamibi nas células dessas regiões. Por isso, é que o coeficiente de captação tardio é mais elevado que o precoce, quando seria de esperar o contrário. Neste doente, teria valido a pena adquirir mais uma série de imagens tardiamente, por exemplo aos 120 ou 180 minutos após a injeção do radiofármaco.

Mais adiante procurar-se-á explicar os motivos pelos quais a avaliação dos doentes com ^{99m}Tc -sestamibi após a quimioterapia não é tão precisa e eficaz como seria desejável.

Análise da resposta terapêutica, de acordo com as informações obtidas através da TC

No quadro 4.6 apresenta-se a comparação entre os valores da taxa de eliminação dos tumores na primeira e segunda avaliações cintigráficas, as informações qualitativas provenientes da segunda avaliação realizada por TC e o tempo de sobrevida após o diagnóstico da doença. A informação proveniente da TC tem carácter qualitativo, pois em muitos doentes não foi possível determinar com exactidão as dimensões do tumor na primeira e/ou segunda avaliações. Isto deve-se ao facto de, nuns casos haver derrame pleural e noutros, os doentes rejeitarem o contraste endovenoso, impossibilitando assim a abordagem tecnicamente mais adequada.

A escolha da TC como método de monitorização da terapia decorre naturalmente (sobretudo, por falta de outros meios disponíveis) em Portugal e no meio académico-científico onde decorreu este trabalho. Contudo, importa admitir que esta metodologia não é a mais adequada, sabendo-se, como se sabe que a TC, tal como a RMN (Ressonância Magnética Nuclear) permitem o acesso a informação anatómica e morfológica da mais alta importância, mas que contudo pode estar bastante enviesada, sendo por vezes difícil, senão impossível, distinguir fenómenos de recorrência tumoral (ou tecido tumoral residual), incluídos dentro de processos inflamatórios benignos, ou até fibróticos, de natureza essencialmente reaccional, com desenvolvimento pós radioterapia, por exemplo [125,126].

Assim sendo, seria muito mais interessante e cientificamente adequado, que se utilizasse a metodologia PET no sentido de validar os resultados obtidos em termos das cintigrafias obtidas com ^{99m}Tc -sestamibi. De resto, vários foram os estudos e trabalhos publicados [126-130] que demonstraram de uma forma cabal o interesse na utilização de PET com ^{18}F -FDG na detecção e avaliação de tumores residuais como recorrentes, particularmente em situações intermédias ou finais (após a conclusão de ciclos terapêuticos). Até porque, e em contraste com a TC e com a RMN, a PET com ^{18}F -FDG pode detectar alterações no metabolismo tumoral da glucose, denunciando – e, desta forma, caracterizando devidamente - a heterogeneidade celular e metabólica muitas vezes presente no interior de uma mesma massa tumoral.

Quadro 4.6 – Comparação entre a taxa de eliminação, a análise por TC e a sobrevida dos doentes

Doente	TE (%) 1ª Avaliação	TE (%) 2ª Avaliação	TC	Tempo Sobrevida (meses)
1. AC	8,88	8,25	Manteve	5
3. FF	-2,38	1,23	Melhorou ligeiramente	12
4. RJ	-4,04	-5,49	Melhorou ligeiramente	11
5. LC	12,21	23,52	Melhorou ligeiramente	9
6. CC	1,09	47,06	Piorou	>11
8. LL	3,01	-4,84	Melhorou	>11
9. SP	4,03	-2,60	Melhorou	Vivo
10. AP	8,81	-19,45	Piorou	8

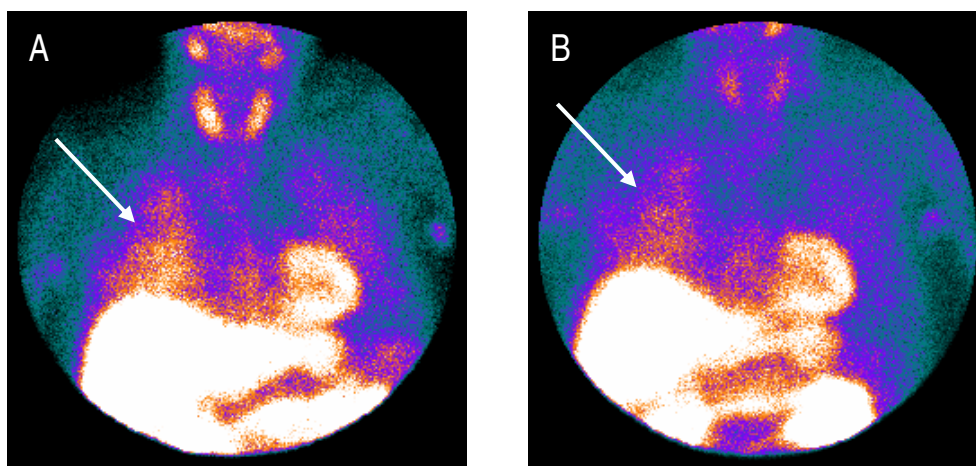
Legenda: Adenoc – Adenocarcinoma; PC – tumor de pequenas células; C epiderm – Carcinoma epidermóide

Da análise do quadro, é possível verificar que, para a maioria dos doentes, há concordância entre os dados obtidos por avaliação cintigráfica e os dados obtidos por TC, nomeadamente nos casos dos doentes 1,3,4, 6, 8 e 9.

No caso do doente 6, a segunda avaliação cintigráfica indica um franco aumento na taxa de eliminação do radiofármaco, o que seria indicativo de ausência de resposta à quimioterapia. Contudo, tanto os dados da TC, como da avaliação cintigráfica não se relacionam com o tempo de sobrevida do doente, pois há doentes com aumentos da taxa de eliminação mais discretos e no entanto, apresentam um tempo de sobrevida bastante inferior (doente 1, por exemplo).

No caso do doente 5, não houve concordância entre os dados da TC e os da avaliação cintigráfica. Neste caso, a TC indicou que houve uma ligeira evolução positiva. Não obstante, através da avaliação cintigráfica, verificou-se que houve um aumento acentuado (para o dobro) da taxa de eliminação do radiofármaco, o que significa que este doente não estava a responder à quimioterapia (figura 4.4). Tal confirma-se pelo tempo de vida, dado que este doente sobreviveu apenas mais 6 meses após a segunda avaliação. Assim, neste caso, a avaliação cintigráfica possibilitou uma avaliação mais correcta da situação – como de resto acontece com bastante frequência em estudos comparativos entre as eficácias relativas dos métodos baseados em Radiologia e em Medicina Nuclear, particularmente quando utilizados no contexto oncológico, como é o caso.

Avaliação pré-quimioterapia



Avaliação após o 3º ciclo de quimioterapia

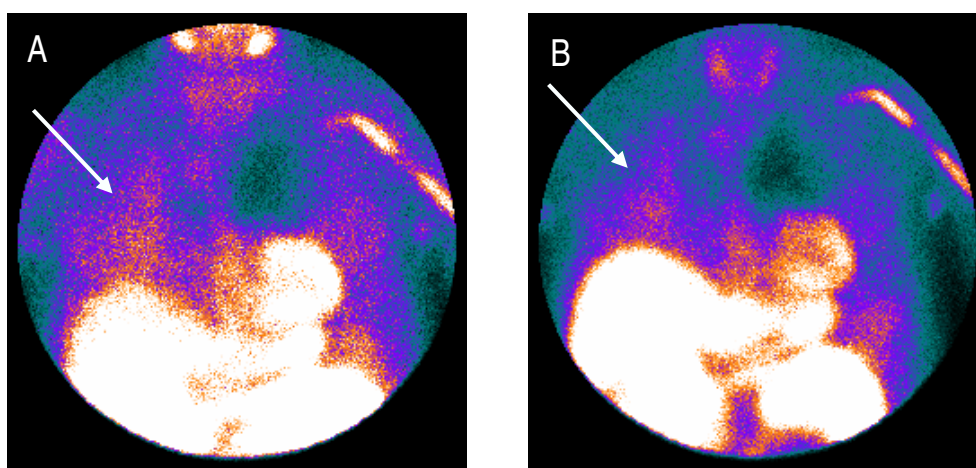


Figura 4.4 – Imagens adquiridas em projecção anterior, relativas à primeira e segunda avaliação do doente 5. Como se pode verificar, há uma redução significativa na actividade presente no tumor entre as imagens precoces e as imagens tardias.

A – imagens precoces; B – Imagens tardias

Relativamente ao doente 10, também não há concordância entre os dados da TC e os da avaliação cintigráfica. Neste doente, através da avaliação cintigráfica parecia que o doente apresentava uma franca evolução positiva, apesar de na primeira avaliação ter sido classificado correctamente como sendo um caso em que não iria haver uma boa resposta à terapia. Contudo, veio a verificar-se que o tumor continuou a progredir e a aumentar, tendo este doente falecido 6 meses após a segunda avaliação. Neste caso, parece ter sido a avaliação por TC a que possibilitou uma avaliação mais correcta da situação, o que poderá facilmente ser explicado pela relativa imprecisão da técnica cintigráfica aqui utilizada e a maior precisão que se deveria obter através da utilização de PET (por outras palavras, admite-se como provável, que os resultados obtidos através

desta técnica não seriam os mesmos). A figura 4.5 apresenta a evolução da taxa de eliminação do radiofármaco para cada um dos doentes estudados.

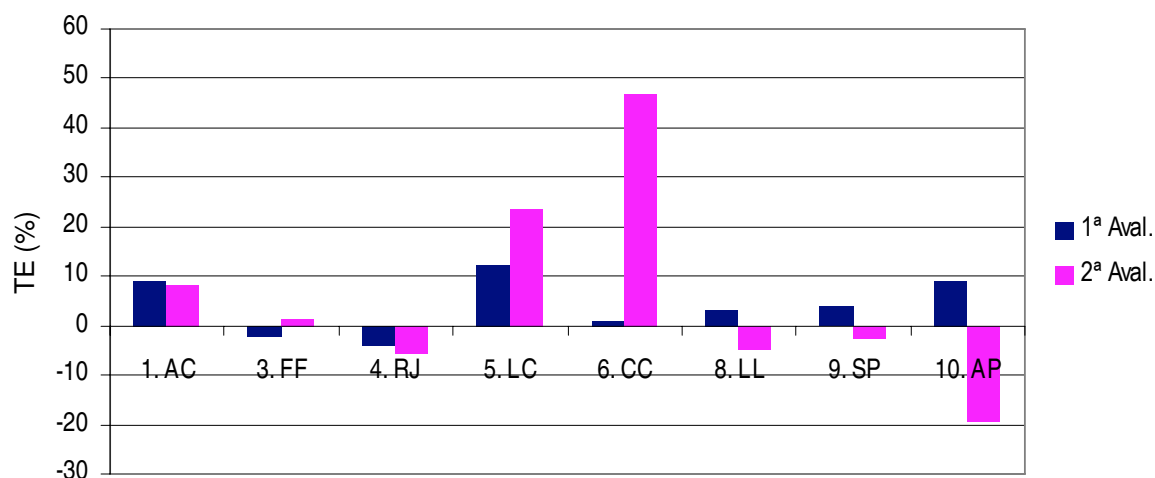


Figura 4.5 – Taxa de eliminação do ^{99m}Tc -sestamibi na primeira e segunda avaliação.

Como se pode ver pela análise da figura, a evolução da taxa de eliminação do radiofármaco pelo tumor é concordante com a evolução clínica e o tempo de sobrevida dos doentes, com a excepção dos dados da segunda avaliação relativa aos doentes 6 e 10 (25% dos casos).

Algumas considerações adicionais

A principal modalidade de tratamento dos tumores pulmonares em estadio IIIB e IV (ou doença extensa, no caso dos tumores de pequenas células) é a quimioterapia, como forma de terapia paliativa. Assim, nestes casos, o objectivo último deste tipo de abordagem terapêutica é procurar que o doente atinja um tempo de sobrevida o mais longo possível, com a menor morbilidade possível associada. Por este motivo, antes de iniciar a quimioterapia, seria importante poder prever o comportamento do tumor à terapia, nomeadamente se este desenvolverá ou não mecanismos de resistência aos citostáticos. Esta previsão é possível através de avaliação cintigráfica dos tumores, dado que os mecanismos de captação e de efluxo do ^{99m}Tc -sestamibi e outros análogos tecnecios envolvem diversos processos celulares que são importantes na avaliação da resposta dos tumores à terapia.

Neste trabalho, foram analisados apenas 8 doentes pelas razões já expostas. Trata-se pois, de uma amostra extremamente reduzida e, por esse motivo, as conclusões têm carácter preliminar.

O estudo continua em curso, tendo já incluído mais três novos casos de doentes que efectuaram a primeira avaliação. Assim, está prevista a obtenção de resultados mais consistentes e de conclusões mais bem fundamentadas, com base numa amostra maior de doentes.

Para o estudo dos doentes, optou-se pela aquisição de imagens estáticas. Esta opção, apesar de não ser consensual, está descrita na literatura, sendo também a opção de alguns autores [31,32,106,119]. Neste caso, esta opção esteve relacionada com questões logísticas, dado que, normalmente, o doente iniciava a primeira sessão de quimioterapia no final da manhã em que era realizado o estudo cintigráfico. Assim, optou-se por adquirir um conjunto de imagens precoces, com início aos 5 minutos após a administração do radiofármaco e, logo de seguida, adquirir um estudo tomográfico, terminando com novo conjunto de imagens tardias, já não restando tempo para a realização de um segundo SPECT. Relativamente aos tempos de aquisição, estão de acordo com os referidos na literatura, apesar de muitos autores optarem por adquirir o conjunto de imagens um pouco mais tarde, geralmente aos 120 ou 180 minutos após a injeção do radiofármaco [14,32,36,107,103,104]. Os protocolos de aquisição de imagens são diversos, já que alguns autores optam apenas pela aquisição de imagens precoces, aos 10 – 15 após a injeção do radiofármaco [31,119,121]. Outros, iniciam a aquisição de imagens precoces aos 30 ou aos 60 minutos [7,14,16,17]. Nestes casos, os autores não encontraram correlação entre as taxas de eliminação ou os índices de retenção e a resposta à quimioterapia. Um eventual problema desta opção metodológica poderá estar relacionado com os tempos de aquisição das imagens, dado que o transporte do ^{99m}Tc -sestamibi mediado pela Pgp é um mecanismo relativamente rápido, sendo perfeitamente possível que aos 30 minutos já esteja completo. Assim, é possível concluir que, no âmbito do estudo da resposta terapêutica em tumores pulmonares, a aquisição de imagens precoces deveria ter início entre os 5 e os 15 minutos.

No presente trabalho, não foi possível realizar a quantificação dos níveis de expressão da Pgp e da MRP nas células tumorais, dado que a amostra de tecido retirada na biopsia foi sistematicamente muito reduzida, tendo sido utilizada na totalidade para a análise histológica do tumor. Por este motivo, não foi realizada a comparação dos níveis de expressão destas proteínas com os diversos indicadores calculados (coeficiente de captação, coeficiente de retenção, índice de retenção e taxa de eliminação). Contudo, de acordo com *Bailly et al.* este facto revestir-se-á de uma importância muito relativa dado que os níveis de expressão destas proteínas não se relacionam com a funcionalidade das bombas de efluxo das mesmas [3]. Além disso, mesmo quando se faz a determinação dos níveis de expressão destas proteínas por técnicas de citometria de fluxo ou imunohistoquímica, nem sempre existe uma correlação com os indicadores calculados dado que as

técnicas utilizadas para esse fim apresentam sensibilidades e especificidades muito diversas, pois são afectadas por parâmetros como a heterogeneidade dos tecidos tumorais, a presença simultânea de outros mecanismos de resistência e a expressão heterogénea da Pgp no mesmo tecido, que podem tornar a detecção de MDR equívoca. *Kostakoglu et al.* num estudo realizado em tumores da mama, enfatizaram bem a questão da heterogeneidade da expressão da Pgp em células do mesmo tecido, pois ao realizar a determinação *in vitro* em diferentes regiões do tecido excisado, verificaram discrepâncias importantes na expressão desta proteína. Os autores afirmam que se tivessem efectuado essa determinação apenas numa determinada secção do tumor, chegariam a resultados contraditórios com os da avaliação cintigráfica e os tumores seriam erroneamente classificados segundo uma das seguintes categorias: ausência de expressão da proteína, expressão moderada ou sobre-expressão, em lugar de serem classificados como apresentando expressão heterogénea [120].

Além disso, quando a determinação dos níveis de expressão proteica é feita a partir de amostras de tecido recolhidas por biopsia, este problema pode ser ainda mais grave, dado que apenas se retira uma pequena amostra que pode até nem ser a mais representativa do que realmente está a ocorrer no tumor. Por outro lado, pode ainda acontecer a ausência de coincidência entre o local de punção da biopsia para a recolha da amostra de tecido e a delineação de ROIs nas imagens adquiridas, como por exemplo, retirar a amostra de tecido numa região periférica do tumor e a delinear as ROIs na parte mais central. Pelos motivos acabados de enunciar, é possível encontrar na literatura resultados muito diferentes, pois alguns autores sugerem que há uma boa correlação entre os níveis de expressão da Pgp e/ou da MRP1 em tumores pulmonares e os indicadores calculados por avaliação cintigráfica [14,31,109,119]; outros encontram uma boa correlação apenas com os níveis de expressão da Pgp, mas não com os da MRP [103,110,121]; outros ainda sugerem que a Pgp neste tipo de tumores desempenha um papel menos importante que a MRP no desenvolvimento de MDR [4,5,104]. Relativamente à expressão da LRP, parece ser consensual que não há qualquer correlação entre a sua expressão e os dados cintigráficos [103, 119,122]. Seguem-se alguns exemplos. *Zhou et al.*, num estudo com tumores pulmonares, verificaram que o coeficiente de captação do ^{99m}Tc -sestamibi era significativamente mais elevado nos doentes que não expressavam a Pgp e que nos doentes com sobre-expressão da proteína, a taxa de eliminação era significativamente maior comparativamente com os que não expressavam. Os mesmos autores concluíram que a sobre-expressão da Pgp se correlaciona com uma reduzida acumulação do radiofármaco nas imagens tardias e com uma elevada taxa de eliminação [103].

Estes resultados estão de acordo com os obtidos neste trabalho, na primeira avaliação dos doentes que não responderam à quimioterapia.

Num estudo realizado por *Shih et al.* em tumores pulmonares de não pequenas células, o coeficiente de captação foi significativamente mais elevado em doentes sem expressão da Pgp do que nos que expressavam a proteína. Contudo, não encontraram diferenças estatisticamente significativas entre o coeficiente de captação e a expressão da LRP [122].

Aratani et al. encontraram uma correlação significativa entre os coeficientes de captação precoce e tardio e os níveis de expressão do gene *MDR1* ($p = 0,015$ e $p = 0,022$), mas não encontraram correlação com os níveis de expressão da proteína MRP1 ($p = 0,100$ e $p = 0,145$) [110].

A razão para a selecção do ^{99m}Tc -sestamibi, em detrimento da ^{99m}Tc -tetrofosmina, como agente para a aquisição das imagens, relaciona-se com o facto de este apresentar uma captação superior por parte das células tumorais, conduzindo à obtenção de imagens de melhor qualidade, pois a razão alvo/fundo é maior. No capítulo 1 já foram apresentados diversos exemplos indicativos da superioridade do ^{99m}Tc -sestamibi para este tipo de estudos.

O estabelecimento de um limiar de 8% na taxa de eliminação por hora está de acordo não só com os resultados de estudos realizados *in vitro* em linhas celulares de tumores pulmonares [115], mas também com estudos realizados *in vivo*: *Fukumoto et al.* num estudo em doentes com tumores pulmonares, observaram que nos tumores que não responderam à quimioterapia, a eliminação foi de 15% em 2 horas, sendo este valor sempre inferior no caso dos tumores que responderam ao tratamento [116]. Deste modo, assumindo que a taxa de eliminação por hora apresenta um padrão constante, o limiar estabelecido neste trabalho para prever a resposta dos tumores à quimioterapia, está de acordo com o estabelecido por outros autores que estudaram e publicaram sobre o assunto.

Os resultados obtidos neste trabalho, ainda que preliminares, parecem ir de encontro aos obtidos por outros autores, indicando que aspectos como a captação e a eliminação do ^{99m}Tc -sestamibi nos tumores possuem um significado prognóstico, nomeadamente na previsão da resposta ao tratamento. Contudo, esses aspectos podem não traduzir a ocorrência dos mesmos mecanismos de resistência à terapia. Um aumento da extrusão do ^{99m}Tc -sestamibi dos tumores é indicativo da presença de elevados níveis de Pgp, podendo-se assim prever o desenvolvimento de resistência à quimioterapia mediada pela mesma proteína. Por outro lado, a ausência ou a redução da captação inicial de ^{99m}Tc -sestamibi em tumores macroscópicos indica a presença de elevados níveis de Bcl-2, podendo-se assim prever o desenvolvimento de resistência à quimioterapia mediada por esta proteína [23].

Enquanto que os estudos realizados há alguns anos atrás não faziam qualquer referência à Bcl-2 e à possibilidade de desenvolvimento de MDR por ela mediado, mais recentemente têm sido desenvolvidos cada vez mais trabalhos de pesquisa no sentido de clarificar o papel desta proteína na apoptose celular e no desenvolvimento de MDR. Dado que a Bcl-2 se localiza na face externa da mitocôndria, desempenhando um papel fundamental na cascata apoptótica, e que o local de acumulação intracelular do ^{99m}Tc -sestamibi é este mesmo organelo, há todo o interesse em estudar a relação entre a captação deste radiofármaco e a apoptose. Na base desse estudo, estão dois aspectos importantes: a acumulação reversível do ^{99m}Tc -sestamibi na mitocôndria e a dependência dos potenciais da membrana mitocondrial para a entrada do traçador radioactivo. *Del Vecchio et al.* verificaram que os tumores da mama que não acumulavam ^{99m}Tc -sestamibi, apresentavam alterações no seu programa apoptótico, devido à sobre-expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2. Assim, em lesões malignas, a expressão desta proteína correlaciona-se inversamente com o coeficiente de captação precoce do ^{99m}Tc -sestamibi [113]. A sobre-expressão desta proteína tem sido descrita em vários tipos de tumores e correlaciona-se com a resistência à quimio e à radioterapia, devido à presença de um programa apoptótico defeituoso [123].

Contudo, à semelhança do que foi dito para as proteínas de transporte transmembranar, a sobre-expressão da Bcl-2 por si só não explica o processo de MDR. O mecanismo exacto pelo qual a sobre-expressão desta proteína impede a acumulação do ^{99m}Tc -sestamibi nos tumores ainda não é conhecido. Pensa-se que a Bcl-2, localizada na face externa da mitocôndria, inibe a permeabilização da membrana mitocondrial e, conseqüentemente, a libertação do citocromo c e todas as outras etapas da cascata apoptótica. Ora, apesar de se manterem os potenciais negativos na face interna da mitocôndria, o ^{99m}Tc -sestamibi não consegue entrar porque a membrana se encontra impermeável. Deste modo, pode dizer-se que na ausência de barreiras biológicas que limitem a livre difusão do traçador radioactivo da corrente sanguínea para o tumor, a captação precoce do ^{99m}Tc -sestamibi reflecte o estado das mitocôndrias das células tumorais, nomeadamente, a permeabilidade e a preservação dos potenciais das membranas mitocondriais. Durante a apoptose induzida por substâncias citotóxicas, podem ocorrer alterações nestes dois factores, resultando em disfunção mitocondrial e conseqüente redução da captação do ^{99m}Tc -sestamibi [108].

Com efeito, no âmbito dos tumores pulmonares, alguns autores têm sugerido que uma redução ou ausência de captação de ^{99m}Tc -sestamibi pelo tumor se correlaciona com uma pobre resposta à quimioterapia [7,17,31,36,124]. No presente estudo, não foram observados os mesmos resultados, pois todos os tumores captaram o traçador radioactivo, não se tendo verificado diferenças significativas no coeficiente de captação precoce dos doentes que responderam e nos

que não responderam à quimioterapia. No entanto, à semelhança de outros estudos, foi encontrada uma elevada correlação entre o índice de retenção e a taxa de eliminação do ^{99m}Tc -sestamibi e a resposta à quimioterapia, na primeira avaliação. Assim, uma elevada retenção do traçador pelo tumor constitui um indicador de boa resposta à quimioterapia. Ao invés, uma elevada depuração do radiofármaco pelo tumor, indica a presença de bombas de efluxo activas mediadas por proteínas transmembranares como a Pgp e a MRP1. Assim, os tumores com uma rápida eliminação do traçador radioactivo apresentarão resistência à quimio ou à radioterapia [8, 21, 105-108, 111].

Deste modo, de acordo com os achados bibliográficos e com os resultados obtidos neste trabalho, pode dizer-se que a captação inicial do ^{99m}Tc -sestamibi pelo tumor pode prever a resposta à quimioterapia, dado haver fortes indícios que a acumulação deste agente é afectada pelos níveis de expressão da Bcl-2. Isto não colide com o facto de a resposta à quimioterapia também poder ser previsível através da presença de uma taxa de eliminação aumentada, que é indicativa da existência de elevados níveis de Pgp e de MRP1 e, portanto, desenvolver-se MDR mediada por estas proteínas. Assim, conclui-se que o ^{99m}Tc -sestamibi é uma ferramenta útil na previsão da resposta dos tumores à quimioterapia.

Contudo, alguns autores consideram que este agente não é útil na monitorização dessa resposta durante os tratamentos, já que não permite a diferenciação entre tumores que se encontram em processo apoptótico e tumores que estão a desenvolver MDR, já que, segundo os mesmos autores, em ambos os casos, o traçador radioactivo não se acumula nas células [81]. É necessário interpretar estas conclusões com alguma cautela, pois foram baseadas em estudos com parâmetros de aquisição diferentes e que além disso, não contemplavam a aquisição de imagens tardias: num dos estudos, a aquisição de imagens precoces tinha lugar 10 minutos após a administração do radiofármaco e no outro 30 minutos [121,131]. Ora, consoante ficou demonstrado neste trabalho os tempos de aquisição das imagens têm uma grande influência nos resultados obtidos. Por isso, quando se pretende estudar a dinâmica dos mecanismos de MDR nos tumores, particularmente os mediados pelas proteínas acima referidas, é muito importante não só iniciar a aquisição das imagens precocemente (entre os 5 e os 15 minutos após a injeção do radiofármaco), como também adquirir imagens numa fase mais tardia e mesmo intermédia, como por exemplo, aos 60, 120 e, eventualmente, 180 minutos. A razão para isto, é que o que acontece em termos práticos, é a mesma coisa, ou seja a saída do ^{99m}Tc -sestamibi da célula, mas essa saída deverá acontecer em tempos diferentes, consoante o mecanismo de MDR que estiver a actuar. Assim, enquanto que a aquisição de imagens precoces é importante para a avaliação de mecanismos de resistência mediados pela Bcl-2, a aquisição de imagens numa fase tardia ou intermédia, permitirá avaliar a

existência de MDR mediada por proteínas transmembranares, como por exemplo, a Pgp e a MRP1 (figura 4.6).

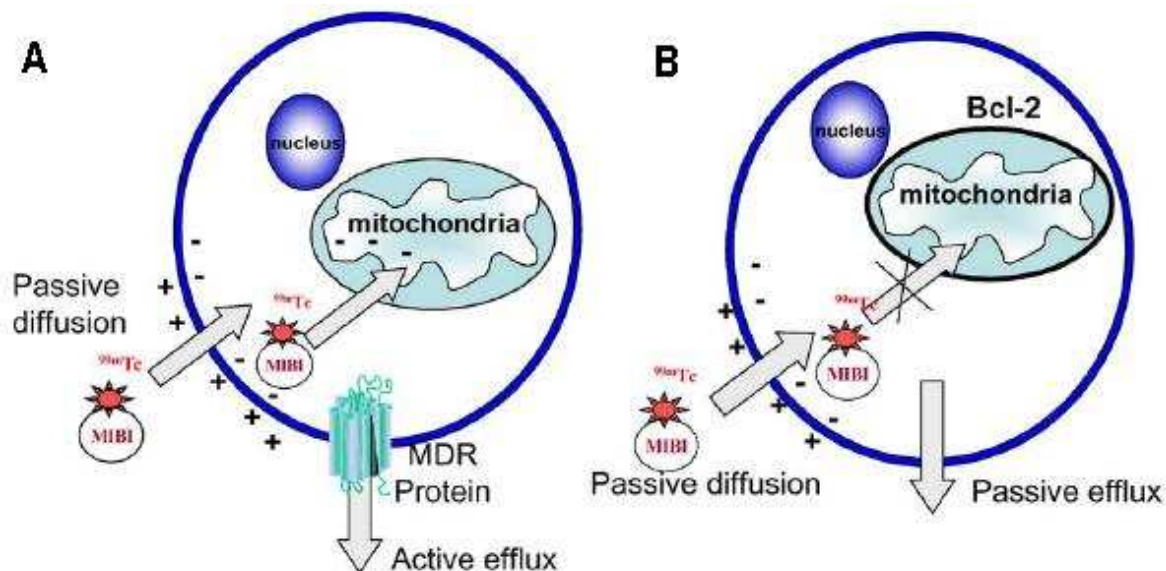


Figura 4.6 – Extrusão do ^{99m}Tc -sestamibi das células resistentes mediada por proteínas transmembranares (A) e pela proteína anti-apoptótica Bcl-2.

Fonte: Moretti J, Hauet N, Caglar M, et al. To Use or not to Use MIBI? That is the Question when Assessing Tumour Cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005; 32:838

No entanto, existem ainda muito poucos estudos comparativos que avaliem de uma forma cabal a utilidade do ^{99m}Tc -sestamibi na avaliação da resposta terapêutica, antes e durante ou após a quimioterapia.

Apesar de neste trabalho termos verificado uma menor utilidade deste agente na monitorização da resposta à quimioterapia, são necessários mais estudos e amostras de doentes mais significativas para se poder chegar a conclusões mais fundamentadas.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

A quimioterapia constitui um importante recurso para a cura ou para a palição de diversos tumores, de entre os quais os tumores pulmonares. Contudo, apesar dos diversos protocolos ou regimes quimioterapêuticos que envolvem a administração simultânea de vários agentes citotóxicos, a presença de MDR continua a ser um problema no tratamento de patologias oncológicas, dado que muitos doentes acabam por não responder à terapia. O sucesso da quimioterapia pode estar condicionado por diversos factores: por exemplo, a perfusão do tumor afecta a biodisponibilidade dos citostáticos e a sua concentração no fluido extracelular do tecido neoplásico. Por outro lado, a viabilidade celular e a resistência mediada pela sobre-expressão de determinados genes, influenciam a sensibilidade das células malignas aos citostáticos [112]. Deste modo, antes de iniciar a quimioterapia, é importante quantificar a presença e a probabilidade de desenvolvimento, ou não, de MDR. Até porque cada vez mais se focam as atenções de todos os intervenientes nestes processos no sentido de diminuir drasticamente os custos financeiros não produtivos nem optimizados, com o objectivo de permitir maximizar a resposta terapêutica e minimizar os efeitos secundários. Finalmente, a identificação precoce da ausência de resposta a estes tratamentos poderá ser extremamente importante na correcta selecção dos protocolos ou regimes quimioterapêuticos, com todas as repercussões que isso implora em termos de resultados finais para os doentes.

No âmbito da Medicina Nuclear, existem diversas modalidades para efectuar a avaliação da resposta terapêutica em doentes com patologias do foro oncológico. Com efeito, para este fim têm sido utilizados diversos compostos, quer emissores de positrões, quer emissores de fotões gama, no sentido de avaliar a viabilidade das células malignas ou possíveis alterações no metabolismo tumoral [23]. Relativamente aos emissores de positrões, o mais utilizado ao longo dos últimos anos tem sido a ^{18}F -FDG, que pelas suas propriedades bioquímicas e biocinéticas, por um lado, como pela sua - relativa - disponibilidade generalizada, se tem vindo a revelar como um agente muito útil na monitorização da resposta à terapia e na detecção de doença recidivante. No que diz respeito aos emissores de fotões gama, têm sido usados compostos lipofílicos e catiónicos marcados com tecnécio-99m, como o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi, a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -tetrofosmina e a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -furifosmina (sendo que esta última já não se encontra comercialmente disponível) para a previsão da resposta do tumor à terapia. De entre estes, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi tem sido o mais amplamente utilizado, pois é o composto que apresenta a maior relação lesão/fundo, permitindo e garantindo-se assim a aquisição de imagens de melhor qualidade [27,29,30,37].

O método globalmente considerado como o mais adequado para o estudo dos mecanismos de MDR (particularmente os que estão relacionados com a expressão de proteínas como a Pgp, a MRP e a Bcl-2), consiste na aquisição de imagens com ^{99m}Tc -sestamibi, pois contrariamente às técnicas de determinação *in vitro* da expressão destas proteínas, a avaliação cintigráfica permite estudar a dinâmica e a funcionalidade destes mecanismos.

Este trabalho teve (e ainda tem, dado que continua, independentemente deste contexto actual de apresentação de Dissertação Final de Mestrado) como objectivo a avaliação da resposta terapêutica de doentes com tumores pulmonares não operáveis, através da utilização de ^{99m}Tc -sestamibi, um agente que se caracteriza pela sua localização preferencial em tecidos ricos em mitocôndrias, tendo sido inicialmente desenvolvido para estudos de perfusão do miocárdio. Para tal, foram estudados 12 doentes com tumores pulmonares em estadio IIIB ou IV, tendo-se realizado duas séries de avaliações: a primeira ocorrendo antes do início da quimioterapia e a segunda tendo lugar após o 3º ciclo de tratamento. Foram adquiridas imagens estáticas em projecções anterior e posterior aos 5 e 65 minutos após a administração endovenosa de ^{99m}Tc -sestamibi. Com base nas imagens adquiridas, foram calculados diversos indicadores: coeficientes de captação precoce e tardio, coeficiente de retenção, índice de retenção e a taxa de eliminação por hora. A primeira e segunda avaliações tinham como objectivo, respectivamente, tentar prever a resposta dos tumores à quimioterapia e a monitorização dessa resposta com base nos valores obtidos para os diversos indicadores. Assim, procurou-se estabelecer uma relação entre a captação, a retenção e a eliminação do radiofármaco por parte do tumor e a resposta à quimioterapia, tentando ainda inferir se os tumores estão ou não a desenvolver mecanismos de MDR. De salientar aqui a importância dos tempos de aquisição das imagens: o início da aquisição das imagens precoces deve ter lugar entre os 5 e os 15 minutos, caso contrário poder-se-á estar a perder informação importante relativamente à dinâmica das bombas de efluxo transmembranares. No que diz respeito à aquisição das imagens tardias, apesar de não ser um aspecto consensual, pois de modo geral varia entre os 60 e os 240 minutos, através dos resultados obtidos neste trabalho, parece que, na maioria dos casos, a aquisição de imagens até aos 60 ou 70 minutos será suficiente. Além disso, é de facto importante efectuar a aquisição das imagens em dois momentos distintos para possibilitar a determinação do índice de retenção e da taxa de eliminação do radiofármaco pelo tumor, dado que são os indicadores que melhor traduzem a dinâmica do transporte activo mediado por proteínas transmembranares [8,21,105-108,111,116].

Para a análise dos resultados, os doentes foram divididos em 2 grupos de acordo com a resposta à quimioterapia (doentes que responderam e doentes que não responderam ao tratamento), quantificada em termos de tempo de sobrevida. Assim, e dada a necessidade de estabelecimento prévio de referências tão objectivas quanto possível, considerou-se que um tempo de sobrevida igual ou superior a 10 meses correspondia a uma boa resposta à quimioterapia, considerando-se uma ausência de resposta no caso contrário. Neste estudo, foram encontradas diferenças estatisticamente significativas apenas no coeficiente de retenção, no índice de retenção e na taxa de eliminação entre os doentes que responderam e os que não responderam à terapia, na primeira avaliação. O estabelecimento de um limiar de 8% relativamente ao valor da taxa de eliminação por hora, permitiu prever a resposta à quimioterapia em todos os doentes logo na primeira avaliação, com uma exactidão de 100%, identificando-se assim os doentes que iriam e os que não iriam responder à terapia. Assim sendo, se o tumor apresentar uma taxa de eliminação superior a 8%, isso constituirá um mau indicador, pois significa que o doente não irá responder à quimioterapia. Ao invés, será considerado um bom indicador se o tumor apresentar uma taxa de eliminação inferior a 8%, pois isso significará que os citostáticos apresentam uma retenção estável no interior das células, potenciando aí a sua acção. Já na segunda avaliação, os resultados foram mais heterogéneos, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas nos valores dos diversos indicadores entre ambos os grupos.

Os resultados obtidos neste trabalho, apesar de preliminares, dado o reduzido tamanho da amostra, parecem ir de encontro aos de outros trabalhos já publicados, contribuindo assim para provar que o ^{99m}Tc -sestamibi constitui uma ferramenta útil na previsão da resposta dos tumores pulmonares à quimioterapia. Contudo, ainda não está estabelecida a sua utilidade na monitorização dessa resposta durante os tratamentos, sendo necessários mais estudos, idealmente multicêntricos, e sempre com amostras de maiores dimensões, as quais, por definição, só poderão ser obtidas através da maior duração temporal dos estudos em questão – de resto, como já foi referido, este estudo está a ser continuado.

No futuro, com uma amostra maior, espera-se que venha ser possível estudar vários graus de resposta à quimioterapia (remissão completa, parcial ou ausência de remissão) e, eventualmente, estudar o comportamento da evolução do tumor de acordo com o seu tipo histológico (pequenas células *versus* não pequenas células e, dentro destes, avaliar separadamente os mais comuns:

adenocarcinoma e carcinoma epidermóide). Por outro lado, poderão ser feitas abordagens diferentes relativamente à forma de cálculo dos diversos indicadores, no sentido de a adequar ao tipo de tumor (por exemplo, em vez de utilizar para os cálculos a média das contagens presentes na ROI, utilizar as contagens máximas, pois poderão constituir um indicador importante da biologia tumoral). Além disso, seria potencialmente importante clarificar o papel da Bcl-2 no desenvolvimento de MDR em tumores pulmonares.

Finalmente, e dado que a MDR constitui um problema importante no tratamento de patologias oncológicas, acredita-se que seria interessante, no futuro, proceder ao desenvolvimento de protocolos normalizados de actuação (*guidelines*) específicos, no sentido de colaborar na sempre desejável uniformização e optimização das formas de abordagem deste problema que se percebe como cada vez mais actual e pertinente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stavrovskaya A. Cellular Mechanisms of Multidrug Resistance of Tumor Cells. *Biochemistry (Moscow)*. 2000; 65: 95-106
2. Arceci R. Clinical Significance of P-glycoprotein in Multidrug Resistance Malignancies. *Blood*. 1993; 81(9): 2215-2222
3. Bailly J, Muller C, Jaffrezou J, et al. Lack of Correlation between Expression and Function of P-glycoprotein in Acute Myeloid Leukemia Cell Lines. *Leukemia*. 1995; 9: 799-807
4. Crankshaw C, Piwnica-Worms D. Tc-99m-sestamibi may be a Transport Substrate of the Human Multidrug Resistance-associated Protein (MRP1). *J Nucl Med*. 1996; 37: 247P
5. Moretti J, Cordobes M, Starzec A. Involvement of Glutathione in Loss of Technetium-99m-MIBI Accumulation Related to Membrane MDR Protein Expression in Tumor Cells. *J Nucl Med*. 1998; 39: 1214-1218
6. Gottesman M, Fojo T, Bates S, et al. Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-dependent Transporters. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2 (1): 48-58
7. Bom H, Kim Y, Song H, et al. Technetium-99m-MIBI Uptake in Small Cell Lung Cancer. *J Nucl Med*. 1998; 39: 91-94
8. Nishiyama Y, Yamamoto Y, Fukunaga K, et al. Evaluation of Radiotherapeutic Response in Non Small Cell Lung Cancer Patients by Technetium-99m MIBT and Thallium-201 Chloride SPET. *Eur J Nucl Med*. 2000; 27: 536-541
9. Longley D, Johnston P. Molecular Mechanisms of Drug Resistance. *J Pathol*. 2005; 205: 275-292
10. Muller S, Guth-Tougelidis B, Creutzig H. Imaging of Malignant Tumors with Tc-99m-MIBI SPECT. *J Nucl Med*. 1987; 28:562 (Abst.)
11. Hassan I, Sahwail A, Constantinides C, et al. Uptake and Kinetics of Tc-99m Hexakis-2-methoxy-isobutylisonitrile in Benign and Malignant Lesions in the Lungs. *Clin Nucl Med*. 1989; 14:333
12. Piwnica-Worms D, Chiu M, Budding M, et al. Functional Imaging of Multidrug Resistant P-glycoprotein with an Organotechnetium Complex. *Cancer Res*. 1993; 53: 977-984
13. Barbaris E, Kronauge J, Cohen D, et al. Characterization of P-glycoprotein Transport and Inhibition *in vivo*. *Cancer Res*. 1998; 58: 276-282
14. Kostakoglu L, Kirarh P, Ruancan S, et al. Association of Tumor Washout Rates and Accumulation of ^{99m}Technetium-MIBI with Expression of P-glycoprotein in Lung Cancer. *J Nucl Med*. 1998; 39: 228-234

15. Hendrikse N, Franssen E, van der Graaf W. Visualization of Multidrug Resistance *In Vivo*. *Eur J Nucl Med*. 1999; 26: 283-293
16. Dirlik A, Burak Z, Goksel T, et al. The Role of Tc-99m Sestamibi Imaging in Predicting Clinical Response to Chemotherapy in Lung Cancer. *Ann Nucl Med*. 2002; 16: 103-108
17. Kao C, Hsieh J, Tsai S, et al. Quickly Predicting Chemotherapy Response to Paclitaxel-based Therapy in Non Small Cell Lung Cancer by Early Technetium-99m Methoxy-isobutylisonitrile Chest Single Photon Emission Computed Tomography. *Clin Cancer Res*. 2000; 6: 820-824
18. Ciarmiello A, Del Vecchio S, Silvestro P, et al. Tumor Clearance of ^{99m}Tc-sestamibi as a Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy for Locally Advanced Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 1998; 16: 1677-1683
19. Taki J, Sumiya H, Asada N, et al. Assessment of P-glycoprotein in Patients with Malignant Bone and Soft-tissue Tumors Using Technetium-99m-MIBI Scintigraphy. *J Nucl Med*. 1998; 39: 1179-1184
20. Yokogami K, Tamura S, Jinnouchi S, et al. Application of SPET using Technetium-99m-sestamibi in Brain Tumors and Comparison with Expression of the *MDR1* Gene: is it Possible to Predict Response to Chemotherapy in Patients with Gliomas by means of ^{99m}Tc-sestamibi SPET? *Eur J Nucl Med*. 1998; 25: 401-409
21. Del Vecchio S, Ciarmiello A, Salvatore M. Clinical Imaging of Multidrug Resistance in Cancer. *Q J Nucl Med*. 1999; 43: 125-131
22. Piwnica-Worms D, Rao V, Kronauge J, et al. Characterization of Multidrug Resistance P-glycoprotein Transport Function with an Organotechnetium Cation. *Biochemistry*. 1995; 34: 12210-12220
23. Del Vecchio S, Zannetti A, Salvatore M. MIBI as Prognostic Factor in Breast Cancer. *Q J Nucl Med*. 2003; 47: 46-50
24. Del Vecchio S, Zannetti A, Ciarmiello A, et al. ^{99m}Tc-MIBI Uptake and Bcl-2 Overexpression in Untreated Breast Cancer Patients. *Eur J Nucl Med*. 2001; 28: 1120
25. Luker G, Fracasso P, Dobkin J, et al. Modulation of the Multidrug Resistance P-glycoprotein: Detection with Technetium-99m-sestamibi *in vivo*. *J Nucl Med*. 1997; 38: 369-372
26. Tatsumi M, Tsoruo T, Nishimura T. Evaluation of MS-209, a Novel Multidrug-resistance-reversing Agent, in Tumour-bearing Mice by Technetium-99m-MIBI Imaging. *Eur J Nucl Med*. 2002; 29: 288-294

27. Ballinger J, Bennerman J, Boxen I, *et al.* Technetium-99m-tetrofosmin as a Substrate for P-glycoprotein: *In Vivo* Studies in Multidrug Resistant Breast Tumor Cells. *J Nucl Med.* 1996; 37: 1578-1582
28. Wolf H, Frieling B, Nacke C, *et al.* ^{99m}Tc-tetrofosmin Accumulation in Sensitive and Multidrug Resistant Tumor Cells with and without Verapamil. *Eur J Nucl Med.* 1996; 23: 1095
29. Utsunomiya K, Ballinger J, Piquette-Miller M, *et al.* Comparison of the Accumulation and Efflux Kinetics of Technetium-99m Sestamibi and Technetium-99m Tetrofosmin in an MRP-expressing Tumor Cell Line. *Eur J Nucl Med.* 2000; 27: 1786-1792
30. Yeh J, Hsu W, Huang W, *et al.* Technetium-99m Tetrofosmin SPECT Predicts Chemotherapy Response in Small Cell Lung Cancer. *Tumor Biol.* 2003; 24: 151-155
31. Shiau Y, Tsai S, Wang J, *et al.* To Predict Chemotherapy Response Using Technetium-99m-tetrofosmin and Compare with P-glycoprotein and Multidrug Resistance Related Protein-1 Expression in Patients with Untreated Small Cell Lung Cancer. *Cancer Lett.* 2001; 169: 181-188
32. Kao C, Hsieh J, Tsai S, *et al.* Paclitaxel-based Chemotherapy for Non Small Cell Lung Cancer: Predicting the Response with ^{99m}Tc-tetrofosmin Chest Imaging. *J Nucl Med.* 2001; 42: 17-20
33. Sun S, Hsieh J, Tsai S, *et al.* Technetium-99m-tetrofosmin Mammoscintigraphy Findings Related to the Expression of P-glycoprotein Mediated Multidrug Resistance. *Anticancer Res.* 2000; 20: 1467-1470
34. Berk F, Demir H, Aktolun C. Thallium-201 Imaging in the Assessment of Tumor Response to Anti-tumor Treatments. *Q J Nucl Med.* 2003; 47: 63-74
35. Tokuchi Y, Isobe H, Takekawa H, *et al.* Predicting Chemotherapeutic Response to Small Cell Lung Cancer of Platinum Compounds by Thallium-201 Single Photon Emission Computerized Tomography. *Br J Cancer.* 1998; 77: 1363-1368
36. Yamamoto Y, Nishiyama Y, Satoh K, *et al.* Comparative Study of Technetium-99m-sestamibi and Thallium-201 SPECT in Predicting Chemotherapeutic Response in Small Cell Lung Cancer. *J Nucl Med.* 1998; 39: 1626-1629
37. Bernard B, Krenning E, Breeman W, *et al.* ^{99m}Tc-MIBI, ^{99m}Tc-tetrofosmina and ^{99m}Tc-Q12 *In Vitro* and *In Vivo*. *Nucl Med Biol.* 1998; 25: 233-240
38. Higashi K, Ueda Y, Matsunari I, *et al.* ¹¹C-acetate PET Imaging of Lung Cancer: Comparison with ¹⁸F-FDG PET and ^{99m}Tc-MIBI SPET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004; 31: 13-21
39. Chiti A, Schreiner F, Crippa F, *et al.* Nuclear Medicine Procedures in Lung Cancer. *Eur J Nucl Med.* 1999; 26: 533-555

40. Elsinga P, Franssen E, Hendrikse N, et al. [^{11}C]-labeled Daunorubicin and Verapamil for Probing P-glycoprotein in Tumors with PET. *J Nucl Med*. 1996; 37: 1571-1575
41. Cancer Facts and Figures – 2005. American Cancer Society (ACS) 2005. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2002/result_merged/sect_01_overview.pdf (Consulta em 02/12/2005)
42. Jerry L. Cancer – A Global Concern. The Epidemiology of Cancer. Canada. October 1998 <http://www.pitt.edu/~super1/lecture/lec0192/index.htm> (Consulta em 12/07/2005)
43. Ruckdeschel J, Spitz M, Saxman S. Report of the Lung Cancer Progress Review Group. National Cancer Institute. August 2001
44. Edwards B et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975-2002, Featuring Population-Based Trends in Cancer Treatment. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97: 1407-1427
45. Cooper G, Hausman R. The Cell: A Molecular Approach. 3rd edition. ASM Press. 2004: 631-673
46. Vallabhajosula S. Radiopharmaceuticals in Oncology. In: Nuclear Oncology – Diagnosis & Therapy. Lippincott Williams & Wilkins. 2001: 31 – 62
47. Dolinsky C. Lung Cancer: The Basics. University of Pennsylvania Medical School. August 2005. <http://www.oncolink.upenn.edu/types/article.cfm?c=9&s=76&ss=781&id=8037> (Consulta em 02/12/2005)
48. Non-Small Cell Lung Cancer: Treatment Health Professional Version. National Cancer Institute. June 2005 <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/non-small-cell-lung/healthprofessional/allpages> (Consulta em 12/07/2005)
49. Small Cell Lung Cancer: Treatment Health Professional Version. National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/small-cell-lung/healthprofessional/allpages> (Consulta em 12/07/2005)
50. Hirsh F, Matthews M, Aisner S, et al. Histopathologic Classification of Small Cell Lung Cancer. Changing Concepts and Terminology. *Cancer*. 1988; 62 (5): 973-977
51. Brambilla E, Travis W, Colby T, et al. The new World Organization Classification of Lung Tumours. *Eur Respir J*. 2001; 18: 1059-1068
52. U.S. Department of Health and Human Services. Targeting Tobacco Use: The Nation's Leading Cause of Death. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta. 2003
53. U.S. Environmental Protection Agency. Respiratory Health Effects of Passive Smoking: Lung Cancer and Other Disorders. Washington. 1992
54. U.S. Department of Health and Human Services. Report on Carcinogens. 10th edition. National Toxicology Program. 2002

55. Minna J *et al.* Molecular Biology of Lung Cancer. In: Cancer – Principles and Practice of Oncology. 5th edition. Lippincott-Raven. 1997: 849-857
56. Salgia R, Skarin A. Molecular Abnormalities in Lung Cancer. *J Clin Oncol.* 1998; 16:1207-1217
57. Bailey-Wilson J, Amos C, Pinney S, *et al.* A Major Lung Cancer Susceptibility Locus Maps to Chromosome 6q23-25. *Am J Hum Genet.* 2004; 75: 460-474
58. Travis W, Travis L, Devesa S. Lung Cancer. *Cancer.* 1995; 75: 191-202
59. Leonard G, Fojo T, Bates S. The Role of ABC Transporters in Clinical Practice. *Oncologist.* 2003; 8: 411-424
60. Roninson I. Molecular and Cellular Biology of Multidrug Resistance in Tumor Cells. *Plenum Press.* 1990
61. Thomas H, Coley H. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein. *Cancer Control.* 2003; 10(2): 159-165
62. Labialle S, Gayet L, Marthinet E, *et al.* Transcriptional Regulators of the Human Multidrug Resistance 1 Gene: Recent Views. *Biochem Pharmacol.* 2002; 64: 943-948
63. Piwnica-Worms D, Luker K, Fracasso P. Multidrug Resistance. In: Nuclear Oncology – Diagnosis & Therapy. Lippincott Williams & Wilkins. 2001: 63 – 72
64. Ambudkar S, Dey S, Hrycyna A, *et al.* Biochemical, Cellular and Pharmacological Aspects of the Multidrug Transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1999; 39: 361-398
65. Goldstein L, Galsky H, Fojo A, *et al.* Expression of a Multidrug Resistance Gene in Human Cancers. *J Natl Cancer Inst.* 1989; 81: 116-124
66. Higgins C, Gottesman M. Is the Multidrug Transporter a Flippase? *Trends Biochem Sci.* 1992; 17: 18-21
67. Higgins C. The ABC of Channel Regulation. *Cell.* 1995; 82: 693-696
68. Goldstein L. MDR1 Gene Expression in Solid Tumours. *Eur J Cancer.* 1996; 32A(6): 1039-1050
69. Schinkel A. The Physiological Functions of Drug-transporting P-glycoproteins. *Sem Cancer Biol.* 1997; 8:161-170
70. Marie J, Zhou D, Gurbuxani S, *et al.* MDR1/P-glycoprotein in Haematological Neoplasms. *Eur J Cancer.* 1996; 32A: 1034-1038
71. Sandor V, Fojo T, Bates S, *et al.* Future Perspectives for the Development of P-glycoprotein Modulators. *Drug Res Updat.* 1998 ; 1: 190-200
72. Zaman G, Flens M, Leusden M, *et al.* The Human Multidrug Resistance-associated Protein MRP is a Plasma Membrane Drug-efflux Pump. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 8822-8826

73. Twentyman P, Versantvoort C. Experimental Modulation of MRP (Multidrug Resistance-associated Protein)-mediated Resistance. *Eur J Cancer*. 1996; 32A(6): 1002-1009
74. Ota E, Abe Y, Oshika Y, *et al*. Expression of the Multidrug Resistance-associated Protein (MRP) Gene in Non Small Cell Lung Cancer. *British J Cancer*. 1995; 72: 550-554
75. Scheffer G, Wijngaard P, Flens M, *et al*. The Drug Resistance-related Protein LRP is the Human Major Vault Protein. *Nature Med*. 1995; 1(6): 578-582
76. Izquierdo M, Scheffer G, Flens M, *et al*. Major Vault Protein LRP-related Multidrug Resistance. *Eur J Cancer*. 1996; 32A: 979-984
77. Pommier Y, Leteurtre F, Fesen M, *et al*. Cellular Determinants of Sensitivity and Resistance to DNA Topoisomerase Inhibitors. *Cancer Invest*. 1994; 12(5):530-42
78. Lowe S, Ruley H, Jacks T. p53-dependent Apoptosis Modulates the Cytotoxicity of Anticancer Agents. *Cell*. 1993; 74: 957-967
79. Bodey B, Bodey Jr, Groger A, *et al*. Immunocytochemical Detection of the p170 Multidrug Resistance and p53 Tumor Suppressor Gene Proteins in Human Breast Cancer Cells: Clinical and Therapeutical Significance. *Anticancer Res*. 1997; 17: 1311-1318
80. Wang Y, Blandino G, Oren M, *et al*. Induced p53 Expression in Lung Cancer Cell Line Promotes Cell Senescence and Differentially Modifies the Cytotoxicity of Anti-cancer Drugs. *Oncogene*. 1998; 15:1923-1930
81. Moretti J, Hauet N, Caglar M, *et al*. To Use or not to Use MIBI? That is the Question when Assessing Tumour Cells. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2005; 32:836-842
82. Chu G. Cellular Responses to Cisplatin: The Roles of DNA-binding Proteins and DNA Repair. *J Biol Chem*. 1994; 269(2): 787-790
83. Lai S, Goldstein L, Gottesman M, *et al*. MDR1 Gene Expression in Lung Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1989; 81: 1144-1150
84. Canitrot Y, Bichat F, Cole S. Multidrug Resistance Genes (MRP1) and MDR1 Expression in Small Cell Lung Cancer Xenografts: Relationship with Response to Chemotherapy. *Cancer Lett*. 1998; 130:133-141
85. Oka M, Fukuda M, Sakamoto A. The Clinical Role of MDR1 Gene Expression in Human Lung Cancer. *Anticancer Res*. 1997; 17: 721-724
86. Holzmayer T, Hilsenbeck S, Von Doff D. Clinical Correlates of MDR1 (P-glycoprotein) Gene Expression in Ovarian and Small Cell Lung Carcinomas. *J Natl Cancer Res*. 1992; 84:1486-1491

87. Nooter K, Westerman A, Flens M, *et al.* Expression of the Multidrug Resistance-associated Protein (MRP1) Gene in Human Cancers. *Clin Cancer Res.* 1995; 1: 1301-1310
88. Beck W, Grogan T, Willman C, *et al.* Methods to Detect P-glycoprotein-associated Multidrug Resistance in Patient's Tumors: Consensus Recommendations. *Cancer Res.* 1996; 56: 3010-3020
89. Herman L, Sharma V, Kronauge J, *et al.* Novel *Hexakis* (Areneisonitrile) Technetium (I) Complexes as Radioligands Targeted to the Multidrug Resistance P-glycoprotein. *J Med Chem.* 1995; 38:2955-2963
90. Crankshaw C, Marmion M, Luker G. Novel Tc(III)-Q-complexes for Functional Imaging of the Multidrug Resistance (MDR1) P-glycoprotein. *J Nucl Med.* 1998; 39: 77-86
91. Rao V, Herman L, Kronauge J, Piwnica-Worms D. A Novel Areneisonitrile Tc Complex Inhibits the Transport Activity of MDR P-glycoprotein. *Nucl Med Biol.* 1998; 25: 225-232
92. Piwnica-Worms D, Kronauge J, Chiu M, *et al.* Uptake and Retention of Hxakis (2-methoxy Isobutyl Isonitrile) Technetium (I) in Cultured Chick Myocardial Cells: Mitochondrial and Plasma Membrane Potential Dependence. *Circulation.* 1990; 82: 1826-1838
93. Delmon-Moingeon L, Piwnica-Worms D, van den Abbeele A. Uptake of the Cation Hexakis (2-methoxy Isobutylisonitrile) Technetium-99m by Human Carcinoma Cell Lines *In Vitro.* *Cancer Res.* 1990; 50: 2198-2202
94. Mariani G. Unexpected Keys in Cell Biochemistry Imaging: Some Lessons from Technetium-99m-Sestamibi. *J Nucl Med.* 1996; 37: 536-538
95. Fukumoto M. Single-photon Agents for Tumor Imaging: ²⁰¹Tl, ^{99m}Tc-MIBI and ^{99m}Tc-tetrofosmin. *Ann Nucl Med.* 2004; 18: 79-95
96. Barbaris E, Kronauge J, Davison A, Jones A. Uptake of Cationic Technetium Complexes in Cultured Human Carcinoma Cells and Human Xenografts. *Nucl Med Biol.* 1998; 25: 667-673
97. Maublant J, Moins N, Gachon P, *et al.* Uptake of Technetium-99m-teboroxime in Cultured Myocardial Cells: Comparison with Thallium-201 and Technetium-99m-sestamibi. *J Nucl Med.* 1993; 34:255-259
98. Arbab A, Koizumi K, Toyama K, *et al.* Uptake of Technetium-99m-tetrofosmin, Technetium-99m-MIBI and Thallium-201 in Tumor Cell Lines. *J Nucl Med.* 1996; 37: 1551-1556
99. Carvalho P, Chiu M, Kronauge J, *et al.* Subcellular Distribution and Analysis of Technetium-99m-MIBI in Isolated Perfused Rat Hearts. *J Nucl Med.* 1992; 33: 1516-1522
100. Crane P, Laliberte R, Heminway S, *et al.* Effect of Mitochondrial Viability and Metabolism on Technetium-99m-sestamibi Myocardial Retention. *Eur J Nucl Med.* 1993; 20: 20-25

101. Maffioli L, Steens J, Pauwels E, Bombardieri E. Applications of ^{99m}Tc -sestamibi in Oncology. *Tumori*. 1996; 82: 12-21
102. Nosotti M, Santambrogio L, Gasparini M, et al. Role of ^{99m}Tc -Hexakis-2-Methoxy-Isobutylisonitrile in the Diagnosis and Staging of Lung Cancer. *Chest*. 2002; 122: 1361-1364
103. Zhou J, Higashi K, Ueda Y, et al. Expression of Multidrug Resistance Protein and Messenger RNA Correlate with ^{99m}Tc -MIBI Imaging in Patients with Lung Cancer. *J Nucl Med*. 2001; 42: 1476-1483
104. Sasaki M, Kuwabara Y, Ichiya Y, et al. Prediction of the Chemosensitivity of Lung Cancer by ^{99m}Tc -Hexakis-2-methoxyisobutyl Isonitrile SPECT. *J Nucl Med*. 1999; 40: 1778-1783
105. Burak Z, Ersoy O, Moretti J, et al. The Role of ^{99m}Tc -MIBI Scintigraphy in the Assessment of MDR1 Overexpression in Patients with Musculoskeletal Sarcoma: Comparison with Therapy Response. *Eur J Nucl Med*. 2001; 28: 1341-1350
106. Sciuto R, Pasqualoni R, Bergomi S, et al. Prognostic Value of ^{99m}Tc -sestamibi Washout in Predicting Response of Locally Advanced Breast Cancer to Neoadjuvant Chemotherapy. *J Nucl Med*. 2002; 43: 745-751
107. Komori T, Narabayashi I, Matsui R, et al. Technetium-99m MIBI Single Photon Emission Computed Tomography as an Indicator of Prognosis for Patients with Lung Cancer – Preliminary Report. *Ann Nucl Med*. 2000; 14: 415-420
108. Del Vecchio S, Salvatore M. ^{99m}Tc -MIBI in the Evaluation of Breast Cancer Biology. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004; 31 (Suppl. 1): S88-S96
109. Cordobes M, Starzec A, Delmon-Moingeon L, et al. Technetium-99m-sestamibi Uptake by Human Benign and Malignant Breast Tumor Cells: Correlation with MDR gene expression. *J Nucl Med*. 1996; 37: 286-289
110. Aratani T, Narabayashi I, Komori T, et al. Usefulness of Tc-99m MIBI SPECT in Predicting Multidrug Resistance Gene Expression Levels in Non Small Cell Lung Cancer – a Preliminary Report. *Ann Nucl Med*. 2001; 15: 313-319
111. Burak Z, Moretti J, Ersoy O, et al. ^{99m}Tc -MIBI Imaging as a Predictor of Therapy Response in Osteosarcoma Compared with Multidrug Resistance-associated Protein and P-glycoprotein Expression. *J Nucl Med*. 2003; 44: 1394-1401
112. Ceriani L, Giovanella L, Bandera M, et al. Semi-quantitative assessment of ^{99m}Tc -sestamibi Uptake in Lung Cancer: Relationship with Clinical Response to Chemotherapy. *Nucl Med Comm*. 1997; 18: 1087-1097

113. Del Vecchio S, Zannetti A, Aloj L, et al. Inhibition of Early ^{99m}Tc-MIBI Uptake by Bcl-2 Anti-apoptotic Protein Overexpression in Untreated Breast Carcinoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003; 30: 879-887
114. Koukourakis M, Koukouraki S, Giatromanolaki A, et al. Non-small Cell Lung Cancer Functional Imaging: Increased Hexakis-2-methoxy-isobutyl-isonitrile Tumor Clearance Correlates with Resistance to Cytotoxic Treatment. *Clin Cancer Res*. 1997; 3: 749-754
115. Botelho F, Gomes C, Abrunhosa A. Avaliação Molecular e Funcional do Desenvolvimento de Resistência aos Citostáticos (MDR) em Tumores Pulmonares de Pequenas Células. 2005 (Trabalho não Publicado)
116. Fukumoto M, Yoshida D, Hayase N, et al. Scintigraphic Prediction of Resistance to Radiation and Chemotherapy in Patients with Lung Carcinoma. *Cancer*. 1999; 86: 1470-1479
117. Yüksel M, Çermik T, Karlikaya C, et al. Monitoring the Chemotherapeutic Response in Primary Lung Cancer Using ^{99m}Tc-MIBI SPET. *Eur J Nucl Med*. 2001; 28: 799-806
118. Wang H, Chen X, Qiu F. Correlation of Expression of Multidrug Resistance Protein and Messenger RNA with ^{99m}Tc-methoxyisobutyl Isonitrile (MIBI) Imaging in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2004; 10: 1281-1285
119. Kuo T, Liu F, Chuang C, et al. To Predict Response Chemotherapy Using Technetium-99m Tetrofosmin Chest Images in Patients with Untreated Small Cell Lung Cancer and Compare with P-glycoprotein, Multidrug Resistance-related Protein-1 and Lung Resistance-related Protein Expression. *Nucl Med Biol*. 2003; 30: 627-632
120. Kostakoglu L, Ruancan S, Ergün E, et al. Influence of the Heterogeneity of P-glycoprotein Expression on Technetium-99m-MIBI Uptake in Breast Cancer. *J Nucl Med*. 1998; 39: 1021-1026
121. Kao C, Changlai S, Chieng P, Yen T. Technetium-99m Methoxyisobutylisonitrile Chest Imaging of Small Cell Lung Carcinoma. *Cancer*. 1998; 83: 64-68
122. Shih C, Hsu W, Huang W, et al. Usefulness of Chest Single Photon Emission Computed Tomography with Technetium-99m Methoxyisobutylisonitrile to Predict Taxol Based Chemotherapy Response in Advanced Non Small Cell Lung Cancer. *Cancer Lett*. 2003; 199: 99-105
123. Reed J. Apoptosis-regulating Proteins as Targets for Drug Discovery. *Trends Mol Med*. 2001; 7: 314-319

124. Hsu W, Yen R, Kao C, et al. Predicting Chemotherapy Response to Paclitaxel-based Therapy in Advanced Non Small Cell Lung Cancer (Stage IIIB or IV) with a Higher T Stage (>T2). *Oncology*. 2002; 63: 173-179
125. Libshits H, Shuman L. Radiation-Induced Pulmonary Changes: CT Findings. *J Comput Assist Tomogr*. 1984; 8: 15-19
126. Patz E, Lowe V, Hoffman J, et al. Persistent or Recurrent Bronchogenic Carcinoma: Detection with PET and ^{18}F -FDG. *Radiology*. 1994; 191: 379-382
127. Inoue T, Kim E, Komaki R, et al. Detecting Recurrent or Residual Lung Cancer with ^{18}F -FDG – PET. *J Nucl Med*. 1995; 36: 788-793
128. Goldsmith S, Kostakoglu L. Nuclear Medicine Imaging of Lung Cancer. *Lung Cancer*. 2000; 38: 511-524
129. Bury T, Corhay J, Duysinx B, et al. Value of FDG-PET in Detecting Residual or Recurrent Nonsmall Cell Lung Cancer. *Eur Respir*. 1999; 14: 1376-1380
130. Hicks R, Kalff V, MacManus M, et al. The Utility of ^{18}F -FDG-PET for Suspected Recurrent Nonsmall Cell Lung Cancer after Potentially Curative Therapy: Impact on Management and Prognostic Stratification. *J Nucl Med*. 2001; 42: 1605-1613
131. Kostakoglu L, Uysal U, Özyar E, et al. A Comparative Study of Technetium-99m Sestamibi and Technetium-99m Tetrofosmin Single-photon Tomography in the Detection of Nasopharyngeal Carcinoma. *Eur J Nucl Med*. 1997; 24: 621-628

ANEXO A

PREPARAÇÃO e CONTROLO de

QUALIDADE do ^{99m}TC -SESTAMIBI

Caracterização do ^{99m}Tc -sestamibi

Composição do Fármaco

Cada frasco contém uma mistura liofilizada, estéril e livre de pirogénios, constituída por tetrakis (2-metoxi isobutil isonitrilo) tetrafluoroborato de cobre (I) (1,0 mg), cloreto estanhoso dihidratado (0,075 mg), hidrocloreto L-cisteína monohidratado (1,0 mg) [1].

Preparação do ^{99m}Tc -sestamibi

Todos os procedimentos a seguir descritos devem ser efectuados de forma a garantir a manutenção das condições de assepsia e de radioprotecção, seguindo as instruções do fabricante.

O protocolo de preparação do ^{99m}Tc -sestamibi é o seguinte [1]:

1. Em livro de registo apropriado, anotar o lote e a data de validade do fármaco;
2. Colocar o frasco do fármaco dentro de um contentor de chumbo;
3. Numa seringa estéril e devidamente protegida com protecção de chumbo ou tungsténio, calibrar 3700 a 5550 MBq (100 a 150 mCi) de solução de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc) num volume de 1 a 3 mL;
4. Adicionar a solução de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc) calibrada ao conteúdo do frasco e retirar o volume de ar equivalente à quantidade de solução introduzida para manter a pressão no interior do frasco;
5. Agitar o frasco durante 5 a 10 segundos;
6. Retirar o frasco do contentor de chumbo, colocando-o num contentor próprio para banho-maria. Colocar o frasco num recipiente com água em ebulição durante 10 minutos. O tempo deve começar a contar a partir do momento em que a água começa a ferver novamente. É muito importante que a água não entre em contacto com a cápsula de borracha do frasco;
7. Retirar o frasco do banho e voltar a colocá-lo no contentor de chumbo inicial, deixando arrefecer à temperatura ambiente durante 15 minutos;
8. Calibrar a actividade total de radiofármaco preparado;

9. Colocar uma etiqueta no contentor de chumbo, incluindo as seguintes informações: actividade total (MBq ou mCi), volume total (mL), actividade volúmica (MBq ou mCi/mL), data, hora e responsável pela preparação;
10. Em livro de registo próprio anotar os mesmos dados incluídos na etiqueta, bem como o nome dos doentes a quem será administrado o radiofármaco preparado.

O radiofármaco deve ser armazenado a uma temperatura entre 15 e 25°C, sendo estável durante 6 horas após a sua preparação. O pH é de 5,5 podendo variar entre 5,0 e 6,0.

Propriedades Farmacodinâmicas do ^{99m}Tc -sestamibi

O ^{99m}Tc -sestamibi não possui quaisquer efeitos farmacodinâmicos, visto que a quantidade administrada em termos de diagnóstico é muito inferior ao mínimo necessário para induzir efeitos farmacológicos. O agente é eliminado sem ser metabolizado [1].

Propriedades Farmacocinéticas do ^{99m}Tc -sestamibi

O ^{99m}Tc -sestamibi é um composto catiónico, lipofílico que é captado preferencialmente pelas células musculares cardíacas viáveis. A retenção intracelular do ^{99m}Tc -sestamibi ocorre especificamente na mitocôndria, como resultado de interações electrostáticas. Tendo em conta este mecanismo de retenção, qualquer célula rica em mitocôndrias é capaz de captar e reter o ^{99m}Tc -sestamibi.

A actividade pulmonar é negligenciável durante todo o estudo, mesmo imediatamente após a injeção. A depuração sanguínea ocorre muito rapidamente, com semi-vidas sanguíneas da ordem de 4,3 minutos em situação de repouso e 1,6 minutos em situação de esforço físico. Cinco minutos após a administração endovenosa, apenas 8% da dose injectada se mantém em circulação. Existe menos que 1% de ^{99m}Tc -sestamibi ligado às proteínas plasmáticas [1].

A principal via de eliminação do ^{99m}Tc -sestamibi é o sistema hepatobiliar. A actividade proveniente da vesícula biliar aparece no intestino dentro de uma hora após a injeção. Vinte e sete por cento da dose injectada é excretada através da urina, e aproximadamente 33% é eliminada através das fezes em 48 horas [1].

Características Físicas do Radionúclido

O Tecnécio-99m (^{99m}Tc) decai por transição isomérica, com uma semi-vida de 6,02 horas, sendo um emissor gama puro de fótons com energia de 140 keV.

Aspectos Práticos do Controlo de Qualidade do ^{99m}Tc -sestamibi

Testes Físico-químicos

a) Características Físicas

O aspecto físico de um radiofármaco é um aspecto de fundamental importância. O manipulador deve estar familiarizado com a cor e o estado físico das preparações, devendo reconhecer facilmente, através de mera inspecção visual, qualquer desvio da coloração referenciada pelo produtor, bem como a existência de quaisquer partículas em suspensão [2].

No caso do ^{99m}Tc -sestamibi, a preparação final deve corresponder a uma solução incolor e sem partículas em suspensão [1].

b) pH

O pH ideal de um radiofármaco é de 7,4 (igual ao pH sanguíneo), embora este possa assumir uma vasta gama de valores, que normalmente se situam entre 2 e 9, uma vez que o sangue possui uma elevada capacidade tampão [2].

O pH pode ser medido através de vários métodos, nomeadamente através de um medidor de pH ou através do método colorimétrico. O primeiro método mencionado é muito preciso, pois é quantitativo, mas coloca problemas de contaminação radioactiva dos eléctrodos. O segundo método carece de precisão, uma vez que a determinação do pH é feita por comparação de cores, mas possui a vantagem de ser um método bastante rápido e prático, sendo, contudo, consensualmente considerado como suficientemente preciso para o objectivo pretendido. Por este motivo, é este o método utilizado no âmbito deste trabalho.

Em termos práticos, coloca-se uma gota do radiofármaco (contido numa seringa de 1mL em protecção de chumbo) na extremidade do papel de pH, espera-se alguns instantes e faz-se a comparação com a escala de cores da embalagem do papel. De modo a obedecer aos critérios de

aceitação preconizados pelo fabricante, o ^{99m}Tc -sestamibi deve possuir um pH de 5,5 podendo contudo variar entre 5,0 e 6,0 [1].

c) Pureza Radionuclídica

A pureza radionuclídica corresponde à fracção da radioactividade total presente num radiofármaco na forma radionuclídica desejada, sendo expressa em percentagem. As impurezas radionuclídicas podem ser devidas ao método de produção dos radionúclidos ou à separação incompleta durante o processo radioquímico de marcação [2, 3].

São exemplo de impurezas radionuclídicas numa solução de pertecnetato de sódio (^{99m}Tc), cujos limites legais se apresentam entre parêntesis, expressos em μCi (microcuries) do contaminante por mCi (milicurie) de ^{99m}Tc -pertecnetato: ^{99}Mo (0,15 μCi), ^{131}I (0,05 μCi), ^{103}Ru (0,05 μCi), ^{89}Sr (0,0001 μCi), ^{90}Sr (0,00006 μCi); os outros radionúclidos emissores gama não devem exceder 0,1 μCi [4]. Estes contaminantes radioactivos são indesejáveis, porque aumentam a exposição do doente à radiação (sem qualquer benefício) e podem deteriorar a qualidade das imagens. As impurezas radionuclídicas mais comuns presentes no eluato são o ^{99}Mo e o ^{99}Tc . Contudo, nos departamentos de Medicina Nuclear, devido ao equipamento normalmente disponível, apenas se realiza a determinação do ^{99}Mo , garantindo o produtor que os outros contaminantes não excedem os valores mencionados.

A pureza radionuclídica depende das semi-vidas relativas, da quantidade do radionúclido pretendido e de outros contaminantes. A pureza radionuclídica sofre alterações à medida que o tempo passa. A presença de pequenas quantidades de radionúclido contaminante de semi-vida longa é difícil de detectar na presença de grandes quantidades de um radionúclido de semi-vida curta. Nestes casos, deve-se deixar decair o radionúclido de curto período físico, medindo-se então a actividade do de período físico mais longo [2].

A determinação da quantidade de ^{99}Mo presente no eluato baseia-se no facto de a actividade do eluato proveniente do ^{99m}Tc ser atenuada por uma espessura de 6 mm de chumbo [5]. De facto, um contentor de chumbo com 6 mm de espessura consegue minimizar a passagem de fotões de baixa energia (como os de 140 keV provenientes do ^{99m}Tc e os de 181 keV provenientes do ^{99}Mo), sem contudo atenuar os fotões gama do ^{99}Mo de energia mais elevada (740 e 778 keV).

O procedimento adoptado neste trabalho para determinação da pureza radionuclídica é o seguinte:

1. Colocar o contentor de chumbo com 6 mm de espessura no calibrador de dose para obter as contagens relativas ao fundo. (Deve-se aguardar algum tempo até não haver oscilações nas contagens). Este valor é expresso em μCi ;
2. Mudar o isótopo no calibrador, para o ^{99}Mo ;
3. Transferir o frasco do eluato do seu contentor habitual para o contentor de 6 mm. Deste modo, como já foi referido anteriormente, mede-se a actividade respeitante ao ^{99}Mo (expressa em μCi);
4. Colocar o frasco de eluato, sem o contentor de chumbo, para medir a actividade relativa ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (expressa em mCi);
5. Calcular a relação $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$, segundo a fórmula:

$$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc} = \frac{\text{contagens } ^{99}\text{Mo} (\mu\text{Ci}) - \text{contagens fundo } (\mu\text{Ci}) \times \text{factor correcção}}{\text{contagens } ^{99\text{m}}\text{Tc} (\text{mCi}) - \text{contagem fundo } (\mu\text{Ci})}$$

O valor do factor de correcção varia em função do calibrador de dose. Isto prende-se com o facto do contentor de chumbo absorver todos os raios gama de baixa energia, mas também absorver parte dos raios gama de alta energia provenientes do ^{99}Mo [3]. Por este motivo, o factor de correcção irá "compensar" aquela atenuação, procurando contribuir para uma apresentação tão fiel quanto possível dos valores reais da pureza radionuclídica. O valor obtido fica devidamente registado no livro de registo referente ao gerador.

d) Pureza Química

A pureza química de um radiofármaco corresponde à fracção do produto que se encontra na forma química desejada, quer esteja total ou parcialmente na forma radiomarcada [2]. Há diversos contaminantes químicos presentes nos eluatos, mas o mais comum é o ião alumínio (Al^{3+}), cujo valor não deve exceder $10 \mu\text{g Al}^{3+}/\text{mL}$ de solução [2, 3, 4, 5]. A presença deste catião conduz à formação de colóides que serão captados pelo sistema reticuloendotelial. Em última análise, a partir de certas quantidades, a presença de impurezas químicas podem, inclusivamente, provocar um efeito tóxico [2].

O método descrito na literatura é também aquele que é utilizado neste trabalho – método colorimétrico. Com este método não se pretende saber qual o valor exacto da quantidade de Al^{3+} presente no eluato, mas apenas inferir qualitativamente acerca da presença desse ião em quantidades superiores ou inferiores ao limite legal.

Passa-se então a descrever o procedimento utilizado para determinar a pureza química do eluato:

1. Retirar uma pequena quantidade de eluato para uma seringa de 1mL (com protecção de chumbo) e deita-se uma gota da solução numa tira de papel constituído por ácido tricarboxílico;
2. Deitar uma gota (com as mesmas dimensões) de solução padrão de Al^{3+} numa tira de papel de ácido tricarboxílico. Esta solução tem a concentração exacta de 10 $\mu\text{g Al}^{3+}/\text{mL}$;
3. Esperar o tempo necessário para que o Al^{3+} presente nas duas soluções reaja com o papel indicador;
4. Comparar as colorações das duas tiras.

Critério: se a coloração da gota da solução de pertecnetato de sódio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) for mais intensa que a gota da solução padrão, então o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -pertecnetato contém mais de 10 $\mu\text{g Al}^{3+}/\text{mL}$ de eluato, pelo que não deve ser utilizado para a preparação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -sestamibi.

e) Pureza Radioquímica

A determinação da pureza radioquímica é dos testes mais frequentemente efectuados na maioria dos departamentos de Medicina Nuclear. Esta define-se como a percentagem da radioactividade total do radiofármaco presente na forma química desejada [2, 3]. A pureza radioquímica dos radiofármacos deve ser determinada antes da sua administração aos doentes, devido aos potenciais problemas que podem afectar não só as formulações, mas também, em última análise, a qualidade das imagens. A detecção e a determinação das impurezas radioquímicas podem ser realizadas através de diversos métodos, nomeadamente a precipitação, a cromatografia de camada fina, a cromatografia de gel, a cromatografia gasosa, a electroforese de papel e de gel, a troca iónica, a extracção com solventes, a cromatografia líquida de alta resolução e a destilação.

O método utilizado neste trabalho foi o aconselhado pelo fabricante do sestamibi, ou seja, a cromatografia ascendente em camada fina. A cromatografia é uma técnica de separação dos componentes de uma mistura seguindo os seus diferentes índices de repartição. De um modo geral,

uma pequena quantidade do radiofármaco (alíquota) é colocada no fundo (origem) da tira cromatográfica (fase estacionária) que depois é colocada num solvente apropriado (fase móvel). O solvente migra ao longo da tira (por fenómenos de adsorção e capilaridade) separando as espécies químicas presentes. Quando o solvente percorrer a distância desejada ao longo da tira (frente do solvente) esta é retirada do solvente e seca. Depois, realiza-se a quantificação da distribuição da actividade.

A relação entre a distância migrada do componente em estudo e a distância da frente do solvente, a partir do ponto de origem designa-se de índice de repartição e é característico de cada componente do radiofármaco. De um modo geral, pode dizer-se que os solventes aquosos permitem que o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e que os complexos tecneciados hidrofílicos migrem com a frente do solvente, enquanto que os compostos insolúveis permanecem na origem. Os solventes orgânicos permitem que o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ migre com a frente do solvente, e os restantes componentes permaneçam na origem [3].

Passa-se então a descrever o procedimento para a determinação da pureza radioquímica do ^{99m}Tc -sestamibi [1]:

Fase estacionária: óxido de alumínio, Baker-Flex #1 B-F (dimensões: 2,5 cm x 7,5 cm)

Fase móvel: etanol (pureza superior a 95%)

1. Colocar o etanol na câmara cromatográfica, cobrindo-a com uma tampa e deixando-a saturar durante 10 minutos. O volume de etanol deve ser suficiente para atingir uma altura de cerca de 3 a 4 mm.
2. Preparar a tira cromatográfica de acordo com o seguinte esquema:

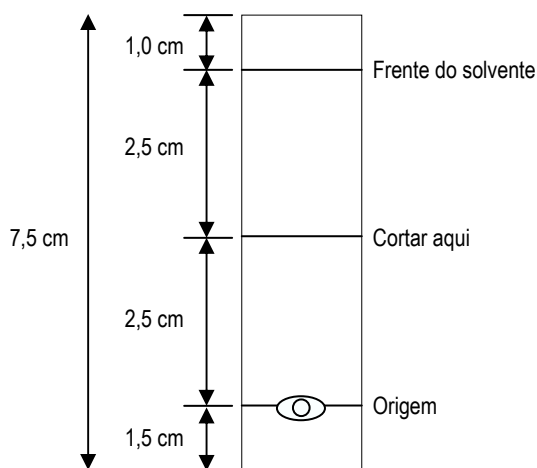


Figura A1 – Esquema representativo da fase estacionária.

3. Aplicar uma gota de etanol na origem da tira cromatográfica (1,5 cm de altura), utilizando uma seringa de 1mL e uma agulha de 22 – 26 *Gauge*. Não deixar que a gota seque.
4. Aplicar uma gota de radiofármaco sobre a gota de etanol e deixar secar. A gota deve secar à temperatura ambiente, não devendo ser aquecida.
5. Colocar a tira na câmara cromatográfica e deixar migrar até à frente do solvente (5 cm acima do ponto de aplicação das gotas).
6. Deixar secar a tira.
7. Cortar a tira a 4 cm de altura e medir cada metade no contador de poço.
8. Calcular a pureza radioquímica de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ } ^{99m}\text{Tc-Sestamibi} = \frac{\text{Actividade metade superior tira cromatográfica} - \text{Actividade fundo}}{(\text{Actividade metade superior} + \text{Actividade metade inferior tira cromatográfica}) - \text{Actividade fundo}} \times 100$$

De acordo com o fabricante, a pureza radioquímica deve ser sempre superior a 90%. Se tal não se verificar, o radiofármaco preparado deve ser rejeitado [1].

Testes Biológicos

O objectivo dos testes biológicos é determinar a esterilidade, a pirogenicidade e a toxicidade de um radiofármaco. Estes testes são idênticos àqueles que se realizam para os fármacos convencionais. Contudo, e devido à especificidade própria dos radiofármacos e da inerente semi-vida física curta, os testes respeitantes à pirogenicidade e esterilidade, não são praticáveis (nem praticados) com assiduidade no âmbito da radiofarmácia, até porque a chegada dos resultados acontece dias depois da utilização do mesmo (por exemplo, no caso que nos ocupa presentemente, o fabricante aconselha como vida útil do kit após reconstituição cerca de seis horas, enquanto que o resultado do teste biológico mais simples e rápido demora cerca de quatro a cinco dias a chegar do laboratório). A atitude mais corrente e consensual, nacional e internacionalmente, consiste em retirar de tempos a tempos (normalmente cerca de uma amostra em cada dez, ou cerca de uma por semana) uma amostra que é enviada para laboratórios especializados neste tipo de testes. Assim se mantém algum controlo em termos biológicos, mesmo se relativamente aproximado e sempre *a posteriori*. Durante todo o processo de manipulação dos produtos trabalha-se de acordo com as normas GMP (*Good Manufacturing Practice*), respeitando as condições de assepsia, em câmaras de

fluxo laminar sempre que necessário ou aconselhável, pelo que de uma forma geral, é bastante infrequente (nunca aconteceu, pelo menos de acordo com o meu conhecimento) que os resultados laboratoriais dos testes biológicos sejam positivos.

Apesar de, no âmbito deste trabalho ainda não se ter efectuado qualquer dos testes biológicos, passo a apresentar os conceitos fundamentais.

a) Teste de Esterilidade

A esterilidade indica a ausência de qualquer bactéria ou microorganismo viável num radiofármaco. Não é possível realizar o teste de esterilidade (ou concluí-lo e obter resultados) de um radiofármaco de semi-vida curta antes da sua administração ao doente, pois os testes actualmente existentes demoram vários dias até à obtenção dos resultados. Deve ser utilizada uma técnica asséptica, de modo a não introduzir bactérias externas durante os procedimentos.

Dois dos métodos para determinar a esterilidade consistem na incubação de uma amostra de radiofármaco num meio de tioglicolato à temperatura de 30 - 35°C durante 7 a 14 dias ou num meio digestivo de caseína à temperatura de 20 - 25°C durante 7 a 14 dias [2]. O volume da amostra deve ser igual à dose a administrar. Se se verificar o crescimento bacteriano em qualquer dos testes, o radiofármaco é considerado não estéril.

b) Teste de Pirogenicidade

Todos os radiofármacos destinados à administração humana devem ser isentos de pirogénios. Estes são polissacáridos ou proteínas produzidas pelo metabolismo dos microorganismos. O tipo mais comum de pirogénios são as endotoxinas, contudo diversos produtos químicos também podem constituir uma fonte de pirogénios [2].

Após a administração, os pirogénios produzem sintomas como febre, leucopenia, dores articulares, sudção, náuseas e dilatação das pupilas. Este tipo de reacção pode verificar-se em alguns doentes no período de 30 minutos a 2 horas após a administração e persistem durante 10 a 12 horas, mas raramente são fatais [2].

A presença de pirogénios é particularmente indesejável quando são administrados volumes maiores numa dose única (15 mL ou mais). De um modo geral, pode considerar-se desnecessário realizar o teste de pirogenicidade nos radiofármacos tecneciados, porque os volumes injectados são muito reduzidos [5].

Existem diversos métodos para a determinação da pirogenicidade dos radiofármacos, nomeadamente a utilização de coelhos (com determinado peso) nos quais se injecta (numa veia da orelha) um volume de radiofármaco 3 a 10 vezes superior à dose humana. Depois da injeção mede-se a temperatura rectal dos animais à 1^a, 2^a e 3^a horas, verificando as variações que ocorrem e a partir daí inferir se o radiofármaco é ou não apirogénio. Um outro método é o LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) que corresponde a um teste laboratorial *in vitro* que se baseia na observação das preparações de *Amebocyte Lysate* de sangue de *horseshoe crabs* que formam um gel opaco na presença de pirogénios. Trata-se de um método mais sensível e credível que o dos coelhos, mas apenas consegue detectar a presença de pirogénios do tipo endotoxinas [2].

Um outro aspecto importante é o facto de a esterilidade de uma solução não garantir a sua apirogenicidade, nem a esterilização destruir os pirogénios. Efectivamente, não há nenhum método particular para tornar uma amostra apirogénica. Uma vez que a pirogenicidade tem origem fundamentalmente no metabolismo bacteriano, a melhor forma de prevenir a contaminação pirogénica é utilizar material esterilizado, soluções e equipamento em condições assépticas, isto é, adoptar métodos e técnicas próprias de um sistema com Garantia de Qualidade, ou seja, adoptar uma atitude preventiva permanente.

Resultados Obtidos

No âmbito deste trabalho, realizaram-se os testes fisico-químicos em 10 *kits* de ^{99m}Tc-sestamibi e respectivos eluatos. Não foram efectuados os testes biológicos (teste de esterilidade e de pirogenicidade), pelas razões já apresentadas, tratando-se de testes bastante dispendiosos, quer em termos económicos, quer em termos de tempo.

Os resultados obtidos são apresentados na tabela seguinte:

Tabela A1 – Resultados obtidos nos testes físico-químicos.

Kit	Inspecção Visual	pH	Pureza Radionuclídica $\frac{\mu\text{Ci } ^{99}\text{Mo}}{\text{mCi } ^{99\text{m}}\text{Tc}}$ Refª: < 0,15	Pureza Química Refª: <10 μg Al^{3+}/mL	Pureza Radioquímica	Resultado Final
Kit 1	Sol. incolor, sem partículas	5,5	$9,7 \times 10^{-3}$	Sim	96,5%	Aprovado
Kit 2	Sol. incolor, sem partículas	5,5	$15,2 \times 10^{-3}$	Sim	97,2%	Aprovado
Kit 3	Sol. incolor, sem partículas	5,5	$12,8 \times 10^{-3}$	Sim	93,3%	Aprovado
Kit 4	Sol. incolor, sem partículas	5,5	$21,4 \times 10^{-3}$	Sim	94,8%	Aprovado
Kit 5	Sol. incolor, sem partículas	5,5	$10,3 \times 10^{-3}$	Sim	96,7%	Aprovado
Kit 6	Sol. incolor, sem partículas	5,5	$12,5 \times 10^{-3}$	Sim	98,5%	Aprovado
Kit 7	Sol. incolor, sem partículas	5,5	$11,9 \times 10^{-3}$	Sim	97,1%	Aprovado
Kit 8	Sol. incolor, sem partículas	5,5	$13,3 \times 10^{-3}$	Sim	98,2%	Aprovado
Kit 9	Sol. incolor, sem partículas	5,5	$11,2 \times 10^{-3}$	Sim	98,7%	Aprovado
Kit 10	Sol. incolor, sem partículas	5,5	$11,8 \times 10^{-3}$	Sim	96,9%	Aprovado

ANEXO B

CONTROLO de QUALIDADE da CÂMARA

GAMA GERAL ELECTRIC 400 AC

Controlo de Qualidade da Câmara Gama *General Electric 400 AC*

a) Ajuste do Fotopico

Deve-se seleccionar a janela de energia correcta para o radionúclido a utilizar, (no caso presente, como referido: janela de 20% centrada nos 140 keV) ficando o fotopico perfeitamente centrado nessa janela. Uma ajuste correcta do fotopico é absolutamente fundamental para optimização do desempenho da câmara gama. Até porque todos os parâmetros que estão a ser avaliados para controlo da qualidade são afectados desfavoravelmente se o sistema se encontra “off-peak” [6].

b) Controlo de Orientação

A orientação da imagem deve manter-se constante em todas as imagens obtidas para efeitos de controlo da qualidade, isto para que a mesma área do detector esteja sempre gravada na mesma posição na imagem (particularmente importante na avaliação da progressão, ou regressão, de eventuais alterações regionais do desempenho do detector) [6].

c) Uniformidade

Existe consenso neste campo, considerando-se que se deve usar um dos métodos, e sempre o mesmo, com uma frequência diária.

c₁) Método Extrínseco

Se o que se pretende é a avaliação da uniformidade extrínseca do sistema, então instala-se e centra-se sobre o colimador uma fonte planar (a taxa de contagens não deve exceder as 20.000 contagens/segundo).

O protocolo para a execução deste teste é o seguinte [6, 7, 8, 9]:

1. Adquirir uma imagem da fonte planar que contenha, pelo menos, cerca de 3 milhões de contagens (se o campo de visão apresentar a forma circular - como é o caso presente) e cerca de 5 milhões de contagens (se o campo de visão apresentasse a forma rectangular);
2. Avaliar e comparar as imagens obtidas com imagens do mesmo tipo obtidas previamente, em termos de uniformidade;
3. Gravar todos os dados importantes (informação, afinação do fotopico, afinação das intensidades do tubo de raios catódicos, totalidade das contagens obtidas e tempo necessário para as obter);
4. Proceder à gravação das imagens obtidas em ficheiros dedicados exclusivamente para esse fim.

c₂) Método Intrínseco

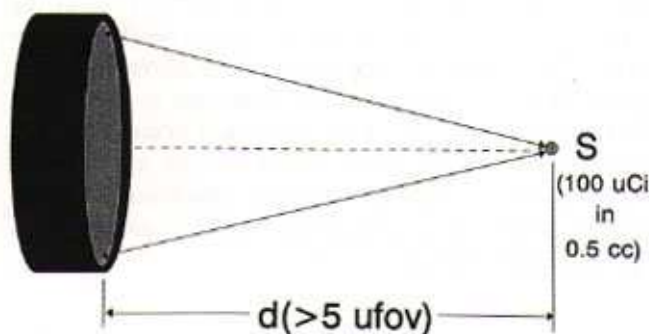


Figura B1 – Esquema ilustrativo da colocação da fonte pontual num teste intrínseco.

Fonte: DePuey E, Berman D, Garcia E. Cardiac SPECT Imaging. USA. 1995. Raven Press.

Pp. 22

Se este for o método adoptado, o colimador tem de ser removido. Cuidados extremos têm de ser tomados, no sentido de evitar a todo o custo qualquer choque físico, bem como a ocorrência de contaminação radioactiva do cristal. De facto, a contaminação de um cristal pode facilmente ocasionar a inoperacionalidade da câmara gama durante vários dias. A figura seguinte ilustra a forma como se efectuou o teste de uniformidade segundo o método intrínseco.



Figura B2 – Teste de uniformidade – método intrínseco.

O protocolo para a execução deste teste é o seguinte [7, 8, 9]:

1. Começa-se por posicionar uma máscara em anel, de chumbo, apresentando um tamanho apropriado, na face do detector, isto se o efeito de acumulação de contagens na periferia do campo de visão não é já, a título prévio, anulado por máscara própria e inerente ao detector (como é o caso presente);
2. Colocar uma fonte pontual, com uma taxa de contagens que não exceda 20.000 contagens/segundo, a uma distância mínima de cerca de cinco vezes o diâmetro do campo de visão útil (UFOV – *Useful Field of View*) do detector.
3. Adquirir uma imagem planar da fonte que contenha, pelo menos, cerca de 3 milhões de contagens (se o campo de visão apresentar a forma circular - como é o caso presente) e cerca de 5 milhões de contagens (se o campo de visão apresentasse a forma rectangular);
4. Avaliar e comparar as imagens obtidas com imagens do mesmo tipo obtidas previamente, em termos de uniformidade;
5. Gravar todos os dados importantes (informação, afinação do fotopico, afinação das intensidades do tubo de raios catódicos, totalidade das contagens obtidas e tempo necessário para as obter);
6. Proceder à gravação das imagens obtidas em ficheiros dedicados exclusivamente para esse fim.

No âmbito deste trabalho, optou-se pelo segundo método, o intrínseco, no sentido de ser efectuado desta forma o acesso a este parâmetro, previamente ao início de cada uma das séries diárias de testes clínicos. Contudo, numa primeira fase, em que se pretendia a avaliação completa das características da câmara gama, efectuou-se igualmente o método extrínseco, com utilização de fonte planar sobre o colimador BEAR. Os limites de aceitação, preconizados pela *General Electric* para o equipamento utilizado neste trabalho, em termos de uniformidade constam na tabela seguinte [8,9]:

Tabela B2 – Limites para o valor da uniformidade da câmara gama *GE 400 AC*

	Limite no Campo Visão Total (%) FFOV (Full Field Of View)	Limite no Campo Visão Central (%) CFOV (Central Field Of View)
<i>Uniformidade Integral</i>	8,5	7,5
Uniformidade Diferencial	6,5	5,5

d) Linearidade e Resolução

Parece igualmente haver um consenso que indica que a linearidade e a resolução devem ser avaliados pelo menos uma vez por semana. Um fantoma de buracos ortogonais é preferível, segundo muitos autores, desde que as dimensões dos buracos sejam suficientemente pequenas para testar a resolução máxima das câmaras gama que se pretende avaliar. Os outros tipos de fantasmas podem requerer múltiplas imagens do fantoma, em diferentes orientações, para obtenção de uma completa avaliação do desempenho do sistema. No âmbito deste trabalho, como já foi referido, utilizou-se o fantoma de quatro quadrantes, por ser o único disponível, tendo por isso que se adquirir quatro imagens (uma para cada posição do fantoma, com o fantoma a apresentar um desvio angular de 90° entre cada posição). Desta forma, todas as áreas do UFOV foram testadas (figura B3).

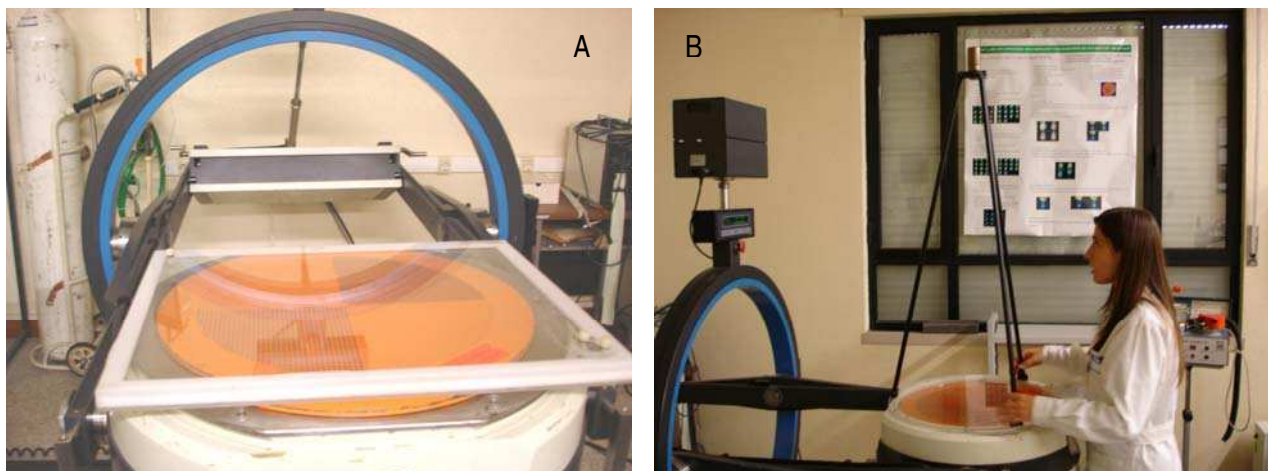


Figura B3 – Teste de resolução e linearidade espacial. (A) método extrínseco; (B) método intrínseco.

d₁) Método Intrínseco

O protocolo de execução deste teste é o seguinte [7, 8, 9]:

1. Inicia-se o teste pela remoção do colimador e pelo posicionamento do detector face ao tecto;
2. Posicionar uma máscara em anel, de chumbo, apresentando um tamanho apropriado, na face do cristal, isto se o efeito de acumulação de contagens na periferia do campo de visão não é já, a título prévio, anulado por máscara própria e inerente ao detector (como é o caso presente);
3. Posicionar o fantoma na posição adequada;
4. Colocar uma fonte pontual, com uma taxa de contagens que não exceda 20.000 contagens/segundo, a uma distância mínima de cerca de cinco vezes o diâmetro do UFOV do detector;
5. Adquirir uma imagem da fonte que contenha, pelo menos, cerca de 3 milhões de contagens (se o campo de visão apresentar a forma circular – como é o caso presente) ou cerca de 5 milhões de contagens (se o campo de visão apresentasse a forma rectangular);
6. Avaliar e comparar as imagens obtidas com imagens do mesmo tipo obtidas previamente, em termos de linearidade e resolução intrínseca;
7. Proceder à gravação das imagens obtidas em ficheiros dedicados exclusivamente para esse fim.

d₂) Método Extrínseco

O protocolo de execução deste teste é o seguinte [7, 8, 9]:

8. Inicia-se o teste pela colocação do colimador BEAR e pelo posicionamento do detector face ao tecto;
9. Posicionar uma máscara em anel, de chumbo, apresentando um tamanho apropriado, na face do cristal, isto se o efeito de acumulação de contagens na periferia do campo de visão não é já, a título prévio, anulado por máscara própria e inerente ao detector (como é o caso presente);
10. Posicionar o fantoma de barra sobre o colimador;
11. Colocar uma fonte plana, com uma taxa de contagens que não exceda 20.000 contagens/segundo, sobre o fantoma;
12. Adquirir uma imagem da fonte que contenha, pelo menos, cerca de 3 milhões de contagens (se o campo de visão apresentar a forma circular – como é o caso presente) ou cerca de 5 milhões de contagens (se o campo de visão apresentasse a forma rectangular);
13. Avaliar e comparar as imagens obtidas com imagens do mesmo tipo obtidas previamente, em termos de linearidade e resolução intrínseca;
14. Proceder à gravação das imagens obtidas em ficheiros dedicados exclusivamente para esse fim.

e) Centro de Rotação

A avaliação do centro de rotação é efectuada para assegurar que existe um alinhamento entre a representação obtida e o ponto, real, de referência que se está a observar e que deu origem à imagem. A existência de um alinhamento correcto entre a câmara e o centro de rotação mecânico deve ser testada no mínimo semanalmente.

Obtém-se a informação através de imagens, que foram acumuladas através de movimentos rotacionais em torno de uma ou mais fontes pontuais de ^{99m}Tc ou ^{57}Co , adquiridas com os mesmos colimadores e segundo as mesmas matrizes utilizadas clinicamente. Utiliza-se então um programa específico do computador para calcular o centro de rotação e o valor do pixel obtido é gravado.

As imagens transaxiais reconstruídas podem apresentar as fontes pontuais parecendo muito largas, ou ainda parecendo ter um centro frio, isto se o centro de rotação estiver desalinhado.

Registos dos valores obtidos (bem como os valores das correcções eventualmente necessárias) devem ser gravados e mantidos, para poder avaliar a evolução de características do sistema.

No caso presente, e por razões relacionadas com a necessidade de obtenção de resultados fiáveis e com a facilidade de execução do próprio teste, optou-se pela execução de um teste de avaliação do centro de rotação diário, utilizando-se para o efeito uma fonte de cerca de 74 a 111 MBq (2 a 3 mCi) de ^{99m}Tc , seguindo a metodologia aqui descrita (coincidente com a preconizada pelo fabricante [7, 8, 9], estando o colimador BEAR colocado. A figura seguinte ilustra o modo de execução deste teste.



Figura B4 – Avaliação do alinhamento do centro de rotação.

O protocolo para a execução deste teste é o seguinte [9,10]:

1. Inicia-se o protocolo pela colocação do colimador que se vai utilizar: BEAR;
2. Colocar uma fonte pontual de 74 a 111 MBq (2 a 3 mCi) de ^{99m}Tc na extremidade da mesa de imagem, ligeiramente desalinhado em relação ao centro do campo de visão, – cerca de alguns centímetros na direcção dos xx;
3. Programar uma aquisição tomográfica com 32 imagens planares, com duração de 5 segundos cada, ao longo de 360°, utilizando uma matriz de 64 x 64;

4. Avaliar e comparar os valores obtidos com os do mesmo tipo obtidos previamente, com o intuito de facilitar o reconhecimento e identificação de tendências evolutivas;
5. Gravar a totalidade dos dados significativos;
6. Comparar os valores obtidos com os preconizados pelo fabricante (limite de aceitação situado nos 4 mm).

Resultados Obtidos

a) Verificação do fotopico



Figura B5 – Verificação visual do fotopico.

b) Teste de Uniformidade

Tabela B3 – Resultados obtidos no teste de uniformidade – método intrínseco.

	Limite no Campo Visão Total (%) FFOV (Full Field Of View)	Limite no Campo Visão Central (%) CFOV (Central Field Of View)
Uniformidade Integral	6,18	4,38
Uniformidade Diferencial	3,47	2,77

c) Teste de Resolução e Linearidade Espacial

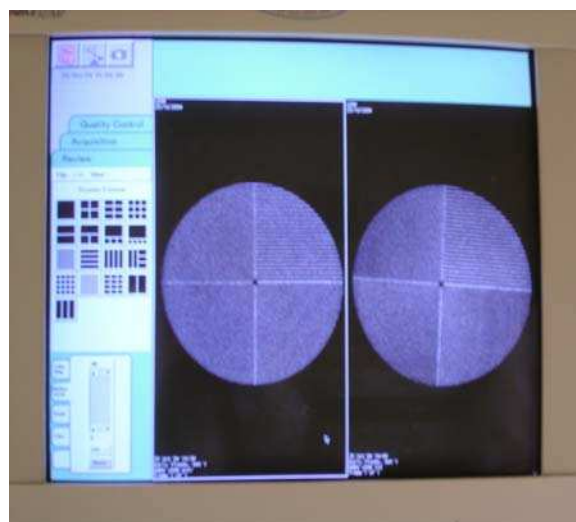


Figura B6 – Resultado obtido nos testes de resolução e linearidade espacial.

Método extrínseco – foto da esquerda; método intrínseco – foto da direita.

d) Centro de Rotação



Figura B7 – Resultados obtidos no teste do centro de rotação.

O valor do desalinhamento centro de rotação (2,22 mm) está dentro dos limites de tolerância ($< 4\text{mm}$).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Literatura inclusa no kit de Cardiolite® produzido pela DuPont Pharma GmbH
2. Saha G. Fundamentals of Nuclear Pharmacy, 4th edition. USA. 1998. Springer-Verlag. Pp. 121, 148-170
3. O' Connor, M. The Mayo Clinic Manual of Nuclear Medicine. USA. 1996. Churchill Livingstone. Pp. 59-82
4. Henkin R, Boles M, Dillehay G, Halama J, Karesh S, Wagner R, Zimmer A. Nuclear Medicine, Vol II. USA. 1996. Mosby. Pp. 1493-1594
5. Sharp P, Gemmell H, Smith F. Practical Nuclear Medicine, 2nd edition. USA. 1998. Oxford University Press. Pp. 72-99
6. Bernier D, Christian P, Langan J. Nuclear Medicine Technology and Techniques, 4th edition. USA. 1997. Mosby. Pp. 79-95
7. GE STARCAM Owner's Manual. 04 – 90. General Electric Medical Systems. 1990
8. GE Owner's Manual. 21 68381-100, REV 1. General Electric Medical Systems. 1997
9. GE Owner's Manual. 21 48617-100, REV 3. General Electric Medical Systems. 1998
10. Metello L. A Importância do Controlo de Qualidade Instrumental em Medicina Nuclear. Provas Públicas de Aptidão Pedagógica e Científica. 2003. (Trabalho não Publicado)