



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

## **ESTUDO DA MARCAÇÃO COM LUTÉCIO-177 DE DERIVADOS DA BOMBESINA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

**RENATA MARTINUSSI COUTO**

**Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau  
de Doutor em Ciências na Área de  
Tecnologia Nuclear – Aplicações**

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

**SÃO PAULO  
2014**

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

**ESTUDO DA MARCAÇÃO COM LUTÉCIO-177 DE DERIVADOS DA  
BOMBESINA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS**

**RENATA MARTINUSSI COUTO**

**Tese apresentada como parte dos  
requisitos para obtenção do Grau  
de Doutor em Ciências na Área de  
Tecnologia Nuclear – Aplicações**

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

Versão Corrigida  
Versão Original se encontra no IPEN

**SÃO PAULO  
2014**

*Aos meus pais Gilberto e Neusa,  
à minha irmã Karina e a minha filha Raphaela  
pelo amor, incentivo e confiança em todas as etapas  
da minha vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, fonte inesgotável de força e sabedoria.

À Dra. Elaine Bortoleti de Araújo por mais esta oportunidade cedida, pelos ensinamentos, apoio, confiança e pela amizade construída ao longo de todos estes anos.

À minha família pelo amor e carinho dedicado.

À Dra. Maria Tereza Colturato pelo apoio e amizade.

Aos meus amigos de laboratório e pessoais que contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Aos amigos da gerência de produção de radiofármacos do Centro de Radiofarmácia.

Aos amigos da gerência de controle de qualidade de radiofármacos do Centro de Radiofarmácia.

Aos amigos do Centro de Biotecnologia, principalmente a Dra. Miriam Suzuki pela ajuda prestada no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares e a todos da comissão de pós-graduação.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pelo auxílio financeiro necessário à realização desta tese.

A todos que contribuíram direta e indiretamente neste trabalho.

# ESTUDO DA MARCAÇÃO COM LUTÉCIO-177 DE DERIVADOS DA BOMBESINA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

RENATA MARTINUSSI COUTO

## RESUMO

Têm sido estudadas novas modalidades para o diagnóstico e tratamento de câncer de próstata avançado baseado em peptídeos. Receptores para o peptídeo liberador de gastrina (GRPr) são superexpressos em vários tipos de células cancerígenas, incluindo câncer de mama e próstata. A bombesina é um análogo do peptídeo GRP de mamíferos que se liga com alta especificidade e afinidade a GRPr. Várias pesquisas têm sido realizadas para desenvolver e radiomarcado um análogo da bombesina com lutécio-177 com interesse para terapia de tumores pequenos ou metástases, devido às características físicas e viabilidade comercial do radionuclídeo. O objetivo deste trabalho foi estudar o processo de marcação e controle de qualidade de derivados da bombesina, usando como agente quelante DTPA e DOTA e espaçador aminoacídico Gly<sub>5</sub>, e realizar estudos de estabilidade e de biodistribuição de modo a avaliar o potencial de aplicação em estudos clínicos. Os estudos demonstraram que os análogos da bombesina estudados podem ser marcados com <sup>177</sup>Lu com alto rendimento de marcação e alta atividade específica. Os estudos de estabilidade *in vitro* sugerem que os derivados DOTA-conjugados apresentam maior estabilidade que o DTPA-conjugados quando armazenados sob refrigeração e em soro humano. O coeficiente de partição do PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu indicou maior lipofilicidade quando comparado com o derivado

PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu , porém sem influência sobre o clareamento sanguíneo ou captação hepática do composto. Os compostos DOTA-conjugados apresentam menor ligação às proteínas plasmáticas, corroborado pelo rápido clareamento sanguíneo observado nos estudos *in vivo*. Os estudos de biodistribuição com os compostos PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu e PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu mostraram o rápido clareamento sanguíneo dos compostos e excreção renal, e baixa captação óssea, indicando estabilidade *in vivo* dos derivados <sup>177</sup>Lu-DOTA. O composto PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu apresentou maior captação no pâncreas e intestinos, órgãos com maior porcentagem de receptores para bombesina. Entretanto, a ligação dos compostos às células tumorais (PC-3) *in vitro* foi similar para ambos os compostos.

# **RADIOLABELING STUDY OF BOMBESIN ANALOGUES WITH LUTETIUM-177 AND EVALUATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES**

**RENATA MARTINUSSI COUTO**

## **ABSTRACT**

New therapy modalities for the treatment of advanced prostate cancer based on peptide analogues are reviewed. It has been shown that gastrin releasing peptide receptors (GRPr) are overexpressed in various types of cancer cells including prostate and breast cancer. Bombesin is an analogue of the mammalian GRP that binds with high specificity and affinity to GRPr. Significant research efforts have been devoted to the design bombesin analogues labeled with  $^{177}\text{Lu}$  considering the excellent radiophysical properties and commercial availability of the radionuclide. The aim of this work was to study the labeling and the quality control of a bombesin analogues with Lu-177 using DOTA and DTPA as chelate group and an aminoacidic spacers Gly5 and study the stability and biodistribution properties in order to evaluate the potencial for clinical application. The studies showed that the bombesin analogs were labeled with  $^{177}\text{Lu}$  with high radiochemical yield and high specific activity. *In vitro* stability studies showed that DOTA-conjugated peptides were more stable than DTPA-conjugated, when stored under refrigeration or in human serum. The partition coefficient values showed that  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PG<sub>5</sub>N was more lipophilic when compared with  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PG<sub>5</sub>M but without influence on blood clearance and liver uptake. The DOTA-conjugated

peptides presented low binding to plasma proteins, that contributes for fast blood clearance *in vivo*. Biodistribution studies of  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PG<sub>5</sub>M and  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PG<sub>5</sub>N, showed significant renal uptake, as a result of the urinary excretion and low bone uptake, that indicated the *in vivo* stability of the  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-complexes. The compound  $^{177}\text{Lu}$ -DOTA-PG<sub>5</sub>M showed higher uptake on pancreas and intestines and these organs presents high density of BBN receptors. But the *in vitro* binding assays (PC-3 tumors cells) showed similar results for both compounds.



## Sumário

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1 Introdução à Medicina Nuclear</b> .....	<b>17</b>
<b>1.2 Radiofármacos para diagnóstico e terapia</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3 Radioisótopos para Terapia</b> .....	<b>24</b>
<b>1.4 Lutécio-177</b> .....	<b>27</b>
<b>1.5 Molécula carreadora</b> .....	<b>29</b>
<b>1.5.1 Partículas</b> .....	<b>29</b>
<b>1.5.2 Anticorpos</b> .....	<b>30</b>
<b>1.5.3 Peptídeos</b> .....	<b>31</b>
<b>1.6 Câncer de Próstata</b> .....	<b>33</b>
<b>1.7 Radiofármacos baseados em peptídeos</b> .....	<b>38</b>
<b>1.8 Peptídeos análogos da bombesina</b> .....	<b>39</b>
<b>2.JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>57</b>
<b>3. OBJETIVO</b> .....	<b>60</b>
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>61</b>
<b>4.1 Materiais</b> .....	<b>61</b>
<b>4.1.1 Reagentes</b> .....	<b>61</b>
<b>4.1.2 Equipamentos</b> .....	<b>62</b>
<b>4.1.3 Animais</b> .....	<b>62</b>
<b>4.1.4 Outros</b> .....	<b>63</b>
<b>4.2 Métodos</b> .....	<b>63</b>
<b>4.2.1 Obtenção dos peptídeos análogos de bombesina</b> .....	<b>63</b>

4.2.2 Estudo da marcação dos derivados de bombesina com <sup>177</sup> Lu .....	64
4.2.2.1 Radiomarcção dos derivados de bombesina .....	64
4.2.2.2 Purificação dos peptídeos radiomarcados .....	65
4.2.3 Ensaio de Qualidade e Estabilidade .....	66
4.2.3.1 Ensaio de pureza radioquímica.....	66
4.2.3.2 Estabilidade dos derivados de bombesina radiomarcados armazenados a 2 – 8° C .....	69
4.2.3.3 Estabilidade dos derivados de bombesina radiomarcados em soro humano e ligação às proteínas séricas <i>in vitro</i> .....	70
4.2.4 Determinação do coeficiente de partição (log P) experimental dos peptídeos radiomarcados.....	71
4.2.5 Cultivo de células PC-3.....	71
4.2.6 Ensaio de ligação às células tumorais .....	72
4.2.7 Ensaio <i>in vivo</i> .....	73
4.2.8 Análise estatística .....	74
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	75
5.1 Radiomarcção do derivado de bombesina acoplado ao DTPA (PG <sub>5</sub> M-DTPA).....	75
5.1.1 Ensaio de pureza radioquímica.....	75
5.1.2 Estudo da marcação de PG <sub>5</sub> M-DTPA com <sup>177</sup> Lu .....	79
5.1.3 Análise da Estabilidade do PG <sub>5</sub> M-DTPA- <sup>177</sup> Lu .....	88
5.2 Radiomarcção dos derivados de bombesina conjugados ao DOTA .....	92
5.2.1 Determinação do sistema de cromatografia em camada delgada (CCD) .....	92
5.2.2 Estudo de marcação .....	94

<b>5.2.2 Estudo da marcação dos derivados de BBN-DOTA-conjugados com <sup>177</sup>Lu.....</b>	<b>97</b>
<b>5.2.3 Estudo de estabilidade dos derivados de bombesina conjugados ao DOTA.....</b>	<b>100</b>
<b>5.3 Determinação do coeficiente de partição experimental dos derivados de bombesina radiomarcados (log P) .....</b>	<b>107</b>
<b>5.4 Resultados de ligação às células tumorais (“Binding”) .....</b>	<b>108</b>
<b>5.5 Estudos de biodistribuição em animais sadios .....</b>	<b>109</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>116</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>118</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físicas de radioisótopos emissores $\beta^-$ , utilizados na terapia de tumores.....	26
Tabela 2 - Sistemas cromatográficos estudados para determinação do perfil cromatográfico do $^{177}\text{LuCl}_3$ e peptídeos radiomarcados.....	68
Tabela 3 - Estudo da variação da temperatura de reação na marcação utilizando-se 20 $\mu\text{g}$ do -PG <sub>5</sub> M-BBN-DTPA com 55,5 MBq (1,5 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$ , 30 minutos e 350 rpm.....	80
Tabela 4 - Estudo da variação da massa de PG <sub>5</sub> M-DTPA utilizada no procedimento de marcação, à temperatura de 90° C, 30 minutos sob agitação constante de 350 rpm e 55,5 MBq de $^{177}\text{Lu}$ (1,5 mCi).....	81
Tabela 5 - Estudo de variação do tempo e atividade de reação na radiomarcação do PG <sub>5</sub> M-DTPA com $^{177}\text{LuCl}_3$ , utilizando-se 20 $\mu\text{g}$ de peptídeo à 90° C.....	83
Tabela 6 - Estudo da variação da atividade de marcação do PG <sub>5</sub> M-DTPA com $^{177}\text{LuCl}_3$ , mantendo como padrão 20 $\mu\text{g}$ de peptídeo, 90° C, 30 minutos sob agitação de 350 rpm.....	85
Tabela 7 - Estudo da variação da atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ na radiomarcação do PG <sub>5</sub> M-DOTA, mantendo como padrão 20 $\mu\text{g}$ de peptídeo, reagindo por 30 minutos sob agitação de 350 rpm à temperatura de 90° C.....	98
Tabela 8 - Estudo da variação da atividade de marcação do PG <sub>5</sub> N-DOTA com $^{177}\text{LuCl}_3$ , mantendo como padrão 20 $\mu\text{g}$ de peptídeo, 90° C, 30 minutos sob agitação de 350rpm.....	99
Tabela 9 - Coeficiente de partição (log P) óleo:água (n-octanol:PBS) experimental dos derivados da bombesina acoplados ao DOTA (n=3). .....	108
Tabela 10 - Estudo de biodistribuição do derivado de bombesina PG <sub>5</sub> M-DOTA em camundongos Swiss sadios, fêmeas, após a administração via endovenosa caudal de (5,55 MBq – 150 $\mu\text{Ci}$ ) (n=4). Dados apresentados como media $\pm$ desvio padrão. ....	110

Tabela 11 - Estudo de biodistribuição do derivado de bombesina PG<sub>5</sub>N-DOTA em camundongos *Swiss* sadios, fêmeas, após a administração via endovenosa caudal de (5,55 MBq – 150 µCi) (n=4). Dados apresentados como media ± desvio padrão.

..... 111

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático do sistema genital masculino (Sistema reprodutor masculino, 2008). Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2011.....	33
Figura 2 - Estrutura da bombesina (Fonte: Internet, 2009) .....	40
Figura 3 - Sequência dos grupamentos C-terminal da bombesina, do peptídeo liberador de gastrina (GRP) e da neuromedina B (NMB) (Patel e cols., 2006). .....	40
Figura 4 - Sequência dos análogos da bombesina estudados neste trabalho. ....	58
Figura 5 - Perfil cromatográfico do $^{177}\text{LuCl}_3$ em papel Whatmann 3MM nos diferentes solventes estudados.....	76
Figura 6 - Perfil cromatográfico do $^{177}\text{LuCl}_3$ em papel Whatmann 1 MM nos diferentes solventes estudados.....	76
Figura 7 - Perfil cromatográfico do $^{177}\text{LuCl}_3$ em fitas de TLC-SG nos diferentes solventes estudados. ....	77
Figura 8 - Perfil cromatográfico do $\text{PG}_5\text{M-DTPA-}^{177}\text{Lu}$ sendo em (A) – Fitas TLC-SG e (B) cromatografia em papel Whatmann 1MM e 3MM utilizando-se diferentes solventes.....	77
Figura 9 - Perfil cromatográfico do $^{177}\text{LuCl}_3$ utilizando fita TLC-SG como suporte e solução EDTA 0,2 M pH 5,0 como solvente. ....	78
Figura 10 - Perfil cromatográfico da $\text{PG}_5\text{M-DTPA-}^{177}\text{Lu}$ em CCD, utilizando fita de TLC-SG como suporte e solução EDTA 0,2M pH 5,0 como solvente. ....	79
Figura 11 - Perfil de CLAE do $^{177}\text{LuCl}_3$ em uma coluna de fase reversa $\text{C}_{18}$ , com um gradiente linear de 10 a 90 % (v/v) de TFA: $\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1000 v/v) em TFA: $\text{H}_2\text{O}$ (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos. ....	87
Figura 12 - Perfil de CLAE do derivado de bombesina $\text{PG}_5\text{M-DTPA-}^{177}\text{Lu}$ em uma coluna de fase reversa $\text{C}_{18}$ , com um gradiente linear de 10 a 90 % (v/v) de TFA: $\text{CH}_3\text{CN}$ (1:1000 v/v) em TFA: $\text{H}_2\text{O}$ (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos. ....	87

Figura 13 - Estudo em CCD da estabilidade do peptídeo PG <sub>5</sub> M-DTPA radiomarcado com <sup>177</sup> Lu com diferentes atividades específicas e armazenado à temperatura 2 - 8° C por até 5 dias, resultados expressos em porcentagem de pureza radioquímica. ....	88
Figura 14 - Resultados do estudo de estabilidade em soro humano (CCD) do derivado PG <sub>5</sub> M-DTPA- <sup>177</sup> Lu em diferentes tempos (n=4) expresso em porcentagem de pureza radioquímica.....	90
Figura 15 - Estudo da porcentagem de ligação do peptídeo radiomarcado PG <sub>5</sub> M-DTPA- <sup>177</sup> Lu às proteínas plasmáticas realizado em diferentes tempos (n=4).....	91
Figura 16 - Perfil cromatográfico (CCD) do <sup>177</sup> LuCl <sub>3</sub> utilizando TLC-SG como suporte e tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0. ....	93
Figura 17 - Perfil cromatográfico (CCD) do PG <sub>5</sub> M-DOTA- <sup>177</sup> Lu utilizando TLC-SG como suporte e tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0. ....	93
Figura 18 - Perfil cromatográfico (CCD) do PG <sub>5</sub> N-DOTA- <sup>177</sup> Lu utilizando TLC-SG como suporte e tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0. ....	94
Figura 19 - Perfil em CLAE do derivado de bombesina PG <sub>5</sub> M-DOTA radiomarcado com <sup>177</sup> LuCl <sub>3</sub> em uma coluna de fase reversa C <sub>18</sub> , com um gradiente linear de 10 a 90 % (v/v) de TFA:CH <sub>3</sub> CN (1:1000 v/v) em TFA:H <sub>2</sub> O (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL / minuto por 15 minutos. ....	95
Figura 20 - Perfil em CLAE do derivado de bombesina PG <sub>5</sub> N-DOTA radiomarcado com <sup>177</sup> LuCl <sub>3</sub> em uma coluna de fase reversa C <sub>18</sub> , com um gradiente linear de 10 a 90 % (v/v) de TFA:CH <sub>3</sub> CN (1:1000 v/v) em TFA:H <sub>2</sub> O (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos. ....	96
Figura 21 - Frações de purificação das misturas de duas diferentes marcações do peptídeo PG <sub>5</sub> M- <sup>177</sup> Lu eluídos em coluna Sep-Pak C <sub>18</sub> previamente condicionada....	97
Figura 22 - Estabilidade dos derivados de bombesina conjugados ao DOTA radiomarcados com lutécio-177 avaliada por CCD (TLC-SG) após armazenamento a	

2 - 8° C por diferentes tempos (n=3), resultados expressos em % de pureza radioquímica.....	101
Figura 23. Estabilidade dos derivados de bombesina DOTA-conjugados radiomarcados com lutécio -177 avaliada por CCD (TLC-SG) incubados em soro humano, a 37° C por diferentes tempos (PG <sub>5</sub> M-DOTA n=3 e PG <sub>5</sub> N-DOTA n=4), resultados expressos em porcentagem de pureza radioquímica. ....	102
Figura 24 - Porcentagem de ligação do análogo PG <sub>5</sub> M-DOTA- <sup>177</sup> Lu às proteínas plasmáticas nos tempos de 15 minutos, 1 e 4 horas. Dados apresentados como média ± desvio padrão (n=3).....	108
Figura 25 - Porcentagem de ligação do análogo PG <sub>5</sub> N-DOTA- <sup>177</sup> Lu às proteínas plasmáticas nos tempos de 15 minutos, 1, 4 e 24 horas. Dados apresentados como média ± desvio padrão (n=6).....	108
Figura 26 - Estudo de ligação total às células PC-3 (10 <sup>6</sup> células) dos análogos PG <sub>5</sub> M-DOTA- <sup>177</sup> Lu e do PG <sub>5</sub> N-DOTA- <sup>177</sup> Lu, (n=3). ....	109
Figura 27 - Biodistribuição dos derivados PG <sub>5</sub> M-DOTA- <sup>177</sup> Lu PG <sub>5</sub> N-DOTA- <sup>177</sup> Lu nos principais órgãos de interesse, em camundongos <i>Balb/c</i> sadios fêmeas após administração por via endovenosa caudal do peptídeo radiomarcado. ....	112



## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Introdução à Medicina Nuclear**

A Organização Mundial da Saúde define a Medicina Nuclear como “a especialidade que se ocupa do diagnóstico, tratamento e investigação médica mediante o uso de radioisótopos como fontes radioativas abertas”. A Sociedade Brasileira de Biologia, Medicina Nuclear e Imagem Molecular a define como “a especialidade médica que emprega fontes não seladas de radionuclídeos com finalidade de diagnóstico e de terapia”.

De fato, as fontes radioativas abertas utilizadas em medicina nuclear são radiofármacos (RF), utilizados na aquisição de imagens para observar o estado fisiológico dos tecidos ou órgãos de forma não invasiva, obtidos através da marcação de moléculas participantes desses processos fisiológicos com isótopos radioativos.

A imagem da distribuição do radiofármaco é, sem dúvida, uma das aplicações mais importantes da radioatividade na Medicina Nuclear. A proposta desse método diagnóstico é administrar quantidades suficientes de radiofármacos e usar uma câmara de cintilação para obter imagens da distribuição desse marcador molecular nos tecidos ou órgão de interesse (Gambhir e cols., 2009).

O comportamento fisiológico e bioquímico do radiofármaco (para um determinado processo em estudo) é quase sempre idêntico ao da substância estável. Sendo administrados em quantidades muito pequenas, não alteram os processos fisiológicos e, conseqüentemente, permitem um estudo funcional sem

interferências na função. Foi Maisey, em 1978, quem escreveu que “a medicina nuclear está para a radiologia como a fisiologia está para a anatomia” (Maisey, 1978).

Habitualmente, as técnicas radiológicas dependem de alterações da estrutura e morfologia para detectar a presença de patologia. Por seu lado, as imagens fornecidas pelos métodos de medicina nuclear (cintilografias) deverão ser interpretadas como imagens funcionais (ou morfo-funcionais). Em situações de doença as alterações funcionais precedem as alterações morfológicas. Assim sendo, as imagens funcionais desempenham um papel importante na detecção mais precoce da doença.

Como recurso diagnóstico, a Medicina Nuclear é um meio seguro e eficiente, em geral indolor e não invasivo, para se obter informações que, de outra maneira, seriam impossíveis de conseguir. É um conjunto de procedimentos de alta sensibilidade para encontrar anormalidades na estrutura e na função dos órgãos estudados, com a virtude de identificar, precocemente, numerosas alterações orgânicas e funcionais em relação a outros métodos diagnósticos.

Cerca de três quartos de todos os procedimentos clínicos realizados mundialmente utilizam a modalidade SPECT (*Single Photon Emission Computer Tomography*) (Gambhir e cols., 2009).

Além de seu uso no diagnóstico, o método permite avaliar recidivas, acompanhar a evolução, a remissão ou a progressão de certas enfermidades (Gambhir e cols., 2009).

Os procedimentos utilizados em Medicina Nuclear têm a vantagem de substituir outros testes que submetem o paciente a maior risco iatrogênico e que

lhes causam maior desconforto. Também substituem outras formas de exames mais onerosos usados em diagnóstico.

A Medicina Nuclear é indispensável para diagnóstico e acompanhamento de enfermidades cardíacas, oncológicas, endócrinas, traumatológicas, renais, pulmonares, etc. Os radiofármacos são administrados geralmente por via endovenosa, aguardando-se a concentração no tecido alvo antes de adquirir as imagens (Sapienza, M. T e Buchpieguel, C.A, 2004). A inferência diagnóstica é obtida gravando-se a distribuição do material radioativo com aquisição de imagens bi ou tridimensionais em diferentes tempos. A farmacocinética dos traçadores e a captação seletiva pelos tecidos formam as bases da utilidade diagnóstica (Thrall, J.H e Ziessman, H. A, 2003).

Estão disponíveis técnicas com indicação para o estudo de praticamente todos os órgãos, aparelhos e sistemas do corpo humano.

Como recurso usado na terapia, a Medicina Nuclear também é um meio seguro e eficiente para tratar certas afecções benignas e malignas curáveis com irradiação. O tratamento com radiofármacos realizados pela Medicina Nuclear é um procedimento indolor e não invasivo que pode ser aplicado quando as condições do paciente não permitem cirurgias ou outra forma de tratamento, ou mesmo de forma complementar a outros tipos de tratamento.

As doses utilizadas e o fato de que a irradiação ocorre quase que exclusivamente nas células e tecidos alvos como resultado da ligação específica dos radiofármacos aos devidos alvos, têm a vantagem de irradiar pouco os pacientes minimizando a ocorrência de efeitos colaterais. A medicina nuclear tem também utilidade como paliativo contra a dor provocada por metástases ósseas, quando outros métodos forem ineficientes para aliviar o sofrimento dos pacientes.

## 1.2 Radiofármacos para diagnóstico e terapia

A Radiofarmácia existe desde a primeira administração de uma preparação radioativa em um organismo vivo, com o objetivo de verificar os efeitos e a trajetória metabólica. Este fato (1932) antecedeu à Segunda Guerra Mundial, quando os radioisótopos artificiais disponíveis eram produzidos através do bombardeamento de núcleos-alvo por partículas positivas aceleradas. Entretanto, foi o programa “Átomos para a Paz”, lançado pelo Governo americano, após 1945, visando ao aproveitamento da produção de radioisótopos oriundos do reator de urânio, que tornou possível ao mundo o uso dos radiofármacos (Welch & Redvandy, 2005).

Os radiofármacos são definidos pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) como preparações farmacêuticas com finalidade diagnóstica ou terapêutica que, quando prontas para o uso, contém um ou mais radionuclídeos. Compreendem também os componentes não-radioativos para a marcação e os radionuclídeos, incluindo os componentes extraídos dos geradores de radionuclídeos (Resolução RDC Nº 64, 2009, ANVISA).

Os radiofármacos podem ser representados por moléculas inorgânicas simples que contém um radioisótopo, como por exemplo a solução de iodeto de sódio ( $^{131}\text{I}$ ) -  $\text{Na}^{131}\text{I}$ , bem como por moléculas mais complexas radiomarcadas, como moléculas orgânicas, peptídeos e anticorpos monoclonais (Owunwanne e cols., 1995).

As características físico-químicas do radiofármaco determinam a sua farmacocinética, isto é, a fixação no órgão alvo, metabolização e eliminação do

organismo, enquanto que as características físicas determinam a aplicação do composto em diagnóstico ou terapia (Oliveira e cols., 2006).

No desenvolvimento de radiofármacos, vários fatores devem ser levados em consideração, tais como, a escolha e produção do elemento radioativo, a escolha e obtenção do substrato de marcação e o método a ser empregado na marcação. Além disso, devem ser considerados os aspectos de pureza de natureza química, física e biológica relativos ao controle de qualidade deste radiofármaco (Chandra, 1992).

Além destas características, deve-se levar em conta também a necessidade do radiofármaco de possuir alta atividade específica, ou seja, a radioatividade por unidade de massa do radiofármaco (Pujatti, 2012).

Analisando pela perspectiva do fármaco, as características ideais incluem biodistribuição adequada para atingir o tecido alvo, ausência de toxicidade e efeitos secundários. Os radiofármacos não devem sofrer dissociação *in vitro* nem *in vivo*, serem fáceis de radiomarcado e apresentarem disponibilidade a um custo razoável (Thrall & Ziessman, 2003).

Do ponto de vista do comportamento fisiológico, determinado por seu componente químico, os radiofármacos distribuem-se nos órgãos-alvo por diferentes mecanismos incluindo difusão passiva, difusão facilitada, transporte ativo, bloqueio capilar, localização compartimental, fagocitose, ligação antígeno-anticorpo, e ligação receptor-específica (Weatherman e cols., 2010).

Os radiofármacos de perfusão são transportados no sangue e atingem o órgão alvo na proporção do fluxo sanguíneo. Não possuem locais específicos de ligação e acredita-se que são distribuídos de acordo com o tamanho e a carga

do composto. Os radiofármacos de ligação específica são direcionados por moléculas biologicamente ativas, como anticorpos e peptídeos, que se ligam a receptores celulares ou são transportados para o interior de determinadas células (Oliveira e cols, 2006).

Radiofármacos marcados com diferentes radionuclídeos vêm sendo utilizados em aplicações diagnósticas e terapêuticas, sendo que cerca de 95% dos radiofármacos são utilizados com propósito de diagnóstico (Unak, 2000).

Nos últimos anos houve um aumento no interesse pela terapia radionuclídica, com a introdução de novos radiofármacos aplicados para destruir especificamente determinadas células ou impedir sua proliferação indesejável (Santos, 2001).

A terapia radionuclídica interna utiliza-se do princípio da deposição de radiação nos tecidos alvos-doentes, por meio de radiofármacos preservando os tecidos sadios (Santos, 2001).

Além da localização seletiva da radiação, a terapia radionuclídica interna tem a vantagem de poder determinar a dose de radiação no tecido alvo. Outra vantagem é a de que um grande número de radionuclídeos, com uma ampla variedade de tipos de emissão e energias, está disponível, proporcionando aplicações específicas e diversificando a possibilidade de produção (Ercan, 1999).

Os radiofármacos que se destinam ao diagnóstico clínico apresentam na sua composição um radioisótopo emissor de radiação gama ( $\gamma$ ) ou emissor de pósitrons ( $\beta^+$ ). Nesta situação, é desejável que o radioisótopo incorporado ao radiofármaco não emita partículas alfa ( $\alpha$ ) ou beta menos ( $\beta^-$ ), uma vez que estas apenas aumentam a dose de radiação absorvida pelo paciente e não influenciam

na captação das imagens (Garcia, 2006).

Para aplicação de radiofármacos em terapia, a meia-vida física é um parâmetro essencial na escolha de radioisótopos e são indicados aqueles que emitem partículas ionizantes (partículas alfa ( $\alpha$ ), beta menos ( $\beta^-$ ) ou elétrons Auger). A escolha do radioisótopo a ser utilizado é dependente do tamanho do tumor, da distribuição intratumoral e da farmacocinética do radiofármaco (Oliveira e cols., 2006).

A efetividade da terapia pode ser potencializada pelo local de introdução do radiofármaco (Ercan, 1999). Os radiofármacos constituídos por partículas beta ( $\beta$ ) podem ser administrados diretamente dentro da cavidade tumoral, como na terapia de tumores sólidos, ou introduzidos por meio de uma via arterial preferencial, como no caso da radioembolização utilizada na terapia de tumores hepáticos. Ainda, como exemplo de administração localizada de radiofármacos para terapia é importante citar a aplicação em radiosinovectomia, procedimento no qual o radiofármaco é administrado na cavidade articular para efeito de tratamento de patologias tais como a artrite reumatóide. A administração local de radiofármacos pretende confinar o efeito da radiação no local da aplicação, para preservar os tecidos sadios da exposição desnecessária à radiação (Ercan, 1999).

A partícula originada do decaimento radioativo pode apresentar alcance médio (partículas  $\beta^-$ ), ou curto (partículas  $\alpha$  ou elétrons Auger), diminuindo assim os danos aos tecidos sadios circunvizinhos ao tecido alvo. O tipo específico de decaimento vai depender da natureza e do estágio da doença. Desta forma, a toxicidade da terapia radionuclídica interna é muito menor quando comparado à radioterapia externa. A emissão de raios gama ( $\gamma$ ) pode ou não

acompanhar o processo de emissão de partículas carregadas e apresenta uma pequena contribuição efetiva no tratamento terapêutico, porém, também contribui para um aumento na irradiação dos tecidos adjacentes. Por outro lado, a emissão  $\gamma$  facilita a localização e acompanhamento da radiação no local de interesse, por meio de aquisição de imagens cintilográficas em Medicina Nuclear (Saha, 2003).

As informações fornecidas podem auxiliar no diagnóstico clínico em várias situações nas quais os métodos de imagem anatômicos são limitados, como por exemplo, infiltração de pequenos linfonodos ou pesquisa de tumor residual após tratamento. As aplicações diagnósticas da medicina nuclear em oncologia incluem a detecção e caracterização de lesão primária, o estadiamento e o controle da resposta terapêutica (Sapienza e cols., 2004).

### **1.3 Radioisótopos para Terapia**

Segundo Srivasta e Dadachova (2001), a escolha do radioisótopo para fins terapêuticos deve ser avaliada com base nos seguintes fatores:

- Meia-vida física, considerada ótima entre 1 e 14 dias;
- Tipos de emissão ( $\alpha$ ,  $\beta$  e elétron Auger), que engloba o modo de desintegração do radioisótopo, bem como a energia e a intensidade da radiação;
- Atividade específica;
- Química favorável à síntese do radiofármaco, como por exemplo o radioiodo que pode ser introduzido facilmente por meio de substituição eletrofílica num resíduo de tirosina (Tyr) de uma proteína ou radiometais



que são facilmente complexados por agentes quelantes que são encontrados comercialmente acoplados à biomoléculas;

- Via de administração;
- Dosimetria interna;
- Cuidados com a segurança radiológica e ambiental;
- Veículo usado como carreador;
- Farmacocinética “in vivo” do radiofármaco e do radioisótopo livre;
- Custo de produção.

Apesar de todos estes fatores influenciarem, de um modo ou de outro, na escolha do radioisótopo adequado para a terapia, para proposições práticas, a escolha é geralmente limitada à emissão de partícula  $\beta^-$  pelo radioisótopo eleito (Lewington, 2003).

As partículas  $\beta^-$  são elétrons carregados negativamente que são emitidos do núcleo de um átomo instável, sendo sua energia e seu alcance variáveis (Zweit, 1996).

Os elementos radioativos conhecidos por serem emissores de partículas  $\beta^-$  possuem representantes, os quais são classificados em 3 grupos de acordo com a energia de emissão da partícula e conseqüente alcance (Zweit, 1996):

- Radionuclídeos emissores  $\beta^-$  de baixa energia;
- Radionuclídeos emissores  $\beta^-$  de média energia;
- Radionuclídeos emissores  $\beta^-$  de alta energia.

Os elementos emissores  $\beta^-$  que são classificados como de baixa energia, possuem emissões que variam de 0,08 a 0,18 MeV, apresentando alcance, na água, entre 0,4 e 0,9 mm sendo seus representantes o iodo-131 ( $^{131}\text{I}$ )

e o lutécio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ). Os de média energia são classificados entre 0,23 e 0,36 MeV, com alcance entre 1,2 e 1,8 mm, como por exemplo, o samário-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ). Os de alta energia variam entre 0,5 a 1,0 MeV, com alcance entre 2,2 e 5,0 mm, sendo seus representantes o rênio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ) e o ítrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ) (ZWEIT, 1996). A tabela 1 mostra alguns radioisótopos que são frequentemente usados na produção de radiofármacos para fins terapêuticos e as propriedades físicas correspondentes.

Tabela 1 - Características físicas de radioisótopos emissores  $\beta^-$ , utilizados na terapia de tumores.

Radioisótopo	Meia-vida (dias)	Energia média do $\beta^-$ (keV)	Alcance médio do $\beta^-$ (mm)	$E_\gamma$ (keV) / A(%)
I-131	8,0	182	0,39	364 / 81
Lu-177	6,7	133	0,23	208 / 11
Sm-153	1,9	224	0,54	103 / 28
Re-188	0,7	764	3,1	155 / 15
Y-90	2,7	935	4,0	-
Ho-166				

$E_\gamma$  (keV)/A= energia gama principal/abundância

Fonte: Adaptação de Welch, 2003.

Os elétrons emitidos de um núcleo em decaimento  $\beta^-$  apresentam espectro de energia e alcance variados. Ao interagir com a matéria, as partículas  $\beta^-$  podem sofrer alteração de sua rota, e conseqüente redução de sua energia

cinética, a qual pode chegar à zero. Uma vez que a transferência linear de energia (LET) nessa interação é relativamente baixa ( $0,2 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ), pode-se afirmar que essas partículas são pouco eficientes em lesar o DNA das células-alvo. Portanto, para serem utilizados como agentes terapêuticos, os emissores  $\beta^-$  devem estar presentes em altas concentrações no tecido tumoral, transferindo milhares de elétrons a cada célula cancerosa. Essa especificidade é assegurada pela molécula carregadora (Pujatti, 2009).

#### 1.4 Lutécio-177

O lutécio é encontrado na natureza como óxido de lutécio-175. O lutécio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) é o isótopo radioativo produzido em reatores de alto fluxo através do bombardeamento de um alvo enriquecido em óxido de lutécio-176 (71%) comercialmente disponível. A produção de lutécio-177 livre de carreador também é possível e recomendável para aplicações médicas que exijam alta atividade específica da molécula a ser radiomarcada. Nesse caso o radioisótopo é produzido a partir da reação  $^{176}\text{Yb} (n,\gamma) ^{177}\text{Yb} (T_{1/2}1,9\text{h})$ . O  $^{177}\text{Yb}$  decai por emissão de radiação  $\beta^-$  para  $^{177}\text{Lu}$ . A separação desses dois radioisótopos, por sua vez, é feita em duas etapas (Zalutsky, 2003).

A aplicação do  $^{177}\text{Lu}$  na produção de radiofármacos para terapia radioisotópica é recente e vem se intensificando nos últimos anos. Esse crescente uso atribui-se às propriedades físicas e químicas desse radioisótopo. A meia-vida física do  $^{177}\text{Lu}$  é de 6,65 dias, significativamente maior do que a de outros radiolantanídeos como o  $^{153}\text{Sm}$  e  $^{166}\text{Ho}$ , o que permite sua utilização em processos mais complexos de radiomarcção, os quais demandam maior tempo e

trabalho. Além disso, o  $^{177}\text{Lu}$  emite radiação  $\beta^-$  de 497 keV de energia máxima e 230  $\mu\text{m}$  de alcance médio, ideal para o tratamento de micrometástases, como as geradas pelos tumores de próstata hormônio-refratários. A emissão concomitante de radiação  $\gamma$  de 208 keV de energia confere ao lutécio aplicação diagnóstica na obtenção de imagens cintilográficas. Finalmente, com o auxílio de ferramentas tecnológicas adequadas torna-se possível conjugar esse radiolantanídeo a inúmeros compostos biologicamente ativos, desde que esses sejam ligados a um agente quelante (Mikolajczac e cols, 2003).

O  $^{177}\text{Lu}$  apresenta características químicas similares à de outros lantanídeos. A ligação com o lutécio é iônica e necessita de quelantes multidentados, aniônicos e macrocíclicos, a fim de garantir a estabilidade do complexo molécula carreadora-radiolantanídeo. O  $^{177}\text{Lu}$  mimetiza o cálcio *in vivo* e apresenta alta afinidade pelo tecido ósseo. Na ausência de ligantes, que satisfaçam seu número de coordenação, esse radiolantanídeo forma radiocolóide –  $^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$  – em pH neutro ou alcalino, que se acumula no fígado. Assim, a química do  $^{177}\text{Lu}$  envolve sua dissolução e manutenção em ácido clorídrico. Para prevenir a formação de hidróxidos insolúveis tampão citrato ou acetato são utilizados em pHs que variam entre 4,5 e 6,5. Finalmente, a formação do radiofármaco pode requerer aquecimento, dependendo do agente quelante utilizado (Jurisson e cols., 2008).

O potencial terapêutico do  $^{177}\text{Lu}$  vem sendo avaliado em conjunto com uma série de substâncias carreadoras. Um estudo comparativo entre o peptídeo [DOTA<sup>0</sup>,Tyr<sup>3</sup>]octreotato (DOTATATO) marcado com  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  ou  $^{177}\text{Lu}$  mostrou que a captação do peptídeo radiomarcado com  $^{177}\text{Lu}$  por tumores pancreáticos foi mais alta que quando marcado pelos outros dois radioisótopos (Breeman e cols.,

2003). Frente aos resultados encorajadores, o DOTATATO-<sup>177</sup>Lu foi também avaliado em estudos clínicos e os resultados foram promissores (Kwekkeboom e cols., 2003). Atualmente, já existem derivados da somatostatina radiomarcados com <sup>177</sup>Lu disponíveis comercialmente em todo o mundo, dentre eles o DOTATATO-<sup>177</sup>Lu, produzido pela radiofarmácia do IPEN e utilizado no Brasil para tratamento de tumores neuroendócrinos.

## **1.5 Molécula carreadora**

A molécula carreadora a ser acoplada ao radionuclídeo pode ser uma molécula orgânica, uma partícula, um anticorpo ou um peptídeo.

### **1.5.1 Partículas**

Muitos dos primeiros trabalhos envolvendo terapia radioisotópica utilizavam partículas radiomarcadas. Atualmente, estes agentes ainda são objeto de estudo de vários trabalhos, sendo normalmente empregados em administração local quando o tumor ou outra patologia está localizado em um compartimento isolado, como é o caso das partículas de hidroxiapatita radiomarcadas com <sup>90</sup>Y ou <sup>177</sup>Lu para aplicação em pacientes com artrite reumatóide em articulações, respectivamente, do joelho e cotovelo (Couto, 2009). Nesse processo, a partícula radiomarcada é injetada na articulação e destrói seletivamente o tecido inflamado, em uma alternativa de menor custo e tempo de hospitalização que o tratamento cirúrgico convencional. A técnica é conhecida como radiosinovectomia (Kassis &

Adelstein, 2003; Couto, 2009). O objetivo neste caso é garantir uma distribuição uniforme do radiofármaco na cavidade e minimizar a dose de radiação ao restante do corpo. Além da estabilidade, uma característica importante das partículas é o seu tamanho, o que determina não apenas a homogeneidade da dose depositada, mas também a sua permanência no local destinado.

### **1.5.2 Anticorpos**

Nas últimas décadas observou-se uma rápida evolução no desenvolvimento de radiofármacos de origem proteica, principalmente devido às limitações na aplicabilidade de carreadores na forma de partículas. A marcação de anticorpos monoclonais e sua utilização como ferramenta no diagnóstico e terapia de tumores surgiu como uma alternativa. Os radiofármacos de origem proteica como os anticorpos monoclonais podem ser produzidos para apresentar alta afinidade e especificidade pelo tecido tumoral e promover um excelente contraste entre tecido marcado e a radiação de fundo na imagem refletida, além de reduzir a dosimetria ao paciente na terapia. No entanto, o alto peso molecular dos anticorpos (50000 a 150000 Da) limita sua utilização, uma vez que implicam em longa meia-vida plasmática e lenta difusão através dos tecidos e do tumor. Além disso, essas macromoléculas são primariamente metabolizadas pelo fígado e excretadas pelo trato biliar e o intestino, aumentando significativamente a dosimetria e a radiação de fundo nesses órgãos (Weiner e Thakur, 2001).

Diante destes problemas, o ideal seria que a molécula carreadora apresentasse uma rápida remoção da circulação sanguínea e excreção principalmente renal. Contudo, o acúmulo de radiação nos rins é um fato

indesejável e o radiofármaco deve ser prontamente eliminado através da urina. Para tanto é necessário reduzir o tamanho da molécula carreadora, o que no caso dos anticorpos significa clivá-los em fragmentos. Todavia, essa redução de tamanho também promove reduções na afinidade e especificidade da molécula (Knight, 2003).

Outra desvantagem da utilização de anticorpos monoclonais é o desenvolvimento de reação imunológica nos pacientes em virtude da origem murínica dos mesmos. A utilização de anticorpos quiméricos ou humanizados minimiza o desenvolvimento de tais reações.

Nos últimos anos, foi crescente o interesse pela possibilidade de conjugar peptídeos a drogas citotóxicas ou radionuclídeos tendo como alvo especificamente seus receptores em células tumorais. Comparados aos anticorpos, os peptídeos apresentam a vantagem de serem moléculas bem menores (5500 Da) cuja tecnologia de produção é menos onerosa. O baixo peso molecular dos peptídeos resulta em baixa antigenicidade, rápido clareamento e rápida difusão tecidual com excreção predominantemente renal (Weiner e Thakur, 2002; Reubi, 2003).

### **1.5.3 Peptídeos**

Uma alternativa aos anticorpos é a utilização de pequenos peptídeos, compostos de 50 aminoácidos ou menos. Existem três diferenças entre os peptídeos e as proteínas que representam implicações fundamentais na terapia radioisotópica. Por apresentarem menor tamanho, os peptídeos são clareados do sangue e dos tecidos sadios rapidamente. Outra consequência do seu baixo peso

molecular é a penetração mais rápida e homogênea no tumor. Além disso, peptídeos são menos imunogênicos que as proteínas, tornando possível um esquema terapêutico que envolva a administração de múltiplas doses. Embora o desenvolvimento de novas tecnologias tenha reduzido o custo de produção de proteínas, a síntese de peptídeos ainda é mais conveniente que o uso de anticorpos, mas não apresenta apenas vantagens (Zalutsky, 2003). A maioria dos peptídeos em estudo, para aplicação em terapia radioisotópica, são peptídeos regulatórios e ainda que seus receptores sejam encontrados em maior densidade em células tumorais, eles também são encontrados em tecidos saudáveis, principalmente no trato gastrointestinal. Portanto, esses peptídeos regulatórios causam efeitos fisiológicos em baixas concentrações, o que torna importante a adoção de uma metodologia de marcação que assegure alta atividade específica do composto radiomarcado (Zalutsky, 2003).

Sua baixa estabilidade *in vivo*, demonstra a necessidade de modificações estruturais que aumentem a estabilidade. Além disso, como consequência de sua rápida eliminação renal, esses agentes podem provocar toxicidade aos rins, o que limitaria sua utilização. Neste sentido, uma possível solução para este inconveniente é a coadministração de aminoácidos básicos, os quais inibem a reabsorção tubular dos peptídeos que sofreram filtração glomerular (Zalutsky, 2003).

Diversos peptídeos regulatórios apresentam alta afinidade por células tumorais, que geralmente superexpressam receptores para estes peptídeos permitindo uma melhor visualização do tumor na imagem cintilográfica e a aquisição em um menor intervalo de tempo após a administração, em razão do rápido clareamento sanguíneo dessas moléculas. Esse mesmo peptídeo, quando



radiomarcado com um emissor beta e gama, por exemplo, atuará também como agente terapêutico do tumor primário e de possíveis sítios metastáticos. Dentre promissores peptídeos estão os derivados de somatostatina, como o octreotídeo, o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), a substância P e a bombesina (Knight, 2003).

### 1.6 Câncer de Próstata

A próstata é uma glândula do aparelho reprodutor masculino que se localiza na parte baixa do abdômen. É um órgão muito pequeno, que possui a forma de maçã e se situa logo abaixo da bexiga e à frente do reto (figura 1). A próstata envolve a porção inicial da uretra, tubo pelo qual a urina armazenada na bexiga é eliminada. A próstata produz parte do sêmen, líquido espesso que contém os espermatozóides (INCA, 2011).

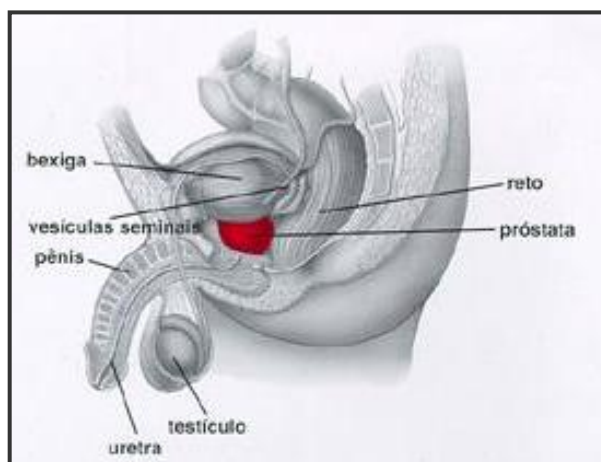


Figura 1 - Desenho esquemático do sistema genital masculino (Sistema reprodutor masculino, 2008). Fonte: Instituto Nacional do Câncer, 2011.

Somente três processos patológicos podem afetar a próstata: inflamação, aumento nodular benigno e câncer. Destes três, os aumentos nodulares benignos são os mais comuns e ocorrem com tanta frequência na idade avançada que podem ser considerados um processo “natural” do envelhecimento. Os processos inflamatórios têm, na maior parte das vezes, pouca importância clínica e podem ser tratados facilmente. O carcinoma prostático, por sua vez, é também uma lesão comum e, por sua gravidade, merece uma consideração cuidadosa (Robbins & Cotran, 2005).

O câncer de próstata foi reportado pela primeira vez por Langstaff em 1817 (Tricoli e cols., 2004).

No Brasil, no ano de 2014, estima-se 68.800 novos casos de câncer de próstata. Esses valores correspondem a um risco estimado de 68 casos novos a cada 100 mil homens. Nas regiões Sudeste (78/100 mil) e Nordeste (43/100 mil), o câncer da próstata é o mais incidente entre os homens. Sem considerar os tumores da pele não melanoma, é o mais frequente nas regiões Centro-Oeste (75/100 mil), Sul (68/100 mil) e Norte (30/100 mil) (INCA, 2013).

Uma estimativa mundial apontou o câncer de próstata como sendo o segundo tipo de câncer mais frequente em homens, cerca de 915 mil casos novos no ano de 2008. Aproximadamente 75% dos casos diagnosticados no mundo ocorrem em países desenvolvidos. A taxa de incidência mundial cresceu cerca de 25 vezes, sendo as mais altas observadas na Austrália, Nova Zelândia, Europa Ocidental e América do Norte. Parte desse aumento pode ser reflexo das práticas de rastreamento por meio do teste Antígeno Prostático Específico - PSA (INCA, 2013).

No Brasil, o aumento da expectativa de vida, a melhoria e a evolução dos métodos diagnósticos e da qualidade dos sistemas de informação do país podem explicar o aumento das taxas de incidência ao longo dos anos.

O único fator de risco bem estabelecido para o desenvolvimento do câncer de próstata é o fator idade. Aproximadamente 62% dos casos de câncer da próstata diagnosticados no mundo acometem homens com 65 anos ou mais. Com o crescimento da expectativa de vida mundial, é esperado que o número de novos casos aumente cerca de 60% até o ano de 2015. Além desse, a raça/etnia e a história familiar da doença também são considerados fatores de risco para esse tipo de neoplasia. (INCA, 2013).

Outro fator importante na etiologia desse tipo de câncer é a dieta. Dietas com base em gordura animal, carne vermelha, embutidos e cálcio têm sido associados ao aumento no risco de desenvolver câncer de próstata. Além disso, também contribui como fator de risco a obesidade, em especial para aquelas neoplasias de comportamento mais agressivo. Em contrapartida, dietas ricas em vegetais, vitaminas D e E, licopeno e ômega-3 aparecem como fatores protetores. Recentemente, a síndrome metabólica, caracterizada pela resistência ao hormônio insulina, vem sendo apontada como potencial fator de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia. Em geral, os homens com diabetes mellitus tipo 2 possuem deficiência com relação ao hormônio testosterona. Estudos recentes sugerem que a terapia de reposição hormonal (testosterona) possa inverter alguns aspectos da síndrome metabólica, embora a correlação entre essa reposição e o surgimento do câncer de próstata ainda seja uma pergunta sem resposta (INCA, 2013).

A mortalidade por esse tipo de neoplasia apresenta um perfil ascendente semelhante ao da incidência no Brasil, embora sua magnitude seja mais baixa. Pode ser considerado um câncer de bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente. Programas de controle da doença são aplicáveis para a redução da mortalidade, entretanto, os métodos de rastreamentos atuais, como o PSA, não mostraram, até o momento, sucesso na redução da mortalidade (INCA, 2013).

Alguns destes tumores podem crescer de forma rápida, espalhando-se para outros órgãos e podendo levar à morte. A grande maioria, porém, cresce de forma tão lenta (leva cerca de 15 anos para atingir 1cm<sup>3</sup>) que não chega a dar sinais durante a vida e nem a ameaçar a saúde do homem (INCA, 2013).

Em aproximadamente 70% dos casos, o carcinoma de próstata surge na zona periférica da glândula, classicamente em uma localização posterior, frequentemente palpável ao exame retal. Caracteristicamente, aos cortes de próstata, o tecido neoplásico é áspero e firme, mas quando encrustado na substância prostática pode ser extremamente difícil de visualizar e mais aparente à apalpação. A disseminação do câncer de próstata ocorre por invasão local direta e através da corrente sanguínea e linfática. A extensão local envolve mais comumente as vesículas seminais e a base da bexiga urinária, o que pode resultar em obstrução uretral. A disseminação hematogênica ocorre principalmente para os ossos, particularmente o esqueleto axial, mas raramente algumas lesões se disseminam amplamente para as vísceras. Os ossos mais comumente envolvidos, em ordem decrescente de frequência, são a coluna lombar, o fêmur proximal, a pelve, a coluna torácica e as costelas. Já a

disseminação linfática ocorre inicialmente para os linfonodos, que ocasionalmente precede a disseminação óssea (Epstein, 2005).

A mortalidade por câncer de próstata é relativamente baixa, o que reflete, em parte, seu bom prognóstico. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer – INCA, no ano de 2011, chegou a 13129 o número de mortes causadas pelo câncer de próstata. Nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos é de 64%; enquanto que, para os países em desenvolvimento a sobrevida média é de 41% (INCA, 2011).

A suspeita diagnóstica do câncer de próstata é feita pela observação isolada de níveis séricos elevados do antígeno prostático específico – PSA - ou de alterações texturais ao exame digital da próstata. Uma vez avaliados esses dois parâmetros, caso persista a hipótese de tumor, deverão ser solicitados estudo ultra-sonográfico por via transretal e biópsia, sendo esta última a única forma de diagnóstico definitivo de tumor. A associação dessas ferramentas é responsável pelo estadiamento local. Outros exames, como a tomografia computadorizada de pelve e ressonância magnética auxiliam na busca de linfonodos regionais e doença extraprostática (Império, 2004).

Apesar de suas inúmeras aplicações no diagnóstico de patologias, no caso de tumores prostáticos, a medicina nuclear ainda é utilizada apenas para avaliar suspeita de doença metastática óssea, através da cintilografia óssea com tecnécio-99m (Império, 2004).

## 1.7 Radiofármacos baseados em peptídeos

Células tumorais podem ser diretamente alcançadas pelo emprego de anticorpos e seus fragmentos ou peptídeos.

Usualmente, as células tumorais expressam receptores de superfície para peptídeos reguladores. A superexpressão desses receptores no tumor, em diferentes estágios, é comprovada quando comparada sua densidade no tecido tumoral aos tecidos adjacentes ou ao tecido sadio do órgão, sendo essa a principal razão pelo interesse em peptídeos e seus receptores no câncer como possibilidade de direcionar a eles compostos específicos. Os principais receptores, já identificados, expressos em diferentes linhagens tumorais são os receptores para somatostatina, peptídeo intestinal vasoativo, colecistoquinina, peptídeo liberador de gastrina e neurotensina. O primeiro peptídeo aprovado para prática clínica foi um análogo de somatostatina com afinidade, principalmente, para tumores neuroendócrinos (Reubi, 2003).

A modelagem de peptídeos marcados com radionuclídeos tem aplicações tanto diagnósticas quanto terapêuticas, a depender do perfil farmacocinético do composto e tipo de emissor conjugado. O desenvolvimento de compostos objetiva obter análogos de peptídeos que apresentem afinidade por subtipos específicos de receptores e farmacocinética adequada ao propósito, para tanto são investigados análogos dos peptídeos endógenos sintetizados com diferentes espaçadores e grupos quelantes (Reubi, 2003).

Os grupos quelantes são introduzidos na estrutura do peptídeo para possibilitar a marcação com radioisótopos metálicos, incluindo lantanídeos. Os espaçadores posicionados entre o grupamento quelante e a sequência de

aminoácidos do peptídeo responsável pela interação com os receptores celulares são introduzidos para potencializar a farmacocinética do peptídeo e garantir a interação com os receptores.

### **1.8 Peptídeos análogos da bombesina**

A bombesina (BBN) é um peptídeo de 14 aminoácidos (figura 2) análogo do peptídeo humano liberador de gastrina (GRP) que foi isolado da pele do sapo *Bombina bombina* em 1970. São conhecidos quatro tipos de receptores para BBN, são eles: o receptor B de neuromedina (subtipo 1), o receptor GRP (subtipo 2); o receptor órfão (subtipo 3) e o receptor BBN (subtipo 4), sendo os três primeiros encontrados em tecidos de mamíferos e o quarto em anfíbios. Esses receptores são proteínas transmembrana com sete domínios acoplados à proteína G que, uma vez interagindo com seus agonistas, deflagram o processo de internalização do complexo agonista-receptor (Hoffman e cols., 2003).

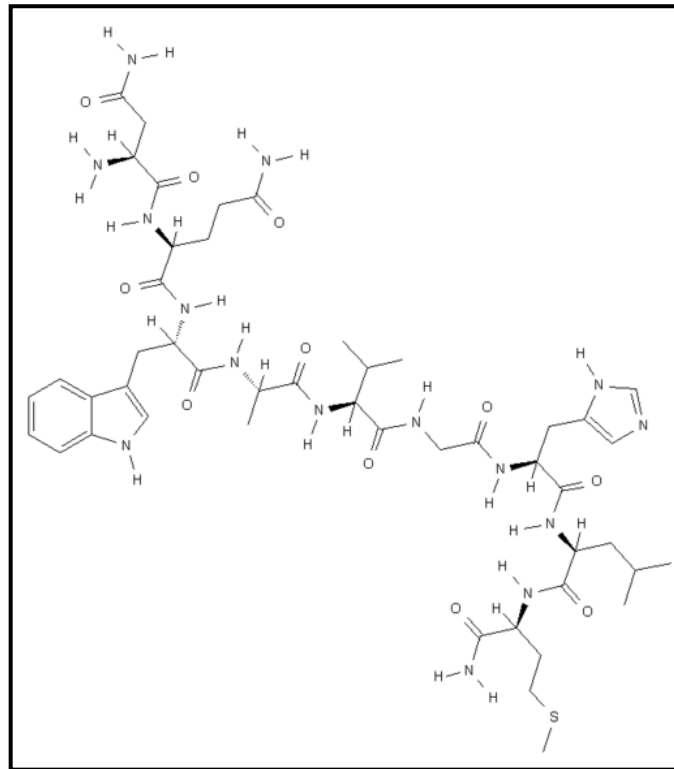


Figura 2 - Estrutura da bombesina (Fonte: Estrutura da Bombesina, 2009)

A figura 3 mostra a sequência dos grupamentos C-terminal da bombesina, do peptídeo liberador de gastrina (GRP) e da neuromedina B (NMB).

Bombesina	<b>Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-CONH<sub>2</sub></b>
GRP	<b>Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-CONH<sub>2</sub></b>
NMB	<b>Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-CONH<sub>2</sub></b>

Figura 3 - Sequência dos grupamentos C-terminal da bombesina, do peptídeo liberador de gastrina (GRP) e da neuromedina B (NMB) (Patel e cols., 2006).



O receptor do GRP (GRPr) tem ação fisiológica sobre o sistema nervoso central e também sobre a liberação de hormônios gastrointestinais. A superexpressão do receptor GRP têm sido identificada em ambos os RNA mensageiros (Bartholdi e cols., 1998; Markwalder & Reubi, 1999; Sun e cols., 2000; Weber, 2009) e na concentração de proteínas de animais submetidos a prostatectomia (Markwalder e Reubil, 1999). Utilizando-se de técnica de autoradiografia, Markwalder e Reubi constataram que os carcinomas primários da próstata muitas vezes expressam GRPr em concentrações muito mais elevada do que glândulas da próstata não-neoplásica. O GRPr também se expressa nas células neoplásicas de carcinoma de células renais, câncer de mama, câncer de pulmão, câncer de cólon, tumor pancreático, câncer de endométrio e tumores gastro-intestinais (Moody e cols, 1996; Gugger & Reubi, 1999; Carroll e cols, 2000; Fleischmann e cols., 2000; Pansky e cols, 2000; Reubil e cols, 2004; Fleischmann e cols, 2005; Fleischmann e cols, 2009).

A constatação mais significativa é a superexpressão dos receptores GRP no câncer de próstata, onde, quando ativado, o receptor é capaz de estimular o crescimento de linhagens de células tumorais que são andrógeno-independentes (PC-3). Esse fato tem estimulado a pesquisa por antagonistas do receptor na perspectiva de reduzir o crescimento tumoral naqueles casos (Stangelberger e cols, 2005b; Schwartzmann e cols, 2006). Além do fato dos receptores GRP serem expressos intensamente nas células malignas, essa expressão também foi identificada em estágios precoces, mais especificamente em células pré-malignas; em contrapartida, os tecidos não neoplásicos não apresentam superexpressão do receptor GRP (Markwalder e Reubi, 1999).

Outros pesquisadores também verificaram a expressão de receptores de GRP em outros tipos de neoplasias além do câncer de próstata (Reubi e cols, 2002), como por exemplo câncer de mama (Halmos e cols, 1995; Reubi e cols, 2002), de receptores para bombesina em câncer de ovário (Schally e cols, 2011); de receptores de neuromedina em tumores intestinais, e receptores de BBN3 em tumores pulmonares (Reubi e cols, 2002).

Ananias e colaboradores (2009) em seu estudo relataram ter observado a presença de receptores para GRP em 18 dos 21 casos de metástase linfonodal e em 52,9% das metástases ósseas de câncer prostático.

A descoberta de que os receptores GRP são superexpressos em diversos tipos de câncer humanos, levantou a possibilidade da utilização de análogos da bombesina como base molecular para o tratamento e diagnósticos do câncer de mama, ovário, próstata e pulmão. Têm sido sugeridas três opções principais: o uso de análogos não radioativos de bombesina (especificamente GRPr antagonistas) para o tratamento anti-proliferação a longo prazo; o uso de análogos da bombesina radioativos para imagem de tumores e radioterapia alvo, e análogos da bombesina citotóxicos para terapia citotóxica específica (Knight, 2003).

As propriedades mitogênicas dos agonistas de GRPr levou os pesquisadores a investigar o uso potencial de antagonistas como agentes anticancerígenos. Antagonistas de GRPr podem exercer efeito anti-proliferativo em vários cânceres experimentais *in vitro* e *in vivo*. A inibição do crescimento do tumor ocorre através de diferentes mecanismos que não foram completamente compreendidos (Schally e cols., 2001; Hohla e Schally, 2010).

Os principais mecanismos envolvidos na inibição do tumor incluem a redução dos níveis de receptores do fator de crescimento epidérmico (Bajo e cols, 2002) e a inibição da neovascularização e da atenuação da expressão de oncogenes (Schally e cols., 2001; Jensen e cols., 2008). Potentes antagonistas de GRPr foram desenvolvidos por Coy e colaboradores (1988) modificando o esqueleto do peptídeo bombesina, substituindo a ligação amida com uma ligação pseudo-peptídica. Subsequentemente, demonstrou-se que [Leu13-CH<sub>2</sub>NH-Leu14]bombesina (6-14) pode inibir o crescimento de células Swiss 3T3, e de diversas células cancerígenas (Schally e cols, 2001; Hohla e Schally, 2010).

O primeiro estudo clínico deste tipo foi realizado por Schwartzmann e colaboradores (2006) em 25 pacientes com tumores sólidos avançados. A administração do antagonista de bombesina [d-Tpi6-Leu13- CH<sub>2</sub>NH-Leu14]bombesina (6-14), também conhecido como RC-3095, não promoveu nenhuma toxicidade, mas, infelizmente, nenhuma resposta significativa ao tratamento foi detectada (Schwartzmann e cols, 2006).

A utilização de análogos da bombesina para terapia citotóxica específica vem sendo investigada em uma vasta variedade de tumores, incluindo câncer de próstata (Schally e Varga, 2006). Um análogo de bombesina citotóxico (AN-215) demonstrou um efeito inibidor poderoso sobre o crescimento de células PC-3 de próstata andrógeno-independentes. Todavia, a eficácia desta estratégia para o tratamento de tumores humanos ainda está sob investigação (Stangelberger e cols, 2005b).

Alterações moleculares na estrutura da bombesina vêm sendo promovidas a fim de melhorar sua afinidade pelos receptores e aumentar sua especificidade pelas células tumorais.

Essas modificações ocorrem principalmente na porção N-terminal do peptídeo, uma vez que a porção C-terminal, que compreende a sequência do aminoácido 7 (Gln) ao aminoácido 14 (Met), é responsável pela interação com o receptor e atividade biológica do peptídeo (Pujatti, 2009)..

A maior parte do esforço de investigação tem incidido sobre ligantes de alta afinidade por receptores de GRP. Estes ligantes são geralmente análogos de BBN de comprimento completo (1-14) ou análogos baseados na sequência de aminoácidos da porção C-terminal de bombesina (7-14), o que confere a afinidade de ligação ao receptor.

A maioria dos derivados de bombesina são agonistas e são internalizados na célula após a ligação ao receptor ao contrário dos antagonistas. Por esta razão, muitos grupos de estudo têm assumido que a captação dos agonistas nas células é maior do que dos antagonistas.

No entanto, os artigos recentes relatam uma comparação direta entre um agonista e um antagonista. A captação do antagonista foi muito maior devido à forte ligação ao receptor neste sentido, é muito provável que a internalização seja apenas um mecanismo possível de acúmulo (Maina e cols, 2005; Cescato e cols, 2008).

Há ainda muito o que se pesquisar no conceito de agonistas e antagonistas da bombesina. Um agonista é considerado como um ligante que ativa os receptores celulares produzindo mensagens secundárias, desencadeando respostas bioquímicas. Já um antagonista não produz efeito nos receptores, mas bloqueia o efeito dos agonistas ocupando os mesmos sítios de ligação dos receptores (Yu e cols, 2013).

A ligação dos análogos agonistas da bombesina aos receptores para GRP desencadeia uma série de respostas intracelulares que leva à divisão celular por mitose (Levine e cols, 2003; Zhu e cols, 2007). Dentre as respostas intracelulares ativadas estão o aumento da concentração intracelular de inositol fosfato, diacilglicerol e cálcio. A maioria dos derivados da bombesina radiomarcados propostos na literatura são agonistas da bombesina. Os agonistas possuem a capacidade de induzir a internalização mediada por receptor, principalmente por endocitose. O acúmulo do radiofármaco no interior da célula pode ser importante para garantir que a maior dose de radiação esteja em contato com as células-alvo e suas organelas, obtendo-se assim uma maior eficácia terapêutica (Abd-Elgaliel e cols, 2008).

Os antagonistas da bombesina, na presença de um agonista isoladamente, impedem a resposta mitótica e levam à morte celular por apoptose (Stangelberger e cols, 2005b; Patel e cols, 2006; Zhu e cols, 2007; Cescato e cols, 2008).

Zhu e colaboradores (2007) observaram esses efeitos citotóxicos de derivados antagonistas da bombesina na concentração de 50 nM, significativamente menor do que a maior concentração dos derivados da bombesina testados ( $10^4$  nM). Como esse efeito não foi observado, acredita-se que esses derivados da bombesina estudados são fracos ou antagonistas dos receptores para GRP. Neste último caso, a ação antagonista só seria observada na presença de um agonista. No entanto, estudos *in vivo*, tais como estudos de ligação, internalização e externalização devem ser realizados a fim de confirmar se os derivados são agonistas ou antagonistas destes receptores (Pujatti, 2009)

No que concerne ao antagonista do receptor de bombesina, os estudos têm se concentrado no desenvolvimento de terapias baseadas em hormônios antagonistas da bombesina a partir da descoberta de que a bombesina e GRP funcionam como fatores de crescimento autócrinos e os seus receptores estão envolvidos na progressão de tumores do câncer da próstata (Wang e cols, 1996; Aprikian e cols, 1998). Um certo número de antagonistas de bombesina / GRP foram idealizados e sintetizados para o tratamento de câncer da próstata, incluindo V-3095, RC-3940-II (Hca<sup>6</sup>, Leu<sup>13</sup> [CH<sub>2</sub>N] Tac<sup>14</sup>bombesin [6-14]) e RC3950 (Schally e cols, 2000; Schally e Varga, 2006).

Estes antagonistas da bombesina / GRP bloqueiam potentemente a ligação da bombesina ao receptor suprimindo eficazmente o crescimento de várias linhagens celulares de câncer de próstata, incluindo PC-82, PC-3, MDA-PCa-2b e DU-145 (Stangelberger e cols, 2005a; Stangelberger e cols, 2005b; Stangelberger e cols, 2005c; Schally e Varga, 2006). Os mais potentes antagonistas são a pseudo-bombesina, com nanopeptídeos modificados nas cadeias C- e N-terminais, dos quais RC-3940-II demonstrou uma maior afinidade de ligação à receptores de células tumorais, e com maior atividade anti-tumoral do que RC-3095 (Cai e cols, 1994; Koppan e cols, 1998).

Os estudos clínicos sobre a possível aplicação de antagonistas da bombesina / GRP para o câncer estão em andamento. Um ensaio de fase I do antagonista de bombesina / GRP RC-3095, em pacientes com tumores sólidos avançados, foi publicado em 2006 (Schwartzmann e cols, 2006). Devido à ocorrência de toxicidade local no ponto de injeção, no entanto, o procedimento de escalonamento de dose não pode ser completamente avaliado, até uma dose máxima tolerada. Assim, a dose recomendada de RC-3095 para os ensaios de

fase II não poderia ser claramente estabelecida. Ensaios de fase II para RC-3095, portanto, não foram registrados ou iniciados. Considerando-se a novidade de seu mecanismo de ação e impressionante atividade antitumoral em avaliações pré-clínicas, estudos explorando novas formulações ou análogos de RC-3095 para diminuir a toxicidade local estão em andamento.

No que diz respeito à utilização de análogos de bombesina para terapia citotóxica, derivados de bombesina não radiomarcados foram propostos para o tratamento do câncer. Nesse caso, os análogos utilizados foram antagonistas da bombesina, uma vez que os agonistas são estimuladores da proliferação celular, não sendo adequados para tratamento antitumoral (Zhu e cols, 2007). No contexto dos antagonistas da bombesina, alguns derivados com espaçadores orgânicos não peptídicos foram reportados (Pujatti, 2009). Todavia, apesar de apresentarem atividade citotóxica contra células de diferentes linhagens tumorais, a aplicação dessas moléculas em estudos clínicos ainda é questionável, pois a administração dos derivados em concentrações terapêuticas, as quais são relativamente altas, pode acarretar sérios efeitos adversos ao paciente devido ao bloqueio do GRPr em tecidos saudáveis e, conseqüentemente, bloqueio das respostas fisiológicas desencadeadas pela sua ativação. Os derivados obtidos a partir da inserção de espaçadores orgânicos não peptídicos apresentam um caráter lipofílico maior em relação à bombesina nativa, o que dificulta a excreção renal e favorece o acúmulo da molécula no organismo (Pujatti, 2009).

Diante dos inconvenientes associados à aplicabilidade clínica de antagonistas da bombesina no tratamento de tumores, uma outra abordagem metodológica foi desenvolvida, sendo de grande interesse em medicina nuclear. Desta vez, o derivado da bombesina é utilizado como carreador de um isótopo

radioativo às células tumorais. Assim, dependendo das características físicas do radioisótopo acoplado, os derivados podem ser aplicados para terapia antitumoral e/ou para diagnóstico por SPECT ou PET. Dentre as vantagens mostradas pelos derivados da bombesina como carreadores de um isótopo radioativo está a possibilidade de utilização não só de antagonistas, mas também de agonistas, considerando-se a massa do derivado da bombesina no radiofármaco administrado ao paciente em relação às concentrações dos antagonistas não radiomarcados utilizados em terapia (Pujatti, 2009).

No que diz respeito ao uso de análogos da bombesina radioativos para imagem de tumores e radioterapia, a utilização de GRPr pode permitir a localização de tumores primários, a determinação da propagação da doença, e ajudar a programar terapias individualizadas para pacientes com câncer de próstata.

Análogos de BBN marcados com  $^{111}\text{In}$  e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  têm sido desenvolvidos para diagnóstico SPECT e os compostos conjugados ao  $^{64}\text{Cu}$  e  $^{68}\text{Ga}$  para imagens PET de tumores que expressem receptores GRP. Em outra perspectiva, compostos marcados com  $^{177}\text{Lu}$  e  $^{90}\text{Y}$ , ambos emissores beta, têm sido descritos como promissores na terapia (Anderson e Welch, 1999; Lane e cols, 2008).

Uma série de derivados de bombesina marcados com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  têm sido desenvolvidos e estudados em modelos pré-clínicos (Baidoo et al., 1998; Nock e cols, 2003; Lin e cols, 2005), dois dos quais estão sendo utilizados em estudos clínicos. O primeiro deles, derivado da bombesina RP527 radiomarcado com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , envolveu sujeitos experimentais de ambos os sexos e sadios. Apesar de nenhum efeito adverso, como alteração das funções vitais ou dos parâmetros bioquímicos dos voluntários terem sido reportados durante todo os testes,



observou-se, pela análise das imagens, uma alta captação hepática e intestinal, devido à excreção hepatobiliar do RP527-<sup>99m</sup>Tc. Essa alta captação, detectada até 24 horas após a administração intravenosa do derivado, resultou em uma alta dose de radiação absorvida pelo fígado e intestino, o que provavelmente impossibilitou os estudos subsequentes em pacientes com tumor. Além disso, o derivado também foi significativamente captado pela mama das pacientes, impossibilitando sua aplicação no diagnóstico de câncer de mama. Embora o estudo tenha apresentado alguns resultados não satisfatórios, concluiu que, do ponto de vista de dosimetria, o uso clínico do RP527-<sup>99m</sup>Tc é favorável, considerando-se as doses administradas para aplicação em SPECT (Van de Wiele e cols, 2001).

Já um segundo estudo clínico envolvendo o derivado EDDA/HYNIC-[Lys3]-bombesina radiomarcado com <sup>99m</sup>Tc, incluiu apenas o gênero feminino, portadoras do câncer de mama e sadias. Os resultados mostraram que nenhuma das 11 mulheres avaliadas apresentou efeitos adversos após a administração do radiofármaco e o acúmulo abdominal do radiofármaco foi reduzido. Contudo, não houve diferença significativa entre a captação mamária nas mulheres sadias e nas portadoras do câncer de mama, indicando que esses derivados não são adequados para imagem tumoral (Santos-Cuevas e cols, 2008).

Diferentes compostos de bombesina marcados com <sup>177</sup>Lu estão sendo investigados. O <sup>177</sup>Lu pode ser acoplado à biomolécula com o uso de quelantes como o DTPA (Ácido dietileno-triamino-pentacético) ou DOTA (Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético) e tem apresentado resultados promissores quanto à afinidade e possibilidade de visualização de tumores de próstata.

Lantry e colaboradores (2006) descreveram a síntese e a caracterização do derivado agonista da bombesina AMBA radiomarcado com  $^{177}\text{Lu}$ , para aplicações em diagnóstico por SPECT e terapia, especialmente de pequenos tumores e micrometástases. Esse derivado apresentou boas propriedades de ligação e internalização pelos receptores GRP nos estudos com células PC-3 de adenocarcinoma de próstata humano *in vitro* e alta captação tumoral nos estudos *in vivo*. No entanto, também apresentou alta captação pelo pâncreas e demais órgãos do sistema gastrointestinal. Esse resultado conduziu ao estudo de Waser e colaboradores (2007) e de Thomas e colaboradores, que avaliaram a ligação do AMBA- $^{177}\text{Lu}$  a receptores GRP e NMB em diferentes cortes de tecidos e tumores humanos *in vitro*. As análises evidenciaram a ausência de receptores GRP no pâncreas humano, ao contrário do observado em camundongos, e a presença desses receptores em carcinomas de próstata, mama, rins e cólon e também em células sadias do músculo liso e plexo mesentérico do trato gastrointestinal. Esses resultados mostraram a necessidade de se obter um análogo mais seletivo, uma vez que a irradiação das células do trato gastrointestinal, principalmente das células intestinais, conhecidamente radiosseinsíveis, pode acarretar efeitos adversos irreversíveis ao paciente. O AMBA também foi inserido em um estudo comparativo envolvendo derivados da bombesina com diferentes espaçadores e radiomarcados com  $^{111}\text{In}$ . Os resultados obtidos foram semelhantes aos descritos para os derivados do estudo marcados com outros radioisótopos, ou seja, importante captação tumoral, mas também alto acúmulo abdominal (Garrison e cols, 2008).

O mesmo derivado da bombesina, AMBA- $^{177}\text{Lu}$ , foi analisado por Linder e colaboradores (2009), onde observou-se nos estudos de biodistribuição

animal, que o radiofármaco é rapidamente eliminado por excreção renal. Embora o radiofármaco tenha apresentado um rápido metabolismo *in vivo* nos estudos pré-clínicos, o  $^{177}\text{Lu}$ -AMBA mostrou eficácia de ligação às células PC-3 e direcionamento eficaz à células de câncer metastático em humanos. (Linder e cols, 2009).

Buscando melhores desempenhos *in vivo*, a maioria dos compostos radiomarcados são análogos da bombesina conjugados a quelantes bifuncionais, como o ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) e o ácido 1,4,7,10-tetrazaciclododecano-N,N',N'',N'''-tetracético (DOTA), que permitem a ligação do radiometal ( $^{111}\text{In}$ ,  $^{67,68}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ) ao grupo funcional da biomolécula. Os quelantes DTPA, DOTA e NOTA e seus derivados são os mais utilizados para marcações com  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{68}\text{Ga}$  e  $^{64}\text{Cu}$  (Zilin Yu e cols, 2013). Entre o grupamento quelante e a sequência de aminoácidos que interage com os receptores normalmente se introduz uma porção modificada, comumente denominada espaçador e as moléculas produzidas são derivados análogos da bombesina (Pujatti, 2009).

Um derivado da bombesina – [ $\epsilon$ -Lys3,Tyr4]-BBN – conjugado ao DTPA e ao DOTA e radiomarcado com  $^{111}\text{In}$  foi avaliado quanto à ligação, internalização por células AR42-J de tumor de pâncreas de rato e biodistribuição em ratos. A máxima atividade específica obtida para o derivado conjugado ao DTPA (270 GBq/ $\mu\text{mol}$ ) foi maior do que para o derivado conjugado ao DOTA (30 GBq/ $\mu\text{mol}$ ). Nos estudos *in vitro*, não foram observadas diferenças significativas entre peptídeo conjugado ao DTPA e ao DOTA na ligação e internalização pelas células AR42-J.

Nos estudos de biodistribuição em ratos saudáveis, o derivado conjugado ao DOTA apresentou maior ligação aos tecidos que superexpressam os receptores BB2. Apesar desse resultado favorável à utilização [ε- Lys3,Tyr4]-BBN-DOTA, os autores escolheram o derivado conjugado ao DTPA para iniciar estudos clínicos de fase I, devido à maior facilidade de radiomarcção.

Zhang e colaboradores avaliaram os derivados da bombesina BZH1 (GABA-[DTyr6, β-Ala11, Thi13; Nle14]-BBN(6-14)-DTPA) e BZH2 (GABA-[D-Tyr6, β-Ala11, Thi13; Nle14]- BBN(6-14)-DOTA), com afinidade pelos três receptores, e radiomarcados com índio-111, lutécio-177 e ítrio-90 quanto à ligação às células AR42-J e PC-3 de adenocarcinoma de próstata humano *in vitro* e *in vivo*. As marcações do BZH1 com <sup>111</sup>In ocorreram à temperatura ambiente por uma hora e as do BZH2 à 95 °C por 25 minutos e todas as reações apresentaram alto rendimento e atividades específicas maiores que 37 GBq/μmol das moléculas radiomarcadas para os dois agentes quelantes utilizados. Nos estudos de estabilidade em soro humano *in vitro*, produtos de clivagem dos dois derivados foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Nos estudos com células *in vitro*, ambos os peptídeos foram internalizados pelas células AR42-J e PC-3 em taxas similares. Entretanto, os estudos de externalização em células AR42-J demonstraram maior taxa de externalização para o BZH1. Em contrapartida, nos estudos de biodistribuição *in vivo* em modelo animal de tumor de células AR42-J, esse derivado foi também o que apresentou maior captação tumoral. Os autores concluíram que ambos os derivados são ferramentas promissoras para o diagnóstico de tumores que expressam quaisquer receptores para a bombesina, não havendo diferenças que favoreçam a utilização do DTPA ou do DOTA como agente quelante (Zhang e cols, 2004).

À medida que novos peptídeos radiomarcados surgem como novas ferramentas para diagnóstico e terapia, os agentes quelantes se tornam cada vez mais importantes em radioquímica. Ainda que o ligante seja o responsável pela biodistribuição da molécula radiomarcada, o agente quelante pode influenciar diretamente em sua estabilidade e comportamento *in vivo*. Em decorrência do pequeno número de trabalhos comparativos publicados e dos resultados conflitantes obtidos, faz-se necessário avaliar, para um derivado da bombesina específico, o melhor agente quelante para conjugação e marcação com um radioisótopo específico não apenas do ponto de vista de praticidade do procedimento de radiomarcção, mas também quanto à estabilidade, ligação às células alvo *in vitro* e *in vivo*, bem como perfil de biodistribuição do marcador molecular obtido (Pujatti, 2012).

Peptídeos derivados da bombesina possuem como efeito biológico a estimulação da secreção de ácido gástrico e das enzimas pancreáticas ou vesícula biliar. O que faz com que sejam rapidamente e seletivamente degradados pelas enzimas proteolíticas para regular os níveis de expressão. Portanto, muitas tentativas de estabilizar estes peptídeos vêm sendo publicadas.

Agentes quelantes de metal radioativo têm um potencial efeito sobre a afinidade *in vitro* do derivado de BBN. Comparado com o peptídeo íntegro, os efeitos podem ser positivos ou negativos. Obviamente, a farmacocinética dos derivados também é afetada. O caráter e a carga hidrofílica ou lipofílica é responsável pela excreção via hepatobiliar ou trato urinário renal. Para imagem de câncer de próstata, o ideal é que a absorção de radiação na região abdominal seja a mais baixa possível. Derivados BBN mais hidrofílicos são, portanto, preferível, pois estes mostram baixa absorção no trato hepatobiliar.

A variação do espaçador entre o grupo quelante e a molécula peptídica também deve conferir características de afinidade e farmacocinética apropriadas ao emprego diagnóstico. O Cmp3 é um análogo que apresenta diferenças mínimas relacionadas à molécula original de bombesina. A marcação com  $^{111}\text{In}$  de outros compostos de cadeia menor de aminoácidos e contendo aminoácidos não naturais, conjugados com DTPA, melhoraram a razão de internalização com o receptor quando comparados ao Cpm3, mas nem todos os peptídeos de cadeia curta apresentaram boa razão de internalização. A influência de grupos espaçadores tem sido intensamente investigada para encontrar análogos com melhores perfis (De Visser e cols, 2007).

Os análogos de bombesina têm a capacidade de interagir tanto com receptores de superfície de células tumorais quanto em tecidos saudáveis que também expressem esses receptores, podendo influenciar nos efeitos fisiológicos deflagrados por eles, de acordo com o subtipo de receptor.

Em 1998, o primeiro pan-análogo da bombesina foi sintetizado, isto é, uma molécula com afinidade para todos os subtipos de receptores, o protótipo [D-Tyr<sup>6</sup>, β-Ala<sup>11</sup>, Phe<sup>13</sup>, Nle<sup>14</sup>] bombesina (Pradhan e cols., 1998). Por comparação com essa molécula de referência, estudos de afinidade dos análogos por diferentes subtipos de receptores puderam ser realizados, fornecendo assim, outras informações mais precisas acerca do potencial de distribuição das moléculas no organismo.

A influência dos quelantes bifuncionais é um importante ponto de investigação. O uso de diferentes quelantes pode proporcionar um impacto significativo na lipofilicidade, na estabilidade da solução, na farmacocinética e na biodistribuição do radiofármaco. Os ensaios com DOTA e DTPA procuraram

definir o desempenho de diferentes análogos tanto marcados com  $^{111}\text{In}$  (Breeman e cols, 2002) quanto com outros radiometais, como foi descrito para os pan-análogos BZH1 (conjugado ao DTPA) e BHZ2 (conjugado com DOTA) (Zhang e cols, 2007).

Outras informações, especialmente acerca da afinidade por subtipos de receptores e obtenção de imagens *in vivo*, foram explorados para os análogos de bombesina e podem complementar o diagnóstico e estadiamento do câncer de próstata. O direcionamento das pesquisas aponta para investigações de diversos análogos de bombesina quanto à estabilidade do composto, interação com diferentes subtipos de receptores, razões de internalização do receptor e efluxo, perfil farmacocinético e análise de imagens, para, então, alcançar a viabilidade clínica.

Schroeder e cols (2010) realizaram uma comparação sistemática entre um antagonista de bombesina e quatro agonistas. Os cinco análogos de bombesina radiomarcados foram selecionados com base na eficácia de ligação às células PC-3 de câncer de próstata previamente estudados. A porcentagem de absorção tumoral, em animais, do antagonista  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Demobesin-1 atingiu o pico máximo de absorção 1 hora após sua administração, embora a absorção tenha sido maior que nos outros quatro agonistas analisados, entre eles o  $^{111}\text{In}$ -AMBA e  $^{111}\text{In}$ -PESIN, essa diferença de absorção não foi significativamente diferente dos outros análogos estudados (Yu e cols, 2013).

Apesar do grande número de derivados agonistas e antagonistas da bombesina desenvolvidos e radiomarcados, um radioligante com características adequadas para aplicação *in vivo*, ou seja, que apresenta o máximo de captação tumoral com o mínimo de acúmulo nos tecidos saudáveis, ainda não foi descrito e

seu desenvolvimento constitui-se em contribuição de suma importância para diagnóstico e tratamento de tumores que superexpressam GRPr.



## 2. JUSTIFICATIVA

Os derivados da bombesina estudados neste trabalho foram planejados no Centro de Radiofarmácia (CR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) no ano de 2007, com base nos dados de biodistribuição dos derivados publicados até então. Como resultado dos estudos, obteve-se uma série de derivados da bombesina com espaçadores formados por aminoácidos e a sequência original da bombesina do aminoácido 6 ao aminoácido 14. Os espaçadores foram escolhidos de modo a aumentar a hidrofiliicidade da molécula, levando-se em consideração os derivados já estudados que utilizaram espaçadores orgânicos, objetivando diminuir a captação em órgãos não-alvos a partir do aumento do clareamento sanguíneo, mas mantendo a captação tumoral em um valor aceitável para aplicação no diagnóstico e terapia de tumores.

O Centro de Radiofarmácia (CR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) tem como objetivo o desenvolvimento, produção e distribuição de radiofármacos que venham a suprir a demanda nacional em procedimentos diagnósticos de SPECT e PET, e terapias com radiofármacos. Uma das diretrizes do CR é a pesquisa aplicada a novos agentes que possam servir de instrumento no estabelecimento e inovação de métodos da medicina nuclear, fornecendo produtos de qualidade a custo reduzido, de modo a atender às necessidades em sintonia com as tendências mundiais da clínica.

Neste sentido, o CR investe no estudo de derivados de bombesina, objetivando desenvolver um radiofármaco com características adequadas para

diagnóstico e terapia de tumores que expressa receptores para o peptídeo liberador de gastrina (GRP).

Dando continuidade aos estudos de avaliação do potencial da série de derivados de bombesina planejados, este trabalho estudou os derivados apresentados a seguir.

<b>DTPA</b>	- Phe - (Gly) <sub>5</sub> -	Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- <b>Met</b> -NH <sub>2</sub>	<b>PG<sub>5</sub>M-DTPA</b>
<b>DOTA</b>	- Phe - (Gly) <sub>5</sub> -	Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- <b>Met</b> -NH <sub>2</sub>	<b>PG<sub>5</sub>M-DOTA</b>
<b>DOTA</b>	- Phe - (Gly) <sub>5</sub> -	Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu- <b>Nle</b> -NH <sub>2</sub>	<b>PG<sub>5</sub>N-DOTA</b>
↓	↓	↓	↓
Agente Quelante	Grupo espaçador (N-terminal)	Sequência C-terminal de aminoácidos da bombesina (Met) e modificado no último aminoácido (Nle)	Nome dado aos derivados de BBN neste trabalho

Figura 4 - Sequência dos análogos da bombesina estudados neste trabalho.

A primeira série de derivados obtida caracterizada pela estrutura DOTA-Phe-Gly<sub>(1-5)</sub>-BBN, foi radiomarcada com <sup>177</sup>Lu (Pujatti, 2009) para diagnóstico e terapia radionuclídica e apresentou resultados promissores nos estudos pré-clínicos, particularmente para o derivado com Phe-Gly<sub>5</sub>.

A segunda série estudada foi radiomarcada com <sup>111</sup>In e <sup>68</sup>Ga e difere da primeira série estudada quanto ao primeiro aminoácido do espaçador, modificado de fenilalamina (Phe) para tirosina (Tyr), e no último aminoácido da

sequência da bombesina, modificado de metionina (Met) para norleucina (Nle) para alguns análogos. A substituição do último aminoácido objetivou prevenir a formação de espécies radioquímicas indesejáveis, originadas da possível oxidação do resíduo de metionina durante o processo de radiomarcção e armazenamento. Além disso, estudos demonstraram que essa substituição aumenta a estabilidade dos derivados em plasma humano e a % de ligação às células de câncer de próstata e mama. Essas modificações não afetaram a afinidade pelos receptores e a internalização (Pujatti., 2012).

Desta forma, de posse de outros derivados de bombesina, com espaçadores do tipo Gly<sub>5</sub>, porém diferindo entre si pelo agente quelante ou pela presença de metionina ou norleucina na porção C-terminal, considera-se interessante realizar um estudo comparativo dos peptídeos com espaçadores Gly<sub>5</sub> radiomarcados com o mesmo elemento radioativo, no caso <sup>177</sup>Lu, de modo a determinar o composto com maior potencial para aplicação em um estudo clínico futuro.

..

### 3. OBJETIVO

O presente trabalho objetivou estudar, de forma inédita, a radiomarcagem com  $^{177}\text{Lu}$  dos análogos da bombesina planejados PG<sub>5</sub>M-DTPA, e PG<sub>5</sub>N-DOTA, otimizar as condições de produção e controle de qualidade de pureza radioquímica e avaliar a estabilidade e as propriedades biológicas dos produtos gerados de forma comparativa ao peptídeo PG<sub>5</sub>M-DOTA.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Materiais

#### 4.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram:

- Acetato de sódio anidro (Nuclear, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Ácido clorídrico p.a. (Merck, Alemanha);
- Ácido trifluoroacético grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Água purificada por equipamento de osmose reversa (Purificador Milli-RX Millipore, EUA);
- Cloreto de lutécio-177 ( $^{177}\text{LuCl}_3$ , IDB, Holanda);
- Citrato de sódio p.a. (Merck, Alemanha);
- Etanol (Merck, Alemanha);
- Meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab);
- Metanol (Merck, Alemanha);
- Soro fetal bovino (Cultilab, Brasil);
- Penicilina:streptomomicina (Cultilab, Brasil);
- Resina Chellex 100 (bioRad, EUA);
- Peptídeos derivados da bombesina (piCHEM, Áustria);

#### 4.1.2 Equipamentos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) 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-10A e forno CTO-10 Avp (Shimadzu, Japão);
- Detector radioativo Shell Jr. 1000/2000 (câmara de cintilação – NaI) do sistema CLAE (Shell-usa, USA);
- Contador automático tipo poço com cristal NaI (TID5002 cobra II (Packard-Canberra, EUA);
- Medidor de pH (Tecnopon, Brasil);
- Balança analítica – (Ohaus, EUA);
- Pipetas automáticas (Brand e Socorex);
- Ultracentrífuga MIKRO 220R (Hettich, Alemanha);
- Agitador/aquecedor Thermomixer comfort 1,5 mL (Eppendorf, EUA);
- Calibrador de atividade (CRMTM-35R – Capintec, EUA);

#### 4.1.3 Animais

Os estudos *in vivo* foram realizados em camundongos *Swiss*, fêmeas, de seis a dez semanas de idade e 20 a 25 gramas de peso, adquiridos do biotério do IPEN. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

#### 4.1.4 Outros

- Coluna de fase reversa C<sub>18</sub> para cromatografia líquida de alta eficiência (Delta-Pak, 3,9 x 150 mm, 5 µm – Waters, EUA);
- Suporte cromatográfico para cromatografia em camada delgada TLC-SG (Merck, Alemanha);
- Tiras de papel whatmann 3 MM (Whatmann, EUA);
- Coluna cromatográfica Sep-PaK com cartucho C<sub>18</sub> de fase reversa (Waters, EUA);
- Frascos para cultivo de células (Costar, EUA);
- Células de tumor de próstata humano (PC 3) (Hemocentro da UNICAMP, Brasil);
- Membrana filtrante (0,22µm) (Millipore, EUA);
- Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos tipo eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon e criotubos;
- vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos, provetas e pipetas.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Obtenção dos peptídeos análogos de bombesina

Os peptídeos análogos da BBN utilizados neste trabalho foram planejados no Centro de Radiofarmácia (CR-IPEN), por modelagem molecular, com base na estrutura do receptor GRP e diferenciam-se pelo grupamento

quelante e o último aminoácido da porção C-terminal. Os estudos de modelagem foram realizados junto ao Departamento de Bioquímica Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e os análogos propostos foram sintetizados por uma empresa especializada (piCHEM), com estrutura já acoplada aos diferentes quelantes - DTPA ou DOTA

#### **4.2.2 Estudo da marcação dos derivados de bombesina com $^{177}\text{Lu}$**

As condições de marcação dos análogos da bombesina são descritas em diferentes referências variando com o grupo quelante (PUJATTI, 2012; LIU, 2008). Com o mesmo quelante, as condições de pH, tempo e temperatura de reação sofrem pequenas modificações, contudo o parâmetro individualizado mais importante é determinar a relação entre atividade do radioisótopo e a massa do peptídeo. Os métodos descritos foram avaliados e/ou adaptados para determinar as melhores condições de marcação.

##### **4.2.2.1 Radiomarcção dos derivados de bombesina**

A radiomarcção dos peptídeos conjugados com DOTA foi realizada a partir dos estudos de Pujatti (2009), onde é descrita a radiomarcção de derivados da bombesina acoplados ao DOTA com lutécio-177. Dentre os vários procedimentos de marcação consultados na literatura, o procedimento de marcação da autora anteriormente citada foi o de escolha para o desenvolvimento deste trabalho por ter sido facilmente reproduzido em nosso laboratório com excelentes resultados de rendimentos de marcação.



O procedimento de marcação consistiu em adicionar 20 µg do peptídeo previamente diluído em tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5 ao cloreto de lutécio 92,5 MBq (2,5 mCi), levar o volume à 200 µL com o mesmo tampão acetato e incubar a mistura de reação à 90° C, por 30 minutos, sob agitação de 350 rpm.

A diferença no procedimento de marcação com os diferentes quelantes ocorre no momento da incubação. As marcações utilizando-se o quelante DTPA são geralmente realizadas à temperatura ambiente (25° C) enquanto o quelante DOTA requer aquecimento (ZHANG e cols, 2004).

Todos os reagentes utilizados nas reações foram preparados com água purificada por equipamento de osmose reversa e tratada com resina chelex 100 para remoção dos íons metálicos.

Tomando como base o procedimento padrão de marcação para os peptídeos quelados com o quelante DOTA, realizou-se estudos para otimização das condições de marcação para o peptídeo quelado ao quelante DTPA, incluindo a variação da temperatura de reação, do tempo de reação, da massa de peptídeo e da atividade de cloreto de lutécio adicionada no procedimento de radiomarcação.

#### **4.2.2.2 Purificação dos peptídeos radiomarcados**

Sempre que um peptídeo radiomarcado resulta em um rendimento de marcação inferior à 95%, pode se utilizar o procedimento de purificação para aumentar a pureza radioquímica da marcação e garantir sua integridade em experimentos de biodistribuição.

A purificação do peptídeo marcado foi realizada através da eluição da mistura de marcação em uma coluna compacta de cromatografia de fase reversa, com o emprego de dois sistemas de eluição com polaridades diferentes, de forma que um dos sistemas arrastasse o radioisótopo não ligado e o outro sistema extraísse o complexo radioisótopo-peptídeo.

A purificação foi realizada como descrito por Zhang e col (2004), utilizando-se uma coluna Sep-Pak com cartucho C<sub>18</sub> pré-condicionada com 10 mL de etanol seguido de 10 mL de água. A mistura de reação foi aplicada no cartucho e o radionuclídeo livre foi eluído com 10 mL de água e o peptídeo marcado foi eluído na sequência, com 3 mL de metanol. A fase metanólica foi, então, evaporada para obtenção do peptídeo radiomarcado com <sup>177</sup>Lu purificado, que foi retomado em pequeno volume de tampão acetato.

#### **4.2.3 Ensaios de Qualidade e Estabilidade**

De acordo com a natureza do radiofármaco e o propósito da pesquisa, realizou-se nos compostos radiomarcados ensaios de pureza radioquímica, para verificar a eficiência do processo de marcação, assim como estudos de estabilidade, a fim de determinar alterações no perfil de marcação no decorrer do tempo e condição de armazenamento.

##### **4.2.3.1 Ensaio de pureza radioquímica**

A pureza radioquímica é a razão, expressa em porcentagem, da radioatividade do radionuclídeo em questão presente na forma química declarada,

relacionada ao total da radioatividade do radionuclídeo presente na amostra. Sua determinação consiste em separar substâncias químicas diferentes que contêm o radionuclídeo e a medida de radioatividade ligada à substância química declarada. Neste estudo são empregadas as técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se suporte de sílica gel (TLC-SG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Por sua simplicidade, a cromatografia em camada delgada (CCD) constituiu-se no método de rotina nos serviços de medicina nuclear para verificar rapidamente a eficiência de marcação de uma reação. Na fase estacionária empregou-se uma fita de alumínio composta por uma fina camada de sílica gel (TLC-SG) conforme sugerido por Gabriel e cols (2003) e o tampão citrato 0,1 mol/L com pH 5 foi a fase móvel inicialmente empregada. Neste sistema cromatográfico, o peptídeo marcado permanece na origem e o  $^{177}\text{Lu}$  livre migra com a frente do solvente (Gabriel e cols., 2003). Uma pequena alíquota do peptídeo marcado foi colocada a 1 cm da base da fita, após secagem da aplicação, a extremidade da fita foi colocada em contato com a fase móvel, num recipiente fechado, permitindo-se o desenvolvimento da corrida. Após secagem, a fita foi cortada a cada centímetro e a atividade determinada em contador gama.

O perfil de migração do  $^{177}\text{LuCl}_3$  e do composto radiomarcado foi estudado em diferentes sistemas cromatográficos neste trabalho, conforme mostra a tabela 2 a seguir.

Tabela 2 - Sistemas cromatográficos estudados para determinação do perfil cromatográfico do  $^{177}\text{LuCl}_3$  e peptídeos radiomarcados.

<b>Suporte</b>	<b>Solvente</b>
<b>TLC-SG</b>	EDTA 0, 1 M pH 5,0
	EDTA 0,2 M pH 5,0
	DTPA 0,02 M pH 5,0
	DTPA 0,1 M pH 5,0
	DTPA 0,2 M pH 5,0
	AcNH <sub>3</sub> EDTA 50 mM
<b>Papel Whatman 1 MM</b>	DTPA 0,02 M pH 5,0
	DTPA 0,1 M pH 5,0
	AcNH <sub>3</sub> EDTA 50 mM
<b>Papel Whatman 3 MM</b>	DTPA 0,02 M pH 5,0
	DTPA 0,1 M pH 5,0
	EDTA 0,2 M pH 5,0

A técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é reservada aos centros de pesquisa e desenvolvimento, sendo um método mais caro que a CCD, porém de melhor resolução. Os sistemas descritos se utilizam da banda de absorção UV e radiação emitidas para detectar, identificar e

quantificar o composto de interesse e/ou compostos indesejados. A análise em CLAE baseou-se na técnica descrita por Hoffman e colaboradores (2002) e foi adaptada por Pujatti (2012), na qual foi usado um sistema equipado com detector com faixa de absorção variável e detector de radiação. Procedeu-se a CLAE em um sistema Shimadzu equipado com uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub> (Waters, 150 mm x 4,0 mm, 5 µm) e detector de radiação gama (Shell Jr.). O fluxo utilizado foi de 1,5 mL/minuto com gradiente linear de 10 a 90% (v/v) de TFA:CH<sub>3</sub>CN (1% v/v) em TFA:H<sub>2</sub>O (1% v/v) por 15 minutos, retornando ao estado inicial por cinco minutos para estabilização do sistema. Analisou-se também o perfil do <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub>, e do perfil dos peptídeos não radiomarcados utilizando detector UV 190 – 300 nm (Shimadzu) e comprimento de onda de 280 nm.

#### **4.2.3.2 Estabilidade dos derivados de bombesina radiomarcados armazenados a 2 – 8° C**

Este ensaio tem por objetivo acompanhar a estabilidade da ligação entre o <sup>177</sup>Lu e o peptídeo análogo de bombesina, após o procedimento de marcação, sendo, o peptídeo radiomarcado mantido sob refrigeração (2 - 8° C) por diferentes períodos de tempo (1 a 7 dias) com tomadas de alíquotas periódicas para análise cromatográfica (TLC-SG) e determinação da pureza radioquímica.

#### 4.2.3.3 Estabilidade dos derivados de bombesina radiomarcados em soro humano e ligação às proteínas séricas *in vitro*

Para obtenção do soro humano, coletou-se 10 mL de sangue de doador sadio sem anticoagulante, em seguida a amostra foi submetida à centrifugação a 1400 g (1500 rpm) por 10 minutos, e após a separação do coágulo de fibrina a amostra foi novamente centrifugada para separação do soro.

Em duplicata, adicionou-se 55 MBq (1,5 mCi) de cada marcador molecular a 1 mL do soro humano e levou-se o mesmo à incubação de 37° C sob agitação de 350 rpm por 15 minutos, 1, 4 e 24 horas. Decorrido o tempo, retirou-se uma alíquota das misturas (200 µL) para análise de uma pequena fração por CCD, conforme descrito anteriormente, e cálculo da porcentagem dos marcadores moleculares íntegros em cada tempo. À fração remanescente da alíquota, adicionou-se etanol (1:1 v/v) para precipitação das proteínas. Em seguida foi feita a centrifugação da amostra à 9720 g (10000 rpm) e uma alíquota do sobrenadante e o precipitado foram coletadas e a radioatividade determinada no contador automático tipo poço devidamente calibrado para o radioisótopo. A porcentagem de ligação às proteínas séricas (LP) foi determinada pela seguinte equação (EQ.1):

$$LP (\%) = \frac{\text{Atividade (cpm) no precipitado}}{\text{Atividade (cpm) no precipitado} + \text{Atividade (cpm) no sobrenadante}} \times 100$$

\*Atividade corrigida para o volume total

EQ. 1

#### 4.2.4 Determinação do coeficiente de partição (log P) experimental dos peptídeos radiomarcados

O coeficiente de partição dos peptídeos radiomarcados foi determinado conforme descrito por Durkan e colaboradores (Durkan e cols, 2007), a fim de avaliar comparativamente sua lipossolubilidade. Adicionou-se, em triplicata, 25 µL - 12 MBq (0,324 mCi) dos peptídeos radiomarcados a um tubo contendo 3 mL de n-octanol (fase orgânica) e 3 mL de solução fosfato-salina pH 7,4 (PBS) (fase aquosa), pré-saturados por 24 horas. Agitou-se o tubo por uma hora à temperatura ambiente e, após a separação das fases aquosa e orgânica, coletou-se 10 µL da fase aquosa e 100 µL da fase orgânica para contagem em contador automático tipo poço. O coeficiente de partição (log P) foi determinado pela equação a seguir (EQ. 2):

$$\log P = \log_{10} \frac{\text{cpm na fase orgânica}}{\text{cpm na fase aquosa} \times 10}$$

EQ. 2

#### 4.2.5 Cultivo de células PC-3

As células PC-3 de adenocarcinoma prostático humano grau IV (Hemocentro da Unicamp) foram cultivadas a 37° C e 5 % de CO<sub>2</sub> em meio de cultura RPMI 1640, enriquecido com 10 % de soro fetal bovino (SFB) e 1 % de antibiótico (penicilina:streptomomicina) em parceria com o Centro de Biotecnologia do IPEN. Ao atingirem 80 % de confluência na placa de cultura, as células foram

tripsinizadas e ressuspensas em meio adequado para o ensaio (ensaio de ligação ou implantação em animais).

#### **4.2.6 Ensaio de ligação às células tumorais**

Os ensaios de ligação específica às células tumorais foram realizados com os marcadores moleculares conjugados ao DOTA radiomarcados com  $^{177}\text{Lu}$  nas células PC-3 de adenocarcinoma de próstata. Colocou-se  $10^6$  células em meio de cultura ( $10^6$  células / 100  $\mu\text{L}$ ) em tubos do tipo eppendorf. Os eppendorfs foram acomodados na centrífuga programada para rotacionar a 3000 rpm durante 5 minutos à  $4^\circ\text{C}$ , para ser removido o meio de cultura. Após, lavou-se as células com 200  $\mu\text{L}$  de solução PBS e colocou-se para centrifugar novamente com a mesma programação, em seguida retirou-se a solução de tampão fosfato/salina (PBS).

Após esta preparação, as células foram incubadas à  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora, sem agitação, na presença de cerca de 100000 cpm, de atividade, dos diferentes conjugados de DOTA radiomarcados com  $^{177}\text{Lu}$ . Após a incubação, os tubos foram centrifugados (10000 rpm, 5 minutos em  $4^\circ\text{C}$ ), o meio reacional foi aspirado e as células foram lavadas três vezes com PBS, centrifugado 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 de radioatividade total ligada às células. Os experimentos foram realizados em triplicata.



#### 4.2.7 Ensaios *in vivo*

Os análogos de bombesina radiomarcados, PG<sub>5</sub>M-DOTA e PG<sub>5</sub>N-DOTA, foram submetidos a ensaios *in vivo*, a fim de avaliar o comportamento da biodistribuição em animais de experimentação.

Foram usados camundongos *Swiss*, provenientes do biotério do IPEN. O manejo de animais experimentais e procedimentos descritos estão de acordo com o Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA).

Foram realizados estudos de biodistribuição em animais sadios (camundongos fêmeas) seguindo o modelo descrito por de Visser e col (2007). Os análogos de bombesina marcados foram administrados numa atividade aproximadamente 3,7 MBq (0,1 mCi / 0,1 mL) intravenosamente. Após diferentes intervalos de tempo, os animais foram sacrificados, os órgãos retirados e lavados com salina e uma amostra de sangue foi coletada. A atividade das amostras foi determinada em contador gama e a massa determinada em balança analítica. Os percentuais de atividade injetada por órgão e por grama de tecido foram, então, calculados, conforme as equações a seguir.

$$\%AI/g = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{peso do órgão (g)} \times (\text{cpm padrão} - \text{cpm da cauda})} \times 100$$

EQ.3

Para cálculo da porcentagem de atividade injetada presente nos ossos (% AI / osso) e nos músculos (% AI / músculo) dos animais, retirou-se o fêmur e amostra do músculo da coxa dos camundongos, calculou-se a porcentagem de atividade por grama e assumiu-se o peso do esqueleto como 12% (EQ. 4) e dos músculos como 40 % (EQ. 5) do peso corpóreo do camundongo.

$$\%AI \text{ (osso total)} = \frac{\text{cpm fêmur} \times 12 \times \text{peso do camundongo (g)}}{\text{peso do fêmur (g)} \times (\text{cpm padrão} - \text{cpm na cauda})}$$

EQ. 4

$$\%AI \text{ (músculo total)} = \frac{\text{cpm músculo} \times 40 \times \text{peso do camundongo (g)}}{\text{peso do músculo (g)} \times (\text{cpm padrão} - \text{cpm na cauda})}$$

EQ. 5

#### 4.2.8 Análise estatística

Os resultados deste trabalho foram expressos como média e desvio padrão. A análise estatística foi realizada através do programa estatístico GraphPad Prism 5.00<sup>®</sup> (GraphPad Software, Inc., San Diego CA, EUA). Quando apenas dois grupos foram comparados utilizou-se o teste t de Student. A probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerada para mostrar diferenças significativas para todas as comparações feitas.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Para melhor apresentar a análise, os resultados serão apresentados levando-se em consideração o grupamento quelante.

### **5.1 Radiomarcção do derivado de bombesina acoplado ao DTPA (PG<sub>5</sub>M-DTPA)**

#### **5.1.1 Ensaio de pureza radioquímica**

A literatura mostra a análise do rendimento de marcação de peptídeos radiomarcados utilizando-se sistemas cromatográficos com diferentes suportes e solventes (Cuevas e cols, 2009; Koumarianoi e cols, 2009; Shimardi e cols, 2011; Araújo e cols, 2008).

Neste trabalho, foram avaliadas a cromatografia em papel, considerando-se a disponibilidade e o baixo custo, comparativamente à cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica gel, normalmente empregada na avaliação de pureza radioquímica de peptídeos radiomarcados. Os perfis do <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> observados nos diferentes sistemas cromatográficos estão representados nas figuras 5, 6 e 7.

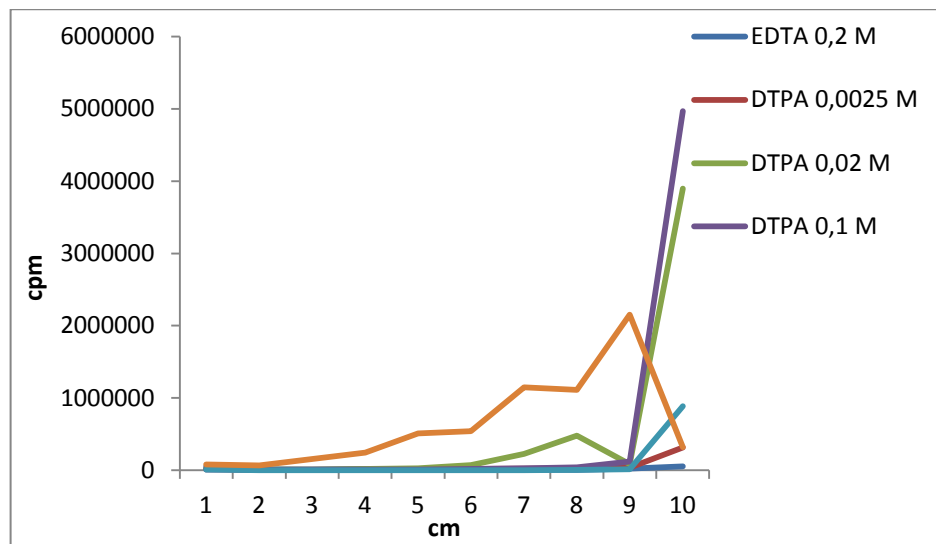


Figura 5 - Perfil cromatográfico do  $^{177}\text{LuCl}_3$  em papel Whatmann 3MM nos diferentes solventes estudados.

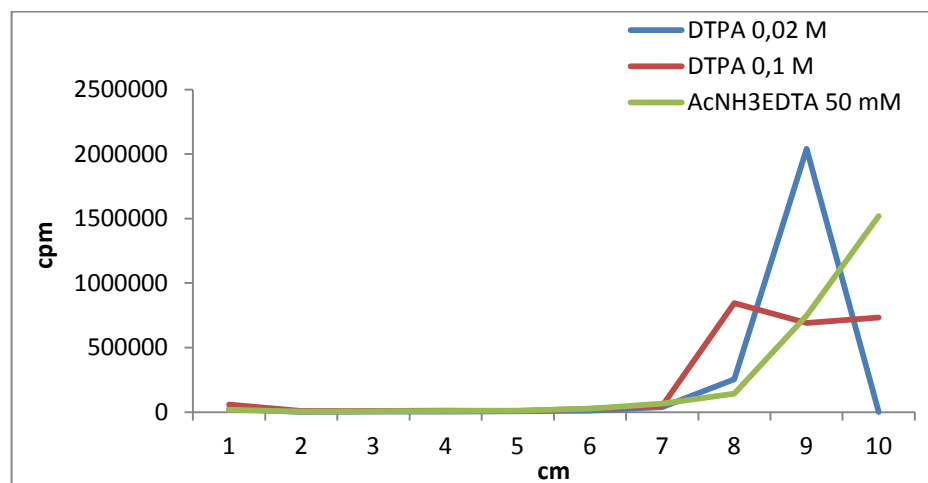


Figura 6 - Perfil cromatográfico do  $^{177}\text{LuCl}_3$  em papel Whatmann 1 MM nos diferentes solventes estudados.

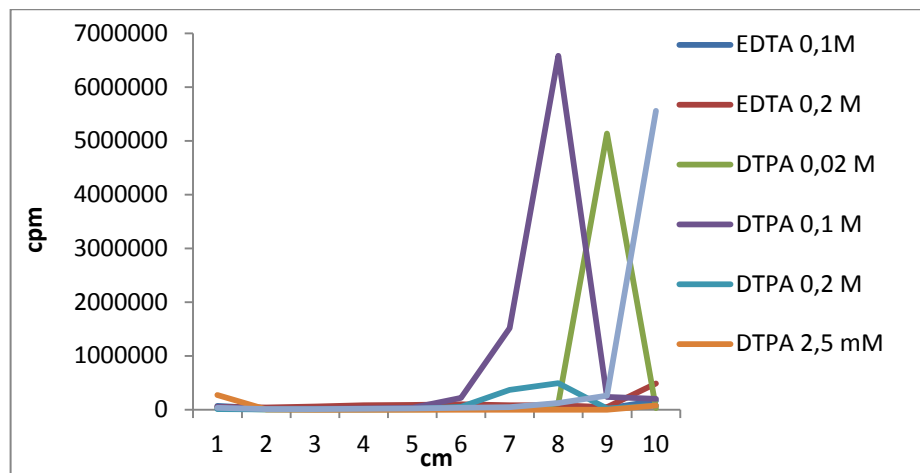


Figura 7 - Perfil cromatográfico do  $^{177}\text{LuC}_{13}$  em fitas de TLC-SG nos diferentes solventes estudados.

A análise do perfil cromatográfico do peptídeo  $\text{PG}_5\text{M-DTPA-}^{177}\text{Lu}$  também foi analisada em diferentes sistemas. Os perfis obtidos são mostrados na figura 8.

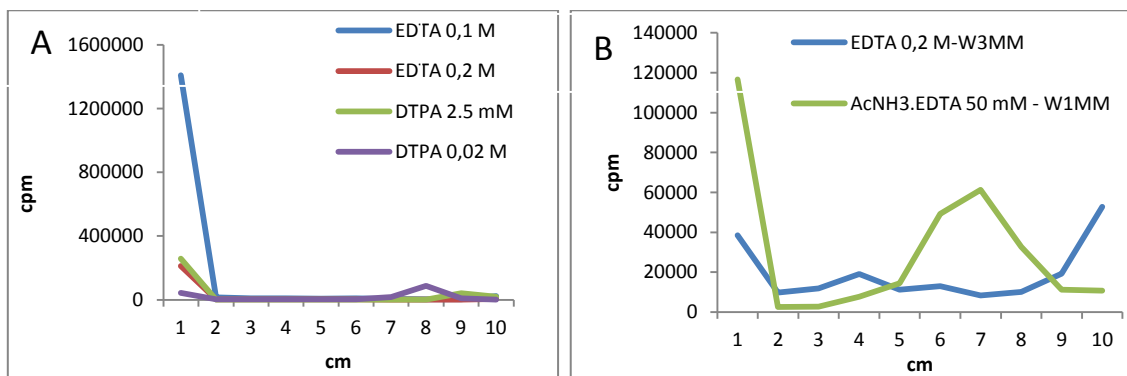


Figura 8 - Perfil cromatográfico do  $\text{PG}_5\text{M-DTPA-}^{177}\text{Lu}$  sendo em (A) – Fitas TLC-SG e (B) cromatografia em papel Whatmann 1MM e 3MM utilizando-se diferentes solventes.

Após analisar o perfil cromatográfico dos diferentes sistemas utilizados para determinação da pureza radioquímica das marcações, optou-se pela CCD, com utilização de fitas de TLC-SG como suporte e solução EDTA 0,2 M pH 5,0 como fase móvel, por permitir a migração do  $^{177}\text{Lu}$  juntamente com a frente de solvente sem promover arraste, enquanto o peptídeo radiomarcado permanece na origem da fita.

Nesse sistema, o  $^{177}\text{LuCl}_3$  (lutécio livre) migra com fator de retenção ( $R_f$ ) 0,8-1,0 como mostra o perfil cromatográfico na figura a seguir (figura 9).

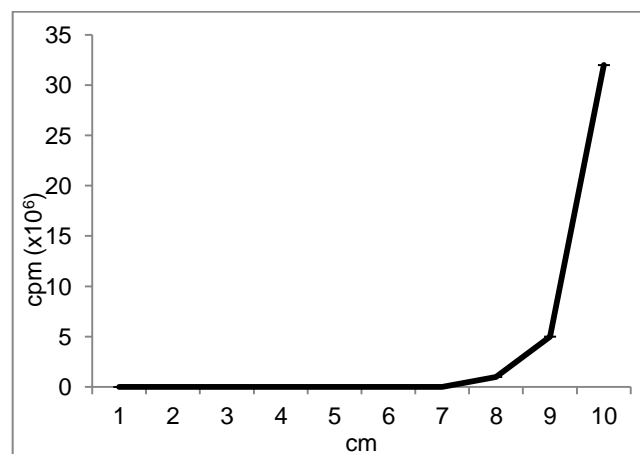


Figura 9 - Perfil cromatográfico do  $^{177}\text{LuCl}_3$  utilizando fita TLC-SG como suporte e solução EDTA 0,2 M pH 5,0 como solvente.

O perfil de cromatografia em camada delgada do marcador molecular  $\text{PG}_5\text{M-DTPA}$  radiomarcado com  $^{177}\text{LuCl}_3$  no sistema que utiliza fita TLC-SG como suporte e solução EDTA 0,2 M pH 5,0 como fase móvel é apresentado isoladamente na figura 10. Nesse sistema, ao contrário do  $^{177}\text{LuCl}_3$ , o radiofármaco permanece na origem da fita, com  $R_f$  0,0.

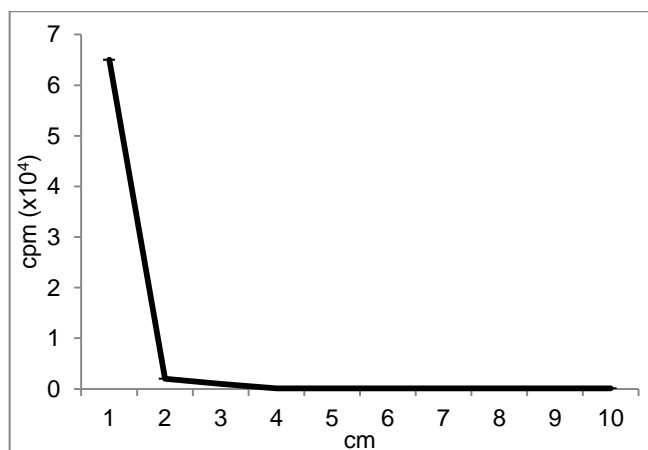


Figura 10 - Perfil cromatográfico da PG<sub>5</sub>M-DTPA-<sup>177</sup>Lu em CCD, utilizando fita de TLC-SG como suporte e solução EDTA 0,2M pH 5,0 como solvente.

Por promover completa separação entre o produto radiomarcado e o <sup>177</sup>Lu livre, o sistema de CCD em suporte de fita TLC-SG e utilizando EDTA 0,2 M pH 5,0 como fase móvel foi aplicado para determinação da pureza radioquímica das marcações nos demais experimentos envolvendo o peptídeo PG<sub>5</sub>M-DTPA.

### 5.1.2 Estudo da marcação de PG<sub>5</sub>M-DTPA com <sup>177</sup>Lu

Os estudos de radiomarcção da PG<sub>5</sub>M-DTPA com <sup>177</sup>Lu foram realizados com base nos estudos de Pujatti (Pujatti, 2009), utilizando-se tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5 como meio de marcação.

A primeira variável estudada durante o procedimento de radiomarcção foi a temperatura de reação.

Mantendo-se como condição padrão de marcação, a massa de 20 µg de peptídeo, atividade de 55,5 MBq (1,5 mCi) de <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> sob agitação leve de

350 rpm durante 30 minutos, pode-se observar, como mostra a tabela 3, que o procedimento de marcação obteve uma pureza radioquímica superior quando realizado sob aquecimento de 90° C.

Tabela 3 - Estudo da variação da temperatura de reação na marcação utilizando-se 20 µg do PG<sub>5</sub>M-BBN-DTPA com 55,5 MBq (1,5 mCi) de <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub>, 30 minutos e 350 rpm.

Temperatura de Reação (° C)	Pureza Radioquímica (%)
25	79,80 ± 13,51 (n=2)
40	90,42 ± 0,41 (n=2)
90	94,39 ± 0,58 (n=6)

A análise de variância de um fator mostrou diferença significativa em relação à porcentagem de pureza radioquímica quando comparadas as diferentes temperaturas de reação: 25, 40 e 90° C, [F(3,8) = 4,80; p < 0,003] (tabela 3). O teste de *post-hoc* de Bonferroni demonstrou que a porcentagem de pureza radioquímica obtida nas marcações à 90° C é significativamente superior à porcentagem obtida nas marcações com baixas temperaturas (25° C).

Estudos prévios descrevem que a radiomarcção de peptídeos quelados ao DTPA, com <sup>67</sup>Ga e <sup>177</sup>Lu, pode ser realizada à temperatura ambiente sem prejuízo para a pureza radioquímica (ZHANG et al., 2004). Entretanto, na marcação do derivado de bombesina conjugado ao DTPA, a marcação à temperatura ambiente apresenta grande variação no rendimento de marcação,



com valores médio em torno de 80% de pureza radioquímica. Melhores resultados foram obtidos com ligeiro aquecimento (40 ° C) ou ainda com aquecimento à 90 ° C, reproduzindo as condições utilizadas para marcação de peptídeos conjugados ao quelante DOTA.

Pujatti (2012) descreve a radiomarcção de um derivado da BBN quelado ao DTPA com  $^{111}\text{In}$  utilizando temperaturas entre 25° C e 55° C com excelentes resultados, diferentemente dos resultados obtidos neste estudo. Neste caso, possivelmente, a alta atividade específica do  $^{111}\text{In}$  utilizado tenha contribuído para os melhores rendimentos de marcação à temperatura de 25° C. Em virtude dos resultados obtidos utilizou-se a temperatura de 90° C nos experimentos seguintes.

Determinada a temperatura ótima para as reações, procedeu-se à avaliação da massa de PG<sub>5</sub>M-DTPA a ser radiomarcada e os resultados são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Estudo da variação da massa de PG<sub>5</sub>M-DTPA utilizada no procedimento de marcação, à temperatura de 90° C, 30 minutos sob agitação constante de 350 rpm e 55,5 MBq de  $^{177}\text{Lu}$  (1,5 mCi).

<b>Massa (µg)</b>	<b>Pureza Radioquímica (%)</b>
10	90,77 ± 2,04 (n=2)
20	94,39 ± 0,58 (n=6)
40	89,52 ± 9,59 (n=2)

A massa de 20 µg do peptídeo apresenta um rendimento superior quando comparado à utilização da massa de 10 µg do peptídeo [t(6)=4,49;p<0,004] (tabela 4). Esses resultados sugerem que a utilização de 20 µg do PG<sub>5</sub>M-DTPA é adequada para obter um rendimento de marcação superior à 90%. O aumento da massa para 40 µg não resultou em incremento da pureza radioquímica da marcação e acarretaria a diminuição da afinidade específica do produto.

A massa de peptídeo utilizada na reação de marcação é um dado muito importante a ser avaliado. Deve-se utilizar na marcação uma massa suficiente para que ocorra a radiomarkação, mas não em excesso que possa competir com os receptores de células tumorais, impedindo ou diminuindo a ligação às células tumorais do peptídeo radiomarcado. O radiofármaco (RF) com característica desejável para aplicação *in vivo* deve possuir alta atividade específica (AE) sendo esta a relação entre a atividade do radioisótopo pela massa do peptídeo, pois quanto menor a atividade específica do radiofármaco, maior a massa de peptídeo frio que irá competir pelos receptores das células tumorais.

Os resultados obtidos no estudo de variação da massa são semelhantes aos obtidos por Pujatti e cols nas marcações com <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> do mesmo derivado de bombesina, porém quelado ao quelante DOTA. Já na radiomarkação com <sup>111</sup>In do derivado PG<sub>5</sub>M-DTPA o mesmo autor relata, que a massa de 10 µg do peptídeo é suficiente para se obter uma porcentagem de pureza radioquímica superior à 95% (PUJATTI, 2012). Também neste caso, massas maiores foram requeridas para marcação com lutécio-177, quando comparado com as marcações com índio-111, tendo em vista que o lutécio-177 utilizado, proveniente do processo de obtenção por reação (n,γ) a partir do alvo de

$^{176}\text{Lu}$  (IDB), apresenta atividade específica baixa quando comparado com o índio-111, produto isento de carregador.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, optou-se por utilizar a massa de 20  $\mu\text{g}$  de peptídeo nas marcações do  $\text{PG}_5\text{M-DTPA}$  com  $^{177}\text{Lu}$ .

O procedimento padrão de reação descrito utiliza 30 minutos de reação para radiomarkação dos derivados de bombesina. Mantendo-se então como padrão a massa de 20  $\mu\text{g}$  de peptídeo e a temperatura de  $90^\circ\text{C}$ , realizou-se o estudo de variação do tempo de marcação. A tabela 5 a seguir, mostra os resultados obtidos neste experimento, para duas atividades diferentes.

Tabela 5 - Estudo de variação do tempo e atividade de reação na radiomarkação do  $\text{PG}_5\text{M-DTPA}$  com  $^{177}\text{LuCl}_3$ , utilizando-se 20  $\mu\text{g}$  de peptídeo à  $90^\circ\text{C}$ .

<b>Atividade de Marcação</b>	<b>Tempo de Reação</b>	<b>Pureza Radioquímica</b>
<b>(MBq / mCi)</b>	<b>(min)</b>	<b>(%)</b>
55,5 / 1,5	15	91,32 $\pm$ 3,07 (n=4)
	30	94,39 $\pm$ 0,58 (n=6)
	45	90,40 $\pm$ 0,07 (n=2)
	60	93,02 $\pm$ 0,96 (n=2)
111 / 3,0	15	92,08 $\pm$ 1,11 (n=2)
	30	98,70 $\pm$ 0,72 (n=5)
	45	87,36 $\pm$ 2,47 (n=2)
	60	89,83 $\pm$ 1,78 (n=2)

A análise de variância de duas vias não revelou efeito significativo do fator atividade de marcação (55 ou 111 MBq / 1,5 ou 3,0 mCi) e do fator tempo de reação (15, 30, 45 e 60 minutos). Assim como também não apresentou efeito significativo para interação entre os fatores. Quando analisamos separadamente os dados, a análise de variância de uma via não revelou diferença significativa em relação à porcentagem de pureza radioquímica ( $p > 0,05$  - tabela 5).

Os resultados obtidos neste experimento mostram que a variação do tempo de reação não influencia significativamente na porcentagem de pureza radioquímica obtida no procedimento de marcação. Entretanto, para uma rotina de produção, considerando-se a meia-vida do lutécio-177 de aproximadamente 7 dias, o tempo de 30 minutos de reação é adequado. Sendo assim optou-se por utilizar o tempo de 30 minutos no procedimento de reação dos estudos subsequentes.

No estudo de variação da atividade, os resultados obtidos indicaram que a porcentagem de pureza radioquímica obtida para 55,5 MBq (1,5 mCi) não foram reproduzidos com 111 MBq (3,0 mCi), particularmente para tempos maiores de reação, indicando possível efeito de radiólise ou influência do tempo de aquecimento utilizado.

Tais resultados preliminares sugeriram realizar estudo de variação da atividade de cloreto de lutécio adicionado na reação, variando a mesma de 18,5 à 555 MBq (0,5 mCi até 15 mCi). Os resultados obtidos são demonstrados na tabela 6.

Tabela 6 - Estudo da variação da atividade de marcação do PG<sub>5</sub>M-DTPA com <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub>, mantendo como padrão 20 µg de peptídeo, 90° C, 30 minutos sob agitação de 350 rpm.

<b>Atividade de Marcação (MBq/mCi)</b>	<b>Atividade específica (MBq/µg / mCi/µg)</b>	<b>Pureza Radioquímica (%)</b>
18,5 / 0,5	0,93 / 0,025	97,89 ± 0,74 (n=2)
55,5 / 1,5	2,78 / 0,075	94,39 ± 0,58 (n=6)
111 / 3,0	5,55 / 0,15	98,70 ± 0,72 (n=5)
185 / 5,0	9,25 / 0,25	98,37 ± 0,15 (n=3)
333 / 9,0	16,65 / 0,45	93,36 ± 5,13 (n=2)
555 / 15,0	27,75 / 0,75	9,69 ± 0,70 (n=2)

Quando variou-se a atividade de marcação de 18,5 a 333 MBq (0,5 a 9,0 mCi) observou-se pureza radioquímica superior à 90%. Este estudo indica que as marcações resultaram em alta pureza radioquímica quando a atividade específica variou de 0,93 MBq / µg a 16,65 MBq / µg. Porém, ao se utilizar 555 MBq (15 mCi) na marcação (AE = 27,75 MBq / µg) a pureza radioquímica observada caiu drasticamente, sendo da ordem de 10%.

A análise de variância de uma via mostrou diferença significativa em relação à porcentagem de pureza radioquímica quando comparada à marcação

de 20  $\mu\text{g}$  de peptídeo para todas as atividades de marcação [F(5,12)=467;p<0,0001]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni revelou que a atividade de marcação de 55,5 MBq apresentou diferença significativa na porcentagem de pureza radioquímica quando comparado à atividade de marcação de 111, 185, 333 e 555 MBq (3,0; 5,0; 9,0 e 15 mCi), respectivamente.

A partir deste estudo considera-se a atividade específica máxima de 16,5 MBq /  $\mu\text{g}$  (0,45 mCi /  $\mu\text{g}$ ) para ser utilizada nos estudos de marcação que requeiram a obtenção do peptídeo radiomarcado com alta atividade específica, como no caso de avaliar a porcentagem de ligação do radiofármaco à receptores específicos *in vitro*. Entretanto, isso depende dos resultados do estudo de estabilidade, uma vez que o aumento da atividade específica pode contribuir para o aumento do efeito de radiólise sobre as moléculas radiomarcadas.

Foi realizada a análise em CLAE do peptídeo radiomarcado. O perfil obtido é mostrado na figura 12, bem como o perfil para o  $^{177}\text{LuCl}_3$  (figura 11). O lutécio livre apresenta um pico com um tempo de retenção de aproximadamente 1,8 minutos, enquanto o peptídeo radiomarcado apresenta um tempo de retenção maior de aproximadamente 15 minutos.

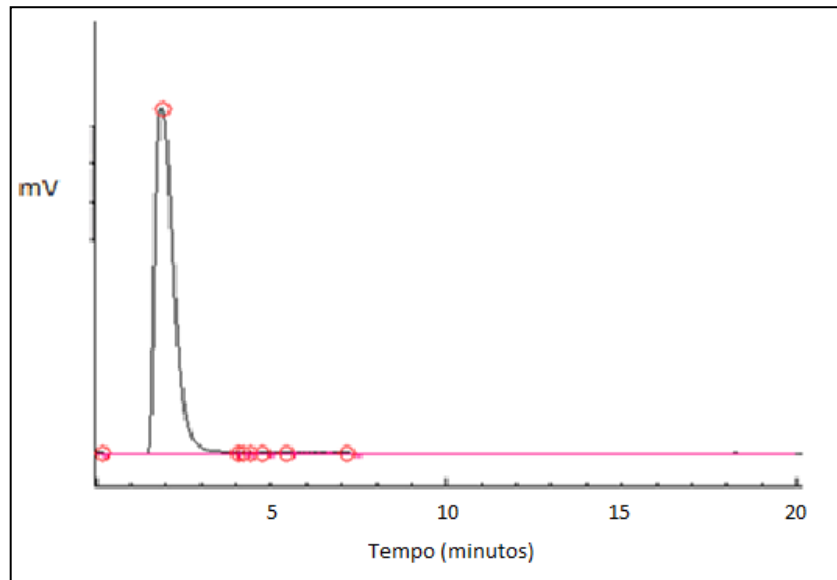


Figura 11 - Perfil de CLAE do  $^{177}\text{LuCl}_3$  em uma coluna de fase reversa  $\text{C}_{18}$ , com um gradiente linear de 10 a 90 % (v/v) de TFA: $\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1000 v/v) em TFA: $\text{H}_2\text{O}$  (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos.

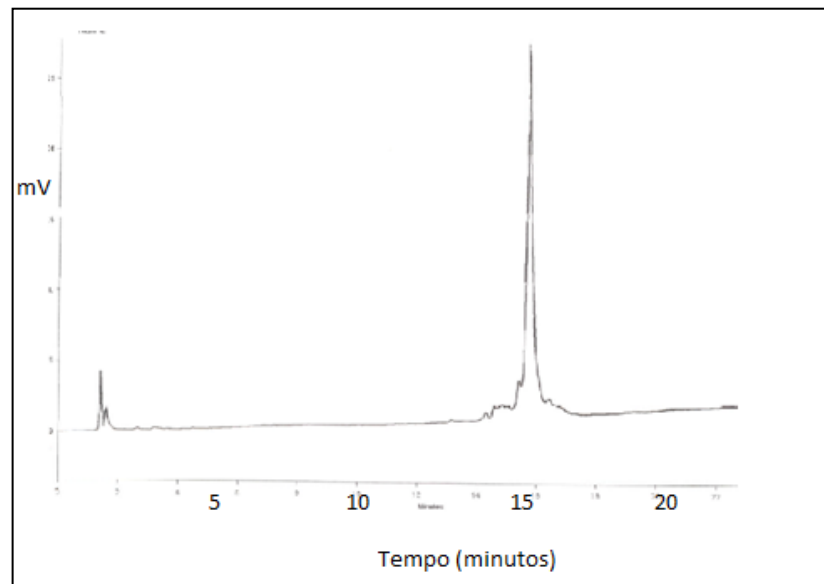


Figura 12 - Perfil de CLAE do derivado de bombesina  $\text{PG}_5\text{M-DTPA-}^{177}\text{Lu}$  em uma coluna de fase reversa  $\text{C}_{18}$ , com um gradiente linear de 10 a 90 % (v/v) de TFA: $\text{CH}_3\text{CN}$  (1:1000 v/v) em TFA: $\text{H}_2\text{O}$  (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 25 minutos.

### 5.1.3 Análise da Estabilidade do PG<sub>5</sub>M-DTPA-<sup>177</sup>Lu

#### 5.1.3.1 Estabilidade do PG<sub>5</sub>M-DTPA-<sup>177</sup>Lu armazenado à 2 – 8° C

Os resultados da análise de estabilidade do peptídeo PG<sub>5</sub>M-DTPA-<sup>177</sup>Lu com diferentes atividades específicas sob armazenamento a 2 - 8° C mostraram que o produto apresenta pureza radioquímica superior a 90% por até 24 horas e superior a 80 % por até 5 dias nas marcações com menores atividades específicas (figura 13).

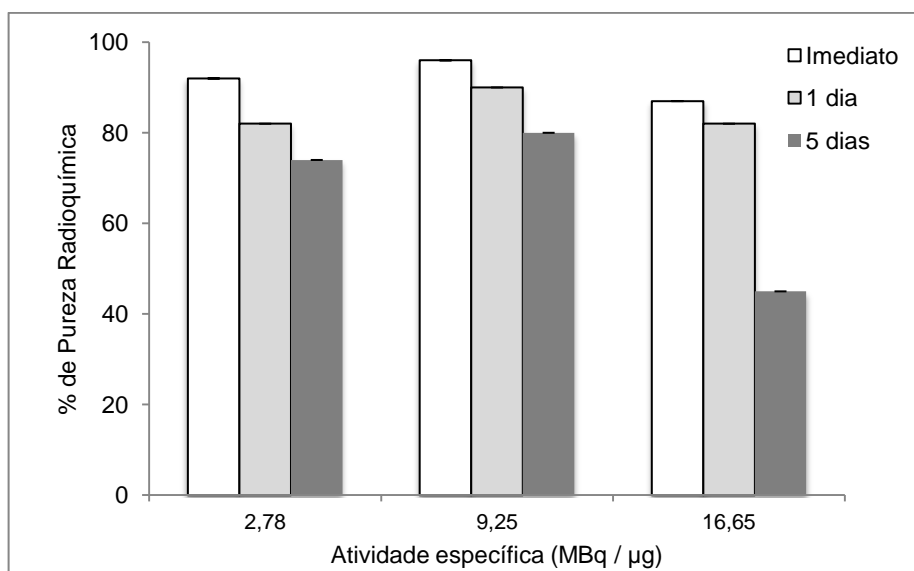


Figura 13 - Estudo em CCD da estabilidade do peptídeo PG<sub>5</sub>M-DTPA radiomarcado com <sup>177</sup>Lu com diferentes atividades específicas e armazenado à temperatura 2 - 8° C por até 5 dias, resultados expressos em porcentagem de pureza radioquímica.



A partir destes resultados pode-se observar que o produto radiomarcado com a maior atividade específica possui menor estabilidade frente ao armazenamento. Possivelmente, esta menor estabilidade é resultado do efeito da radiólise que se acentua com o aumento da atividade específica do peptídeo radiomarcado.

Este estudo de estabilidade demonstra que a atividade específica máxima a ser utilizada é de 9,25 MBq /  $\mu\text{g}$  (0,25 mCi /  $\mu\text{g}$ ) garantindo maior estabilidade ao produto.

#### **5.1.3.2 Estabilidade do PG<sub>5</sub>M-DTPA-<sup>177</sup>Lu em plasma humano**

Para análise da estabilidade em soro humano, o marcador molecular radiomarcado com atividade específica de 2,78 MBq /  $\mu\text{g}$  (0,075 mCi /  $\mu\text{g}$ ) foi diluído em plasma humano fresco e os perfis cromatográficos em CCD foram examinados, após 15 minutos, 1, 4 e 24 horas após incubação à 37° C, e utilizados para calcular a porcentagem do marcador molecular íntegro em cada tempo.

A maior estabilidade dos derivados radiomarcados no soro pode refletir uma maior quantidade do radiofármaco intacto presente na área do tumor, aumentando a probabilidade de ligação à superfície das células tumorais. A figura 14 abaixo mostra os resultados de estabilidade em soro humano obtidos para o peptídeo PG<sub>5</sub>M-DTPA radiomarcado com <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub>.

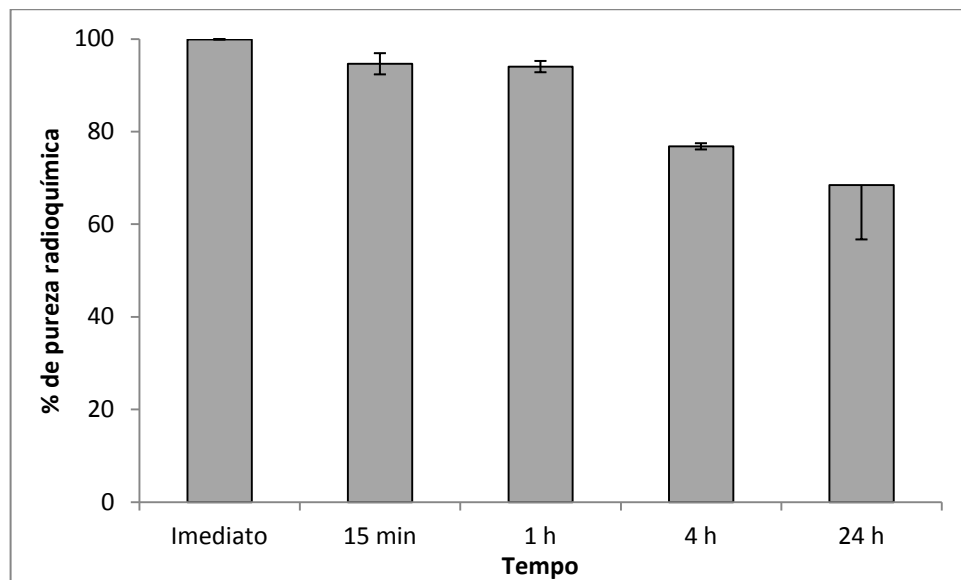


Figura 14 - Resultados do estudo de estabilidade em soro humano (CCD) do derivado  $\text{PG}_5\text{M-DTPA-}^{177}\text{Lu}$  em diferentes tempos ( $n=4$ ) expresso em porcentagem de pureza radioquímica.

Pode-se observar com os resultados obtidos que o produto mantém estabilidade superior a 90 % por apenas 1 hora. Esta estabilidade vai diminuindo com o passar do tempo, chegando até 70% em 24 hs. Okarvi e Jammaz (2012) relatam a análise da estabilidade em plasma humano *in vitro*, em um estudo realizado com o derivado da bombesina  $\text{MAG}_3\text{-X-BBN}$  radiomarcado com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Análises realizadas em CLAE revelaram que mais de 88 % da radioatividade permanece ligada ao peptídeo por até 4 horas de incubação, mostrando uma alta atividade metabólica do peptídeo radiomarcado (Okarvi, S.M.; Jammaz, I.A., 2012).

Pujatti (2012) avaliou o mesmo derivado da bombesina acoplado ao DTPA radiomarcado com In-111. Os resultados obtidos na análise de estabilidade (CLAE) em soro humano *in vitro* mostram que o produto tem uma estabilidade

superior à 90% nos primeiros 15 minutos. Esta estabilidade vai decaindo com o tempo, chegando a aproximadamente 10% após 24 horas.

Os valores de estabilidade obtidos neste trabalho demonstram que o peptídeo PG<sub>5</sub>M-DTPA radiomarcado ao <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> é relativamente estável em soro. Considerando-se que seu clareamento sanguíneo deve ser rápido, espera-se que o peptídeo permaneça intacto até ligar-se aos receptores tumorais.

### 5.1.3.3. Estudo de ligação do PG<sub>5</sub>M-DTPA-<sup>177</sup>Lu às proteínas plasmáticas

A partir dos resultados da análise de ligação às proteínas do PG<sub>5</sub>M-DTPA radiomarcado com <sup>177</sup>Lu pode-se observar, na figura 15, que a ligação às proteínas plasmáticas é relativamente baixa, ficando em torno de 10 % nas primeiras 4 horas. Esta característica é importante para permitir um rápido clareamento sanguíneo e evitar o metabolismo do radiofármaco pelas enzimas do soro *in vivo*.

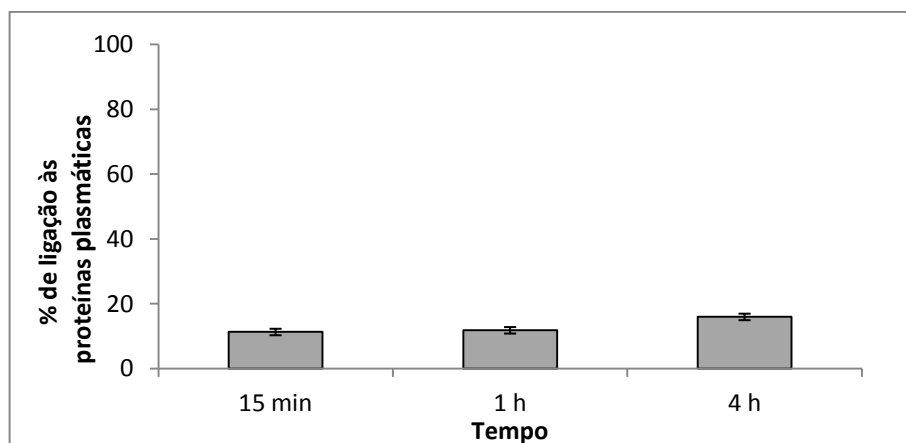


Figura 15 - Estudo da porcentagem de ligação do peptídeo radiomarcado PG<sub>5</sub>M-DTPA-<sup>177</sup>Lu às proteínas plasmáticas realizado em diferentes tempos (n=4).

## 5.2 Radiomarcção dos derivados de bombesina conjugados ao DOTA

### 5.2.1 Determinação do sistema de cromatografia em camada delgada (CCD)

O perfil de migração do  $^{177}\text{LuCl}_3$  em cromatografia de camada delgada foi estudado em diferentes sistemas, conforme descrito anteriormente no item 4.1.1. Nas marcações dos derivados de BBN com DOTA como agente quelante, pode-se observar que o uso do tampão citrato como fase móvel (Figura 16) apresentou boa eficiência na separação das diferentes espécies radioquímicas nas marcações com  $^{177}\text{Lu}$ , do que quando utilizou-se a solução de EDTA (resultado não apresentado), que se mostrou mais eficiente nas marcações do derivado de BBN acoplado ao DTPA.

Conseqüentemente, optou-se por utilizar, para o sistema de CCD, como suporte fita TLC-SG e como fase móvel tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0, que promoveu completa separação entre o produto radiomarcado e o  $^{177}\text{Lu}$  livre, para determinação da pureza radioquímica das marcações, sendo este sistema definido para os demais experimentos. Nesse sistema, o  $^{177}\text{LuCl}_3$  migra para o final da fita com o solvente ( $R_f$  0,7 à 0,9) e, o radiofármaco permanece na origem da fita, com  $R_f$  0,0.

O perfil de cromatografia em camada delgada do  $^{177}\text{LuCl}_3$  e dos derivados da BBN radiomarcado com  $^{177}\text{LuCl}_3$  no sistema descrito é apresentado, respectivamente, nas figuras 16, 17 e 18 a seguir.

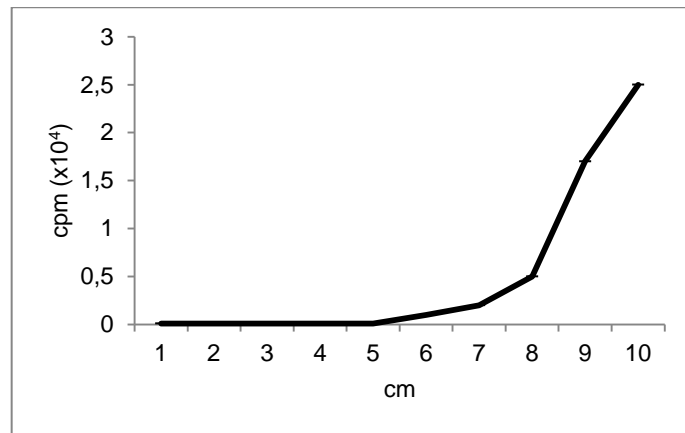


Figura 16 - Perfil cromatográfico (CCD) do  $^{177}\text{LuCl}_3$  utilizando TLC-SG como suporte e tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0.

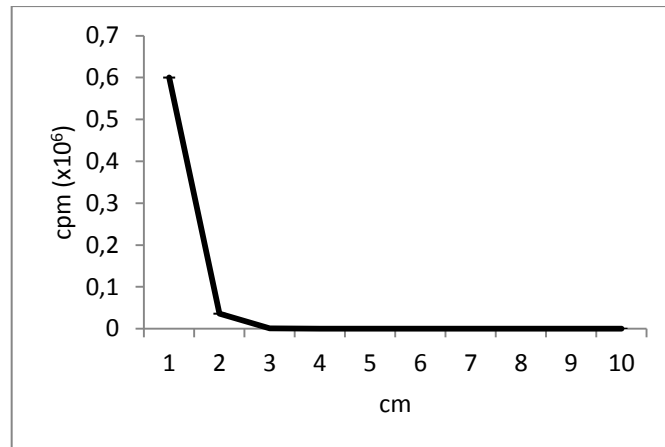


Figura 17 - Perfil cromatográfico (CCD) do  $\text{PG}_5\text{M-DOTA-}^{177}\text{Lu}$  utilizando TLC-SG como suporte e tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0.

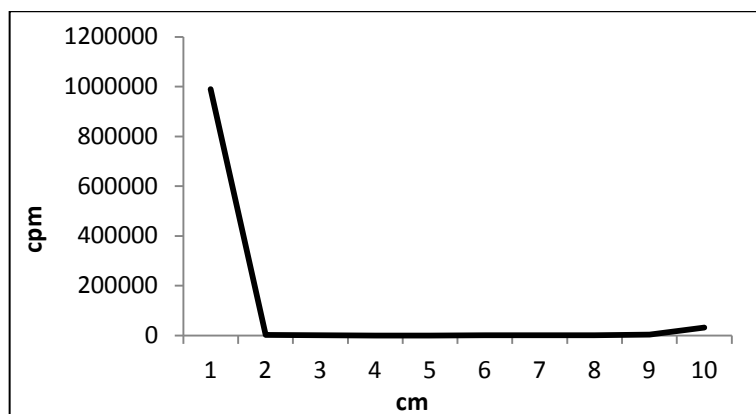


Figura 18 - Perfil cromatográfico (CCD) do PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu utilizando TLC-SG como suporte e tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0.

### 5.2.2 Estudo de marcação

A reação de marcação foi estudada variando-se a massa dos peptídeos DOTA-conjugados PG<sub>5</sub>M-DOTA, PG<sub>5</sub>N-DOTA (10, 20 e 40 µg), a atividade de cloreto de lutécio (18,5 à 629 MBq) e tempo de reação (30 e 60 minutos), sob agitação constante à temperatura de 90° C. Os resultados da pureza radioquímica das reações, determinadas por TLC-SG, são demonstrados separadamente nos itens a seguir.

A análise por CLAE foi realizada para o <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub>, conforme citado na figura 11 anteriormente, e também realizada com os peptídeos DOTA-conjugados radiomarcados. Os perfis obtidos encontram-se representados nas figuras 19 e 20 a seguir.

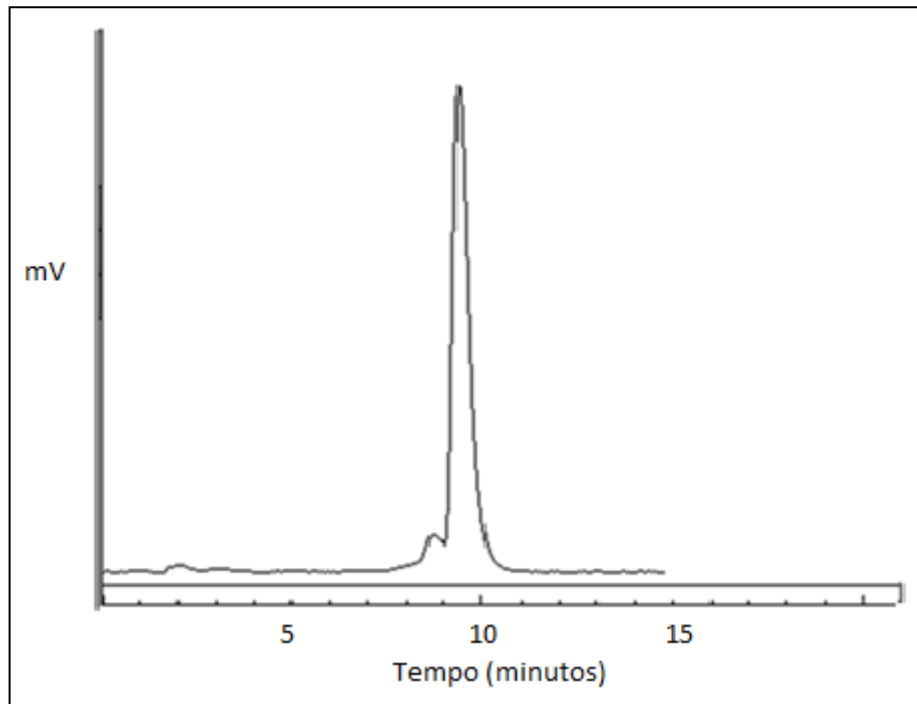


Figura 19 - Perfil em CLAE do derivado de bombesina PG<sub>5</sub>M-DOTA radiomarcado com <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> em uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub>, com um gradiente linear de 10 a 90 % (v/v) de TFA:CH<sub>3</sub>CN (1:1000 v/v) em TFA:H<sub>2</sub>O (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL / minuto por 15 minutos.

O tempo de retenção do <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> foi de 1,8 minutos (Figura 11) e do derivado radiomarcado PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu foi de 9,4 minutos.

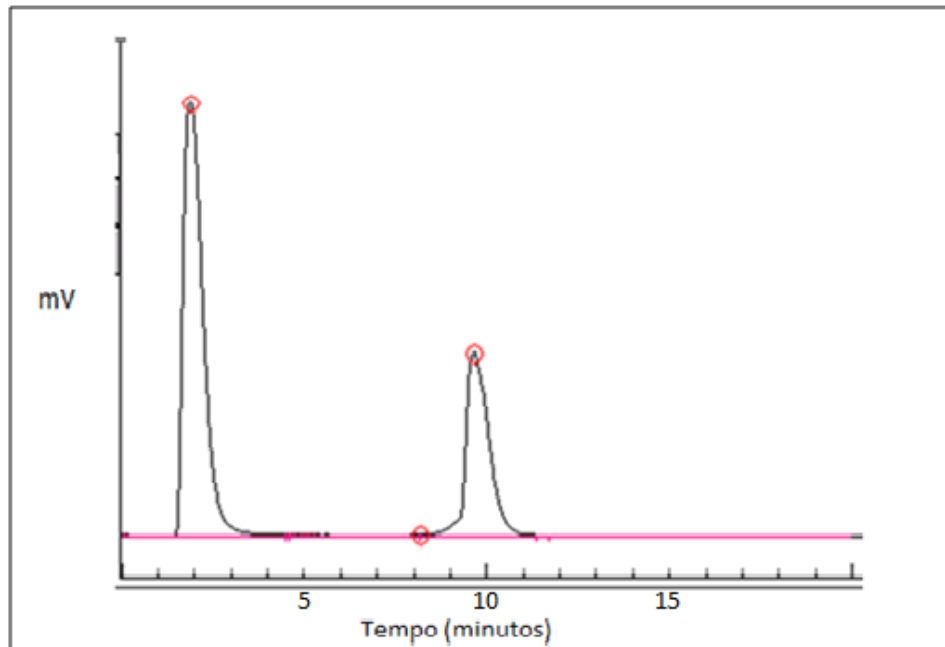


Figura 20 - Perfil em CLAE do derivado de bombesina PG<sub>5</sub>N-DOTA radiomarcado com <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> em uma coluna de fase reversa C<sub>18</sub>, com um gradiente linear de 10 a 90 % (v/v) de TFA:CH<sub>3</sub>CN (1:1000 v/v) em TFA:H<sub>2</sub>O (1:1000 v/v) a um fluxo de 1,5 mL/minuto por 15 minutos.

A figura 20 ilustra o perfil de CLAE da radiomarcção do PG<sub>5</sub>N-DOTA com <sup>177</sup>Lu que resultou em baixo rendimento de marcação, apresentando elevada porcentagem de lutécio livre. O tempo de retenção do <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> foi de 1,8 minutos e do derivado radiomarcado PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu foi de 9,6 minutos.

Sempre que um peptídeo radiomarcado resultou em um rendimento de marcação inferior à 95%, ele foi submetido ao processo de purificação para aumentar a pureza radioquímica da marcação.

A purificação foi realizada como descrito por Zhang e cols (2004) utilizando-se uma coluna Sep-Pak com cartucho C<sub>18</sub> pré-condicionado. A figura a seguir ilustra as frações de eluição obtidas no processo de purificação por Sep-



Pak de duas diferentes marcações do derivado PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu em que não se obteve bons resultados de rendimento de marcação.

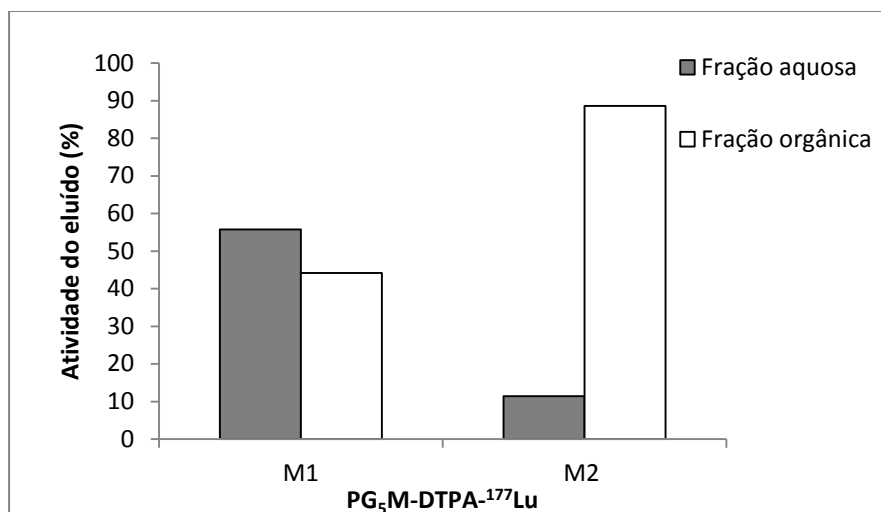


Figura 21 - Frações de purificação das misturas de duas diferentes marcações do peptídeo PG<sub>5</sub>M-<sup>177</sup>Lu eluídos em coluna Sep-Pak C<sub>18</sub> previamente condicionada, atividades determinadas em calibrador de atividade.

O sistema utilizado para purificação dos peptídeos radiomarcados mostrou-se eficiente na remoção do lutécio livre de preparação, que foi eluído na fração aquosa.

### 5.2.2 Estudo da marcação dos derivados de BBN-DOTA-conjugados com <sup>177</sup>Lu

Diversos derivados de bombesina quelados ao quelante DOTA, incluindo o PG<sub>5</sub>M-DOTA foram previamente estudados no Centro de Radiofarmácia do IPEN, e o procedimento de marcação com <sup>177</sup>Lu que resultou em melhores resultados de pureza radioquímica foi aquele que utilizou 20 µg do

peptídeo, reagindo com até 92,5 MBq (2,5 mCi) de cloreto de lutécio durante 30 minutos com agitação de 350 rpm sob a temperatura de 90° C (PUJATTI, 2009).

Tendo em vista estes resultados prévios, neste trabalho adotou-se esta condição de marcação para todos os derivados de BBN-DOTA-conjugados, porém com o cuidado de avaliar a influência de atividade específica no rendimento de marcação e na estabilidade dos peptídeos estudados (Tabela 7 , 8).

Este estudo é importante pois possibilita avaliar a influência da atividade específica no rendimento de marcação sendo o ponto de partida para definição das condições de marcação envolvendo atividades maiores do radioisótopo, compatíveis com a produção do radiofármaco para aplicações clínicas. A análise de variância de uma via não revelou diferença significativa entre as diferentes massas de PG<sub>5</sub>M-DOTA analisadas ( $p > 0,05$  - tabela 7).

Tabela 7 - Estudo da variação da atividade de  $^{177}\text{LuCl}_3$  na radiomarcação do PG<sub>5</sub>M-DOTA, mantendo como padrão 20  $\mu\text{g}$  de peptídeo, reagindo por 30 minutos sob agitação de 350 rpm à temperatura de 90° C.

<b>Atividade de <math>^{177}\text{LuCl}_3</math> (MBq / mCi)</b>	<b>Atividade específica (MBq/<math>\mu\text{g}</math> / mCi/<math>\mu\text{g}</math>)</b>	<b>Pureza Radioquímica (%)</b>
55,5 / 1,5	2,78 / 0,075	91,69 $\pm$ 8,46 (n=9)
92,5 / 2,5	4,63 / 0,125	92,36 $\pm$ 3,93 (n=10)
185 / 5,0	9,25 / 0,25	98,86 $\pm$ 0,08 (n=2)
259 / 7,0	12,95 / 0,35	98,97 $\pm$ 0,24 (n=2)
370 / 10,0	18,50 / 0,50	97,00 $\pm$ 0,02 (n=2)
444 / 12,0	22,20 / 0,60	97,24 $\pm$ 0,44 (n=2)

Tabela 8 - Estudo da variação da atividade de marcação do PG<sub>5</sub>N-DOTA com <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub>, mantendo como padrão 20 ug de peptídeo, 90° C, 30 minutos sob agitação de 350rpm.

<b>Atividade de marcação (MBq / mCi)</b>	<b>Atividade Específica (MBq/μg / mCi/μg)</b>	<b>Pureza Radioquímica (%)</b>
18,5 / 0,5	0,93 / 0,025	77,18 ± 9,00 (n=2)
55,5 / 1,5	2,78 / 0,075	83,17 ± 8,42 (n=15)
111 / 3,0	5,55 / 0,15	85,42 ± 6,57 (n=8)
185 / 5,0	9,25 / 0,25	96,34 ± 3,36 (n=9)
333 / 9,0	16,65 / 0,45	85,39 ± 15,81 (n=2)
370 / 10,0	18,50 / 0,50	94,25 ± 5,72 (n=6)
444 / 12,0	22,20 / 0,60	90,55 ± 7,87 (n=2)
555 / 15,0	27,75 / 0,75	78,13 ± 27,19 (n=2)
629 / 17,0	31,45 / 0,85	74,46 ± 2,78 (n=2)

Os resultados deste estudo são semelhantes aos obtidos para o derivado de BBN quelado ao DTPA, ou seja, bons resultados de pureza radioquímica (superior a 90 %) são obtidos para marcações com atividade específica de até 18,5 MBq / μg, ou seja, para marcação com até 10 mCi para 20 μg de peptídeo.

A atividade de <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub> incorporada por unidade de massa dos peptídeos, ou seja, a atividade específica das moléculas radiomarcadas, é uma grandeza importante do ponto de vista de desenvolvimento de novos radiofármacos. É desejável que a atividade específica seja alta, principalmente no caso de radiofármacos para aplicação em terapia radioisotópica, a fim de evitar a toxicidade decorrente dos efeitos fisiológicos provocados pela ligação das moléculas carreadoras aos seus receptores *in vivo* (Thrall e Ziessman, 2003). A

atividade específica dos derivados da bombesina radiomarcados descritos na literatura é variável, estando em sua maioria compreendida entre 1 e 10 GBq /  $\mu\text{mol}$ , ou seja de 0,92 e 9,25 MBq /  $\mu\text{g}$  (Pujatti, 2009). Considerando-se esta faixa, a atividade específica obtida para os derivados da bombesina radiomarcados com  $^{177}\text{Lu}$  pode ser considerada alta e adequada para a aplicação em estudos pré-clínicos.

### **5.2.3 Estudo de estabilidade dos derivados de bombesina conjugados ao DOTA**

#### **5.2.3.1 Estabilidade dos DOTA-conjugados radiomarcados armazenados a 2-8 ° C**

A estabilidade dos derivados de bombesina conjugados com DOTA radiomarcados com  $^{177}\text{Lu}$ , com atividade específica de 4,63 MBq /  $\mu\text{g}$  foi analisada após armazenamento a 2-8° C por até 7 dias. A pureza radioquímica dos produtos foi determinada por meio de cromatografia em camada delgada em fitas de TLC-SG. Os derivados DOTA-conjugados estudados apresentaram alta estabilidade nessa temperatura, como mostra a figura 22, na qual a pureza radioquímica foi, em geral, igual ou superior a 90% por até 72 horas e, igual ou superior a 85% por até 7 dias após a radiomarcção. A pureza radioquímica maior que 95% pode ser estabelecida como critério de aceitação para a aplicação clínica, tendo em vista a pequena porcentagem de radioisótopo livre. Nos peptídeos estudados neste trabalho a pureza superior à 95% foi observada por até 48 horas de marcação, quando o peptídeo fica armazenado sob refrigeração.

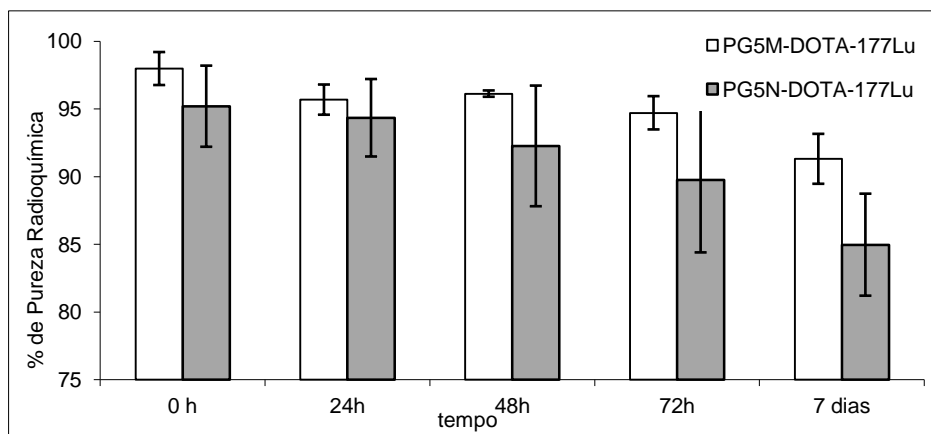


Figura 22 - Estabilidade dos derivados de bombesina conjugados ao DOTA radiomarcados com lutécio-177 avaliada por CCD (TLC-SG) após armazenamento a 2 - 8° C por diferentes tempos (n=3), resultados expressos em % de pureza radioquímica.

O derivado PG<sub>5</sub>M-DOTA foi previamente estudado pelo nosso grupo de pesquisa radiomarcado ao <sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub>, conforme citado anteriormente, e os resultados de estabilidade, no qual o autor relata cerca de 98 % de pureza radioquímica no controle imediato, decaindo para aproximadamente 91 % depois de 7 dias, correspondem aos resultados de estabilidade obtidos em nosso trabalho.

A análise estatística revelou efeito significativo do fator radiofármacos (PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu, PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu [F(2,40) = 10,21; p < 0,0003] e do fator tempo (0h, 24h, 48h, 72h e 7dias) [F(4,40) = 17,42; p < 0,0001] (figura 22). Quando comparamos o fator radiofármaco o teste de post-hoc de Bonferroni revelou que o radiofármaco PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu apresentou uma diminuição significativa da porcentagem de pureza radioquímica quando comparado ao

radiofármaco PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu nos tempos de 2 e 7 dias. Na análise intra-grupo, o teste de post-hoc de Bonferroni revela que o radiofármaco PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu apresentou uma diminuição da porcentagem de pureza radioquímica com 7 dias quando comparado com o 0h e 48h, já o radiofármaco PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu apresentou uma diminuição da porcentagem de pureza radioquímica com 7 dias quando comparado com o 0h, 24h e 48h.

### 5.2.3.2 Estabilidade dos DOTA-conjugados radiomarcados em soro humano a 37° C

A estabilidade dos derivados radiomarcados armazenados em soro humano foi analisada por até 4 horas conforme ilustrado na figura 23.

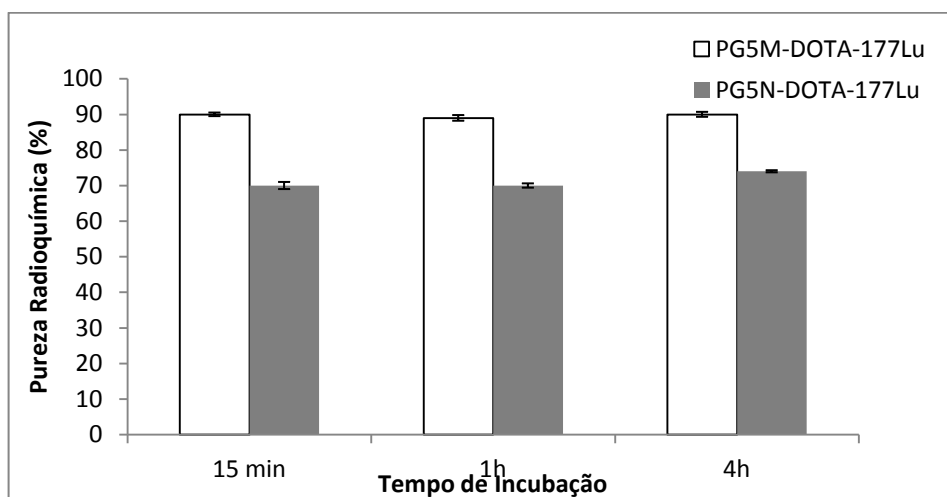


Figura 23 - Estabilidade dos derivados de bombesina DOTA-conjugados radiomarcados com lutécio -177 avaliada por CCD (TLC-SG) incubados em soro humano, a 37° C por diferentes tempos (PG<sub>5</sub>M-DOTA n=3 e PG<sub>5</sub>N-DOTA n=4), resultados expressos em porcentagem de pureza radioquímica.

A análise de variância de duas vias revelou somente efeito do radiofármaco ( $\text{PG}_5\text{M-DOTA-}^{177}\text{LuCl}_3$  ou  $\text{PG}_5\text{N-DOTA-}^{177}\text{LuCl}_3$ ) [ $F(1,15)=9,05;p<0,009$ ]. Não revelou efeito do fator tempo de incubação (15 min, 1 e 4 horas), assim como também não houve interação entre os fatores radiofármaco e tempo de incubação. ( $p>0,05$ ). Esse resultado demonstra que houve diferença significativa entre os radiofármacos, porém não houve diferença no decorrer do tempo para ambos os grupos.

Garanoya e colaboradores (2007) afirmam que a estabilidade dos derivados pode ser aumentada pela substituição dos aminoácidos Leu<sup>13</sup> e/ou Met<sup>14</sup> por aminoácidos artificiais, tais como ciclohexilalanina (Cha) ou norleucina (Nle). Os resultados obtidos neste estudo mostraram que a substituição da metionina (Met) pela norleucina (Nle) dá origem a um derivado estável, que corresponde ao derivado  $\text{PG}_5\text{N-DOTA-}^{177}\text{Lu}$ . Mesmo tendo sido obtida uma porcentagem de pureza radioquímica imediata mais baixa neste estudo, pode-se observar que o radiofármaco apresenta-se estável por até 4 horas após a incubação em soro humano.

Convém ressaltar que o controle de estabilidade foi realizado por análise em CCD e que este método cromatográfico mostrou-se eficaz para separação e identificação da impureza  $^{177}\text{Lu}$  livre. Entretanto, a eventual quebra de estrutura proteica pode não estar sendo identificada por meio desta técnica cromatográfica que evidenciou apenas a estabilidade de ligação do  $^{177}\text{Lu}$  ao quelante DOTA.

Por este motivo não ficou evidenciado incremento de estabilidade atribuída à substituição do aminoácido metionina por norleucina para os derivados de bombesina.

O ensaio de estabilidade em soro humano *in vitro* orienta sobre o grau da integridade do produto *in vivo*, particularmente com relação à estabilidade da ligação entre o metal e o grupo quelante. A maior estabilidade dos derivados radiomarcados no soro pode refletir em uma maior quantidade do radiofármaco intacto presente na área do tumor, aumentando a probabilidade de ligação à superfície das células tumorais. Em contrapartida a ligação do radionuclídeo *in vivo* promoveria acúmulo de radioatividade na estrutura óssea, com incremento de dose para a medula.

Neste sentido, a partir dos resultados do gráfico anterior pode-se observar que ambos os derivados DOTA-conjugados apresentam alta estabilidade em soro humano por até 4 horas de incubação.

Comparado ao peptídeo quelado ao DTPA, os derivados DOTA-conjugados mostraram-se mais estáveis, apresentando menos liberação do lutécio, principalmente se comparado o período de 4 horas de incubação. Este resultado se extrapolado para a condições *in vivo* possibilitaria supor que os derivados DOTA-conjugados deverão apresentar maior estabilidade *in vivo* quando comparados ao derivado acoplado ao DTPA.

### **5.2.3.3 Estudo de ligação às proteínas plasmáticas dos derivados DOTA-conjugados radiomarcados**

O estudo de ligação às proteínas plasmáticas é de grande interesse, pois o radiofármaco deve ter uma eliminação rápida do sangue para evitar a metabolização pelas enzimas do soro. Os resultados de ligação às proteínas plasmáticas *in vitro* dos derivados de bombesina DOTA-conjugados,



radiomarcados após incubação a 37° C por diferentes tempos são apresentados nas figuras 24 e 25 a seguir.

Nos estudos em que utilizou-se o análogo PG<sub>5</sub>M-DOTA (figura 24) observa-se que aproximadamente 15% do radiofármaco se liga às proteínas plasmáticas e essa ligação apresenta variação mínima com o tempo de incubação, sendo de 12% no tempo de 4 horas.

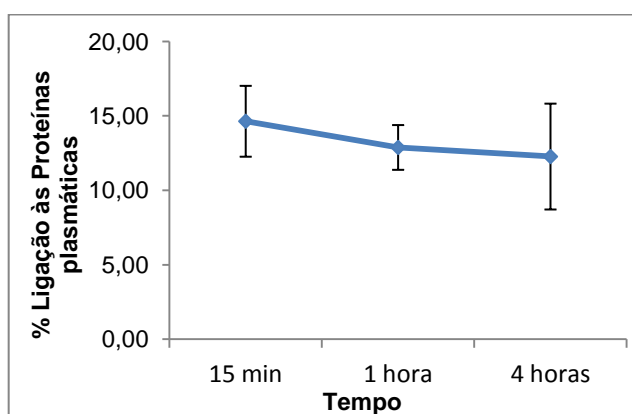


Figura 24 - Porcentagem de ligação do análogo PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu às proteínas plasmáticas nos tempos de 15 minutos, 1 e 4 horas. Dados apresentados como média ± desvio padrão (n=3).

O mesmo estudo foi realizado para o análogo PG<sub>5</sub>N-DOTA e os resultados obtidos são mostrados na figura 25 a seguir.

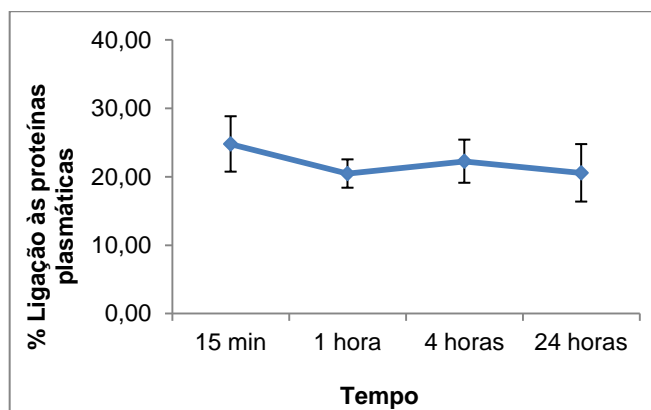


Figura 25 - Porcentagem de ligação do análogo PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu às proteínas plasmáticas nos tempos de 15 minutos, 1, 4 e 24 horas. Dados apresentados como média ± desvio padrão (n=6).

Pode-se observar que, para este análogo, a ligação às proteínas plasmáticas mostrou-se superior, quando comparada ao PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu, chegando a 25%, 15 minutos após a incubação do produto marcado. Observou-se também que esta ligação manteve-se praticamente constante após 4 horas.

A análise estatística, anova de duas vias, revelou somente efeito do fator radiofármaco (PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu e PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu) [F(1,12)=44,95;p<0,0001]. Não houve efeito do fator tempo (15 minutos, 1 e 4 horas), também não houve interação entre os fatores radiofármaco e tempo (p>0,05) (figuras 24 e 25).

O teste T de Student revelou diferença significativa entre a porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas do PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu quando comparado com PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu t(4)=3,75; =5,12; p<0,02; p<0,07; 15 minutos e 1 hora respectivamente. Esses dados demonstram que a PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu apresenta maior ligação as proteínas plasmáticas nos tempos avaliados.

A ligação às proteínas plasmáticas, observada para os dois análogos DOTA-conjugados estudados, sugere um clareamento sanguíneo *in vivo* mais lento para o derivado acoplado ao DTPA, para o qual a ligação às proteínas plasmáticas foi maior.

### **5.3 Determinação do coeficiente de partição experimental dos derivados de bombesina radiomarcados (log P)**

O cálculo de log P, coeficiente de partição nos direciona quanto à lipossolubilidade do radiofármaco. Um resultado do log P < 0 é obtido quando a amostra é hidrofílica, sendo assim ela tem uma distribuição mais eficiente em meio líquido (plasma sanguíneo) e é excretada pelos rins. Quando temos um RF com log P > 0 tem-se uma substância mais hidrofóbica, sendo assim, ela tem maior afinidade à membrana celular e à moléculas lipídicas.

Os coeficientes de partição experimentais dos peptídeos radiomarcados são mostrados na tabela 9 e sugerem que esses derivados são pouco lipofílicos. Apesar disto, observa-se que a substituição da metionina terminal pelo aminoácido sintético norleucina aumenta a lipofilicidade do marcador molecular.

Tabela 9 - Coeficiente de partição (log P) óleo:água (n-octanol:PBS) experimental dos derivados da bombesina acoplados ao DOTA (n=3).

Coeficiente de Partição Experimental (log P)		
RF	PG <sub>5</sub> M-DOTA- <sup>177</sup> Lu	PG <sub>5</sub> N-DOTA- <sup>177</sup> Lu
log P	-1,53 ± 0,28	-1,13 ± 0,19

Pujatti (2012) observou comportamento semelhante ao comparar coeficientes de partição de derivados de bombesina acoplados ao DTPA e radiomarcados com <sup>111</sup>In, que diferiam quanto ao aminoácido terminal (Met e Nle). Também neste caso, a substituição da metionina por norleucina promoveu um discreto aumento na lipofilicidade do peptídeo radiomarcado.

#### 5.4 Resultados de ligação às células tumorais (“Binding”)

Os estudos de ligação específica são realizados a fim de se determinar a capacidade dos marcadores moleculares de se ligarem às células tumorais. As células utilizadas neste estudo foram as células PC-3 de adenocarcinoma prostático humano grau IV (Hemocentro da Unicamp), cultivadas em parceria com a Dra. Miriam Suzuki do Centro de Biotecnologia do IPEN.

Os resultados obtidos no estudo de ligação às células tumorais *in vitro* da PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu são demonstradas nas figuras a seguir. Os peptídeos foram obtidos com atividade específica de 4,63MBq / µg.

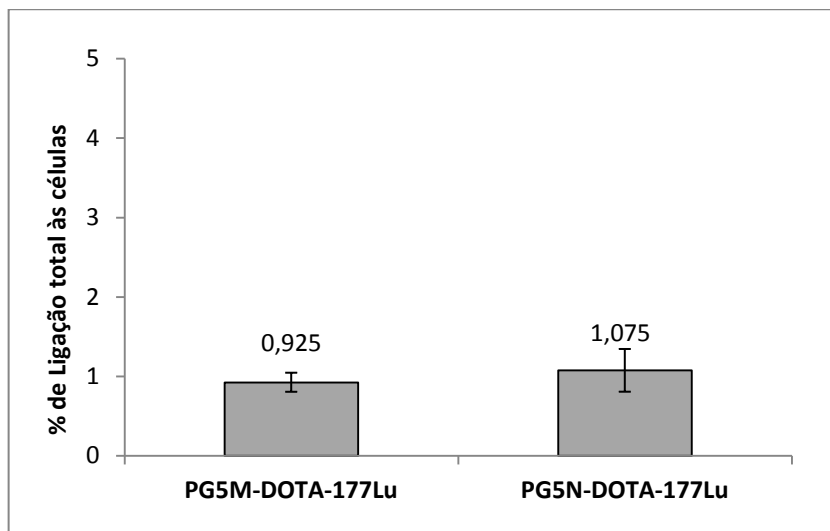


Figura 26 - Estudo de ligação total às células PC-3 ( $10^6$  células) dos análogos  $PG_5M-DOTA-^{177}Lu$  e do  $PG_5N-DOTA-^{177}Lu$ , (n=3).

Os dois peptídeos estudados apresentaram porcentagem de ligação às células tumorais semelhante, indicando não haver influência da substituição do aminoácido terminal metionina por norleucina na capacidade de ligação aos receptores celulares nos estudos *in vitro*. A análise estatística, realizada por meio do teste T de student, não revelou diferença significativa entre os derivados  $PG_5M-DOTA-^{177}Lu$  e  $PG_5N-DOTA-^{177}Lu$  ( $p > 0,05$ ) em relação à ligação às células PC-3 de adenocarcinoma prostático.

### 5.5 Estudos de biodistribuição em animais sadios

Os resultados dos estudos de biodistribuição realizados com os marcadores moleculares  $PG_5M-DOTA-^{177}Lu$  e  $PG_5N-DOTA-^{177}Lu$  são

apresentados nas tabelas a seguir, expressos em porcentagem de atividade por órgão e por grama de tecido.

Tabela 10 - Estudo de biodistribuição do derivado de bombesina PG5M-DOTA em camundongos *Swiss* sadios, fêmeas, após a administração via endovenosa caudal de (5,55 MBq – 150  $\mu$ Ci) (n=4). Dados apresentados como media  $\pm$  desvio padrão.

<b>PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub></b>			
<b>Órgão</b>	<b>% Atividade administrada/g ou mL</b>		
	<b>1 hora</b>	<b>4 horas</b>	<b>24 horas</b>
<b>Sangue</b>	0,497 $\pm$ 0,227	0,083 $\pm$ 0,031	0,025 $\pm$ 0,004
<b>Coração</b>	0,13 $\pm$ 0,09	0,04 $\pm$ 0,01	0,2 $\pm$ 0,01
<b>Pulmões</b>	0,48 $\pm$ 0,12	0,06 $\pm$ 0,03	0,05 $\pm$ 0,03
<b>Pâncreas</b>	3,90 $\pm$ 2,91	1,37 $\pm$ 0,75	1,70 $\pm$ 0,57
<b>Baço</b>	0,32 $\pm$ 0,06	0,06 $\pm$ 0,06	0,16 $\pm$ 0,06
<b>Estômago*</b>	0,42 $\pm$ 0,16	0,19 $\pm$ 0,14	0,11 $\pm$ 0,05
<b>Fígado</b>	0,26 $\pm$ 0,08	0,11 $\pm$ 0,06	0,05 $\pm$ 0,01
<b>Rins</b>	3,81 $\pm$ 1,88	3,11 $\pm$ 1,70	0,01 $\pm$ 0,002
<b>Intestino*</b>	0,70 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,22	0,06 $\pm$ 0,003
<b>Músculo</b>	0,46 $\pm$ 0,15	0,09 $\pm$ 0,04	0,10 $\pm$ 0,01
<b>Osso</b>	0,60 $\pm$ 0,21	0,20 $\pm$ 0,06	0,34 $\pm$ 0,06
<b>Cérebro</b>	0,04 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,006

\* Estômago e Intestinos com conteúdo

Tabela 11 - Estudo de biodistribuição do derivado de bombesina PG<sub>5</sub>N-DOTA em camundongos *Swiss* sadios, fêmeas, após a administração via endovenosa caudal de (5,55 MBq – 150 µCi) (n=4). Dados apresentados como media ± desvio padrão.

<b>PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>LuCl<sub>3</sub></b>			
<b>% Atividade administrada/g ou mL</b>			
<b>Órgão</b>	<b>1 hora</b>	<b>4 horas</b>	<b>24 horas</b>
<b>Sangue</b>	0,07 ± 0,03	0,01 ± 0,004	0,007 ± 0,003
<b>Coração</b>	0,12 ± 0,20	0,01 ± 0,06	0,004 ± 0,001
<b>Pulmões</b>	0,22 ± 0,14	0,11 ± 0,11	0,005 ± 0,002
<b>Pâncreas</b>	0,65 ± 0,16	0,14 ± 0,30	0,10 ± 0,08
<b>Baço</b>	0,05 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,02 ± 0,009
<b>Estômago*</b>	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,008 ± 0,005
<b>Fígado</b>	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,004
<b>Rins</b>	0,40 ± 0,15	0,28 ± 0,09	0,22 ± 0,15
<b>Intestino*</b>	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,03	0,01 ± 0,006
<b>Músculo</b>	0,67 ± 0,02	0,03 ± 0,021	0,017 ± 0,007
<b>Osso</b>	0,093 ± 0,044	0,038 ± 0,01	0,032 ± 0,016
<b>Cérebro</b>	0,01 ± 0,02	0,001 ± 0,007	0,00 ± 0,00

\*Estômago e Intestinos com conteúdo

A figura a seguir compara a % atividade injetada/g dos derivados de bombesina DOTA-conjugados para os principais órgãos avaliados.

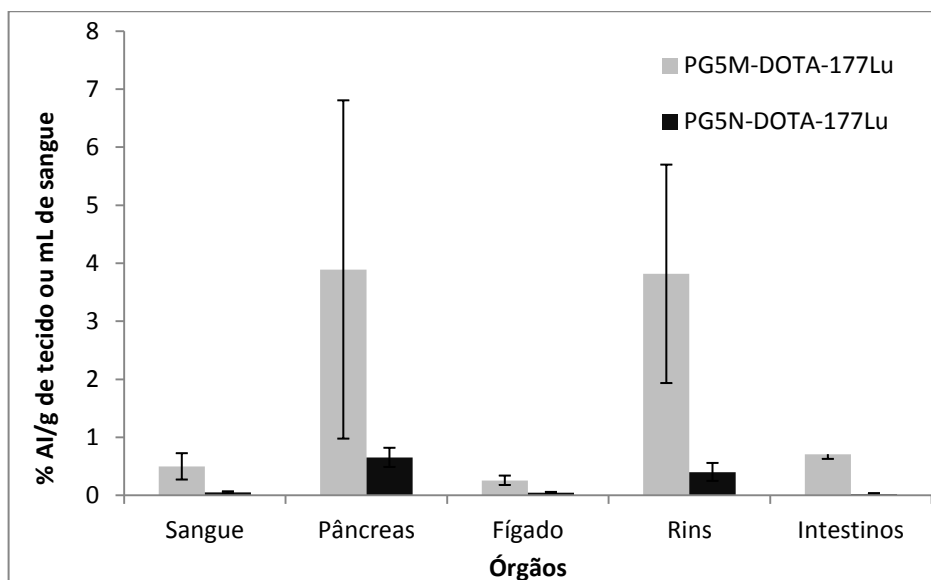


Figura 27 - Biodistribuição dos derivados PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu e PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu nos principais órgãos de interesse, em camundongos *Swiss* sadios fêmeas 1 hora após administração por via endovenosa caudal do peptídeo radiomarcado.

Pode-se observar uma concentração significativa da radioatividade nos rins, até 24 horas após a administração, indicando que os derivados são excretados principalmente por via renal, configurando os rins como órgãos críticos para a dosimetria.

Este fato é comumente observado na biodistribuição de peptídeos radiomarcados com características hidrofílicas. A toxicidade associada à dosimetria renal quando da utilização clínica de peptídeos radiomarcados com aplicações terapêuticas, como os derivados de somatostatina radiomarcados com <sup>177</sup>Lu ou <sup>90</sup>Y, tem sido contornada pela administração de solução de aminoácidos que atuam como protetores renais durante a administração do radiofármaco. Desta forma, a captação renal elevada deixa de ser um inconveniente para aplicação clínica do peptídeo radiomarcado.



A excreção renal associada à baixa captação hepática dos derivados demonstra a baixa lipossolubilidade dos derivados radiomarcados.

O pâncreas é um órgão que expressa os receptores BB<sub>2</sub> em alta densidade em camundongos e, portanto, é um controle da ligação dos derivados da bombesina a esses receptores, além de ser também responsável pelo acúmulo abdominal de muitos derivados estudados (Pujatti, 2012).

O intestino grosso, mais particularmente o cólon, é a parte que mais expressa receptores de BB<sub>2</sub>. Os marcadores moleculares estudados apresentaram menor captação pancreática em relação aos derivados da bombesina descritos na literatura (Lantry e cols, 2006; Zhang e cols, 2007; Garayou e cols, 2007).

A baixa captação no pâncreas poderia sugerir ausência de captação tumoral, mas alguns estudos indicam que não há relação entre a captação pancreática ou intestinal e tumoral (Lane e cols, 2010; La Bella e cols, 2002).

O peptídeo PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu apresentou maior captação pancreática e intestinal do que o derivado PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu, sugerindo apresentar maior afinidade pelos receptores específicos. Entretanto, no estudo de ligação às células PC-3 a porcentagem de ligação dos dois radiofármacos foi similar.

Pujatti (2012) observou comportamento inverso ao comparar derivados de bombesina acoplados ao DTPA e marcados com <sup>111</sup>In, sendo que o derivado com norleucina terminal apresentou maior captação pancreática que o derivado com metionina terminal. Entretanto, neste estudo a captação pancreática dos derivados que também possuem como espaçador a sequência de 5 aminoácidos glicina foi menor que a observada para outros derivados de bombesina descritos na literatura (Lane e cols, 2010; La Bella e cols, 2002).

Tais diferenças sugerem que a alteração do aminoácido terminal interfere na especificidade de ligação ao receptor celular não sendo, entretanto o único fator a ser considerado. A alteração do grupamento quelante e do radioisótopo utilizado na marcação também devem contribuir para a alteração das características moleculares relacionadas ao reconhecimento e ligação ao receptor celular específico.

O rápido clareamento sanguíneo observado para os dois peptídeos radiomarcados corrobora os resultados obtidos de baixa ligação às proteínas plasmáticas *in vitro*, que favorece o clareamento sanguíneo dos peptídeos radiomarcados.

Apesar da ligação às proteínas plasmáticas do derivado PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu ter sido significativamente maior que o derivado PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu, esta diferença não contribuiu para retardar o clareamento sanguíneo do derivado com norleucina terminal.

A captação no tecido ósseo foi baixa para ambos os derivados de bombesina, refletindo a alta estabilidade da ligação DOTA-<sup>177</sup>Lu.

Estudos de biodistribuição do composto PG<sub>5</sub>M-DTPA-<sup>177</sup>Lu deverão ser realizados, de modo a comparar, principalmente, o efeito do agente quelante (DTPA ao invés do DOTA) na estabilidade *in vivo* do peptídeo marcado bem como na captação pancreática, renal e clareamento sanguíneo.

Apesar dos estudos de biodistribuição do peptídeo derivado de bombesina quelado ao DTPA não ter sido realizado, sua estabilidade quando incubado em soro humano foi menor quando comparada à estabilidade dos derivados DOTA-conjugados, especialmente após 4 horas de incubação. De fato,

é sabido que o DOTA é melhor quelante para o  $^{177}\text{Lu}$  que o DTPA, promovendo radiofármacos com melhor estabilidade *in vivo*.

Os resultados obtidos neste trabalho sugerem a continuidade dos estudos, de modo a avaliar a captação dos peptídeos radiomarcados em modelos tumorais *in vivo* e confirmar a aparente superioridade do derivado PG<sub>5</sub>M-DOTA- $^{177}\text{Lu}$  com relação à capacidade de ligação à células tumorais receptor-específicas.

## 6. CONCLUSÕES

Com base no trabalho realizado pode-se concluir que os derivados de bombesina radiomarcados com  $^{177}\text{LuCl}_3$ , acoplados ao DTPA e ao DOTA, foram obtidos com alta pureza radioquímica e alta atividade específica, características importantes para aplicação em diagnóstico ou terapia receptor-específica.

Todos os peptídeos radiomarcados apresentaram estabilidade alta com pureza radioquímica superior à 95% por até 24 horas armazenados de 2-8° C, não sendo observada diferença significativa na estabilidade do produto em relação à diferença de quelantes utilizados, e nem quanto à diferença no último aminoácido da cadeia C-terminal neste período. Quando se considerou períodos maiores de armazenamento todos os compostos sofreram degradação de forma similar.

Os estudos de estabilidade em soro humano mostraram que os 3 derivados apresentaram alta estabilidade após 1 hora de incubação, avaliada pela liberação do lutécio da estrutura do peptídeo. O peptídeo quelado ao DTPA foi o que apresentou maior instabilidade para o período de 24 horas de incubação.

Nos estudos de ligação às proteínas plasmáticas observou-se valores mais altos de ligação para o peptídeo  $\text{PG}_5\text{N-DOTA-}^{177}\text{Lu}$ , porém sem reflexo no clareamento sanguíneo.

A determinação do coeficiente de partição experimental dos derivados de bombesina DOTA-conjugados possibilitou concluir que os mesmos são pouco lipofílicos e que a substituição da metionina pela norleucina aumentou a

lipofilicidade do marcador molecular, porém sem reflexo no clareamento sanguíneo ou captação hepática do composto.

De modo geral, os estudos de biodistribuição realizados com os derivados DOTA-conjugados demonstraram o rápido clareamento sanguíneo e alta captação renal. Apresentaram ainda captação significativa em órgãos que expressam receptores para bombesina, como pâncreas e intestinos, particularmente o derivado PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu. No estudo de ligação *in vitro* às células PC-3, entretanto, a afinidade dos peptídeos PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu e PG<sub>5</sub>N-DOTA-<sup>177</sup>Lu foi similar. Estas características de biodistribuição indicam o potencial para aplicação clínica destes peptídeos radiomarcados, particularmente o derivado PG<sub>5</sub>M-DOTA-<sup>177</sup>Lu.

## 7. REFERÊNCIAS

ANANIAS, H. J.; VAN DEN HEUVEL, M. C.; HELFRICH, W.; DE JONG, I. J. Expression of the gastrin-releasing peptide receptor, the prostate stem cell antigen and the prostate-specific membrane antigen in lymph node and bone metastases of prostate cancer. *Prostate*, v. 69, n. 10, p. 1101-1108, 2009.

ANDERSON, C. J.; WELCH, M. J. Radiometal-labeled agents (non-technetium) for diagnostic imaging. *Chem Rev*, v. 99, n. 9, p. 2219-2234, 1999.

ANGER, H. O. Scintillation camera. *Rev Sci Instrum.*, v. 29, n. 1, p. 27-33, 1958.

ANGER, H. O. Scintillation Camera with Multichannel Collimators. *J Nucl Med*, v. 5, p. 515-531, 1964.

APRIKIAN, A. G.; HAN, K.; GUY, L.; LANDRY, F.; BEGIN, L. R.; CHEVALIER, S. Neuroendocrine differentiation and the bombesin/gastrin-releasing peptide family of neuropeptides in the progression of human prostate cancer. *Prostate Suppl*, v. 8, p. 52-61, 1998.

BAIDOO, K. E.; LIN, K. S.; ZHAN, Y.; FINLEY, P.; SCHEFFEL, U.; WAGNER, H. N., JR. Design, synthesis, and initial evaluation of high-affinity technetium bombesin analogues. *Bioconjug Chem*, v. 9, n. 2, p. 218-225, 1998.

BAJO, A. M.; SCHALLY, A. V.; KRUPA, M.; HEBERT, F.; GROOT, K.; SZEPESHAZI, K. Bombesin antagonists inhibit growth of MDA-MB-435 estrogen-independent breast cancers and decrease the expression of the ErbB-2/HER-2 oncoprotein and c-jun and c-fos oncogenes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 99, n. 6, p. 3836-3841, 2002.

BARTHOLDI, M. F.; WU, J. M.; PU, H.; TRONCOSO, P.; EDEN, P. A.; FELDMAN, R. I. In situ hybridization for gastrin-releasing peptide receptor (GRP receptor) expression in prostatic carcinoma. *Int J Cancer*, v. 79, n. 1, p. 82-90, 1998.

BLAHD, W. H. Benedict Cassen: the father of body organ imaging. *Cancer Biother Radiopharm*, v. 15, n. 5, p. 423-429, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 63, de 18 de dezembro de 2009. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Radiofármacos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 dez. 2009.

BREEMAN, W. A.; DE JONG, M.; ERION, J. L.; BUGAJ, J. E.; SRINIVASAN, A.; BERNARD, B. F.; KWEKKEBOOM, D. J.; VISSER, T. J.; KRENNING, E. P. Preclinical comparison of (111)In-labeled DTPA- or DOTA-bombesin analogs for receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy. *J Nucl Med*, v. 43, n. 12, p. 1650-1656, 2002.

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

CAI, R. Z.; REILE, H.; ARMATIS, P.; SCHALLY, A. V. Potent bombesin antagonists with C-terminal Leu-psi(CH<sub>2</sub>-N)-Tac-NH<sub>2</sub> or its derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 91, n. 26, p. 12664-12668, 1994.

CARROLL, R. E.; OSTROVSKIY, D.; LEE, S.; DANILKOVICH, A.; BENYA, R. V. Characterization of gastrin-releasing peptide and its receptor aberrantly expressed by human colon cancer cell lines. *Mol Pharmacol*, v. 58, n. 3, p. 601-607, 2000.

CESSATO, R.; MAINA, T.; NOCK, B.; NIKOLOPOULOU, A.; CHARALAMBIDIS, D.; PICCAND, V.; REUBI, J. C. Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting. *J Nucl Med*, v. 49, n. 2, p. 318-326, 2008.

CHANDRA, R. **Introductory physics of Nuclear medicine.** . 1992.

CHAPMAN, E. M.; EVANS, R. D. The treatment of hyperthyroidism with radioactive iodine. *J Am Med Assoc*, v. 131, p. 86-91, 1946.

COUTO, R. M. **Desenvolvimento de radiofármaco para radiosinovectomia.** 2009. 102 (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, São Paulo.

COY, D. H.; HEINZ-ERIAN, P.; JIANG, N. Y.; SASAKI, Y.; TAYLOR, J.; MOREAU, J. P.; WOLFREY, W. T.; GARDNER, J. D.; JENSEN, R. T. Probing peptide backbone function in bombesin. A reduced peptide bond analogue with potent and specific receptor antagonist activity. *J Biol Chem*, v. 263, n. 11, p. 5056-5060, 1988.

DE VINCENTIS, G.; REMEDIANI, S.; VARVARIGOU, A. D.; DI SANTO, G.; IORI, F.; LAURENTI, C.; SCOPINARO, F. Role of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -bombesin scan in diagnosis and staging of prostate cancer. *Cancer Biother Radiopharm*, v. 19, n. 1, p. 81-84, 2004.

DE VISSER, M.; BERNARD, H. F.; ERION, J. L.; SCHMIDT, M. A.; SRINIVASAN, A.; WASER, B.; REUBI, J. C.; KRENNING, E. P.; DE JONG, M. Novel  $^{111}\text{In}$ -labelled bombesin analogues for molecular imaging of prostate tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 34, n. 8, p. 1228-1238, 2007.

EPSTEIN, J. I. O Trato Urinário Inferior e o Sistema Genital Masculino. In: ROBBINS, R. C.; COTRAN, R. S. (Ed.). **Patologia – Bases Patológicas das Doenças.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.1068-1104.

ERCAN, M. T. **In microheads, microcapsules & liposomes.** London: Arshady, R., 1999. 283-342.

ESTEVEES, F. P.; RAGGI, P.; FOLKS, R. D.; KEIDAR, Z.; ASKEW, J. W.; RISPLER, S.; O'CONNOR, M. K.; VERDES, L.; GARCIA, E. V. Novel solid-state-detector dedicated cardiac camera for fast myocardial perfusion imaging: multicenter comparison with standard dual detector cameras. **J Nucl Cardiol**, v. 16, n. 6, p. 927-934, 2009.

ESTRUTURA DA BOMBESINA. Disponível em <http://it.wikipedia.org/wiki/Bombesina>. acesso em 12/2009.

FERMI, E. Radioactivity induced by neutron bombardment **Nature**, v. 122, p. 201, 1934.

FLEISCHMANN, A.; LADERACH, U.; FRIESS, H.; BUECHLER, M. W.; REUBI, J. C. Bombesin receptors in distinct tissue compartments of human pancreatic diseases. **Lab Invest**, v. 80, n. 12, p. 1807-1817, 2000.

FLEISCHMANN, A.; WASER, B.; GEBBERS, J. O.; REUBI, J. C. Gastrin-releasing peptide receptors in normal and neoplastic human uterus: involvement of multiple tissue compartments. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 8, p. 4722-4729, 2005.

FLEISCHMANN, A.; WASER, B.; REUBI, J. C. High expression of gastrin-releasing peptide receptors in the vascular bed of urinary tract cancers: promising candidates for vascular targeting applications. **Endocr Relat Cancer**, v. 16, n. 2, p. 623-633, 2009.

GABRIEL, M.; DECRISTOFORO, C.; DONNEMILLER, E.; ULMER, H.; WATFAH RYCHLINSKI, C.; MATHER, S. J.; MONCAYO, R. An inpatient comparison of <sup>99m</sup>Tc-EDDA/HYNIC-TOC with <sup>111</sup>In-DTPA-octreotide for diagnosis of somatostatin receptor-expressing tumors. **J Nucl Med**, v. 44, n. 5, p. 708-716, 2003.

GAMBHIR, S. S.; BERMAN, D. S.; ZIFFER, J.; NAGLER, M.; SANDLER, M.; PATTON, J.; HUTTON, B.; SHARIR, T.; HAIM, S. B. A novel high-sensitivity rapid-acquisition single-photon cardiac imaging camera. **J Nucl Med**, v. 50, n. 4, p. 635-643, 2009.

GARCIA, E. J. Um espaço para a radiofarmácia. **Pharm. Bras.**, v. 31, p. 4-8, 2006.

GUGGER, M.; REUBI, J. C. Gastrin-releasing peptide receptors in non-neoplastic and neoplastic human breast. **Am J Pathol**, v. 155, n. 6, p. 2067-2076, 1999.

HALMOS, G.; WITTLIFF, J. L.; SCHALLY, A. V. Characterization of bombesin/gastrin-releasing peptide receptors in human breast cancer and their relationship to steroid receptor expression. **Cancer Res**, v. 55, n. 2, p. 280-287, 1995.



HARPER, P. V.; R., B.; CHARLESTON, D.; LATHROP, K. A. Optimization of a scanning method using technetium-99m. *Nucleonics*, v. 22, n. 1, p. 50-54, 1964.

HEVESY, G. The Absorption and Translocation of Lead by Plants: A Contribution to the Application of the Method of Radioactive Indicators in the Investigation of the Change of Substance in Plants. *Biochem J*, v. 17, n. 4-5, p. 439-445, 1923.

HOFFMAN, T. J.; GALI, H.; SMITH, C. J.; SIECKMAN, G. L.; HAYES, D. L.; OWEN, N. K.; VOLKERT, W. A. Novel series of <sup>111</sup>In-labeled bombesin analogs as potential radiopharmaceuticals for specific targeting of gastrin-releasing peptide receptors expressed on human prostate cancer cells. *J Nucl Med*, v. 44, n. 5, p. 823-831, 2003.

HOHLA, F.; SCHALLY, A. V. Targeting gastrin releasing peptide receptors: New options for the therapy and diagnosis of cancer. *Cell Cycle*, v. 9, n. 9, p. 1738-1741, 2010.

IMPÉRIO, M. D. Câncer de Próstata. In: EDITORA, B. (Ed.). **Manual de Oncologia**. São Paulo: Guimarães, J.R.Q., 2004. cap. 40.

INCA. O Câncer de próstata. [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). *Acessado em 20 de julho de 2013.*, 2011

JENSEN, R. T.; BATTEY, J. F.; SPINDEL, E. R.; BENYA, R. V. International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states. *Pharmacol Rev*, v. 60, n. 1, p. 1-42, 2008.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Guanabara Koogan, 1999.

JURISSON, S.; CUTLER, C.; SMITH, S. V. Radiometal complexes: characterization and relevant in vitro studies. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, v. 52, n. 3, p. 222-234, 2008.

KASSIS, A. I.; ADELSTEIN, S. J. Considerations in the selection of radionuclides for cancer therapy. In: WELCH, M. J.; REDVANLY, C. S. (Ed.). **Handbook of Radiopharmaceuticals: radiochemistry and applications**. Chichester: Wiley, 2003. cap. 27.

KNIGHT, L. C. Radiolabeled peptides for tumor imaging. In: WELCH, M. J.; REDEVANLY, C. S. (Ed.). **Handbook of Radiopharmaceuticals: radiochemistry and applications**. Chichester: Wiley, 2003.

KOPPAN, M.; HALMOS, G.; ARENCIBIA, J. M.; LAMHARZI, N.; SCHALLY, A. V. Bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists RC-3095 and RC-3940-II inhibit tumor growth and decrease the levels and mRNA expression of epidermal growth

factor receptors in H-69 small cell lung carcinoma. **Cancer**, v. 83, n. 7, p. 1335-1343, 1998.

KWEKKEBOOM, D. J.; BAKKER, W. H.; KAM, B. L.; TEUNISSEN, J. J.; KOUIJ, P. P.; DE HERDER, W. W.; FEELDERS, R. A.; VAN EIJCK, C. H.; DE JONG, M.; SRINIVASAN, A.; ERION, J. L.; KRENNING, E. P. Treatment of patients with gastro-entero-pancreatic (GEP) tumours with the novel radiolabelled somatostatin analogue [177Lu-DOTA(0),Tyr3]octreotate. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 30, n. 3, p. 417-422, 2003.

LA BELLA, R.; GARCIA-GARAYOA, E.; LANGER, M.; BLAUENSTEIN, P.; BECK-SICKINGER, A.G.; SCHUBIGER, P.A. *In vitro* and *in vivo* evaluation of a <sup>99m</sup>Tc(I)-labeled bombesin analogues for imaging of gastrin releasing peptide receptor-positive tumors. **Nucl Med Biol**, v.29, n.5, p.553-560, 2002.

LANE, S. R.; VEERENDRA, B.; ROLD, T. L.; SIECKMAN, G. L.; HOFFMAN, T. J.; JURISSON, S. S.; SMITH, C. J. 99mTc(CO)3-DTMA bombesin conjugates having high affinity for the GRP receptor. **Nucl Med Biol**, v. 35, n. 3, p. 263-272, 2008.

LANE, S.R.; NANDA, P.; ROLD, T.L.; SIECKMAN, G. L.; FIGUEROA, S.D.; HOFMAN, T.J.; JURISSON, S.S.; SMITH, C.J. Optimization, biological evaluation and microPET imaging of copper-64-labeled bombesin agonists, [<sup>64</sup>Cu-NO2A-(x)-BBN(7-14)NH<sub>2</sub>], in a prostate tumor xenografted mouse model. **Nucl Med Biol**, v.37, n. 7, p. 751-761, 2010.

LEWINGTON, V. J. Targeted radionuclide therapy for neuroendocrine tumours. **Endocr Relat Cancer**, v. 10, n. 4, p. 497-501, 2003.

LIN, K. S.; LUU, A.; BAIDOO, K. E.; HASHEMZADEH-GARGARI, H.; CHEN, M. K.; BRENNEMAN, K.; PILI, R.; POMPER, M.; CARDUCCI, M. A.; WAGNER, H. N., JR. A new high affinity technetium-99m-bombesin analogue with low abdominal accumulation. **Bioconjug Chem**, v. 16, n. 1, p. 43-50, 2005.

LINDER K. E.; METCALFE, E.; ARUNACHALAM, T.; CHEN, J.; EATON, S. M.; FENG, W.; FAN, H.; RAJU, N.; CAGNOLINI, A.; LANTRY, L. E.; NUNN, A. D.; SWENSON, R. E. *In vitro* and *in vivo* metabolism of Lu-AMBA, a GRP-Receptor Binding Compound, and the Synthesis and Characterization of Its Metabolites. **Bioconjugate Chem**, v. 20, p. 1171-1178, 2009.

LIU, S. Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. **Adv Drug Deliv Rev**, v.60, n.12, p.1347-1370, 2008.

MAINA, T.; NOCK, B. A.; ZHANG, H.; NIKOLOPOULOU, A.; WASER, B.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. Species differences of bombesin analog interactions with GRP-R define the choice of animal models in the development of GRP-R-targeting drugs. **J Nucl Med**, v. 46, n. 5, p. 823-830, 2005.

MAISEY, M. N. Nuclear medicine. **Practitioner**, v. 220, n. 1317, p. 445-451, 1978.

MARKWALDER, R.; REUBI, J. C. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate: relation to neoplastic transformation. **Cancer Res**, v. 59, n. 5, p. 1152-1159, 1999.

MOODY, T. W.; ZIA, F.; VENUGOPAL, R.; FAGARASAN, M.; OIE, H.; HU, V. GRP receptors are present in non small cell lung cancer cells. **J Cell Biochem Suppl**, v. 24, p. 247-256, 1996.

NOCK, B.; NIKOLOPOULOU, A.; CHIOTELLIS, E.; LOUDOS, G.; MAINTAS, D.; REUBI, J. C.; MAINA, T. [99mTc]Demobesin 1, a novel potent bombesin analogue for GRP receptor-targeted tumour imaging. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 30, n. 2, p. 247-258, 2003.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; P., C.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 42, n. 2, p. 151-165, 2006.

OWUNWANNE, A.; PATEL, M.; SADEK, S. **The Handbook of radiopharmaceutics**. London: 1995.

PANSKY, A.; DE WEERTH, A.; FASLER-KAN, E.; BOULAY, J. L.; SCHULZ, M.; KETTERER, S.; SELCK, C.; BEGLINGER, C.; VON SCHRENCK, T.; HILDEBRAND, P. Gastrin releasing peptide-preferring bombesin receptors mediate growth of human renal cell carcinoma. **J Am Soc Nephrol**, v. 11, n. 8, p. 1409-1418, 2000.

PRADHAN, T. K.; KATSUNO, T.; TAYLOR, J. E.; KIM, S. H.; RYAN, R. R.; MANTEY, S. A.; DONOHUE, P. J.; WEBER, H. C.; SAINZ, E.; BATTEY, J. F.; COY, D. H.; JENSEN, R. T. Identification of a unique ligand which has high affinity for all four bombesin receptor subtypes. **Eur J Pharmacol**, v. 343, n. 2-3, p. 275-287, 1998.

PUJATTI, P. B. **Desenvolvimento de derivados da bombesina radiomarcados com Lutécio-177: Relação estrutura e potencial diagnóstico-terapêutico para tumor de próstata**. 2009. 137 (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, São Paulo.

PUJATTI, P. B. **Marcadores moleculares derivados da Bombesina para diagnóstico de tumores por SPECT e PET**. 2012. 230 (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, São Paulo.

PUJATTI, P. B.; MASSICANO, A. V.; MENGATTI, J.; DE ARAUJO, E. B. Preparation of [In-111]-labeled-DTPA-bombesin conjugates at high specific activity and stability: evaluation of labeling parameters and potential stabilizers. **Appl Radiat Isot**, v. 70, n. 5, p. 856-863, 2012.

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

REUBI, J. C. Old and new peptide receptor targets in cancer: future directions. **Recent Results Cancer Res**, v. 194, p. 567-576, 2013.

REUBI, J. C.; KORNER, M.; WASER, B.; MAZZUCHELLI, L.; GUILLOU, L. High expression of peptide receptors as a novel target in gastrointestinal stromal tumours. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 31, n. 6, p. 803-810, 2004.

REUBI, J. C.; WENGER, S.; SCHMUCKLI-MAURER, J.; SCHAER, J. C.; GUGGER, M. Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14). **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 4, p. 1139-1146, 2002.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. Neoplasia. In: ELSVIER (Ed.). **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Robbins, S.L. Cotran, R.S., 2005. p.282-356.

SAHA, G. H. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. 2003.

SANTOS, J. S. **Obtenção de grupo prostético radioiodado para marcação de proteínas por via indireta**. 2001. (Mestrado). Instituto de pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, São Paulo.

SANTOS-CUEVAS, C. L.; FERRO-FLORES, G.; ARTEAGA DE MURPHY, C.; PICHARDO-ROMERO, P. A. Targeted imaging of gastrin-releasing peptide receptors with 99mTc-EDDA/HYNIC-[Lys3]-bombesin: biokinetics and dosimetry in women. **Nucl Med Commun**, v. 29, n. 8, p. 741-747, 2008.

SAPIENZA, M. T.; BUCHPIGUEL, C. A. Medicina nuclear em oncologia. In: GUIMARÃES, J. R. Q. (Ed.) **Manual de Oncologia**. São Paulo: BBS Editora, 2004. p. 675-683.

SAPIENZA, M. T.; ONO, C. R.; WATANABE, T.; BUCHPIGUEL, C. A.; HIRONAKA, F. H. First-pass scintigraphy with (99m)Tc macroaggregated albumin: a method for evaluating pulmonary arterial flow pulsatility. **Nucl Med Commun**, v. 25, n. 6, p. 571-576, 2004.

SAWIN, C. T.; BECKER, D. V. Radioiodine and the treatment of hyperthyroidism: the early history. **Thyroid**, v. 7, n. 2, p. 163-176, 1997.

SCHALLY, A. V.; COMARU-SCHALLY, A. M.; NAGY, A.; KOVACS, M.; SZEPESHAZI, K.; PLONOWSKI, A.; VARGA, J. L.; HALMOS, G. Hypothalamic hormones and cancer. **Front Neuroendocrinol**, v. 22, n. 4, p. 248-291, 2001.

SCHALLY, A. V.; COMARU-SCHALLY, A. M.; PLONOWSKI, A.; NAGY, A.; HALMOS, G.; REKASI, Z. Peptide analogs in the therapy of prostate cancer. **Prostate**, v. 45, n. 2, p. 158-166, 2000.

SCHALLY, A. V.; ENGEL, J. B.; EMONS, G.; BLOCK, N. L.; PINSKI, J. Use of analogs of peptide hormones conjugated to cytotoxic radicals for chemotherapy targeted to receptors on tumors. ***Curr Drug Deliv***, v. 8, n. 1, p. 11-25, 2011.

SCHALLY, A. V.; VARGA, J. L. Antagonists of growth hormone-releasing hormone in oncology. ***Comb Chem High Throughput Screen***, v. 9, n. 3, p. 163-170, 2006.

SCHWARTSMANN, G.; DILEONE, L. P.; HOROWITZ, M.; SCHUNEMANN, D.; CANCELLA, A.; PEREIRA, A. S.; RICHTER, M.; SOUZA, F.; DA ROCHA, A. B.; SOUZA, F. H.; POHLMANN, P.; DE NUCCI, G. A phase I trial of the bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) antagonist RC3095 in patients with advanced solid malignancies. ***Invest New Drugs***, v. 24, n. 5, p. 403-412, 2006.

SCOPINARO, F.; DE VINCENTIS, G.; VARVARIGOU, A. D.; LAURENTI, C.; IORI, F.; REMEDIANI, S.; CHIARINI, S.; STELLA, S. <sup>99m</sup>Tc-bombesin detects prostate cancer and invasion of pelvic lymph nodes. ***Eur J Nucl Med Mol Imaging***, v. 30, n. 10, p. 1378-1382, 2003.

SHARIR, T.; BEN-HAIM, S.; MERZON, K.; PROCHOROV, V.; DICKMAN, D.; BERMAN, D. S. High-speed myocardial perfusion imaging initial clinical comparison with conventional dual detector angler camera imaging. ***JACC Cardiovasc Imaging***, v. 1, n. 2, p. 156-163, 2008.

SRIVASTAVA, S.; DADACHOVA, E. Recent advances in radionuclide therapy. ***Semin Nucl Med***, v. 31, n. 4, p. 330-341, 2001.

STANGELBERGER, A.; SCHALLY, A. V.; VARGA, J. L.; HAMMANN, B. D.; GROOT, K.; HALMOS, G.; CAI, R. Z.; ZARANDI, M. Antagonists of growth hormone releasing hormone (GHRH) and of bombesin/gastrin releasing peptide (BN/GRP) suppress the expression of VEGF, bFGF, and receptors of the EGF/HER family in PC-3 and DU-145 human androgen-independent prostate cancers. ***Prostate***, v. 64, n. 3, p. 303-315, 2005a.

STANGELBERGER, A.; SCHALLY, A. V.; VARGA, J. L.; ZARANDI, M.; CAI, R. Z.; BAKER, B.; HAMMANN, B. D.; ARMATIS, P.; KANASHIRO, C. A. Inhibition of human androgen-independent PC-3 and DU-145 prostate cancers by antagonists of bombesin and growth hormone releasing hormone is linked to PKC, MAPK and c-jun intracellular signalling. ***Eur J Cancer***, v. 41, n. 17, p. 2735-2744, 2005b.

STANGELBERGER, A.; SCHALLY, A. V.; VARGA, J. L.; ZARANDI, M.; SZEPESHAZI, K.; ARMATIS, P.; HALMOS, G. Inhibitory effect of antagonists of bombesin and growth hormone-releasing hormone on orthotopic and intraosseous growth and invasiveness of PC-3 human prostate cancer in nude mice. ***Clin Cancer Res***, v. 11, n. 1, p. 49-57, 2005c.

SUN, B.; SCHALLY, A. V.; HALMOS, G. The presence of receptors for bombesin/GRP and mRNA for three receptor subtypes in human ovarian epithelial cancers. ***Regul Pept***, v. 90, n. 1-3, p. 77-84, 2000.

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

TRICOLI, J. V.; SCHOENFELDT, M.; CONLEY, B. A. Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 12 Pt 1, p. 3943-3953, 2004.

UNAK, T. Potential use of radiolabeled glucuronide prodrugs with auger and/or alpha emitters in combined chemo- and radio-therapy of cancer. **Curr Pharm Des**, v. 6, n. 11, p. 1127-1142, 2000.

VAN DE WIELE, C.; DUMONT, F.; DIERCKX, R. A.; PEERS, S. H.; THORNBACK, J. R.; SLEGERS, G.; THIERENS, H. Biodistribution and dosimetry of (99m)Tc-RP527, a gastrin-releasing peptide (GRP) agonist for the visualization of GRP receptor-expressing malignancies. **J Nucl Med**, v. 42, n. 11, p. 1722-1727, 2001.

VAN DE WIELE, C.; DUMONT, F.; VANDEN BROECKE, R.; OOSTERLINCK, W.; COCQUYT, V.; SERREYN, R.; PEERS, S.; THORNBACK, J.; SLEGERS, G.; DIERCKX, R. A. Technetium-99m RP527, a GRP analogue for visualisation of GRP receptor-expressing malignancies: a feasibility study. **Eur J Nucl Med**, v. 27, n. 11, p. 1694-1699, 2000.

VAN DE WIELE, C.; PHONTEYNE, P.; PAUWELS, P.; GOETHALS, I.; VAN DEN BROECKE, R.; COCQUYT, V.; DIERCKX, R. A. Gastrin-releasing peptide receptor imaging in human breast carcinoma versus immunohistochemistry. **J Nucl Med**, v. 49, n. 2, p. 260-264, 2008.

WANG, Q. J.; KNEZETIC, J. A.; SCHALLY, A. V.; POUR, P. M.; ADRIAN, T. E. Bombesin may stimulate proliferation of human pancreatic cancer cells through an autocrine pathway. **Int J Cancer**, v. 68, n. 4, p. 528-534, 1996.

WEATHERMAN, K. D.; CRISP, W.; WEBER, H. The physiological basis of radiopharmaceuticals. In: SMITH, B. T. (Ed.). **Nuclear pharmacy**. London: Pharmaceutical Press, 2010. cap. 3, p.55-66.

WEBER, H. C. Regulation and signaling of human bombesin receptors and their biological effects. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, v. 16, n. 1, p. 66-71, 2009.

WEINER, R. E.; THAKUR, M. L. Radiolabeled peptides in diagnosis and therapy. **Semin Nucl Med**, v. 31, n. 4, p. 296-311, 2001.

WEINER, R. E.; THAKUR, M. L. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. **Appl Radiat Isot**, v. 57, n. 5, p. 749-763, 2002.

WELCH, J. M.; REDVANDLY, C. S. **Handbook of Radiopharmaceuticals**. New York: 2005.

ZALUTSKKY, M. R. Radionuclide Therapy. In: VÉRTES, A.;NAGY, S.; ZOLTÁN, K. (Ed.). **Handbook of Nuclear Chemistry**. Netherlands:: Kluwer Academic Publishers v.4, 2003. p.315-348.

ZHANG, H.; CHEN, J.; WALDHERR, C.; HINNI, K.; WASER, B.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. Synthesis and evaluation of bombesin derivatives on the basis of pan-bombesin peptides labeled with indium-111, lutetium-177, and yttrium-90 for targeting bombesin receptor-expressing tumors. **Cancer Res**, v. 64, n. 18, p. 6707-6715, 2004.

ZHANG, H.; SCHUHMACHER, J.; WASER, B.; WILD, D.; EISENHUT, M.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. DOTA-PESIN, a DOTA-conjugated bombesin derivative designed for the imaging and targeted radionuclide treatment of bombesin receptor-positive tumours. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 34, n. 8, p. 1198-1208, 2007.

ZHU, J.; GONG, J. Y.; GOODMAN, O. B., JR.; CARTEGNI, L.; NANUS, D. M.; SHEN, R. Bombesin attenuates pre-mRNA splicing of glucocorticoid receptor by regulating the expression of serine-arginine protein p30c (SRp30c) in prostate cancer cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1773, n. 7, p. 1087-1094, 2007.

ZWEIT, J. Radionuclides and carrier molecules for therapy. **Phys Med Biol**, v. 41, n. 10, p. 1905-1914, 1996.