



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DA MARCAÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO DA SUBSTÂNCIA P
UTILIZANDO LUTÉCIO-177 COMO RADIOTRAÇADOR**

CLARICE MARIA DE LIMA

**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do Grau de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear -
Aplicações**

**Orientadora:
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo**

**SÃO PAULO
2011**



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO DA MARCAÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO DA SUBSTÂNCIA P
UTILIZANDO LUTÉCIO-177 COMO RADIOTRAÇADOR**

CLARICE MARIA DE LIMA

**Dissertação apresentada como
parte dos requisitos para obtenção
do Grau de Mestre em Ciências na
Área de Tecnologia Nuclear -
Aplicações**

**Orientadora:
Dra. Elaine Bortoleti de Araújo**

**SÃO PAULO
2011**

*Aos meus pais que sempre acreditaram e confiaram em mim e pelo total apoio para
concluir mais esta etapa.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, pela saúde, por minha família e por mais uma vez não ter me desamparado em toda a preparação para este trabalho.

À minha orientadora pela grande oportunidade que me concedeu, pela confiança, pela paciência, dedicação e por sua simplicidade em transmitir seus conhecimentos.

Aos bolsistas por me acolherem com tanto carinho e atenção, por cada ajuda recebida, cada ensinamento, pela troca de conhecimento, pela paciência e pela amizade construída neste período, em especial: Adriana Vidal, Akin, Camila, Priscilla e Renata.

À Dra. Maria Tereza Colturato e à Dra. Tatiana Lavinias pelo apoio.

A Dra. Josefina pelos seus ensinamentos e esclarecimentos.

À Diretoria de Radiofarmácia – DIRF onde todos os experimentos deste trabalho foram realizados.

À Miriam Suzuki pela ajuda sempre que possível para realização dos experimentos com células.

À Marcela e Raquel do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN-MG) pela doação das células tumorais U-87 MG.

À Neide do Biotério por disponibilizar os animais para os ensaios.

À colaboração dos colegas da DIRF em especial: Ideli, Nathanael e Vivian.

A toda minha família por todo o estímulo recebido, em especial: Claudionor e Patrícia, Claudia e Rubens, Claudete, sobrinhos, Tio Geraldo e Tia Margarida.

Às minhas amigas: em especial Adriana Siqueira, por sempre me apoiar, acreditar nos meus sonhos e por sua amizade incondicional e Marcela pelas aulas de inglês.

Aos colegas de trabalho: Benta, Claudia, Eliane, Geraldo, Jacira, Janaína, Marcos, Maura, Miriam, Roberto, Salomé, Silvana, Susilei e minha eterna Diretora Cleuza Pedroso.

Aos demais parentes e amigos.

ESTUDO DA MARCAÇÃO E BIODISTRIBUIÇÃO DA SUBSTÂNCIA P UTILIZANDO LUTÉCIO-177 COMO RADIOTRAÇADOR

Clarice Maria de Lima

RESUMO

Gliomas malignos são tumores cerebrais primários, resistentes a vários tratamentos, como quimioterapia, radioterapia, indução de apoptose e cirurgia. Uma alternativa para o tratamento dos gliomas malignos é a terapia radionuclídea. Essa técnica utiliza moléculas radiomarcadas que se ligam seletivamente às células tumorais e nelas depositam dose citotóxica de radiação, provocando a morte das células doentes. A maioria dos protocolos de terapia radionuclídea para tumores cerebrais malignos envolve a administração de peptídeos marcados com radioisótopos emissores β^- . A substância P (SP) é um neuropeptídeo de 11 aminoácidos, da família das taquicininas, caracterizada pela sequência C-terminal Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂. A SP radiomarcada com diferentes radioisótopos, inclusive Lutécio-177, tem sido descrita e proposta para tratamento *in vivo* de tumores. A SP é o ligante mais importante dos receptores de neuroquinina tipo 1, superexpressos em gliomas malignos. O objetivo deste trabalho foi estudar as condições de marcação de SP-DOTA com ¹⁷⁷Lu, a estabilidade do composto marcado e suas propriedades *in vitro* e *in vivo*, a fim de desenvolver um protocolo de produção e avaliar o potencial do radiofármaco para terapia de gliomas. As condições de marcação foram otimizadas variando-se temperatura, tempo de reação, atividade de cloreto de lutécio-177 e massa de SP-DOTA e analisou-se a pureza radioquímica das preparações por meio de técnicas cromatográficas. A estabilidade da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada com baixa atividade de ¹⁷⁷Lu foi avaliada por diferentes tempos a 2 - 8 °C ou incubadas em soro humano a 37 °C. A estabilidade das marcações com alta atividade de ¹⁷⁷Lu também foi analisada na presença de ácido gntísico (6 mg/mL) adicionado após a reação de marcação. As condições de marcação em baixa e alta atividade foram submetidas à avaliação quanto à

possibilidade de oxidação do resíduo de metionina, adicionando o aminoácido D-L-metionina (6 mg/mL) ao meio de reação e posterior avaliação cromatográfica. Estudo *in vitro* com SP-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na ausência e presença de metionina, utilizando células de glioma humano M059J e U-87 MG, verificou o efeito da oxidação da metionina sobre a ligação às células. Estudos de biodistribuição foram realizados em camundongos *Nude* com modelo tumoral e em camundongos *Balb-c* sadios. Obteve-se a maior pureza radioquímica (> 95 %) associada à maior atividade específica de SP-DOTA-¹⁷⁷Lu quando o tempo de reação foi de 30 minutos, temperatura de 90 °C, massa de SP-DOTA de 10 µg e a atividade do ¹⁷⁷Lu de 185 MBq. A SP radiomarcada em condições otimizadas manteve-se estável a 2 - 8 °C e em soro humano por 4 horas. Os estudos *in vitro* demonstraram ligação aos receptores celulares e essa ligação mostrou-se reduzida quando o peptídeo apresenta-se em sua forma oxidada. A adição de metionina combinada com ácido genticóico preveniu a oxidação peptídica e assegurou-se a estabilidade do composto marcado, principalmente com alta atividade de ¹⁷⁷Lu, quando se utilizou maior massa de SP-DOTA. Nos estudos *in vivo*, os resultados mostraram uma cinética de biodistribuição favorável do composto e capacidade de ligação às células tumorais. SP-DOTA-¹⁷⁷Lu pode ser uma ferramenta útil para estudos *in vivo* devido à facilidade de preparação, alta estabilidade e afinidade pelas células tumorais.

STUDIES OF THE RADIOLABELING AND BIODISTRIBUTION OF SUBSTANCE P USING LUTETIUM-177 AS A RADIOTRACER

Clarice Maria de Lima

ABSTRACT

Malignant gliomas are primary brain tumors, resistant to various treatments, as chemotherapy, radiotherapy, induction of apoptosis and surgery. An alternative for the treatment of malignant gliomas is the radionuclide therapy. This technique apply radiolabeled molecules that selectively bind to tumor cells producing cytotoxic effect by dose irradiation, and resulting in death of tumor cells. Most protocols for radionuclide therapy of malignant brain tumors involve the administration of peptides labeled with β^- emitting radioisotopes. The Substance P (SP) is an 11- amino acid neuropeptide, characterized by the C-terminal sequence Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂. The use of SP labeled with different radionuclides including ¹⁷⁷Lu, have been proposed for *in vivo* treatment of tumors. SP is the most important target of neurokinin 1 receptors, overexpressed in malignant gliomas. The objective of this work was to study conditions of radiolabeling DOTA-SP with ¹⁷⁷Lu, the stability of labeled compound and *in vivo* and *in vitro*, to develop a protocol production and evaluate the potential of the radiopharmaceutical in the therapy of gliomas. The labeling conditions were optimized varying the temperature, reaction time, activity of lutetium-177 chloride and mass of DOTA-SP. The radiochemical purity of preparations were analyzed by chromatographic techniques. The stability of ¹⁷⁷Lu -DOTA- SP radiolabeled with low activity of ¹⁷⁷Lu was evaluated for different time at 2-8 °C or incubated in human serum. The stability of the labeled with high activity of ¹⁷⁷Lu was also analyzed in the presence of gentisic acid (6 mg / mL) added after the labeling reaction. The labeled conditions in low and high activity were subjected to evaluation for the ability

to cause oxidation of methionine residue, adding the D-L- methionine amino acid to the reaction medium (6 mg / mL) and subsequent chromatographic evaluation. *In vitro* study with ^{177}Lu -DOTA-SP, radiolabeled in the absence and presence of methionine, using human M059J U-87 MG glioma cells and, showed the effect of oxidation of methionine on the cells binding. Biodistribution studies were performed in *Nude* mice with tumor model and *Balb-c* mice. Highest radiochemical purity (> 95%) associated with the highest specific activity of ^{177}Lu -DOTA-SP when the reaction time was 30 minutes, temperature of 90 °C, 10 µg of DOTA-SP, and the activity of ^{177}Lu of 185 MBq. The radiolabeled SP in optimized conditions remained stable at 2-8 °C and in human serum for 4 hours. *In vitro* studies showed the binding to cell receptors and this binding was reduced when the peptide was presented in its oxidized form. The addition of methionine combined with gentisic acid prevented the oxidation of peptide and increased the stability of the labeled compound, particularly with high activity of ^{177}Lu , when using larger mass of DOTA-SP. *In vivo* studies results showed a favorable biodistribution kinetics of the compound and ability to bind to tumor cells. ^{177}Lu -DOTA-SP can be a useful tool for *in vivo* studies due to ease preparation, high stability and affinity for tumor cells.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1 Tumores cerebrais	20
3.1.1 Glioma	20
3.1.2 Diagnóstico	22
3.1.3 Terapia de glioma.....	23
3.1.3.1 Quimioterapia.....	23
3.1.3.2 Radioterapia	24
3.1.3.3 Terapia radionuclídea.....	25
3.2 Lutécio-177	26
3.3 Substância P	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Materiais.....	33
4.1.1 Infra estrutura	33
4.1.2 Reagentes	33
4.1.3 Equipamentos	33
4.1.4 Outros	34
4.1.5 Tampões e soluções	34
4.1.6 Células tumorais.....	35
4.1.7 Animais	35
4.2 Métodos.....	35
4.2.1 Radiomarcção da SP com ¹⁷⁷ Lu	35
4.2.2 Radiomarcção com alta atividade de ¹⁷⁷ Lu	36

4.2.3 Controle de pureza radioquímica	36
4.2.3.1 Cromatografia em camada delgada (ITLC-SG).....	36
4.2.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	37
4.2.4 Purificação da Substância P radiomarcada	37
4.2.5 Análise da estabilidade da SP-DOTA radiomarcada <i>in vitro</i>	37
4.2.6 Análise da oxidação	38
4.2.7 Efeito da oxidação da metionina sobre a ligação às células tumorais <i>in vitro</i>	38
4.2.8 Estudos de biodistribuição	39
4.2.9 Análise estatística.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 Radiomarcção da SP com ¹⁷⁷ Lu	42
5.1.1 Efeito da massa de SP-DOTA sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	42
5.1.2 Efeito da temperatura sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	42
5.1.3 Efeito do tempo de reação sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	43
5.1.4 Efeito da atividade de ¹⁷⁷ LuCl ₃ sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu.....	44
5.1.5 Condição padrão de marcação	45
5.2 Radiomarcção com alta atividade de ¹⁷⁷ Lu	46
5.3 Análise da estabilidade da SP-DOTA radiomarcada <i>in vitro</i>	48
5.4 Cultivo das células	52
5.5 Análise da oxidação peptídica.....	54
5.6 Efeito da oxidação do resíduo de metionina sobre a ligação às células tumorais <i>in vitro</i>	56
5.7 Estudos de biodistribuição	58
6 CONCLUSÕES	67
6.1 Radiomarcção da Substância P com lutécio-177	67
6.2 Estabilidade da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu.....	67
6.3 Estudo do efeito da oxidação do resíduo da metionina sobre a ligação às células tumorais <i>in vitro</i>	67
6.4 Estudos de biodistribuição	68
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Efeito da temperatura sobre a pureza radioquímica de SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu. 10 µg de SP-DOTA reagiram por 30 minutos com 92,5 MBq de ¹⁷⁷ Lu, em pH 4,5 e sob agitação de 350 rpm (n=3).	43
TABELA 2: Efeito do tempo da reação sobre a pureza radioquímica de SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu. 10 µg de SP-DOTA reagiram a 90 °C com 92,5 MBq de ¹⁷⁷ Lu, em pH 4,5 e 350 rpm de agitação.	43
TABELA 3: Efeito da atividade do ¹⁷⁷ Lu sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu. 10 µg de SP-DOTA reagiu com diferentes atividades de ¹⁷⁷ Lu a 90 °C por 30 minutos(n=2).....	44
TABELA 4: Resultados da radiomarcção da SP-DOTA com alta atividade de ¹⁷⁷ LuCl ₃ . As reações foram realizadas a 90 °C, por 30 minutos e a pureza radioquímica foi analisada por ITLC-SG (n=2).....	47
TABELA 5: Estabilidade <i>in vitro</i> da Substância P (10 µg) radiomarcada com baixa atividade de radionuclídeo, determinada por ITLC-SG após armazenamento entre 2-8 °C por diferentes tempos (n=3).	49
TABELA 6: Estabilidade metabólica da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu (9,25 MBq/µg) determinada por ITLC-SG após incubação em soro humano a 37 °C por diferentes tempos (n=6).	50
TABELA 7: Estabilidade da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcada com alta atividade de lutécio-177 armazenada a -20 °C por diferentes tempos, avaliada por ITLC-SG (n=3). ..	51
TABELA 8: Biodistribuição da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcada na presença de metionina (6 mg/mL) em camundongos <i>Balb-c</i> sadios 1, 4 e 24 horas após administração intravenosa, em %AI/g de órgão ou mL de sangue (n=3)	59
TABELA 9: Biodistribuição da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcada na presença de metionina (6 mg/mL) em camundongos <i>Balb-c</i> sadios 1, 4 e 24 horas após administração intravenosa, em %AI/órgão (n=3)	60
TABELA 10: Biodistribuição da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu, radiomarcada na ausência de metionina em camundongos <i>Nude</i> implantados com tumor AR42J 1, 4 e 24 horas após administração intravenosa, em %AI/g de órgão ou mL de sangue (n=4).	61

TABELA 11: Biodistribuição da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcada na ausência de metionina em camundongos <i>Nude</i> implantados com tumor U-87 MG 1,4 e 24 horas após administração intravenosa, em %AI/g de órgão ou mL de sangue (n=3).....	62
TABELA 12: Biodistribuição da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcada na ausência de metionina em camundongos <i>Nude</i> implantados com tumor U-87 MG 1, 4 e 24 horas após administração intravenosa, em %AI/órgão (n=3).....	63
TABELA 13: Biodistribuição da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcada na ausência e presença de metionina em camundongos <i>Nude</i> implantados com células de glioblastoma humano U-87 MG, 1 hora após administração intravenosa (n=3)	64
TABELA 14: Comparativo entre as razões tumor : órgão e sangue da biodistribuição da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcada na ausência e presença de metionina em camundongos <i>Nude</i> implantados com células de glioblastoma humano U-87 MG, 1 hora após administração intravenosa (n=3).....	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Estrutura da Substância P.....	28
FIGURA 2: Efeito da variação da massa de SP-DOTA sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu. A reação foi realizada com 92,5 MBq de ¹⁷⁷ LuCl ₃ a 90 °C, por 30 minutos, em pH 4,5 sob agitação de 350 rpm (n=3).....	42
FIGURA 3: Perfil do ¹⁷⁷ LuCl ₃ em CLAE (radioativo), utilizando-se uma coluna de fase reversa C ₁₈ com um gradiente linear de 10 - 90% de TFA/acetronitrila (1:1000 v/v) em TFA/água (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos.	45
FIGURA 4: Perfil da SP radiomarcada com 185 MBq (5 mCi) de ¹⁷⁷ Lu em CLAE (radioativo), utilizando-se uma coluna de fase reversa C ₁₈ com um gradiente linear de 10-90% de TFA/acetronitrila (1:1000 v/v) em TFA/água (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos.....	46
FIGURA 5: Perfil em CLAE (radioativo) da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcada com 1850 MBq (50 mCi) de ¹⁷⁷ LuCl ₃ , utilizando-se uma coluna de fase reversa C ₁₈ com um gradiente linear de 10 - 90% de TFA/acetronitrila (1:1000 v/v) em TFA/água (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos.	48
FIGURA 6: Fotomicrografia das células AR42J de tumor de pâncreas de rato na placa de cultivo em meio de cultura (aumento: 10000x).....	52
FIGURA 7: Fotomicrografia das células M059J de glioma humano na placa de cultivo em meio de cultura (aumento: 10000x)	53
FIGURA 8: Fotomicrografia das células U-87 MG de glioblastoma humano em placa de cultivo e em meio de cultura (aumento:10000x).....	53
FIGURA 9: Perfil da SP radiomarcada com 185 MBq (5 mCi) de ¹⁷⁷ Lu em CLAE (radioativo), utilizando-se uma coluna de fase reversa C ₁₈ com um gradiente linear de 10 - 90% de TFA/acetronitrila (1:1000 v/v) em TFA/água (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos, na ausência de metionina (A) (TR= 6,31 ± 0,01 minutos) e com metionina 6 mg/mL (B) (TR= 7,15 ± 0,04 minutos).....	55
FIGURA 10: Perfil em CLAE (radioativo) de SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcada com 1850 MBq (50 mCi) de ¹⁷⁷ LuCl ₃ , utilizando-se uma coluna de fase reversa C ₁₈ com um gradiente linear de 10 - 90% de TFA/acetronitrila (1:1000 v/v) em TFA/água (1:1000	

v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos. Na ausência de metionina (A) o primeiro pico apresenta TR=1,15 minutos (^{177}Lu livre), o segundo TR = $6,31 \pm 0,01$ minutos (SP-DOTA- ^{177}Lu) e o terceiro com TR = $7,15 \pm 0,04$ minutos e com metionina 6 mg/mL (B) (TR = $7,15 \pm 0,04$ minutos)56

FIGURA 11: Ensaio de ligação *in vitro* de SP-DOTA- ^{177}Lu radiomarcada (baixa atividade 185 MBq) na presença e ausência de metionina (6 mg/mL) às células M059J de glioma humano (n=3)..57

FIGURA 12: Ensaio de ligação *in vitro* de SP-DOTA- ^{177}Lu radiomarcada (baixa atividade 185 MBq) na presença e ausência de metionina (6 mg/mL) em células U-87 MG (n=3).58

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Atividade Específica
AG	Ácido Gentísico
Arg	Arginina
AR42J	Linhagem celular de tumor de pâncreas de rato
CCK	Colecistoquinina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CT	Tomografia Computadorizada
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-tetraacético
DOTATATE	[DOTA ⁰ , Tyr ³] Octreotato
DOTATOC	[DOTA ⁰ , Tyr ³] Octreotídeo
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentacético
GBM	Glioblastoma Multiforme
Gln	Glutamina
Gly	Glicina
HCl	Ácido clorídrico
Ile	Isoleucina
IMT	Metiltirosina
ITLC-SG	Cromatografia em Camada Delgada – Sílica Gel
Leu	Leucina
Lys	Lisina
M	Molar (mol.L ⁻¹)
Met	Metionina
M059J	Linhagem celular de glioma humano
NK1	Receptor para Substância P
NK2	Receptor para neuroquinina A
NK3	Receptor para neuroquinina B
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato-salina pH 7,4
PET	Tomografia por Emissão de Pósitron

Phe	Fenilalanina
Pro	Prolina
Rf	Fator de retenção
RM	Ressonância Magnética
RPM	Rotações por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SP	Substância P
SNC	Sistema Nervoso Central
SPECT	Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único
SPRs	Receptores para Substância P com alta afinidade
SSTR2	Receptores para somatostatina
TFA	Ácido trifluoroacético
TR	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
U-87 MG	Linhagem celular de glioblastoma humano
Val	Valina
VIP	Peptídeo Vasoativo Intestinal
²¹³Bi	Radioisótopo de bismuto com número de massa 213
¹⁸F	Radioisótopo de flúor com número de massa 18
¹²³I	Radioisótopo de iodo com número de massa 123
¹³¹I	Radioisótopo de iodo com número de massa 131
¹¹¹In	Radioisótopo de índio com número de massa 111
^{113m}In	Radioisótopo de índio com número de massa 113 metaestável
¹⁷⁷Lu	Radioisótopo de lutécio com número de massa 177
¹⁷⁷LuCl₃	Cloreto de lutécio-177
⁷⁵Se	Radioisótopo de selênio com número de massa 75
^{99m}Tc	Radioisótopo de tecnécio com número de massa 99 metaestável
⁹⁰Y	Radioisótopo de ítrio com número de massa 177
¹⁷⁵Yb	Radioisótopo de ytérbio com número de massa 175
¹³³Xe	Radioisótopo de xenônio com número de massa 133

1 INTRODUÇÃO

Gliomas malignos são os tumores cerebrais primários mais comuns em jovens e adultos, com idade entre 15 a 35 anos, representando a segunda causa mais frequente de morte nessa faixa etária (Laperriere et al., 2002; Kneifel et al., 2006). A sobrevivência média de um paciente com glioma depende de fatores genéticos, do grau de diferenciação histológica, da infiltração das células tumorais em tecidos saudáveis do cérebro e da taxa de crescimento celular, podendo variar de 10 a 14 meses em pacientes com glioma de alto grau (glioblastoma) e a 10 anos em pacientes com glioma de baixo grau. Em sua maioria, os gliomas mostram-se resistentes a vários tratamentos tais como quimioterapia, radioterapia, indução de apoptose e cirurgia. Embora o tratamento possa prolongar a vida do paciente, a maioria dos tumores cerebrais não é curável (Tazarczyk et al., 2007). Apesar dos avanços tecnológicos no diagnóstico e na terapia dos gliomas, não tem sido observado efeito na taxa de sobrevivência de pacientes com gliomas de alto grau (Kneifel et al., 2006).

Uma alternativa para o tratamento dos gliomas malignos é a terapia radionuclídea. Essa técnica utiliza moléculas radiomarcadas que se ligam seletivamente às células tumorais e nelas depositam dose citotóxica de radiação, provocando a morte das células doentes. A maioria dos protocolos de terapia radionuclídea para tumores cerebrais malignos envolve a administração de peptídeos marcados com radioisótopos emissores β^- (Kneifel et al., 2006).

O ^{177}Lu (Lutécio-177) é um radioisótopo com propriedades favoráveis para a terapia radionuclídea, como meia vida de 6,75 dias e emissão de partícula β^- de energia média de 497 keV. Além disso, o ^{177}Lu também é emissor de radiação gama ($E_{\gamma_{\text{max}}}$ de 208 keV), podendo ser também utilizado no diagnóstico por imagem. Diversos estudos comprovaram a eficácia do ^{177}Lu em radiomarcador peptídeos conjugados ao quelante DOTA, como o peptídeo $[\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3]$ Octreotato (DOTATATE) e $[\text{DOTA}^0, \text{Tyr}^3]$ octreotídeo (DOTATOC) (Breeman et al., 2003).

A substância P (SP) é um neuropeptídeo de 11 aminoácidos, conhecido como um membro importante da família das taquicininas, caracterizada pela sequência C-terminal Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂ (Breeman et al., 1996). Atua principalmente como neurotransmissor e neuromodulador em várias regiões do cérebro e tem um papel

importante na modulação da transmissão da dor periférica e central. Receptores da SP são encontrados em tecidos associados ao sistema linfático, como amígdalas e adenóides, músculo liso do intestino, nas glândulas das vias aéreas, nas paredes dos brônquios e também em células periféricas, incluindo células ósseas (Van Hagen et al., 1996).

Além disso, a SP é o ligante mais importante dos receptores de neuroquinina tipo 1 (NK1), expressos em carcinoma medular da tireóide, câncer de pulmão, pâncreas, mama e também superexpressos em gliomas malignos. Esses receptores são raramente encontrados em tumores gastrointestinais ou linfomas. Com isso, a SP torna-se uma candidata em potencial para utilização como molécula carregadora de um isótopo radioativo para detecção e tratamento dessas doenças (Reubi, 2003; Kneifel et al., 2007).

A SP radiomarcada com diferentes radioisótopos tem sido descrita e proposta para detecção e tratamento *in vivo* de doenças como artrite reumatóide e tumores. SP-DTPA-Arg¹-¹¹¹In mostrou-se adequado para a visualização de receptores de SP *in vivo*, presentes nas glândulas salivares, artrite adjuvante e também em tumor de pâncreas (Breeman et al., 1996). Além disso, um estudo piloto utilizando Substância P-DOTA-⁹⁰Y como radiofármaco de terapia local em glioblastoma, conforme realizado anteriormente para astrocitomas com DOTATOC-⁹⁰Y, obteve resultados encorajadores, com acúmulo e tempo de permanência alto no local do tumor, sendo a principal explicação para os bons resultados preliminares com esta técnica (Reubi, 2003).

O radiofármaco, SP-DOTAGA-¹¹¹In/⁹⁰Y foi proposto para tratamento local de gliomas. Esse radiofármaco consiste na sequência natural da Substância P, conjugada com DOTAGA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-glutárico) um quelante para radionuclídeos metálicos. Utilizaram o emissor β^- ⁹⁰Y para terapia e o emissor gama ¹¹¹In para testes diagnósticos. Os primeiros resultados clínicos publicados são encorajadores tendo sido observada toxicidade local transiente (edema radiogênico) como efeito colateral e melhora neurológica em 65% dos pacientes (Kneifel et al., 2007). Kneifel e colaboradores (2007) desenvolveram um protocolo para endoradioterapia de gliomas malignos utilizando o derivado de somatostatina radiomarcado DOTATOC-⁹⁰Y e obtiveram resultados clínicos promissores. Entretanto, a desvantagem deste sistema alvo é a baixa expressão de receptores para somatostatina em gliomas

Em um outro trabalho, Kneifel e colaboradores (2006) desenvolveram um novo radiofármaco por meio da conjugação do quelante ácido à Arg¹ da Substância P (SP-DOTAGA-Arg¹), gerando um composto para marcação com ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu e ²¹³Bi. Clinicamente, o radiofármaco distribuiu-se de acordo com a geometria do tumor. Nesse

estudo envolvendo 20 pacientes foi observado em apenas um paciente edema radiogênico sintomático. A estabilização da doença ou melhora do estado neurológico foi observada em 13 dos 20 pacientes. Os autores concluíram que esta modalidade terapêutica é uma estratégia inovadora para controle local de gliomas malignos.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Estudar as condições de marcação e a estabilidade da SP complexada ao quelante DOTA e suas propriedades *in vitro* e *in vivo*, utilizando o ^{177}Lu como radionuclídeo, a fim de desenvolver um protocolo de produção e avaliar o potencial do radiofármaco para terapia de gliomas.

2.2 Objetivos específicos

- Radiomarcara a Substância P com lutécio-177 obtendo-se pureza radioquímica maior que 95%;
- Estudar a estabilidade da Substância P radiomarcada;
- Avaliar a oxidação do resíduo de metionina da proteína frente às condições de marcação;
- Analisar o efeito da oxidação da metionina sobre a ligação às células tumorais *in vitro*.
- Analisar sua biodistribuição em camundongos sadios e com tumor de pâncreas e glioma

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Tumores cerebrais

Os tumores cerebrais dividem-se em dois grupos, os intracranianos que se localizam dentro do parênquima cerebral (gliomas e os tumores dos vasos sanguíneos) e os que se localizam fora do mesmo (meningiomas, neurinomas do acústico e os tumores da região hipofisária). Os tumores metastáticos podem ocorrer em locais diversos. Em sua maioria, os tumores intraparenquimatosos são gliomas (Robbins, 1969).

Para que o paciente diagnosticado com esse tipo de tumor apresente mais que um ano de sobrevida, é preciso muito conhecimento sobre a patogênese e a etiologia dos tumores malignos primários do Sistema Nervoso Central (SNC) como o glioma, para encaminhar para o melhor tratamento (Michailowsky et al., 2003).

3.1.1 Glioma

Em geral, os gliomas são os tumores cerebrais malignos mais comuns em adultos, cerca de cinco casos a cada 100000 habitantes por ano e sua incidência tem aumentado nos últimos 25 anos, tanto em adultos como em crianças (Laperriere et al., 2002; Laks et al., 2010). Há muitos estudos sobre as causas de tumores cerebrais e algumas já são conhecidas como mutações genéticas na família, doenças imunológicas e doses elevadas de radiação. Porém, tais causas são responsáveis por uma minoria dos casos. Estudos epidemiológicos e variabilidade geográfica em inúmeros casos sugerem que a etiologia dos tumores cerebrais pode estar associada a fatores ambientais e exposição à agentes cancerígenos (Laks et al., 2010).

No Brasil, os gliomas ocorrem geralmente em crianças menores de 15 anos. Cerca de 8% a 15% das neoplasias pediátricas são de tumores do SNC, sendo o glioma o mais frequente tumor sólido nessa faixa de idade (Instituto Nacional do câncer, 2011).

Nos Estados Unidos, os tumores cerebrais constituem a menor parte dos casos de câncer, com incidência de 14,8 por 100000 habitantes por ano e cerca de metade são benignos. As formas malignas do tumor de cérebro apresentam uma perspectiva devastadora de morbidade e mortalidade (Laks et al., 2010).

As células de glioma podem migrar por longas distâncias no cérebro e causar lesões até mesmo no outro hemisfério cerebral. Mostram-se muito resistentes aos diversos tipos de tratamentos, tais como quimioterapia, indução de apoptose e cirurgia. Embora o tratamento possa prolongar a vida do paciente, a maioria dos tumores cerebrais não é curável (Tazarczyk et al., 2007; Heikkilä et al., 2010).

No sistema de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), os gliomas são classificados de acordo com suas características histológicas: gliomas de grau IV (glioblastoma multiforme, GBM) traz o pior prognóstico com sobrevida inferior a 12 meses; glioma de grau III (gliomas anaplásicos) também tem prognóstico próximo ao de grau IV; gliomas de grau II (astrocitomas) apresentam um melhor prognóstico, com uma sobrevida de 8-10 anos e os gliomas de grau I que são considerados em sua maioria curáveis (Cordier et al., 2010).

Os gliomas de grau II ou astrocitomas são os mais comuns em crianças e o mais frequente é o meduloblastoma. Tumores histologicamente semelhantes ao meduloblastoma são raramente encontrados em adultos (Robbins, 1969).

Glioblastoma multiforme (GBM) ou astrocitoma de grau IV é a forma mais comum de glioma (representa cerca de 40%), na qual o tumor apresenta crescimento rápido e se forma a partir do tecido da glia do cérebro e da medula espinhal, possuindo células muito diferentes das células normais. Geralmente, ocorrem em adultos (45 a 70 anos de idade) em sua maioria ocorre mais em homens do que em mulheres e afeta mais frequentemente o cérebro que a medula espinhal. O termo multiforme é devido à natureza heterogênea desta neoplasia e sua composição histológica variada. Estes tumores são caracterizados pela infiltração difusa nos tecidos adjacentes que impedem a ressecção completa. O paciente com GBM tem uma sobrevida média global de cerca de 1 ano. O tratamento para este tipo de tumor é a ressecção seguida da combinação de radioterapia e quimioterapia (Michailowsky et al., 2003; Laks et al., 2010; National Cancer Institute, 2011).

A célula tumoral tem características muito distintas quando comparada a uma célula sadia, tais como:

- Uma taxa maior de proliferação celular;
- As características de transporte de membrana alterada associada aos vasos sanguíneos e células tumorais;
- Perfusão alterada dentro do tumor;
- Alteração do metabolismo;

- Alterações na expressão de receptores específicos para hormônios;
- A expressão de determinados antígenos associados ao tumor (Elgazzar, 2006).

A diferenciação histológica, o grau de infiltração de células tumorais para outras áreas do cérebro sadio e as taxas de crescimento variável determinam as taxas de sobrevivência. Diferenças de sobrevivência e resposta ao tratamento são atribuídas a fatores genéticos. Os gliomas de baixo grau afetam um grupo mais jovem, é a segunda causa mais frequente de morte em adolescentes e adultos jovens com idade entre 15 e 35 anos perdendo para leucemia, ressaltando a necessidade de tratamento eficaz (Kneifel et al., 2006).

Após a realização da cirurgia para retirada do tumor ou depois de realizada a biópsia, a forma dominante de terapia administrada é a radioterapia (Laperriere et al., 2002).

Com o avanço nos diagnósticos, houve um alto número de ressecções. No entanto, se o tumor é localizado em áreas do cérebro que são responsáveis por função verbal ou motora, a ressecção não pode ser eficazmente aplicada, tendo-se como meta a preservação das funções cerebrais. Assim, a utilização desta técnica deve ser limitada. Em gliomas de grau II, o que se recomenda primeiro é a administração da quimioterapia e/ou radioterapia, para depois decidir pela ressecção (Cordier et al., 2010).

Mesmo após tratamento, pode ocorrer recidiva local o que tem levado ao estudo de outras formas de intensificação da dose de radiação em um esforço para melhorar o tratamento e aumentar o tempo de vida, pois é uma doença que, na maioria dos casos, é invariavelmente fatal (Laperriere et al, 2002).

3.1.2 Diagnóstico

Por volta de 1980 começou a ser utilizada a ressonância magnética (RM) para diagnosticar esse tipo de tumor e atualmente é a tecnologia padrão aceita para imagens cerebrais e outros tipos de tumores do SNC. Uma nova tecnologia chamada ressonância magnética funcional, que mede as mudanças no fluxo sanguíneo que acompanham a atividade do cérebro, pode ser útil em determinar como funcionam as regiões cerebrais. Dessa forma, avaliar melhor qual o risco potencial de uma cirurgia e elaborar o planejamento do tratamento (National Cancer Institute, 2011).

Para melhor visualização de tumores cerebrais, novas tecnologias foram implantadas, como imagem por Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único (SPECT) combinada com Tomografia Computadorizada (CT), onde, por exemplo,

aplica-se o radiofármaco IMT-¹²³I (L-3-[¹²³I]iodo-alfa-metil-tirosina) em SPECT e FLT-¹⁸F (3'-deoxi-3'-fluorotimidina) para imagem em Tomografia por Emissão de Póstron (PET). No caso dos gliomas foram observados alto contraste nas imagens, constatando-se que estes radiofármacos ultrapassaram a barreira hematoencefálica (Crespo e Santamaria, 2009).

3.1.3 Terapia de glioma

Existem diferentes modalidades convencionais para terapia de gliomas: radioterapia, quimioterapia, radioimunoterapia e terapia radionuclídea. Tratamento de tumores cerebrais malignos com esses métodos convencionais, se realizado isoladamente, pode não ter um bom resultado. A toxicidade para os tecidos cerebrais sadios adjacentes ao tumor, geralmente dificulta a administração de doses curativas e reduz severamente a qualidade de vida dos pacientes apesar de prolongamento significativo da sobrevida (Zalutsky, 2005).

3.1.3.1 Quimioterapia

Quimioterapia não é uma terapia muito indicada para tratamento de gliomas, pois a maioria das drogas utilizadas em quimioterapia não atravessam a barreira hematoencefálica. Uma classe de drogas, as nitrosoureas, que atravessa a barreira hematoencefálica, demonstrou em testes clínicos que produz uma pequena melhora no tempo de sobrevida do paciente quando combinada com cirurgia e radioterapia (National Cancer Institute, 2011).

A termozolomida é uma droga administrada por via oral, que se tornou disponível nos Estados Unidos a partir de 1999, pode prolongar a sobrevida dos pacientes com glioma quando combinada com a radioterapia. Esquemas de doses elevadas de quimioterapia para o tratamento de alguns tipos de tumores cerebrais infantis pode substituir a radioterapia, possivelmente reduzindo danos ao cérebro em desenvolvimento (National Cancer Institute, 2011).

Agentes antiangiogênese são drogas que bloqueiam o crescimento de novos vasos sanguíneos, necessários para o desenvolvimento de tumores representando uma promessa no tratamento de gliomas. Gliomas são tumores altamente vascularizados, ou seja, eles têm um grande número de vasos sanguíneos. As drogas que obstruem o desenvolvimento destes vasos sanguíneos estão sendo testadas em ensaios clínicos de pacientes com tumores cerebrais. Com base nos resultados promissores de dois ensaios

clínicos, um dos quais realizados no National Institute of Health (NIH), a FDA (Food and Drug Administration) aprovou de forma acelerada, em maio de 2009, o agente antiangiogênese bevacizumab (Avastin r) para o tratamento de glioblastoma (National Cancer Institute, 2011).

3.1.3.2 Radioterapia

É uma técnica avançada na qual o tecido tumoral alvo é medido com maior precisão para reduzir os danos causados pela radiação ao tecido sadio, tais como:

- A terapia 3-tridimensional conformada é um procedimento que utiliza um computador para criar uma imagem tridimensional do tumor, permitindo ao médico dar a maior dose de radiação possível ao tumor, poupando o tecido normal;
- A radioterapia estereotáxica, utiliza equipamentos especiais para definição da área tumoral. A dose total de radiação é dividida em várias doses menores, administrada durante vários dias. Esta técnica também está sendo estudada no tratamento de outros tipos de câncer, como o câncer de pulmão;
- Radioterapia de intensidade modulada é um tipo de radioterapia tridimensional que utiliza imagens geradas por um computador para mostrar o tamanho e a forma do tumor, onde feixes finos de radiação de diferentes intensidades detalham o tumor por vários ângulos. Este tipo de terapia de radiação reduz os danos ao tecido saudável junto ao tumor (National Cancer Institute, 2011).

3.1.3.3 Terapia radionuclídea

Uma alternativa para o tratamento dos gliomas malignos é a terapia radionuclídea. Essa técnica utiliza moléculas radiomarcadas que se ligam seletivamente às células tumorais e nelas depositam dose citotóxica de radiação, provocando a morte das células doentes. A maioria dos protocolos de terapia radionuclídea para tumores cerebrais malignos envolve a administração de peptídeos marcados com radioisótopos emissores β^- (Kneifel et al., 2006).

Em 1920, Georg DeHevesy criou o termo “radioindicator” (radiofármaco) e introduziu o “princípio do traçador” para as ciências biomédicas. Um radiofármaco é composto por uma molécula carregadora e por um radionuclídeo, utilizados para diagnóstico e terapia de várias doenças. Um grande número de radiofármacos foi desenvolvido ao longo das últimas quatro décadas para melhor visualizar a estrutura e

função de muitos órgãos e tecidos. Os radiofármacos apresentam uma grande variedade de propriedades químicas e físicas (Oliveira et al., 2006; Elgazzar, 2006).

Para se desenvolver um radiofármaco é necessário atentar para a natureza química e bioquímica da molécula que irá transportar o radionuclídeo para a área alvo. O uso de radiofármacos para transportar radiação ionizante como doses terapêuticas tem sido amplamente estudado. Certo número de radiofármacos já está disponível para uso clínico para tratamento de diversos tipos de cânceres ou paliativo da dor resultante de metástases ósseas (Oliveira et al., 2006; Elgazzar, 2006).

A farmacocinética, biodistribuição e metabolismo do radiofármaco são muito importantes para a compreensão dos mecanismos de localização do radiofármaco no órgão ou tecido de interesse (Elgazzar, 2006).

Muitos radiofármacos foram desenvolvidos para aumentar a especificidade das técnicas de medicina nuclear. A medicação do paciente e muitos outros fatores podem alterar significativamente a biodistribuição, localização e características dos tecidos e retenção de um radiofármaco (Elgazzar, 2006).

Ao se administrar um radiofármaco ao paciente este geralmente passa por processos de distribuição, metabolização e excreção, por meio de excreção renal, biliar, ou outra. O tempo que ele permanecerá no organismo depende do tempo de meia vida do radionuclídeo e da eliminação biológica (Oliveira et al., 2006).

No início de 1940, tumores cerebrais foram detectados utilizando-se radionuclídeos com aplicação de fósforo radioativo. Na década de 1950 foi utilizado criptônio radioativo que foi capaz de medir o movimento e fluxo sanguíneo cerebral em humanos. Nas próximas décadas, foram utilizados também ^{133}Xe , ^{131}I -Diodofluoresceína e ^{75}Se , mas muitos desses não atingiram a expectativa, por causa das propriedades físicas dos carregadores dos radionuclídeos. Com o avanço da comercialização de geradores de radioisótopos, continuou-se a exploração do SNC com uso, por exemplo, de DTPA- $^{113\text{m}}\text{In}$, DTPA- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e Gluconato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$, mas sem sucesso devido à dificuldade de ultrapassar a barreira hematoencefálica (Crespo e Santamaria, 2009).

A escolha do tipo de partícula ionizante que deve ser utilizada em um radiofármaco para terapia, dependerá do tamanho do tumor, da distribuição intratumoral e farmacocinética do radiofármaco. A partícula α , por exemplo, aumenta a dose de radiação para os tecidos saudáveis e apresenta aplicação para a terapia (Oliveira et al., 2006).

A terapia radionuclídea com radiofármacos marcados com emissores β^- é um campo emergente da medicina nuclear. Sua aplicação inclui o tratamento paliativo da dor

óssea, melhorando a qualidade de vida dos pacientes e suas metástases através da utilização de moléculas marcadas com radionuclídeos específicos. Com a finalidade de assegurar o êxito do tratamento é essencial selecionar cuidadosamente o radionuclídeo e a molécula a ser marcada. Este conjunto deve ter propriedades farmacológicas adequadas e eficácia terapêutica. Os parâmetros técnicos para a seleção do radionuclídeo com fins terapêuticos são: tempo de decaimento, energia de emissão beta e química adequada; alta pureza radioquímica, alta atividade específica, baixo custo de produção e boa logística de abastecimento (Aliaga et al., 2010).

3.2 Lutécio-177

Lutécio-177 (^{177}Lu) pertence ao grupo químico 3A da tabela periódica. Pode ser obtido por dois métodos: por reação (n,γ) em reator a partir da irradiação com nêutrons térmicos, em óxido de ^{176}Lu enriquecido, não sendo necessário nenhum tipo de purificação do radionuclídeo produzido ou por irradiação de Yterbio-176 (^{176}Yb) e posterior separação eletroquímica do ^{177}Lu do ^{175}Yb (Crudo, 2009).

Devido às suas propriedades favoráveis, o ^{177}Lu é um dos radioisótopos que aparece como um candidato para a terapia radionuclídea: emissor de partícula β^- de alta energia (E_{max} de 497 keV), também emite radiação gama (E_{max} de 208 keV ideal para diagnóstico permitindo a localização *in vivo* do tumor e facilitando os cálculos de dosimetria), tem meia vida de 6,75 dias e química adequada que possibilita a marcação de uma série de moléculas e peptídeos. A meia vida física do ^{177}Lu é outra vantagem pois possibilita tempo suficiente entre a produção e o momento da utilização pelos médicos. O seu alcance é de até 3 mm em tecido mole, isso é uma vantagem para tratamento de micro metástases e tumores de pequeno tamanho (Silva et al., 2005; Crudo, 2009; Aliaga et al., 2010; Nevares et al., 2010).

A atividade específica (AE) de um radionuclídeo é um fator muito importante para seu potencial na aplicação clínica. Atualmente, o ^{177}Lu é comercializado com valores de AE de 20 Ci/mg, se for produzido a partir de ^{176}Lu ou 45 Ci/mg se for produzido a partir de ^{176}Yb . AE maiores que 10 Ci/mg de ^{177}Lu permitem obter rendimentos de marcação de 99% para peptídeos análogos de somatostatina com uma AE final do radiofármaco de 37 MBq/ μg . O que por vezes interfere no rendimento da marcação é a presença de cátions metálicos (Fe^{+3} , Zn^{+3}) como impurezas, no ^{177}Lu comercializado, que competem com o

^{177}Lu pelos níveis de ligações dos agentes quelantes empregados nas reações de marcação (Crudo, 2009).

De Araújo e colaboradores (2009) realizaram um estudo comparativo marcando um análogo de somatostatina DOTA-Tyr³-octreotate (DOTATATE) com ^{131}I e ^{177}Lu , para terapia de tumores neuroendócrinos. Como esperado, a captação e retenção da radioatividade no tumor observado em modelo animal foi maior em 1 hora e 24 horas para DOTATATE- ^{177}Lu . Atualmente, são produzidos derivados de somatostatina radiomarcados com ^{177}Lu para terapia de tumores neuroendócrinos, como o DOTATATE- ^{177}Lu , comercializado no Brasil.

Diferentes peptídeos já foram radiomarcados com ^{177}Lu para aplicação em terapia radionuclídea como: Minigastrina 3-DOTA, lanreotido-DOTA e Substância P-DOTA. Lutécio-177 também vem sendo utilizado para radiomarcagem de anticorpos monoclonais para radioimunoterapia como o anti-CD20 (Crudo, 2009), com aplicação na terapia de linfoma não Hodgkin.

3.3 Substância P

Peptídeos são moléculas formadas por vários aminoácidos unidos por ligações peptídicas. O tamanho pode variar de moléculas com apenas 2 aminoácidos a 50 e geralmente não possuem uma estrutura bem definida. Existem duas formas de peptídeos, os naturais e os sintéticos. Receptores de peptídeos são encontrados em vários tipos de cânceres humanos (Reubi, 2003).

Existem vários exemplos de aplicações clínicas bem sucedidas de peptídeos radiomarcados para imagem e tratamento de tumores receptores-positivos. Como alguns análogos de somatostatina radiomarcados utilizados para terapia e diagnóstico de tumores neuroendócrinos: D-Phe¹octreotide-DTPA- ^{111}In (Octreoscan) já é comercializado e utilizado para cintilografia, por emitir raios γ (consegue-se detectar tumores muito pequenos e também pequenas metástases) e como radioterapêutico por emitir elétrons Auger; para radioterapia utiliza-se Tyr³-octreotide-DOTA- ^{90}Y (DOTATOC- ^{90}Y) ou DOTATATE- ^{177}Lu . Outros peptídeos também são utilizados para desenvolvimento de novos radiofármacos, como: colecistoquinina (CCK), gastrina, peptídeo vasoativo intestinal (VIP), bombesina, Substância P e análogos do neuropeptídeo NPY (Reubi, 2003; Elgazzar, 2006).

A Substância P (SP) é um neuropeptídeo de 11 aminoácidos (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂), um dos membros mais importantes da família das

taquicininas, caracterizada pela sequência C terminal Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, onde o X pode representar Phe, Ile ou Val (Breeman et al., 1996; Rodrigues et al., 2005).

A SP foi identificada em 1971 por Chang, depois de ter sido isolada do trato gastrointestinal de mamíferos em 1931. O termo “P” está ligado ao pó obtido após o procedimento de extração (Bennett & Simmons, 2001; Tazarczyk et al., 2007). A estrutura da SP é mostrada na FIG.1.

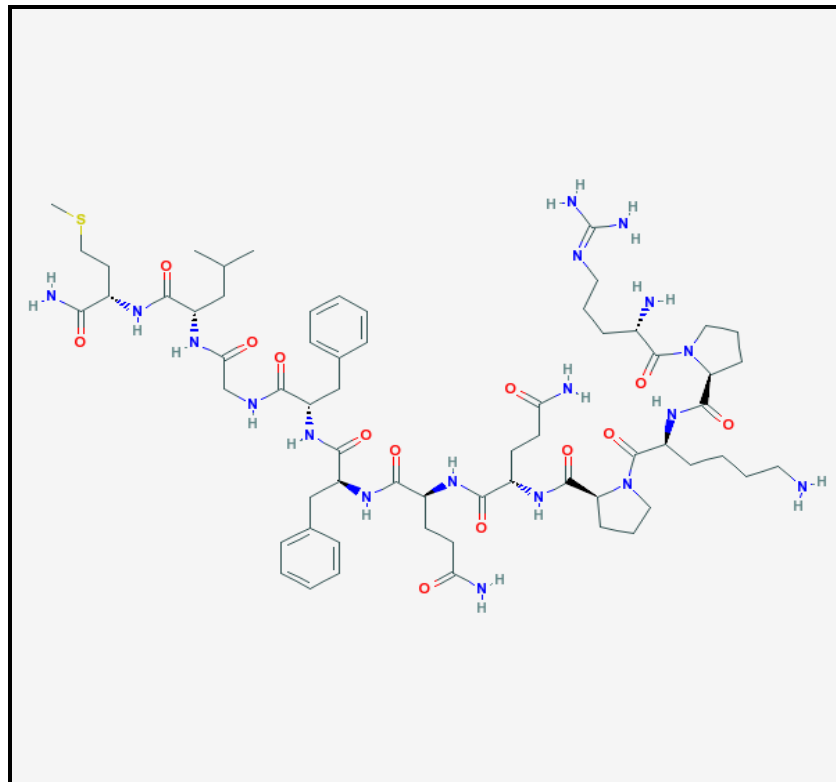


FIGURA 1 – Estrutura da Substância P (Estrutura da Substância P, 2011).

A nomenclatura para receptores taquicininas, comumente aceita, define três tipos de receptores homólogos: o receptor SP NK1, o receptor neuroquinina A - NK2 e o receptor neuroquinina B - NK3. Os receptores de taquicinina apresentam grande distribuição tecidual e interagem com seus ligantes em associação com diversas respostas, tais como: neurotransmissão sensorial, respostas imunológicas, contração e relaxamento do endotélio dependente do músculo vascular, liberação de histamina, extravasamento plasmático, inflamação, comportamento sexual e potencialmente, regeneração nervosa e tratamento de úlcera (Breeman et al., 1996; Rodrigues et al., 2005).

Os receptores 1 (NK1) têm grande afinidade pela SP, sendo o principal ligante deste tipo de receptor, e são encontrados em neurônios, em células periféricas, incluindo

células ósseas e são super expressos em gliomas malignos de grau II a IV (Goto e Tanaka, 2002; Cordier et al., 2010; Nevares et al., 2010).

O envolvimento da SP na síndrome carcinóide e dor de cabeça vascular tem sido sugerido. Receptores SP com alta afinidade (SPRs) têm sido encontrados na sinóvia de ratos com artrite adjuvante bem como em pacientes com artrite reumatóide. Adicionalmente, concentrações muito altas de SPRs são expressas no centro germinal dos linfonodos e em uma linha celular de astrocitoma humano. Um grande número de receptores SPRs com alta afinidade é encontrado em espécimes cirúrgicas obtidas de pacientes com doenças inflamatórias ósseas (Breeman et al., 1996).

Sabe-se que a SP possui importante papel na modulação da transmissão da dor de aferentes periféricos e central através de receptores neuroquinina 1 e 2. Substância P e outras taquicinininas também podem representar papel na patogênese das doenças inflamatórias. A SP parece induzir degranulação de mastócitos *in vitro*, regular a quimiotaxia, liberar enzimas lisossômicas dos macrófagos, regular a expansão de células T e B e a produção de imunoglobulinas (Van Hagen et al., 1996).

Estudos sugerem que as taquicinininas e seus receptores estão envolvidos no desenvolvimento e progressão de várias neoplasias, sendo que o receptor NK1 pode ser responsável pela progressão do glioma, pois um número elevado de níveis de expressão do receptor NK1 foi revelado em tumores malignos, em comparação com as neoplasias do tecido normal do cérebro (Reubi, 2003; Tazarczyk et al., 2007; Muñoz e Coveñas, 2010).

Os receptores de NK1 também estão expressos em carcinoma medular da tireóide, câncer de pulmão, pâncreas e mama. Esses receptores são raramente encontrados em tumores gastrointestinais ou linfomas (Kneifel et al., 2007; Reubi, 2003). Com isso, a SP é uma candidata potencial para utilização como molécula carregadora de um isótopo radioativo para detecção e tratamento dessas doenças.

A SP radiomarcada com diferentes radionuclídeos tem sido descrita e proposta para detecção e tratamento *in vivo* de doenças como doença óssea inflamatória, artrite reumatóide e tumores, como carcinóides (Breeman et al., 1996; Henning et al., 2006; Kneifel et al., 2007).

A SP complexada ao agente quelante DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-tetraacético) pode ser marcada com um radionuclídeo emissor β^- para ser utilizada em terapia radionuclídea para o tratamento de tumores cerebrais (Cordier et al., 2010; Nevares et al., 2010).

Um radiofármaco foi desenvolvido por Kneifel e colaboradores (2006) Arg¹-SP-DOTAGA, que realizou um estudo piloto em 20 pacientes com gliomas de grau II a IV para avaliar a biodistribuição e toxicidade a curto e longo prazo e para avaliar a resposta clínica e radiológica. Arg¹-SP-DOTAGA foi radiomarcado com ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu e ²¹³Bi para terapia e com ¹¹¹In para diagnóstico. Foi confirmado que o conjugado com SP mostrou alta afinidade no receptor NK1 do tumor cerebral. Seu peso molecular de 1,8 kDa (quilodalton) facilita sua distribuição intratumoral após a aplicação local. Clinicamente, os radiofármacos distribuíram-se de acordo com a geometria do tumor. Dos 20 pacientes apenas um apresentou edema radiogênico sintomático. O tratamento de gliomas recorrentes com a SP radiomarcada com ⁹⁰Y teve bons resultados e melhora de sobrevida. Após este tipo de tratamento, a ressecção do tumor foi facilitada, pois houve necrose causada pela radiação e um falso encapsulamento do tumor. A estabilização da doença ou melhora do estado neurológico foi observado em 13 dos 20 pacientes. Os autores concluíram que esta modalidade terapêutica utilizando peptídeo difusível como vetor é uma estratégia inovadora para controle local de gliomas malignos.

Arg¹-SP- DTPA-¹¹¹In mostrou-se adequado para a visualização de receptores de SP *in vivo*, presentes nas glândulas salivares, artrite adjuvante e também em tumor de pâncreas (Breeman et al., 1996).

Foi realizado um estudo comparativo utilizando o radionuclídeo ⁹⁰Y para radiomarcado SP, este possui algumas características vantajosas: emissor β^- com uma energia de 2,1 MeV, um alcance médio de 5 mm no tecido e é disponível comercialmente. Seu alcance, entretanto, pode atingir áreas adjacentes ao tumor, o que é uma desvantagem. Uma alternativa a este radionuclídeo é o ²¹³Bi, emissor α , de energia de 5,8 MeV. O alcance das partículas de cerca de 81 μ m preserva os tecidos adjacentes ao tumor (Cordier et al., 2010).

Cordier e colaboradores (2010) realizaram um estudo piloto com cinco pacientes com gliomas de grau II- IV, que receberam a injeção local de [Thi⁸,Met(O₂)¹¹]-SP-DOTA-²¹³Bi, após a biópsia e implantação dos cateteres, para confirmar a presença de receptores NK1 e distribuição de dose. Uma semana após receberam a injeção intratumoral houve a ressecção tumoral. Em todos os pacientes foi detectado receptores NK1 e a distribuição de dose foi congruente com a morfologia do tumor. Imagens com SPECT/CT e amostra de sangue confirmaram a alta retenção do radiofármaco no local do tumor. Imagem de RM mostrou alterações intratumorais, radionecrose, que foi confirmada por

exame histopatológico. Nos tumores pequenos houve completa radionecrose, nos tumores maiores houve necrose, principalmente próximo ao cateter implantado. Este tipo de terapia é viável para gliomas pequenos devido ao curto alcance da partícula alfa e por não apresentar toxicidade nas áreas sadias do cérebro.

Kneifel e colaboradores (2007) desenvolveram um protocolo para endoradioterapia de gliomas malignos utilizando o derivado de somatostatina radiomarcado DOTATOC-⁹⁰Y e obtiveram resultados clínicos promissores. Entretanto, a desvantagem desse sistema alvo é a expressão pequena de receptores para somatostatina, especialmente em gliomas.

O composto ⁰D-Phe¹-Tyr³-octreotideo-DOTA-⁹⁰Y/¹¹¹In apresenta inconvenientes ou desvantagens que podem justificar o desenvolvimento e utilização da SP radiomarcada: o receptor NK1 é super expresso em todas as neoplasias gliais enquanto a expressão dos receptores para somatostatina (SSTR2) é baixa na maioria dos glioblastomas; a expressão de NK1 no tecido cerebral normal é restrita a áreas circunscritas, enquanto os receptores SSTR2 são expressos em todo o tecido cerebral, impossibilitando uma distinção autoradiográfica entre tecido normal e célula tumoral em áreas de infiltração de células tumorais; a forte expressão de NK1 dentro da neovasculatura tumoral sugere concomitante ligação da estrutura vascular; a cinética de marcação do quelante DOTAGA conjugado a SP é superior à do DOTA (taxa de reação 10 vezes maior) ideal para marcação com um emissor alfa como ²¹³Bi; as primeiras experiências com SP-DOTAGA resultaram em respostas radiológicas e clínicas mais fortes comparadas com o sistema alvo SSTR2 (Kneifel et al., 2006).

Os autores selecionaram um radiofármaco DOTATOC-⁹⁰Y estável no sítio alvo por mais de 72 horas, mas que se degrada rapidamente, dentro de 1 a 2 minutos, na circulação por ação das enzimas peptidases séricas. Isto é importante para minimizar o risco de efeitos colaterais sistêmicos de expressão de NK1 por células imune e de problemas inespecíficos nos rins devido a recaptação tubular do radiofármaco (Moll et al., 2001; Kneifel et al., 2006).

Necrose tardia por radiação com efeito sobre a massa e deterioração funcional tem sido frequentemente observada após radioterapia intersticial utilizando sementes de iodo-125. No novo procedimento, terapia dirigida com radiofármacos seguida de remoção cirúrgica, a indução de necrose por radiação representa um dos objetivos do tratamento. Se um glioma não pode ser removido cirurgicamente devido à localização crítica, emissores

beta ou alfa de pequeno alcance podem ser utilizados para minimizar o dano neurológico colateral. (Kneifel et al., 2006).

O radiofármaco SP-DOTAGA-¹¹¹In/⁹⁰Y liga-se aos receptores NK1, tendo sido proposto para tratamento local de tumores cerebrais. Os autores construíram um vetor peptídico que consiste na sequência natural da SP, conjugada com DOTAGA, um quelante para radionuclídeos metálicos. Utilizaram ⁹⁰Y, emissor β⁻ para terapia e ¹¹¹In emissor γ para diagnóstico. Os primeiros resultados clínicos publicados são encorajadores tendo sido observada toxicidade local transiente (edema radiogênico) como efeito colateral, enquanto melhora neurológica foi observada em 65% dos pacientes (Kneifel et al, 2007).

Um estudo piloto utilizando Substância P -DOTA-⁹⁰Y como radiofármaco para terapia local em glioblastoma, conforme realizado anteriormente para astrocitomas com DOTATOC-⁹⁰Y, obteve resultados encorajadores, com acúmulo e tempo de permanência alto no local do tumor, sendo a principal explicação para os bons resultados preliminares com esta técnica (Reubi, 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Infra-estrutura

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento da Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) do IPEN, que possui toda infraestrutura necessária para realização dos ensaios.

4.1.2 Reagentes

- Substância P- DOTA (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂-DOTA – Pichem, Áustria) fornecido pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA);
- Cloreto de Lutécio – 177, atividade específica: 750,4 GBq/mg (IDB, Holanda);
- Acetato de Sódio Anidro (Nuclear, Brasil);
- Resina Qualex 100 (BioRad, EUA);
- Citrato de sódio diidratado (J.T.Baker, EUA);
- Ácido cítrico (Cromato Produtos Químicos, Brasil);
- Acetonitrila (Merck, Alemanha);
- Ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich, EUA);
- Água purificada (Purificador Milli-RX45 Millipore, EUA);
- Metanol (Merck, Alemanha);
- Etanol (Merck, Alemanha);

4.1.3 Equipamentos

- Balança analítica (Ohaus, EUA);
- Agitador/aquecedor Thermomixer comfort 1,5 mL (Eppendorf, EUA);
- Agitador de tubos tipo vortex (Vertex, Brasil);
- Medidor de pH (Tecnopon, Brasil);
- Contador gama tipo poço, com detector de NaI(Tl) (Packard, EUA);

- Centrífuga (Hettich, Alemanha);
- Agitador magnético com aquecimento (725A Fisatom, Brasil);
- Pipetas automáticas (Brand e Socorex);
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência composto por sistema modulado constituído por bomba LC-10 ATvp, controlador automático de gradiente FCV-10 AL, degaseificador DGU-20A₅, injetor automático de amostras SIL-10ADvp, detector UV SPD-10^a e forno CTO-10 Avp (Shimadzu, Japão);
- Freezer (LS Logen Scientific, Thermostatic Cabinets, EUA);
- Geladeira vertical (Eletrolab, Brasil).

4.1.4 Outros

- Células M059J de glioma humano (Cell Bank, Brasil);
- Células U-87 MG de glioblastoma humano (doação do CDTN, Brasil);
- Células AR42J de tumor de pâncreas de rato (ATCC, EUA);
- Coluna Sep-Pak C₁₈ (Waters, EUA);
- Coluna de fase reversa C18 para cromatografia líquida de alta eficiência (4,0 x 150 mm, 5 µm – Waters, EUA);
- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlemeyers, balões volumétricos, provetas e pipetas;
- Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos tipo eppendorf e tubos cônicos tipo Falcon;
- Fita indicadora de pH (Merck, Alemanha);
- Fitas cromatográficas de sílica gel (ITLC-SG - Instant Thin Layer Chromatography-Sílica Gel”) (Pall Life Sciences, EUA);
- Membrana filtrante 0,22 µm hidrofílica (Millipore - EUA);

4.1.5 Tampões e soluções

- Tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5;
- Tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0;
- Solução de cloreto de sódio 0,9%;
- Tampão fosfato-salina pH 7,4 (PBS);
- Ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em água;
- Ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% em acetonitrila;

- Solução de HCl 0,1 M

4.1.6 Células tumorais

As células AR42J de tumor de pâncreas de rato, M059J de glioma humano e U-87 MG de glioblastoma humano, foram mantidas em meio de cultura RPMI- 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico. As células foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO₂, no Centro de Biotecnologia do IPEN. A viabilidade das células foi verificada por microscópio óptico antes da utilização nos estudos *in vitro* e *in vivo*.

4.1.7 Animais

Para os estudos *in vivo* foram utilizados camundongos *Balb-c* e *Nude* machos, saudáveis, de 4 semanas de idade pesando entre 20 a 35 gramas de peso fornecidos pelo Biotério do IPEN. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do IPEN e os experimentos realizados de acordo com o regimento estabelecido pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

4.2 Métodos

4.2.1 Radiomarcção da SP com ¹⁷⁷Lu

a) Preparo do peptídeo

Para as marcações, 2 mg do peptídeo liofilizado foram dissolvidos em 2 mL de tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5. O tampão foi preparado com água purificada tratada com resina Chellex 100 trocadora de íons, para remoção de cátions presentes. A SP foi previamente complexada ao agente quelante DOTA pelo fornecedor. Após a completa diluição, a solução foi fracionada em tubos tipo eppendorf contendo 100 µL (100 µg de SP). Os eppendorfs foram rotulados e armazenados em freezer a -20 °C até sua utilização.

b) Procedimento de radiomarcção da SP com ¹⁷⁷Lu

Para se alcançar a metodologia ideal de marcação da SP, diferentes condições foram avaliadas:

- Tempo de reação de 15, 20, 25 e 30 minutos;
- Temperatura de reação de 70, 80 e 90 °C;

- Massa de SP-DOTA de 0,5; 1; 2; 5 e 10 µg;
- Atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ de 92,5 a 1036 MBq (2,5 a 28 mCi); com atividade específica de 871 a 920 GBq / mg.

Em um tubo de reação cônico do tipo eppendorf adicionou-se a SP-DOTA diluída em tampão acetato de sódio 0,4 M (0,2 mL e pH 4,5) seguida da atividade desejada de $^{177}\text{LuCl}_3$ em HCl 0,05 M, o pH final ficou em torno de 4,5. A mistura foi aquecida a diferentes temperaturas por diferentes intervalos de tempo. A substância P radiomarcada foi submetida a ensaios cromatográficos para avaliar a pureza radioquímica.

4.2.2 Radiomarcção com alta atividade de ^{177}Lu

A melhor condição de radiomarcção obtida nos ensaios descritos anteriormente foi extrapolada para a marcação com alta atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$, de 925 a 6956 MBq (25 a 188 mCi).

4.2.3 Controle de pureza radioquímica

A pureza radioquímica é a porcentagem da radioatividade total presente na forma química desejada, que corresponde à porcentagem da SP ligada ao ^{177}Lu . O controle de pureza radioquímica da marcação da SP foi realizado por dois sistemas cromatográficos: cromatografia em camada delgada em sílica gel 60 (ITLC-SG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.2.3.1 Cromatografia em camada delgada (ITLC-SG)

Cromatografia em camada delgada (ITLC-SG) foi realizada para determinar a porcentagem de lutécio livre na preparação. Aplicou-se uma alíquota da solução de radiomarcção sobre a fita de fibra de vidro impregnada com sílica gel, ITLC-SG (1,5 x 10 cm) em duplicata e utilizou-se como fase móvel o tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0. Após o desenvolvimento da cromatografia ascendente, cortou-se a fita em pedaços de 1 cm e realizou-se a leitura da radioatividade presente em cada segmento em um contador gama do tipo poço calibrado para o radionuclídeo. A SP-DOTA radiomarcada migra com fator de retenção (R_f) 0,1 – 0,2 enquanto o lutécio livre migra com R_f 0,9 – 1,0 (Breeman et al., 1996).

4.2.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A mistura de reação foi também avaliada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈ (5 µm, 4,0 x 150 mm), a um fluxo de 1,5 mL/minutos com um gradiente linear de 10 – 90% (v/v) de 0,1 % TFA/acetronitrila em 0,1% TFA/água por 15 minutos e a composição foi mantida por mais 5 minutos para estabilização do sistema.

4.2.4 Purificação da Substância P radiomarcada

A Substância P radiomarcada com pureza radioquímica inferior a 95 % foi purificada em coluna compacta de matriz C₁₈ (Sep-Pack-C₁₈). Para acondicionamento da coluna, lavou-se a mesma com 10 mL de etanol e 10 mL de água destilada, secando-a com 10 mL de ar após as lavagens. Aplicou-se 150 µL da amostra e purificou-se com 10 mL de água destilada para remoção do ¹⁷⁷Lu livre, recolhendo-se em alíquotas de 1 mL, seguido de 5 mL de metanol, para eluir a Substância P marcada em alíquotas de 0,5 mL.

Ao final, contaram-se as alíquotas em um calibrador de atividade para cálculo do rendimento de marcação e realizou-se a cromatografia em camada delgada (ITLC-SG) na fração eluída com metanol para determinação da porcentagem de pureza radioquímica da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu purificada.

4.2.5 Análise da estabilidade da SP-DOTA radiomarcada *in vitro*

Para determinar a estabilidade *in vitro* da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu, as preparações foram armazenadas em geladeira a 2 - 8° C por diferentes tempos (1 - 9 dias), retirando-se uma alíquota a cada dia para análise da pureza radioquímica por cromatografia em ITLC-SG.

Foram coletados 10 mL de sangue de doador sadio sem anticoagulante, para obtenção do soro humano, para análise de estabilidade. Centrifugou-se a 2500 rpm por 10 minutos, separou-se o coágulo de fibrina e centrifugou-se novamente para separação do soro.

A SP radiomarcada foi incubada (37 MBq/mL) em soro por 1, 4 e 24 horas a 37 °C, sob agitação de 350 rpm. Realizou-se o controle de qualidade, ao final de cada tempo, para avaliar a estabilidade, aplicando-se uma alíquota da solução de marcação nas fitas de ITLC-SG em duplicata.

A estabilidade das marcações efetuadas com alta atividade de lutécio-177 também foi analisada em preparações utilizando-se ou não de ácido gntísico (AG) como

agente estabilizante. A solução de AG (10 mg/mL) foi preparada em tampão acetato de sódio 0,4 M (pH 4,5) 300 µL desta solução foi adicionada na mistura imediatamente após a marcação para produzir uma concentração de AG final de 6 mg/mL (Chen et al., 2008). As preparações foram armazenadas em freezer -20 °C e analisadas de imediato, 24 e 48 horas após a radiomarcagem.

4.2.6 Análise da oxidação

As condições de marcação em baixa e alta atividade foram submetidas à avaliação para verificar a possibilidade de oxidação do resíduo de metionina (Met), último aminoácido na cadeia peptídica da Substância P. Avaliou-se a pureza radioquímica, por CLAE, da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu, empregou-se baixa e alta atividade, na presença ou não de excesso de metionina no meio de marcação (na concentração de 6 mg de D,L-Metionina / mL) (Chen et al., 2007).

4.2.7 Efeito da oxidação da metionina sobre a ligação às células tumorais *in vitro*

A análise de ligação *in vitro* da Substância P-DOTA-¹⁷⁷Lu (0,5 mCi/µg) foi avaliada em células de glioma humano M059J e U-87 MG. Colocou-se 10⁶ células em meio de cultura (10⁶ células/100µL) em tubos do tipo eppendorf. Os eppendorfs foram acomodados na centrífuga programada para rotacionar a 3000 rpm por 5 minutos a 4 °C, para ser removido o meio de cultura. Após esse procedimento, lavou-se as células com 200 µL de solução PBS e colocou-se para centrifugar novamente com a mesma programação, em seguida retirou-se a solução de tampão fosfato/salina (PBS).

Ao término da preparação, as células foram incubadas a 37 °C durante 1 hora, sem agitação, na presença de cerca de 10⁶ cpm de SP-DOTA radiomarcada com ¹⁷⁷Lu na ausência ou na presença de metionina (6 mg/mL). Após a incubação, os tubos foram centrifugados (10000 rpm, 5 minutos em 4 °C), o meio reacional foi aspirado e as células foram lavadas três vezes com PBS, centrifugando a 10000 rpm por 5 minutos em cada lavagem. Depois da última lavagem retirou-se a solução de PBS e a radioatividade de cada célula foi determinada em um contador gama e os resultados foram expressos em porcentagem da radioatividade total ligada às células. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.8 Estudos de biodistribuição

Os estudos *in vivo* foram conduzidos de acordo com princípios éticos de experimentação animal da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e envolveram camundongos *Balb-c* machos saudáveis e *Nude* implantados com células de tumor de pâncreas de rato (células AR42J) e células de glioblastoma humano (U-87 MG).

Camundongos da raça *Nude* (Biotério – IPEN), 12 machos, de 4 a 6 semanas foram implantados com células de tumor de pâncreas (células AR-42J), 2×10^6 células AR42J/camundongo em 0,1 mL de solução fisiológica tamponada com tampão fosfato na região dorsal. Os estudos de biodistribuição foram realizados em camundongos com tumores de 0,5 a 1,0 g em média (cerca de 15 dias após a implantação). Cada camundongo recebeu, por via intravenosa caudal, a Substância P marcada com ^{177}Lu (sem adição de metionina), 1,185 MBq (50 μCi), diluído em 100 μL de solução salina 0,9%. Os animais foram sacrificados após 1, 4 e 24 horas, o sangue foi coletado e os órgãos vitais e o tumor foram retirados, lavados em água, pesados e a radioatividade foi medida em um contador gama tipo poço. As porcentagens da atividade injetada por órgão (% AI, EQ.1) e por grama de órgão (% AI/g, EQ. 2) foram calculadas em função da média das contagens da triplicata de um padrão da atividade da dose administrada (Breeman et al., 1996; de Araújo et al., 2009).

$$\% \text{AI} = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{cpm padrão}} \times 100 \quad (\text{EQ. 1})$$

$$\% \text{AI/g} = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{peso órgão (g)} \times \text{cpm padrão}} \times 100 \quad (\text{EQ. 2})$$

Para calcular a porcentagem de atividade injetada no osso (%AI/osso) retirou-se o fêmur do camundongo e calculou-se a porcentagem de atividade por grama assumindo-se o peso do esqueleto como 12% (EQ. 3) do peso total do camundongo. Para calcular a porcentagem de atividade injetada no músculo, também retirou-se o músculo da coxa do camundongo e calculou-se a porcentagem de atividade por grama considerando como 40% (EQ. 4) do peso total do camundongo (Jiménez, 2007).

$$\%AI / \text{osso} = \frac{\text{cpm fêmur} \times 12 \times \text{peso do camundongo (g)}}{\text{peso do fêmur (g)} \times \text{cpm padrão}} \quad (\text{EQ. 3})$$

$$\%AI / \text{músculo} = \frac{\text{cpm músculo} \times 40 \times \text{peso do camundongo (g)}}{\text{peso do músculo (g)} \times \text{cpm padrão}} \quad (\text{EQ. 4})$$

Calculou-se também a porcentagem da atividade injetada por mL de sangue (% AI/mL sangue, EQ. 5) em função da média das contagens do padrão e a porcentagem da atividade injetada no sangue total (% AI/sangue, EQ. 6), considerou-se o volume total de sangue (volemia) do camundongo como 7,78% do seu peso total (EQ. 7) (Jiménez, 2007).

$$\%AI / \text{mL sangue} = \frac{\text{cpm de 1 mL de sangue}}{\text{cpm padrão}} \times 100 \quad (\text{EQ. 5})$$

$$\%AI / \text{sangue} = \%AI / \text{mL sangue} \times \text{volemia} \quad (\text{EQ. 6})$$

$$\text{Volemia (mL)} = \text{peso do camundongo (g)} \times 0,0778 \quad (\text{EQ. 7})$$

Camundongos da raça *Nude* (Biotério –IPEN), 13 machos, sadios, de 4 a 6 semanas, foram implantados com células de glioma humano, 5×10^6 células U-87 MG/camundongo em 0,1 mL de solução fisiológica tamponada com tampão fosfato na região dorsal (Heikkilä et al, 2010). Seguiu-se o mesmo procedimento do estudo com camundongos implantados com tumor de pâncreas, injetando-se a SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada na presença de metionina (na concentração de 6 mg de D,L-Metionina / mL) e ausência de metionina.

Estudos de biodistribuição foram realizados também em camundongos *Balb-c*, machos, sadios, após administração do radiofármaco (radiomarcada na presença de metionina) na veia caudal. A retirada de sangue e órgãos foi realizada conforme descrito no estudo com camundongos *Nude*, para determinar a %AI (EQ. 1) e %AI/g (EQ. 2) dos diferentes órgãos.

4.2.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como Média \pm Desvio Padrão. A análise estatística foi realizada através do programa Excel, utilizando o teste t de Student com distribuição

bicaudal para comparação de pares. Diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Radiomarcção da SP com ^{177}Lu

5.1.1 Efeito da massa de SP-DOTA sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA- ^{177}Lu

Os resultados dos estudos de marcação da SP-DOTA com ^{177}Lu , variando-se a massa do peptídeo, são mostrados na FIG. 2. Obteve-se alta pureza radioquímica (>95%) com as massas de 5 e 10 μg de SP-DOTA. Quando a massa de SP-DOTA foi reduzida para 2,5 μg , a pureza radioquímica diminuiu para $39,13 \pm 3,2\%$ e nenhuma reação ocorreu com 0,5 e 1 μg de peptídeo. Pureza radioquímica de $99,81 \pm 0,1\%$ foi obtida com 10 μg de SP-DOTA. Tendo em vista os resultados deste estudo, a massa de SP-DOTA escolhida para ser utilizada nas demais reações foi de 10 μg .

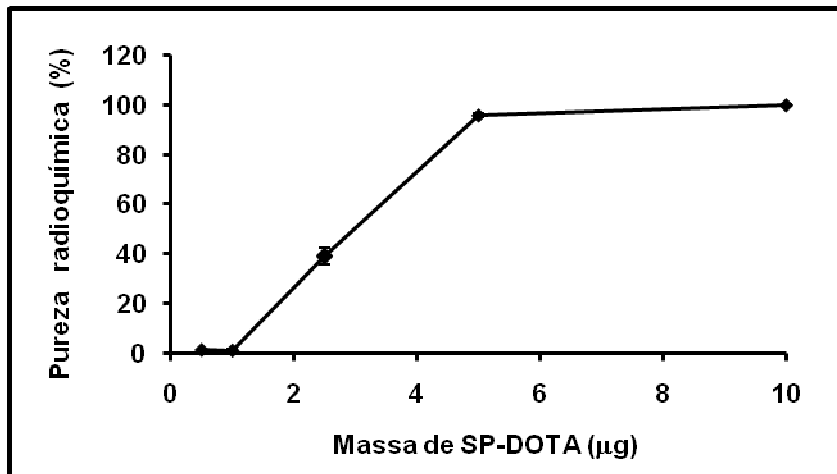


FIGURA 2 – Efeito da variação da massa de SP-DOTA sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA- ^{177}Lu . A reação foi realizada com 92,5 MBq de $^{177}\text{LuCl}_3$ a 90 °C, por 30 minutos, em pH 4,5 sob agitação de 350 rpm (n=3).

5.1.2 Efeito da temperatura sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA- ^{177}Lu

Na TAB. 1 apresenta-se o efeito da temperatura sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA radiomarcada. A pureza radioquímica determinada por ITLC-SG foi satisfatória em todas as temperaturas analisadas (> 95%) e a temperatura escolhida para a realização

dos demais estudos foi 90 °C, a fim de assegurar eficiência de marcação semelhante às reações com maior atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$. Entretanto, o estudo de variação de temperatura demonstra que a utilização de temperaturas entre 80 e 90 °C promovem resultados de marcação excelentes, com pureza radioquímica da ordem de 99 % (TAB. 1). A proposta deste trabalho foi avaliar e definir uma faixa de temperatura segura para promover resultados de pureza radioquímica reprodutíveis e superiores a 95%.

TABELA 1 - Efeito da temperatura sobre a pureza radioquímica de SP-DOTA- ^{177}Lu . 10 μg de SP-DOTA reagiram por 30 minutos com 92,5 MBq de ^{177}Lu , em pH 4,5 e sob agitação de 350 rpm (n=3).

Temperatura da reação (°C)	Pureza radioquímica da SP-DOTA- ^{177}Lu (%)
70	95,33 \pm 3,2
80	99,73 \pm 0,1
90	99,81 \pm 0,1

5.1.3 Efeito do tempo de reação sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA- ^{177}Lu

Na TAB. 2 apresenta-se o resultado da análise do efeito do tempo da reação sobre a pureza radioquímica de SP-DOTA- ^{177}Lu . A pureza radioquímica da SP radiomarcada foi satisfatória em todos os tempos de reação estudados, e o tempo de reação escolhido para realização dos demais estudos foi 30 minutos, considerando-se também, neste caso, a segurança para reprodução de bons resultados e que este tempo de reação é compatível com o tempo de meia vida do elemento radioativo.

TABELA 2 - Efeito do tempo da reação sobre a pureza radioquímica de SP-DOTA- ^{177}Lu . 10 μg de SP-DOTA reagiram a 90 °C com 92,5 MBq de ^{177}Lu , em pH 4,5 e 350 rpm de agitação (n= 3).

Tempo de reação	Pureza radioquímica da SP-DOTA- ^{177}Lu (%)
15 minutos	99,15 \pm 0,8
20 minutos	98,17 \pm 1,5
25 minutos	98,13 \pm 0,1
30 minutos	99,81 \pm 0,1

5.1.4 Efeito da atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA- ^{177}Lu

O efeito da atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ sobre a pureza radioquímica das reações de marcação é apresentado na TAB. 3. Alta pureza radioquímica (> 95%) foi obtida quando a atividade do lutécio-177 variou entre 92,5 e 259 MBq, obtendo-se o radiofármaco com atividade específica variando de 9,25 até 25,9 MBq / μg (35 MBq/nmol). Quando utilizou-se atividades mais altas de radioisótopo, a pureza radioquímica das preparações diminuiu, sugerindo que o limite de 25,9 MBq / μg não deve ser ultrapassado.

TABELA 3 - Efeito da atividade do ^{177}Lu sobre a pureza radioquímica da SP-DOTA- ^{177}Lu . 10 μg de SP-DOTA reagiu com diferentes atividades de ^{177}Lu a 90 °C, por 30 minutos (n=2).

Atividade de ^{177}Lu		Pureza radioquímica da SP-DOTA- ^{177}Lu (%)	Atividade específica da SP-DOTA- ^{177}Lu		
MBq	mCi		MBq/ μg	mCi/ μg	MBq/nmol
92,5	2,5	99,8 \pm 0,30	9,25	0,25	12,5
111,0	3,0	98,9 \pm 0,30	11,10	0,30	15
129,5	3,5	98,6 \pm 0,01	12,95	0,35	17,50
185,0	5,0	99,3 \pm 0,04	18,50	0,50	25
259,0	7,0	96,8 \pm 0,40	25,90	0,70	35
277,5	7,5	90,6 \pm 2,00	27,75	0,75	37,5
407,0	11,0	74,7 \pm 5,80	40,70	1,10	55
1036,0	28,0	2,90 \pm 1,90	103,60	2,80	140

A atividade específica da marcação é uma importante propriedade a ser avaliada, particularmente quando se considera radiofármacos que interagem com receptores específicos nas células tumorais. Radiofármacos receptor-específicos, produzidos com baixa atividade específica, podem apresentar baixa captação que se estabelece entre as moléculas radiomarcadas e as não radiomarcadas pelo sítio de ligação. Dessa forma, no desenvolvimento de um novo radiofármaco, objetiva-se utilizar a mais alta atividade específica possível, desde que não comprometa a estabilidade do próprio produto (Thrall e Ziessman, 2003).

5.1.5 Condição padrão de marcação

Com base nos resultados dos experimentos anteriores, escolheu-se uma condição padrão de marcação, através da qual os parâmetros seriam extrapolados para marcações com atividades mais altas de lutécio-177. Esta condição foi: 10 µg de SP-DOTA, 185 MBq (5 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$, 90 °C de temperatura, 30 minutos de reação, pH 4,5 e agitação de 350 rpm. Apesar da pureza radioquímica ter sido satisfatória nas marcações com até 259 MBq de $^{177}\text{LuCl}_3$, escolheu-se como padrão a atividade de 185 MBq, uma vez que 259 MBq corresponde à atividade limite (correspondente à AE de 35,0 MBq/nmol) e sua utilização demandaria o estudo da estabilidade do produto radiomarcado.

A FIG. 3 ilustra o perfil em CLAE do $^{177}\text{LuCl}_3$ livre e a FIG. 4 ilustra o perfil da SP-DOTA- ^{177}Lu marcada com 185 MBq (5 mCi). A SP-DOTA radiomarcada (TR = 6,31 minutos) foi facilmente separada do ^{177}Lu livre (TR = 1,15 minutos) devido a diferença entre seus tempos de retenção. Além disso, cabe ressaltar que no perfil cromatográfico da SP-DOTA- ^{177}Lu não foi observada presença significativa de lutécio livre, confirmando, também por essa técnica cromatográfica, a alta pureza radioquímica da preparação.

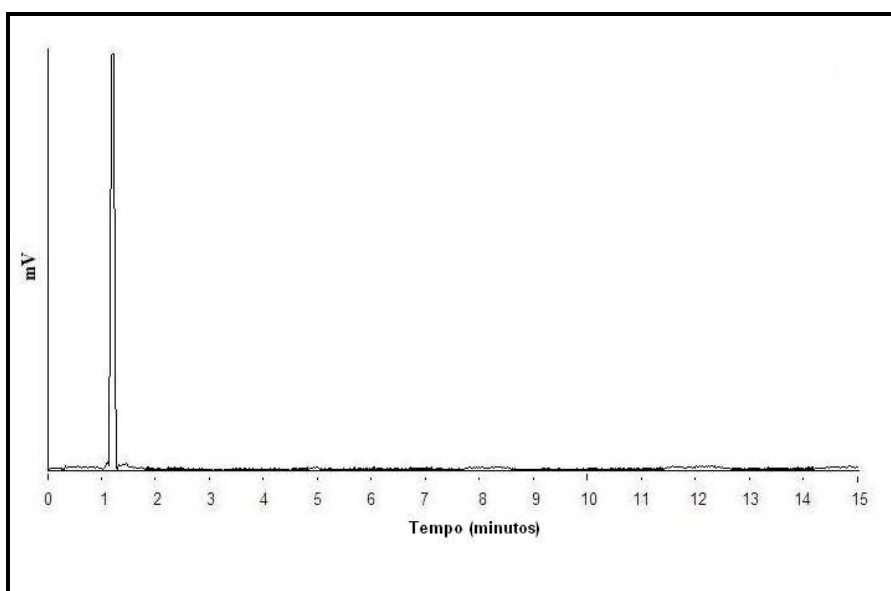


FIGURA 3: Perfil do $^{177}\text{LuCl}_3$ em CLAE (radioativo), utilizando-se uma coluna de fase reversa C_{18} com um gradiente linear de 10 – 90% de TFA/acetonitrila (1:1000 v/v) em TFA/água (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos.

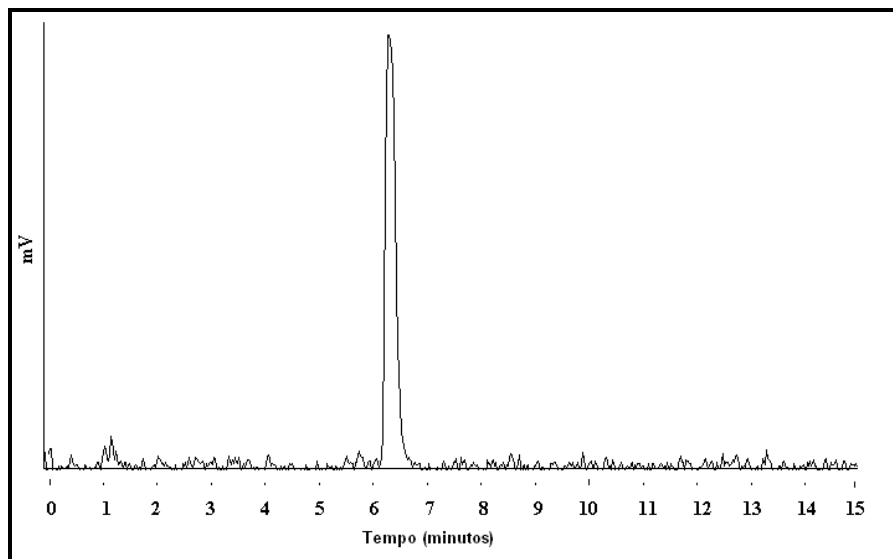


FIGURA 4. Perfil da SP-DOTA radiomarcada com 185 MBq (5 mCi) de ^{177}Lu em CLAE (radioativo), utilizando-se uma coluna de fase reversa C_{18} com um gradiente linear de 10 – 90% de TFA/acetonitrila (1:1000 v/v) em TFA/água (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos.

5.2 Radiomarcção com alta atividade de ^{177}Lu

Na TAB. 4 apresentam-se os resultados da radiomarcção de SP-DOTA com alta atividade de ^{177}Lu , extrapolando-se a massa de SP-DOTA e a atividade do radionuclídeo nas proporções da reação padrão de marcação. Os resultados de pureza radioquímica após a purificação utilizando-se sistema Sep Pack (quando a pureza radioquímica inicial não foi satisfatória) também são apresentados na TAB. 4. Nesse caso, o protocolo utilizado para purificação mostrou-se muito eficaz, resultando no produto marcado com pureza radioquímica em torno de 97%.

Para assegurar a estabilidade das marcações, pode-se utilizar agentes estabilizantes como ácido gntísico ou ácido ascórbico (Marques et al., 2001). Os agentes estabilizantes devem ser adicionados ao produto radiomarcado após a reação, o efeito da adição de ácido gntísico (AG) 6 mg/mL, como estabilizante da reação é um importante aspecto a ser analisado, especialmente no desenvolvimento de radiofármacos, tendo em vista a provável radiólise quando se utilizam altas atividades, como no caso do radiofármaco para terapia (Chen et al., 2008).

TABELA 4 - Resultados da radiomarcção da SP-DOTA com alta atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$. As reações foram realizadas a 90 °C, por 30 minutos e a pureza radioquímica foi determinada por ITLC-SG (n=2).

Atividade do ^{177}Lu MBq (mCi)	Massa de SP-DOTA (μg)	Atividade Específica (MBq/nmol)	Estabilizante	Pureza radioquímica (%)	
				Antes da purificação	Após a purificação
925 (25)	50	25	-	98,3 \pm 0,7	-
1850 (50)	100	25	AG	97,2 \pm 1,6	-
2775 (75)	100	37,5	-	98,2 \pm 0,5	-
3700 (100)	200	25	AG	97,8 \pm 1,9	-
4810 (130)	260	25	AG	94,8 \pm 2,6	-
4995 (135)*	200	33,75	-	44,4 \pm 8,8	97,6 \pm 0,4
6956 (188)*	200	47	-	63,1 \pm 1,9	97,3 \pm 0,5

* marcação realizada com ^{177}Lu com atividade específica baixa (AE=277,5 e 490,3 GBq/mg) fornecido pelo laboratório Oak Ridge National Laboratory (ORNL, USA).

Neste estudo, avaliando-se a pureza radioquímica das preparações imediatamente após o término do procedimento das marcações, não foi possível avaliar o benefício do agente estabilizante no meio de reação. Tal aspecto será melhor elucidado com os resultados dos estudos de estabilidade.

O perfil em CLAE da SP-DOTA- ^{177}Lu radiomarcada com 1850 MBq (50 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$ com adição de ácido gentísico logo após a reação, é apresentado na FIG 5. Três picos são identificados: o primeiro com TR = 1,15 minutos (^{177}Lu livre), o segundo com 6,31 \pm 0,01 minutos (SP-DOTA- ^{177}Lu) e o terceiro com TR = 7,15 \pm 0,04 minutos.

A presença de 2 picos com TR próximos sugere oxidação do resíduo de metionina da proteína (Chen et al., 2008; Nevares et al., 2010). Isso acontece por causa da radiólise da água, possível degradação nas reações em alta temperatura em torno de 100 °C e em pH ácido. Para evitar essa oxidação estudos, foram realizados adicionando agentes estabilizantes ao meio de marcação, como ácido ascórbico, ácido gentísico e metionina (Chen et al, 2008).

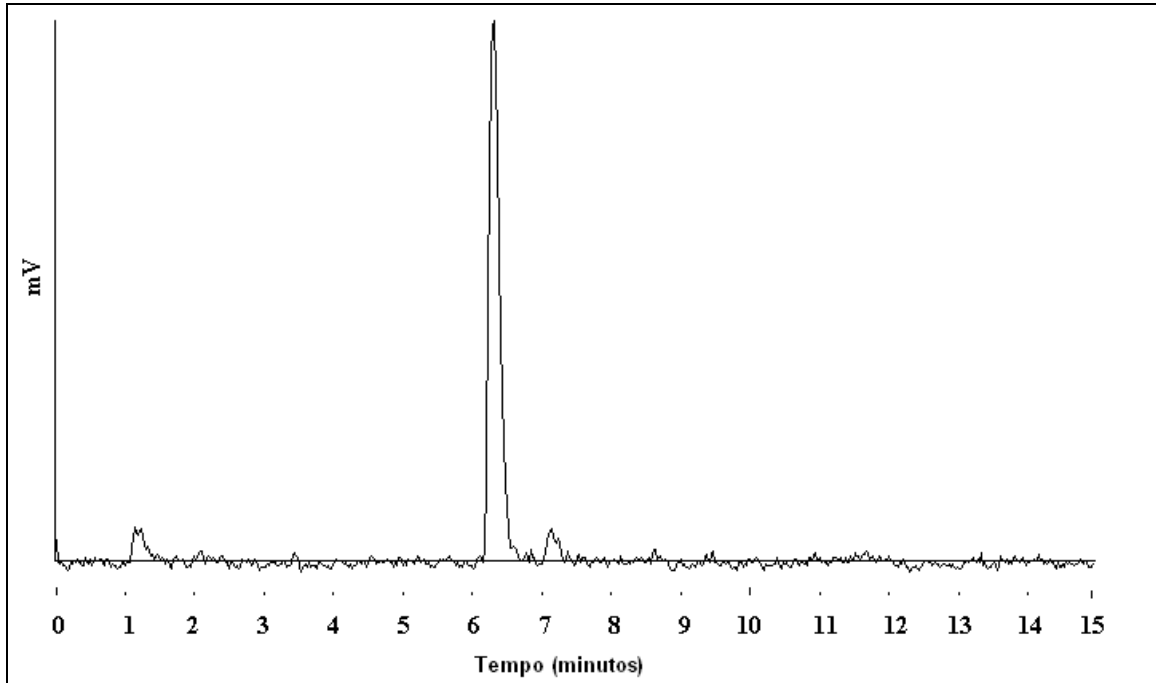


FIGURA 5 – Perfil em CLAE (radioativo) da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada com 1850 MBq (50 mCi) de ¹⁷⁷LuCl₃, utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈ com um gradiente linear de 10 – 90% de TFA/acetonitrila (1:1000 v/v) em TFA/água (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos.

5.3 Análise da estabilidade da SP-DOTA radiomarcada *in vitro*

A estabilidade da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada com baixas atividades de radionuclídeo foi avaliada por ITLC-SG após diferentes tempos de armazenamento sob refrigeração (2-8 °C) e os resultados são apresentados na TAB. 5. O produto radiomarcado manteve-se estável por até 72 horas quando sua atividade específica foi de 9,25 MBq/μg (12,5 MBq/nmol). Com o aumento da relação atividade de radionuclídeo:massa de peptídeo a estabilidade foi reduzida.

TABELA 5 - Estabilidade *in vitro* da Substância P (10 µg) radiomarcada com baixa atividade de radionuclídeo, determinada por ITLC-SG após armazenamento entre 2-8 °C por diferentes tempos (n=3).

Atividade específica da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	Tempo de armazenamento a 2-8 °C			
	Imediato	24 horas	48 horas	72 horas
9,25 MBq/µg (12,5 MBq/nmol)	99,8 ± 0,1	98,36 ± 0,3	97,90 ± 0,3	95,58 ± 0,1
18,5 MBq/µg (25 MBq/nmol)	99,3 ± 0,1	97,04 ± 0,1	95,9 ± 0,5	91,4 ± 0,6
25,9 MBq/µg (35 MBq/nmol)	96,8 ± 0,4	89,5 ± 12,1	88,9 ± 6,5	82,2 ± 2,5

O estudo de estabilidade confirmou a hipótese anteriormente descrita de que a relação atividade de radionuclídeo:massa de peptídeo de 25,9 MBq/µg (35 MBq/nmol) é a relação limite, produzindo um produto com alta pureza radioquímica inicial, porém com baixa estabilidade frente ao armazenamento.

Encontrar a relação atividade:massa de peptídeo que confira alta pureza radioquímica às reações bem como alta atividade específica e estabilidade prolongada ao produto radiomarcado, representa um dos mais importantes desafios para o desenvolvimento de radiofármacos receptor-específicos. A atividade específica deve ser a mais alta, uma vez que está relacionada à provável saturação dos receptores por moléculas de peptídeos não marcados (no caso de radiofármacos com baixa AE), causando comprometimento da ligação do radiofármaco aos sítios receptores e comprometendo seu efeito terapêutico.

Analisou-se também a estabilidade da SP-DOTA após a incubação em soro humano *in vitro*, e os resultados são apresentados na TAB. 6. A estabilidade foi satisfatória em até 4 horas após a radiomarcção, demonstrando estabilidade metabólica da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu, conforme apresentado na TAB. 6. A estabilidade metabólica garante a interação com os receptores das células tumorais e a permanência no local da administração.

TABELA 6 - Estabilidade metabólica da SP-¹⁷⁷Lu (9,25 MBq/ μ g) determinada por ITLC-SG após incubação em soro humano a 37 °C por diferentes tempo (n=6).

Tempo de armazenamento em soro humano a 37 °C	Pureza radioquímica (%)
Imediato	99,80 \pm 0,1
1 hora	98,39 \pm 0,7
4 horas	94,61 \pm 3,3
24 horas	67,45 \pm 0,2

A estabilidade metabólica é uma propriedade importante para este radiofármaco, uma vez que representa a garantia de interação com os receptores das células tumorais e a permanência no local da administração, considerando-se terapia por administração intratumoral ou intracavitária.

Conforme a literatura consultada, um radiofármaco terapêutico deve manter sua integridade química e biológica durante a preparação, armazenamento e transporte (Liu e Edwards, 2001).

Radiofármacos terapêuticos emissores β^- podem sofrer radiólise (formação de radicais livres, são reativos para peptídeos) durante e após a preparação. Uma forma de prevenir este fenômeno é adicionar um estabilizante no momento da preparação ou imediatamente após a radiomarcção (Liu e Edwards, 2001; Chen et al., 2008).

O ácido genticóico tem sido utilizado como estabilizador e deve ser adicionado preferencialmente após a radiomarcção, pois durante o processo de radiomarcção, o estabilizador pode ser submetido a certo grau de decomposição térmica, devido à reação em temperaturas elevadas. Sugere-se também que seja utilizado para estabilizar preparações que contenham altas atividades de radionuclídeo (> 10 mCi). A temperatura de armazenamento também influencia na estabilidade, devendo-se armazenar peptídeos radiomarcados em baixas temperaturas, tanto menor quanto maior for a atividade do radionuclídeo. Ou seja, a taxa de decomposição radiolítica do radiofármaco é mais lenta na concentração menor de atividade do que na maior concentração. Congelando-se o composto radiomarcado com alta atividade, retarda-se o tempo de reação entre radicais livres e os peptídeos radiomarcados (Liu e Edwards, 2001).

Os resultados da estabilidade da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada com alta atividade de lutécio-177 (925 a 4810 MBq) e armazenada a -20 °C por diferentes tempos são apresentados na TAB. 7. A metionina (Met 6 mg/mL) foi adicionada à marcação e o ácido gntísico (AG 6 mg/mL) após a reação. Pode-se observar que em todos os casos estudados, assegurou-se a estabilidade do composto radiomarcado por até 24 horas. Além disso, comparando-se a estabilidade da marcação realizada com 1850 MBq de ¹⁷⁷Lu em que foram adicionados os dois estabilizantes, ácido gntísico e metionina, em relação à marcação em que apenas o ácido gntísico foi adicionado, não observou-se diferença significativa (p= 0,47).

TABELA 7 - Estabilidade da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada com alta atividade de lutécio-177 armazenada a -20 °C por diferentes tempos, avaliada por ITLC-SG (n=3).

Atividade da SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu MBq (mCi)	Estabilizante	Pureza radioquímica (%) armazenado a -20 °C		
		Imediato	24 horas	48 horas
925 (25)	-	98,3 ± 0,7	97,8 ± 0,4	79,9 ± 9,7
1850 (50)	AG	97,2 ± 1,6	95,8 ± 0,3	91,8 ± 1,9
1850 (50)	AG/Met	98,0 ± 0,4	97,6 ± 0,3	94,1 ± 4,1
2775 (75)	-	98,2 ± 0,5	94,9 ± 1,2	88,2 ± 1,4
4810 (130)	AG	94,8 ± 2,6	95,0 ± 0,2	95,9 ± 0,3

Portanto, considerando-se o exposto anteriormente, a estabilidade da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada com alta atividade pode ser garantida prevenindo-se a radiólise através do uso de agentes estabilizantes e congelamento da amostra. Além disso, diluir o produto armazenando-o em menor concentração radioativa, também promove, normalmente, efeito protetor contra radiólise (Liu e Edwards, 2001). Esta opção não foi estudada para o caso de SP-DOTA-¹⁷⁷Lu, podendo ser objeto de estudos futuros.

Garantir a estabilidade do produto é particularmente importante, considerando-se as dimensões continentais de nosso país e a necessidade de transportar o produto para as diferentes regiões.

5.4 Cultivo das células

As FIG. 6, 7 e 8 ilustram o aspecto das células que foram cultivadas no Centro de Biotecnologia do IPEN e utilizadas nos estudos *in vivo* em modelo tumoral animal e ensaios de ligação *in vitro*. A observação microscópica possibilita analisar a viabilidade celular e o crescimento celular. As células cultivadas apresentaram boa taxa de crescimento, com exceção da célula M059J, a qual apresentou crescimento mais tardio.

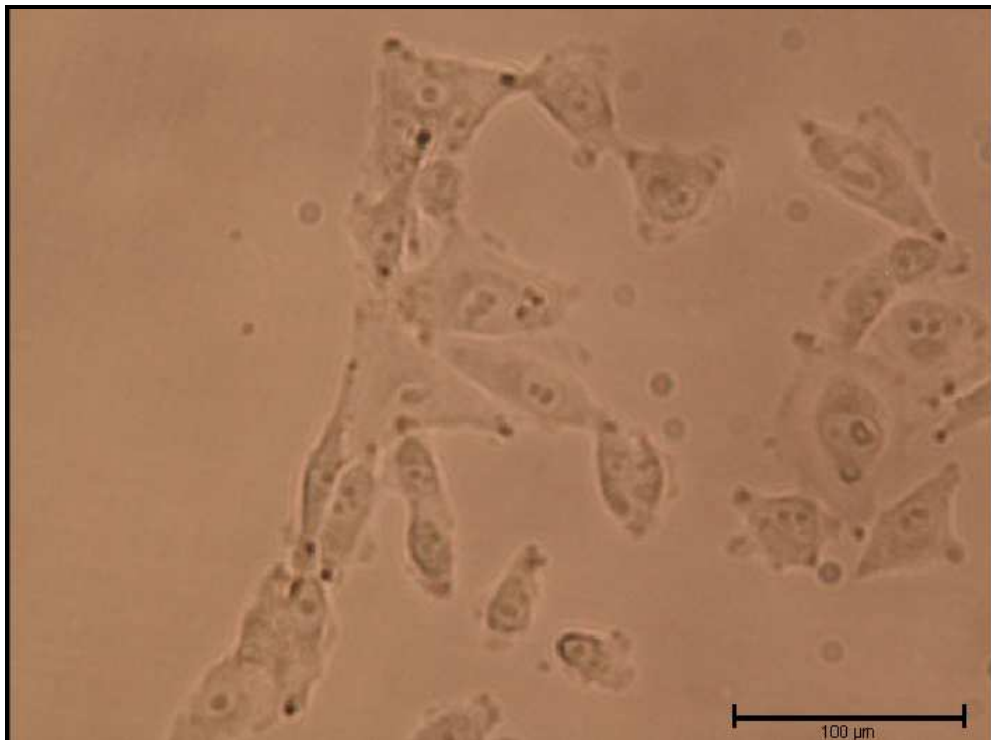


FIGURA 6 – Fotomicrografia das células AR42J de tumor de pâncreas de rato na placa de cultivo e em meio de cultura (aumento: 10000x).



FIGURA 7 – Fotomicrografia das células M059J de glioma humano na placa de cultivo e em meio de cultura (aumento: 10000x).

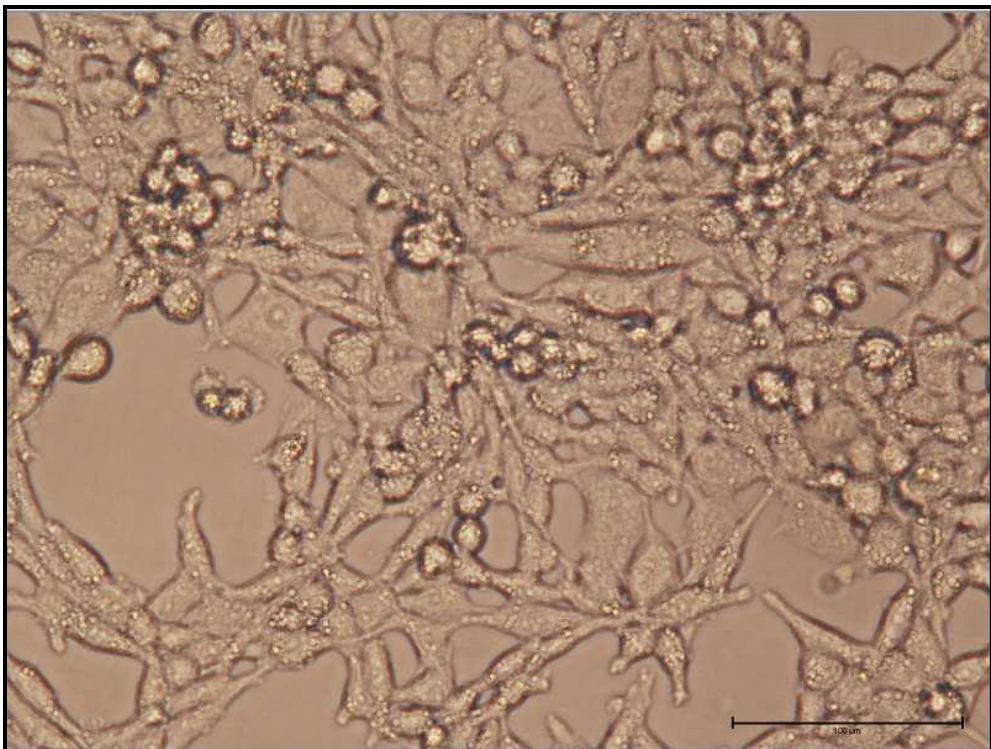


FIGURA 8 – Fotomicrografia das células U-87 MG de glioblastoma humano em placa de cultivo e em meio de cultura (aumento:10000x).

5.5 Análise da oxidação peptídica

Chen e colaboradores (2008) avaliaram a eficácia de agentes estabilizantes na prevenção de oxidação peptídica do resíduo de metionina da proteína durante as reações de marcação. Dentre os compostos estudados estava o aminoácido metionina. Considerando-se que a SP apresenta a metionina em sua estrutura, avaliou-se se há oxidação desse resíduo de aminoácido durante as reações de marcação com baixa e alta atividade de radionuclídeo por CLAE e os resultados são apresentados nas FIG. 9 e 10, respectivamente. Pode-se observar, através do perfil da SP-DOTA radiomarcada com baixa e alta atividade de lutécio-177 na ausência e presença de metionina, a alteração nos tempos de retenção do produto principal (de $6,31 \pm 0,01$ para $7,15 \pm 0,04$ minutos). Este resultado sugere a ocorrência de oxidação peptídica e confirmam que a oxidação pode ser prevenida pela adição de excesso do aminoácido, como sugerido por Chen e colaboradores (2008). Além disso, pode-se observar para a SP-DOTA-¹⁷⁷Lu que a oxidação do resíduo da metionina não depende da atividade do ¹⁷⁷Lu na reação, uma vez que ocorreu de maneira semelhante nas marcações com baixa e alta atividade de lutécio-177.

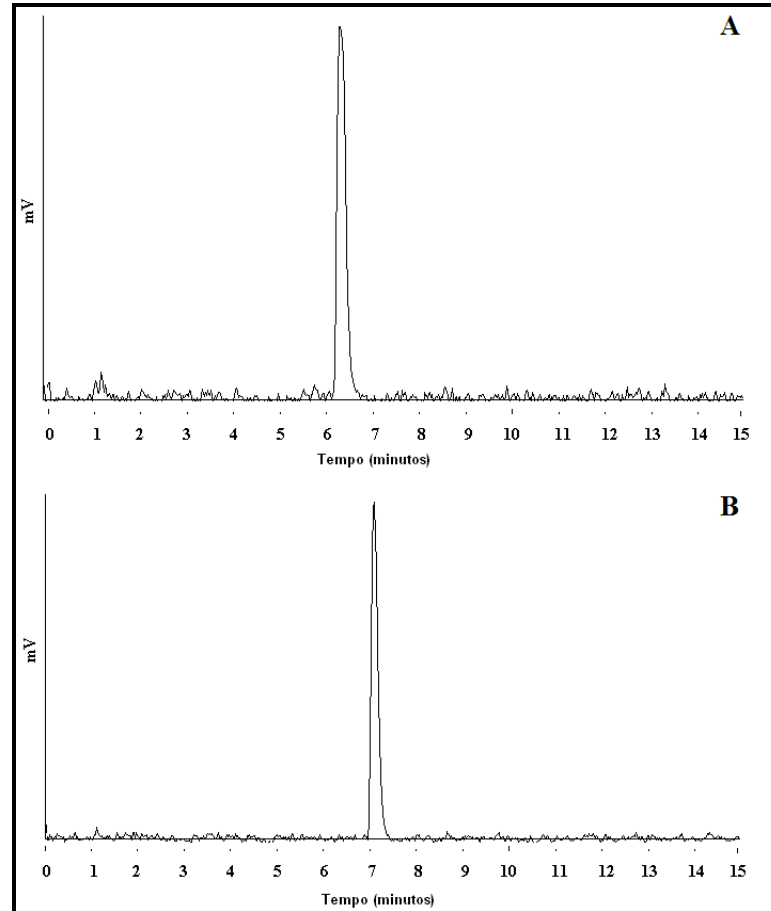


FIGURA 9 - Perfil da SP radiomarcada com 185 MBq (5 mCi) de ^{177}Lu em CLAE (radioativo), utilizando-se uma coluna de fase reversa C_{18} com um gradiente linear de 10 – 90% de TFA/acetonitrila (1:1000 v/v) em TFA/água (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos, na ausência de metionina (A) ($\text{TR} = 6,31 \pm 0,01$ minutos) e com metionina 6 mg/mL (B) ($\text{TR} = 7,15 \pm 0,04$ minutos).

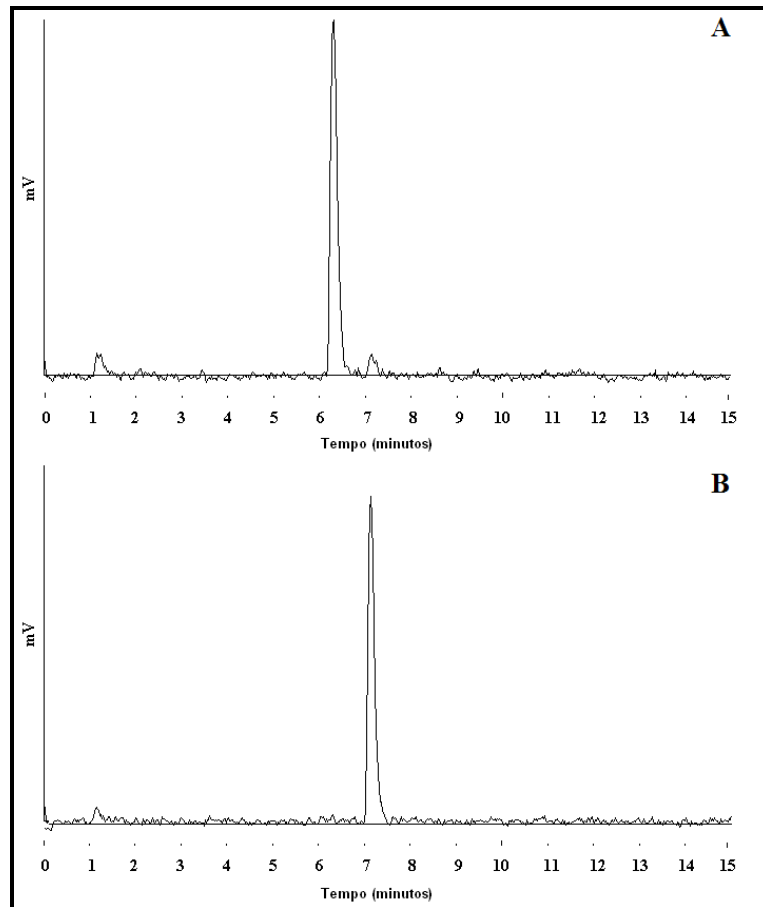


FIGURA 10 - Perfil em CLAE (radioativo) de SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada com 1850 MBq (50 mCi) de ¹⁷⁷LuCl₃, utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈ com um gradiente linear de 10 – 90% de TFA/acetonitrila (1:1000 v/v) em TFA/água (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos. Na ausência de metionina (A) o primeiro pico apresenta TR = 1,15 minutos (¹⁷⁷Lu livre), o segundo TR = 6,31 ± 0,01 minutos (SP-DOTA-¹⁷⁷Lu) e o terceiro com TR = 7,15 ± 0,04 minutos e com metionina 6 mg/mL (B) (TR = 7,15 ± 0,04 minutos).

5.6 Efeito da oxidação do resíduo da metionina sobre a ligação às células tumorais *in vitro*

Na FIG. 11 apresenta-se o resultado do ensaio de ligação *in vitro* da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na ausência e na presença de metionina (6 mg/mL), às células de glioma humano M059J. A ligação do peptídeo radiomarcado às células tumorais foi cerca de 10 vezes maior ($p=0,0007$), quando a radiomarcagem foi realizada na presença de metionina, demonstrando a importância da prevenção da oxidação peptídica durante a radiomarcagem, pois essa oxidação pode comprometer a interação com o receptor. Além disso, este resultado sugere que o desenvolvimento de uma formulação para preparação da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu a ser utilizada em ensaios clínicos de terapia local de tumores deve incluir

a metionina, além do ácido gantísico como estabilizantes das marcações com alta atividade.

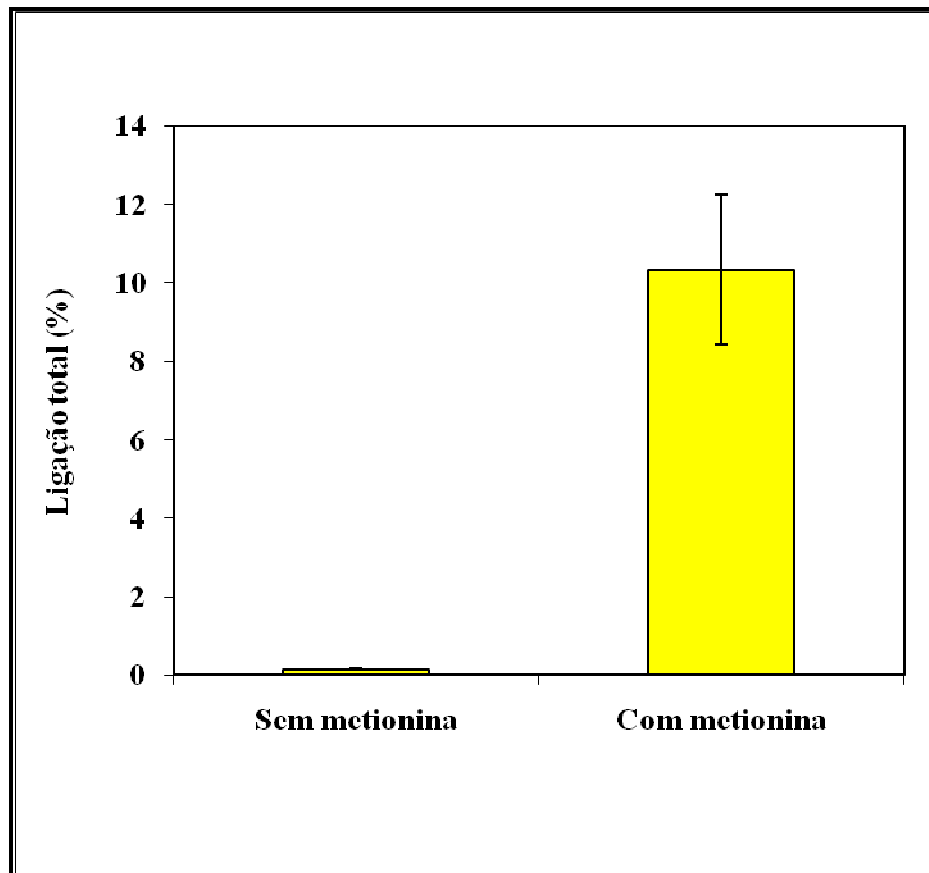


FIGURA 11 - Ensaio de ligação *in vitro* de SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada (baixa atividade 185 MBq) na presença e ausência de metionina (6 mg/mL), às células M059J de glioma humano (n=3).

O resultado do ensaio de ligação *in vitro* da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na ausência e na presença de metionina (6 mg/mL), às células de glioblastoma humano U-87 MG é apresentado na FIG. 12. Observa-se que, nessa linhagem celular, a adição de metionina no meio de marcação não promoveu alteração significativa na porcentagem de ligação de SP-DOTA-¹⁷⁷Lu às células ($p= 0,36$) como observado para as células M059J. Isso pode estar relacionado à histologia tumoral, uma vez que este tipo de tumor tem características muito distintas mesmo sendo os dois classificados como gliomas de grau IV (Kneifel et al., 2006).

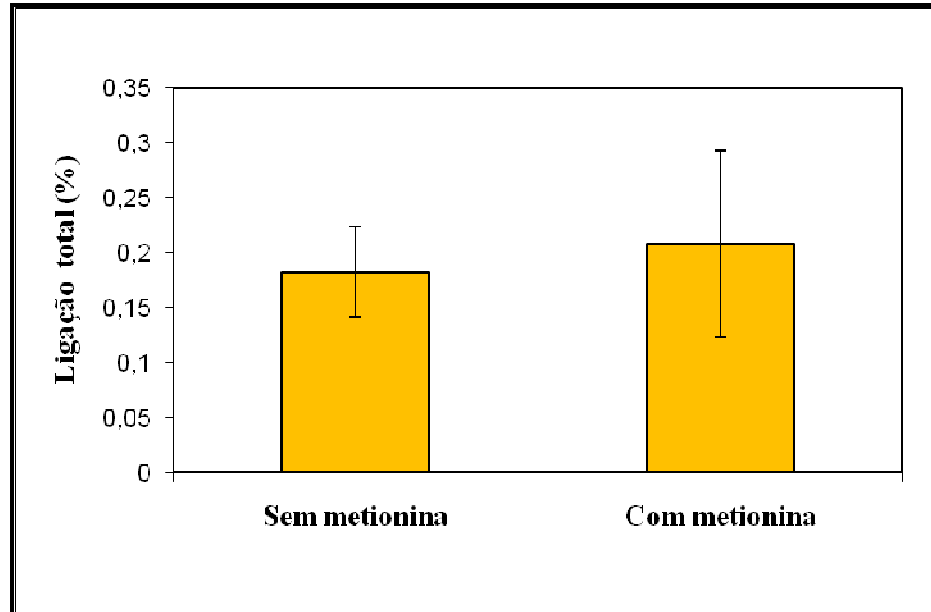


FIGURA 12. Ensaio de ligação *in vitro* de SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada (baixa atividade 185 MBq) na presença e ausência de metionina (6 mg/mL) em células U-87 MG (n=3).

5.7 Estudos de biodistribuição

Os resultados dos estudos de biodistribuição da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na presença de metionina (6 mg/mL), após administração intravenosa em camundongos *Balb-c* machos saudáveis, são apresentados na TAB. 8, em porcentagem de atividade injetada por grama de tecido ou mililitro de sangue (%AI/g ou %AI/mL) e na TAB.9, em porcentagem de atividade injetada por órgão (%AI). Observa-se alta concentração de atividade nos rins em até 4 horas após a administração, indicando que a excreção se dá principalmente por via renal e rápido clareamento sanguíneo do peptídeo radiomarcado. Baixa concentração de atividade é observada no fígado e também nos ossos, confirmando a ausência de impurezas da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu (Nevares et al., 2010). A baixa captação óssea também indica estabilidade *in vivo* de peptídeos radiomarcados com lutécio-177 (Jiménez, 2007). Observou-se também baixa captação cerebral indicando que a preparação não ultrapassa a barreira hematoencefálica.

TABELA 8 - Biodistribuição da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada na presença de metionina (6 mg/mL) em camundongos *Balb-c* sadios 1, 4 e 24 horas após administração intravenosa, em % AI / g de órgão ou mL de sangue (n=3).

Órgão	% AI / g de órgão ou mL de sangue		
	1 hora	4 horas	24 horas
Sangue	3,64*	0,31 ± 0,10	0,10 ± 0,02
Coração	0,18 ± 0,04	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,02
Pulmões	0,16 ± 0,15	0,21 ± 0,09	0,08 ± 0,02
Pâncreas	0,19 ± 0,05	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,04
Baço	0,32 ± 0,09	0,23 ± 0,02	0,14 ± 0,04
Estômago	0,22 ± 0,02	0,14 ± 0,05	0,16 ± 0,02
Fígado	0,24 ± 0,03	0,17 ± 0,03	0,14 ± 0,03
Rins	5,12 ± 0,55	4,29 ± 0,50	1,60 ± 0,57
Intestino grosso	0,57 ± 0,16	0,59 ± 0,02	0,16 ± 0,03
Intestino delgado	0,36 ± 0,17	0,39 ± 0,01	0,58 ± 0,06
Músculo	0,32 ± 0,06	0,06 ± 0,04	0,05 ± 0,01
Osso	0,51 ± 0,20	0,22 ± 0,07	0,13 ± 0,14
Cérebro	0,11 ± 0,11	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01

*1 animal

TABELA 9 - Biodistribuição da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada na presença de metionina (6 mg/mL) em camundongos *Balb-c* sadios 1, 4 e 24 horas após administração intravenosa, em %AI/órgão (n=3).

Órgão	% AI/órgão		
	1 hora	4 horas	24 horas
Sangue	7,55*	1,03 ± 0,41	0,25 ± 0,08
Coração	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Pulmões	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Pâncreas	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Baço	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Estômago	0,12 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,02
Fígado	0,42 ± 0,06	0,29 ± 0,01	0,19 ± 0,01
Rins	2,32 ± 0,54	1,80 ± 0,06	0,53 ± 0,07
Intestino grosso	0,42 ± 0,08	0,51 ± 0,12	0,21 ± 0,03
Intestino delgado	1,54 ± 0,49	1,04 ± 0,08	1,30 ± 0,06
Músculo	1,52 ± 0,06	1,28 ± 0,41	0,71 ± 0,08
Ossos	0,64 ± 0,70	0,68 ± 0,23	0,50 ± 0,53
Cérebro	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01

*1 animal

Na TAB.10 apresentam-se os resultados da biodistribuição da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada sem metionina, após administração intravenosa em camundongos *Nude* machos implantados com tumor de pâncreas de rato (AR42J). Observou-se elevada captação no tumor quando comparado ao pâncreas normal, o que sugere a presença de receptores NK1 nas células tumorais AR42J. Além disso, porcentagem significativa da atividade injetada permaneceu no tumor por até 24 horas após a administração. A eliminação renal, ligação ao intestino delgado e estabilidade *in vivo* (devido a baixa captação óssea) evidenciadas nos *Balb-c* foram confirmadas no estudo em *Nude*. Este estudo com *Nude* implantados com células AR42J foi válido para avaliar a captação tumoral, pois há expressão de receptores NK1 nestas células tumorais (Ehlers et al, 2000; Reubi, 2003; Rodrigues et al, 2005). Observou-se baixa captação cerebral o mesmo foi observado no estudo realizado com *Balb-c*, comprovando que a SP-DOTA-¹⁷⁷Lu não ultrapassa a barreira hematoencefálica.

TABELA 10 - Biodistribuição da SP-DOA-¹⁷⁷Lu radiomarcada na ausência de metionina em camundongos *Nude* implantados com tumor AR42J 1, 4 e 24 horas após administração intravenosa, em % AI / g de órgão ou mL de sangue (n=4).

Órgão	% AI / g de órgão ou mL de sangue		
	1 hora	4 horas	24 horas
Sangue	1,79 ± 0,20	1,79 ± 1,25	0,01 ± 0,01
Tumor	1,27 ± 0,30	1,18 ± 0,25	0,70 ± 0,10
Pulmões	1,58 ± 0,40	1,72 ± 0,48	0,29 ± 0,10
Coração	1,06 ± 0,10	0,95 ± 0,10	0,19 ± 0,10
Fígado	0,93 ± 0,20	0,82 ± 0,20	0,69 ± 0,10
Rins	17,76 ± 6,90	14,89 ± 6,58	6,53 ± 1,30
Pâncreas	0,79 ± 0,10	0,64 ± 0,10	0,18 ± 0,10
Baço	1,13 ± 0,40	0,98 ± 0,30	0,14 ± 0,10
Intestino delgado	3,14 ± 1,20	2,63 ± 0,86	2,13 ± 0,30
Intestino grosso	1,36 ± 0,50	1,12 ± 0,40	0,82 ± 0,20
Estômago	1,04 ± 0,20	0,99 ± 0,30	0,73 ± 0,10
Músculo esquelético	0,67 ± 0,40	0,59 ± 0,20	0,06 ± 0,01
Cérebro	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,04	0,02 ± 0,01

Os resultados da biodistribuição da SP-DOA-¹⁷⁷Lu radiomarcada na ausência de metionina após administração intravenosa em camundongos *Nude* implantados com células de glioblastoma humano (células U-87 MG) expressos em % AI/g de órgão ou mL de sangue e % AI/órgão são apresentados na TAB. 11 e 12, respectivamente. Apesar da menor captação tumoral observado no tumor de células U-87 MG, quando comparado ao tumor AR42J, observou-se retenção do radiofármaco no tumor por até 24 horas após administração sugerindo uma provável ligação estável aos receptores ou internalização do radiofármaco, uma vez que não há relatos sobre a densidade desses receptores nas diferentes células (Goto e Tanaka, 2002; Cordier et al., 2010; Nevares et al., 2010). Observa-se alta captação nos rins, indicando que a excreção ocorre por via renal e que essa concentração foi maior do que o estudo com *Balb-c* sadio.

TABELA 11 - Biodistribuição da SP- ^{177}Lu radiomarcada na ausência de metionina em camundongos *Nude* implantados com tumor U-87 MG 1, 4 e 24 horas após a administração intravenosa, em % AI / g de órgão ou mL de sangue (n=3).

Órgãos	% AI / g de órgão ou mL de sangue		
	1 hora	4 horas	24 horas
Sangue	0,15 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Tumor	0,37 ± 0,02	0,31 ± 0,04	0,21 ± 0,01
Coração	0,10 ± 0,09	0,04 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Pulmões	1,71 ± 0,69	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Pâncreas	0,57 ± 0,08	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Baço	0,32 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Estômago	0,56 ± 0,06	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,02
Fígado	0,23 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,15 ± 0,02
Rins	11,65 ± 0,08	8,95 ± 0,53	4,50 ± 0,36
Intestino grosso	1,09 ± 0,08	0,81 ± 0,04	1,09 ± 0,20
Intestino delgado	2,13 ± 0,04	0,80 ± 0,01	0,90 ± 0,30
Músculo	0,11 ± 0,01	0,04 ± 0,04	0,03 ± 0,02
Osso	0,46 ± 0,07	0,09 ± 0,03	0,25 ± 0,05
Cérebro	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01

TABELA 12 - Biodistribuição da SP- ^{177}Lu radiomarcada na ausência de metionina em camundongos *Nude* implantados com tumor U-87 MG 1, 4 e 24 horas após a administração intravenosa, em % AI/órgão (n=3).

Órgãos	% AI / órgão		
	1 hora	4 horas	24 horas
Sangue	0,16 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,04 ± 0,01
Tumor	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,05 ± 0,01
Coração	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Pulmões	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Pâncreas	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00
Baço	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Estômago	0,12 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Fígado	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,19 ± 0,06
Rins	3,60 ± 0,11	3,97 ± 0,08	2,33 ± 0,25
Intestino grosso	1,30 ± 0,02	0,69 ± 0,11	1,03 ± 0,07
Intestino delgado	1,64 ± 0,01	2,07 ± 0,05	2,00 ± 0,38
Músculo	0,79 ± 0,04	0,04 ± 0,03	0,34 ± 0,19
Ossos	0,97 ± 0,02	0,56 ± 0,15	0,39 ± 0,04
Cérebro	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01

Em todos os estudos de biodistribuição observou-se a baixa captação cerebral, demonstrando que a SP não ultrapassa a barreira hematoencefálica e, por isso, para tratamento de gliomas, deve ser injetada localmente. Houve também baixa captação no fígado e osso, indicando o baixo nível de impureza do composto, uma vez que o ^{177}Lu livre na forma coloidal acumula no fígado, e na forma catiônica acumula no osso (Nevares et al., 2010). Alta concentração de atividade foi observada nos rins em todos os tempos estudados, indicando que a excreção da SP radiomarcada se dá primariamente por via renal. A captação do radiofármaco nos intestinos e estômago está provavelmente relacionada com a ligação a receptores específicos, presentes principalmente no trato gastrointestinal (Ehlers et al., 2000; Rodrigues et al., 2005).

Na TAB. 13 apresentam-se os resultados do estudo comparativo das biodistribuições da SP- ^{177}Lu -DOTA, radiomarcada com e sem metionina, em camundongos *Nude* implantados com tumor de glioblastoma humano (células U-87 MG) 1 hora após a administração intravenosa. Observou-se aumento significativo da radioatividade concentrada no tumor ($p= 0,001$), sangue ($p= 0,003$) e intestino delgado ($p= 0,01$) quando a SP- ^{177}Lu -DOTA injetada foi radiomarcada na presença de metionina, quando comparado à radiomarcada na ausência de metionina. Esses resultados sugerem o quanto a possível oxidação da metionina pode interferir na ligação de um radiofármaco aos seus receptores *in vivo*.

TABELA 13 - Biodistribuição da SP- ^{177}Lu -DOTA radiomarcada na ausência e presença de metionina em camundongos *Nude* implantados com células de glioblastoma humano U-87 MG, 1 hora após administração intravenosa (n=3).

Peptídeo	SP- ^{177}Lu -DOTA	
	Com metionina	Sem metionina
Unidade de medida	% AI/g	% AI/g
Sangue	1,53 ± 0,10	0,15 ± 0,01
Tumor	1,66 ± 0,06	0,37 ± 0,02
Coração	0,68 ± 0,12	0,10 ± 0,09
Pulmões	1,55 ± 0,20	1,71 ± 0,69
Pâncreas	0,58 ± 0,29	0,57 ± 0,08
Baço	0,85 ± 0,06	0,32 ± 0,01
Estômago	2,70 ± 0,64	0,56 ± 0,06
Fígado	0,88 ± 0,06	0,23 ± 0,01
Rins	11,68 ± 1,41	11,65 ± 0,08
Intestino grosso	2,45 ± 0,35	1,09 ± 0,08
Intestino delgado	5,28 ± 0,45	2,13 ± 0,04
Músculo	0,54 ± 0,17	0,11 ± 0,01
Ossos	0,95 ± 0,09	0,46 ± 0,07
Cérebro	0,09 ± 0,01	0,02 ± 0,01

Deve-se considerar, entretanto, que nos estudos realizados *in vitro*, não observou-se diferença significativa na ligação à célula tumoral da mesma linhagem (U-87 MG) quando analisou-se, de forma comparativa, a ligação do peptídeo marcado na presença e na ausência de metionina (FIG. 12).

A TAB. 14 apresenta de forma comparativa as razões tumor:órgão, considerando os resultados dos estudos de biodistribuição uma hora após administração intravenosa (% AI/g de órgão ou mL de sangue) em camundongos *Nude* implantados com células U-87 MG de glioblastoma humano.

TABELA 14 – Comparativo entre as razões tumor:órgão e sangue da biodistribuição da SP-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada na ausência e presença de metionina em camundongos *Nude* implantados com células de glioblastoma humano U-87 MG, 1 hora após administração intravenosa (n=3).

Razões	SP-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	
	Com metionina	Sem metionina
Tumor:sangue	1,09	2,46
Tumor:rins	0,14	0,03
Tumor:intestino grosso	0,68	0,34
Tumor:intestino delgado	0,31	0,17
Tumor:pâncreas	2,86	0,64
Tumor:músculo	3,07	3,36

Foram observadas diferenças significativas entre as relações tumor:sangue ($p=0,01$), tumor:rins ($p=0,01$), tumor:intestino grosso ($p=0,04$) e tumor:intestino delgado ($p=0,02$). Entretanto as razões tumor:pâncreas ($p=0,07$) e tumor:músculo ($p=0,67$) não foram observadas diferenças significativas. Apesar da captação no tumor ter sido maior para o composto marcado na presença de metionina, a razão tumor:sangue não foi correspondente, ou seja, foi menor que a relação para o peptídeo marcado sem metionina, indicando que o aumento na captação observado nos estudos de biodistribuição se deve não à maior ligação ao tumor, mas à maior concentração sanguínea do radiofármaco, que aumentou a captação tumoral. O clareamento sanguíneo do composto marcado sem metionina foi muito mais rápido, resultando numa melhor relação tumor:sangue para o tempo de uma hora analisado.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a necessidade de continuidade dos estudos aprofundando-se a avaliação da interferência da oxidação dos resíduos de

metionina na interação com diferentes modelos tumorais, em ensaios *in vitro* e *in vivo*, com simulação de administração local do produto. Também é considerado a possibilidade de síntese de novos derivados de SP, modificados em seu resíduo de Met, de modo a avaliar o resultado da alteração na marcação e propriedades biológicas do peptídeo radiomarcado.

A marcação da SP-DOTA com outros elementos radioativos como ^{90}Y (emissor β^-) e ^{213}Bi (emissor α) representariam alternativas terapêuticas também interessantes e merecem estudos futuros.

6 CONCLUSÕES

6.1 Radiomarcção da Substância P com lutécio-177

A Substância P foi radiomarcada com lutécio-177 com alta pureza radioquímica (>95%) e alta atividade específica a partir do estudo de otimização dos parâmetros de marcação.

Em condições otimizadas, a Substância P foi marcada com sucesso com alta atividade de ^{177}Lu obtendo-se um produto com alta pureza radioquímica e alta atividade específica. A reação de radiomarcção promoveu oxidação do resíduo de metionina, provavelmente devido à alta temperatura, pH ácido e efeito da radiólise. Essa oxidação pode ser evitada com a adição de metionina no meio da marcação. Um protocolo de marcação incluindo Met foi desenvolvido.

6.2 Estabilidade da SP-DOTA- ^{177}Lu

SP-DOTA- ^{177}Lu manteve-se estável sob refrigeração, a 2 - 8 °C, por 48 horas (AE= 25 MBq/nmol) e em soro humano a 37 °C por 4 horas. Estes resultados indicam que SP-DOTA- ^{177}Lu pode ser uma ferramenta útil para aplicação clínica na terapia de tumores considerando-se sua facilidade de preparação e alta estabilidade, necessária para viabilizar o transporte do produto aos centros médicos.

6.3 Estudo do efeito da oxidação da metionina sobre a ligação às células tumorais *in vitro*.

Os estudos *in vitro* com células M059J demonstraram ligação da SP-DOTA- ^{177}Lu aos receptores nas células tumorais e essa ligação mostrou-se reduzida significativamente quando o peptídeo apresentou-se em sua forma oxidada. No entanto, nos estudos *in vitro* com células U-87 MG, não se observou diferença significativa de ligação às células entre o peptídeo na forma oxidada e não oxidada.

Os estudos de ligação às células tumorais deverão ser intensificados de modo a elucidar se as diferenças são atribuídas às diferenças histológicas ou expressão de receptores específicos.

6.4 Estudos de biodistribuição

Nos estudos *in vivo* em camundongos *Nude* com glioma os resultados mostraram uma cinética de biodistribuição favorável do composto com provável ligação aos receptores tumorais indicando o potencial do radiofármaco para aplicação de tumores cerebrais.

SP-DOTA-¹⁷⁷Lu não ultrapassa a barreira hematoencefálica, por isso faz-se necessária a administração local do radiofármaco para tratamento de tumores cerebrais primários.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALIAGA, E.; MIRANDA, J.; BENITES, M.; RAMOS, B. Producción de ^{177}Lu de alta actividad específica a partir de ^{176}Yb : Estudio preliminar. *Informe Científico Tecnológico 2008*, p. 59 – 62, IPEN- Instituto Peruano de Energia nuclear, Lima, impresso em 2010.

BENNETT, V. J.; SIMMONS, M. A. Analysis of fluorescently labeled substance P analogs: binding, imaging and receptor activation. *BMC Chemical Biology*, v. 1, n. 1, 2001.

BREEMAN, W. A. P.; VANHAGEN, M. P.; VISSER-WISSELAAR, H. A.; VAN DER PLUIJM, M. E.; KOPER, J. W.; SETYONO-HAN, B.; BAKKER, W. H.; KWEKKEBOOM, D. J.; HAZENBERG, M. P.; LAMBERTS, S. W. J.; VISSER, T. J.; KRENNING, E. P. In vitro and vivo studies of substance P receptor expression in rats with the new analog [indium – 111 –DTPA- Arg¹] Substance P. *J. Nucl. Méd*, v. 37, n. 1, p. 108-117, 1996.

BREEMAN, W. A. P.; JONG, M. DE.; VISSER, T. J.; ERION, J. L.; KRENNING, E. P. Optimising conditions for radiolabelling of DOTA-peptides with ^{90}Y , ^{111}In and ^{177}Lu at high specific activities. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 30, n. 6, p. 917-920, 2003.

CHEN, J.; LINDER, K. E.; CAGNOLINI, A.; METCALFE, E.; RAJU, N.; TWEEDLE, M. F.; SWENSON, R. E. Synthesis, stabilization and formulation of [^{177}Lu]Lu-AMBA, a systemic radiotherapeutic agent for gastrin releasing peptide receptor positive tumors. *Appl Rad Isot*, v. 66, p. 497-505, 2008.

CORDIER, D.; FORRER, F.; BRUCHERTSEIFER, F.; MORGENSTERN, A.; APOSTOLIDIS, C.; GOOD, S.; MULLER-BRAND, J.; MÄCKE, H.; REUBI, J. C.; MERLO, A. Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with ^{213}Bi -DOTA-[Thi⁸,Met (O₂)¹¹]-substance P: a pilot trial. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 37, p. 1335-1344, 2010.

CRESCO, F. I. Z.; SANTAMARIA, A. R. Radiofármacos em neuromedicina. In: Verdera, E. S; Castiglia, S. G. Avances em radiofarmacia. Comitê de radiofarmacia. *Alasbimn*, p. 41-73, 2009.

CRUDO, J. L. Lutecio-177, um radionucléido apropriado para radioimunoterapia y terapia radionucleídica de receptores peptídicos. In: Avances em radiofarmacia. Comitê de radiofarmacia. *Alasbimn*, p. 5-6, 2009.

DE ARAÚJO, E. B.; CALDEIRA FILHO, J. S.; NAGAMATI, L. T.; MURAMOTO, E.; COLTURATO, M. T.; COUTO, R. M.; PUJATTI, P. B.; MENGATTI, J.; SILVA, C. P. G. A comparative study of ^{131}I and ^{177}Lu labeled somatostatin analogues for therapy of neuroendocrine tumours. *Appl Rad Isot*, n. 67, p. 227-233, 2009.

EHLERS, R. A.; KIM, S.; ZHANG, Y.; ETHRIDGE, R. T.; MURRILO, C.; HELLMICH, M. R.; EVANS, D. B.; TOWNSEND JUNIOR, C. M.; EVERS, M. Gut peptide receptor expression in human pancreatic cancers. *Annals of surgery*, v. 231, n.6, p. 838-848, 2000.

ELGAZZAR, A. H. The pathophysiologic basis of Nuclear Medicine. *Springer*, 2006.

ESTRUTURA DA SUBSTÂNCIA P. Disponível em : <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=36511>>. Acesso em 10 jan, 2011.

GOTO, T; TANAKA, T. Tachykinins and tachykinin receptors in bone. *Microsc. Res. Tech.*, v. 58, n. 2, p. 91-97, 2002.

HEIKKILÄ, J. E.; VÄHÄ-KOSKELA, M. J. V.; RUOTSALAINEN, J. J.; MATIKAINEN, M. W.; STANFORD, M. M.; MCCART, J. ANDREA; BELL, J.C.; HINKKANEN, A.E. Intravenously Administered Alphavirus Vector VA7 Eradicates orthotopic human Glioma Xenografts in nude mice. *PLoS ONE*, v. 5, n. 1, 2010.

HENNING, I. M.; LAISSUE, J. A.; HORISBERGER, U.; REUBI, J. C. Substance-P receptors in human primary neoplasms: Tumoral and vascular localization. *Int J Cancer*, v. 61, n. 6, p. 786-792, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2010 Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: < www1.inca.gov.br/estimativa/2010>. Acesso em 03 jan. 2011.

JIMÉNEZ, Y. V. Dosimetria interna aplicada a fármacos marcados com ¹⁷⁷Lu. 2007. Dissertação (mestrado). Instituto Balseiro, Cuyo.

KNEIFEL, S.; BERNHARDT, P.; UUSIJÄRVI, H.; GOOD, S.; PLASSWILM, L.; BUITRAGO-TÉLLEZ, C.; MÜLLER-BRAND, J.; MÄCKE, H.; MERLO, A. Individual voxelwise dosimetry of targeted ⁹⁰Y-labelled substance P radiotherapy for malignant gliomas. *Eur J Nucl Méd Mol Imaging*, 2007.

KNEIFEL, S.; CORDIER, D.; GOOD, S.; IONESCU, M.C.S.; GHAFARI, A.; HOFER, S.; KRETZSCHMAR, M.; TOLNAY, M.; APOSTOLIDIS, C.; WASER, B.; ARNOLD, M.; MUELLER-BRAND, J.; MAECKE, H. R.; REUBI, J. C.; MERLO, A.. Local targeting of malignant gliomas by the diffusible peptidic vector 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid-Substance P. *Clinical Cancer Research*, v. 12, n. 12, p. 3843-3850, 2006.

LAKS, D. R.; VISNYEI, K.; KORNBIUM, H. I. Brain Tumor Stem Cells as Therapeutic Targets in models of Glioma. *Yonsei Med J*, v. 51, n. 5, p. 633-640, 2010.

LAPERRIERE, N.; ZURAW, L.; CAIRNCROSS, G.; THE CANCER CARE ONTARIO PRACTICE GUIDELINES INITIATIVE NEURO-ONCOLOGY DISEASE SITE GROUP. Radiotherapy for newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. *Radiotherapy and Oncology*, v. 64, p. 259-273, 2002.

LIU, S.; EDWARDS, D. S. Stabilization of ⁹⁰Y-labeled DOTA-biomolecule conjugates using gentisic acid and ascorbic acid. *Bioconjugate Chem*, v. 12, n. 4, p. 554 – 558, 2001.

MARQUES, F. L. N.; OKAMOTO, M. R. Y.; BUCHPIGUEL, C. A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. *Radiol Bras*, v. 34, n. 4, p. 233 – 239, 2001.

MICHAILOWSKY, C.; NIURA, F. K.; VALLE, A. C. DO.; SONOHARA, S.; MENEGUIN, T D.; TSANACLIS. Tumores experimentais do sistema nervoso central – Padronização de modelo em roedores utilizando a linhagem 9L. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 61, n. 2-A, p. 234-240, 2003.

MOLL, S.; NICKEKEIT, V.; MUELLER-BRAND, J.; BRUNNER, F. P.; MAECKE, H. R.; MIHATSCH, M. J. A new cause of renal thrombotic microangiopathy: yttrium 90 – DOTATOC internal radiotherapy. *Am J Kidney Dis*, v. 37, n. 4, p. 847-851, 2001.

MUÑOZ, M.; COVEÑAS, R. Neurokinin-1 receptor: a new promising target in the treatment of cancer. *Discov med*, v. 10, n. 53, p. 305-313, 2010.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e sua aplicações. *RBCF*, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. *Brain Tumor*. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/brain>>. Acesso em: 04 jan. 2011.

NEVARES, N.; LOPEZ BULARTE, A. C.; PUERTAYEPES, N.; ZAPATA, M.; PÉREZ, J.; ROJO, A. M.; CRUDO, J. L. Ensayos in-vitro Del péptido marcado ¹⁷⁷Lu-DOTA-Substancia P y evaluación de los caçulos dosimétricos em La etapa preclínica. *Alasbinn Journal Year 12*, n. 49, 2010.

REUBI, J. C. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev*, v. 24, n. 4, p. 389-427, 2003.

ROBBINS, S. L. *Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1969.

RODRIGUES, S.S; FONSECA, C.C.; NEVES, M.T.D. Células endócrinas do sistema gastro pancreático. Conceitos, distribuição, secreções, ação e controle. *Arq.ciên. vet.zool. UNIPAR*, v.8,n. 2, p.171-180, 2005.

SILVA, G. P.; LOPES, P. R. C.; OSSO, J. A. Estudo da viabilidade da produção do ¹⁷⁷Lu no reator nuclear do IPEN. *International Nuclear Atlantic Conference - INAC 2005*.

TAZARCZYK, M.; MATYJA, E.; LIPKOWSKI, A. Substance P and its receptors – a potential target for novel medicines in malignant brain tumour therapies (mini-review). *Folia Neurophatol*, v.45, n. 3, p. 99-107, 2007.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H.A. *Medicina Nuclear*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,2003.

VAN HAGEN, P. M., BREEMAN, W. A. P.; REUBI, J. C.; POSTEMA, P. T. E.; VAN DEN ANKER-LUGTENBURG, P. J.; KWEKKEBOOM, D. J., LAISSUE, J.; WASER, B.; LAMBERTS, S. W. J.; VISSER, T. J.; KRENNING, E. P. Visualization of the thymus

by substance P receptor scintigraphy in man. *Eur J Nucl Méd*, n. 23, n. 11, p.1508-1513, 1996.

ZALUTSKY, M. R. Current Status of Therapy of Solid Tumors: Brain Tumor Therapy. *J. Nucl. Med.*, v. 46, n. 1, p. 151S-156S, 2005