



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**ESTUDO DA MARCAÇÃO COM ÍNDIO-111 E GÁLIO-68 DE DERIVADOS DA BOMBESINA  
E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS PARA APLICAÇÃO EM SPECT E PET**

**RICARDO DE SOUZA OLIVEIRA**

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

**Orientadora:**

**Profa. 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 ÍNDIO-111 E GÁLIO-68 DE DERIVADOS DA BOMBESINA  
E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS PARA APLICAÇÃO EM SPECT E PET**

**RICARDO DE SOUZA OLIVEIRA**

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

**Orientadora:**

**Profa. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo**

**Versão Corrigida**  
Versão Original disponível no IPEN

**São Paulo**  
**2014**

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando á beira mar,  
divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais  
bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua  
misterioso diante de meus olhos”

(Isaac Newton )

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe, que por todo esse tempo se preocupou, ficou noites sem dormir, e que mesmo nos momentos difíceis nunca deixou de me apoiar e acreditar que era possível realizar este trabalho, e que eu pudesse viver bem, mesmo estando longe de casa e de seus cuidados.

À Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, agradeço por todos os ensinamentos proporcionados, pela disposição e coragem por me aceitar em seu grupo de pesquisa, além da confiança depositada em mim.

À Marycel Rosa Felisa Figols de Barboza, agradeço pelo carinho, atenção e disposição para me ensinar desde a Especialização até o término deste trabalho.

Ao amigo Sérgio G. Suiama, pelo apoio e incentivo, desde o momento que este era apenas uma utopia distante.

Aos meus amigos, Luis Alberto, Adriana Vidal, Bruna Ferrari, Thiago Guarato, Fernando Alvieri, Lais Alcarde, Renata Martinussi, Priscilla Pujatti, Maria Tereza.

À Dra. Miriam Suzuki do Centro de Biotecnologia do IPEN pelo cultivo e desenvolvimento das células utilizadas neste trabalho.

Aos colegas e companheiros de trabalhos da divisão de produção de Radiofármacos, de Controle de Qualidade, e da Pesquisa e Desenvolvimento da Diretoria de Radiofarmácia, obrigado a todos.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em especial à Diretoria de Radiofarmácia, onde os estudos deste trabalho foram realizados.

Ao Hemocentro da UNICAMP, pelo fornecimento das células PC-3 utilizadas neste trabalho.

Aos Funcionários do Biotério do IPEN, em especial à Neide pelo cuidado com os animais.

Aos amigos e colegas do Serviço de Medicina Nuclear do Hospital Israelita Albert Einstein.

Aos funcionários da divisão de pós-graduação do IPEN.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa de estudo concedida.

# **ESTUDO DA MARCAÇÃO COM ÍNDIO-111 E GÁLIO-68 DE DERIVADOS DA BOMBESINA E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS PARA APLICAÇÃO EM SPECT E PET**

Ricardo de Souza Oliveira

## **RESUMO**

Receptores para o peptídeo liberador de gastrina (GRPr) são super expressos 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 aos receptores do peptídeo liberador de gastrina (GRPr). Significantes pesquisas têm sido realizadas para desenvolver e radiomarcador um análogo da bombesina para diagnóstico de tumores de próstata e mama, utilizando-se técnicas de SPECT e PET, com radionuclídeos como  $^{111}\text{In}$  e  $^{68}\text{Ga}$ . O objetivo deste trabalho foi estudar a marcação com  $^{111}\text{In}$  de uma série inédita de peptídeos derivados de bombesina e determinar o potencial de aplicação no diagnóstico de tumores de próstata em modelos animais. Vários estudos foram realizados para padronizar o procedimento de marcação, variando-se temperatura, tempo de marcação, massa do peptídeo e atividade do radionuclídeo. Os resultados demonstraram que os análogos da bombesina estudados podem ser marcados com índio-111 com alto rendimento de marcação e alta atividade específica. Os estudos de biodistribuição em animais normais demonstraram que o derivado de BBN com espaçador aminoacídico Gly<sub>5</sub> apresentou captação pancreática e intestinal expressiva, sugerindo ser o melhor derivado. Dois derivados DOTA- conjugados, com espaçador Gly<sub>5</sub> foram radiomarcados com gálio-68 e investigados em modelo animal com tumor de próstata humano, indicando o potencial para aplicação do peptídeo radiomarcado no diagnóstico por PET.

**STUDY OF LABELLING OF BOMBESIN DERIVATIVES WITH 111-INDIUM  
AND 68-GALIUM AND EVALUATION OF BIOLOGICAL PROPERTIES FOR  
APPLICATION IN SPECT AND PET**

Ricardo de Souza Oliveira

**ABSTRACT**

Gastrin releasing peptide receptors (GRPRs) are over expressed 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 GRPRs. Significant research efforts have been devoted to the design and radiolabel bombesin peptides for the diagnostic of prostatic and breast cancer using SPECT e PET, with radionuclides like  $^{111}\text{In}$  e  $^{68}\text{Ga}$ . The objective of this work was to study the labeling with  $^{111}\text{In}$  of a new bombesin series and evaluate the potential for diagnostic application using animal model. Several studies were evaluated to optimize the labelling conditions of BBN derivatives with  $^{111}\text{In}$  using different temperature, time, mass of peptide and radionuclide activity. High radiochemical purity and high specific activity were obtained for all the peptides labeled with 111-indium. Biodistribution studies in normal mices showed that the BBN derivative with Gly<sub>5</sub> as aminoacidic spacer presented high uptake on pancreas and intestines that suggests that is the best peptide. Two DOTA-derivatives with Gly<sub>5</sub> as spacer were radiolabelled with 68-gallium and evaluated in tumor model animals of human prostatic cancer and showed high potential for clinical application in diagnostic procedures with PET.

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	7
1.1 Medicina Nuclear .....	7
1.2 Radiofármacos para diagnóstico e terapia .....	10
1.3 Radiofármacos baseados em proteínas .....	13
1.4 Radiofármacos baseados em peptídeos análogos da bombesina .....	14
<b>2. OBJETIVO</b> .....	25
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 Infraestrutura .....	31
4.2 Materiais .....	31
4.2.1 Reagentes .....	31
4.2.2 Equipamentos .....	32
4.2.3 Outros materiais .....	32
4.3 Tampões e soluções utilizadas para os estudos com $^{111}\text{InCl}_3$ .....	33
4.4 Tampões e soluções utilizados para os estudos com $^{68}\text{GaCl}_3$ .....	33
4.5 Obtenção dos peptídeos análogos de bombesina .....	33
4.6 Animais .....	34
4.7 Métodos .....	35
4.7.1 Estudo das condições de marcação .....	35
4.7.2 Ensaio de pureza radioquímica .....	38
4.7.2.1 Cromatografia ascendente em camada delgada em sílica gel 60 (TLC) .....	38
4.7.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	39
4.7.3 Estudos de biodistribuição .....	39
4.7.3.1 Estudos de biodistribuição em animais normais .....	39
4.7.3.2 Estudos de biodistribuição em animais com tumor .....	40
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	422
5.1 Estudos de marcação de derivados de bombesina .....	42
5.2 Estudos de biodistribuição em camundongos <i>BALB/c</i> sadios dos derivados de BBN radiomarcados com $^{111}\text{In}$ .....	499
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	61
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	62



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Medicina Nuclear

De acordo com a Sociedade de Medicina Nuclear e Imagem Molecular, Medicina Nuclear é “a especialidade que se ocupa do diagnóstico, tratamento e investigação médica mediante o uso de radioisótopos como fontes radioativas abertas”(SNMMI,2014). Já a Sociedade Brasileira de Biologia, Medicina Nuclear e Imagem Molecular a designa como “a especialidade médica que emprega fontes não seladas de radionuclídeos com finalidade de diagnóstico e de terapia” (SBMN,2014).

As fontes radioativas abertas utilizadas em medicina nuclear na verdade são radiofármacos (RF), que serão utilizados na aquisição de imagens para observar o comportamento fisiológico dos tecidos ou órgãos de forma não invasiva, obtidos através da marcação de moléculas participantes desses processos fisiológicos com isótopos radioativos (Maisey, 1978).

Nestes casos para se obter imagens do comportamento fisiológico e bioquímico do radiofármaco (para um determinado processo em estudo), o comportamento biológico do radiofármaco é quase sempre idêntico ao da substância não radioativa. Os radiofármacos são administrados em quantidades muito pequenas (em massa), e que não alteram os processos fisiológicos, conseqüentemente, possibilitando um estudo funcional sem interferência na função de um determinado órgão. (PUJATTI,2012).

A possibilidade de se visualizar a distribuição do radiofármaco é, sem sombra de dúvida, uma das aplicações mais importantes da radioatividade em Medicina Nuclear. A proposta desse método diagnóstico é administrar quantidades suficientes de radiofármacos e utilizar um equipamento apropriado para obter imagens da distribuição desse marcador molecular nos tecidos ou órgão de interesse (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).

Durante vários anos as imagens cintilográficas foram obtidas com câmaras de cintilografia de uma cabeça (Fig. 01), que evoluíram para equipamentos de duas cabeças de detecção (Fig. 02), que possibilitam um maior conforto ao paciente, uma vez que reduz pela metade o tempo de aquisição de alguns estudos.

Cerca de três quartos de todos os procedimentos clínicos realizados mundialmente utilizam a modalidade SPECT (*Single Photon Emission Computer Tomography*), que associa a imagem cintilográfica a imagens tomográficas, podendo ser adquiridas ou manipuladas em diferentes planos (Gambhir e cols., 2009).



FIGURA 01 – Câmara de Cintilação (Gama câmara) de uma cabeça, um dos primeiros equipamentos utilizados em Medicina Nuclear. (Gama Camara, 2014).



FIGURA 02 – Câmara de cintilação de duas cabeças. (Gama Câmara, 2014)

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

Esta modalidade médica é indispensável para diagnóstico e estadiamento de enfermidades cardíacas, oncológicas, endócrinas, traumatológicas, renais, pulmonares, etc. Os radiofármacos são administrados geralmente por via endovenosa, oral, subcutânea ou via subaracnóideia 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).

A tecnologia PET (Tomografia por Emissão de Pósitrons) é uma tecnologia dispendiosa, proposta de forma a complementar as técnicas de imagens anatômicas como Tomografia (CT) e Ressonância Magnética (RM). Sua disseminação pelo país ainda está limitada aos grandes centros, sendo estes localizados na região sudeste em sua maioria, porém com a quebra do monopólio da União na produção de Radiofármacos a partir de 2006, observou-se um aumento de instalações PET e de Ciclotrons, comandados por empresas privadas. Atualmente de acordo com a Comissão Nacional de Energia Nuclear, o

Brasil possui 436 instalações de clínicas ou hospitais cadastrados que prestam serviços em Medicina Nuclear. (CNEN, 2014).

A atividade administrada ao paciente 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.

Peptídeos e anticorpos radiomarcados com diferentes isótopos vem sendo estudados para a terapia e o diagnóstico de tumores, podendo-se destacar os derivados de somatostatina radiomarcados com Lutécio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ) e Ítrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ), e o anticorpo anti CD20 radiomarcado com  $^{90}\text{Y}$  e Iodo – 131 ( $^{131}\text{I}$ ).

A medicina nuclear tem pode ser utilizada para o tratamento paliativo contra a dor provocada por metástases ósseas, quando outros métodos forem ineficientes para aliviar ou tratar as dores e o sofrimento dos pacientes. Neste caso, utilizando-se radiofármacos que se concentram preferencialmente nas metástases ósseas em relação ao tecido ósseo normal. (COUTO, 2009).

## **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. Em 1932, antes mesmo da Segunda Guerra mundial, 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 e o pleno desenvolvimento da Medicina Nuclear (Welch J.M. e Redvandy, C.S., 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 (Brasil, Resolução RDC Nº 64, 2009, ANVISA).

Os radiofármacos podem ser representados por moléculas inorgânicas simples que contêm 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 do radionuclídeo 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. Um radiofármaco só pode ser empregado em aplicações clínicas quando atender às especificações farmacopeicas e demonstrar-se seguro e eficaz para o uso pretendido. Desta forma, no estudo e desenvolvimento de novos radiofarmacos é necessário avaliar as características de biodistribuição do composto radiomarcado e obter informações sobre a toxicidade do composto, através de experimentos *in vivo* e *in vitro* (Chandra, 1992).

No desenvolvimento de novos radiofarmacos, 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 J. H. e Ziessman, H. A., 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).

No caso de radiofármacos receptor-específicos, 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).

A aplicação de radiofármacos para terapia apresenta-se como uma alternativa para destruir especificamente determinadas células ou impedir sua proliferação indesejável (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, estar 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).

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 Radiofármacos baseados em proteínas**

Nas últimas décadas observou-se uma rápida evolução no desenvolvimento de radiofármacos de origem proteica, baseados em anticorpos monoclonais e peptídeos receptor-específicos, por apresentarem alta afinidade e especificidade pelo tecido tumoral e promoverem 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, resultando meia-vida plasmática longa e difusão lenta 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, R. E. e Thakur, M. L., 2001).

Diante destes problemas, o ideal seria que a molécula carreadora apresentasse uma rápida remoção da circulação sanguínea e excreção principalmente renal, o que pode ser obtido utilizando-se proteínas de baixo peso molecular como os peptídeos. Contudo, o acúmulo de radiação nos rins é um fato indesejável e o radiofármaco deve ser prontamente eliminado pela urina. (Knight, 2003).

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

sanguíneo e rápida difusão tecidual com excreção predominantemente renal (Weiner e Thakur, 2002; Reubi, 2003).

Outra consequência do baixo peso molecular dos peptídeos é a penetração mais rápida e homogênea no tumor. 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 e diagnóstico, 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).

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).

#### **1.4 Radiofármacos baseados em peptídeos análogos da bombesina**

A bombesina (BBN) é um peptídeo de 14 aminoácidos (Fig. 03) 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).

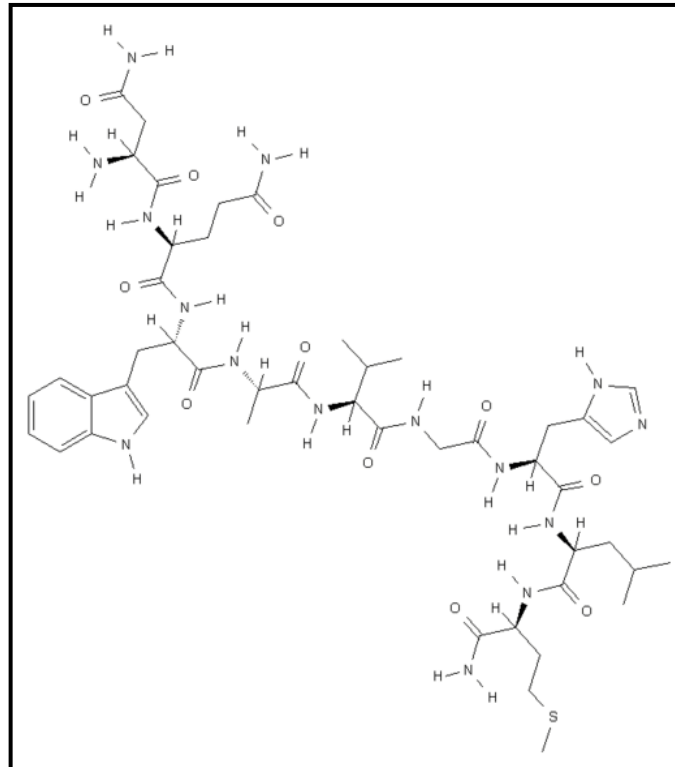


FIGURA 03 - Estrutura da bombesina (Fonte: Estrutura da Bombesina, 2014)

A Fig. 04 apresenta 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 04 - 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 Reubi, 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.

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).

A presença de receptores para GRP em 18 dos 21 casos de metástase linfonodal e em 52,9% das metástases ósseas de câncer prostático foi demonstrada em estudo conduzido por Ananias e colaboradores (2009).

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).

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).

Em 1998, o primeiro pan-análogo da bombesina foi sintetizado, 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.

Agonistas de GRPr promovem proliferação das células tumorais. Tal fato levou os pesquisadores a investigar o uso potencial de antagonistas como agentes anticancerígenos, que podem exercer efeito anti-proliferativo em vários cânceres experimentais *in vitro* e *in vivo*. A inibição do crescimento do tumor ocorre por de diferentes mecanismos que não foram completamente elucidados (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).

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 íntegra (1-14) ou análogos baseados na porção C-terminal (7-14) 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 maioria dos derivados de bombesina são agonistas e são interiorizados 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. Entretanto estudos comparativos demonstraram captação maior para o antagonista, sugerindo que a internalização seja apenas um mecanismo possível de acúmulo (Maina e cols, 2005; Cescato e cols, 2008).

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).

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).

O ensaio de fase I do antagonista de bombesina / GRP RC-3095, em pacientes com tumores sólidos avançados, foi conduzido e o produto demonstrou toxicidade local no ponto de injeção. Assim, a dose recomendada de RC-3095 para os ensaios de fase II não foi estabelecida, e o estudo foi interrompido. Entretanto a intensa atividade antitumoral do RC-3095 em avaliações pré-clínicas, promoveu a continuidade dos que visou desenvolver análogos do peptídeo com menor toxicidade local (Schwartzmann e cols, 2006).

No que diz respeito à utilização de análogos de bombesina para terapia citotóxica, derivados antagonistas de bombesina não radiomarcados foram propostos para o tratamento do câncer. Alguns derivados com espaçadores orgânicos não peptídicos foram reportados e apresentaram atividade citotóxica contra células de diferentes linhagens tumorais (Zhu e cols, 2007). Apesar disto a aplicação dessas moléculas em estudos clínicos ainda é questionável, pois a administração dos derivados em concentrações terapêuticas, 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 (Zhu e cols, 2007).

Os derivados da bombesina também vêm sendo estudados como carreadores 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 imagem. 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 que a massa do derivado da

bombesina no radiofármaco administrado ao paciente é extremamente reduzida em relação às concentrações dos antagonistas não radiomarcados utilizados em terapia (Pujatti, 2009).

Os derivados de bombesina desenvolvidos para radiomarcagem 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 Índio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), Gálio-67 ou Gálio-68 ( $^{67,68}\text{Ga}$ ),  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ) ao grupo funcional da biomolécula. Para marcação com Tecnécio-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), utiliza-se geralmente o quelante HYNIC com coligantes como o EDDA. Entre o grupamento quelante e a sequência de aminoácidos que interage com os receptores normalmente se introduz uma porção modificada, comumente denominada espaçador.

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 Cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ) 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 derivado da bombesina RP527 radiomarcado com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , foi estudado clinicamente em indivíduos sadios. Nenhum efeito adverso grave foi reportado, porém, observou-se, uma alta captação hepática e intestinal, devido à excreção hepatobiliar do RP527- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , detectada até 24 horas após a administração intravenosa do derivado. Além disso, o derivado também foi significativamente captado pela mama das pacientes, impossibilitando sua aplicação no diagnóstico de câncer de mama. (Van de Wiele e cols, 2001).

O EDDA/HYNIC-[Lys3]-bombesina radiomarcado com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , foi estudado em pacientes com e sem câncer de mama. 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).

Um dos derivados de BBN mais intensamente estudados é o agonista da bombesina AMBA radiomarcado com  $^{177}\text{Lu}$  (Lantry e cols, 2006) 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.

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.

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.

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).

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.(Pujatti, 2012).

O derivado da bombesina [ $\epsilon$ -Lys3,Tyr4]-BBN conjugado ao DTPA e ao DOTA e radiomarcado com  $^{111}\text{In}$  mostrou nos estudos *in vitro* de tumor de pâncreas de rato, não haver 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 [ $\epsilon$ -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. (Pujatti, 2012)



Os derivados da bombesina BZH1 (GABA-[DTyr6,  $\beta$ -Ala11, Thi13; Nle14]-BBN(6-14)-DTPA) e BZH2 (GABA-[D-Tyr6,  $\beta$ -Ala11, Thi13; Nle14]-BBN(6-14)-DOTA), com afinidade pelos três receptores, e radiomarcados com índio-111, lutécio-177 e ítrio-90 foram avaliados quanto à ligação às células AR42-J e PC-3 de adenocarcinoma de próstata humano *in vitro* e *in vivo*. 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. 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).

A influência do espaçador entre o grupo quelante e a molécula peptídica também deve ser investigada podendo interferir na afinidade pelo receptor e farmacocinética do composto. 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 (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.

Recentemente utilizando a metodologia descrita no estudo de Mc Bride WJ e cols, 2009, na qual ligava um átomo de Alumínio (Al) ao radioisótopo  $^{18}\text{F}$  formando um complexo estável (Al $^{18}\text{F}$  – quelante – peptídeo) Chatalic e cols, 2014 marcou duas séries diferentes de análogos de gastrina com  $^{18}\text{F}$  e de forma comparativa realizou também

marcações com  $^{68}\text{Ga}$ , para a realização de um estudo pré-clínico no qual resultou em alta captação desses novos radiofármacos ao tumor e rápida depuração sanguínea.

Gourni e col., 2014, utilizando um peptídeo antagonistas de GRPr, radiomarcados com  $^{64}\text{Cu}$  e  $^{68}\text{Ga}$ , e com os quelantes NOTA e NODAGA obtiveram resultados promissores em estudos pré-clínicos, onde ambos os peptídeos apresentaram rápido clareamento sanguíneo e captação tumoral alta. A captação no pâncreas também foi elevada até a primeira hora, porém com rápida eliminação do órgão, resultando em uma relação tumor: pâncreas elevado nos tempos mais tardios.

Utilizado um derivado de BBN radiomarcado com  $^{68}\text{Ga}$  e com o quelante NOTA ( $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-MATBBN) Pan e col., 2014 também obtiveram bons resultados pré-clínicos onde o mesmo observou uma relação tumor : fígado e tumor : intestino alta além de uma farmacocinética favorável e um rápido clareamento sanguíneo. Tais resultados sugerem o potencial do composto radiomarcado para a aplicação em estudos clínicos.

Estes estudos recentes corroboram para continuidade dos estudos de marcadores de receptor GRPr, nos próximos anos, buscando novas alternativas de se obter radiofármacos estáveis, procedimentos de marcação simples utilizando-se radioisótopos emissores de pósitrons uma vez que estes podem ser obtidos de geradores ou de cíclotrons.

## 2. OBJETIVO

Estudar a marcação de uma nova série de derivados da BBN com Índio-111 ( $^{111}\text{In}$ ) e Gálio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ) e caracterizar suas propriedades *in vitro* e *in vivo*, de modo a contribuir para a definição de um marcador molecular inédito e com características adequadas para a realização de diagnóstico de tumores que superexpressam GRPr, utilizando as técnicas de SPECT e PET.

### 3. JUSTIFICATIVA

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).

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  $1\text{cm}^3$ ) que não chega a dar sinais durante a vida e nem a ameaçar a saúde do homem (INCA, 2013).

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 de textura ao exame digital da próstata. Uma vez avaliados esses dois parâmetros, caso persista a hipótese de tumor, deverão ser solicitados estudo ultrassonográfico 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 extra prostática (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 metilenodifosfonato marcado com tecnécio-99m (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).

Tendo em vista a conhecida relação entre a superexpressão do GRPr e alguns tumores humanos e a importância epidemiológica desses tumores no Brasil, o desenvolvimento de radioligantes específicos para estes receptores não só contribui para o diagnóstico, estadiamento, avaliação da resposta terapêutica e/ou tratamento do câncer, como também provém informações a respeito das características bioquímicas das células envolvidas no processo patológico, antecipando a determinação da conduta médica a ser adotada.

O CR-IPEN planejou uma série de peptídeos derivados de BBN, utilizando a sequência BBN<sub>6-14</sub>, conjugados a quelantes do tipo DOTA e DTPA, e utilizando diferentes espaçadores aminoacídicos do tipo Phe-Gly<sub>n</sub> ou Tyr-Gly<sub>n</sub>, com *n* variando de 1 a 5.

Um primeiro estudo comparativo foi realizado com 5 peptídeos (mais especificamente DOTA-Phe-Gly<sub>1-5</sub>-BBN<sub>6-14</sub>) radiomarcados com lutécio 177, com objetivo de avaliar o potencial dos derivados para aplicação na terapia de tumores de próstata (Pujatti, 2009). Neste estudo, observou-se que dois derivados, com espaçadores Phe-Gly<sub>3</sub> e Phe-Gly<sub>5</sub>, apresentaram melhores relações de captação nos tumores em relação à captação nos tecidos normais que expressam receptores GRP, especialmente o pâncreas e intestinos.

Tendo em vista os resultados do primeiro estudo realizado no CR-IPEN com derivados de BBN utilizando espaçadores aminoacídicos, outro estudo foi conduzido no CR-IPEN para avaliar as propriedades biológicas de derivados de bombesina com espaçador Phe-Gly<sub>5</sub>, radiomarcados com lutécio-177. Neste estudo, o derivado com espaçador Phe-Gly<sub>5</sub> foi conjugado ao quelante DTPA, originando o peptídeo DTPA-Phe-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub>. Ainda neste estudo, realizou-se a marcação do derivado DOTA-Phe-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub>, e DOTA-Phe-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-13</sub>-Nle<sub>14</sub> no qual o último aminoácido da sequência BBN<sub>6-14</sub> (Met), foi substituído por norleucina (Nle) (Couto, 2009).

A substituição do aminoácido Metionina por Norleucina representou uma alternativa a ser avaliada, tendo em vista a observação da ocorrência de oxidação do resíduo de Met durante o processo de marcação com lutécio-177 (Pujatti, 2009).

Neste trabalho (Couto, 2009), 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 Met pela Nle 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 DOTA-Phe-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub>. No estudo de ligação *in vitro* às células PC-3, entretanto, a afinidade dos peptídeos DOTA-Phe-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub> e DOTA-Phe-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub>-Nle<sub>14</sub> foi similar. Estas características de biodistribuição indicam o potencial para aplicação clínica destes peptídeos radiomarcados (Couto, 2009).

O uso de espaçadores aminoacídicos do tipo Tyr-Gly<sub>3</sub> e Tyr-Gly<sub>5</sub> foi explorado em estudos subsequentes, utilizando outros derivados de BBN planejados, radiomarcados com <sup>111</sup>In e <sup>68</sup>Ga, para avaliação do potencial de ligação a diferentes linhagens de células de tumor de próstata e mama. Os peptídeos derivados de BBN estudados foram o DOTA e DTPA-Tyr-Gly<sub>3</sub>-BBN<sub>6-14</sub>, DOTA e DTPA-Tyr-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub> e os peptídeos DOTA e DTPA-Tyr-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub>-(Nle<sub>14</sub>), nos quais o último aminoácido da sequência (Met<sub>14</sub>) foi substituído pelo aminoácido Nle. Neste estudo, os derivados conjugados ao DTPA e DOTA foram marcados com <sup>111</sup>In e os conjugados com DOTA foram posteriormente marcados com <sup>68</sup>Ga.

Neste estudo (Pujatti, 2012), o marcador molecular DTPA-Tyr-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub>-(Nle<sub>14</sub>), apresentou maior captação pancreática e tumoral, sugerindo sua capacidade de reconhecer os receptores BB<sub>2</sub>. Dentre os compostos estudados, este foi o marcador molecular mais promissor para aplicações clínicas.

Dentre as linhagens celulares tumorais estudadas, os derivados da bombesina foram capazes de se ligar às células LNCaP e PC-3 de tumor de próstata e às células T-47D de tumor de mama (Pujatti, 2012).

O marcador molecular conjugado ao DOTA apresentou afinidade semelhante ao conjugado ao DTPA pelos receptores, mas este último se ligou menos e foi menos internalizado. O marcador molecular conjugado ao DOTA apresentou maior estabilidade *in vitro* em plasma de camundongo e *in vivo* em soro de camundongo e no tumor de células PC-3 (Pujatti, 2012).

O marcador molecular DOTA-Tyr-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub>-(Nle<sub>14</sub>) radiomarcado com <sup>111</sup>In apresentou maior captação tumoral do que o DTPA-Tyr-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub>-(Nle<sub>14</sub>) no

tumor de células PC-3 e a captação tumoral pelo tumor de células LNCaP foi semelhante para os dois marcadores moleculares, bem como a captação pancreática e intestinal. Apesar da menor captação pelo tumor de células PC-3, os dois compostos foram ferramentas úteis para imagem desses tumores *in vivo* e apresentaram a vantagem da menor captação abdominal e razões tumor:tecidos sadios mais favoráveis, quando comparados ao derivado da bombesina com espaçador Gly<sub>3</sub> radiomarcados com <sup>111</sup>In (Pujatti, 2012).

O trabalho também concluiu que o perfil de biodistribuição do marcador molecular DOTA-Tyr-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub>-(Nle<sub>14</sub>)-<sup>68</sup>Ga em animais sadios e com tumor de células PC-3 foi semelhante ao obtido para o DOTA-Tyr-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub>-(Nle<sub>14</sub>) e DTPA-Tyr-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub>-(Nle<sub>14</sub>) radiomarcados com <sup>111</sup>In, e as razões tumor:músculo para os três marcadores moleculares foram da mesma ordem de grandeza (Pujatti, 2012).

Diversos derivados de bombesina, agonistas e antagonistas, empregando diferentes espaçadores e diferentes quelantes radiomarcados com diferentes radionuclídeos foram propostos por diferentes grupos de pesquisa, conforme descritos na introdução deste trabalho. Entretanto um radioligante com características adequadas para aplicação *in vivo*, ou seja, que apresente o máximo de captação tumoral com o mínimo de acúmulo nos tecidos sadios, ainda não foi descrito e seu desenvolvimento constitui-se em contribuição de suma importância para diagnóstico e tratamento de tumores que superexpressam GRPr.

Os resultados promissores obtidos em estudos com derivados de BBN planejados no CR-IPEN e radiomarcados com lutécio-117, índio-111 e galio-68 possibilitaram identificar derivados com potencial para aplicação no diagnóstico de tumores que expressam receptores para GRP. Tais resultados serão complementados com este estudo, que se propõe a determinar as propriedades biológicas da série DTPA-Tyr-Gly<sub>1-5</sub>-BBN<sub>6-14</sub> radiomarcados com índio-111 e, de forma comparativa, dos peptídeos DOTA-Tyr-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-14</sub> e DOTA-Tyr-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>6-13</sub>-Nle<sub>14</sub> radiomarcados com <sup>68</sup>Ga.



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Infraestrutura

Este projeto foi desenvolvido nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) do Centro de Radiofármacos (CR) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), que possui infraestrutura necessária para a realização dos experimentos, que utilizam fontes radioativas não seladas.

### 4.2 Materiais

#### 4.2.1 Reagentes

Os principais reagentes utilizados neste estudo e os seus respectivos fabricantes seguem abaixo:

- Acetato de sódio anidro (Nuclear, Brasil);
- Acetonitrila grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Ácido clorídrico p.a. (Merck, Alemanha);
- Ácido clorídrico 30% ultrapuro (Merck, Alemanha);
- Acetona ultrapura (Merck, Alemanha);
- Ácido cítrico p.a. (Merck, Alemanha);
- Ácido trifluoroacético grau HPLC (Merck, Alemanha);
- Água purificada por equipamento de osmose reversa (Purificador Milli-RX Millipore, EUA);
- Cloreto de índio-111 ( $^{111}\text{InCl}_3$ , IDB, Holanda);
- Citrato de sódio p.a. (Merck, Alemanha);
- Derivados da bombesina acoplados ao DTPA e ao DOTA com diferentes grupos espaçadores (piCHEM, Áustria);
- 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);

#### 4.2.2 Equipamentos

Em nosso estudo utilizamos equipamentos disponíveis nos laboratórios de P&D do CR, que contribuem para o desenvolvimento de novos radiofármacos, segue abaixo os principais equipamentos utilizados:

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) 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 (Tecnopeon, 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);
- Gerador de  $^{68}\text{Ge}$ - $^{68}\text{Ga}$  de 50 mCi (1850mBq) (Eckert e Ziegler Eurotope, Alemanha);
- Módulo automático para síntese de peptídeos radiomarcados com  $^{68}\text{Ga}$  Modular Lab Pharm Tracer (Eckert e Ziegler Eurotope, Alemanha);
- Cassete para marcação estéril e apirogênico (Eckert e Ziegler Eurotope, Alemanha);

#### 4.2.3 Outros materiais

- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlemeyers, balões volumétricos, provetas e pipetas.
- Frascos para cultivo de células (Costar, EUA);

- Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos tipo eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon e criotubos.

#### 4.3 Tampões e soluções utilizadas para os estudos com $^{111}\text{InCl}_3$

Os principais tampões e soluções utilizadas nos estudos com o radioisótopo  $^{111}\text{In}$  foram:

- Ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (v-v) em acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ )
- Ácido trifluoroacético 0,1% (v-v) em água ( $\text{H}_2\text{O}$ );
- Solução de EDTA 0,2M pH 5,0 em água;
- Solução tampão fosfato-salina (PBS) pH7,4;
- Solução de NaCl 0,9% (p-v) em água;
- Tampão acetato de sódio 0,4M pH4,5;
- Tampão Citrato 0,1M pH 5,0.

#### 4.4 Tampões e soluções utilizados para os estudos com $^{68}\text{GaCl}_3$

Os principais tampões e soluções utilizadas para as marcações com  $^{68}\text{Ga}$  foram:

- Solução de HCl 0,02M em acetona ultrapura;
- Solução de HCl 0,1M;
- Solução de Etanol 50%;
- Tampão acetato de sódio 0,2M pH4,0;
- Tampão Citrato 0,1M pH5,0;

#### 4.5 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 (Pujatti, 2012). 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

Apresentam-se a seguir os peptídeos utilizados neste trabalho, para marcação com  $^{111}\text{In}$  e  $^{68}\text{Ga}$ .

Peptídeos marcados com $^{111}\text{In}$			
Peptídeo	Quelante	Espaçador	Sequência de aminoácidos da BBN <sub>6-14</sub>
DTPA-Tyr-Gly-BBN <sub>(6-14)</sub>		Tyr-Gly	
DTPA-Tyr-Gly <sub>2</sub> -BBN <sub>(6-14)</sub>		Tyr-Gly <sub>2</sub>	
DTPA-Tyr-Gly <sub>3</sub> -BBN <sub>(6-14)</sub>	DTPA	Tyr-Gly <sub>3</sub>	Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met
DTPA-Tyr-Gly <sub>4</sub> -BBN <sub>(6-14)</sub>		Tyr-Gly <sub>4</sub>	
DTPA-Tyr-Gly <sub>5</sub> -BBN <sub>(6-14)</sub>		Tyr-Gly <sub>5</sub>	
Peptídeos marcados com $^{68}\text{Ga}$			
DOTA-Tyr-Gly <sub>5</sub> -BBN <sub>(6-14)</sub> -Met	DOTA	Tyr-Gly <sub>5</sub>	Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met
DOTA-Tyr-Gly <sub>5</sub> -BBN <sub>(6-13)</sub> -Nle		Tyr-Gly <sub>5</sub>	Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Nle

#### 4.6 Animais

Os estudos *in vivo* foram realizados em camundongos *Balb-c*, de seis a dez semanas de idade, e 20 a 25 gramas de peso, *Nude* ou *Scid*, de seis a dez semanas de idade e 15 a 20 gramas de peso, machos ou fêmeas (segundo disponibilidade do Biotério – IPEN). Os animais utilizados neste estudo foram mantidos no Biotério do IPEN, até o instante da realização dos experimentos, em condições adequadas e controladas de luminosidade (sendo o fotoperíodo de 12h/claro e 12h/escuro), temperatura e umidade. Os animais foram alimentados com ração balanceada, padrão para roedores e água *ad libitum* durante todos os experimentos. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de

Ética na Utilização de Animais (CEUA) do IPEN, e realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

## 4.7 Métodos

### 4.7.1 Estudo das condições de marcação

Para se alcançar a metodologia ideal de marcação com Índio-111 ( $^{111}\text{InCl}_3$ ) dos peptídeos estudados foram avaliadas diferentes condições, as quais variam quanto ao tempo de reação, temperatura do meio e a relação atividade/massa (radioisótopo/peptídeo).

Partindo-se de procedimentos de marcação foram avaliados os limites de cada parâmetro da reação, dentre eles tempo de reação e a relação massa do peptídeo: atividade do radioisótopo, quando a marcação era realizada com  $^{111}\text{In}$ . Os análogos radiomarcados foram então submetidos ao controle de pureza radioquímica que indicaram a condição que confere maior rendimento de marcação.

Iniciou-se o procedimento de marcação com  $^{111}\text{In}$ , adicionou-se a 10  $\mu\text{g}$  de cada derivado 18,5 a 925 MBq (0,5 a 25 mCi) de  $^{111}\text{InCl}_3$  (livre de carreador) e ajustou-se o volume para 200  $\mu\text{L}$  com tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5. A mistura de reação foi então incubada por 15 minutos, a 25° C e agitação de 350 rpm e a pureza radioquímica foi analisada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Especificidade (CLAE), conforme descrito a seguir.

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

As marcações dos derivados de bombesina com  $^{68}\text{Ga}$  foram realizadas utilizando o módulo automático Modular-Lab Pharm Tracer (FIG. 09 e 11), equipado com computador com programa para operação do módulo e cassetes para marcação e purificação do peptídeo DOTATATO (FIG. 10).

Inicialmente, montou-se o cassete no módulo automático e realizou-se um teste de pressão no sistema utilizando o programa apropriado. Conectou-se a entrada da mangueira do gerador de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  a um frasco contendo 10 mL de HCl 0,1 M e depois conectou-se a mangueira de saída do gerador na entrada do cassete de marcação. Em seguida, os frascos de NaCl 0,9 % (p/v) e de etanol 50 % foram colocados nas suas posições indicadas no programa, conectou-se uma agulha de respiro na tampa do frasco onde se coloca a solução eluente de HCl em acetona 98 % e adicionou-se 3 mL dessa solução ao frasco. Preparou-se 60  $\mu\text{g}$  de peptídeo em 2 mL de tampão acetato de sódio 0,2 M pH 4,0 contendo ou não etanol (5 % v/v) e transferiu-se a solução para o frasco de reação do sistema automatizado. Procedeu-se à checagem do sistema utilizando o programa apropriado e iniciou-se a síntese. Ao final das reações, determinou-se a pureza radioquímica por CLAE, conforme descrito no item 4.7.2



Fig. 09 – Módulo automático Modular – Lab Pharm Tracer utilizado para marcação automatizada dos derivados de bombesina DOTA conjugados com  $^{68}\text{Ga}$

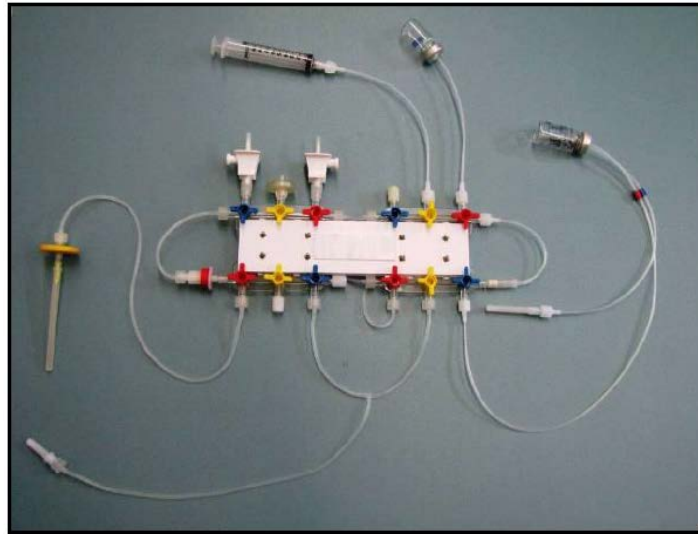


Fig 10 – Cassete para marcação do DOTATATO com  $^{68}\text{Ga}$  que foi utilizado para a marcação dos derivados de bombesina DOTA conjugados

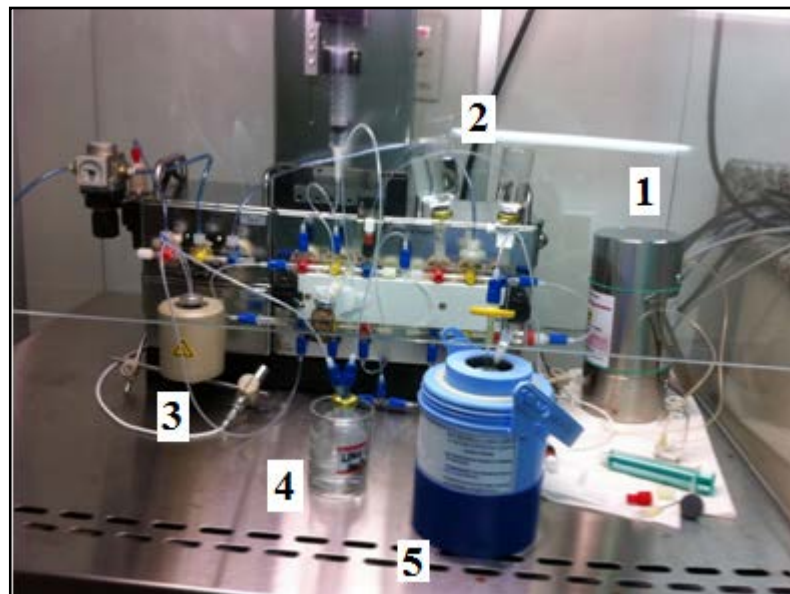


Fig 11 – Módulo automático montado com o cassete para marcação. Os números indicam a posição do gerador de  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$  (1); frascos contendo NaCl 0,9 % p/v e etanol 50 % (2); frasco de reação (3); frasco do resíduo (4) e do frasco contendo produto final (5).

#### 4.7.2 Ensaio de pureza radioquímica

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.

A pureza radioquímica é a fração do radionuclídeo presente na forma química de interesse de determinado radiofármaco. 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).

Neste trabalho, o controle de pureza radioquímica da marcação de BBN-análogos foi realizado em dois sistemas: a cromatografia em camada delgada de sílica gel 60 em placa de alumina (TLC-SG) (Merck, Alemanha), e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

##### 4.7.2.1 Cromatografia ascendente em camada delgada em sílica gel 60 (TLC)

Aplicou-se uma alíquota da mistura de radiomarcação sobre o suporte de TLC (1,2 x 10 cm) e procedeu-se à cromatografia utilizando como fase móvel solução de EDTA 0,2 M pH 5,0. Em seguida, cortou-se as fitas de TLC em 10 segmentos de 1 cm e a radioatividade foi determinada em contador gama automático tipo poço devidamente calibrado para o radioisótopo. Nesse sistema, o marcador molecular permanece na origem da fita ( $R_f$ ) 0,0 – 0,1, enquanto o  $^{111}\text{In}$  não ligado migra com  $R_f$  0,6 – 0,8, este experimento foi feito em triplicata



#### 4.7.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Procedeu-se à cromatografia em fase reversa 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). No primeiro método (método A), 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 (0,11% v/v) em TFA:H<sub>2</sub>O (0,1% v/v) por 15 minutos, retornando ao estado inicial por cinco minutos para estabilização do sistema. No segundo método (método B), o fluxo utilizado foi de 1,0 mL/minuto com 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) por 20 minutos, retornando ao estado inicial por cinco minutos para estabilização do sistema. Analisou-se também, para fins comparativos, o perfil do <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> pelos dois métodos e dos peptídeos não radiomarcados utilizando 280 nm de comprimento de onda (Shimadzu).

#### 4.7.3 Estudos de biodistribuição

Os estudos *in vivo* foram conduzidos de acordo com o Comitê de Ética em pesquisa do IPEN e com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em animais de Laboratório (SBCAL).

##### 4.7.3.1 Estudos de biodistribuição em animais normais

Camundongos adultos da raça *Balb-c* (Bioterio – IPEN), receberam por via endovenosa caudal o BBN – análogo marcado com <sup>111</sup>In (n=3), 1,85 MBq (50 µCi, diluídos em 100 µL de solução de NaCl 0,9 %) de cada marcador molecular. Após diferentes tempos, os animais foram sacrificados, o sangue e os principais órgãos foram retirados para avaliação da radioatividade em um contador gama tipo poço. As porcentagens da dose injetadas por órgão e por grama de órgão serão calculadas em função da contagem de um padrão da dose administrada. Calculou-se as porcentagens da atividade injetada por tecido (%AI, EQ.1) e por grama de tecido (% AI/g, EQ.2). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para a determinação da porcentagem de atividade injetada nos ossos (%AI/osso) e nos músculos (%AI/músculo) dos animais, retirou-se o fêmur e o músculo da coxa dos camundongos, calculou-se a porcentagem de atividade por grama e assumiu-se o peso do esqueleto o cálculo foi realizado para 12% (EQ.3) e para os músculos 40% (EQ.4) do peso corpóreo do camundongo.

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

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

$$\%AI \text{ (osso total)} = \frac{\text{cpm fêmur X 12 X peso do camundongo (g)}}{\text{peso do fêmur (g) X (com padrão - cpm na cauda)}} \quad \text{EQ.3}$$

$$\%AI \text{ (músculo total)} = \frac{\text{com músculo x 40 c peso do camundongo (g)}}{\text{peso do músculo (g) x (cpm padrão - cpm na cauda)}} \quad \text{EQ.4}$$

#### 4.7.3.2 Estudos de biodistribuição em animais com tumor

Células de adenocarcinoma prostático humano grau IV androgênico independente (PC-3) foram mantidos em meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS. As células foram mantidas em ar humidificado contendo 5% de Co a 37°C. As células foram cultivadas até 80% de confluência, tripsinizadas e ressuspensas de acordo com cada experimento.

Para desenvolvimento de modelo tumoral camundongos *SCIDs* foram injetados com  $4 \times 10^6$  células PC-3 por via subcutânea no flanco esquerdo. Os animais foram

utilizados 15 a 21 dias após a administração, quando os tumores atingiram cerca de 5 mm de diâmetro.

O estudo de biodistribuição em animais com tumor foram realizados para os derivados de bombesina DOTA conjugados radiomarcados com gálio-68, utilizando-se a mesma metodologia descrita para o estudo em animais normais. Além do sangue e demais órgãos, também retirou-se a massa tumoral dos animais para determinação da % atividade administrada/grama de tumor.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse estudo o objetivo geral foi estudar a marcação de uma série de peptídeos inéditos derivados de bombesina com  $^{111}\text{In}$  e  $^{68}\text{Ga}$ , caracterizando suas propriedades *in vivo* de modo a avaliar o potencial dos marcadores moleculares para o diagnóstico de tumores que superexpressam receptores para o peptídeo liberador de gastrina (BB2), utilizando técnicas de SPECT e PET.

Desta forma, realizou-se a radiomarkação de alguns peptídeos derivados de bombesina quelados ao DTPA com  $^{111}\text{In}$  para a aplicação em SPECT e a radiomarkação com  $^{68}\text{Ga}$ , por meio de método automatizado, de peptídeos quelados ao DOTA.

### 5.1 Estudos de marcação de derivados de bombesina

Nesse estudo desenvolveu-se o procedimento de marcação com o  $^{111}\text{In}$  utilizando o derivado de BBN, DTPA-Phe-Gly<sub>2</sub>-BBN<sub>(6-14)</sub>, e aplicando as melhores condições aos demais peptídeos, sendo eles, DTPA-Phe-Gly<sub>1</sub>-BBN<sub>(6-14)</sub>, DTPA-Phe-Gly<sub>3</sub>-BBN<sub>(6-14)</sub>, DTPA-Phe-Gly<sub>4</sub>-BBN<sub>(6-14)</sub>, e DTPA-Phe-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>(6-14)</sub>. Em relação ao estudo no qual variou-se o tempo de reação, TAB.1, pode-se observar que o derivado apresentou alta pureza radioquímica em todos os tempos estudados, sendo esta avaliada por cromatografia de camada delgada (CCD), sendo assim adotou-se como padrão para os demais estudos o tempo de 15 minutos, por ser um tempo intermediário.

TABELA 1 - Variação da pureza radioquímica das reações (CCD), em função do tempo em que 10 $\mu$ g de DTPA-Phe-Gly<sub>2</sub>-BBN<sub>6-14</sub> e 18,5MBq (0,5mCi) de <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> reagiram a 25°C sob agitação de 350 rpm em solução de tampão acetato de sódio pH4,5 (n=3).

Tempo de Reação (minutos)	Pureza Radioquímica (%)
5	95,1 $\pm$ 5,7
15	97,3 $\pm$ 0,5
30	97,4 $\pm$ 1,3

Determinado o tempo de reação ideal para o procedimento de marcação, procedeu-se à variação de massa do DTPA-Phe-Gly<sub>2</sub>, sendo os resultados apresentados na FIG. 12, onde 10 $\mu$ g do peptídeo conferiram pureza radioquímica satisfatória  $\geq$  95%. Massas menores do peptídeo resultaram na diminuição da pureza radioquímica. Neste sentido, dentre os valores de massa estudados, a massa de 10 $\mu$ g do peptídeo possibilitou a produção do marcador molecular radiomarcado com alta atividade específica e alta pureza radioquímica. Como as marcações foram realizadas com atividade de 18,5MBq (0,5mCi) de <sup>111</sup>InCl<sub>3</sub>, a atividade específica de 1,85MBq/ $\mu$ g pode ser considerada como a atividade específica máxima que resultou em alta pureza radioquímica da marcação.

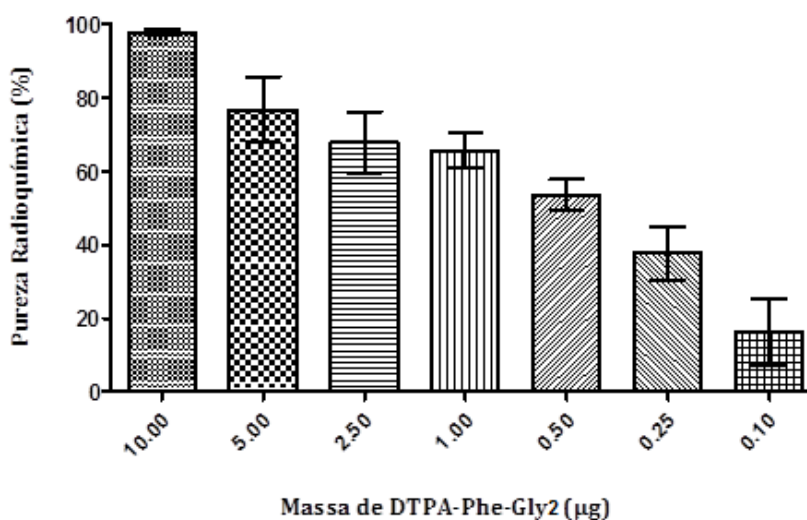


Fig 12 - Efeito da variação de massa sobre a pureza radioquímica da reação de marcação do DTPA-Phe-Gly<sub>2</sub>-BBN<sub>6-14</sub> - <sup>111</sup>In (%) utilizando-se o método de cromatografia em camada delgada (CCD) (n=4).

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, à semelhança dos resultados obtidos neste estudo. A alta atividade específica do  $^{111}\text{In}$  utilizado contribuiu para obtenção de altos rendimentos de marcação à temperatura de 25°C.

De modo a confirmar a atividade específica máxima, avaliou-se o efeito da atividade crescente de radionuclídeo sobre a pureza radioquímica, TAB.2, com CCD e quando possível com CLAE, onde 10µg radiomarcados com 185MBq (5mCi), não apresentou resultados satisfatórios de marcação.

TABELA 2 – Efeito da atividade crescente de radionuclídeo sobre a pureza radioquímica da reação de marcação do DTPA-Phe-Gly<sub>2</sub>-BBN<sub>6-14</sub> com  $^{111}\text{InCl}_3$ .

Massa DTPA-Phe-Gly <sub>2</sub> (µg)	Atividade $^{111}\text{InCl}_3$ MBq/mCi	Pureza Radioquímica DTPA-Phe-Gly <sub>2</sub> -BBN <sub>6-14</sub> $^{111}\text{In}$ (%) (CCD)	Pureza Radioquímica DTPA-Phe-Gly <sub>2</sub> -BBN <sub>6-14</sub> $^{111}\text{In}$ (%) (CLAE)
10	37 / 1	98,9 ± 9,98 (n=3)	nd
10	55,5 / 1,5	59,9 ± 2,2 (n=3)	nd
10	74 / 2	43,2 ± 7,1 (n=3)	nd
10	185 / 5	37,2 ± 4,6(n=3)	nd
20	37 / 1	98,2 (0,2) (n=2)	99,0 (n=1)
20	92,5 / 2,5	98,5 (n=1)	nd
20	148 / 4	98,9 (n=1)	92,3 (n=1)

nd= não determinado

Neste estudo excelentes resultados de pureza radioquímica foram obtidos quando 10 µg do peptídeo foi radiomarcado com 37MBq (atividade específica de 3,7 MBq/µg), decrescendo significativamente quando aumentou-se a atividade para 55,5 MBq. Ao aumentar-se a massa do peptídeo para 20 µg, excelentes resultados de pureza radioquímica foram obtidas para atividade de até 148 MBq (7,4 MBq/ µg). Desta forma, pode-se concluir que se aumentando a massa do peptídeo, obteve-se marcações com alta atividade específica e alta pureza radioquímica.

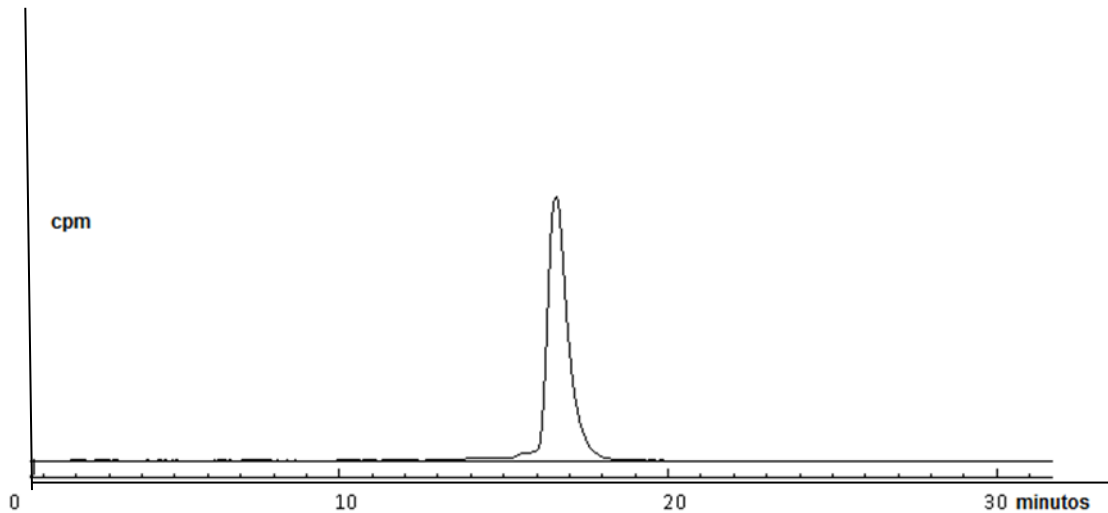
Os estudos de radiomarcção são importantes por que estabelecem uma relação de atividade de  $^{111}\text{In}$ : massa de peptídeo (MBq/µg ou mCi/µg) que confere maior pureza radioquímica ao produto radiomarcado, sendo útil para a extrapolação da condição ótima de marcação para reações envolvendo atividades maiores de cloreto de índio-111, compatíveis com a produção do radiofármaco para aplicações clínicas.

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 radiomarcção, 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.

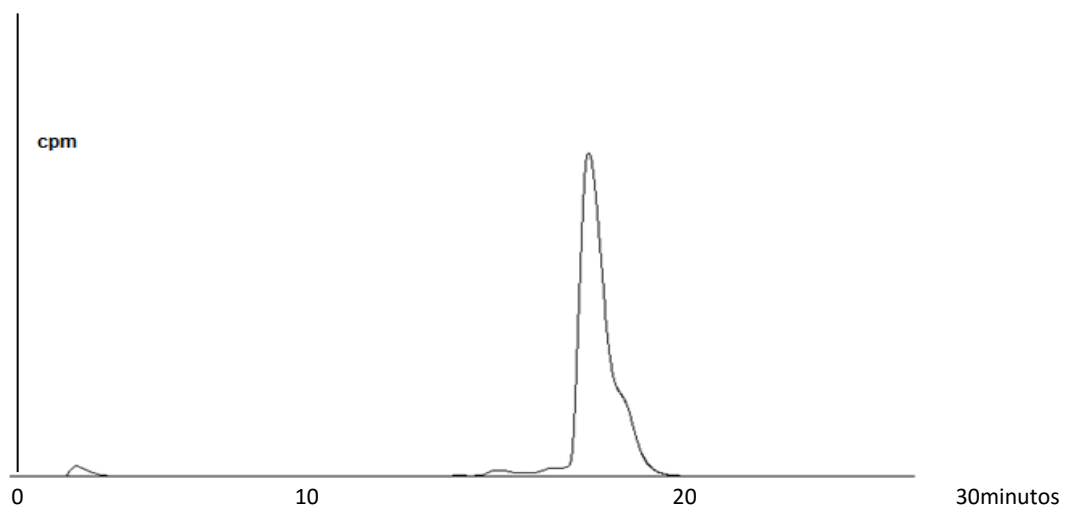
A partir dos resultados destes estudos com o peptídeo DTPA-Phe-Gly<sub>2</sub>-BBN<sub>6-14</sub>, utilizou-se como condição de marcação para os demais derivados DTPA-BBN a seguinte condição de marcação: temperatura de reação a 25°C (ou temperatura ambiente), massa em 10µg, a atividade de cloreto de  $^{111}\text{In}$  em 37MBq ou 1mCi e o tempo de reação em 15 minutos.

Utilizando-se estas condições de marcação, os peptídeos radiomarcados com  $^{111}\text{In}$  foram avaliados por cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em camada delgada, e os cinco peptídeos apresentaram pureza radioquímica satisfatória  $\geq$

95%, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo estes estudos realizados em triplicatas, (FIG. 13, FIG. 14, FIG. 15, FIG. 16 e FIG.17).

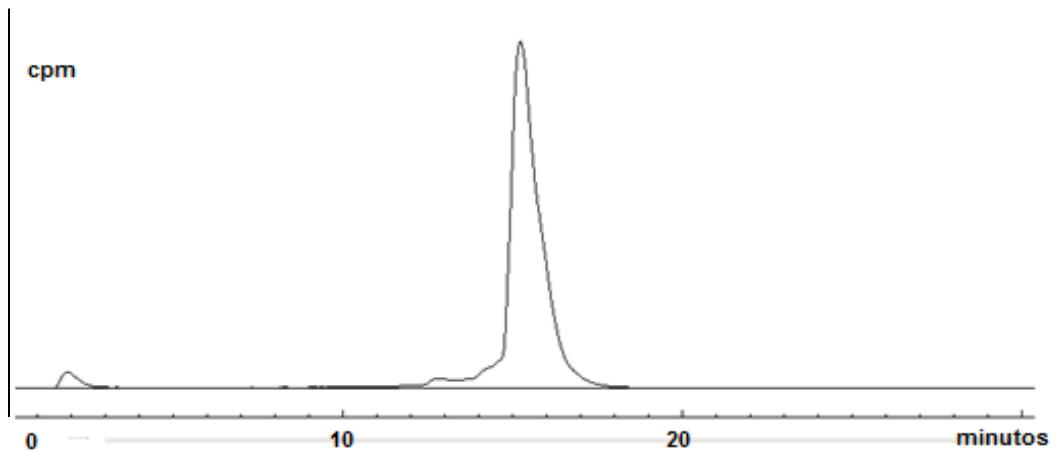


**Fig 13** – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular DTPA-Phe-Gly<sub>2</sub>- BBN<sub>(6-14)</sub>-<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> de atividade específica de 3,7MBq/μg, utilizando-se uma coluna de C18, com gradiente linear de 10 a 90% (v/v) de TFA:CH<sub>3</sub>CN (1:1000 v/v) em TFA:H<sub>2</sub>O a um fluxo de 1 mL/minuto por 20 minutos (n=3).

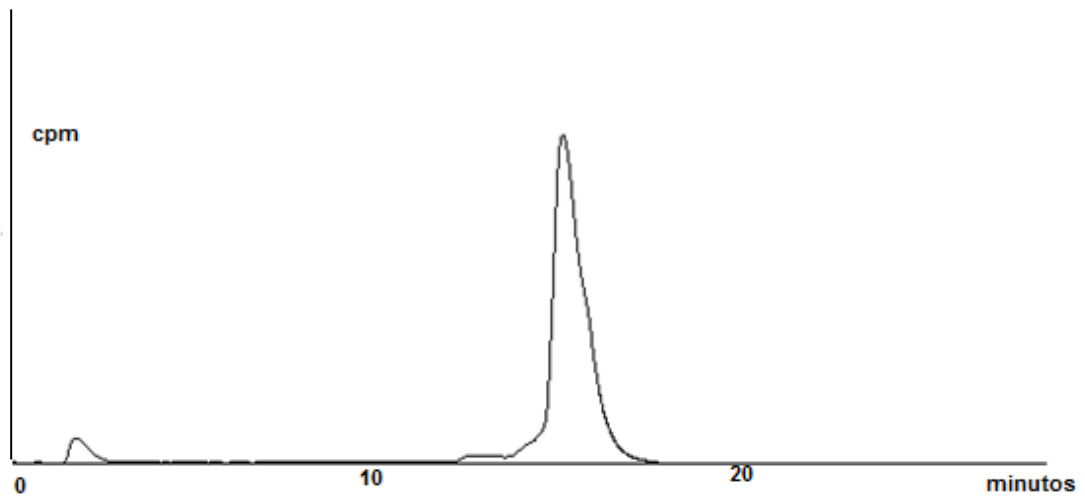


**Fig 14** – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular DTPA-Phe-Gly<sub>1</sub>- BBN<sub>(6-14)</sub>-<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> de atividade específica de 3,7MBq/μg, utilizando-se uma coluna de C18, com gradiente linear de 10 a 90% (v/v) de TFA:CH<sub>3</sub>CN (1:1000 v/v) em TFA:H<sub>2</sub>O a um fluxo de 1 mL/minuto por 20 minutos (n=3)

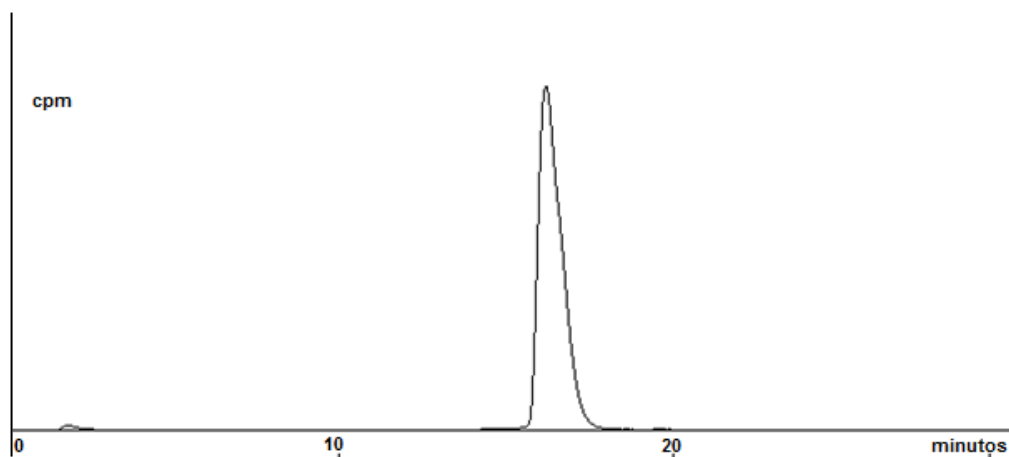




**Fig 15** – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular DTPA-Phe-Gly<sub>3</sub>- BBN<sub>(6-14)</sub>-<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> de atividade específica de 3,7MBq/μg, utilizando-se uma coluna de C18, com gradiente linear de 10 a 90% (v/v) de TFA:CH<sub>3</sub>CN (1:1000 v/v) em TFA:H<sub>2</sub>O a um fluxo de 1 mL/minuto por 20 minutos (n=3)

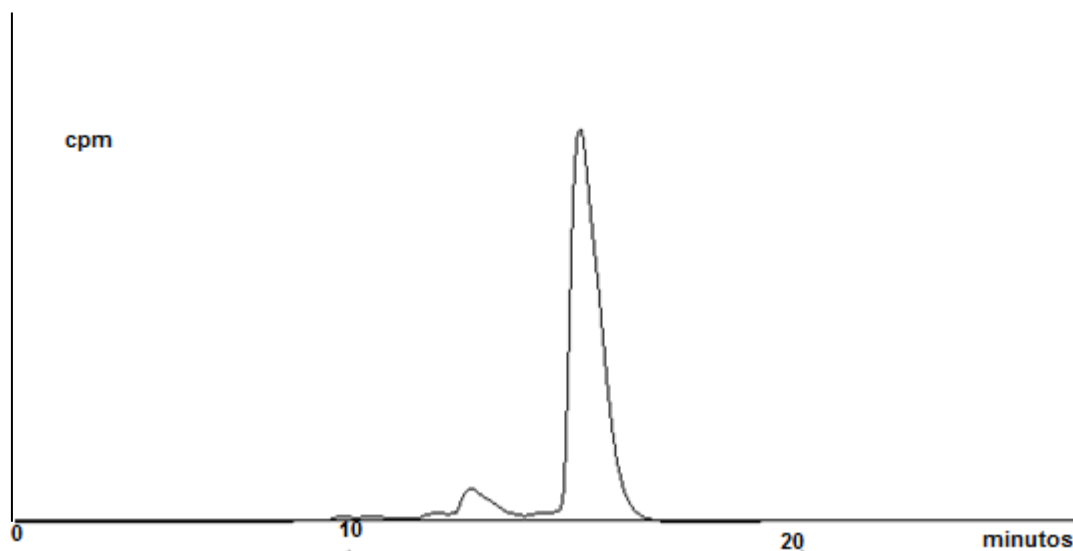


**Fig 16** – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular DTPA-Phe-Gly<sub>4</sub>- BBN<sub>(6-14)</sub>-<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> de atividade específica de 3,7MBq/μg, utilizando-se uma coluna de C18, com gradiente linear de 10 a 90% (v/v) de TFA:CH<sub>3</sub>CN (1:1000 v/v) em TFA:H<sub>2</sub>O a um fluxo de 1 mL/minuto por 20 minutos (n=3)



**Fig 17** – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular DTPA-Phe-Gly<sub>4</sub>BBN<sub>(6-14)</sub>-<sup>111</sup>InCl<sub>3</sub> de atividade específica de 3,7MBq/μg, utilizando-se uma coluna de C18, com 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 a um fluxo de 1 mL/minuto por 20 minutos (n=3)

Em relação à marcação do peptídeo derivado de BBN quelado ao DOTA, DOTA-Phe-Gly<sub>3</sub>-BBN<sub>(6-14)</sub> em módulo automático na presença de etanol 5% v/v, sendo a pureza radioquímica desse produto avaliada por CCD e CLAE obteve-se pureza radioquímica  $\geq$  85%, onde não se observa a presença de <sup>68</sup>Ga livre nas misturas de radiomarkação, confirmando assim a eficiência do sistema de purificação para a remoção do radioisótopo livre, como é mostrado na FIG. 18.



**Fig 18** – Perfil de CLAE (radioativo) do marcador molecular DOTA-Phe-Gly<sub>3</sub>-BBN<sub>(6-14)</sub>-<sup>68</sup>Ga utilizando-se uma coluna de C18, com 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 a um fluxo de 1 mL/minuto por 20 minutos (n=3).

## 5.2 Estudos de biodistribuição em camundongos BALB/c sadios dos derivados de BBN radiomarcados com $^{111}\text{In}$

A biodistribuição dos derivados de bombesina radiomarcados com  $^{111}\text{In}$  em animais sadios podem ser visualizados nas TABELAS 3, 4, 5, 6 e 7 que seguem abaixo. Neste estudo os principais órgãos de interesse são os rins uma vez que o produto pode ser eliminado por esta via de eliminação e é um importante órgão para estudos dosimétricos, o fígado que pode indicar ou não, baixa lipossolubilidade dos produtos e pâncreas uma vez que este apresenta receptores BB2 em alta densidade em camundongos. O peptídeo DTPA-Phe-Gly<sub>1</sub> foi o derivado que apresentou maior captação renal em 4 horas após a injeção, todos os peptídeos apresentaram baixa captação hepática, e o DTPA-Phe-Gly<sub>5</sub> foi o derivado de bombesina que ficou retido por mais tempo no pâncreas.

TABELA 3 – Biodistribuição do marcador molecular DTPA-Phe-Gly<sub>1</sub>- BBN<sub>(6-14)</sub> - $^{111}\text{In}$  (%AI/g de tecido ou mL de sangue), em camundongos *BALB/c* sadios (n=3).

% ATIVIDADE INJETADA/GRAMA (%AI/g)			
Órgãos	TEMPO 1H	TEMPO 4H	TEMPO 24H
<b>Sangue</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,01
<b>Coração</b>	0,04 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Pulmões</b>	0,08 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>Pâncreas</b>	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Baço</b>	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,01
<b>Estômago</b>	0,47 ± 0,29	1,17 ± 0,06	0,03 ± 0,01
<b>Fígado</b>	0,49 ± 0,11	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,01
<b>Rins</b>	1,17 ± 0,23	0,68 ± 0,10	0,13 ± 0,05
<b>Intestinos</b>	0,49 ± 0,15	0,53 ± 0,23	0,02 ± 0,01
<b>Músculo</b>	0,28 ± 0,07	0,02 ± 0,01	0,00 ± 0,00
<b>Osso</b>	0,26 ± 0,17	0,12 ± 0,02	0,01 ± 0,00
<b>Cérebro</b>	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,00 ± 0,00

TABELA 4 – Biodistribuição do marcador molecular DTPA-Phe-Gly<sub>2</sub>- BBN<sub>(6-14)</sub> -<sup>111</sup>In (%AI/g de tecido ou mL de sangue), em camundongos *BALB/c* sadios (n=3).

% ATIVIDADE INJETADA/GRAMA (%AI/g)			
Órgãos	TEMPO 1H	TEMPO 4H	TEMPO 24H
<b>Sangue</b>	0,58 ± 0,09	0,06 ± 0,01	0,002 ± 0,00
<b>Coração</b>	0,15 ± 0,07	0,03 ± 0,01	0,00 ± 0,00
<b>Pulmões</b>	0,15 ± 0,12	0,11 ± 0,02	0,02 ± 0,01
<b>Pâncreas</b>	0,17 ± 0,05	0,26 ± 0,07	0,00 ± 0,00
<b>Baço</b>	0,10 ± 0,05	0,07 ± 0,02	0,01 ± 0,00
<b>Estômago</b>	0,20 ± 0,18	0,84 ± 0,31	0,02 ± 0,00
<b>Fígado</b>	0,34 ± 0,24	0,35 ± 0,06	0,12 ± 0,14
<b>Rins</b>	1,78 ± 0,64	1,00 ± 0,64	0,32 ± 0,08
<b>Intestinos</b>	0,24 ± 0,08	0,58 ± 0,20	0,04 ± 0,01
<b>Músculo</b>	0,53 ± 0,64	0,66 ± 0,12	0,00 ± 0,00
<b>Osso</b>	0,26 ± 0,16	0,04 ± 0,00	0,01 ± 0,01
<b>Cérebro</b>	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

TABELA 5 – Biodistribuição do marcador molecular DTPA-Phe-Gly<sub>3</sub>- BBN<sub>(6-14)</sub> -<sup>111</sup>In (%AI/g de tecido ou mL de sangue), em camundongos *BALB/c* sadios (n=3).

% ATIVIDADE INJETADA/GRAMA (%AI/g)			
Órgãos	TEMPO 1H	TEMPO 4H	TEMPO 24H
<b>Sangue</b>	0,07 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,10 ± 0,15
<b>Coração</b>	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00
<b>Pulmões</b>	0,10 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
<b>Pâncreas</b>	0,04 ± 0,02	0,13 ± 0,05	0,14 ± 0,02
<b>Baço</b>	0,05 ± 0,00	0,04 ± 0,01	0,06 ± 0,02
<b>Estômago</b>	0,11 ± 0,04	0,11 ± 0,05	0,03 ± 0,02
<b>Fígado</b>	0,06 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,00
<b>Rins</b>	1,42 ± 0,28	0,91 ± 0,27	0,47 ± 0,25
<b>Intestinos</b>	0,08 ± 0,03	0,15 ± 0,12	0,04 ± 0,00
<b>Músculo</b>	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,04	0,01 ± 0,00
<b>Osso</b>	0,05 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,03 ± 0,03
<b>Cérebro</b>	0,00 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00

TABELA 6 – Biodistribuição do marcador molecular DTPA-Phe-Gly<sub>4</sub>- BBN<sub>(6-14)</sub> -<sup>111</sup>In (%AI/g de tecido ou mL de sangue), em camundongos *BALB/c* sadios (n=3).

% ATIVIDADE INJETADA/GRAMA (%AI/g)			
Órgãos	TEMPO 1H	TEMPO 4H	TEMPO 24H
<b>Sangue</b>	0,21 ± 0,09	0,03 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Coração</b>	0,38 ± 0,19	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Pulmões</b>	0,15 ± 0,05	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00
<b>Pâncreas</b>	0,07 ± 0,06	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
<b>Baço</b>	0,09 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00
<b>Estômago</b>	0,30 ± 0,20	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,01
<b>Fígado</b>	0,12 ± 0,01	0,03 ± 0,15	0,03 ± 0,01
<b>Rins</b>	2,10 ± 0,64	1,71 ± 0,24	0,37 ± 0,21
<b>Intestinos</b>	0,45 ± 0,20	0,12 ± 0,07	0,06 ± 0,02
<b>Músculo</b>	0,07 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01
<b>Osso</b>	0,05 ± 0,04	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,01
<b>Cérebro</b>	0,01 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00

TABELA 7 – Biodistribuição do marcador molecular DTPA-Phe-Gly<sub>5</sub>- BBN<sub>(6-14)</sub> -<sup>111</sup>In (%AI/g de tecido ou mL de sangue), em camundongos *BALB/c* sadios (n=3).

% ATIVIDADE INJETADA/GRAMA (%AI/g)			
Órgãos	TEMPO 1H	TEMPO 4H	TEMPO 24H
<b>Sangue</b>	0,09 ± 0,04	0,09 ± 0,07	0,03 ± 0,02
<b>Coração</b>	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
<b>Pulmões</b>	0,31 ± 0,08	0,06 ± 0,00	0,02 ± 0,00
<b>Pâncreas</b>	0,53 ± 0,08	0,46 ± 0,21	0,16 ± 0,06
<b>Baço</b>	0,10 ± 0,01	0,24 ± 0,34	0,03 ± 0,00
<b>Estômago</b>	0,15 ± 0,01	0,39 ± 0,55	0,02 ± 0,00
<b>Fígado</b>	0,18 ± 0,05	0,06 ± 0,25	0,03 ± 0,00
<b>Rins</b>	2,06 ± 0,35	1,61 ± 0,37	0,35 ± 0,12
<b>Intestinos</b>	0,11 ± 0,13	0,28 ± 0,16	0,03 ± 0,00
<b>Músculo</b>	0,08 ± 0,02	0,31 ± 0,22	0,00 ± 0,00
<b>Osso</b>	0,08 ± 0,04	0,16 ± 0,12	0,02 ± 0,01
<b>Cérebro</b>	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00

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 é mais crítica quando da utilização clínica de peptídeos radiomarcados com aplicações terapêuticas, como já observado para os derivados de somatostatina radiomarcados com  $^{177}\text{Lu}$  ou  $^{90}\text{Y}$ . Este problema tem sido contornado 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  $\text{BB}_2$  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, especialmente contra indicado para compostos utilizados em terapia (Pujatti, 2012).

Desta forma, no modelo animal utilizado, a captação pancreática do composto é desejável, podendo ser correlacionada com a ligação aos receptores GRP, porém não deve ser excessivamente alta ou mesmo persistente. De qualquer modo, a captação pancreática no modelo animal deverá ser reavaliada nos estudos clínicos, tendo em vista as diferenças de expressão dos receptores entre as espécies.

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).

Os marcadores moleculares estudados apresentaram menor captação pancreática em relação a outros derivados da bombesina descritos na literatura (Lantry e cols, 2006; Zhang e cols, 2007; Garayou e cols, 2007; Pan e cols, 2014).

O peptídeo DTPA-Phe-Gly<sub>5</sub>-BBN<sub>(6-14)</sub>-<sup>111</sup>In apresentou maior captação pancreática e intestinal que os demais, sugerindo apresentar maior afinidade pelos receptores específicos.

Pujatti (2009) encontrou resultados semelhantes para a série de derivados da BBN com espaçadores Gly<sub>1-5</sub>, conjugados ao DOTA e radiomarcados com <sup>177</sup>Lu. Também neste caso, o derivado com espaçador Gly<sub>5</sub> apresentou a maior captação pancreática e também melhor relação de captação nos tumores em relação aos tecidos normais. Deste modo, podemos supor que o tamanho do espaçador influenciou mais na captação do pâncreas que a mudança do quelante (DOTA ou DPTA) ou do radionuclídeo (<sup>177</sup>Lu ou <sup>111</sup>In).

O rápido clareamento sanguíneo observado para todos os peptídeos radiomarcados era esperado, tendo em vista as características de hidrofiliabilidade conferidas aos peptídeos pelos espaçadores aminoacídicos.

A captação no tecido ósseo foi baixa para todos os derivados de bombesina estudados, refletindo a alta estabilidade da ligação DTPA-<sup>111</sup>In *in vivo*.

Os resultados obtidos com esta série de peptídeos radiomarcados com <sup>111</sup>In, sugerem que o derivado com espaçador aminoacídico Gly<sub>5</sub> possui potencial para aplicação no diagnóstico de tumores que expressam receptores para BBN. Neste sentido, este potencial será avaliado para os derivados Gly<sub>5</sub> conjugados ao DOTA e ligados ao gálio-68 em modelos animais de tumor de próstata humano.

As tabelas 8, 9, 10 e 11 a seguir apresentam os resultados dos estudos de biodistribuição dos derivados de BBN DOTA-conjugados e radiomarcados com <sup>68</sup>Ga, realizados em camundongos Balb-c e SCID com tumor.

TABELA 8 – Biodistribuição do  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Phe-Gly5-BBN<sub>(6-14)</sub> (%AI/g de tecido ou mL de sangue), em camundongos Balb-c sadios (n=3).

<b>Órgãos</b>	<b>% ATIVIDADE INJETADA/GRAMA (%AI/g)</b>		
	<b>30 minutos</b>	<b>60 minutos</b>	<b>90 minutos</b>
	<b>Média± Desvio padrão</b>	<b>Média± Desvio padrão</b>	<b>Média± Desvio padrão</b>
<b>Sangue</b>	0,26±0,08	0,13±0,04	0,05±0,03
<b>Coração</b>	0,13±0,02	0,09±0,02	0,03±0,01
<b>Pulmões</b>	0,22±0,02	0,18±0,006	0,05±0,01
<b>Pâncreas</b>	5,56±1,07	4,86±0,69	2,90±0,20
<b>Baço</b>	0,77±0,44	0,53±0,22	0,23±0,09
<b>Estômago</b>	0,93±0,34	0,93±0,84	0,19±0,02
<b>Fígado</b>	0,11±0,01	0,17±0,01	0,09±0,05
<b>Rins</b>	1,37±0,83	2,02±0,50	0,91±0,34
<b>Intestinos</b>	1,01±0,23	1,79±0,70	0,59±0,31
<b>Músculo</b>	0,10±0,03	0,11±0,05	0,05±0,02
<b>Oso</b>	0,15±0,05	0,16±0,06	0,05±0,03
<b>Cérebro</b>	0,03±0,02	0,02±0,003	0,006±0,001



TABELA 9 – Biodistribuição do  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Phe-Gly5-BBN<sub>(6-14)</sub> (%AI/g de tecido ou mL de sangue), em camundongos SCID com tumor (n=3).

Órgãos	% ATIVIDADE INJETADA/GRAMA (%AI/g)		
	30 minutos	60 minutos	90 minutos
	<b>Média ± Desvio padr</b>	<b>Média ± Desvio padrão</b>	<b>Média ± Desvio padrão</b>
Sangue	5,45±2,04	0,78±0,22	0,73±0,28
Coração	1,43±0,51	0,25±0,16	0,25±0,03
Pulmões	2,36±1,73	0,36±0,15	0,31±0,03
Pâncreas	7,52±5,97	3,49±0,60	2,89±0,33
Baço	0,97±0,13	0,57±0,17	0,27±0,09
Estômago	1,717±0,24	0,98±0,74	0,20±0,15
Fígado	0,71±0,17	0,21±0,13	0,21±0,05
Rins	6,38±2,09	1,92±0,75	1,91±0,29
Intestinos	0,54±0,17	0,65±0,49	0,36±0,05
Músculo	0,86±0,48	0,22±0,09	0,09±0,02
Osso	0,96±0,26	0,45±0,19	0,21±0,10
Cérebro	0,15±0,06	0,04±0,001	0,02±0,003
Tumor	1,84±0,59	1,14±0,64	0,49±0,14

TABELA 10 – Biodistribuição do  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Phe-Gly5-BBN<sub>(6-14)</sub>Nle (%AI/g de tecido ou mL de sangue), em camundongos Balb-c sadios (n=3).

Órgãos	% ATIVIDADE INJETADA/GRAMA (%AI/g)		
	30min	60min	90min
	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão	Média ± Desvio padrão
Sangue	0,36±0,02	0,19±0,24	0,08±0,04
Coração	0,18±0,04	0,11±0,10	0,07±0,02
Pulmões	0,40±0,07	0,24±0,24	0,12±0,07
Pâncreas	2,71±1,45	2,08±0,89	1,33±0,33
Baço	0,25±0,04	0,14±0,15	0,09±0,02
Estômago	0,49±0,13	0,31±0,26	0,05±0,03
Fígado	0,19±0,03	0,11±0,11	0,10±0,04
Rins	3,96±0,59	2,28±2,39	3,12±1,69
Intestinos	0,86±0,28	0,57±0,41	0,28±0,06
Músculo	0,15±0,02	0,08±0,09	0,06±0,01
Osso	0,26±0,08	0,17±0,12	0,15±0,04
Cérebro	0,03±0,01	0,02±0,01	0,01±0,002

TABELA 11 – Biodistribuição do  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Phe-Gly5-BBN<sub>(6-14)</sub>Nle (%AI/g de tecido ou mL de sangue), em camundongos SCID com tumor (n=3).

	% ATIVIDADE INJETADA/GRAMA (%AI/g)		
	30 minutos	60 minutos	90 minutos
<b>Órgãos</b>	<b>Média ± Desvio padrão</b>	<b>Média ± Desvio padrão</b>	<b>Média ± Desvio padrão</b>
Sangue	5,48±2,83	2,9±2,4	0,21±0,07
Coração	1,15±0,48	0,14±0,11	0,30±0,10
Pulmões	1,69±0,71	0,74±0,97	0,33±0,23
Pâncreas	3,28±2,26	3,89±3,70	2,25±1,16
Baço	0,58±0,15	0,27±0,29	1,37±1,11
Estômago	1,24±0,37	0,19±0,19	0,34±0,12
Fígado	0,91±0,36	0,22±0,23	0,36±0,34
Rins	10,43±7,13	3,12±2,77	2,23±1,96
Intestinos	0,92±0,18	0,58±0,48	0,83±0,45
Músculo	1,15±0,78	0,36±0,33	0,94±0,68
Osso	1,14±0,67	0,45±0,48	1,00±1,23
Cérebro	0,14±0,06	0,06±0,06	0,08±0,02
Tumor	1,48±0,46	1,05±1,07	0,42±0,15

As tabelas seguintes representam as relações tumor:órgão dos estudos de biodistribuição dos derivados  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Phe-Gly5-BBN(6-14) e  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Phe-Gly5-BBN(6-13)-Nle.

TABELA 12. Relação tumor:órgão obtida a partir dos resultados do estudo de biodistribuição do  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Phe-Gly5-BBN<sub>(6-14)</sub>.

<b>Órgãos</b>	<b>30minutos</b>	<b>60minutos</b>	<b>90minutos</b>
Tumor:Pâncreas	0,24	0,32	0,16
Tumor: Rins	0,28	0,59	0,26
Tumor: Fígado	2,59	5,43	2,33
Tumor:Músculo	2,13	5,18	5,44

TABELA 13. Relação tumor:órgão obtida a partir dos resultados do estudo de biodistribuição do  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Phe-Gly5-BBN(6-13)-Nle

<b>Órgãos</b>	<b>30minutos</b>	<b>60minutos</b>	<b>90minutos</b>
Tumor:Pâncreas	0,24	0,32	0,16
Tumor: Rins	0,28	0,59	0,26
Tumor: Fígado	2,59	5,43	2,33
Tumor:Músculo	2,13	5,18	5,44

Todos os derivados de BBN DOTA-conjugados e radiomarcados com  $^{68}\text{Ga}$  apresentaram rápido clareamento sanguíneo, especialmente nos animais normais (Balb-c). Os animais com tumor (SCID) apresentaram clareamento sanguíneo comparativamente mais lento e vários fatores podem estar relacionados a este fato, dentre eles, as diferenças entre as linhagens de camundongos utilizadas, o comprometimento vascular e/ou fisiológico decorrentes da massa tumoral presente.

A captação renal de todos os derivados também foi significativa e comparável à captação renal observada para os compostos radiomarcados com  $^{111}\text{In}$ . Também no caso dos derivados marcados com  $^{68}\text{Ga}$ , a captação renal pode ser atribuída à excreção dos compostos por esta via.

Todos os compostos radiomarcados com  $^{68}\text{Ga}$  apresentaram baixa captação óssea nos tempos estudados, o que sugere a estabilidade *in vivo* dos marcadores. A captação hepática de todos os derivados foi baixa e compatível com a esperada baixa lipofilicidade dos compostos.

A captação pancreática observada para todos os derivados de BBN DOTA-conjugados radiomarcados com  $^{68}\text{Ga}$  foi elevada quando comparada à captação dos derivados DTPA-conjugados radiomarcados com  $^{111}\text{In}$ , tanto nos camundongos normais como nos camundongos com modelo tumoral.

Pujatti (2012) já havia observado captação pancreática alta para o derivado  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Phe-Gly5-BBN6-13-Nle, em camundongos Balb-c e camundongos Nude com tumor de células PC-3.

Considerando-se a captação pancreática como um indicativo da especificidade do radiomarcador pelos receptores GRP do pâncreas, este trabalho possibilita supor que os derivados DOTA-conjugados radiomarcados com  $^{68}\text{Ga}$  apresentaram maior especificidade que os derivados DTPA-conjugados radiomarcados com  $^{111}\text{In}$ , indicando possível interferência do grupo quelante, ou mesmo do complexo quelante-radionuclídeo na ligação do peptídeo radiomarcado aos receptores específicos.

Ao serem analisadas as relações tumor:órgão obtidas para os derivados DOTA-conjugados, a partir dos estudos de biodistribuição em animais com tumor, observam-se relações tumor:músculo favoráveis para a aquisição de imagens PET. Além disto, a relação tumor:pâncreas aumenta com o tempo (de 30 para 60 minutos) para o derivado  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Phe-Gly5-BBN6-14, sugerindo maior especificidade de ligação às células tumorais, quando comparada com o derivado  $^{68}\text{Ga}$ -DOTA-Phe-Gly5-BBN6-13-Nle, apesar dos valores de % AI/g de tumor serem praticamente iguais para os dois compostos nos tempos observados.

Os estudos de biodistribuição permitem concluir que de todos os derivados de BBN avaliados (7 derivados), os DOTA-conjugados, com espaçadores Gly5, radiomarcados com  $^{68}\text{Ga}$  apresentaram maior potencial para aplicação em estudos clínicos futuros. Tais derivados apresentaram rápido clareamento sanguíneo e captação tumoral, compatíveis com a aquisição de imagens em tempos curtos após a administração do radiofármaco. A excreção predominantemente renal sugere atenção para a dosimetria do órgão, porém é favorável na medida em que evita o acúmulo abdominal, próprio dos compostos que apresentam captação hepática e excreção intestinal. A captação pancreática significativa dos compostos também sugere a capacidade de ligação aos receptores específicos. A captação pancreática, entretanto, não será desejável nos estudos clínicos e deverá ser especialmente observada para avaliação dosimétrica e estudo da interferência na observação de eventuais massas tumorais na região abdominal dos pacientes.

Estudos de biodistribuição utilizando os dois derivados DOTA-conjugados radiomarcados com  $^{68}\text{Ga}$  deverão ser conduzidos com um número maior de animais, de modo a definir qual dos dois compostos deverá ser indicado para a condução dos estudos clínicos futuros.

## 6 CONCLUSÕES

Em relação aos estudos realizados pode-se concluir que:

- Os derivados de BBN DTPA-conjugados foram radiomarcados com  $^{111}\text{In}$  com alta pureza radioquímica. Os estudos de variação dos parâmetros de marcação possibilitaram definir as condições ideais de marcação, resultando em peptídeos radiomarcados com alta pureza radioquímica e alta atividade específica.
- No caso da marcação automatizada, dos derivados DOTA-conjugados com  $^{68}\text{Ga}$ , o processo de purificação final garantiu a obtenção do peptídeo com pureza radioquímica alta com rendimento relativamente alto.
- Os métodos utilizados para avaliação da pureza radioquímica das marcações (TLC e CLAE) possibilitaram a plena separação dos peptídeos radiomarcados e impurezas radioquímicas das marcações.
- Os estudos de biodistribuição realizados com a série de peptídeos DTPA-Gly1-5-BBN6-14, radiomarcados com  $^{111}\text{In}$ , indicou que o peptídeo com espaçador Gly5 apresentou maior captação pancreática dentre os peptídeos estudados, sugerindo apresentar maior afinidade pelos receptores GRP.
- Os derivados de BBN DOTA-conjugados radiomarcados com  $^{68}\text{Ga}$  apresentaram os maiores valores de captação pancreática, captação tumoral satisfatória e relação tumor:músculo compatível com a aquisição de imagens PET. Estes radiofármacos apresentam potencial para aplicação em estudos clínicos futuros.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ELGALIEL, W. R.; GALLAZZI, F.; GARRISON, J. C.; ROLD, T. L.; SIECKMAN, G. L.; FIGUEROA, S. D.; HOFFMAN, T. J.; LEVER, S. Z. Design, synthesis, and biological evaluation of an antagonist-bombesin analogue as targeting vector. *Bioconjug Chem*, v. 19, n. 10, p. 2040-2048, 2008.

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.; SZEPEHAZI, 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 <sup>90</sup>Y, <sup>111</sup>In and <sup>177</sup>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.

CESCATO, 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.

CNEN, Comissão Nacional de Energia Nuclear, Instalações de Medicina Nuclear. Disponível em: < <http://www.cnen.gov.br/seguranca/cons-ent-prof/entidades-aut-cert.asp>> Acessado em 20 de set. de 2014.

DE VINCENTIS, G.; REMEDIANI, S.; VARVARIGOU, A. D.; DI SANTO, G.; IORI, F.; LAURENTI, C.; SCOPINARO, F. Role of <sup>99m</sup>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 <sup>111</sup>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 & lipossomes**. 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: 09 set. 2014.

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.

GAMA CAMARA. Disponível em:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Gamma\\_camera#mediaviewer/File:GammaCamera.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Gamma_camera#mediaviewer/File:GammaCamera.jpg)  
Acesso em 12 de set. 2014.

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.

GARRISON, J. C.; ROLD, T. L.; SIECKMAN, G. L.; NAZ, F.; SUBLETT, S. V.; FIGUEROA, S. D.; VOLKERT, W. A.; HOFFMAN, T. J. Evaluation of the pharmacokinetic effects of various linking group using the <sup>111</sup>In-DOTA-X-BBN(7-14)NH<sub>2</sub> structural paradigm in a prostate cancer model. *Bioconjug Chem*, v. 19, n. 9, p. 1803-1812, 2008.

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.; KOOIJ, 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. <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>-DTMA bombesin conjugates having high affinity for the GRP receptor. *Nucl Med Biol*, v. 35, n. 3, p. 263-272, 2008.

LANTRY, L. E.; CAPPELLETTI, E.; MADDALENA, M. E.; FOX, J. S.; FENG, W.; CHEN, J.; THOMAS, R.; EATON, S. M.; BOGDAN, N. J.; ARUNACHALAM, T.; REUBI, J. C.; RAJU, N.; METCALFE, E. C.; LATTUADA, L.; LINDER, K. E.; SWENSON, R. E.; TWEEDLE, M. F.; NUNN, A. D. <sup>177</sup>Lu-AMBA: Synthesis and characterization of a selective <sup>177</sup>Lu-labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer. *J Nucl Med*, v. 47, n. 7, p. 1144-1152, 2006.

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-NO<sub>2</sub>A-(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.

MEDICINA NUCLEAR. Sociedade Brasileira de Medicina Nuclear. Disponível em <[http://www.sbm.org.br/site/medicina\\_nuclear](http://www.sbm.org.br/site/medicina_nuclear)> Acesso em 27 set 2014

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.

NUCLEAR MEDICINE. Disponível em <<http://www.snmmi.org/AboutSNMMI/Content.aspx?ItemNumber=4456>> Acesso em: 09 set. 2014.

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.

PATEL, O.; SHULKES, A.; BALDWIN, G. S. Gastrin-releasing peptide and cancer. *Biochim Biophys Acta*, v. 1766, n. 1, p. 23-41, 2006.

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.



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 <sup>99m</sup>Tc-EDDA/HYNIC-[Lys<sup>3</sup>]-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.

SCHROEDER, R. P.; VAN WEERDEN, W. M.; KRENNING, E. P.; BANGMA, C. H.; BERNDSEN, S.; GRIEVINK-DE LIGT, C. H.; GROEN, H. C.; RENEMAN, S.; DE BLOIS, E.; BREEMAN, W. A.; DE JONG, M. Gastrin-releasing peptide receptor-based targeting using bombesin analogues is superior to metabolism-based targeting using choline for *in vivo* imaging of human prostate cancer xenografts. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, v. 38, n. 7, p. 1257-1266, 2011.

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. 99mTc-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.; SLEGGERS, 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.; SLEGGERS, 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.