AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**RADIOMARCAÇÃO DE INIBIDOR DE PSMA COM ^{177}Lu E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO
POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

JEFFERSON DE JESUS SILVA

**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
2017**

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

**RADIOMARCAÇÃO DE INIBIDOR DE PSMA COM 177LU E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO
POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

JEFFERSON DE JESUS SILVA

**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
2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

SILVA, Jefferson. J. J.. **Radiomarcção de inibidor de PSMA com ^{177}Lu e avaliação biológica do potencial para aplicação no tratamento do câncer de próstata**. 2017. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP. São Paulo. Disponível em: <http://www.teses.usp.br>

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de geração automática da Biblioteca IPEN/USP, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva, Jefferson de Jesus Silva.

Radiomarcção de inibidor de PSMA com ^{177}Lu e avaliação biológica do potencial para aplicação no tratamento do câncer de próstata / Jefferson de Jesus Silva. Orientadora Profa. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo. São Paulo, 2017.

131p.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear. Área de concentração (Aplicações). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Universidade de São Paulo.

1. Câncer de próstata. 2. Radiofármaco. 3. Terapia Radionuclídica. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Jefferson de Jesus Silva.

Título: Radiomarcacão de inibidor de PSMA com ^{177}Lu e avaliação biológica do potencial para aplicação no tratamento do câncer de próstata.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Profa. Dra.: Elaine Bortoleti de Araújo. Julgamento: _____

Instituição: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

Profa. Dra.: Adriana Vidal Fernandes Massicano. Julgamento: _____

Instituição: University of Alabama at Birmingham.

Prof. Dr.: Luiz Augusto Corrêa Passos. Julgamento: _____

Instituição: Universidade Estadual de Campinas.

Profa. Dra.: Sibila Roberta Marques Grallert. Julgamento: _____

Instituição: Instituto Racine.

Profa. Dra.: Renata Corrêa Nieto. Julgamento: _____

Instituição: Universidade Presbiteriana Mackenzie.

Dedico esse trabalho aos meus pais, familiares,
professores e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus que iluminou o meu caminho, colocando pessoas do bem durante essa longa trajetória.

À minha família, em especial aos meus pais, Ana e José, como exemplos de dignidade e honestidade, são a base para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu querido irmão, pela amizade e companheirismo ao longo de nossas vidas.

À minha orientadora Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, o meu sincero agradecimento pela confiança, pelos ensinamentos transmitidos, pela amizade e sobretudo pela compreensão e conversa quando a vida me pregou uma peça. Obrigado por ser uma pessoa humanizada!

À Dra. Maria Tereza Colturato, pelo incentivo durante a realização deste trabalho e pela disponibilidade em participar do seminário geral de área, suas recomendações foram fundamentais.

Ao MSc. Jair Mengatti, pela contribuição no que foi necessário para conduzir o presente trabalho.

À Dra. Neuza Takeo O. Fukumori e a Dra. Margareth Mie N. Matsuda, pela compreensão das necessidades envolvidas no desenvolvimento deste trabalho, tornando possível a utilização dos equipamentos do controle de qualidade do centro de radiofarmácia.

Ao Dr. Daniel Perez, Dra. Miriam Suzuki e Dra. Sofia Santos, por todas as vezes que me auxiliaram no cultivo celular.

Ao Hospital do Câncer de Barretos, por disponibilizar as células tumorais que foram utilizadas neste trabalho.

Aos funcionários e colaboradores do Biotério, em especial à Neide, Ana Claudia, Andreia, Cecília, Elizabeth, Dra. Nanci Nascimento (*in memoriam*), Dr. Luiz

Augusto Passos e Dra. Glauce, por todo o suporte dado em relação aos animais utilizados neste trabalho.

Aos amigos de pós-graduação, Adriana Vidal, Bruna Teiga, Jorge Batista, Luis Alberto, Natanael Silva, Raquel Benedetto, Regiane Martins, Sofia Santos, Cristian Villas Boas e Laís Alcarde. Eu tenho sorte e agradeço a Deus por ter me presenteado com suas amizades, vocês promoveram conforto e tornaram de alguma forma possível a realização deste trabalho. Muito obrigado!

Ao meu segundo irmão Filipe (*in memoriam*). “Um irmão é um amigo que Deus lhe deu, um amigo é um irmão que seu coração escolheu”.

À professora Adelaide José Vaz (*in memoriam*) e ao professor Alípio de Oliveira Carmo. “Um professor sempre afeta a eternidade. Ele nunca saberá onde sua influência termina” (Joseph Addison).

Aos demais amigos, professores e familiares de todas as partes.

Aos membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

Aos funcionários da divisão de pós-graduação do IPEN.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pelo auxílio financeiro.

“Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado”.

Albert Einstein

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes”.

Cora Coralina

RESUMO

O câncer de próstata é considerado o segundo mais comum na população masculina em todo o mundo e ocupa a 15ª posição em mortes por câncer, em homens, representando cerca de 6% do total de mortes por câncer no mundo. O antígeno de membrana prostático específico (PSMA) é uma glicoproteína tipo II transmembrânica superexpressa no câncer de próstata, suas metástases e em neovascularizações relacionadas a tumores sólidos, que tem estimulado o desenvolvimento de pequenas moléculas inibidoras do receptor de PSMA, que carreguem agentes terapêuticos. Este trabalho pretendeu estudar de forma inédita a marcação e estabilidade radioquímica do Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-DOTA com ^{177}Lu (PSMA-DOTA- ^{177}Lu) e avaliar seu potencial para a terapia do câncer de próstata. O radiofármaco foi obtido com pureza radioquímica elevada (PR > 95%) em todas as condições estudadas e permaneceu inalterada em $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até 48 horas, mesmo em atividade específica alta (74 MBq/ μg). O ensaio de ligação específica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu mostrou que a fração do peptídeo que se ligou às células LNCaP de tumor de próstata foi de $1,79 \pm 0,21\%$, $2,47 \pm 0,03\%$, $3,07 \pm 0,01\%$ e $4,13 \pm 0,27\%$, para as concentrações de $0,15 \times 10^6$, $0,3 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ e 1×10^6 células, respectivamente. O ensaio de internalização do PSMA-DOTA- ^{177}Lu sugere que o maior percentual da ligação específica do radiofármaco às células LNCaP corresponde à fração da ligação de superfície ($99,03 \pm 0,84\%$). Os parâmetros farmacocinéticos determinados no estudo *in vivo* em camundongos *Balb/c* são compatíveis com o rápido clareamento sanguíneo e excreção renal, além de apresentar apreciável captação tumoral *in vivo* ($2,76 \pm 1,21\%$ AI/g) após 4 horas de administração do radiofármaco. Os estudos em estabilidade em soro humano demonstram estabilidade alta do radiofármaco PSMA-DOTA- ^{177}Lu por um período de até 24 horas, que foi confirmada pela baixa captação óssea demonstrada nos estudos *in vivo* de biodistribuição. O estudo de variação da atividade possibilitou estabelecer a atividade específica ideal (MBq/ μg), que será extrapolada para um piloto de produção do radiofármaco. Os resultados favoráveis deste estudo encorajam a perspectiva de realização de ensaio clínico controlado deste novo radiofármaco, avaliando seu potencial para aplicação no tratamento do câncer de próstata.

Palavras-chave: Câncer de próstata, Radiofármaco, Terapia Radionuclídica.

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most frequently worldwide diagnosed cancer among males and ranks the 15th common cause of death from cancer in men, comprising 6% of the world's total cancer deaths. The prostate specific membrane antigen (PSMA) is a type II transmembrane glycoprotein, which is overexpressed in prostate cancer as well as in the neovasculature of solid tumors and metastasis. These features render PSMA an ideal target for developing small molecules inhibitors of PSMA and therapeutic approaches to targeted drugs delivery. This work intended to study in an unprecedented way the radiochemical labeling and stability of Glu-NH-CO-NH-Lys (Ahx)-DOTA with ^{177}Lu (^{177}Lu -PSMA-DOTA) and its potential anti-tumor effects in prostate cancer. The radiopharmaceutical PSMA- ^{177}Lu was obtained with high radiochemical purity (RP > 95%) under all studied conditions and remained unchanged up to 48 hours (high at $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$), even at high specific activity (74 MBq / μg). The cellular uptake of PSMA-DOTA- ^{177}Lu was determined using PSMA-expressing LNCaP cells and showed a binding of $1.79 \pm 0.21\%$, $2.47 \pm 0.03\%$, $3.07 \pm 0.01\%$ and $4.13 \pm 0.27\%$, to 0.15×10^6 , 0.3×10^6 , 0.5×10^6 and 1×10^6 LNCaP cells, respectively. The PSMA-DOTA- ^{177}Lu internalization assay revealed that the membrane-bound activity (non-internalized peptide) to LNCaP cells, was $99.03 \pm 0.84\%$. Moreover, the pharmacokinetic *in vivo* studies performed in *Scid* mice resulted in a rapid blood clearance and renal excretion, and showed significant tumor uptake ($2.76 \pm 1.21\%$ IA/g) 4 hours after PSMA-DOTA- ^{177}Lu administration. Stability studies in human serum demonstrated high PSMA-DOTA- ^{177}Lu stability over 24 hours, which is in agreement with the low bone uptake obtained in the *in vivo* biodistribution studies. Furthermore, the comparative study aiming to establish the ideal PSMA-DOTA- ^{177}Lu specific activity (MBq / μg) will be considered for further radiopharmaceutical production. The pre-clinical data obtained from this study suggested a great potential for PSMA-DOTA- ^{177}Lu to be included in clinical trials and to make a major contribution to the treatment of prostate cancer.

Key words: Prostate cancer, Radiopharmaceutical, Peptide receptor radionuclide therapy.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo geral	23
2.2 Objetivos específicos	23
3 REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1 CÂNCER	24
3.1.1 Câncer de Próstata	25
3.1.2 Marcadores associados ao câncer de próstata	27
3.2 ANTÍGENO DE MEMBRANA PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSMA)	28
3.3 DESENVOLVIMENTO DE MOLÉCULAS PSMA-ESPECÍFICAS	30
3.4 INIBIDORES DE PSMA NA MEDICINA	32
3.4.1 Inibidores do PSMA baseados em ureia (IPBU)	33
3.5 APLICAÇÃO CLÍNICA DE INIBIDORES DO PSMA BASEADOS EM UREIA NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA	34
3.6 Diagnóstico e terapia do câncer na MEDICINA NUCLEAR	39
3.6.1 Terapia Radioisotópica	40
3.6.2 Considerações para o desenvolvimento de moléculas para terapia radioisotópica	42
3.6.3 Seleção do radioisótopo	43
3.6.4 Lutécio-177	45
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	48
4.1 Resumo do delineamento experimental	48
5 MATERIAIS	50
5.1 Infraestrutura	50
5.2 Reagentes e soluções	50
5.3 Equipamentos	51
5.4 Animais	52
5.5 Células de carcinoma prostático humano androgênio-dependente	53
6 MÉTODOS	54
6.1 Desenvolvimento do método de radiomarcagem do PSMA-DOTA com ¹⁷⁷ Lu e obtenção do IPBU conjugado com o agente quelante DOTA	54
6.2 Determinação de atividade específica do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	55
6.3 Desenvolvimento do método de controle de pureza radioquímica	56
6.4 Análise da estabilidade do peptídeo PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu após a marcação	57
6.5 Análise da estabilidade do peptídeo PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em soro humano e ligação às proteínas plasmáticas in vitro	57

6.6 Determinação do coeficiente de partição (log P) experimental	58
6.7 Procedimento de cultivo das células de carcinoma prostático humano androgênio-dependente (LNCaP) e estudo de ligação celular	59
6.8 Ensaio in vitro de ligação específica do peptídeo PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu às células LNCaP	59
6.9 Ensaio in vitro de internalização do peptídeo PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu às células LNCaP ..	60
6.10 Estudos farmacocinéticos do peptídeo PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos BALB/c	61
6.11 Estudos de biodistribuição do peptídeo PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos BALB/c	62
6.12 Identificação das principais espécies presentes na urina	64
6.13 Desenvolvimento de modelo tumoral LNCaP em camundongos SCID	64
6.14 Estudos de biodistribuição do peptídeo PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos SCID com tumor	65
6.15 Análise estatística	65
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
7.1 Desenvolvimento de método de cromatografia em camada delgada (CCD) e de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	67
7.2 Estudo de radiomarcagem com ¹⁷⁷ Lu e determinação de atividade específica do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	76
7.3 Determinação do coeficiente de partição (log P) experimental	87
7.4 Análise da estabilidade em soro humano e ligação às proteínas séricas “in vitro”	88
7.5 Estudos de ligação do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu às células tumorais	92
7.6 Estudos de farmacocinética do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos BALB/c	97
7.7 Estudos de biodistribuição do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos BALB/c	100
7.8 Desenvolvimento do modelo tumoral e estudo de biodistribuição do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos com tumor de células LNCaP	107
8 CONCLUSÃO	113
ANEXO A	115
ANEXO B	116
ANEXO C	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos principais radionuclídeos emissores de partículas β^- utilizados na radioterapia.....	44
Tabela 2 - Estudo da variação da massa de PSMA-DOTA utilizada no procedimento de marcação, à temperatura de 90° C, 30 minutos sob agitação constante de 350 rpm e 92,5 MBq (2,5 mCi) de ^{177}Lu (n=5).....	78
Tabela 3 - Análise da influência da atividade específica sobre a pureza radioquímica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu , mantendo como padrão 10 μg do peptídeo, 90°C, 30 minutos sob agitação de 350 rpm (CCD-SG) (n=3).....	79
Tabela 4 – Porcentagem de ligação à superfície e internalização do PSMA-DOTA- ^{177}Lu (n= 8).....	96
Tabela 5 – Parâmetros farmacocinéticos para o PSMA-DOTA- ^{177}Lu determinados em camundongos <i>BALB/c</i> machos (n = 5).....	99
Tabela 6 - Biodistribuição do PSMA-DOTA- ^{177}Lu com atividade específica de 74MBq/ μg em camundongos <i>BALB/c</i> machos. Os resultados estão em porcentagem de atividade administrada por grama de tecido (%AI/g) ou mL de sangue (%AI/mL) (n=5).....	101
Tabela 7 - Biodistribuição do PSMA-DOTA- ^{177}Lu com atividade específica de 74MBq/ μg em camundongos <i>BALB/c</i> machos. Os resultados estão em porcentagem de atividade administrada por órgão (%AI) (n=5).....	102
Tabela 8 - Razões órgão:sangue calculadas a partir da %AI/g ou %AI/mL dos resultados da biodistribuição do PSMA-DOTA- ^{177}Lu em camundongos <i>BALB/c</i> machos.....	103
Tabela 9 - Biodistribuição do PSMA-DOTA- ^{177}Lu com atividade específica de 74 MBq/ μg em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor LNCaP. Os resultados estão em porcentagem de atividade por grama de tecido (%AI/g) ou mL de sangue (%AI/mL) após 4 horas de administração (n=3).....	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição proporcional das estimativas dos dez tipos de câncer mais incidente no Brasil para 2016, exceto pele não melanoma.....	25
Figura 2 – Esquema ilustrativo do antígeno de membrana prostático específico (PSMA), constituído por domínio extracelular de 707 aminoácidos, região transmembrana de 24 aminoácidos e domínio intracelular de 19 aminoácidos.....	29
Figura 3 – Estrutura molecular de Inibidores de PSMA baseados em ureia. O terminal de carboxilato livre é mantido intacto (lado direito) e as modificações estruturais são introduzidas na outra extremidade (lado esquerdo), substituindo o ácido aspártico por outros aminoácidos.....	35
Figura 4 – Estrutura molecular do inibidor PSMA-617.....	36
Figura 5 - Estrutura molecular do peptídeo Glu-NH-CO-NH-Lys (Ahx)-DOTA (PSMA-DOTA).....	39
Figura 6 – Estrutura molecular do agente quelante ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracéticoo (DOTA).....	46
Figura 7 - Esquema do delineamento experimental do trabalho.....	49
Figura 8 - Ilustração simplificada da complexação do IPBU com DOTA.....	55
Figura 9 - Perfil cromatográfico em CCD-SG do $^{177}\text{LuCl}_3$ utilizando como fase móvel a solução metanol:acetato de amônio 1M pH 8,5 (1:1 v/v) (n=4).....	68
Figura 10 - Perfil cromatográfico em CCD-SG do $^{177}\text{LuCl}_3$ utilizando como fase móvel o tampão citrato:ácido cítrico 0,1M pH 5 (n=4).....	68
Figura 11 - Perfil cromatográfico em CCD-SG do PSMA-DOTA- ^{177}Lu utilizando como fase móvel a solução metanol:acetato de amônio 1M pH 8,5 (1:1 v/v) (n=7).....	69
Figura 12 - Perfil cromatográfico em CCD-SG do PSMA-DOTA- ^{177}Lu utilizando como fase móvel o tampão citrato:ácido cítrico 0,1M pH 5 (n=7).....	69
Figura 13 - Radiocromatograma do $^{177}\text{LuCl}_3$ utilizando coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,6 mm, 5 μm).....	71
Figura 14 - Radiocromatograma do PSMA-DOTA- ^{177}Lu utilizando coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,6 mm, 5 μm).....	72

Figura 15 - Radiocromatograma do $^{177}\text{LuCl}_3$ livre e PSMA-DOTA- ^{177}Lu utilizando coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,6 mm, 5 μm).....	73
Figura 16 – Estudo comparativo da pureza radioquímica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu (marcação de 5 μg de PSMA-DOTA) em CCD-SG utilizando-se diferentes fases móveis em suporte de tiras de sílica gel ($p > 0,05$) ($n=3$).....	74
Figura 17 – Estudo comparativo da pureza radioquímica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu (marcação de 10 μg de PSMA-DOTA) em CCD-SG utilizando-se diferentes fases móveis em suporte de tiras de sílica gel ($p > 0,05$) ($n=3$).....	75
Figura 18 – Estudo comparativo da pureza radioquímica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu (marcação de 20 μg de PSMA-DOTA) em CCD-SG utilizando-se diferentes fases móveis em suporte de tiras de sílica gel ($p > 0,05$) ($n=3$).....	75
Figura 19 - Estudo da variação de massa na marcação do PSMA-DOTA com $^{177}\text{LuCl}_3$, mantendo como padrão 92,5 MBq (2,5 mCi) de atividade, temperatura de 90°C por 30 minutos sob agitação de 350 rpm (CCD-SG) ($n=5$).....	77
Figura 20 - Estudo da variação da atividade de marcação do PSMA-DOTA com $^{177}\text{LuCl}_3$, mantendo como padrão 10 μg do peptídeo, 90°C, 30 minutos sob agitação de 350 rpm (CCD-SG) ($n=3$).....	79
Figura 21 - Estabilidade do PSMA-DOTA- ^{177}Lu radiomarcado com atividade específica de 9,25 MBq/ μg e armazenado a ≤ -20 °C por até sete dias (CCD-SG) ($n=3$).....	81
Figura 22 - Estabilidade do PSMA-DOTA- ^{177}Lu radiomarcado com atividade específica de 18,5 MBq/ μg e armazenado a ≤ -20 °C por até sete 7 dias (CCD-SG) ($n=3$).....	81
Figura 23 - Estabilidade do PSMA-DOTA- ^{177}Lu radiomarcado com atividade específica de 37 MBq/ μg e armazenado a ≤ -20 °C por até sete dias (CCD-SG) ($n=3$).....	82
Figura 24 - Estabilidade do PSMA-DOTA- ^{177}Lu radiomarcado com atividade específica de 74 MBq/ μg e armazenado a ≤ -20 °C por até sete dias (CCD-SG) ($n=3$).....	82

Figura 25 – Estudo da estabilidade do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcado com atividade específica de 37 MBq/μg e armazenado a ≤ - 20 °C por até 48 horas, descongelado no momento da análise (CCD-SG) (n=3).....	85
Figura 26 – Estudo da estabilidade do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcado com atividade específica de 55,5 MBq/μg e armazenado a ≤ - 20 °C por até 48 horas, descongelado no momento da análise (CCD-SG) (n=3).....	85
Figura 27 – Estudo da estabilidade do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcado com atividade específica de 74 MBq/μg e armazenado a ≤ - 20 °C por até 48 horas, descongelado no momento da análise (CCD-SG) (n=3).....	86
Figura 28 – Estudo da estabilidade do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu radiomarcado com atividade específica de 74 MBq/μg e armazenado a ≤ - 20 °C por até 48 horas: tempo imediato (A), 24 horas (B) e 48 horas (C) descongelado no momento da análise (CLAE) (n=3).....	84
Figura 29 - Estabilidade do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu incubado em soro humano a 37°C por 15 minutos, 1, 4 e 24 horas, analisado por CCD-SG (n= 3).....	89
Figura 30 – Perfil de CLAE do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu incubado em soro humano a 37°C por 15 minutos.....	89
Figura 31 – Perfil de CLAE do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu incubado em soro humano a 37°C por 1 hora.....	90
Figura 32 – Perfil de CLAE do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu incubado em soro humano a 37°C por 4 horas.....	90
Figura 33 – Perfil de CLAE do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu incubado em soro humano a 37°C por 24 horas.....	91
Figura 34 - Estudo de ligação do marcador molecular às proteínas séricas “ <i>in vitro</i> ” por 15 minutos, 1, 4 e 24 horas (n=3).....	92
Figura 35 - Fotomicrografias representativas de células LNCaP de carcinoma prostático humano androgênio-dependente em cultivo (ATCC® CRL-1740™).....	93
Figura 36 - Ligação de diferentes concentrações do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu (0,76 a 30,5 pmol) às células LNCaP (3 x 10 ⁵) (n = 3).....	94

Figura 37 – Resultados do ensaio de ligação específica do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em diferentes concentrações de células LNCaP ($0,15 \times 10^6$, $0,3 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ e 1×10^6) (n = 3).....	95
Figura 38 – Estudo do clareamento sanguíneo do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos <i>BALB/c</i> machos entre 15 minutos e 24 horas (n=5).....	98
Figura 39 - Biodistribuição do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu com atividade específica de 74MBq/μg em camundongos <i>BALB/c</i> machos. Os resultados estão em porcentagem de atividade por grama de tecido (%AI/g) ou mL de sangue (%AI/mL) (n=5).....	101
Figura 40 - Resultados da captação renal do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos <i>BALB/c</i> machos entre 30 minutos e 24 horas após administração (%AI/g) (n=5).....	104
Figura 41 - Captação óssea (fêmur) do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos <i>BALB/c</i> machos entre 30 minutos e 24 horas após administração (n=5).....	106
Figura 42 – Porcentagem de espécie radioquímica correspondente ao Rf do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em CCD-SG em amostras de urina dos camundongos coletadas entre 30 minutos e 4 horas (n=3).	107
Figura 43 – Dissecção da massa tumoral do estudo de biodistribuição do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu.....	109
Figura 44 - Corte histológico do tumor LNCaP desenvolvido em camundongos <i>SCID</i> (CVAP – São Paulo, 2016).....	109
Figura 45 - Biodistribuição do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu com atividade específica de 74 MBq/μg em camundongos <i>SCID</i> machos com tumor LNCaP. Os resultados estão em porcentagem de atividade por grama de tecido (%AI/g) ou mL de sangue (%AI/mL) após 4 horas de administração (n=3).....	110

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Constante de distribuição; radiação alfa
β	Constante de eliminação; radiação beta
γ	Radiação gama
% AI	Porcentagem de dose injetada
% AI/g	Porcentagem de dose injetada por grama de tecido
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área sob a curva
BFC	Quelante bifuncional
CB	Centro de Biotecnologia
CCD	Cromatografia de camada delgada
CL	Depuração
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetro
cpm	Contagens por minuto
CR	Centro de Radiofarmácia
CT	Tomografia computadorizada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético
DOTATATO	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético-D-Phe1-Tyr3 –octreotato
DOTATOC	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético-D-Phe1-Tyr3 –octreotideo

DTPA	Ácido dietileno-triamino-pentacético
FDG	Fluordesoxiglicose
FIG.	Figura
<i>g</i>	Força centrífuga
g	Grama
Glu	Glutamato
GMP	Good Manufacturing Practices
H₂O	Água
HBED-CC	ácido N,N'-Bis[2-hidroxi-5-carboxiletil-benzil]etilenediamine-N,N'-diacético
IPBU	Inibidor de PSMA baseado em ureia
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
K_{el}	Constante de eliminação
KeV	Kilo eletrovolt
Kg	Kilograma
L	Litro
LNCaP	Células de carcinoma prostático humano
Log	Logarítmico
Log P	Coeficiente de partição
LP	Proteínas plasmáticas
¹⁷⁷Lu	Lutécio-177
Lys	Lisina

M	Molar
MBq	Mega becquerel
mCi	Milicuriie
MeV	Mega eletrovolt
mg	Miligrama
min.	Minuto (s)
mL	Mililitro
mm	Milimetro
N	Normal
n	Número
NH-CO-NH	Molécula de ureia
NHS	N-hidroxilsuccinamida
PBS	Tampão fosfato salina
PCTA	3,6,9,15-Tetraazabicyclo[9.3.1]pentadeca-1(15),11,13-triene-4-S-3,6,9-triacetic acid
PET	Tomografia computadorizada por emissão de pósitorns
PG	Pontuação de Gleason
pH	Potencial hidrogeniônico
PMPA	2-(fosfometil)-ácido pentanodióico
PR	Pureza radioquímica
PSA	Antígeno prostático específico
PSMA	Antígeno de membrana prostático específico
PSMA-DOTA	Peptídeo inibidor de PSMA conjugado com DOTA

PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu	Peptídeo PSMA-DOTA radiomarcado com ¹⁷⁷ Lu
Rf	Fator de retenção
RM	Ressonância magnética
rpm	Rotações por minuto
SBMN	Sociedade Brasileira de Medicina Nuclear
SPECT	Tomografia computadorizada por emissão de fóton único
t_{1/2}	Meia vida
TAB	Tabela
TFA	Ácido trifluoracético
UV	Ultra violeta
v/v	Volume por volume
Vd	Volume de distribuição
μCi	Micro currie
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrometro

1 INTRODUÇÃO

O câncer de próstata é considerado o segundo mais comum na população masculina em todo o mundo e ocupa a 15ª posição em mortes por câncer, em homens, representando cerca de 6% do total de mortes por câncer no mundo. Aproximadamente 70% dos casos diagnosticados no mundo ocorrem em regiões mais desenvolvidas, sendo que as altas taxas de incidência podem ser reflexo, em grande parte, das práticas de rastreamento por meio do teste do antígeno prostático específico (PSA) (INCA, 2016).

Entretanto, os exames iniciais não são específicos para detectar o câncer, especialmente os testes de PSA. Entre 20% a 30% dos exames, os níveis desse marcador estão elevados devido a outras situações benignas, o que resulta em falsos positivos e levam os pacientes a realização de biópsias desnecessárias (HILLIER et al., 2009).

O antígeno de membrana prostático específico (PSMA) é uma glicoproteína tipo II, transmembrânica, diferentemente do PSA que é uma proteína livre no sangue, de 750 aminoácidos, sendo que grande parte deles representa seu domínio extracelular. O PSMA representa um ótimo alvo para novos métodos de diagnóstico por imagem e terapia antineoplásica em razão de ser superexpresso em praticamente todas as neoplasias da próstata, de seus possíveis papéis na malignidade destas, assim como na angiogênese de tumores sólidos e sua expressão em tecidos extra prostáticos ser altamente restrita (HILLIER et al., 2009; GHOSH et al., 2004).

Nos últimos anos, foram desenvolvidos os inibidores de PSMA baseados em ureia (IPBU) que são peptídeos de baixo peso molecular, compostos basicamente por dois aminoácidos ligados através de uma ureia (MARESCA et al., 2009). Em razão da evolução das técnicas de produção do gálio-68 (^{68}Ga), Banerjee e colaboradores (2010) analisaram o IPBU com a estrutura básica sendo Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx), radiomarcado com ^{68}Ga (PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga), que se mostrou bastante promissor para diagnóstico do câncer de próstata por meio da técnica de tomografia por emissão de pósitrons (PET).

A aplicação clínica do PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga indica seu potencial como um poderoso traçador diagnóstico mostrando melhor eficácia de detecção do que outros marcadores PET, incluindo traçadores como ^{18}F -FDG e $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ -colina. Sendo que o PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga também pode ser usado para identificar metástases de linfonodos. Além disso, em um estudo de caso para o diagnóstico de carcinoma de células renais, proporcionou maior detecção visual em comparação com o ^{18}F -FDG (BUDAUS et al., 2015; HIJAZI et al., 2015; DEMIRCI, 2014).

O traçador de diagnóstico também tem um papel importante para o acompanhamento terapêutico dos pacientes. Uma reavaliação do planejamento terapêutico de pacientes portadores do câncer de próstata utilizando o PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga como traçador, demonstrou impacto significativo na aplicação radioterapêutica de 57 pacientes, uma vez que a terapia foi alterada em 50,8% dos casos (STERZING et al., 2016).

No entanto, devido à meia-vida curta do ^{68}Ga (68 minutos), a aplicação de PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga é limitada a centros PET com facilidade para produção local. Um estudo recente relatou a primeira aplicação clínica de PSMA baseado em ureia radiomarcado com ^{64}Cu , combinando a vantagem de um pequeno agente PSMA-específico com um emissor de pósitron de maior duração, resultando em elevado contraste da imagem com rápido clareamento sanguíneo (FARKAS; SIWOWSKA; AMETAMEY, 2016; GRUBMÜLLER et al., 2016).

O peptídeo DKFZ-PSMA-617 contendo o agente quelante DOTA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-tetracético), tornou-se um novo precursor de teranóstico, o qual demonstrou uma elevada afinidade de ligação ao PSMA em pacientes portadores de câncer de próstata (BENESOVÁ et al., 2015; AFSHAR-OROMIEH et al., 2015).

Devido aos baixos níveis de expressão de PSMA em tecidos saudáveis, esses agentes também têm o potencial para radioterapia de dose elevada com efeitos colaterais mínimos relacionados com a radioatividade, quando marcados com radionuclídeos terapêuticos adequados (KRATOCHWIL et al., 2016a).

Um estudo clínico multicêntrico conduzido com o DKFZ-PSMA-617, radiomarcado com ^{177}Lu , revelou uma resposta terapêutica surpreendentemente satisfatória em pacientes com câncer de próstata metastático resistentes à

castração, estimulando a realização de estudos clínicos prospectivos de fase II e III para avaliar a melhora clínica dos pacientes (RAHBAR et al., 2017).

Tendo em vista que novos casos de câncer de próstata surgem com o passar dos anos no Brasil e no mundo, além dos resultados promissores apresentados em estudos utilizando novas moléculas que tem como alvo o PSMA, fica evidente o interesse pelo estudo de compostos PSMA-específicos radiomarcados que representem uma nova alternativa terapêutica para medicina nuclear brasileira. Dentre os promissores compostos PSMA-específicos, podemos citar o Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-DOTA (PSMA-DOTA), para a qual não foram encontrados na literatura estudos desse inibidor radiomarcado com ^{177}Lu .

Diante desta necessidade nacional, o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), principal desenvolvedor e produtor de radiofármacos no país, deseja por meio deste trabalho, disponibilizar à sociedade um potencial radiofármaco que contribua com o tratamento do câncer de próstata.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho estudou, de forma inédita, a marcação e estabilidade radioquímica do Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-DOTA (PSMA-DOTA) com ^{177}Lu e avaliou seu potencial para a terapia do câncer de próstata por meio de ensaios pré-clínicos *in vitro* de estabilidade em soro humano, especificidade do radiofármaco por células de tumor de próstata LNCaP e ensaios *in vivo* de farmacocinética e biodistribuição em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Comparar métodos cromatográficos de controle de qualidade da pureza radioquímica das marcações de modo a estabelecer um método capaz de separar e quantificar impurezas radioquímicas potenciais;
- ✓ Desenvolver método de radiomarkação do PSMA-DOTA com ^{177}Lu visando obter alta pureza radioquímica (superior a 95%);
- ✓ Estudar a estabilidade *in vitro* do peptídeo PSMA-DOTA- ^{177}Lu em soro humano e armazenado em temperatura reduzida ($\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$);
- ✓ Avaliar a ligação específica e internalização do peptídeo PSMA-DOTA- ^{177}Lu às células de carcinoma prostático humano androgênio-dependente (LNCaP);
- ✓ Analisar os parâmetros farmacocinéticos do peptídeo PSMA-DOTA- ^{177}Lu em camundongos saudáveis;
- ✓ Analisar a biodistribuição do peptídeo PSMA-DOTA- ^{177}Lu em camundongos saudáveis e em camundongos imunodeprimidos inoculados com células (LNCaP);

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 CÂNCER

As primeiras descrições do câncer datam de 1.600 a.C. quando papiros egípcios já relatavam processos de diferenciação e remoção de alguns tumores, como os de mama, ou de tratamento, do útero e estômago. Hipócrates (470-370 a.C.) descreveu casos de câncer de mama, útero, estômago, pele e boca, e se referia como sendo a causa principal do excesso de bile negra, oriunda do baço ou estômago, mas não do fígado, fato este que foi sustentado por mais ou menos 200 anos. Galeno (138-201 d.C.) descrevia o câncer da mesma maneira que Hipócrates e durante séculos esta doença foi considerada como “tumor contra natureza” (SCUTTI et al., 2011).

A denominação "câncer" é utilizada para designar os tumores malignos. Este nome surgiu a partir da palavra grega *Karkinos* que significa caranguejo, quando ao observar tumores notou-se que eles cresciam sobre outros tecidos na forma de pinça (STEVENS, 2002).

O câncer pode ser classificado de acordo com sua morfologia e potencial de agressividade. Tumores malignos apresentam contornos fracamente definidos, alta taxa de crescimento celular e metástase. Tumores benignos apresentam contorno bem definido, crescimento celular lento e localizado (STEVENS, 2002).

Sabe-se que o câncer é uma doença originada no ciclo celular e são necessárias mais de uma alteração genética isolada para induzir uma neoplasia (SOUZA, 2011).

Muitos trabalhos têm demonstrado que a maquinaria que regula o ciclo celular está alterada em células tumorais, levando ao aumento do número de cópias, mutações ou deleções de proto-oncogenes. Genes supressores de tumor também estão envolvidos na carcinogênese de diversos tumores humanos e experimentais, como por exemplo, os genes p53, RB, p19, p21, p27, envolvidos no controle do ciclo celular e na regulação da apoptose (SCUTTI et al., 2011).

3.1.1 Câncer de Próstata

O câncer de próstata é considerado o segundo mais comum na população masculina em todo o mundo e ocupa a 15ª posição em mortes por câncer, em homens, representando cerca de 6% do total de mortes por câncer no mundo. Aproximadamente 70% dos casos diagnosticados no mundo ocorrem em regiões mais desenvolvidas, sendo que altas taxas de incidência podem ser reflexo, em grande parte, das práticas de rastreamento por meio do teste de antígeno prostático específico (PSA) (INCA, 2016).

As estimativas para o biênio 2016-2017 são de 61.200 novos casos de câncer de próstata para o Brasil em cada ano (FIG. 1). Esses valores correspondem a um risco estimado de 61,82 novos casos a cada 100 mil homens. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de próstata é o mais incidente entre os homens no Brasil (INCA, 2016). Enquanto que a *American Cancer Society* estima que 161.360 novos casos podem ser diagnosticados em 2017 e que cerca de 2,8 milhões de homens americanos vivem com câncer de próstata, dos quais mais de 26.730 mortes estão previstas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017).

Figura 1 - Distribuição proporcional das estimativas dos dez tipos de câncer mais incidente no Brasil para o biênio 2016-2017, exceto pele não melanoma.

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2016.

A próstata é uma glândula presente apenas no sistema genital masculino, que pesa aproximadamente 20 gramas. É um órgão retroperitoneal que circunda o colo

da bexiga e a uretra, sendo responsável pela produção de parte do sêmen, líquido espesso que contém os espermatozoides, liberado durante o ato sexual (ROBBINS, 2010).

O câncer de próstata é caracterizado pelo crescimento anormal da próstata, podendo ser lento ou acelerado. O principal sintoma que alerta o paciente é a diminuição ou interrupção da micção, em consequência do aumento de volume da próstata que comprime a uretra e impede a passagem da urina. Em fases mais avançadas há o aparecimento de sintomas urinários mais graves, como infecções urinárias e insuficiência renal, e desenvolvimento de metástases ósseas e em tecidos próximos (ROBBINS, 2010).

O principal fator de risco relacionado ao câncer de próstata é a idade avançada, uma vez que 62% dos diagnósticos no mundo representam homens com 65 anos ou mais e raramente acometem homens com idade inferior a 40 anos (INCA, 2016). A etnia também é um fator importante para esta neoplasia, sendo que africanos e seus descendentes possuem as maiores taxas de incidência, tendo 60% mais risco de desenvolver esta neoplasia do que caucasianos (NCI, 2017).

O histórico familiar também deve ser levado em conta quando se avaliam os riscos de desenvolver o câncer de próstata, porém não está estabelecida a relação multifatorial entre a herança genética e exposições aos mesmos hábitos de vida. Outro fator importante na modulação desse tipo de câncer é o hábito alimentar. Dietas baseadas em gordura animal, carne vermelha, derivados do leite, deficiência de vitamina D e cálcio têm sido associadas ao aumento no risco de desenvolver câncer da próstata. Além disso, a obesidade e o tabagismo também contribuem como fatores de risco, especialmente para neoplasias com um comportamento mais agressivo (NCI, 2017).

Devido à alta incidência internacional do câncer de próstata, extensivas pesquisas estão sendo direcionadas no desenvolvimento de tecnologias de diagnóstico e terapia. Na área da radiologia uma variedade de tecnologias de imagem, incluindo ultrassonografia e tomografia computadorizada, são amplamente utilizadas para detecção de anormalidades anatômicas da próstata. Diversos procedimentos de medicina nuclear também foram desenvolvidos no passado para detecção do câncer de próstata. A vantagem dos procedimentos de medicina nuclear é que esses métodos avaliam também as anormalidades funcionais e não apenas anatômicas (NANNI et al., 2015).

Porém os métodos de diagnóstico iniciais mais frequentes utilizados são a dosagem do antígeno prostático específico (PSA) e o toque retal, e posteriormente são realizados exames de imagem e biópsia prostática transretal para confirmação (INCA, 2016). Entretanto, os exames iniciais não são específicos para detectar o câncer, especialmente o teste de PSA. Entre 20% a 30% dos exames, os níveis desse marcador estão elevados devido a outras situações benignas, o que resulta em falsos positivos e levam os pacientes a realização de biópsias desnecessárias. Em razão disso, são necessários novos métodos de diagnóstico mais precisos para uma melhor avaliação inicial desses pacientes (HILLIER et al., 2009).

A sobrevida em cinco anos para o câncer de próstata quando diagnosticado no início da doença é considerada boa, entretanto existe uma ampla variação no mundo. Alguns países da América do Sul, Ásia e Europa tiveram um aumento de 10% a 20% na sobrevida ao longo da última década. Por outro lado, países como a Bulgária e a Tailândia ainda apresentam sobrevida baixa, em torno de 60% (NCI, 2017). O Brasil apresentou sobrevida de câncer de próstata em cinco anos acima de 95% para o período de 2005 a 2009 (INCA, 2016).

Existe uma variedade de opções terapêuticas para o câncer de próstata que incluem cirurgia, quimioterapia, crioterapia, radioterapia, braquiterapia com sementes radioativas e o uso de radiação externa. Porém é importante salientar que diante das pesquisas recentes na química dos radiofármacos, espera-se que o papel da medicina nuclear para o diagnóstico e terapia do câncer de próstata cresça significativamente no futuro (AFSHAR-OROMIEH et al., 2013; BAUM et al., 2016b).

3.1.2 Marcadores associados ao câncer de próstata

As informações moleculares relacionadas a diferentes tipos de câncer podem ser coletadas por técnicas de diagnóstico *in vitro* ou *in vivo*, medindo os níveis de certas biomoléculas que são produzidas em níveis substancialmente maiores do que o normal. Essas biomoléculas são chamadas marcadores de câncer, marcadores tumorais ou simplesmente biomarcadores, pois são produzidas pelo tumor ou por outras células em resposta à presença do tumor. Os marcadores de câncer são

representados por diferentes categorias, que incluem proteínas, peptídeos, hormônios, enzimas e carboidratos (SRINIVAS; KRAMER; SRIVASTAVA, 2001).

Alguns desses marcadores de câncer são excretados e podem ser encontrados no sangue, urina ou outros fluidos corporais, permitindo que a mensuração *in vitro* dos níveis desses marcadores seja utilizada para o diagnóstico e prognóstico do câncer. No entanto, esses tipos de marcadores de câncer não são úteis para o desenvolvimento de radiofármacos específicos, pois sua presença em regiões não alvo resultará em imagens de baixa qualidade e complicações na radioterapia (SRINIVAS; KRAMER; SRIVASTAVA, 2001).

Felizmente, há uma segunda categoria de marcadores de câncer que são superexpressos em superfícies de células tumorais, mas que não são excretados na corrente sanguínea em níveis significativos. Por isso, esses são os marcadores de câncer preferidos para o desenvolvimento de novos radiofármacos, tanto para o diagnóstico como para a terapia do câncer (SRINIVAS; KRAMER; SRIVASTAVA, 2001).

Há um grande número de biomarcadores associados ao câncer de próstata. O antígeno prostático específico (PSA) é um dos principais marcadores utilizados para o diagnóstico *in vitro* do câncer de próstata, porém é excretado para a circulação sanguínea (ETZIONI et al., 2002). Em contraste, o antígeno de membrana específico prostático (PSMA) não é excretado na circulação sanguínea e está sendo amplamente utilizado como alvo molecular para aplicações *in vivo* de diagnóstico e terapia do câncer de próstata (OSBORN et al., 2013).

3.2 ANTÍGENO DE MEMBRANA PROSTÁTICO ESPECÍFICO (PSMA)

O antígeno de membrana prostático específico (PSMA) é uma glicoproteína tipo II transmembrânica, diferentemente do PSA que é uma proteína livre no sangue, de 750 aminoácidos, sendo que grande parte deles representa seu domínio extracelular (FIG.2) (HILLIER et al., 2009; GHOSH et al., 2004). Está presente em células do epitélio normal da próstata, túbulos renais, mucosa duodenal, glândulas salivares, e em menor proporção em células neuronais (OSBORN et al., 2013).

Porém, é superexpresso no câncer de próstata, suas metástases e em neovascularizações relacionadas a tumores sólidos (HILLIER et al., 2009; CHANG et al., 1999).

Figura 2 – Esquema ilustrativo do antígeno de membrana prostático específico (PSMA), constituído por domínio extracelular de 707 aminoácidos, região transmembrana de 24 aminoácidos e domínio intracelular de 19 aminoácidos.

Fonte: BARINKA et al., 2008.

Sua função exata nas células prostáticas ainda é desconhecida. Nas células neuronais, o PSMA tem atividade NAALADase, sendo responsável por metabolizar o neurotransmissor N-acetil-aspartil-glutamato, e no intestino age como carboxipeptidase e folato hidrolase, possibilitando a absorção de folato livre. O PSMA existe em monômeros e dímeros, sendo que esta é a conformação necessária para suas atividades enzimáticas na superfície celular, e possui a característica de ser internalizado, porém ainda não se sabe o que desencadeia esta movimentação. Especula-se que o PSMA tenha a função de transportador transmembrânico para um ligante ainda não identificado, justamente por sua

internalização ser muito semelhante à endocitose mediada por receptores endógenos (MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2008; BARINKA et al., 2008).

Na carcinogênese e progressão do câncer de próstata, o PSMA possui várias possíveis funções. Sua atividade enzimática de folato hidrolase na superfície das células pode ser responsável pela receptação celular do folato poli- γ -glutamato liberado no meio intersticial pelas células mortas dentro do tumor. Esta ação possibilita que a forma livre do folato participe da síntese e metilação de DNA e síntese de poliaminas, extremamente importantes para a proliferação celular. Ao liberar o glutamato, o PSMA também pode ativar receptores de glutamato e alterar o potencial de membrana da célula ao modular a função dos canais de potássio/cálcio. Essa alteração faz com que haja um influxo de cálcio nas células neoplásicas, o que está relacionado com a malignidade (MHAWECH-FAUCEGLIA et al., 2008; BARINKA et al., 2008).

Em razão do PSMA ser superexpresso em praticamente todas as neoplasias da próstata, de seus possíveis papéis na malignidade destas, assim como na angiogênese de tumores sólidos e sua expressão em tecidos extra prostáticos ser altamente restrita, ele representa um ótimo alvo para novos métodos de diagnóstico por imagem e terapia antineoplásica (HILLIER *et al.*, 2009). Diante disso, linhagens celulares que expressam PSMA foram desenvolvidas para avaliar a especificidade de diferentes ligantes, sendo que células de carcinoma prostático humano androgênio-dependente (LNCaP) são comumente utilizadas em estudos pré-clínicos dessas moléculas (HOROSZEWICZ et al., 1983).

3.3 DESENVOLVIMENTO DE MOLÉCULAS PSMA-ESPECÍFICAS

Duas estratégias diferentes foram adotadas para o desenvolvimento de moléculas PSMA-específicas, sendo que a primeira estratégia utiliza a estrutura molecular do PSMA para direcionar anticorpos monoclonais, enquanto que a segunda estratégia aproveita a atividade enzimática do PSMA para direcionar inibidores enzimáticos (YAO et al., 2002; POMPER et al., 2002).

Ambas estratégias foram demonstradas na literatura com sucesso no desenvolvimento de novas moléculas PSMA-específicas para diagnóstico e terapia do câncer de próstata. No entanto, a primeira abordagem está lentamente se tornando ofuscada pela segunda que utiliza moléculas pequenas radiomarcadas visando a atividade enzimática do PSMA (PINTO et al., 1996).

O anticorpo monoclonal 7E11, também conhecido como Capromab, foi o primeiro anti-PSMA desenvolvido e se liga à porção intracelular ou epítipo citoplasmático do PSMA. A aplicação clínica do anticorpo monoclonal 7E11 foi aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) como ferramenta de diagnóstico do câncer de próstata, sendo o 7E11 registrado com o nome comercial Prostascint® (TANEJA, 2004).

O Prostascint® é conjugado com o agente quelante ácido dietileno triamino pentacético (DTPA) que é então radiomarcado com ^{111}In para obtenção de imagens em tomografia por emissão de fóton único (SPECT) de pacientes portadores do câncer de próstata (SODEE et al., 2000). O Prostascint® também demonstrou ser útil para identificação de outros tipos de câncer, como carcinoma renal e linfoma não-Hodgkin (MICHAELS e BLEND, 2009) e em condições não cancerígenas, como a neurofibromatose (KHAN e CARIDE, 2000).

No entanto, foram relatadas na literatura algumas desvantagens da aplicação clínica do Prostascint®. Os anticorpos monoclonais são macromoléculas com um peso molecular de cerca de 150 kDa, portanto, requerem um tempo considerável para se acumular na massa tumoral. Além disso, o custo do radiofármaco é considerado alto devido ao procedimento de conjugação e produção de ^{111}In e os pacientes também necessitam de duas visitas ao hospital, a primeira para a administração do radiofármaco e a segunda para obtenção da imagem (PILLAI et. al., 2016).

Embora o Prostascint® tenha contribuído para medicina nuclear após a aprovação da FDA em 1996, o interesse no uso desse radiofármaco está progressivamente diminuindo. Conforme mencionado anteriormente, o anticorpo monoclonal 7E11 (Prostascint®) liga-se à região citoplasmática intracelular do PSMA, resultando na incapacidade de diferenciar as células cancerosas mortas e vivas (ZHOU et al., 2005) e anticorpos em geral tem dificuldade em penetrar

adequadamente na microvasculatura do tumor ou sofrem degradação através de proteólise rapidamente (TANG et al., 2003). Por isso, tem havido mais interesse pelo desenvolvimento de anticorpos monoclonais que se ligam à região extracelular do PSMA e inibidores da atividade enzimática do PSMA (MILOWSKY et al., 2007).

3.4 INIBIDORES DE PSMA NA MEDICINA

Os inibidores de enzimas têm muitas aplicações médicas importantes, bem como na indústria e na agricultura, sendo utilizados como drogas, desinfetantes, inseticidas e herbicidas, por bloquearem a atividade enzimática e, portanto, podendo corrigir um desequilíbrio metabólico ou matar agentes patogênicos. Um exemplo interessante amplamente utilizado de um inibidor enzimático para uso médico é o citrato de sildenafil (Viagra®), um medicamento usado para tratar a disfunção erétil masculina. O citrato de sildenafil inibe a reação enzimática responsável pela liberação de uma molécula de sinalização que relaxa os músculos e aumenta o tempo de ereção (MAGGI et al., 2000). Outro exemplo é o fármaco anticancerígeno metotrexato, que é um inibidor da enzima diidrofolato redutase que inibe a reação do ácido fólico com a respectiva enzima (MCGUIRE, 2003).

A partir do conhecimento da função biológica do PSMA, houve uma extensa pesquisa sobre o desenvolvimento de inibidores de PSMA para aplicação em medicina terapêutica (ZHOU et al., 2005). Inicialmente o principal interesse médico nestes inibidores foram para aplicações que envolvem neurotransmissão glutamatérgica, uma vez que o glutamato é o neurotransmissor excitatório primário no sistema nervoso humano (NEALE e BZDEGA, 2000).

Diante disso, muitos dos inibidores de PSMA foram avaliados quanto à neuroproteção em modelos experimentais de esclerose lateral amiotrófica, lesão cerebral traumática e esquizofrenia (OLSZEWSKI et al., 2004). Outras doenças de interesse para uso desses inibidores foram para o tratamento da doença de Alzheimer, epilepsia, doença de Huntington, esclerose múltipla, dor neuropática e inflamatória e doença de Parkinson (ZHOU et al., 2005).

Os benefícios dessas pesquisas resultaram também na descoberta de radiofármacos PSMA-específicos para diagnóstico e tratamento do câncer de próstata. Atualmente, este é o campo da pesquisa dos inibidores de PSMA que está sendo amplamente estudado, resultando na síntese de diversos inibidores de PSMA de pequeno peso molecular, sendo que os mais promissores são os inibidores baseados em ureia, que são peptídeos constituídos pela conjugação de dois aminoácidos ligados através de uma ureia (ZHOU et al., 2005).

3.4.1 Inibidores do PSMA baseados em ureia (IPBU)

Levando em consideração a atividade enzimática NAALADase do PSMA, foram produzidas moléculas baseadas em ureia (IPBU) com propriedades inibitórias do PSMA e testaram suas atividades em células da linhagem LNCaP de carcinoma prostático humano que expressam PSMA na superfície celular, confirmando a utilidade dessas moléculas como estratégia terapêutica e de diagnóstico (TANG et al., 2003).

Os inibidores do PSMA baseados em ureia (IPBU) são peptídeos de baixo peso molecular, inicialmente complexados com ^{99m}Tc e ^{123}I para análises em tomografia computadorizada por emissão de fóton único (HILLIER et al., 2009; BANERJEE et al., 2008). Com o advento da técnica de tomografia por emissão de pósitrons (PET), iniciaram-se estudos com IPBU radiomarcados com ^{18}F (MEASE et al., 2008).

Em razão da evolução das técnicas de produção do gálio-68 (^{68}Ga), Banerjee e colaboradores (2010) analisaram dois compostos de IPBU, com a estrutura básica sendo Glu-NH-CO-NH-Lys, radiomarcados com ^{68}Ga que se mostraram bastante promissores para o diagnóstico do câncer de próstata por imagem PET, principalmente o composto PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga .

Por meio da técnica de tomografia por emissão de pósitrons (PET), foi realizado um estudo comparativo que analisou a eficiência diagnóstica dos radiofármacos fluorometilcolina- ^{18}F e PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga em pacientes portadores de câncer de próstata. Neste estudo o PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga apresentou melhor eficiência de detecção dos diferentes níveis de PSA avaliados em relação ao

fluorometilcolina- ^{18}F . Além disso, o PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga também atingiu melhores resultados na identificação de lesões na próstata (MORIGI et al., 2015).

Um estudo piloto envolvendo trinta pacientes portadores de câncer de próstata foi conduzido com o PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga em PET/CT. O estudo demonstrou um elevado índice de especificidade do radiofármaco no diagnóstico do câncer de próstata e relatou que 92,9% dos focos tumorais intraprostáticos foram corretamente identificados (BUDÄUS et al., 2015). Além disso, em outro estudo realizado foi demonstrado que o PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga pode identificar metástases em linfonodos, podendo se tornar uma importante ferramenta com esse propósito no futuro (HERLEMANN et al., 2016).

Devido à comprovação da excelente afinidade para o PSMA do peptídeo produzido, é desejável desenvolver estratégias terapêuticas à base de radionuclídeos utilizando o PSMA como alvo. Em abordagens de terapia com radiometais, o ^{90}Y e ^{177}Lu são os radionuclídeos mais comumente utilizados. O uso de ^{90}Y ($E_{\beta\text{max}}$: 2,3 MeV, $t_{1/2}$: 64 h) é mais adequado para o tratamento de lesões tumorais maiores, enquanto o ^{177}Lu é mais adequado para o tratamento de lesões e metástases menores, acompanhada por uma minimização da dose sobre os rins em comparação com a aplicação de peptídeos marcados com ^{90}Y . Além disso, a emissão concomitante de raios gama de 208 keV confere ao lutécio a possibilidade de aplicação na obtenção de imagem cintilográfica de captação tumoral, podendo ser uma ferramenta útil no prognóstico da terapia radioisotópica (MIKOLAJCZAK et al., 2003; VAN ESSEN et al., 2007).

3.5 APLICAÇÃO CLÍNICA DE INIBIDORES DO PSMA BASEADOS EM UREIA NO TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA

A terapia radionuclídica do câncer de próstata com diferentes inibidores do PSMA de baixo peso molecular e radiomarcados com ^{177}Lu e ^{131}I já foram iniciadas. Embora existam diversas opções de inibidores de PSMA baseados em ureia com diferentes agentes quelantes e espaçadores, um consenso geral parece ser o uso do grupo farmacofórico Glu-NH-CO-NH-Lys como agente de reconhecimento do receptor (FIG. 3) (KOZIKOWSKI et al., 2001; KOZIKOWSKI; ZHANG; NAN, 2004).

Figura 3 – Estrutura molecular de Inibidores de PSMA baseados em ureia. O terminal de carboxilato livre é mantido intacto (lado direito) e as modificações estruturais são introduzidas na outra extremidade (lado esquerdo), substituindo o ácido aspártico por outros aminoácidos.

Fonte: KOZIKOWSKI et al., 2001; KOZIKOWSKI; ZHANG; NAN, 2004.

Atualmente, os pacientes portadores de câncer de próstata são submetidos ao tratamento com inibidores de PSMA radiomarcados somente quando outras opções de tratamento, como cirurgia, quimioterapia e radioterapia externa, falharam. Entretanto, diante dos resultados clínicos promissores disponíveis na literatura sobre a utilização dos inibidores de PSMA, como o PSMA-617-¹⁷⁷Lu, PSMA I&T-¹⁷⁷Lu e MIP-1095-¹³¹I, é possível considerar no futuro a aplicação clínica dos inibidores de PSMA como primeira opção de tratamento do câncer de próstata, principalmente o inibidor PSMA-617-¹⁷⁷Lu (FIG. 4) que está sendo amplamente utilizado em estudos de casos de uso compassivo do radiofármaco, sendo que os primeiros estudos clínicos controlados prospectivos começam a ser realizados com este radiofármaco (ZECHMANN et al., 2014; WEINEISEN et al., 2015; RAHBAR et al., 2017).

Figura 4 – Estrutura molecular do inibidor PSMA-617.

Fonte: PILLAI et al., 2016.

A disponibilidade comercial do inibidor PSMA-617 da ABX (*Advanced Biochemical Compounds*) e a disponibilidade de ^{177}Lu de vários fornecedores, facilitaram o início da terapia com PSMA-617- ^{177}Lu em diferentes regiões do mundo. Porém o inibidor PSMA-617 foi inicialmente radiomarcado com ^{68}Ga para avaliação da captação em diferentes órgãos e em lesões da próstata, a fim de obter estimativas dosimétricas (AFSHAR-OROMIEH et al., 2015).

Dentre os órgãos saudáveis estudados, os rins e as glândulas salivares apresentaram maior captação do PSMA-617 radiomarcado com ^{68}Ga , no entanto, a exposição à radiação foi considerada relativamente baixa. Os resultados do estudo de estimativas dosimétricas do PSMA-617- ^{68}Ga demonstraram potencial de aplicação clínica do inibidor PSMA-617 na terapia do câncer de próstata quando radiomarcado com ^{177}Lu (AFSHAR-OROMIEH et al., 2015).

Posteriormente, outros estudos foram conduzidos com o propósito de realizar análise dosimétrica do PSMA-617 radiomarcado com ^{177}Lu . Nestes estudos é relatado que embora as glândulas salivares e os rins tenham recebido alta dose de radiação, a análise dosimétrica não apresentou nível crítico e os autores concluíram que o tratamento com maior atividade de ^{177}Lu e múltiplos ciclos de PSMA-617- ^{177}Lu no tratamento do câncer de próstata é possível sem risco de danos aos rins dos pacientes (HOHBERG et al., 2016; DELKER et al., 2016).

Em outro estudo, foi relatado o desfecho clínico do tratamento de 30 pacientes com câncer de próstata metastático resistentes à castração utilizando 1-2 ciclos de PSMA-617-¹⁷⁷Lu. Em 21 dos 30 pacientes o marcador molecular PSA diminuiu, sendo que em 13 pacientes o PSA diminuiu 50%. Além disso, a hematotoxicidade aguda e a toxicidade de outros órgãos não foram observadas, apresentando depuração renal completa em 48 horas (KRATOCHWIL et al., 2016a).

Uma análise retrospectiva dos efeitos colaterais iniciais e da taxa de resposta terapêutica em dez pacientes portadores de câncer de próstata que foram submetidos ao tratamento do PSMA-617-¹⁷⁷Lu foi realizada no Hospital Universitário de Bonn. Oito semanas após a terapia, sete pacientes (70%) sofreram um declínio de PSA, dos quais cinco pacientes apresentaram mais de 50% de declínio do PSA. Entretanto três pacientes apresentaram doença progressiva, apresentando aumento dos níveis de PSA. Nenhum paciente apresentou efeitos colaterais imediatamente após a administração do PSMA-617-¹⁷⁷Lu e a hematotoxicidade relevante (grau 3 ou 4) ocorreu sete semanas após a administração em apenas um paciente, sendo concluído pelos pesquisadores do respectivo estudo que a terapia com o radiofármaco PSMA-617-¹⁷⁷Lu é segura e não tem nenhum efeito colateral precoce (AHMADZADEHFAR et al., 2015).

Em um relato de caso interessante encontrado da literatura é mencionado o desfecho bem-sucedido no tratamento com PSMA-617-¹⁷⁷Lu de um homem de 75 anos com câncer de próstata metastático resistentes à castração que apresentou aumento do PSA após desenvolver depressão grave da medula óssea durante a terapia com ²²³Ra (Alpharadin) (SCHLENKHOFF et al., 2016a).

No início do tratamento com o PSMA-617-¹⁷⁷Lu foram necessárias transfusões repetidas de sangue. Entretanto, seis meses após a última transfusão de sangue e após o terceiro ciclo de administração do radiofármaco o hemograma se estabilizou, sendo que o paciente não necessitou mais de transfusões de sangue e seu nível de PSA diminuiu (SCHLENKHOFF et al., 2016a).

Em outro caso do mesmo grupo de pesquisadores, um paciente de 80 anos com câncer de próstata metastático resistentes à castração diagnosticado em 2005 recebeu dois ciclos de terapia com PSMA-617-¹⁷⁷Lu, sendo observado declínio

contínuo dos níveis de PSA e uma diminuição do tumor na imagem PET-CT (SCHLENKHOFF et al., 2016b).

Nos últimos anos, relatos de casos promissores de diferentes instituições sobre o tratamento do câncer de próstata com inibidores de PSMA radiomarcados com ^{177}Lu estão surgindo, corroborando com a importância do desenvolvimento de novos radiofármacos PSMA-específicos (KABASAKAL et al., 2015; DAS et al., 2016; RAHBAR et al., 2017).

Uma recente análise retrospectiva documentou os efeitos colaterais e taxa de resposta terapêutica do PSMA-617- ^{177}Lu , em cento e quarente cinco pacientes portadores de câncer de próstata de doze diferentes centros de pesquisa na Alemanha. Em 72% dos pacientes o marcador molecular PSA diminuiu e poucos pacientes apresentaram efeitos adversos graves, além disso, nenhuma morte foi relacionada com a terapia após a totalidade de 248 ciclos terapêuticos. Este estudo demonstrou a segurança e eficácia do PSMA-617- ^{177}Lu em um grande número de pacientes, e estimulou a realização de estudos clínicos prospectivos de fase II e fase III (RAHBAR et al., 2017).

Diante do cenário atual, pela busca de potenciais radiofármacos PSMA-específicos para o tratamento do câncer de próstata, podemos citar o Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-DOTA (PSMA-DOTA) (FIG. 5), para a qual não foram encontrados na literatura estudos desse inibidor radiomarcado com ^{177}Lu para avaliar o seu potencial para aplicação clínica.

Estudos pré-clínicos encontrados na literatura com o Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-DOTA (PSMA-DOTA) foram radiomarcados exclusivamente com ^{68}Ga , sendo demonstrado uma apreciável captação tumoral *in vitro* e *in vivo*, com rápido clareamento sanguíneo e baixa captação hepática, tornando-se um potencial radiofármaco para aplicação clínica (EDER et al., 2012).

Atualmente, derivados de inibidores do PSMA baseados em ureia passaram dos estudos pré-clínicos para estudos clínicos, entretanto, estudos pré-clínicos comparativos com derivados PSMA-específicos radiomarcados com diferentes radioisótopos não foram conduzidos para avaliar uma eventual diferença na

farmacocinética, dosimetria, captação em órgãos não alvo e especificidade pelo tecido tumoral.

Figura 5 - Estrutura molecular do peptídeo Glu-NH-CO-NH-Lys (Ahx)-DOTA (PSMA-DOTA).

Fonte: EDER et al., 2012.

3.6 DIAGNÓSTICO E TERAPIA DO CÂNCER NA MEDICINA NUCLEAR

Os radioisótopos usados em medicina nuclear são produzidos artificialmente em reatores nucleares ou ciclotron (acelerador de partículas). Devido ao tempo de meia vida curto de alguns radioisótopos, a técnica de utilização de geradores é bastante empregada. Nela um radionuclídeo de tempo de meia vida curto é obtido a partir do decaimento de um radionuclídeo de tempo de meia vida longa (OLIVEIRA et al., 2006).

No Brasil, a produção de radiofármacos está bastante desenvolvida, sendo a maior parte da sua demanda atendida pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) (RADIOFÁRMACOS, 2016). Radiofármacos utilizados no diagnóstico auxiliam a identificação de tumores e disfunções do organismo.

Preferencialmente são utilizados radionuclídeos emissores de radiação gama (γ) ou emissores de pósitrons (β^+), pois seu decaimento dá origem à radiação eletromagnética penetrante, que apresenta grande capacidade de penetração em tecidos e baixo poder de ionização quando comparado às radiações particuladas (α e β) (DIAS, 2010).

O diagnóstico pode ser feito através do método de cintilografia onde são formadas imagens em PET ou SPECT. Estas imagens são formadas a partir da utilização dos radiofármacos, e a sua captação permite avaliar anatomicamente órgãos e suas funções, detectando anomalias (SBMN, 2016; SAPIENZA et al., 2001).

Além do diagnóstico e estadiamento, podem ser fornecidas informações sobre seguimento e avaliação de resposta terapêutica dos pacientes com câncer, detectando a presença de massa residual após quimioterapia ou a infiltração de linfonodos de pequenas dimensões (SAPIENZA et al., 2001).

Quando utilizados radiofármacos para finalidade terapêutica, ou seja, na terapia radioisotópica, preferencialmente são utilizados radionuclídeos emissores de radiação particulada (α , β^- e elétrons Auger), pois possuem pequeno poder de penetração e são altamente energéticos, ionizando o meio e levando à morte celular. Este tipo de terapia é muito utilizada no tratamento de tumores, sendo considerada uma das modalidades mais efetivas (DIAS, 2010; OLIVEIRA et al., 2006).

3.6.1 Terapia Radioisotópica

A identificação de uma ferramenta simples para localizar e tratar neoplasias no estágio inicial do seu desenvolvimento tem sido um objetivo constante da classe médica, principalmente dos oncologistas. Nesse contexto, a investigação de características moleculares intrínsecas das células tumorais levou ao aprimoramento de fármacos receptor-específicos, utilizados em terapia molecular. Essa classe de fármacos pode apresentar atividade terapêutica intrínseca ou ainda carrear um agente citotóxico às células alvo e inclui anticorpos contra biomoléculas de superfície da célula tumoral e moléculas híbridas que consistem em ligantes receptor-específicos acoplados a radioisótopos, toxinas ou agentes quimioterápicos (ENGEL et al., 2007).

Os efeitos tóxicos da radiação têm sido amplamente estudados e aplicados no tratamento de diversas condições patológicas, principalmente de neoplasias. Em geral, o tumor é irradiado por uma fonte externa de radiação (radioterapia) e em uma prática menos comum, denominada braquiterapia, em que a fonte radioativa encapsulada é implantada nas proximidades do tumor. Ainda que essas duas técnicas tenham sido efetivas no tratamento do câncer, elas apresentam propriedades intrínsecas que comprometem sua eficácia. Para o sucesso de sua utilização, radioterapia e braquiterapia exigem o conhecimento preciso da localização e tamanho do tumor, a fim de maximizar a destruição das células tumorais e minimizar a radiação absorvida pelos tecidos adjacentes. Esses dois procedimentos são de limitada aplicação no tratamento de tumores multi-focais ou de sítios metastáticos e é para contornar essa limitação que a medicina nuclear tem direcionado seus esforços para a terapia radioisotópica ou radioterapia sistêmica (ZALUTSKY, 2003).

A terapia radioisotópica envolve a utilização de uma molécula radiomarcada que conduz seletivamente um nível citotóxico de radiação ao sítio tumoral. O objetivo dessa técnica é semelhante ao da radioterapia e braquiterapia: maximizar a dose de radiação absorvida pelo tumor e reduzir ao mínimo a irradiação dos órgãos normais. Alguns isótopos radioativos possuem penetração relativamente longa com deposição de energia em células vizinhas, sendo esse efeito conhecido como "fogo cruzado" (crossfire) e é particularmente interessante, pois pode destruir células vizinhas que são pobremente vascularizadas. Além do efeito terapêutico, a utilização de isótopos radioativos pode permitir a aquisição de imagem do radioligante acumulado no tumor e fornece informações úteis a respeito de sua interação e características bioquímicas das células tumorais (ZALUTSKY, 2003).

A terapia radioisotópica vem sendo utilizada em pacientes há mais de sessenta anos com a aplicação clínica do iodeto de sódio (Na^{131}I) radioativo no tratamento de hipertireoidismo e carcinoma de tireóide. O aprimoramento de técnicas de síntese de proteínas recombinantes e os avanços no entendimento da biologia de tumores conduziram a uma evolução na pesquisa e na aplicação clínica da terapia radioisotópica (KASSIS e ADELSTEIN, 2003). Um exemplo do sucesso clínico foi a substituição do radioisótopo ^{111}In do OctreoScan®, um peptídeo derivado da somatostatina utilizado para aquisição de imagens de tumores

neuroendócrinos, por radioisótopos com aplicação terapêutica, tais como ^{177}Lu e ^{90}Y , para tratamento desses tumores (THOMAS et al., 2009).

A aplicação mais recente veio com o sucesso clínico da substituição do radioisótopo ^{90}Y do DOTATOC, um peptídeo derivado da somatostatina utilizado para tratamento de tumores neuroendócrinos, por ^{177}Lu para tratamento desses tumores com menor mielotoxicidade e nefrotoxicidade em relação ao DOTATOC- ^{90}Y , promovendo uma maior sobrevida dos pacientes (BAUM et al., 2016a).

3.6.2 Considerações para o desenvolvimento de moléculas para terapia radioisotópica

O desenvolvimento de um radiofármaco efetivo para terapia radioisotópica envolve, além das considerações de localização e tamanho do tumor, a correta seleção de seus dois componentes: o radioisótopo e a molécula carreadora. Sendo assim, é necessário unir um agente com comportamento biológico efetivo para a classe de tumor que se deseja tratar a um radioisótopo com propriedades físicas adequadas para utilização *in vivo*, cujas propriedades químicas permitam sua ligação à molécula (KASSIS e ADELSTEIN, 2003).

No desenvolvimento da molécula carreadora, componente do radiofármaco que irá direcionar o radioisótopo para o tumor, pequenos peptídeos têm sido utilizados com frequência em substituição aos anticorpos monoclonais. Há três diferenças entre os peptídeos e as proteínas que representam implicações fundamentais na terapia radioisotópica. Por apresentarem menor tamanho, essas moléculas são clareadas do sangue e dos tecidos sadios mais rapidamente. Outra consequência de seu baixo peso molecular é a penetração mais rápida e homogênea no tumor. Além disso, peptídeos são menos imunogênicos que as proteínas, tornando possível um esquema terapêutico que envolva a administração de múltiplas doses (ZALUTSKY, 2003).

O uso de peptídeos não apresenta apenas vantagens. A maioria dos peptídeos em estudo, para aplicação em terapia radioisotópica, são peptídeos regulatórios e ainda que seus receptores sejam encontrados em maior densidade nas células tumorais, eles são também encontrados em tecidos normais. 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).

Além disso, os peptídeos podem provocar radiotoxicidade aos rins como consequência de sua rápida eliminação renal, o que limitaria sua utilização. Uma possível solução para a toxicidade renal é a coadministração de aminoácidos básicos, os quais inibem a reabsorção tubular dos peptídeos que sofreram filtração glomerular (ZALUTSKY, 2003).

Diversos peptídeos regulatórios apresentam alta afinidade por células tumorais, geralmente por superexpressarem seus receptores, permitindo uma melhor visualização do tumor no reflexo da 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 (KNIGHT, 2003).

Dentre os promissores peptídeos utilizados como molécula carreadora, podemos citar os inibidores de PSMA baseados em ureia de baixo peso molecular, os quais estão sendo amplamente estudados para o diagnóstico e tratamento do câncer de próstata (MARESCA et al., 2009).

3.6.3 Seleção do radioisótopo

Um grande número de fatores influencia na escolha do radioisótopo para uma aplicação terapêutica particular. No caso do tratamento de neoplasias, o primeiro fator a ser considerado é se a forma de decaimento e a energia da partícula emitida condizem com a localização e tamanho do tumor. Um radioisótopo ideal para tratar tumores sólidos de grandes dimensões será diferente daquele aplicado para eliminar pequenos sítios metastáticos, compostos apenas de algumas centenas de células. Além desses fatores, a meia-vida, o método de produção, a química e o comportamento biológico do radioisótopo também devem ser considerados (ZALUTSKY, 2003).

Atualmente, os principais isótopos utilizados na clínica para terapia radioisotópica são emissores de partículas α e β^- , pois possuem radiação com alta

transferência linear de energia e promovem uma alta ionização em curto espaço percorrido (YEONG; CHENG; NG, 2014).

A maioria dos estudos clínicos encontrados na literatura de inibidores do PSMA baseados em ureia no tratamento do câncer de próstata são radiomarcados com ^{177}Lu . Entretanto, estudos com o inibidor PSMA-617 radiomarcado com ^{225}Ac estão sendo iniciados em pacientes portadores de câncer de próstata resistentes à castração em estágio avançado, podendo a radiomarcagem de inibidores de PSMA com emissores de partículas α torna-se uma opção terapêutica no futuro (KRATOCHWIL et al., 2017; KRATOCHWIL et al., 2016b). A tabela 1 apresenta as características dos principais radionuclídeos emissores de partículas α e β utilizados na radioterapia.

Tabela 1 – Características dos principais radionuclídeos emissores de partículas α e β utilizados na radioterapia.

Radionuclídeo	Partícula	Meia-vida	Energia máxima (MEV)	Alcance Médio
^{188}Re	<i>Beta</i>	16,9 h	2,12	3,5 mm
^{186}Re	<i>Beta</i>	3,7 d	1,07	1,8 mm
^{90}Y	<i>Beta</i>	2,7 d	2,28	3,9 mm
^{67}Cu	<i>Beta</i>	2,6 d	0,58	0,71 mm
^{131}I	<i>Beta</i>	8,0 d	0,61	0,91 mm
^{177}Lu	<i>Beta</i>	6,7 d	0,5	0,67 mm
^{211}At	<i>Alfa</i>	7,2 h	6,8	80 μm
^{213}Bi	<i>Alfa</i>	46 min	8,3	84 μm
^{225}Ac	<i>Alfa</i>	10 d	6,0 - 8,0	60 - 90 μm

Fonte: adaptado de MASSICANO, 2016.

Ao interagir com a matéria, as partículas β^- podem sofrer alteração de sua rota, e conseqüente redução de sua energia cinética, a qual pode chegar a zero. Portanto, para serem utilizados como agentes terapêuticos, os emissores β^- devem estar presentes em altas concentrações no tecido tumoral, transferindo milhares de elétrons a cada célula cancerosa. Essa especificidade deve ser assegurada pela molécula carreadora (KASSIS e ADELSTEIN, 2003).

3.6.4 Lutécio-177

O lutécio é encontrado na natureza como óxido de lutécio-175. O lutécio-177 (^{177}Lu) é o isótopo radioativo produzido em reatores de alto fluxo através do bombardeamento de um alvo enriquecido em óxido de lutécio-176 (71%). A produção de ^{177}Lu livre de carreador também é possível e recomendável para aplicações médicas que exijam alta atividade específica da molécula a ser radiomarcada (ZALUTSKY, 2003). Sendo assim, dois métodos diferentes de produção do ^{177}Lu podem ser utilizados, ambos em reator nuclear. Um é a produção direta, onde se irradia o Lu_2O_3 natural (2,6% de ^{176}Lu) ou o óxido enriquecido (em ^{176}Lu). E o outro método é a irradiação do alvo de Yb_2O_3 , acompanhada por uma separação radioquímica do ^{177}Lu dos isótopos de Yb (PILLAI et al., 2003).

A aplicação do ^{177}Lu na produção de radiofármacos para terapia radioisotópica vem se intensificando nos últimos anos. Esse crescente uso atribui-se às propriedades físicas e químicas desse radioisótopo. A meia-vida física do ^{177}Lu é de 6,65 dias, significativamente maior do que a de outros radiolantanídeos como o ^{153}Sm e ^{166}Ho , o que permite sua utilização em processos mais complexos de radiomarcagem, os quais demandam maior tempo e trabalho, e também possibilita o transporte do radiofármaco para regiões distantes do centro produtor (MIKOLAJCZAC et al., 2003).

Além disso, o ^{177}Lu emite radiação β^- de 497 keV de energia máxima e 230 μm de alcance médio, ideal para o tratamento de micrometástases, como as geradas pelos tumores de próstata hormônio-refratários (MIKOLAJCZAC et al., 2003).

O ^{177}Lu apresenta características químicas similares à de outros lantanídeos. A ligação com o lutécio é iônica e necessita de quelantes multidentados, aniônicos e macrocíclicos, a fim de garantir a estabilidade do complexo molécula carreadora-radiolantanídeo. O ^{177}Lu mimetiza o cálcio *in vivo* e apresenta alta afinidade pelo tecido ósseo. Na ausência de ligantes, que satisfaçam seu número de coordenação, esse radiolantanídeo forma radiocolóide ($^{177}\text{Lu}(\text{OH})_3$) em pH neutro ou alcalino, que se acumula no fígado. Para prevenir a formação de hidróxidos insolúveis, tampão citrato ou acetato, são utilizados em procedimentos de radiomarcagem em pH que variam entre 4,5 e 6,5 (JURISSON et al., 2008).

Para que o agente quelante seja considerado ideal, este deve possuir algumas características específicas: deve ser capaz de realizar uma quelação estável do radiometal, pois, em sistemas biológicos, competem frequentemente com quelantes naturais, como por exemplo, a transferrina, por isso deve ser capaz de impedir a dissociação do radiometal para diminuir sua acumulação em órgãos não alvos; deve possuir uma alta estabilidade termodinâmica para evitar a sua perda durante as técnicas de radiomarcagem, uma vez que estas necessitam de altas temperaturas para possibilitar um alto rendimento; e ser cineticamente inerte, por este fator refletir na razão de dissociação do íon metálico do agente quelante e proporcionando uma melhor estabilidade *in vivo* (LIU et al., 2008; MACKE et al., 2003).

Para aplicação em pequenas moléculas carreadoras o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético (DOTA) (FIG. 6) é o principal agente quelante utilizado para a radiomarcagem com ^{177}Lu (KWEKKEBOOM et al., 2005).

Figura 6 – Estrutura molecular do agente quelante ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetracético (DOTA).

Fonte: PILLAI et al., 2016.

O potencial terapêutico do ^{177}Lu vem sendo avaliado em conjunto com uma série de substâncias carreadoras. Um estudo comparativo entre o peptídeo octreotato (DOTATATO) marcado com ^{111}In , ^{90}Y ou ^{177}Lu mostrou que a captação do

peptídeo radiomarcado com ^{177}Lu por tumores pancreáticos foi melhor quando radiomarcado com ^{111}In e ^{90}Y (BREEMAN et al., 2003).

Atualmente, existem radiofármacos derivados de somatostatina radiomarcados com ^{177}Lu disponíveis comercialmente em todo o mundo, dentre eles podemos citar o DOTATATO- ^{177}Lu , que é produzido pela radiofarmácia do IPEN e utilizado no Brasil para tratamento de tumores neuroendócrinos.

Diante deste cenário, o ^{177}Lu mostra ser um promissor radioisótopo terapêutico para o desenvolvimento de novos radiofármacos, marcando proteínas ou peptídeos, sendo amplamente estudado pela medicina nuclear no tratamento de diferentes tipos de tumores (KWEKKEBOOM et al., 2005).

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Neste tópico será apresentado o planejamento experimental empregado para investigar o potencial de aplicação do PSMA-DOTA- ^{177}Lu para a terapia do câncer de próstata.

4.1 Resumo do delineamento experimental

O peptídeo inibidor de PSMA baseado em ureia (IPBU), Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-DOTA (PSMA-DOTA), foi adquirido já acoplado ao quelante DOTA para marcação com ^{177}Lu (IDB, Holanda). Os parâmetros que interferem nas reações de marcação do produto com ^{177}Lu foram estudados de modo a obter uma alta pureza radioquímica do marcador molecular (> 95 %).

A partir da condição padrão de marcação identificada no estudo, avaliou-se o efeito da atividade crescente de $^{177}\text{LuCl}_3$ sobre a pureza radioquímica e demais parâmetros de reação. A pureza radioquímica foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Após armazenamento a $\leq -20\text{ }^\circ\text{C}$ ou em soro humano (37°C) a estabilidade do marcador molecular foi avaliada por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A partir do estudo de estabilidade em soro humano, realizou-se ensaio de ligação do produto às proteínas plasmáticas.

Os estudos *in vitro* de ligação celular envolveram células de linhagem tumoral de próstata que expressam o receptor PSMA, linhagem LNCaP, e consistiu em estudos de ligação específica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu e estudos de internalização celular.

Por fim, os estudos *in vivo* compreenderam a análise da biodistribuição e farmacocinética do PSMA-DOTA- ^{177}Lu em camundongos *Balb-c* sadios e biodistribuição em modelos animais de tumor de próstata LNCaP.

Figura 7 - Esquema do delineamento experimental do trabalho.

Fonte: autor da dissertação.

5 MATERIAIS

5.1 Infraestrutura

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Controle de Qualidade e Pesquisa e Desenvolvimento da Instalação do Centro de Radiofarmácia (CR), no laboratório de Cultivo Celular do Centro de Biotecnologia (CB) e no Biotério, dependências sediadas na área do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN - CNEN/SP). Esses laboratórios possuem toda a infraestrutura necessária para a manipulação de materiais radioativos, células e animais de experimentação.

5.2 Reagentes e soluções

Os principais reagentes e soluções utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Acetato de amônia (Merck, Alemanha);
- ✓ Acetato de sódio anidro (Merck, Alemanha);
- ✓ Acetonitrila para CLAE (Merck, Alemanha);
- ✓ Ácido acético glacial 100% (Merck, Alemanha);
- ✓ Ácido cítrico (Cromato Produtos Químicos, Brasil);
- ✓ Ácido clorídrico ultrapuro (Merck, Alemanha);
- ✓ Ácido trifluoroacético para CLAE (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Água purificada - Purificador Milli-RX 45 (Millipore, EUA);
- ✓ Albumina sérica bovina (Sigma Aldrich, EUA);
- ✓ Álcool etílico (Merck, Alemanha);
- ✓ Anestésico para uso animal cloridrato de ketamina - Dopalen® (Ceva, Brasil);
- ✓ Citrato de sódio (Merck, Alemanha);
- ✓ Cloreto de lutécio-177 (IDB, Holanda);
- ✓ Cloreto de sódio (Merck, Alemanha);
- ✓ Fosfato de sódio dibásico (Merck, Alemanha);

- ✓ Glicina (Baxter, Brasil);
- ✓ Heparina (Roche, Brasil);
- ✓ Hidróxido de sódio, lentilhas (Merck, Alemanha);
- ✓ Matrigel alta concentração (BD - Biosciences, EUA);
- ✓ Meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10 mM HEPES, 1 mM de piruvato de sódio, 1500 mg/L de bicarbonato de sódio, antibiótico (Sulfato de Gentamicina 50 mg/L) e antimicótico (Anfotericina B 2 mg/L) (Vitrocell Embriolife, Brasil);
- ✓ Metanol grau CLAE (Merck, Alemanha);
- ✓ n-octanol (Merck, Alemanha);
- ✓ Peptídeo Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-DOTA (PSMA-DOTA) (AnaSpec, EUA);
- ✓ Relaxante muscular para uso animal cloridrato de xilasina - Ansedan® (Vetbrands, Brasil);
- ✓ Resina Chelex 100 (BioRad, EUA);
- ✓ Soro fetal bovino SFB (Cultilab, Brasil);
- ✓ Tripsina bovina (Cultilab, Brasil);

5.3 Equipamentos

Os principais equipamentos e materiais utilizados neste trabalho foram:

- ✓ Agitador magnético com aquecimento 725A (Fisatom, Brasil);
- ✓ Agitador/aquecedor Thermomixer Comfort 1,5 mL (Eppendorf, EUA);
- ✓ Balança analítica (Mettler Toledo, EUA);
- ✓ Balança semi-analítica (Lutron, EUA);
- ✓ Cabine de fluxo laminar para cultivo celular classe 2 (Scanlaf, EUA);
- ✓ Calibrador de atividade CRMTM- 35R (Capintec, EUA);
- ✓ Centrífuga refrigerada Mikro 220 (Hettich, Alemanha);
- ✓ Coluna de fase reversa C18 para cromatografia líquida de alta eficiência (Waters, 150 mm x 4,0 mm, 5µm);
- ✓ Contador automático tipo poço com cristal NaI (TI) - D5002 cobra II (Packard-Camberra, EUA);

- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência, modelo 1260 Infinity, composto por sistema modulado constituído por bomba G1311B (1260 Quant Pump), injetor automático de amostras G1329B (1260 ALS), detector UV G4212B (1260 DAD) e forno G1316A (1260 TCC) (Agilent Technologies, EUA);
- ✓ Detector radioativo (câmara de cintilação – NaI) do sistema CLAE (Agilent), modelo 2x2" Pinhole, acoplado à interface de processamento, modelo Gabi Star (Raytest, Alemanha);
- ✓ Estufa de CO₂ (Binder, EUA);
- ✓ Frascos para cultivo de células (Costar, EUA);
- ✓ GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., USA);
- ✓ Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos cônicos com tampa para reação tipo eppendorf, tubos capilares, tubos cônicos tipo Falcon, criotubos, espátula para remoção de células;
- ✓ Medidor de pH (TecnoPON, Brasil);
- ✓ Pipetas automáticas (Brand, Alemanha; Socorex, Suíça e Eppendorf, EUA);
- ✓ Seringa de insulina com agulha de 12,7 x 0,33 mm (BD, EUA);
- ✓ Suporte cromatográfico de sílica gel 60 em placa de alumina (TLC-SG) (Merck, Alemanha);
- ✓ Tiras indicadoras de pH (Merck, Alemanha);
- ✓ Vidraria em geral, tais como béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos e provetas.

5.4 Animais

Os estudos *in vivo* foram realizados em camundongos BALB/c e SCID, de sete a doze semanas de idade e pesando cerca de 23 gramas.

Os camundongos utilizados neste trabalho foram fornecidos pelo biotério do IPEN - CNEN/SP (São Paulo, SP, Brasil). Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Projeto n° 115/15/CEUA-IPEN/SP) (ANEXO A), e realizados de acordo

com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

Os animais foram mantidos no biotério em SPF (*Specific Pathogen Free*) e após um período de adaptação estas condições foram reproduzidas quando os animais estiveram em experimentação:

- ✓ Temperatura ambiente: $22 \pm 2^{\circ} \text{C}$;
- ✓ Iluminação artificial com ciclo de 12 horas de luz / 12 horas de escuridão;
- ✓ Ração e água *ad libitum*.

5.5 Células de carcinoma prostático humano androgênio-dependente

As células de carcinoma prostático humano androgênio-dependente (LNCaP), ausentes de contaminação com micoplasma (ANEXO B), foram doadas pelo Hospital do Câncer de Barretos e cultivadas no laboratório de Cultivo Celular do Centro de Biotecnologia (CB), em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10 mM HEPES, 1 mM de piruvato de sódio, 1500 mg/L de bicarbonato de sódio, 50 mg/L de sulfato de gentamicina, 2 mg/L de anfotericina B e 10% de soro fetal bovino (SFB), conforme descrito nas especificações da linhagem celular (ATCC® CRL-1740™).

6 MÉTODOS

6.1 Desenvolvimento do método de radiomarcção do PSMA-DOTA com ^{177}Lu e obtenção do IPBU conjugado com o agente quelante DOTA

As marcações de proteínas com elementos radioativos metálicos requerem a ligação de um agente complexante ao peptídeo. O peptídeo estudado neste trabalho foi adquirido já complexado ao quelante DOTA (FIG. 8), pela empresa norte-americana especializada em síntese de peptídeos (AnaSpec, EUA).

Dentre os procedimentos de marcação consultados na literatura, a marcação do peptídeo Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx) acoplado ao DOTA com ^{177}Lu ainda é inédita, sendo assim, foi necessário realizar estudos com o propósito de obter um protocolo de radiomarcção satisfatório.

Inicialmente, a radiomarcção do peptídeo Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-DOTA foi baseado nos estudos de Pujatti (2009), onde foi descrito a radiomarcção de derivados da bombesina acoplados ao DOTA com ^{177}Lu . Este procedimento de radiomarcção foi escolhido para o desenvolvimento deste trabalho por ter sido facilmente reproduzido nos laboratórios do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN - CNEN/SP) com excelentes resultados de rendimentos de marcação.

Portanto, o procedimento preliminar de radiomarcção do peptídeo Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-DOTA consistiu em adicionar 10 μg do peptídeo previamente diluído em tampão de acetato de sódio (0,4 M, pH 4,5) a 92,5 MBq (2,5 mCi) de cloreto de lutécio-177, levando o volume à 200 μL com o mesmo tampão acetato e incubado a mistura de reação à 90°C, por 30 minutos, sob agitação de 350 rpm.

Figura 8 - Ilustração simplificada da complexação do IPBU com DOTA.

Fonte: adaptado de EDER et al., 2012.

6.2 Determinação de atividade específica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu

Para avaliar a influência da massa na pureza radioquímica da marcação, utilizou-se massas de 20, 10 e 5 μg do peptídeo PSMA-DOTA diluído em 200 μL de tampão acetato de sódio (0,4 M pH 4,5), com 92,5 MBq (2,5 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$, à 90°C, por 30 minutos, sob agitação de 350 rpm. Ao final, a pureza radioquímica foi determinada por cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme descrito na seção de desenvolvimento do método de controle de pureza radioquímica. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A atividade específica (radioatividade/ μg do peptídeo) que apresentou o melhor resultado, considerando-se a % de pureza radioquímica e estabilidade, foi utilizada para avaliar a influência da atividade crescente de $^{177}\text{LuCl}_3$ sobre a pureza radioquímica, considerando marcações com 92,5 MBq (2,5 mCi), 185 MBq (5 mCi), 370 MBq (10 mCi) e 740 MBq (20 mCi).

6.3 Desenvolvimento do método de controle de pureza radioquímica

A pureza radioquímica é definida como a porcentagem do total da radioatividade que se encontra na forma radioquímica desejada, neste caso, na forma de PSMA-DOTA- ^{177}Lu . As impurezas radioquímicas são decorrentes de Incorporação ineficiente do radionuclídeo ao substrato, ou decomposição que pode ser causado por mudança do pH, exposição a luz ou presença de agentes oxidantes ou redutores (SHARP et al., 2005).

Neste trabalho, para determinar a pureza radioquímica da radiomarcção, foram utilizados dois métodos de controle de qualidade, a saber: cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

a) Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os perfis cromatográficos foram previamente determinados para o $^{177}\text{LuCl}_3$ e PSMA-DOTA- ^{177}Lu em cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) em fases móveis de solução de amônio:metanol 1 M pH 8,5 (1:1 v/v) e tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0.

Para avaliar a resolução das fases móveis, aplicou-se uma alíquota da solução de $^{177}\text{LuCl}_3$ ou da mistura de radiomarcção do PSMA-DOTA- ^{177}Lu sobre as fitas cromatográficas e procedeu-se à cromatografia com as diferentes fases móveis. Após a fase móvel percorrer a fase estacionária, a fita cromatográfica foi cortada em 10 fragmentos e a radioatividade foi determinada em contador automático tipo poço devidamente calibrado para o radioisótopo.

b) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A CLAE foi utilizada para determinar a pureza radioquímica do marcador molecular e avaliar a estabilidade das marcações. Procedeu-se à cromatografia em fase reversa em sistema Agilent equipado com detector UV 190 – 300 nm, coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,0 mm, 5 μm) e detector de radiação gama (Raytest). Foi utilizado método de gradiente linear com fluxo de 1,0 mL/minuto, 0 – 3 minutos 100 % TFA:H₂O (0,1 % v/v); 3 – 20 minutos 90 % – 70 % TFA:H₂O (0,1 %

v/v) e 10 % - 30 % TFA:CH₃CN (0,1 % v/v); 20 – 23 minutos 100 % TFA:H₂O (0,1 % v/v); 23 – 27 minutos 100 % TFA:H₂O (0,1 % v/v), o estado inicial foi mantido por 5 minutos para estabilização do sistema. Realizou-se análise de solução de ¹⁷⁷LuCl₃ e das demais misturas de marcação para identificação do tempo de retenção (RT) das espécies de interesse.

6.4 Análise da estabilidade do peptídeo PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu após a marcação

A estabilidade do peptídeo PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu foi avaliada por CLAE e CCD-SG, conforme descrito na sessão do desenvolvimento do método de controle de pureza radioquímica. A análise da integridade do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu foi realizada imediatamente após a marcação, 1, 4, 24, 48 horas e 7 dias após o fim da marcação. A integridade do radiofármaco foi avaliada com o produto armazenado a ≤ - 20 °C. Os experimentos foram realizados em triplicata.

6.5 Análise da estabilidade do peptídeo PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em soro humano e ligação às proteínas plasmáticas *in vitro*

Para obtenção do soro humano, coletou-se 10 mL de sangue de doador sadio sem anticoagulante, centrifugou-se a 1400 g (1500 rpm) por 10 minutos à temperatura ambiente, separou-se o coágulo de fibrina e centrifugou-se novamente para separação do soro.

Adicionou-se o PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu com pureza radioquímica acima de 95 % a 1,5 mL do soro humano, em triplicata, e incubou-se a 37 °C, sob agitação de 350 rpm, por diferentes tempos (15 minutos, 1, 4 e 24 horas), quando foram retiradas alíquotas da incubação para análise pelos métodos cromatográficos descritos anteriormente. Simultaneamente, após decorrido cada tempo de incubação, uma alíquota foi retirada das misturas (200 µL), adicionou-se 200 µL etanol (1:1 v/v) para precipitação das proteínas e centrifugou-se a 9720 g (10000 rpm) por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e a radioatividade nele e no precipitado foram determinadas em um contador automático tipo poço devidamente calibrado para o radioisótopo. A porcentagem de PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu ligado às proteínas plasmáticas (LP) foi determinada pela equação:

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

6.6 Determinação do coeficiente de partição (log P) experimental

O coeficiente de partição (log P) é determinado pela quantidade de determinada espécie química, quando em equilíbrio, presente na fase orgânica e na fase aquosa. Esta grandeza é considerada um importante parâmetro físico-químico, pois o organismo humano se encontra dividido em estruturas apolares e polares.

Desta maneira, o valor de log P auxilia a predição da distribuição e farmacocinética de substâncias *in vivo*, além de ser imprescindível, para a maioria dos fármacos, que atravessem algumas barreiras lipofílicas para atingir o sítio de ação (LOYD e ALLEN, 2016; RANG et al., 2007).

Adicionou-se, em triplicata, 30 µL (12 MBq) do radiofármaco PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu obtido a partir da condição padrão de marcação a um tubo contendo 3 mL de n-octanol (fase orgânica) e 3 mL de solução fosfato-salina pH 7,4 (PBS) (fase aquosa), pré-saturadas por 24 horas. Agitou-se o tubo por uma hora à temperatura ambiente e após a separação das fases aquosa e orgânica, coletou-se 100 µL da fase aquosa e 100 µL da fase orgânica para contagem em contador automático tipo poço. O coeficiente de partição (log P) foi determinado pela equação:

$$\text{Log P} = \log \frac{\text{cpm da fase orgânica}}{\text{cpm da fase aquosa}}$$

6.7 Procedimento de cultivo das células de carcinoma prostático humano androgênio-dependente (LNCaP) e estudo de ligação celular

As células de carcinoma prostático humano androgênio-dependente (LNCaP) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10 mM HEPES, 1 mM de piruvato de sódio, 1500 mg/L de bicarbonato de sódio, 50 mg/L de sulfato de gentamicina, 2 mg/L de anfotericina B e 10 % de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em ar humidificado contendo 5 % de CO₂ a 37 °C. As células foram cultivadas até 80% de confluência, tripsinizadas e ressuspensas de acordo com cada experimento.

Os estudos de ligação celular foram realizados a fim de se determinar a capacidade dos marcadores moleculares de se ligarem às células tumorais. A partir da radiomacação do peptídeo, utilizando-se atividade específica de 70,3 MBq/μg, o estudo de ligação do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu às células LNCaP foi inicialmente realizado em tubos de ensaio adicionando diferentes quantidades do peptídeo radiomarcado (0,76 a 30,5 pmol) a 3×10^5 células LNCaP, com finalidade de determinar qual a melhor relação molar a ser utilizada nos próximos ensaios celulares e confirmar a expressão do receptor antígeno de membrana prostático específico (PSMA) nas células utilizadas.

6.8 Ensaio *in vitro* de ligação específica do peptídeo PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu às células LNCaP

O ensaio de ligação específica foi realizado com o radiomarcador molecular (30,5 pmol/poço) e células de carcinoma prostático humano androgênio-dependente (LNCaP). O peptídeo não radiomarcado (30,5 nmol/poço) em meio de cultura contendo 10 % de SFB foi utilizado como competidor.

O ensaio foi realizado por meio da adição de diferentes quantidades de células (0,15, 0,3, 0,5 e $1,0 \times 10^6$ células em 0,5 mL de meio de cultura contendo 10 % de SFB) a tubos cônicos de 1,5 mL, seguido da adição de 250 μL de meio de cultura (ligação total) ou 250 μL da solução do competidor (ligação não-específica) e

250 μ L da solução contendo o radiomarcador molecular PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu (30,5 pmol) em todos os tubos.

Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 1 hora e 30 minutos, centrifugados a 3000 rpm por 5 minutos, lavados duas vezes com 1 mL de tampão de ensaio (PBS 0,01 M contendo 0,5 % de albumina sérica bovina) e contados em contador gama.

O gráfico de porcentagem de ligação específica em relação ao número de células, foi construído utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.00®. O experimento foi realizado em triplicata.

6.9 Ensaio *in vitro* de internalização do peptídeo PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu às células LNCaP

As células LNCaP previamente incubadas por 48 horas em placas de seis poços (3×10^5 /poço) e mantidas a 37 °C e 5 % CO₂ foram utilizadas nesse ensaio. O meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com meio de internalização (RPMI 1640 contendo 10 % de SFB). Adicionou-se 1 mL de meio de internalização a cada poço, seguido da adição, em triplicata, de 250 μ L do radiomarcador molecular PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu (30,5 pmol) em todos os poços e 250 μ L de meio de cultivo (RPMI 1640 contendo 10% de SFB) (ligação total) ou 250 μ L de competidor (30,5 nmol) (ligação não-específica).

As células foram incubadas a 37 °C e 5 % CO₂ por 60 minutos. Ao final do tempo de 60 minutos, as células foram lavadas duas vezes com meio de internalização, tratadas com 1 mL de tampão glicina 0,05 M / NaCl 0,1 M (pH 2,8) por 5 minutos, seguido de mais duas lavagens de 5 minutos com a mesma solução. As lavagens ácidas foram coletadas para tubos de contagem para avaliação do total ligado à membrana celular.

Para análise da internalização, as células foram lisadas com 1 mL de NaOH 1 M e o conteúdo foi removido para tubos de contagem após 15 minutos, juntamente com mais duas lavagens da mesma solução. Após a contagem dos tubos em contador gama, a porcentagem de internalização específica foi calculada em função do total de radioatividade na célula (ligada + internalizada) e do total de radioatividade adicionado.

6.10 Estudos farmacocinéticos do peptídeo PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos BALB/c

Os estudos de farmacocinética do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos BALB/c machos pesando cerca de 23 gramas foram realizados por método invasivo, após os camundongos serem anestesiados com 100 µL a cada 20 gramas de peso corporal de uma solução de ketamina básica (20 mg/mL) e xilazina (4 mg/mL), por via intraperitoneal.

A análise da farmacocinética foi realizada injetando-se por via endovenosa caudal, 1,85 MBq (50 µCi, diluídos em 100 µL de solução de NaCl 0,9%) do radiomarcador molecular e após diferentes tempos (15 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 4 horas e 24 horas), coletou-se amostra de sangue (60 µL) pelo plexo orbital dos camundongos anestesiados, utilizando um tubo capilar heparinizado.

A radioatividade do sangue foi analisada em um contador gama tipo poço e os dados foram ajustados no programa GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) para um modelo de distribuição em dois compartimentos, caracterizado por duas exponenciais, uma de decaimento rápido e outra de decaimento lento.

Os parâmetros farmacocinéticos como meia-vida de distribuição ($t_{1/2\alpha}$), meia-vida de eliminação ($t_{1/2\beta}$), constante de distribuição (α) e constante de eliminação (β), bem como a área sob a curva de concentração plasmática versus tempo (AUC), foram calculados utilizando o mesmo programa. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

O clareamento sanguíneo (CL) foi calculado pela equação:

$$CL = \frac{\text{Dose injetada (cpm)}}{\text{Área sob a curva}}$$

O volume de distribuição (Vd) foi calculado pela equação:

$$Vd = \frac{CL}{\beta} \times \text{peso do animal (Kg)}$$

6.11 Estudos de biodistribuição do peptídeo PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos BALB/c

Utilizaram-se camundongos machos da linhagem BALB/c separados em grupos de cinco animais e pesados. O radiofármaco preparado com atividade específica de 74 MBq/μg foi utilizado no estudo.

O radiomarcador molecular PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu (1,85 MBq, 50 μCi) diluído em 100 μL de solução de NaCl 0,9% foi administrado por via endovenosa caudal dos animais. Após diferentes tempos (30 minutos, 1 hora, 4 horas e 24 horas) os animais foram anestesiados com 100 μL a cada 20 gramas de peso corporal, de solução de ketamina básica (20 mg/mL) e xilazina (4 mg/mL), por via intraperitoneal, eutanasiados e dissecados.

Os principais órgãos como o coração, fígado, baço, pulmões, pâncreas, estômago, rins, intestino delgado e grosso, músculo da pata traseira, fêmur e cérebro, foram retirados, lavados e pesados, e avaliou-se a radioatividade em cada um deles em contador gama tipo poço. Calcularam-se as porcentagens da atividade injetada por tecido (% AI) e por grama de tecido (% AI/g) utilizando-se a média das contagens da triplicata de um padrão da atividade administrada. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

$$\% \text{ AI} = \frac{\text{cpm do \acute{o}rg\~{a}o}}{(\text{cpm do padr\~{a}o} - \text{cpm da cauda})} \times 100$$

$$\% \text{ AI/g} = \frac{\text{cpm do \acute{o}rg\~{a}o}}{\text{peso do \acute{o}rg\~{a}o (g)} \times (\text{cpm do padr\~{a}o} - \text{cpm da cauda})} \times 100$$

Para calcular a porcentagem de atividade injetada presente nos m\~{u}sculos, % AI (m\~{u}sculo total), e nos ossos, % AI (osso total), dos animais, retirou-se o m\~{u}sculo da coxa e o f\~{e}mur dos camundongos e calculou-se a porcentagem de atividade por grama e o peso dos m\~{u}sculos e dos ossos. O peso dos m\~{u}sculos foi assumido como 40% e dos ossos como 12 % do peso total do camundongo (JIMEN\~{E}Z, 2007).

$$\% \text{ AI} = \frac{\text{cpm da amostra do m\~{u}sculo} \times 40 \times \text{peso do camundongo (g)}}{\text{peso da amostra do m\~{u}sculo (g)} \times (\text{cpm do padr\~{a}o} - \text{cpm da cauda})} \times 100$$

$$\% \text{ AI} = \frac{\text{cpm da amostra do f\~{e}mur} \times 12 \times \text{peso do camundongo (g)}}{\text{peso da amostra do f\~{e}mur (g)} \times (\text{cpm do padr\~{a}o} - \text{cpm da cauda})} \times 100$$

6.12 Identificação das principais espécies presentes na urina

Os mesmos animais utilizados nos estudos de biodistribuição foram utilizados para este estudo. Desta forma, injetou-se por via endovenosa caudal 1,85 MBq, (50 μ Ci) do PSMA-DOTA- ^{177}Lu diluído em 100 μL de solução salina 0,9 %. Após 30 minutos, 1 hora, 4 horas e 24 horas os animais foram anestesiados (com solução de ketamina e xilasina) e eutanasiados por deslocamento cervical.

Após a retirada dos órgãos para a realização dos estudos de biodistribuição, a urina acumulada na bexiga foi retirada com auxílio de uma seringa. Estas amostras foram analisadas por cromatografia em camada delgada, utilizando-se como fase estacionária placas de CCD-SG e fase móvel tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0.

Após a cromatografia, os R_f das principais espécies radioativas presentes na urina foram identificados e inseridos em um gráfico correlacionando a presença destas espécies com o tempo após a administração endovenosa do PSMA-DOTA- ^{177}Lu . Os resultados foram expressos com a % de média das espécies.

6.13 Desenvolvimento de modelo tumoral LNCaP em camundongos SCID

O camundongo SCID apresenta um gene mutante autossômico, situado no cromossomo 16. A maioria dos homozigotos não possuem imunoglobulinas dos tipos IgA, IgM ou IgG, mas alguns animais têm baixíssimos níveis de alguma ou das três. Os órgãos linfóides desses animais se apresentam com um décimo do seu tamanho normal. Timo, linfonodos e o baço estão completamente destituídos de linfócitos. Os animais homozigotos são totalmente deficientes de linfócitos T e B e suas células esplênicas não respondem a estímulos de mitose para células B ou T; por esta razão, não rejeitam transplantes e provavelmente tumores xenográficos. Esses animais, portanto, apresentam uma imunodeficiência severa ("SCID - Severe Combined Immunodeficient") (JAX, 2017; MASSICANO, 2016).

Para o ensaio de desenvolvimento de modelo tumoral em modelo tumoral foram utilizados camundongos machos SCID de sete a doze semanas de idade e cerca de 23 gramas de peso, inoculando 5×10^6 células LNCaP por via subcutânea

no flanco direito. Estes animais foram observados semanalmente a fim de constatar crescimento tumoral. O animal em que foi observado crescimento de massa sólida, foi eutanasiado e esta massa sólida foi retirada e encaminhada para análise histopatológica.

Em posse de um resultado positivo para carcinoma de origem prostática, este mesmo número de células foi inoculado em mais camundongos machos SCID que foram observados semanalmente, com o objetivo de confirmar o modelo tumoral e realizar estudos de biodistribuição em animais com tumor.

6.14 Estudos de biodistribuição do peptídeo PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos SCID com tumor

O método invasivo foi utilizado nos estudos de biodistribuição em camundongos SCID com tumor, utilizando-se o radiofármaco preparado com atividade específica de 74 MBq/ μ g.

Os animais foram utilizados 30 dias após inoculação de 5×10^6 células LNCaP por via subcutânea no flanco direito, quando os tumores atingiram cerca de 5 mm de diâmetro. O radiomarcador molecular (1,85 MBq, 50 μ Ci) diluído em 100 μ L de solução de NaCl 0,9 % foi administrado por via endovenosa caudal.

Após 4 horas da administração, os animais foram anestesiados (solução de ketamina e xilasina), eutanasiados, e seus principais órgãos e o tumor foram retirados e pesados. Por fim, foi avaliada a radioatividade de cada órgão e tumor em um contador gama tipo poço. O cálculo da porcentagem da atividade injetada por órgão (% AI) e por grama de órgão (% AI/g), % AI nos músculos e % AI nos ossos, foram realizados conforme citado anteriormente, além da % AI no tumor. Os ensaios foram realizados em triplicata.

6.15 Análise estatística

A análise estatística, quando aplicada, foi realizada utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA), sendo os resultados expressos como Média e Desvio Padrão.

A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student com distribuição bicaudal para comparação de pares, análise de variância ANOVA e teste de Bonferroni para comparação de múltiplos grupos. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que 0,05.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Desenvolvimento de método de cromatografia em camada delgada (CCD) e de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise da pureza radioquímica (PR) é o método analítico mais utilizado nas rotinas das radiofarmácias, uma vez que essa análise assegura a qualidade dos radiofármacos. A presença de impurezas radioquímicas no radiofármaco pode aumentar potencialmente a dose de radiação para o paciente, além de afetar diretamente a qualidade de procedimentos diagnósticos. Diante disso, é fundamental desenvolver e utilizar métodos eficientes de controle da pureza radioquímica dos radiofármacos (SHARP et al., 2005).

Por meio de metodologias cromatográficas de controle de qualidade disponíveis na literatura, estudos preliminares foram conduzidos para identificar o tempo de retenção das espécies radioquímicas envolvidas, levando em consideração os resultados obtidos em cromatografia de camada delgada de sílica gel (CCD-SG) de outros peptídeos radiomarcados com ^{177}Lu (PUJATTI, 2009) e do peptídeo PSMA-HBED-CC radiomarcado com ^{68}Ga (ALCARDE, 2016).

Os perfis cromatográficos do $^{177}\text{LuCl}_3$ e PSMA-DOTA- ^{177}Lu foram obtidos em cromatografia de camada delgada de sílica gel (CCD-SG) como suporte. O $^{177}\text{LuCl}_3$ foi previamente analisado em fases móveis de solução metanol:acetato de amônio 1M pH 8,5 (1:1 v/v) (FIG. 9) e tampão citrato:ácido cítrico 0,1M pH 5 (FIG. 10), apresentando Rf de 0,0 – 0,2 em tampão amônio:metanol, enquanto que em tampão citrato de sódio mostrou Rf de 0,9 – 1,0.

Posteriormente, o radiofármaco PSMA-DOTA- ^{177}Lu foi analisado nas mesmas fases móveis, apresentando Rf de 0,5 – 0,7 em solução metanol:acetato de amônio 1M pH 8,5 (1:1 v/v) (FIG. 11), enquanto que em tampão citrato:ácido cítrico 0,1M pH 5 apresentou Rf de 0,0 – 0,2 (FIG. 12).

Desta forma, os dois sistemas cromatográficos estudados mostraram potencial para a separação do peptídeo marcado (PSMA-DOTA- ^{177}Lu) do $^{177}\text{LuCl}_3$, quando presentes na mistura de radiomarcção.

Figura 9 - Perfil cromatográfico em CCD-SG do $^{177}\text{LuCl}_3$ utilizando como fase móvel a solução metanol:acetato de amônio 1M pH 8,5 (1:1 v/v) (n=4).

Figura 10 - Perfil cromatográfico em CCD-SG do $^{177}\text{LuCl}_3$ utilizando como fase móvel o tampão citrato:ácido cítrico 0,1M pH 5 (n=4).

Figura 11 - Perfil cromatográfico em CCD-SG do PSMA-DOTA- ^{177}Lu utilizando como fase móvel a solução metanol:acetato de amônio 1M pH 8,5 (1:1 v/v) (n=7).

Figura 12 - Perfil cromatográfico em CCD-SG do PSMA-DOTA- ^{177}Lu utilizando como fase móvel o tampão citrato:ácido cítrico 0,1M pH 5 (n=7).

Estes resultados estão de acordo com as metodologias disponíveis na literatura, que demonstram a migração distinta das espécies estudadas nos dois sistemas cromatográficos, apesar dos estudos terem sido realizados com peptídeos radiomarcados distintos do utilizado neste trabalho. Na literatura consultada, em fase móvel de solução metanol:acetato de amônio 1 M pH 8,5 (1:1 v/v), o marcador molecular se desloca para o meio da fita, enquanto o elemento radioativo livre permanece na origem da fita (ALCARDE, 2016). Enquanto que em fase móvel tampão citrato:ácido cítrico 0,1M pH 5, o marcador molecular permanece na origem e o $^{177}\text{LuCl}_3$ se desloca para o final da fita (PUJATTI, 2009).

Os métodos cromatográficos para separação do $^{177}\text{LuCl}_3$ e PSMA-DOTA- ^{177}Lu em CCD-SG tiveram sua precisão avaliada comparativamente aos resultados de pureza radioquímica obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A metodologia de CLAE utilizada foi desenvolvida também para avaliar a possível presença de outras espécies radioquímicas, eventualmente não identificadas no CCD-SG, considerando-se que a metodologia de CLAE possui potencialmente maior capacidade de resoluções das espécies. O método de CLAE possibilitaria a identificação de possíveis produtos de degradação do peptídeo radiomarcado, especialmente nos estudos de estabilidade da radiomarcagem.

As metodologias de CLAE encontradas na literatura para análise das espécies de interesse aplicam fluxo elevado da fase móvel (4 mL/min), podendo levar ao aumento de pressão interna na coluna, e um curto período de desenvolvimento (8 minutos) (EDER et al., 2012; EDER et al., 2014), fazendo com que o tempo de retenção das possíveis espécies radioativas presentes no produto sejam muito próximos um dos outros, podendo ocorrer a sobreposição dos picos no radiocromatograma e influenciando negativamente na metodologia analítica.

Diante desta problemática, a proposta analítica de CLAE apresentada por Eder e colaboradores (2014) com o peptídeo PSMA-HBED-CC radiomarcado com ^{68}Ga não foi considerada a mais adequada para o presente estudo, pois são observados picos sobrepostos, relacionados possivelmente com as formas de diastereoisômeros presentes no produto de estudo.

Sendo assim, a metodologia analítica proposta por Alcarde (2016) foi utilizada inicialmente para o desenvolvimento do método analítico em CLAE, pois apresentou

o perfil cromatográfico com melhor resolução entre os picos, devido provavelmente, à alteração no fluxo empregado.

A partir da metodologia analítica mencionada anteriormente, o sistema cromatográfico em CLAE foi estabelecido com boa resolução e separação do $^{177}\text{LuCl}_3$ livre e PSMA-DOTA- ^{177}Lu em coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,6 mm, 5 μm) com gradiente em 0 a 3 minutos de 100% de TFA:H₂O (0,1:1000 v/v), 3 a 20 minutos de 90-70% de TFA:H₂O (0,1:1000 v/v) em TFA:CH₃CN (0,1:1000 v/v), 20 a 23 minutos de 70-100% de TFA:H₂O (0,1:1000 v/v) em TFA:CH₃CN (0,1:1000 v/v), a um fluxo de 1 mL/min. É importante salientar que o tempo após 15 minutos, no respectivo sistema cromatográfico, está relacionado com o procedimento de reequilíbrio para a próxima corrida.

No sistema cromatográfico empregado, o tempo de retenção (TR) do $^{177}\text{LuCl}_3$ livre foi de 1,736 minutos (FIG. 13), distante do tempo de retenção do PSMA-DOTA- ^{177}Lu que foi de 5,640 minutos (FIG. 14), sendo possível identificar o $^{177}\text{LuCl}_3$ livre no radiocromatograma do produto final radiomarcado.

Figura 13 - Radiocromatograma do $^{177}\text{LuCl}_3$ utilizando coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,6 mm, 5 μm).

Figura 14 - Radiocromatograma do PSMA-DOTA- ^{177}Lu utilizando coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,6 mm, 5 μm).

Entretanto, é importante considerar o possível efeito da presença do $^{177}\text{LuCl}_3$ e do PSMA-DOTA- ^{177}Lu na mesma amostra sobre o tempo de retenção das espécies estudadas, podendo alterar o tempo de retenção das espécies e interferindo na interpretação da análise. Para elucidar essa questão, foi realizada análise de uma amostra de PSMA-DOTA- ^{177}Lu contaminada de forma proposital com $^{177}\text{LuCl}_3$.

Contudo, não foi observado diferenças significantes nos tempos de retenção do $^{177}\text{LuCl}_3$ e PSMA-DOTA- ^{177}Lu (FIG. 15). Sendo assim, um método satisfatório foi determinado para ser aplicado no controle da pureza radioquímica das marcações nos demais experimentos envolvendo o peptídeo PSMA-DOTA- ^{177}Lu .

Figura 15 - Radiocromatograma do $^{177}\text{LuCl}_3$ livre e PSMA-DOTA- ^{177}Lu utilizando coluna de fase reversa C18 (Waters, 150 mm x 4,6 mm, 5 μm).

Conforme apresentado nos estudos realizados, os perfis cromatográficos foram satisfatoriamente determinados para o $^{177}\text{LuCl}_3$ livre e PSMA-DOTA- ^{177}Lu em CLAE e CCD, utilizando-se como suporte tiras de sílica gel (CCD-SG) em fases móveis de solução metanol:acetato de amônio 1M pH 8,5 e tampão citrato:ácido cítrico 0,1M pH 5.

Entretanto, é importante considerar o impacto dos resíduos químicos gerados nas análises de controle de pureza radioquímica ao meio ambiente, assim como o impacto nos recursos econômicos e aspectos de segurança da complexidade do processamento dos resíduos químicos e radioativos.

Pensando nisso, utilizando amostras de PSMA-DOTA de 5 μg , 10 μg e 20 μg radiomarcadas com 92,5 MBq (2,5 mCi) de ^{177}Lu e com pureza radioquímica superior a 95%, previamente determinada por CLAE, foi realizado um ensaio complementar da pureza radioquímica analisada por CDD-SG, com o propósito de comparar os resultados das duas fases móveis utilizadas em CCD-SG frente ao resultado obtido em CLAE.

A finalidade foi comparar os resultados obtidos em CCD-SG com os determinados por CLAE e escolher somente um método de CCD-SG para os próximos estudos, resultando em uma diminuição dos resíduos químicos gerados e

minimizando o impacto ao meio ambiente e outras complicações relacionadas aos resíduos químicos, além de otimizar o tempo do ensaio e mão de obra do operador.

Os dois sistemas de controle de qualidade estudados apresentaram resultados dos peptídeos com pureza radioquímica superior a 95%. Além disso, os resultados obtidos neste estudo não revelaram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as fases móveis no controle de pureza radioquímica analisada por CCD-SG (FIG. 16, FIG. 17 e FIG. 18).

Figura 16 – Estudo comparativo da pureza radioquímica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu (marcação de 5 μg de PSMA-DOTA com radioatividade de 92,5 MBq) em CCD-SG utilizando-se diferentes fases móveis em suporte de tiras de sílica gel ($p > 0,05$) (n=3).

Figura 17 – Estudo comparativo da pureza radioquímica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu (marcação de 10 μg de PSMA-DOTA com radioatividade de 92,5 MBq) em CCD-SG utilizando-se diferentes fases móveis em suporte de tiras de sílica gel ($p > 0,05$) ($n=3$).

Figura 18 – Estudo comparativo da pureza radioquímica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu (marcação de 20 μg de PSMA-DOTA com radioatividade de 92,5 MBq) em CCD-SG utilizando-se diferentes fases móveis em suporte de tiras de sílica gel ($p > 0,05$) ($n=3$).

Entretanto, o sistema CCD-SG em tampão citrato:ácido cítrico demonstrou uma resolução melhor para a separação das espécies $^{177}\text{LuCl}_3$ livre e PSMA-DOTA- ^{177}Lu , uma vez que neste sistema, a forma livre de lutécio-177 apresenta Rf mais distante do Rf do PSMA-DOTA- ^{177}Lu (FIG. 10 e FIG. 12). Sendo assim, este foi o método cromatográfico em CCD-SG escolhido para o controle de qualidade dos próximos estudos, simultaneamente com análise em CLAE.

7.2 Estudo de radiomarcacão com ^{177}Lu e determinacão de atividade específica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu

Não foi encontrado na literatura consultada, procedimento de radiomarcacão do peptídeo Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx) acoplado ao DOTA com ^{177}Lu , sendo assim, a radiomarcacão do peptídeo PSMA-DOTA foi estudado tomando-se como base os estudos de Pujatti (2009), no qual foi descrito a radiomarcacão de derivados da bombesina acoplados ao DOTA com ^{177}Lu , utilizando-se tampão acetato de sódio 0,4M pH 4,5 como soluçã de marcaçã.

Estudos preliminares com o tampão acetato de sódio 0,4M pH 4,5 foram realizados a fim de estabelecer a melhor condiçã de marcaçã do peptídeo PSMA-DOTA com ^{177}Lu , sem adiçã de agentes estabilizantes.

A variável estudada durante o procedimento de radiomarcacão foi a influêcia da massa do peptídeo sobre a pureza radioquímica. Variou-se a massa do peptídeo (5, 10 e 20 μg), mantendo-se a temperatura de reaçã a 90°C, o pH do tampão de radiomarcacão de 4,5, o tempo de reaçã em 30 minutos e a atividade de lutécio em 92,5 MBq (2,5 mCi).

O estudo para determinar a melhor relaçã atividade:massa do peptídeo a ser utilizada na reaçã de marcaçã é um dado muito importante a ser avaliado, particularmente para radiofármacos receptor-específicos, uma vez que o excesso de peptídeo não radiomarcado pode competir com o peptídeo radiomarcado pelos receptores alvos (ZALUTSKY, 2003).

A pureza radioquímica foi satisfatória (> 95 %) para os três grupos estudados e por meio do teste de Bonferroni para comparaçã de múltiplos grupos determinou-

se que a diferença foi estatisticamente insignificante entre os grupos ($p > 0,05$). Os resultados da variação de massa estão apresentados na FIG. 19 e TAB. 2.

Figura 19 - Estudo da variação de massa na marcação do PSMA-DOTA com $^{177}\text{LuCl}_3$, mantendo como padrão 92,5 MBq (2,5 mCi) de atividade, temperatura de 90°C por 30 minutos sob agitação de 350 rpm (CCD-SG) (n=5).

Tabela 2 - Estudo da variação da massa de PSMA-DOTA utilizada no procedimento de marcação, à temperatura de 90° C, 30 minutos sob agitação constante de 350 rpm e 92,5 MBq (2,5 mCi) de ^{177}Lu (n=5).

Massa do PSMA-DOTA	Pureza radioquímica
5 µg	97,57 ± 1,13 %
10 µg	98,77 ± 0,55 %
20 µg	98,84 ± 0,56 %

Os dados mostram que os parâmetros definidos para o PSMA-DOTA- ^{177}Lu foram aplicados com sucesso nas diferentes massas do peptídeo (5, 10 e 20 µg), não sendo necessário procedimento de purificação e/ou adição de agentes estabilizantes na marcação para realização dos demais estudos.

Os resultados obtidos neste experimento mostram que a variação da massa de PSMA-DOTA para a atividade estudada não influenciou significativamente na porcentagem de pureza radioquímica obtida no procedimento de marcação. Tais resultados preliminares sugeriram realizar estudo de variação da atividade de cloreto de lutécio-177 adicionado na radiomarcação utilizando-se a massa de 10 µg do peptídeo, já que com 20 µg os resultados não foram superiores.

Fixou-se, por sua vez, a temperatura em 90 °C, a massa de peptídeo PSMA-DOTA em 10 µg, o tampão acetato de sódio 0,4 M com pH 4,5 e o tempo de reação em 30 minutos, para que o efeito da atividade crescente de $^{177}\text{LuCl}_3$ sobre a pureza radioquímica das reações fosse estudado, variando a atividade de 92,5 até 740 MBq (2,5 mCi até 20 mCi).

Os resultados dessas análises determinados por CCD-SG e a atividade específica calculada do marcador molecular obtido são mostrados na FIG.20 e TAB.3.

Figura 20 - Estudo da variação da atividade de marcação do PSMA-DOTA com $^{177}\text{LuCl}_3$, mantendo como padrão 10 μg do peptídeo, 90°C, 30 minutos sob agitação de 350 rpm (CCD-SG) (n=3).

Tabela 3 - Análise da influência da atividade específica sobre a pureza radioquímica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu , mantendo como padrão 10 μg do peptídeo, 90°C, 30 minutos sob agitação de 350 rpm (CCD-SG) (n=3).

Atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ (MBq - mCi)	Atividade Específica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu (MBq/ μg)	Pureza Radioquímica (%)
92,5 - 2,5	9,25	99,21 ± 0,35
185 - 5,0	18,5	98,29 ± 0,83
370 - 10	37,0	98,34 ± 1,17
555 - 15	55,5	99,10 ± 0,08
740 - 20	74,0	98,36 ± 0,69

A atividade específica dos radiofármacos corresponde à radioatividade do nuclídeo por unidade de massa (MBq/ μ g ou mCi/ μ g) ou por número de nmols do peptídeo (MBq/nmol). Do ponto de vista da aplicação clínica, esse parâmetro é importante no desenvolvimento de novos radiofármacos, uma vez que há necessidade de encontrar a atividade específica ideal, pois quando muito alta, pode causar radiólise e assim a desnaturação do peptídeo e quando baixa, as moléculas não marcadas competem com as marcadas pelos mesmos receptores *in vivo*, diminuindo a captação do radiofármaco no tumor e podendo ocasionar quadros de toxicidade em pacientes (ZALUTSKY, 2003).

Pode-se observar que pureza radioquímica satisfatória (> 95 %) foi obtida para todas as atividades específicas avaliadas (TAB. 3) e por meio do teste de Bonferroni para comparação de múltiplos grupos determinou-se que a diferença foi estatisticamente insignificante entre os grupos ($p > 0,05$). Entretanto, é importante considerar o efeito da atividade específica sobre a estabilidade do produto radiomarcado.

A título de comparação, também foram realizados estudos de estabilidade das preparações armazenados na forma congelada ($\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$), para avaliar a influência da atividade específica sobre a pureza radioquímica em diferentes tempos.

Na ausência de agentes estabilizantes, a estabilidade do marcador molecular frente à radiólise foi analisada inicialmente com as atividades específicas de 9,25 MBq/ μ g, 18,5 MBq/ μ g, 37 MBq/ μ g e 74 MBq/ μ g após armazenamento em temperatura de $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongelamento contínuo da mesma alíquota para análise em diferentes tempos por até sete dias. Os resultados são apresentados nas FIG. 21, FIG. 22, FIG. 23 e FIG.24, respectivamente.

Figura 21 - Estabilidade do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcado com atividade específica de 9,25 MBq/μg e armazenado a ≤ -20 °C por até sete dias (CCD-SG) (n=3).

Figura 22 - Estabilidade do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcado com atividade específica de 18,5 MBq/μg e armazenado a ≤ -20 °C por até sete 7 dias (CCD-SG) (n=3).

Figura 23 - Estabilidade do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcado com atividade específica de 37 MBq/μg e armazenado a ≤ -20 °C por até sete dias (CCD-SG) (n=3).

Figura 24 - Estabilidade do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcado com atividade específica de 74 MBq/μg e armazenado a ≤ -20 °C por até sete dias (CCD-SG) (n=3).

Os resultados do controle de qualidade sugerem que o marcador molecular apresenta alta estabilidade ($PR > 95\%$) por até sete dias para as marcações com atividades específicas de 9,25 MBq/ μ g, 18,5 MBq/ μ g e 37 MBq/ μ g, apresentando respectivamente, pureza radioquímica de $97,35 \pm 0,50 \%$, $97,51 \pm 1,72 \%$ e $95,95 \pm 0,43 \%$ no sétimo dia após a radiomarkação do PSMA-DOTA.

Entretanto, a pureza radioquímica apresentou valores inferiores a 95% após 48 horas ($94,55 \pm 0,16 \%$) e sete dias ($92,69 \pm 1,69 \%$) na radiomarkação com atividade específica de 74 MBq/ μ g. O descongelamento contínuo da mesma alíquota foi considerado a provável causa da estabilidade insatisfatória após 48 horas na marcação com atividade específica de 74 MBq/ μ g.

Essa hipótese foi confirmada em um estudo complementar da estabilidade da radiomarkação com atividades específicas de 37 MBq/ μ g, 55,5 MBq/ μ g e 74 MBq/ μ g, utilizando alíquotas fracionadas das respectivas atividades específicas e descongeladas somente para análise de pureza radioquímica de cada tempo, evitando assim a influência negativa do descongelamento contínuo na estabilidade radioquímica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu (tempo imediato, 24 e 48 horas).

Os resultados do estudo complementar de estabilidade do radiofármaco PSMA-DOTA- ^{177}Lu com diferentes atividades específicas (37 MBq/ μ g, 55,5 MBq/ μ g e 74 MBq/ μ g) e armazenado a $\leq -20^\circ\text{C}$ por até 48 horas, analisados por CCD-SG, estão apresentados na FIG. 25, FIG. 26 e FIG. 27, respectivamente.

Os resultados do estudo complementar de estabilidade do radiofármaco com atividade específica de 74 MBq/ μ g e armazenado a $\leq -20^\circ\text{C}$ por até 48 horas, analisados por CLAE, estão apresentados na FIG. 28.

Figura 28 – Estudo da estabilidade do PSMA-DOTA- ^{177}Lu radiomarcado com atividade específica de 74 MBq/ μg e armazenado a $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 48 horas: tempo imediato (A), 24 horas (B) e 48 horas (C) descongelado no momento da análise (CLAE) (n=3).

Figura 25 – Estudo da estabilidade do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcado com atividade específica de 37 MBq/μg e armazenado a ≤ -20 °C por até 48 horas, descongelado no momento da análise (CCD-SG) (n=3).

Figura 26 – Estudo da estabilidade do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcado com atividade específica de 55,5 MBq/μg e armazenado a ≤ -20 °C por até 48 horas, descongelado no momento da análise (CCD-SG) (n=3).

Figura 27 – Estudo da estabilidade do PSMA-DOTA- ^{177}Lu radiomarcado com atividade específica de 74 MBq/ μg e armazenado a $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 48 horas, descongelado no momento da análise (CCD-SG) (n=3).

As atividades específicas entre 9,25 MBq/ μg e 74 MBq/ μg apresentaram alta pureza radioquímica ($> 95\%$), sem necessidade de purificação e/ou adição de agentes estabilizantes, se mantendo estáveis mediante armazenamento a temperatura $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 48 horas quando descongelados no momento da análise. O peptídeo marcado suportou uma atividade específica compatível com a que está sendo utilizada em ensaios clínicos (74 MBq/ μg) de outros ligantes de PSMA radiomarcados com ^{177}Lu (DAS et al., 2016).

O desenho experimental para avaliar a estabilidade do PSMA-DOTA- ^{177}Lu pretendeu identificar uma condição que pudesse ser utilizada como estimativa para o transporte do produto para diferentes localidades do país. O Centro de Radiofarmácia (CR) do IPEN utiliza uma embalagem para transporte de moléculas marcadas que dispõe de um reservatório interno para acondicionar o radiofármaco congelado em gelo seco.

Por este motivo, avaliou-se a estabilidade do PSMA-DOTA- ^{177}Lu a temperatura de $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em diferentes tempos, sendo que o tempo de transporte do radiofármaco, para regiões próximas do centro produtor (IPEN) de até 4 horas. Enquanto que o congelamento por 24 horas e 48 horas forneceu estimativa para o transporte para regiões mais distantes.

7.3 Determinação do coeficiente de partição (log P) experimental

O ensaio de determinação do coeficiente de partição (log P) permite estimar a lipossolubilidade do radiofármaco. Desta maneira, o coeficiente de partição (log P) experimental é considerado um importante parâmetro físico-químico, pois o organismo humano se encontra dividido em estruturas apolares e polares.

Diante desta importância, o valor de log P auxilia na previsão dos parâmetros farmacocinéticos de substâncias *in vivo*, além de ser substancial para a maioria dos fármacos que atravessam algumas barreiras lipofílicas para atingir o sítio de ação (LOYD e ALLEN, 2016; RANG et al., 2007).

O log P experimental encontrado para o PSMA-DOTA- ^{177}Lu foi $-3,39 \pm 0,3$, indicando características de hidrofiliidade e possivelmente relacionada com clareamento sanguíneo rápido, uma vez que os valores de coeficiente de partição estão classificados como: $P = 0$, a substância tem a mesma afinidade por ambas as fases; $P < 0$, a substância tem maior afinidade pela fase aquosa; $P > 0$, a substância tem maior afinidade pela fase orgânica (LOYD e ALLEN, 2016).

O resultado de coeficiente de partição determinado para o PSMA-DOTA- ^{177}Lu , sugerindo característica hidrofílica, está de acordo com o encontrado na literatura. O peptídeo PSMA acoplado a quelantes como DOTA, DTPA e PCTA e radiomarcado com ^{68}Ga apresentou coeficientes de partição de -2,89, -3,24 e -1,41, respectivamente (CHAKRAVARTY et al., 2012; EDER et al., 2012).

A marcação do PSMA-DOTA com ^{177}Lu aparentemente não alterou esta característica físico-química do PSMA-DOTA, indicando perfil hidrofílico e predição de rápido clareamento sanguíneo *in vivo*. Entretanto, para confirmar essa hipótese os resultados obtidos neste estudo deverão ser confrontados com os resultados do estudo de biodistribuição e farmacocinética em camundongos Balb/c.

7.4 Análise da estabilidade em soro humano e ligação às proteínas séricas “*in vitro*”

O ensaio de estabilidade *in vitro* em soro humano fornece uma estimativa da manutenção da integridade do produto *in vivo*, considerando a possibilidade de metabolização por enzimas presentes no sangue. A maior estabilidade dos radiofármacos no soro plasmático pode refletir uma maior quantidade de radiofármaco intacto presente na área do tumor, aumentando a probabilidade de ligação das células tumorais (GARAYOA et al., 2007).

Para análise da estabilidade em soro humano, o marcador molecular foi diluído em soro humano fresco e os perfis cromatográficos em CCD-SG e CLAE foram examinados, após 15 minutos, 1, 4 e 24 horas de incubação a 37°C, e utilizados para calcular a porcentagem dos marcadores moleculares íntegros em cada tempo. Os resultados cromatográficos em CCD-SG são apresentados na FIG. 29.

Para avaliar a integridade do peptídeo PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu após incubação em soro humano por CLAE, realizou-se precipitação das proteínas plasmáticas com etanol e filtração para possibilitar injeção da amostra no equipamento. Neste caso, o perfil de CLAE das amostras analisadas desconsidera a fração do peptídeo radiomarcado eventualmente ligado às proteínas plasmáticas, revelando o perfil de espécies radioquímicas presente na forma livre no plasma.

Os resultados do estudo de estabilidade do radiofármaco PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em soro humano *in vitro* analisados por CLAE, estão apresentados na FIG. 30, FIG.31 FIG.32 e FIG.33.

Figura 29 - Estabilidade do PSMA-DOTA- ^{177}Lu incubado em soro humano a 37°C por 15 minutos, 1, 4 e 24 horas, analisado por CCD-SG (n= 3).

Figura 30 – Perfil de CLAE do PSMA-DOTA- ^{177}Lu incubado em soro humano a 37°C por 15 minutos.

Figura 31 – Perfil de CLAE do PSMA-DOTA- ^{177}Lu incubado em soro humano a 37°C por 1 hora.

Figura 32 – Perfil de CLAE do PSMA-DOTA- ^{177}Lu incubado em soro humano a 37°C por 4 horas.

Figura 33 – Perfil de CLAE do PSMA-DOTA- ^{177}Lu incubado em soro humano a 37°C por 24 horas.

Os perfis de CLAE revelaram uma estabilidade alta do peptídeo radiomarcado em soro humano, apresentando apenas pico correspondente ao peptídeo radiomarcado, não tendo sido evidenciado presença de lutécio livre ou outras espécies sugestivas de metabolização ou degradação do composto.

Os resultados demonstram alta estabilidade do radiofármaco em soro humano, apresentando excelente pureza radioquímica por um período de até 24 horas. Os valores de estabilidade obtidos neste trabalho sugerem que o peptídeo PSMA-DOTA radiomarcado ao $^{177}\text{LuCl}_3$ provavelmente apresentará estabilidade em soro *in vivo*. Diante do resultado obtido no ensaio de coeficiente de partição ($\log P$), considerando-se que seu clareamento sanguíneo deve ser rápido, espera-se que o peptídeo radiomarcado permaneça intacto até ligar-se aos receptores tumorais.

A ligação do radiofármaco às proteínas séricas no ensaio *in vitro* atingiu um máximo de 60% em 1 hora de incubação, com redução para 20% em 4 horas. É importante ressaltar que não foi encontrado na literatura resultados para comparação com os obtidos no presente trabalho. A FIG.34 apresenta os resultados do estudo de ligação às proteínas séricas “*in vitro*”.

Figura 34 - Estudo de ligação do marcador molecular às proteínas séricas “*in vitro*” por 15 minutos, 1, 4 e 24 horas (n=3).

O ensaio de ligação às proteínas plasmáticas *in vitro* serve para avaliar a tendência do peptídeo radiomarcado em se ligar às proteínas plasmáticas *in vivo* ou em manter-se livre no plasma, o que facilitaria a sua eliminação. Entretanto, deve-se considerar que se trata de um estudo *in vitro* e que as condições de incubação podem interferir na porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas. Os resultados obtidos neste estudo deverão ser confrontados com os resultados do estudo de biodistribuição e farmacocinética.

7.5 Estudos de ligação do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu às células tumorais

Os estudos de ligação celular *in vitro* são realizados para determinar a capacidade de ligação dos marcadores moleculares às células tumorais. As células utilizadas foram as células LNCaP de carcinoma prostático humano androgênio-dependente (ATCC® CRL-1740™) que expressam o receptor PSMA (FIG. 35). A atividade específica do radiofármaco PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu utilizado nos experimentos celulares foi 70,3 MBq/μg (1,9 mCi/μg) com pureza radioquímica superior à 95%.

Figura 35 - Fotomicrografias representativas de células LNCaP de carcinoma prostático humano androgênio-dependente em cultivo (ATCC® CRL-1740™).

A atividade específica de 70,3 MBq/ μ g (1,9 mCi/ μ g) foi escolhida pois é compatível com a que está sendo utilizada em ensaios clínicos de outros ligantes de PSMA radiomarcados com ^{177}Lu (DAS et al., 2016). Além disso, está sendo estudada no IPEN a radiomarcagem do peptídeo PSMA-617 com ^{177}Lu , utilizando esta atividade específica. Desta forma, os resultados dos respectivos trabalhos poderão ser comparados com a mesma condição de ensaio experimental.

A partir da radiomarcagem com atividade específica de 70,3 MBq/ μ g (1,9 mCi/ μ g), o estudo de ligação do PSMA-DOTA- ^{177}Lu em células tumorais LNCaP foi inicialmente realizado adicionando diferentes quantidades do peptídeo radiomarcado (0,76 a 30,5 pmol) a 3×10^5 células LNCaP. No ensaio foi observado um aumento significativo de ligação do PSMA-DOTA- ^{177}Lu às células LNCaP, correlacionado com a quantidade de PSMA-DOTA- ^{177}Lu adicionada no ensaio. Os resultados do presente ensaio experimental estão expressos na FIG. 36.

Figura 36 - Ligação de diferentes concentrações do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu (0,76 a 30,5 pmol) às células LNCaP (3×10^5) (n = 3).

Apesar da literatura referenciar a utilização de células LNCaP para avaliação de especificidade de ligação de radiofármacos PSMA-específicos, realizou-se este estudo preliminar para confirmar se as condições de cultivo e manutenção das células empregadas não afetaram a expressão dos receptores PSMA. Tendo em vista que as células LNCaP cultivadas em nosso laboratório demonstraram captação de PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu, os estudos de ligação específica e internalização foram conduzidos.

A utilização de 30,5 pmol do radiofármaco PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou resultado de contagem da radioatividade incorporada às células em contador gama muito superior à contagem de fundo da radioatividade (*background*) e do limite máximo de detecção do equipamento (> 1000000 cpm), além de apresentar maior facilidade de pipetagem em relação à utilização de 24,4 pmol de PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu. Sendo assim, ensaios de ligação específica foram realizados com 30,5 pmol do radiofármaco PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu, a fim de determinar a influência da concentração

das células sobre a ligação específica ($0,15 \times 10^6$ até 1×10^6 de células LNCaP). Os resultados do ensaio de ligação específica são apresentados na FIG.37.

Figura 37 – Resultados do ensaio de ligação específica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu em diferentes concentrações de células LNCaP ($0,15 \times 10^6$, $0,3 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ e 1×10^6) (n = 3).

A porcentagem de ligação específica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu foi de $1,79 \pm 0,21$ %; $2,47 \pm 0,03$ %; $3,07 \pm 0,01$ % e $4,13 \pm 0,27$ %, para as concentrações de $0,15 \times 10^6$, $0,3 \times 10^6$, $0,5 \times 10^6$ e 1×10^6 de células LNCaP, respectivamente.

O percentual de ligação específica obtido para o PSMA-DOTA- ^{177}Lu às células LNCaP foi discretamente melhor aos valores descritos na literatura, nos quais os pesquisadores relataram percentuais de ligação entre 2,5 e 3,0 % para o peptídeo PSMA-DOTA- ^{68}Ga utilizando $0,7 \times 10^6$ de células LNCaP (EDER et al., 2012).

Diante dos resultados obtidos no ensaio de ligação específica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu neste trabalho, podemos sugerir que provavelmente a radiomarcagem do PSMA-DOTA com ^{177}Lu aumenta discretamente a ligação específica do peptídeo

PSMA-DOTA. Entretanto, temos que levar em consideração as diferenças de origem das células, forma de cultivo, manutenção das células e número de passagens, fatores que podem provocar alterações na expressão do receptor por parte das células, aumentando ou diminuindo sua expressão, influenciando na quantidade de receptores disponíveis na membrana celular. Além disso, o estudo realizado por Eder e colaboradores (2012) não informa a atividade específica do PSMA-DOTA-⁶⁸Ga utilizado no ensaio de ligação específica, podendo a possível diferença de atividade específica utilizada nos ensaios ser uma justificativa para a diferença observada na porcentagem de ligação específica quando comparada a do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu encontrada neste trabalho.

A internalização do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu foi analisada utilizando 30,5 pmol do radiofármaco em $0,3 \times 10^6$ células LNCaP aderentes, visto que essa condição de ensaio é comparável com o ensaio de internalização do PSMA-DOTA-⁶⁸Ga encontrado na literatura (EDER et al., 2012). Os resultados do ensaio de internalização foram expressos na TAB 4.

Tabela 4 – Porcentagem de ligação à superfície e internalização do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu (n= 8).

Ligação celular	Média
Superfície celular	99,03 ± 0,84 %
Internalização	0,97 ± 0,86 %

O ensaio de internalização do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu indica que o maior percentual da ligação específica do radiofármaco às células LNCaP corresponde à fração da ligação de superfície (99,03 ± 0,84 %). Por sua vez, a internalização do radiofármaco foi de 0,97 ± 0,86 %. Essa baixa fração de internalização é característica do radiofármaco estudado, provavelmente, devido ao espaçador *Ahx* e ao agente quelante DOTA presentes em sua estrutura molecular (EDER et al., 2012).

Esses resultados estão de acordo com o estudo comparativo de dois agentes quelantes (HBED-CC e DOTA), publicados previamente por Eder e colaboradores

(2012), que demonstraram alta fração de internalização do PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga e uma fração de internalização extremamente baixa do PSMA-DOTA-⁶⁸Ga.

O aumento do influxo de radiofármacos para o interior da célula pode ser considerado importante para garantir que a maior dose de radiação esteja em contato com as células tumorais, podendo assim obter uma melhor eficácia terapêutica (ABD-ELGALIEL et al., 2008).

Entretanto, na literatura é relatado que peptídeos de baixo peso molecular derivados de bombesina, que possuem pouca internalização, promoveram resultados iguais ou até melhores nos estudos pré-clínicos quando comparados com peptídeos derivados de bombesina que possuem maior internalização (STANGELBERGER et al., 2005; CESCATO et al., 2008).

Esses resultados encontrados em estudos com os peptídeos de bombesina, provavelmente se devem ao fato de que não é necessário que o radiofármaco esteja obrigatoriamente no interior das células para que o efeito citotóxico dos radiofármacos sobre as células tumorais aconteça, visto que o radiofármaco com uma apreciável retenção no tumor apresenta o efeito terapêutico conhecido como "fogo cruzado" (*crossfire*) (PUJATTI, 2009).

Além disso, o PSMA também está presente em baixa expressão em células do epitélio normal da próstata, túbulos renais, mucosa duodenal, glândulas salivares e células neuronais, sendo que radiofármacos com maior internalização nas células tumorais, também podem ser internalizados pelos tecidos saudáveis que expressam o receptor de interesse, podendo dificultar sua eliminação e consequentemente aumentando a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos (OSBORN et al., 2013).

A marcação do PSMA-DOTA com ¹⁷⁷Lu aparentemente não alterou a característica do PSMA-DOTA de ligação às células tumorais. Assim, os dados obtidos nos estudos celulares *in vitro* da interação do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu com o antígeno de membrana prostático específico (PSMA), sinalizam positivamente para a perspectiva de investigar essa interação *in vivo*, ou seja, em modelo experimental de tumor de próstata, utilizando as células LNCaP.

7.6 Estudos de farmacocinética do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos BALB/c

O processo de desenvolvimento de novos fármacos é complexo e longo, podendo ser realizado em quatro passos fundamentais para o alcance de resultados positivos: bioanalítico, matemático, experimental e conceitual. A parte matemática do desenvolvimento de novos fármacos trabalha com conceitos farmacocinéticos, como o tempo de meia-vida plasmática dos medicamentos (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVEIRA, 2010). O conhecimento prévio do comportamento de fármacos no organismo auxilia na avaliação de aspectos farmacológicos e toxicológicos, podendo indicar o melhor regime de dosagem nos estudos clínicos de novos medicamentos.

Portanto, o conhecimento prévio da farmacocinética de um novo radiofármaco é importante para avaliar o possível potencial de aplicação clínica, pois inclui os processos de distribuição, biotransformação e eliminação do radiofármaco (ROBERTS, TACCONE, LIPMAN, 2015).

A curva de clareamento sanguíneo do marcador molecular PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu pode ser visualizada na FIG 38, expressa em porcentagem da atividade injetada (% AI) no sangue em função do tempo após a administração.

Figura 38 – Estudo do clareamento sanguíneo do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos BALB/c machos entre 15 minutos e 24 horas (n=5).

Por meio do estudo de clareamento sanguíneo pode-se observar que o PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu apresenta rápido clareamento sanguíneo, sendo eliminado quase que completamente da corrente sanguínea em aproximadamente 2 horas, corroborando com o perfil hidrofílico do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu sugerido no ensaio de coeficiente de partição experimental (log P).

Os dados da FIG. 38 foram utilizados para cálculo dos parâmetros farmacocinéticos do marcador molecular PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu, os quais são apresentados na TAB 5. Os parâmetros foram calculados após ajuste dos dados para um modelo de decaimento exponencial em duas fases ou modelo de distribuição bicompartimental.

Tabela 5 – Parâmetros farmacocinéticos para o PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu determinados em camundongos BALB/c machos (n = 5).

Parâmetro Farmacocinético	Símbolo	Valor
Tempo de meia-vida da fase rápida ou distributiva	$t_{1/2} (\alpha)$	2,92 min
Tempo de meia-vida da fase lenta ou de eliminação	$t_{1/2} (\beta)$	20,04 min
Constante de distribuição	(α)	0,24 min ⁻¹
Constante de eliminação	(β)	0,03 min ⁻¹
Depuração (CL)	CL	0,21 mL.min ⁻¹
Volume de distribuição	Vd	1,07 L.Kg ⁻¹

O tempo de meia-vida de fármacos representa o tempo necessário para que o organismo elimine 50% do fármaco administrado, e assim estabelecer o tempo requerido para eliminar completamente o fármaco do organismo. A fase de distribuição ($t_{1/2} \alpha$) dos fármacos resulta em acentuada diminuição da concentração plasmática do fármaco e mesmo quando o fármaco já está equilibrado entre seus reservatórios teciduais, a sua concentração plasmática continua declinando, representando a fase de eliminação do fármaco ($t_{1/2} \beta$) que é mais lenta que a fase de distribuição (STORPIRTIS et al., 2011). O PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou meia-vida de distribuição ($t_{1/2} \alpha$) de 2,92 minutos e meia vida de eliminação ($t_{1/2} \beta$) de 20,04 minutos (TAB. 5).

A depuração (CL) do fármaco é o parâmetro que relaciona sua velocidade de eliminação com a concentração plasmática no organismo, descrevendo a eficiência

do processo de eliminação (STORPIRTIS et al., 2011). O PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou uma depuração (CL) considerada rápida, o que influencia diretamente no tempo de meia-vida da fase de eliminação ($t_{1/2 \beta}$).

O tempo de meia-vida plasmática da fase distributiva, fase de eliminação e a depuração do radiofármaco PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu traduzem o rápido clareamento sanguíneo, sendo que essa característica é semelhante à apresentada para o PSMA-DOTA-⁶⁸Ga, conforme resultados publicados previamente por Eder e colaboradores (2012), que demonstraram que o peptídeo radiomarcado com gálio-68 é eliminado rapidamente da circulação sanguínea.

Entretanto, Eder e colaboradores (2012) não publicaram os parâmetros farmacocinéticos do PSMA-DOTA-⁶⁸Ga, para que pudéssemos realizar uma comparação mais detalhada com o PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu, com o propósito de verificar alguma influência do ¹⁷⁷Lu sobre os parâmetros farmacocinéticos do PSMA-DOTA.

A eliminação rápida do radiofármaco da circulação sanguínea é fundamental para evitar o metabolismo dos marcadores moleculares pelas enzimas do soro *in vivo* e garantir sua ligação aos receptores de interesse e aplicabilidade no tratamento de tumores, apesar de que a estabilidade do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em soro *in vitro* foi demonstrada.

Os resultados obtidos para o PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu, que demonstraram alta estabilidade em soro *in vitro* e clareamento sanguíneo rápido, encorajaram a realização de estudo de biodistribuição em modelo animal para avaliar o seu potencial para aplicação no tratamento do câncer de próstata.

7.7 Estudos de biodistribuição do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos BALB/c

Os resultados dos estudos de biodistribuição do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos BALB/c machos podem ser visualizados na FIG. 39, TAB 6 e TAB 7. Os dados estão expressos em porcentagem de atividade administrada por órgão (%AI), por grama de tecido (%AI/g) ou mL de sangue (%AI/mL).

Figura 39 - Biodistribuição do PSMA-DOTA- ^{177}Lu com atividade específica de 74MBq/ μg em camundongos BALB/c machos. Os resultados estão em porcentagem de atividade por grama de tecido (%AI/g) ou mL de sangue (%AI/mL) (n=5).

Tabela 6 - Biodistribuição do PSMA-DOTA- ^{177}Lu com atividade específica de 74MBq/ μg em camundongos BALB/c machos. Os resultados estão em porcentagem de atividade administrada por grama de tecido (%AI/g) ou mL de sangue (%AI/mL) (n=5).

Órgão	%AI/g de tecido ou mL de sangue			
	30 minutos	1 hora	4 horas	24 horas
Sangue	0,95 ± 0,37	0,31 ± 0,09	0,02 ± 0,01	0,00 ± 0,00
Coração	0,28 ± 0,09	0,13 ± 0,04	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Pulmões	0,41 ± 0,11	0,33 ± 0,08	0,05 ± 0,01	0,02 ± 0,00
Pâncreas	0,16 ± 0,05	0,13 ± 0,06	0,04 ± 0,02	0,01 ± 0,00
Baço	1,78 ± 0,54	0,19 ± 0,06	0,12 ± 0,02	0,04 ± 0,01
Estômago	0,25 ± 0,07	0,22 ± 0,09	0,14 ± 0,05	0,03 ± 0,01
Fígado	0,12 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Rins	10,90 ± 3,22	5,04 ± 1,60	0,84 ± 0,01	0,16 ± 0,02
Intestinos	0,15 ± 0,04	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,01 ± 0,00
Músculo	0,23 ± 0,06	0,49 ± 0,22	0,15 ± 0,01	0,01 ± 0,00
Osso	0,31 ± 0,09	0,57 ± 0,18	0,16 ± 0,01	0,10 ± 0,03
Cérebro	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00

Tabela 7 - Biodistribuição do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu com atividade específica de 74MBq/μg em camundongos BALB/c machos. Os resultados estão em porcentagem de atividade administrada por órgão (%AI) (n=5).

Órgão	30 minutos %AI	1 hora %AI	4 horas %AI	24 horas %AI
Sangue	2,14 ± 0,81	0,59 ± 0,15	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,01
Coração	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Pulmões	0,09 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Pâncreas	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Baço	0,21 ± 0,06	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Estômago	0,12 ± 0,04	0,05 ± 0,02	0,15 ± 0,06	0,01 ± 0,00
Fígado	0,18 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Rins	5,28 ± 1,48	1,95 ± 0,53	0,35 ± 0,07	0,06 ± 0,01
Intestinos	0,45 ± 0,13	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,04	0,03 ± 0,00
Músculo	2,78 ± 0,67	3,31 ± 1,80	1,64 ± 0,71	0,09 ± 0,03
Osso	1,13 ± 0,35	1,24 ± 0,46	0,52 ± 0,06	0,28 ± 0,07
Cérebro	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00

No estudo de biodistribuição do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu pode-se observar uma concentração significativa da radioatividade nos rins até 4 horas após a administração, indicando que o radiofármaco é excretado principalmente por via renal. Deste modo, os rins provavelmente são os órgãos críticos para a dosimetria.

As baixas captações hepática e intestinal confirmam a preferência pela via de eliminação renal, já esperada em função do resultado de coeficiente de partição experimental (log P) e do estudo de farmacocinética. No entanto, os resultados do ensaio de ligação às proteínas plasmáticas *in vitro* não corroboram com os resultados obtidos nos estudos de farmacocinética e biodistribuição, já que a alta porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas não é compatível com o rápido clareamento sanguíneo observado nos estudos *in vivo*. Neste caso, deve-se considerar que as condições de incubação do ensaio de ligação às proteínas plasmáticas *in vitro* podem ter favorecido a ligação do peptídeo radiomarcado às proteínas plasmáticas, sem a influência do rápido clareamento sanguíneo observado no processo *in vivo*.

Apesar da %AI/g do órgão diminuir em função do tempo nos ensaios de biodistribuição, a razão órgão:sangue aumenta, conforme demonstrado na tabela 8, indicando que a captação nos órgãos não diminui em função do tempo de forma proporcional ao clareamento sanguíneo. No caso específico dos rins, o aumento

observado na razão órgão:sangue possivelmente está associado à reabsorção tubular do radiofármaco, compatível com peptídeos de baixo peso molecular (ZALUTSKY, 2003).

Os peptídeos de baixo peso molecular podem ser reabsorvidos nos túbulos renais após a filtração glomerular, sendo que a reabsorção de peptídeos radiomarcados pode ser considerada uma complicação para a aplicação clínica, tornando os rins órgãos críticos para a dosimetria (ZALUTSKY, 2003). O PSMA-DOTA é um peptídeo de baixo peso molecular, e apesar da captação renal diminuir significativamente em função do tempo após administração, a reabsorção renal pode ser considerada, visto a persistência da captação renal em detrimento do clareamento sanguíneo.

Tabela 8 - Razões órgão:sangue calculadas a partir da %AI/g ou %AI/mL dos resultados da biodistribuição do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos BALB/c machos.

Órgão	Razão %AI/g de órgão : %AI/g de sangue	
	30 minutos	4 horas
Coração	0,29	1,5
Pulmões	0,43	2,5
Fígado	0,13	1,5
Rins	11,47	42
Intestinos	0,16	3,5
Baço	1,87	6

Por meio de estudos clínicos de biodistribuição encontrados na literatura, verificou-se captação de peptídeos PSMA em regiões saudáveis, como as glândulas salivares, rins, fígado, baço e intestino (AFSHAR-OROMIEH et al., 2013). O aumento da razão órgão:sangue também pode ser indicativo da ligação específica do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu nos órgãos não alvos, considerando-se a possível presença de receptores PSMA nos órgãos dos camundongos utilizados no ensaio.

Estudos encontrados na literatura de biodistribuição do PSMA-DOTA-⁶⁸Ga em animais, apresentaram resultados semelhantes aos resultados encontrados neste trabalho. Porém, os estudos de biodistribuição do PSMA-DOTA-⁶⁸Ga foram realizados apenas para o tempo de 60 minutos em camundongos *Nude* com tumor LNCaP (EDER et al., 2012).

Outro dado importante encontrado na literatura, foi que o PSMA-HBED-CC radiomarcado com ^{68}Ga é rapidamente eliminado do sangue, porém devido a reabsorção nos túbulos renais atribuído ao agente quelante HBED-CC, apresentou alta captação renal em 60 minutos ($139,4 \pm 21,4$ % AI/g), diferentemente do PSMA-DOTA- ^{68}Ga que apresentou captação renal mais baixa em 60 minutos ($\sim 5,0$ % AI/g) (EDER et al., 2012).

A marcação do PSMA-DOTA com ^{177}Lu aparentemente não alterou a característica do PSMA-DOTA, a qual também apresentou em 60 minutos captação renal significativamente menor ($5,04 \pm 1,60$ % AI/g) em relação aos resultados do PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga relatado na literatura (EDER et al., 2012). Os resultados da captação renal do PSMA-DOTA- ^{177}Lu estão apresentados isoladamente na FIG 40.

Figura 40 - Resultados da captação renal do PSMA-DOTA- ^{177}Lu em camundongos BALB/c machos entre 30 minutos e 24 horas após administração (%AI/g) (n=5).

O PSMA-DOTA- ^{177}Lu apresentou captação de $1,78 \pm 0,54$ % AI/g no baço após 30 minutos de administração do radiofármaco, sendo que esse resultado está

próximo dos encontrados por Eder e colaboradores para o PSMA-DOTA-⁶⁸Ga. Porém, a captação hepática do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu foi baixa ($0,07 \pm 0,03$ % AI/g) em relação aos resultados do PSMA-DOTA-⁶⁸Ga relatado na literatura (~ 5 % AI/g), podendo essa diferença ser atribuída a radiomarcagem com ¹⁷⁷Lu ou ao modelo animal utilizado nos ensaios já que a expressão de receptores PSMA nestes órgãos pode variar em relação à espécie animal.

A captação do radiofármaco em regiões saudáveis é prejudicial para aplicação clínica, entretanto, estudos têm demonstrado que a administração de bloqueadores como o PMPA (2-(fosfonometil)-ácido pentanodiólico) (2 mg de PMPA /Kg) reduz significativamente a captação do PSMA-DOTA em órgãos não alvos (EDER et al., 2012; KRATOCHWILL et al., 2015; SCHAFER et al, 2012).

A estabilidade de radiofármacos *in vivo* é crucial para obter eficiência na aplicação clínica. O tecido ósseo capta ativamente o lutécio livre presente na corrente sanguínea, portanto, a captação óssea é considerada um indicador da pureza radioquímica *in vivo*, sendo utilizada como um controle da estabilidade *in vivo* de radiofármacos radiomarcados com ¹⁷⁷Lu (AUDICIO et al., 2011).

A captação óssea do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu foi insignificante (FIG. 41) se comparada ao ¹⁷⁷LuCl₃, a qual segundo constatado em literatura, atinge níveis de 10% no fêmur, 24 horas após a administração (REPETTO-LLAMAZARES et al., 2013).

Figura 41 - Captação óssea (fêmur) do PSMA-DOTA- ^{177}Lu em camundongos BALB/c machos entre 30 minutos e 24 horas após administração (n=5).

Estes resultados estão alinhados com os resultados obtidos no estudo de estabilidade do PSMA-DOTA- ^{177}Lu *in vitro* em soro humano. Além disso, pareceu ter havido uma maior eliminação renal do PSMA-DOTA- ^{177}Lu íntegro quando comparado ao lutécio livre, visto que por meio da análise em CCD-SG da urina dos animais, a espécie PSMA-DOTA- ^{177}Lu é provavelmente a principal espécie encontrada eliminada na urina dos camundongos, já que a espécie radioquímica com R_f correspondente foi obtida em percentual superior a 95% no perfil cromatográfico (FIG. 42).

Esta baixa excreção renal do ^{177}Lu na forma iônica, corrobora com a baixa captação óssea encontrada nos estudos de biodistribuição em camundongos BALB/c machos. O tempo de 24 horas não foi representado na FIG.35, já que a urina dos camundongos não apresentou radioatividade mensurável.

Figura 42 – Porcentagem de espécie radioquímica correspondente ao Rf do PSMA-DOTA- ^{177}Lu em CCD-SG em amostras de urina dos camundongos coletadas entre 30 minutos e 4 horas (n=3).

7.8 Desenvolvimento do modelo tumoral e estudo de biodistribuição do PSMA-DOTA- ^{177}Lu em camundongos com tumor de células LNCaP

Para avaliar a ligação do PSMA-DOTA- ^{177}Lu às células de tumor de próstata *in vivo*, buscou-se desenvolver um modelo animal por meio da inoculação de células LNCaP em camundongos SCID, visto que camundongos *Nude* foram utilizados em uma tentativa de desenvolvimento tumoral, mas não houve sucesso (ALCARDE, 2016).

A hipótese do insucesso do crescimento tumoral em camundongo *Nude* foi atribuída à característica do animal que possui sistema imune deficiente pela diminuição de células T CD4+ e CD8+, entretanto sendo capaz de desenvolver uma resposta imune inata com células monocíticas/macrófagos e células natural *Killer*, permitindo que o mesmo desenvolvesse uma resposta imunológica contra as células tumorais, impedindo assim o crescimento tumoral (JAX, 2017).

O camundongo SCID apresenta um gene mutante autossômico, situado no cromossomo 16. Essa linhagem de camundongo é totalmente deficiente de linfócitos T e B e suas células esplênicas não respondem a estímulos de mitose para células B ou T, apresentando uma imunodeficiência severa. Por esta razão, provavelmente não rejeitam tumores xenográficos (JAX, 2017; MASSICANO, 2016).

Pujatti e colaboradores (2012) desenvolveram um modelo tumoral inoculando 5 milhões de células LNCaP em camundongos SCID e utilizados 15 a 21 dias após a inoculação, quando os tumores atingiram cerca de 5 mm de diâmetro. Diante disso, foram utilizados camundongos SCID no presente trabalho, obtendo crescimento tumoral após 30 dias de inoculação de 5 milhões de células LNCaP.

Entretanto, o rendimento do crescimento tumoral foi considerado baixo, visto que dos 15 animais utilizados no ensaio, somente 4 apresentaram crescimento tumoral, sendo que um deles veio a óbito durante o período de crescimento tumoral.

O baixo rendimento de crescimento tumoral constatado neste trabalho, ocorreu provavelmente devido as condições ambientais do biotério que fizeram com que os animais produzissem imunoglobulinas em baixos níveis e ocasionalmente alguns podem ter apresentado níveis quase normais de imunoglobulinas séricas, sendo esse fenômeno descrito na literatura como *leakness* (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Apesar do baixo rendimento de crescimento tumoral, foram obtidos com sucesso três animais com massa tumoral para o estudo de biodistribuição em modelo tumoral do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu. A massa tumoral foi retirada e encaminhada para análise histopatológica no Centro Veterinário de Anatomia Patológica (CVAP-SP), que indicou quadro morfológico compatível com Carcinoma.

A foto da dissecação da massa tumoral e do corte histológico estão representadas na FIG. 43 e FIG. 44, respectivamente, enquanto que o laudo anatomopatológico está anexo a este trabalho (ANEXO C).

Figura 43 – Dissecação da massa tumoral do estudo de biodistribuição do PSMA-DOTA- ^{177}Lu .

Figura 44 - Corte histológico do tumor LNCaP desenvolvido em camundongos SCID (CVAP – São Paulo, 2016).

De acordo com o laudo anatomopatológico, a análise microscópica do fragmento nodular revela duas nodulações circunscritas, bem delimitas e envolvidas por delicado estroma fibrovascular, constituídas de células neoplásicas de aspecto epitelióide, com formato poligonal, arranjadas de forma sólida trabecular. Além disso, é possível observar a presença de vasos sanguíneos entre as células tumorais que são responsáveis pela nutrição celular.

Em posse de um resultado positivo para carcinoma de origem prostática foram realizados os estudos de biodistribuição em animais com tumor. Os resultados do estudo de biodistribuição do PSMA-DOTA- ^{177}Lu em camundongos com tumor de células LNCaP podem ser visualizados na FIG 45 e TAB 9. Os dados estão expressos em porcentagem de atividade administrada por grama de tecido (%AI/g) ou mL de sangue (%AI/mL).

Figura 45 - Biodistribuição do PSMA-DOTA- ^{177}Lu com atividade específica de 74 MBq/ μg em camundongos SCID machos com tumor LNCaP. Os resultados estão em porcentagem de atividade por grama de tecido (%AI/g) ou mL de sangue (%AI/mL) após 4 horas de administração (n=3).

Tabela 9 - Biodistribuição do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu com atividade específica de 74 MBq/μg em camundongos SCID machos com tumor LNCaP. Os resultados estão em porcentagem de atividade por grama de tecido (%AI/g) ou mL de sangue (%AI/mL) após 4 horas de administração (n=3).

Órgãos e tumor	%AI/g de tecido ou mL de sangue
Sangue	0,03 ± 0,01
Coração	0,03 ± 0,01
Pulmões	0,06 ± 0,02
Pâncreas	0,03 ± 0,00
Baço	0,14 ± 0,03
Estômago	0,13 ± 0,06
Fígado	0,07 ± 0,01
Rins	4,32 ± 2,28
Intestinos	0,36 ± 0,07
Músculo	0,01 ± 0,00
Osso	0,02 ± 0,00
Tumor	2,76 ± 1,21
Cérebro	0,01 ± 0,00

Pode-se observar, pelos resultados obtidos, que o PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou apreciável captação tumoral de $2,76 \pm 1,21$ % AI/g após 4 horas da administração endovenosa do radiofármaco, sendo que esse resultado **foi semelhante** ao encontrado por Eder e colaboradores (2012) para o PSMA-DOTA-⁶⁸Ga (~ 3,0% AI/g). Porém, os estudos de biodistribuição do PSMA-DOTA-⁶⁸Ga foram realizados apenas para o tempo de 60 minutos em camundongos *Nude* com tumor LNCaP.

Os estudos de biodistribuição em camundongos SCID com tumor LNCaP confirmaram o rápido clareamento sanguíneo previamente descrito nos estudos realizados em camundongos BALB/c que receberam o mesmo radiofármaco por via endovenosa (FIG. 39 e TAB 6).

Entretanto, a captação renal do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos SCID com tumor LNCaP foi em média maior ($4,32 \pm 2,28$ % AI/g) do que a observada em

camundongos BALB/c ($0,84 \pm 0,01$ % Al/g) após 4 horas da administração. O aumento da captação renal no modelo tumoral pode ser devido ao estado patológico do animal e a linhagem animal utilizada no ensaio que podem ter influenciado na cinética do PSMA-DOTA- ^{177}Lu .

Além disso, a ligação do PSMA-DOTA- ^{177}Lu na massa tumoral pode ser que seja reversível, podendo acontecer um deslocamento do radiofármaco da massa tumoral para a circulação sanguínea, resultando assim em um aumento da captação renal após 4 horas de administração.

Os radiofármacos para aplicação em terapia provocam a morte das células tumorais por dano direto ou indireto, e para isso é importante uma retenção aceitável do radiofármaco nas células alvos para minimizar a exposição de células saudáveis (CHEN et al., 2008). Entretanto para o presente trabalho, os estudos em tempos mais tardios não foram realizados, devido ao baixo rendimento de crescimento tumoral nos camundongos.

As características favoráveis de biodistribuição e afinidade pelo tumor, apresentadas pelo PSMA-DOTA- ^{177}Lu , revelaram o potencial deste radiofármaco para aplicação em estudos clínicos em pacientes com câncer de próstata resistentes à castração e terapia convencional.

O radiofármaco PSMA-617 radiomarcado com ^{177}Lu vem sendo utilizado em estudos clínicos neste tipo de pacientes, especialmente na Alemanha (RAHBAR et al., 2017). Apesar dos resultados promissores obtidos nestes estudos clínicos, os mesmos são estudos retrospectivos, resultantes de coletâneas de casos de uso compassivo do radiofármaco, sendo que os primeiros estudos clínicos controlados prospectivos começam a ser realizados com este radiofármaco.

Estudos pré-clínicos comparativos com diferentes derivados PSMA-específicos não estão disponíveis na literatura. Os resultados dos estudos pré-clínicos realizados neste trabalho com o PSMA-DOTA- ^{177}Lu serão futuramente comparados com os resultados de estudos pré-clínicos a serem realizados com o PSMA-617 radiomarcado com ^{177}Lu e ^{68}Ga , de modo a elucidar eventual diferenças na farmacocinética, captação em órgão não alvo e especificidade pelo tecido tumoral.

8 CONCLUSÃO

Tendo em vista que a cada ano aumentam os números de novos casos de câncer de próstata no Brasil e no mundo, fica evidente o interesse pelo estudo de radiofármacos que representem uma nova alternativa terapêutica para Medicina Nuclear. Por este motivo, a principal contribuição deste trabalho foi avaliar o potencial de um radiofármaco que possa contribuir para o tratamento do câncer de próstata.

A partir dos resultados discutidos no estudo de desenvolvimento do método de controle de pureza radioquímica, o sistema cromatográfico em CLAE e CCD-SG foram estabelecidos com boa resolução e separação do $^{177}\text{LuCl}_3$ e PSMA-DOTA- ^{177}Lu , concluindo ser viável sua aplicação na produção do radiofármaco PSMA-DOTA- ^{177}Lu .

Os estudos desenvolvidos neste trabalho possibilitaram a obtenção do radiofármaco PSMA-DOTA- ^{177}Lu com alta pureza radioquímica, em marcações não automatizadas, mantendo-se acima de 95% de pureza radioquímica, porcentagem estabelecida como critério de aceitação neste trabalho.

O peptídeo marcado suportou uma atividade específica compatível com a que está sendo utilizada em ensaios clínicos (74 MBq/ μg) de outros ligantes de PSMA radiomarcados com ^{177}Lu , demonstrando alta pureza radioquímica (> 95 %) sem necessidade de purificação e/ou adição de agentes estabilizantes, se mantendo estável mediante armazenamento à temperatura $\leq -20^\circ\text{C}$ por até 48 horas, permitindo identificar uma condição que pudesse ser utilizada no transporte do produto para diferentes localidades do país.

Os estudos de estabilidade em soro humano demonstram alta estabilidade do radiofármaco PSMA-DOTA- ^{177}Lu , apresentando excelente pureza radioquímica por um período de até 24 horas, que foi confirmada pela baixa captação óssea demonstrada nos estudos *in vivo* de biodistribuição.

O PSMA-DOTA- ^{177}Lu foi capaz de se ligar *in vitro* às células tumorais derivadas de carcinoma prostático humano androgênio dependente (LNCaP) com

baixa fração de internalização, além de apresentar apreciável captação tumoral *in vivo* após 4 horas de administração do radiofármaco.

Os estudos *in vivo* demonstraram rápido clareamento sanguíneo e rápida excreção renal do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu, fundamental para evitar o metabolismo do radiofármaco pelas enzimas do soro *in vivo* e reduzir a captação em órgãos não alvos.

Por fim, mediante a realização de estudos toxicológicos para que seja confirmada sua segurança, os resultados favoráveis deste trabalho encorajam a perspectiva de realização de ensaio clínico controlado de um novo radiofármaco, avaliando seu potencial para aplicação clínica no tratamento do câncer de próstata.

ANEXO A

Comitê de Ética no Uso de Animais

Certificamos que o projeto intitulado “ESTUDO DA RADIOMARCAÇÃO DO INIBIDOR DE PSMA BASEADO EM UREIA COM ^{177}Lu E AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DO POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NO TRATAMENTO DE CÂNCER DE PRÓSTATA” protocolo nº 155/15 sob a responsabilidade de ELAINE BORTOLETI DE ARAUJO – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUAIPEN) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN – CNEN/SP), em reunião de 01/07/2015.

Vigência do Projeto	Agosto/2015 a julho/2017
Espécie/linhagem	Camundongo/BALB/c e BALB/c Nude
Nº de animais	160 animais: 90 BALB/c e 70 BALB/c Nude
Peso/Idade	Peso: 13 a 30 g e Idade: 7 a 12 semanas
Sexo	Machos
Origem	Biotério do IPEN – CNEN/SP

São Paulo, 07 de julho de 2015.

Prof. Dra. Nanci do Nascimento
Coordenadora da CEUA-IPEN

ANEXO B

Barretos, 26 de Setembro de 2016

Resultado de teste: DETECÇÃO PRESENÇA DE MICOPLASMA

Informações sobre o teste:	Teste para detecção de micoplasma
Tipo de teste:	Luminescência
Marca:	Lonza
Nome do teste:	MycoAlert™ PLUS Mycoplasma

Informações sobre a amostra:	Sobrenadante de linhagem celular
Nome da Linhagem celular:	LNCap
Depositário:	Dr. Rui Manuel Reis

Razão de referência:	$\leq 1,2$ = negativo para micoplasma
Controle positivo da reação	38,11
Controle negativo da reação	0,21
Razão da amostra:	1,06
Teste realizado por:	André van Helvoort Lengert

Interpretação: Negativo para contaminação com micoplasma

Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Diretor Científico do Departamento de Ensino e Pesquisa do HCB

www.hospitalcancerbarretos.org.br
 FONE/FAX - (11) 3221-6600
 END: RUA ANTÔNIO DUARTE VIELLA, 1331
 CEP - 14784-400 BARRETOS - SÃO PAULO - SP
 CNPJ - 48.156.362/0002-01
 INSC. EST. 1882103

ANEXO C

Carolina G. Pires
CRMV - SP 18.634

IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL							
Número	H-010895						
Nome	Scid	Espécie	Rodador	Raça	Camundongo	Sexo	Idade
Proprietário(s)	Jefferson Silva						
Veterinário(s)	Jefferson Silva	Clinica	Jefferson Silva				
Material	Fragmento Cervical e Cadeia Mamária						

LAUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO.

Avaliação Macroscópica

Encaminhado fragmento nodular de superfície irregular, coloração amarelada a acastanhada, medindo 0,9 x 0,3 x 0,3 cm. Ao corte revela superfície lobulada, coloração branco acastanhada, consistência macia, e aspecto heterogêneo.

Técnica Histológica

Hematoxilina & Eosina

Avaliação Microscópica

A análise microscópica do fragmento nodular revela duas nodulações circunscritas, bem delimitas e envolvidas por delicado estroma fibrovascular, constituídas de células neoplásicas de aspecto epitelióide, com formato poligonal, arranjadas de forma sólida trabecular. Possui moderado pleomorfismo, com discretas anisocitose e discreta a moderada anisocariose. O citoplasma é amplo eosinofílico com tendência ao anfófilo, granular e com limites parcialmente definidos. Os núcleos são arredondados, basofílicos, com cromatina finamente granular e possuem um a dois nucléolos evidentes. Figuras de mitose são encontradas em número variando de 1- 7 por campo de 400x, por vezes apresentando atípicas. Associa-se ao conjunto hemorragia discreta multifocal, e focos de necrose.

Diagnóstico:

Fragmento nodular: quadro morfológico compatível com Carcinoma. *

*OBS:

Carcinoma de origem prostática informada pelo requisitante.

Conferido e assinado eletronicamente por: Carolina G. Pires CRMV - SP 18.634

São Paulo, quarta-feira, 1 de março de 2017

REFERÊNCIAS 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.

AFSHAR-OROMIEH, A.; MALCHER, A.; EDER, M.; EISENHUT, M.; LINHART, H. G.; HADASCHIK, B. A.; HOLLAND-LETZ, T.; GIESEL, F. L.; KRATOCHWIL, C.; HAUFE, S.; HABERKORN, U.; ZECHMANN, C. M. PET imaging with a [68Ga]gallium-labelled PSMA ligand for the diagnosis of prostate cancer: biodistribution in humans and first evaluation of tumour lesions. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 40, p. 486-495, 2013.

AFSHAR-OROMIEH, A.; HETZHEIM, H.; KRATOCHWIL, C.; BENESOVA, M.; EDER, M.; NEELS, O.C.; EISENHUT, M.; KÜBLER, W.; HOLLAND-LETZ, T.; GIESEL, F.L.; MIER, W.; KOPKA, K.; HABERKORN, U. The theranostic PSMA ligand PSMA-617 in the diagnosis of prostate cancer by PET/ CT: biodistribution in humans, radiation dosimetry, and first evaluation of tumor lesions. **J Nucl Med**, 56:1697–705, 2015.

AHMADZADEHFAR, H.; RAHBAR, K.; KUERPIG, S.; FIMMERS, R.; YORDANOVA, A.; SCHLENKHOF, C.D. Early side effects and first results of radioligand therapy with ¹⁷⁷Lu-DKFZ-617 PSMA of castrate-resistant metastatic prostate cancer: a two Centre study. **Eur J Nucl Med Med Imaging**, 5:114, 2015.

ALCARDE, L. F. **Estudo de radiomarcção com gálio-68 de inibidor de PSMA baseado em ureia – Avaliação comparative de método automatizado e não automatizado**. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2016.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Key statistics for prostate cancer. <http://www.cancer.org/cancer/prostatecancer/detailedguide/prostate-cancer-key-statistics>. [Accessed on 30.08.2017].

ANDRADE, A.; PINTO, S.C.; OLIVEIRA, R.S. Animais de Laboratório: criação e experimentação. **Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ**. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6, 2002.

AUDICIO, P. F.; CASTELLANO, G.; TASSANO, M. R.; REZZANO, M. E.; FERNANDEZ, M.; RIVA, E.; ROBLES, A.; CABRAL, P.; BALTER, H.; OLIVER, P. [177Lu]DOTA-anti-CD20: labeling and pre-clinical studies. **Appl Radiat Isot.**, v. 69, n. 7, p. 924-928, 2011.

BANERJEE, S. R.; PULLAMBHATLA, M.; BYUN, Y.; NIMMAGADDA, S.; GREEN, G.; FOX, J. J.; HORTI, A.; MEASE, R. C.; POMPER, M. G. 68Ga-labeled inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA) for imaging prostate cancer. **J Med Chem.**, v. 53, n. 14, p. 5333-5341, 2010.

BANERJEE, S. R.; FOSS, C.A.; CASTANARES, M.; MEASE, R. C.; BYUN, Y.; FOX, J. J.; HILTON, J.; LUPOLD, S. E.; KOZIKOWSKI, A. P.; POMPER, M. G. Synthesis and evaluation of technetium-99m- and rhenium-labeled inhibitors of the prostate-specific membrane antigen (PSMA). **J Med Chem**, V. 51, P. 4504-4517, 2008.

BARINKA, C.; HLOUCHOVA, K.; ROVENSKA, M.; MAJER, P.; DAUTER, M.; HIN, N. Structural basis of interactions between human glutamate carboxypeptidase II and its substrate analogs. **J Mol Biol**, 376:1438–50, 2008.

BAUM, R. P.; KLUGE, A. W.; KULKARNI, H.; SCHORR-NEUFING, U.; NIEPSCH, K.; BITTERLICH, N.; VAN ECHTELD, C. J. A. [177LU-DOTA]0-D-PHE1-TYR3-OCTREOTIDE (177LU-DOTATOC) for peptide receptor radiotherapy in patients with advanced neuroendocrine tumours: a phase-ii study. **Theranostics**, 6(4), 501–510, 2016a.

BAUM, R.P.; KULKARNI, H.R.; SCHUCHARDT, C.; SINGH, A.; WIRTZ, M.; WIESSALLA, S. Lutetium-177 PSMA radioligand therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer: safety and efficacy. **J Nucl Med**, [Epub ahead of print] 2016b.

BENESOVÁ, M.; SCHÄFER, M.; BAUDER-WÜST, U.; AFSHAR-OROMIEH, A.; KRATOCHWIL, C.; MIER, W.; HABERKORN, U.; KOPKA, K.; EDER, M. Preclinical evaluation of a tailor-made dota-conjugated psma inhibitor with optimized linker

moiety for imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. **J Nucl Med**, 56(6):914–920, 2015.

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

BUDÄUS, L.; LEYH-BANNURAH, S. R.; SALOMON, G.; MICHL, U.; HEINZER, H.; HULAND, H.; GRAEFEN, M.; STEUBER, T.; ROSENBAUM C. Initial Experience of ^{68}Ga -PSMA PET/CT Imaging in High-risk Prostate Cancer Patients Prior to Radical Prostatectomy. **Eur Urol.**, v. 69, p. 393-396, 2015.

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

CHAKRAVARTY, R.; CHAKRABORTY, S.; DASH, A.; PILLAI, M. R. A. Detailed evaluation on the effect of metal ion impurities on complexation of generator eluted ^{68}Ga with different bifunctional chelators. **Nucl Med Biol.**, v. 40, p. 197–205, 2012.

CHANG, S. S.; O'KEEFE, D. S.; BACICH, D. J.; REUTER, V. E.; HESTON, W. D. W.; GAUDIN, P. B. Prostate-specific membrane antigen is produced in tumor-associated neovasculature. **Clin Cancer Res.**, v. 5, p. 2674-2681, 1999.

DAS, T.; GULERIA, M.; PARAB, A.; KALE, C.; SHAH, H.; SARMA, H.D.; LELE, V.R.; BANERJEE, S. Clinical translation of ^{177}Lu -labeled PSMA-617: initial experience in prostate cancer patients. **Nucl Med Biol**, 43:296–302, 2016.

DELKER, A.; FENDLER, W.P.; KRATOCHWIL, C.; BRUNEGRAF, A.; GOSEWISCH, A.; GILDEHAUS, F.J. Dosimetry for (^{177}Lu) -DKFZ-PSMA-617: a new radiopharmaceutical for the treatment of metastatic prostate cancer. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, 43:42–51, 2016.

DEMIRCI, E.; OCAK, M.; KABASAKAL, L.; DECRISTOFORO, C.; TALAT, Z.; HALAÇ, M.; KANMAZ, B. ^{68}Ga -PSMA PET/CT imaging of metastatic clear cell renal

cell carcinoma. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, Volume 41, Issue 7, pp 1461-1462, 2014.

DIAS, C.R.B.R. **Estudo comparativo da marcação do anticorpo anti-cd20 com ¹⁸⁸Re**. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2010.

EDER, M.; SCHÄFER, M.; BAUDER-WÜST, U.; HULL, W.; WÄNGLER, C.; MIER, W.; HABERKORN, U.; EISENHUT, M. ⁶⁸Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. **Bioconjugate Chem.**, v. 23, p. 688-697, 2012.

EDER, M.; NEELS, O.; MÜLLER, M.; WÜST, U. B.; REMDE, Y.; SCHÄFER, M.; HENNRICH, U.; EISENHUT, M.; AFSHAR-OROMIEH, M.; HABERKORN, U.; KOPKA, K. Novel preclinical and Radiopharmaceutical Aspects of [⁶⁸Ga]Ga-PSMA-HBED-CC: A New PET Tracer for Imaging of Prostate Cancer. **Pharmaceuticals**, v.7, p. 779-796, 2014.

ENGEL, J.B.; SCHALLY, A.V.; DIETL, J.; RIEGER, L.; HÖNIG, A. Targeted therapy of breast and gynecological cancer with cytotoxic analogues of peptide hormones. **Mol Pharm**, v. 4, n. 5, p. 652-658, 2007.

ETZIONI, R.; PENSON, D.F.; LEGLER, J.M.; DI TOMMASO, D.; BOER, R.; GANN, P.H. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. **J Natl Cancer Inst**, 94:981–90, 2002.

FARKAS, R.; SIWOWSKA, K.; AMETAMEY, S.M. ⁶⁴Cu- and ⁶⁸Ga-based PET imaging of folate receptor-positive tumors: Development and evaluation of an albumin-binding NODAGA-folate. **Mol Pharm**, 13:1979, 2016.

GARAYOA, E.G.; MAES, C. S. V.; RÜEGG, D.; BLANC, A.; BLÄUENSTEIN, P.; TOURWÉ, D.A.; BECK-SICKINGER A.G.; SCHUBIGER P.A. New [^{99m}Tc]bombesin analogues with improved biodistribution for targeting gastrin releasing-peptide receptor positive tumors. **Q J Nucl Med Mol Imaging**, v. 51, p. 42-50, 2007.

GHOSH, A.; HESTON, W.D.W. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. **J Cel Biochem**, v. 91, p. 528–539, 2004.

GRUBMÜLLER, B.; BAUM, R.P.; CAPASSO, E.; SINGH, A.; AHMADI, Y.; KNOLL, P.; FLOTH, A.; RIGHI, S.; ZANDIEH, S.; MELEDDU, C.; SHARIAT, S.F.; KLINGLER, H.C.; MIRZAEI, S. 64Cu-PSMA-617 PET/CT Imaging of Prostate Adenocarcinoma: First In-Human Studies. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals**. Vol. 31, No. 8: 277-286, 2016.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estud. av.**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

HERLEMANN, A.; WENTER, V.; KRETSCHMER, A.; THIERFELDER, K. M.; BARTENSTEIN, P.; FABER, C.; GILDEHAUS, F. J.; STIEF, C. G.; GRATZKE, C.; FENDLER, W. P. (68)Ga-PSMA Positron Emission Tomography/ Computed Tomography Provides Accurate Staging of Lymph Node Regions Prior to Lymph Node Dissection in Patients with Prostate Cancer. **Eur Urol.**, v. 16, p. S0302-2838, 2016.

HIJAZI, S.; MELLER, B.; LEITSMANN, C.; STRAUSS, A.; MELLER, J.; RITTER, C.O.; LOTZ, J.; SCHILDHAUS, H.U.; TROJAN, L.; SAHLMANN, C.O. Pelvic lymph node dissection for nodal oligometastatic prostate câncer detected by 68Ga-PSMA-positron emission tomography/computerized tomography. **Prostate**. doi:10.1002/pros.23091, 2015.

HILLIER, S. M.; MARESCA, K. P.; FEMIA, F. J.; MARQUIS, J. C.; FOSS, C. A.; NGUYEN, N.; ZIMMERMAN, C. N.; BARRETT, J. A.; ECKELMAN, W. C.; POMPER, M. G.; JOYAL, J. L.; BABICH, J. W. Preclinical evaluation of novel glutamate-urea-lysine analogues that target prostate-specific membrane antigen as molecular imaging pharmaceuticals for prostate cancer. **Cancer Res**, v. 69, n. 17, p. 6932-6940, 2009.

HOHBERG, M.; ESCHNER, W.; SCHMIDT, M.; DIETLEIN, M.; KOBE, C.; FISCHER, T. Lacrimal glands may represent organs at risk for radionuclide therapy of prostate cancer with [(177)Lu]DKFZ-PSMA-617. **Mol Imaging Biol**, 18:437–45, 2016.

HOROSZEWICZ, J.S.; LEONG, S.S.; KAWINSKI, E.; KARR, J.P.; ROSENTHAL, H.; CHU, T.M. LNCaP model of human prostatic carcinoma. **Cancer Res**, 43:1809–18, 1983.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. **Incidência de câncer no Brasil – estimativa 2016**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2016>, acessado em 13/12/16.

JAX. **The Jackson Laboratory – Mice & Services**. Disponível em: <https://www.jax.org/mouse-search>. Acesso em: 10 jun. 2017.

JIMÉNEZ, Y. V. **Dosimetria interna aplicada a farmacos marcados con 177Lu**. Dissertação (Mestrado). Instituto Balseiro, Cuyo, 2007.

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

KABASAKAL, L.; ABUQBEITA, H.M.; AYGÜN, A.; YEYIN, N.; OCAK, M.; DEMIRCI, E. Pre-therapeutic dosimetry of normal organs and tissues of (177)Lu-PSMA-617 prostate-specific membrane antigen (PSMA) inhibitor in patients with castration-resistant prostate cancer. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, 42:1976–83, 2015.

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

KHAN, A.; CARIDE, V.J. Indium-111 capromab pendetide (ProstaScint) uptake in neurofibromatosis. **Urology**, 56:154, 2000.

KNIGHT, L.C. Radiolabeled peptides for tumor imaging. In: WELCH, M.J.; REDVANLY, C.S. Handbook of Radiopharmaceuticals: radiochemistry and applications. **Chichester: Wiley**, Cap. 23., 2003.

KOZIKOWSKI, A.P.; NAN, F.; CONTI, P.; ZHANG, J.; RAMADAN, E.; BZDEGA, T. Design of remarkably simple, yet potent urea-based inhibitors of glutamate carboxypeptidase II (NAALADase). **J Med Chem**, 44:298–301, 2001.

KOZIKOWSKI, A.P.; ZHANG, J.; NAN, F. Synthesis of urea-based inhibitors as active site probes of glutamate carboxypeptidase II: efficacy as analgesic agents. **J Med Chem**, 47:729–1738, 2004.

KRATOCHWIL, C.; GIESEL, F.; LEOTTA, K.; EDER, M.; HOPPE-TICHY, T.; YOUSSEF, H.; KOPKA, K.; BABICH, J. W.; HABERKORN, U. PMPA for nephroprotection in PSMA-targeted radionuclide therapy of prostate cancer. **J Nucl Med**, v. 56, p. 293-298, 2015.

KRATOCHWIL, C.; GIESEL, F.L.; STEFANOVA, M.; BENEŠOVÁ, M.; BRONZEL, M.; AFSHAR-OROMIEH, A. PSMA-targeted radionuclide therapy of metastatic castration-resistant prostate cancer with Lu-177 labeled PSMA-617. **J Nucl Med**, [pii: numed.115.171397. [Epub ahead of print] PubMed PMID], 2016a.

KRATOCHWIL, C.; BRUCHERTSEIFER, F.; RATHKE, H.; BRONZEL, M.; APOSTOLIDIS, C.; WEICHERT, W.; HABERKORN, U.; GIESEL, F.L.; MORGENSTERN, A. Targeted Alpha Therapy of mCRPC with ²²⁵Actinium-PSMA-617: Dosimetry estimate and empirical dose finding. **J Nucl Med**, 117.191395, 2017.

KRATOCHWIL, C.; BRUCHERTSEIFER, F.; GIESEL, F.L.; WEIS, M.; VERBURG, F.A.; MOTTAGHY, F.; KOPKA, K.; APOSTOLIDIS, C.; HABERKORN, U.; MORGENSTERN, A. ²²⁵Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted α-Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. **J Nucl Med**, 57(12):1941-1944, 2016b.

KWEKKEBOOM, D.J.; TEUNISSEN, J.J.; BAKKER, W. H.; KOOLIJ, P. P. Radiolabeled somatostatin analog [177Lu-dota 0,tyr3]octreotate in patients with endocrine gastroenteropancreatic tumors. **J. Clin. Oncol**, 23:2754–2762, 2005.

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.

LOYD, V.; ALLEN, J. **Introdução à farmácia de Remington**. Porto Alegre, RS: Artmed Ltda, cap. 5, 2016.

MÄCKE, H.R.; GOOD, S. Radiometals (non-Tc, non-Re) and bifunctional labeling chemistry. In: VÉRTES, A.; NAGY, S.; ZOLTÁN, K. *Handbook of Nuclear Chemistry. Netherlands: Kluwer Academic Publishers*, v. 4. p. 279-314, 2003.

MAGGI, M.; FILIPPI, S.; LEDDA, F.; MAGINI, A.; FORTI, G. Erectile dysfunction: from biochemical pharmacology to advances in medical therapy. **Eur J Endocrinol**, 143:143–54, 2000.

MARESCA, K. P.; HILLIER, S. M.; FEMIA, F. J.; KEITH, D.; BARONE, C.; JOYAL, J. L.; ZIMMERMAN, C. N.; KOZIKOWSKI, A. P.; BARRETT, J. A.; ECKELMAN, W. C.; BABICH, J. W. A series of halogenated heterodimeric inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA) as radiolabeled probes for targeting prostate cancer. **J Med Chem**, v. 52, p. 347-357, 2009.

MASSICANO, A. V. F. **Desenvolvimento farmacotécnico de um radioimunoconjugado para terapia de linfoma não-hodgkin**. Tese - (Doutorado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, USP, São Paulo, 2016.

MCGUIRE, J.J. Anticancer antifolates: current status and future directions. **Curr Pharm Des**, 9:2593–613, 2003.

MEASE, R. C.; DUSICH, C. L.; FOSS, C. A.; RAVERT, H.T.; DANNALS, R. F.; SIEDEL, J.; PRIDEAUX, A.; FOX, J. J.; SGOUROS, G.; KOZIKOWSKI, A. P.; POMPER, M. G. N-[N-[(S)-1,3-Dicarboxypropyl] Carbamoyl]-4-[18F]Fluorobenzyl-LCysteine, [18F]DCFBC: A new imaging probe for prostate cancer. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 10, p. 3060-3043, 2008.

MHAWECH-FAUCEGLIA, P.; SMIRAGLIA, D.J.; HASHARA, W.; ANDREWS, C.; SCHWALLER, J.; SOUTH, S. Prostate-specific membrane antigen expression is a potential prognostic marker in endometrial adenocarcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Rev**, 17:571–7, 2008.

MIKOLAJCZAK, R.; PARUS, J.L.; PAWLAK D.; ZAKRZEWSKA, E.; MICHALAK, W.; SASINOWSKA, I. Reactor produced ^{177}Lu of specific activity and purity suitable for medical applications. **J Radioanal Nucl Chem**, v. 257, n°.1, p. 53-57, 2003.

MILOWSKY, M.I.; NANUS, D.M.; KOSTAKOGLU, L.; SHEEHAN, C.E.; VALLABHAJOSULA, S.; GOLDSMITH, S.J. Vascular targeted therapy with anti-prostate-specific membrane antibody J591 in advanced solid tumors. **J Clin Oncol**, 25:540–7, 2007.

MORIGI, J. J.; STRICKER, P. D.; VAN-LEEUEWEN, P. J.; TANG, R.; HO, B.; NGUYEN, Q.; HRUBY, G.; FOGARTY, G.; JAGAVKAR, R.; KNEEBONE, A.; HICKEY, A.; FANTI, S.; TARLINTON, L.; EMMETT, L. Prospective Comparison of ^{18}F -Fluoromethylcholine Versus ^{68}Ga -PSMA PET/CT in Prostate Cancer Patients Who Have Rising PSA After Curative Treatment and Are Being Considered for Targeted Therapy. **J Nucl Med**., v. 6, p. 1185-1190, 2015.

NANNI, C.; SCHIAVINA, R.; BRUNOCILLA, E.; BOSCHI, S.; BORGHESI, M.; ZANONI, L. ^{18}F -Fluciclovine PET/CT for the detection of prostate cancer relapse: a comparison to ^{11}C -choline PET/ CT. **Nucl Med**, 40:386–91, 2015.

NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). **Prostate Cancer**. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/prostate>, acessado em 13/03/2017.

NEALE, J.H.; BZDEGA, T. N-Acetylaspartylglutamate: the most abundant peptide neurotransmitter in themammalian central nervous system. **J Neurochem**, 75:443–52, 2000.

OLIVEIRA, R; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P.; VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, 2006.

OLSZEWSKI, R.T.; BUKHARI, N.; ZHOU, J.; KOZIKOWSKI, A.P.; WROBLEWSKI, J.T.; SHAMIMI-NOORI, S. NAAG peptidase inhibition reduces locomotor activity and some stereotypes in the PCP model of schizophrenia via group II mGluR. **J Neurochem**, 89:876–85, 2004.

OSBORN, J.R.; AKHTAR, N.H.; VALLABHAJOSULA, S.; ANAND, A.; DEH, K.; TAGAWA, S.T. Prostate specific membrane-based imaging. **Urol Oncol**, 31:144–54, 2013.

PILLAI, M. R. A.; CHAKRABORTY, S.; DAS, T.; VENKATESH, M.; Ramamoorthy, N.; Production logistics of ^{177}Lu for radionuclide therapy. **Applied Radiation and isotopes**. V. 59, p. 109-118, 2003.

PILLAI, M.R.; NANABALA, R.; JOY, A.; SASIKUMAR, A.; RUSS, KNAPP, F.F. Radiolabeled enzyme inhibitors and binding agents targeting PSMA: Effective theranostic tools for imaging and therapy of prostate cancer. **Nuclear Medicine and Biology**, 43:692–720, 2016.

PINTO, J.T.; SUFFOLETTO, B.P.; BERZIN, T.M.; QIAO, C.H.; LIN, S.; TONG, W.P. Prostate-specific membrane antigen: a novel folate hydrolase in human prostatic carcinoma cells. **Clin Cancer Res**, 2:1445–51, 1996.

POMPER, M.G.; MUSACHIO, J.L.; ZHANG, J.; SCHEFFEL, U.; ZHOU, Y.; HILTON, J. ^{11}C -MCG: synthesis, uptake selectivity, and primate PET of a probe for glutamate carboxypeptidase II (NAALADase). **Mol Imaging**, 2:96–101, 2002.

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

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

RADIOFÁRMACOS. Disponível em <<http://www.cnen.gov.br/noticias/>>. Acesso em: 10 nov. 2016.

RAHBAR, K.; AHMADZADEHFAR, H.; KRATOCHWIL, C.; HABERKORN, U.; SCHÄFERS, M.; ESSLER, M.; BAUM, R.P.; KULKARNI, H.R.; SCHMIDT, M.; DRZEZGA, A.; BARTENSTEIN, P.; PFESTROFF, A.; LUSTER, M.; LÜTZEN, U.; MARX, M.; PRASAD, V.; BRENNER, W.; HEINZEL, A.; MOTTAGHY, F.M.; RUF, J.;

MEYER, P.T.; HEUSCHKEL, M.; EVESLAGE, M.; BÖGEMANN, M.; FENDLER, W.; KRAUSE, B. German Multicenter Study Investigating ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. **J Nucl Med.** 58(1):85-90, 2017.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2007.

REPETTO-LLAMAZARES, A. H.; LARSEN, R. H.; MOLLATT, C.; LASSMANN, M.; DAHLE, J. Biodistribution and dosimetry of (¹⁷⁷)Lu-tetulumab, a new radioimmunoconjugate for treatment of non-Hodgkin lymphoma. **Curr Radiopharm.**, v. 6, n. 1, p. 20-27, 2013.

ROBBINS, S.L. **Bases Patlogicas das Doenças** 8. Ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2010.

ROBERTS, J.A; TACCONE, F.S.; LIPMAN, J. Understanding PK/PD. **Intensive Care Med.**, v. 41, n.1, p.1-4, 2015.

SAPIENZA, M. T.; MARONE, M. M. S.; CHIATTONE, C. S. Contribuições da medicina nuclear para a avaliação dos linfomas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. v. 23, n. 2, p. 79-92, 2001.

SCHÄFER, M.; BAUDER-WÜST, U.; LEOTTA, K.; ZOLLER, F.; MIER, W.; HABERKORN, U.; EISENHUT, M.; EDER, M. A dimerized urea-based inhibitor of the prostate-specific membrane antigen for ⁶⁸Ga-PET imaging of prostate cancer. **EJNMMI Research**, v. 2, p. 23-34, 2012.

SCHLENKHOFF, C.D.; KNÜPFER, E.; ESSLER, M.; AHMADZADEHFAR, H. Metastatic prostate cancer with restored hormone-response after radioligand therapy with ¹⁷⁷Lu-PSMA-617. **Clin Nucl Med**, 41:572–3, 2016b.

SCHLENKHOFF, C.D.; GAERTNER, F.; ESSLER, M.; SCHMIDT, M.; AHMADZADEHFAR, H. Positive influence of ¹⁷⁷Lu PSMA-617 therapy on bone marrow depression caused by metastatic prostate cancer. **Clin Nucl Med**, 41:478–80, 2016a.

SCUTTI, J. A. B., MATSUO, A. L., PEREIRA, F. V., MASSAOKA, M. H., FIGUEIREDO, C. R., MOREIRA, D. F. Role of SOCS-1 Gene on Melanoma Cell Growth and Tumor Development. ***Translational Oncology***, v. 4, n. 2, p. 101-109, 2011.

SHARP, P. F.; GEMMEL, H. G.; MURRAY, A. D. **Practical nuclear medicine**. 3ed. Londres, UK: Springer, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA NUCLEAR (SBMN). **Medicina Nuclear**. Disponível em: <http://www.sbm.org.br/site/medicina_nuclear>. Acesso em: 10 nov. 2016.

SODEE, D.B.; MALGURIA, N.; FAULHABER, P.; RESNICKM, I.; ALBERT, J.; BAKALE, G. Multi-center ProstaScint® imaging findings in 2154 patients with prostate cancer. **The ProstaScint imaging centers. Urology**, 56:988–93, 2000.

SOUZA F. C. Generation and characterization of isogenic cell lines harboring p53 mutants: A model for the evaluation of p53 and p16 INK4A replacement in the presence of p53R175H and p53R248Q. **Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo**. 2011.

SRINIVAS, P.R.; KRAMER, B.S.; SRIVASTAVA, S. Trends in biomarker research for cancer detection. **Lancet Oncol**, 2:698–704, 2001.

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 invasiveness of PC-3 human prostate cancer in Nude mice. **Clin Cancer Res**, v. 11, p. 49-57, 2005.

STERZING, F.; KRATOCHWIL, C.; FIEDLER, H.; KATAYAMA, S.; HABL, G.; KOPKA, K.; AFSHAR-OROMIEH, A.; DEBUS, J.; HABERKORN, U.; GIESEL, F. L. (68)Ga-PSMA-11 PET/CT: a new technique with high potential for the radiotherapeutic management of prostate cancer patients. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**. 43:34–41, 2016.

STEVENS, A. LOWE I. **Patologia**. São Paulo: Editora Manole Ltda. 2002.

STORPIRTIS, S.; GAI, M. N.; CAMPOS, D. R.; GONÇALVES, J. E. **Farmacocinética Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2011.

TANEJA, S.S. ProstaScint® scan: contemporary use in clinical practice. **Rev Urol**, 6(Suppl. 10):S19–28, 2004.

TANG, H.; BROWN, M.; YE, Y.; HUANG, G.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHAI, H.; CHEN, X.; SHEN, T.Y.; TENNISWOOD, M. Prostate targeting ligands based on N-acetylated α -linked acidic dipeptidase. **Biochem & Biophy Res Commun**, v. 307, p. 8-14, 2003.

THOMAS, R.; CHEN, J.; ROUDIER, M.M.; VESSELLA, R.L.; LANTRY, L.E.; NUNN, A.D. In vitro binding evaluation of ¹⁷⁷Lu-AMBA, a novel ¹⁷⁷Lu-labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy in human tissues. **Clin Exp Metastasis**, DOI 10.1007/s10585-008-9220-0, 2009.

TROYER, J.K.; BECKETT, M.L.; WRIGHT JR, G.L. Location of prostate-specific membrane antigen in the LNCaP prostate carcinoma cell line. **The Prostate**, v. 30, p. 232-242, 1997.

VAN ESSEN, M.; KRENNING, E.P.; DE JONG, M.; VALKEMA, R.; KWEKKEBOOM, D.J. Peptide receptor radionuclide therapy with radiolabelled somatostatin analogues in patients with somatostatin receptor positive tumours. **Acta Oncol**. 46:723–734, 2007.

WEINEISEN, M.; SCHOTTELIUSM, SIMECEK, J.; BAUM, R.P.; YILDIZ, A.; BEYKAN, S. ⁶⁸Ga- and ¹⁷⁷Lu-labeled PSMA I&T: optimization of a PSMA-targeted theranostic concept and first proof-of-concept human studies. **J Nucl Med**, 56:1169–76, 2015.

YAO, D.; TRABULSI, E.J.; KOSTAKOGLU, L.; VALLABHAJOSULA, S.; JOYCE, M.A.; NANUS, D.M. The utility of monoclonal antibodies in the imaging of prostate cancer. **Semin Urol Oncol**, 20:211–8, 2002.

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

ZECHMANN, C.M.; AFSHAR-OROMIEH, A.; ARMOR, T.; STUBBS, J.B.; MIER, W.; HADASCHIK, B. Radiation dosimetry and first therapy results with a ¹²⁴I/ ¹³¹I-labeled small molecule (MIP-1095) targeting PSMA for prostate cancer therapy. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, 41:1280–92, 2014.

ZHOU, J.; NEALE, J.H.; POMPER, M.G.; KOZIKOWSKI, A.P. NAAG peptidase inhibitors and their potential potency for diagnosis and therapy. **Nat Rev Drug Discov**, 4:1015–26, 2005.