AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Estudo de análogo da substância P para desenvolvimento de radiofármaco com aplicação na terapia de tumores cerebrais.

Guilherme Luiz de Castro Carvalho

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

Orientadora:

Profa. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

São Paulo

2015

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

**Estudo de análogo da substância P para desenvolvimento de radiofármaco com
aplicação na terapia de tumores cerebrais.**

Guilherme Luiz de Castro Carvalho

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

Orientadora:

Profa. Dra. Elaine Bortoleti de Araújo

Versão Corrigida
Versão Original disponível no IPEN

São Paulo
2015

**Dedico esse trabalho aos meus pais José Luiz e Regina,
à minha amada esposa Clarissa
e ao meu filho Rafael.**

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisa Energética e Nuclear, IPEN-CNEN/SP, por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao M.Sc. Jair Mengatti pelo apoio e provimento dos recursos necessários para realização deste trabalho sempre que necessário.

A Dra. Elaine Bortoleti de Araújo, gerente da Garantia de Qualidade do Centro de Radiofarmácia e minha orientadora, pela oportunidade concedida, dedicação e confiança, tornando a realização desse trabalho prazerosa e gratificante.

A Dra. Miriam Fussae Suzuki, do Centro de Biotecnologia, pela disponibilidade, dedicação e colaboração, principalmente no cultivo das células.

A Dra. Maria Tereza, da Garantia de Qualidade do Centro de Radiofarmácia, pelo apoio e colaboração durante a execução do trabalho.

Ao Natanael pelo apoio e colaboração na realização dos estudos de biodistribuição em animais sadios e com modelo tumoral.

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

Aos funcionários da gerência de Controle de Qualidade do Centro de Radiofarmácia, em especial Neuza, Margareth, José Luis, Ademar, Vivian, Carlos e Patrícia.

Aos funcionários da gerência de Produção de Radiofármacos do Centro de Radiofarmácia, em especial Adriano, Bruzinga, João Alves, Pires e Rosana.

Ao Peterson, da gerência de Pesquisa e Desenvolvimento do Centro de Radiofarmácia pela colaboração sempre que solicitado.

Aos colegas de pós-graduação do IPEN, Lais, Renata, Priscilla, Adriana, Akinkumi, Luis Alberto e Ricardo pela colaboração, incentivo e agradável convívio.

Ao amigo David, pelo incentivo, apoio e amizade durante todo esse tempo, não só no IPEN, como também fora dele. Valeu por tudo, principalmente pelas partidas de tênis e papos sobre futebol nos momentos de lazer.

Ao Ronaldo, Hélena, Gustavo e Luiza pela amizade, carinho, acolhimento, ajuda e hospedagem sempre que precisei! Muito obrigado por tudo!

Aos meus amados pais José Luiz e Regina, faltam palavras para expressar toda minha gratidão. Obrigado por fazerem parte de todas as etapas da minha vida, sempre me apoiando e incentivando. Minhas conquistas são de vocês, afinal, sem vocês nada disso seria possível! Pretendo ser para o meu filho o que vocês são para mim, motivo de orgulho e um exemplo a ser seguido! Amo vocês!

A minha irmã Lívia e cunhado Marcinho por me proporcionarem momentos especiais sempre que estamos juntos, principalmente agora com a Larinha.

A Clarissa, pelo amor, companheirismo, interesse, apoio e incentivo constante. Muito obrigado por compartilhar sua vida comigo e permitir que eu compartilhe a minha vida com você! Essa vitória é nossa! Te amo!

Ao Rafael, por nos alegrar com sua chegada e me incentivar a concluir esse trabalho da melhor forma possível. Seja bem vindo meu filho!

**“Sem sonhos, a vida não tem brilho.
Sem metas, os sonhos não têm alicerce.
Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais.”**

(Augusto Cury)

ESTUDO DE ANÁLOGO DA SUBSTÂNCIA P PARA DESENVOLVIMENTO DE RADIOFÁRMACO COM APLICAÇÃO NA TERAPIA DE TUMORES CEREBRAIS.

GUILHERME LUIZ DE CASTRO CARVALHO

RESUMO

Atualmente os gliomas representam cerca de 81% dos tumores cerebrais malignos, com aumento na incidência tanto em crianças, como em adultos acima dos 45 anos. Um número elevado de receptores neuroquinina tipo 1 (NK-1) estão expressos em células de glioma, estando a ligação da Substância P (SP) a esses receptores, envolvida no desenvolvimento e progressão desse tipo de tumor. A SP quelada ao DOTA (SP-DOTA), radiomarcada, vem sendo testada para utilização na terapia de gliomas, sendo o lutécio-177 (^{177}Lu), devido a seu menor alcance tecidual, o radioisótopo mais indicado para tumores localizados em áreas críticas do cérebro. No entanto, estudos indicam a necessidade da adição de um excesso de metionina para prevenção da oxidação peptídica da SP-DOTA- ^{177}Lu , visando aumentar a estabilidade e a capacidade de ligação às células tumorais. Para superar esse desafio, surge a perspectiva da utilização de um novo análogo da SP, com estrutura modificada, para prevenir a oxidação peptídica. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi estudar a marcação de um novo análogo da SP com ^{177}Lu e caracterizar suas propriedades *in vitro* e *in vivo*, visando a obtenção de um radiofármaco inédito e com potencial aplicação na terapia de tumores cerebrais e realizar estudos preliminares de marcação deste novo análogo com Ítrio-90 (^{90}Y). O novo análogo foi obtido pela troca do aminoácido metionina (Met) pelo aminoácido norleucina (Nle) na posição 11 da cadeia peptídica da SP, sendo esses peptídeos denominados respectivamente SP(Met¹¹)-DOTA e SP(Nle¹¹)-DOTA. Após análise da oxidação peptídica dos dois peptídeos, os parâmetros da radiomarkação da SP(Nle¹¹)-DOTA, com $^{177}\text{LuCl}_3$, foram estudados para determinar a melhor condição de marcação. As estabilidades *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA- ^{177}Lu sob refrigeração (2-8°C), no freezer (-20°C) e em soro humano (37°C) foram determinadas após radiomarkação com alta atividade, quanto ao uso de agentes estabilizantes e após diluição. A SP(Nle¹¹)-DOTA também foi radiomarcada com ^{90}Y , utilizando-se a condição padrão determinada, sendo a estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA- ^{90}Y sob refrigeração (2-8°C) e em freezer (-20°C), avaliada após radiomarkação com alta atividade e

quanto a utilização de agente estabilizante. A capacidade de ligação *in vitro* às células tumorais (U-87 MG e M059J) e a biodistribuição *in vivo* em camundongos *BALB/c* sadios foram determinadas para a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu e comparadas à SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu. A ligação às proteínas plasmáticas e a biodistribuição em camundongos *Nude* com modelo tumoral também foram avaliadas. Os resultados obtidos na análise da oxidação peptídica comprovaram a importância da adição de excesso de metionina para prevenção da oxidação peptídica e indicaram uma alta estabilidade da SP(Nle¹¹)-DOTA, durante e após o processo de radiomarcagem. A adição de 148 MBq (4 mCi) da solução de ¹⁷⁷LuCl₃ em HCl 0,05N à 10 µg de SP(Nle¹¹)-DOTA diluída em tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5 seguida pela incubação a uma temperatura de 90°C por 30 minutos, sob agitação de 350 rpm foi definida com condição padrão de marcação. O congelamento (-20°C), o uso de agentes estabilizantes e a diluição apresentaram-se como métodos efetivos para garantir uma alta estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, após a marcação com alta atividade. Bons resultados também foram observados para a marcação da SP(Nle¹¹)-DOTA com ⁹⁰YCl₃ e para a estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA-⁹⁰Y, após congelamento (-20°C) e quando utilizado ácido genticóico como estabilizante. A SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou uma boa especificidade pelas células tumorais, principalmente pelas células de glioma humano M059J, sugerindo que a substituição do aminoácido metionina por norleucina na posição 11 não compromete a capacidade de ligação da SP(Nle¹¹) às células tumorais. Uma baixa porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas e um rápido clareamento sanguíneo foram observados para a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, sendo esse radiofármaco eliminado preferencialmente por via renal. A SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou uma boa estabilidade *in vivo* e se mostrou incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo seu uso indicado por injeção intratumoral ou intracavitária. O estudo de biodistribuição em animais com modelo tumoral, mostrou que esse radiofármaco se liga às células tumorais por ligações receptor específicas. Com base nesse dados conclui-se que a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, apresenta-se como um radiofármaco inédito que devido às suas propriedades *in vitro* e *in vivo* favoráveis, apresenta potencial aplicação na terapia de tumores cerebrais, representando uma nova possibilidade dentro do limitado arsenal terapêutico para esse tipo de tumor.

Palavras chaves: Substância P, lutécio-177, glioma, terapia radionuclídica

STUDY OF ANALOG OF SUBSTANCE P FOR DEVELOPMENT OF RADIOPHARMACEUTICAL WITH APPLICATION IN THERAPY OF CEREBRAL TUMORS.

GUILHERME LUIZ DE CASTRO CARVALHO

ABSTRACT

Currently gliomas represent about 81% of malignant brain tumors with increased incidence in children and in adults over 45 years. A large number of type 1 neurokinin receptor (NK-1) are expressed in glioma cells, being the binding of substance P (SP) to these receptors, involved in the development and progression of this tumor type. The SP conjugated at DOTA chelator (SP-DOTA), radiolabeled, have been tested for use in the treatment of gliomas, and the lutetium-177 (^{177}Lu), due to its lower tissue range, has been the most suitable radioisotope for tumors located in critical areas brain. However, studies indicate the necessity of adding an excess of methionine to prevent the peptide SP-DOTA- ^{177}Lu oxidation in order to increase the stability and capacity to bind to tumor cells. To overcome this challenge, there is the prospect of using a new analog of SP with a modified structure, to prevent peptide oxidation. In this context, the aim of this work was study the labeling of a new analog of SP with ^{177}Lu and characterize their properties *in vitro* and *in vivo*, in order to obtain a novel radiopharmaceutical with potential application in brain tumor therapy, and perform preliminary studies labeling of this new analog with yttrium-90 (^{90}Y). The new analog was obtained by replacement of the amino acid methionine (Met) by the amino acid norleucine (Nle) at position 11 of the peptide chain of SP, and these peptides were called SP(Met 11)-DOTA and SP(Nle 11)-DOTA respectively. After analysis of the oxidation for the two peptides, the radiolabeling parameters of the SP(Nle 11)-DOTA with $^{177}\text{LuCl}_3$ were studied to determine the best labeling condition. The SP(Nle 11)-DOTA was also radiolabeled with ^{90}Y , using standard condition, and the stability *in vitro* of the SP(Nle 11)-DOTA- ^{90}Y assessed under refrigeration (2-8 °C) and under freezing (-20° C), after radiolabeling with high activity and use of stabilizing agent. The stabilities *in vitro* of the SP (Nle 11)-DOTA- ^{177}Lu under refrigeration (2-8 °C), under freezing (-20 °C) and in human serum (37 °C) were determined after radiolabeling with high activity, with use of stabilizing agents and after dilution. The

ability of *in vitro* binding to tumor cells (U-87 MG and M059J) and the biodistribution *in vivo* in healthy *BALB/c* mice were determined for the ^{177}Lu -DOTA-SP(Nle¹¹) and compared to ^{177}Lu -DOTA-SP(Met¹¹). The plasma protein binding and biodistribution in *Nude* mice with tumor model were also evaluated. The results obtained from analysis of oxidation for the two peptides confirmed the importance of adding excess methionine to prevent peptide oxidation and indicated a high stability of the DOTA-SP(Nle¹¹), during and after the radiolabeling process. The addition of 148 MBq (4 mCi) of $^{177}\text{LuCl}_3$ solution in 0.05N HCl at 10 μg DOTA-SP(Nle¹¹) diluted in 0.4 M sodium acetate buffer pH 4.5 followed by incubation at a temperature of 90 °C for 30 minutes under constant agitation to 350 rpm was defined as standard labeling condition. The freezing (-20 °C), the use of stabilizing agents and the dilution were presented as effective methods to ensure high stability *in vitro* ^{177}Lu -DOTA-SP(Nle¹¹), after labeling with high activity. Good results were also observed for labeling DOTA-SP(Nle¹¹) with $^{90}\text{YCl}_3$ and for stability *in vitro* of the ^{90}Y -DOTA-SP(Nle¹¹) after freezing (-20 °C) and when gentisic acid was used as a stabilizer. The ^{177}Lu -DOTA-SP(Nle¹¹) showed good specificity to tumor cells, particularly human glioma cells (M059J), suggesting that substitution of the amino acid norleucine for methionine at position 11 does not compromise the capacity of SP(Nle¹¹) binding to tumor cells. A low percentage of plasma protein binding and rapid blood clearance were observed for the ^{177}Lu -DOTA-SP(Nle¹¹), being this radiopharmaceutical preferably eliminated by the kidney. The ^{177}Lu -DOTA-SP(Nle¹¹) showed good stability *in vivo* and inability to cross the blood brain barrier, being its use indicated through intratumoral or intracavitary injection. The biodistribution studies in animals with tumor model showed that the radiopharmaceutical binds to the tumor cells by specific receptor binding. Based on this data was concluded that the ^{177}Lu -DOTA-SP(Nle¹¹), can be presented as a novel radiopharmaceutical that due to its favorable properties *in vitro* and *in vivo*, presents a potential application in the therapy of brain tumors, representing a new possibility within the limited therapeutic options for this type of tumor.

Keywords: Substance P, lutetium-177, gliomas, radionuclide therapy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Classificação das neoplasias.....	18
1.1.1 Neoplasias benignas	18
1.1.2 Neoplasias malignas ou câncer.....	19
1.2 Neoplasias malignas cerebrais	20
1.2.1 Glioblastoma multiforme (GBM)	21
1.3 Substância P e seus receptores	22
1.4 Terapia de neoplasias malignas	24
1.4.1 Terapia de neoplasias malignas cerebrais	27
1.5 Derivados da SP radiomarcados para terapia de tumores cerebrais	28
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVO.....	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Materiais	35
4.1.1 Infraestrutura	35
4.1.2 Reagentes	35
4.1.3 Equipamentos e demais materiais.....	36
4.1.4 Células.....	37
4.1.5 Animais.....	37
4.2 Métodos	38
4.2.1 Preparação dos peptídeos utilizados.....	38
4.2.2 Análise da oxidação do resíduo de metionina	38
4.2.3 Avaliação dos parâmetros da radiomarcagem dos derivados da substância P ..	39
4.2.4 Análise da pureza radioquímica dos derivados radiomarcados	39
4.2.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) - TLC-SG.....	40
4.2.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	40
4.2.5 Análise da estabilidade <i>in vitro</i> da SP(Nle ¹¹)-DOTA radiomarcada	41

4.2.5.1	Análise da estabilidade sob refrigeração (2-8° C).....	42
4.2.5.2	Análise da estabilidade em Freezer (- 20°C).....	42
4.2.5.3	Análise da estabilidade em soro humano a 37° C.....	42
4.2.5.4	Determinação da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas <i>in vitro</i>	43
4.2.6	Estudo celular <i>in vitro</i>	43
4.2.6.1	Cultivo celular.....	43
4.2.6.2	Ensaio de ligação <i>in vitro</i>	44
4.2.7	Estudos de biodistribuição.....	46
4.2.7.1	Estudo de biodistribuição em animais sadios.....	46
4.2.7.2	Estudo de biodistribuição em animais com modelo tumoral.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1	Análise da pureza radioquímica dos derivados radiomarcados	49
5.1.1	Cromatografia em camada delgada (CCD) – TLC-SG	49
5.1.2	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	50
5.2	Análise da oxidação do resíduo de metionina	53
5.3	Estudo dos parâmetros de radiomarcção da SP(Nle¹¹)-DOTA	56
5.3.1	Efeito da atividade de ¹⁷⁷ LuCl ₃ sobre a pureza radioquímica	56
5.3.2	Efeito da massa de peptídeo sobre a pureza radioquímica	58
5.3.3	Efeito da temperatura sobre a pureza radioquímica	59
5.3.4	Efeito do tempo de incubação sobre a pureza radioquímica	60
5.3.5	Condição padrão de marcação.....	62
5.4	Análise da estabilidade <i>in vitro</i> da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada	62
5.4.1	Estudo da estabilidade <i>in vitro</i> da SP(Nle ¹¹)-DOTA radiomarcada com alta atividade.....	62
5.4.1.1	Análise da estabilidade sob refrigeração (2-8°C).....	63
5.4.1.2	Análise da estabilidade em freezer (-20°C)	65
5.4.1.3	Análise da estabilidade em soro humano a 37°C.....	66
5.4.2	Influência do uso de agentes estabilizantes na estabilidade <i>in vitro</i> da SP(Nle ¹¹)-DOTA radiomarcada	67
5.4.2.1	Análise da estabilidade com agentes estabilizantes sob refrigeração (2-8°C)	68

5.4.2.2 Análise da estabilidade com agentes estabilizantes em freezer (-20°C)	70
5.4.2.3 Análise da estabilidade com agentes estabilizantes em soro humano a 37°C	71
5.4.3 Influência da diluição na estabilidade <i>in vitro</i> da SP(Nle ¹¹)-DOTA radiomarcada	72
5.4.3.1 Análise da estabilidade com diluição sob refrigeração (2-8°C).....	73
5.4.3.2 Análise da estabilidade com diluição em freezer (-20°C).....	74
5.4.3.3 Análise da estabilidade com diluição em soro humano a 37°C.....	76
5.4.3.4 Determinação da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas <i>in vitro</i>	77
5.5 Estudos preliminares de marcação com ⁹⁰YCl₃	78
5.6 Estudo celular <i>in vitro</i>	80
5.7 Estudo de biodistribuição	83
5.7.1 Estudo de biodistribuição em animais sadios	83
5.7.2 Estudo de biodistribuição em animais com modelo tumoral	90
6 CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estruturas químicas dos aminoácidos Metionina (A) e Norleucina (B).....	32
FIGURA 2 - Perfil cromatográfico da amostra de $^{177}\text{LuCl}_3$ em CCD utilizando sílica gel 60 como suporte e tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 como fase móvel.	49
FIGURA 3 - Perfil cromatográfico da SP(Met ¹¹)-DOTA radiomarcada com ^{177}Lu , sem adição de metionina ao meio, em CCD utilizando sílica gel 60 como suporte e tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 como fase móvel.....	50
FIGURA 4 - Perfil cromatográfico da SP(Nle ¹¹)-DOTA radiomarcada com ^{177}Lu , sem adição de metionina ao meio, em CCD utilizando sílica gel 60 como suporte e tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 como fase móvel.....	50
FIGURA 5 - Perfil cromatográfico da amostra de $^{177}\text{LuCl}_3$ em CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min).....	51
FIGURA 6 – Perfil cromatográfico da SP(Met ¹¹)-DOTA radiomarcada com $^{177}\text{LuCl}_3$, sem adição de metionina ao meio, em CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min)... ..	51
FIGURA 7 - Perfil cromatográfico da SP(Nle ¹¹)-DOTA radiomarcada com $^{177}\text{LuCl}_3$, sem adição de metionina ao meio, em CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min)... ..	52
FIGURA 8 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Met ¹¹)-DOTA radiomarcada com $^{177}\text{LuCl}_3$ nas condições padrões sem adição de metionina no meio (A1) e com adição de metionina no meio (A2).	53
FIGURA 9 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Met ¹¹)-DOTA radiomarcada com $^{177}\text{LuCl}_3$ nas condições padrões após 24 horas de incubação à temperatura ambiente sem adição de metionina no meio (A1) e com adição de metionina no meio (A2).	54
FIGURA 10 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle ¹¹)-DOTA radiomarcada com $^{177}\text{LuCl}_3$ nas condições padrões sem adição de metionina no meio (A1) e com adição de metionina no meio (A2).	55
FIGURA 11 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle ¹¹)-DOTA radiomarcada com $^{177}\text{LuCl}_3$ nas condições padrões após 24 horas de incubação à temperatura ambiente sem adição de metionina no meio (A1) e com adição de metionina no meio (A2).	55
FIGURA 12 - Efeito da atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ sobre a pureza radioquímica da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ^{177}Lu	57
FIGURA 13 - Efeito da massa de SP(Nle ¹¹)-DOTA sobre a pureza radioquímica da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ^{177}Lu	59
FIGURA 14 - Efeito da temperatura sobre a pureza radioquímica da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ^{177}Lu	60
FIGURA 15 - Efeito do tempo de incubação sobre a pureza radioquímica da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ^{177}Lu . ..	61
FIGURA 16 - Pureza radioquímica da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ^{177}Lu determinada por CCD após marcação com alta atividade e incubação sob refrigeração (2-8°C) por até 168 horas.....	63
FIGURA 17 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ^{177}Lu imediatamente após marcação com alta atividade (A) e 24 horas (B), 48 horas	

(C), 72 horas (D), 96 horas (E), 120 horas (F) e 168 horas (G) após incubação sob refrigeração (2-8°C). 64

FIGURA 18 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD após marcação com alta atividade e incubação em freezer (-20°C) por até 48 horas..... 65

FIGURA 19 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu imediatamente após marcação com alta atividade (A) e 24 horas após incubação em freezer (B). 66

FIGURA 20 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD após marcação com alta atividade e após incubação em soro humano à 37°C por 1, 4 e 24 horas. 67

FIGURA 21 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD após marcação com alta atividade e após incubação sob refrigeração (2-8°C) por 24, 48, 96 e 120 horas com e sem adição de estabilizantes. 68

FIGURA 22 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu sem adição de estabilizante (A), com adição de ácido ascórbico (B) e com adição de ácido gentísico (C) imediatamente após marcação com alta atividade (1) e após incubação por 24 horas (2), 48 horas (3), 96 horas (4) e 120 horas (5) sob refrigeração (2-8°C). 69

FIGURA 23 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD após marcação com alta atividade e após incubação em freezer (-20°C) por 24 horas com e sem adição de estabilizantes..... 70

FIGURA 24 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu sem adição de estabilizante (A), com adição de ácido ascórbico (B) e com adição de ácido gentísico (C) imediatamente após marcação com alta atividade (1) e após incubação por 24 horas (2) em freezer (-20°C). 71

FIGURA 25 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD após marcação com alta atividade e após incubação em soro humano a 37°C por 1, 4 e 24 horas com e sem adição de estabilizantes. 72

FIGURA 26 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD imediatamente após marcação com alta atividade e diluição e após incubação sob refrigeração (2-8°C) por até 168 horas com e sem adição de estabilizantes. 73

FIGURA 27 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu sem adição de estabilizante (A), com adição de ácido ascórbico (B) e com adição de ácido gentísico (C) imediatamente após marcação com alta atividade e diluição (1) e após incubação por 24 horas (2), 48 horas (3), 72 horas (4), 96 horas (5) e 168 horas (6) sob refrigeração (2-8°C). 74

FIGURA 28 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD imediatamente após marcação com alta atividade e diluição e após incubação em freezer (-20°C) por até 48 horas com e sem adição de estabilizantes. 75

FIGURA 29 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu sem adição de estabilizante (A), com adição de ácido ascórbico (B) e com adição de ácido gentísico (C) imediatamente após marcação com alta atividade e diluição (1) e após incubação por 24 horas (2) e 48 horas (3) em freezer (-20°C). 75

FIGURA 30 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD imediatamente após marcação com alta atividade e diluição e após incubação em soro humano a 37°C por 1, 4 e 24 horas com e sem adição de estabilizantes. 76

FIGURA 31 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu sem adição de estabilizante (A), com adição de ácido ascórbico (B) e com

adição de ácido gentísico (C) imediatamente após marcação com alta atividade e diluição (1) e após incubação por 1 hora (2), 4 horas (3) e 24 horas (4) em soro humano a 37°C. A porcentagem da área de cada pico está indicada.	77
FIGURA 32 - Porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu.....	78
FIGURA 33 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C ₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,5 mL/min) da SP (Nle ¹¹)-DOTA- ⁹⁰ Y imediatamente após marcação com alta atividade (A), 24 horas (B) e 48 horas (C), após incubação sob refrigeração (2-8°C) com adição de ácido gentísico (6 mg/mL).	80
FIGURA 34 - Estudo da ligação <i>in vitro</i> da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu e da SP(Met ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu, radiomarcada na presença e ausência de excesso de metionina no meio (6 mg/mL), com células tumorais de glioblastoma humano U-87MG.	82
FIGURA 35 - Estudo da ligação <i>in vitro</i> da SP(Met ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu, radiomarcada na presença de excesso de metionina no meio (6 mg/mL) e da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu com células tumorais de glioma humano M059J.	83
FIGURA 36 - Biodistribuição da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios em % AI/órgão (n=3)	85
FIGURA 37 - Biodistribuição da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios em % AI/g de órgão ou mL de sangue (n=3)	86
FIGURA 38 - Biodistribuição da SP(Met ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios em % AI/órgão (n=3)	87
FIGURA 39 - Biodistribuição da SP(Met ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios em %AI/g de órgão ou mL de sangue (n=3)	88
FIGURA 40 - Comparação da biodistribuição, em %AI/ mL de sangue, entre a SP(Met ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu e a SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios, 1 hora, 4 horas e 24 horas após administração do radiofármaco (n= 3).	88
FIGURA 41 - Comparação da biodistribuição, em %AI/g de órgão para os rins, entre a SP(Met ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu e a SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios, 1 hora, 4 horas e 24 horas após administração do radiofármaco (n= 3).	89
FIGURA 42 - Comparação da biodistribuição, em %AI/g de órgão para os ossos, entre a SP(Met ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu e a SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios, 1 hora, 4 horas e 24 horas após administração do radiofármaco (n= 3).	90
FIGURA 43 - Biodistribuição da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos <i>Nude</i> machos com modelo tumoral de glioma (M059J) em % AI/órgão (n=4)	91
FIGURA 44 - Biodistribuição da SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu em camundongos <i>Nude</i> machos com modelo tumoral de glioma (M059J) em %AI/g de órgão ou mL de sangue (n=4).	92

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características físicas de radioisótopos emissores β^- , utilizados na terapia de tumores.	26
TABELA 2 - Efeito da atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ sobre a pureza radioquímica da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$.	56
TABELA 3 - Efeito da massa de $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA}$ sobre a pureza radioquímica da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$.	58
TABELA 4 - Efeito da temperatura sobre a pureza radioquímica da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$.	60
TABELA 5 - Efeito do tempo de incubação sobre a pureza radioquímica da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$.	61
TABELA 6 - Pureza radioquímica da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{90}\text{Y}$ determinada por CCD após marcação com alta atividade e após incubação sob refrigeração (2-8°C) e em freezer por 24 e 48 horas.	79
TABELA 7 - Pureza radioquímica da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{90}\text{Y}$ determinada por CCD após marcação com alta atividade e incubação sob refrigeração (2-8°C) por até 48 horas com adição de ácido genticóico (6 mg/mL).	79
TABELA 8 - Estudo de ligação <i>in vitro</i> da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$ e da $\text{SP}(\text{Met}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$, radiomarcada sem e com adição de metionina ao meio (6 mg/mL), utilizando células tumorais de glioblastoma humano U87MG.	81
TABELA 9 - Estudo de ligação <i>in vitro</i> da $\text{SP}(\text{Met}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$, radiomarcada com adição de metionina ao meio (6 mg/mL) e da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$, utilizando células tumorais de glioma humano M059J.	82
TABELA 10 - Biodistribuição da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$ em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios em %AI/órgão (n=3).	84
TABELA 11 - Biodistribuição da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$ em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios em %AI/g de órgão ou mL de sangue (n=3).	85
TABELA 12 - Biodistribuição da $\text{SP}(\text{Met}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$ em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios em %AI/órgão (n=3).	86
TABELA 13 - Biodistribuição da $\text{SP}(\text{Met}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$ em camundongos <i>BALB/c</i> machos sadios em %AI/g de órgão ou mL de sangue (n=3).	87
TABELA 14 - Biodistribuição da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$ em camundongos <i>Nude</i> machos com modelo tumoral de glioma (M059J) em %AI/órgão (n=4).	91
TABELA 15 - Biodistribuição da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$ em camundongos <i>Nude</i> machos com modelo tumoral de glioma (M059J) em %AI/g de órgão ou mL de sangue (n=4).	92
TABELA 16 - Razão tumor : sangue da biodistribuição da $\text{SP}(\text{Nle}^{11})\text{-DOTA-}^{177}\text{Lu}$ em camundongos <i>Nude</i> machos com modelo tumoral de glioma (M059J) em %AI/g de tumor : %AI/ mL de sangue, 1 hora, 4 horas e 24 horas após administração intravenosa (n=4).	93

1 INTRODUÇÃO

Nos organismos multicelulares, a taxa de proliferação de cada tipo celular é controlada com precisão por um sistema altamente integrado que permite a sua replicação dentro de estreitos limites, mantendo a população normal em níveis homeostáticos. Como na maioria dos tecidos e órgãos há divisão celular contínua para restaurar as perdas decorrentes do processo de envelhecimento, a replicação celular é atividade essencial para o organismo. No entanto, ela deve seguir o controle rígido imposto ao sistema, pois se feita para mais ou para menos o equilíbrio se quebra. Uma das características principais das células neoplásicas é sua proliferação descontrolada (Brasileiro Filho et al., 1998).

A reprodução é atividade fundamental das células e, em geral, existe correlação inversa entre diferenciação e multiplicação celular. Quanto mais avançado ou complexo é o estado de diferenciação, menor é sua taxa de reprodução. Assim se entende que, nas neoplasias, ocorre também perda da diferenciação celular paralelamente ao aumento da taxa de proliferação.

A proliferação celular, em condições normais, é atividade complexa e depende da atuação coordenada dos produtos de vários genes, os quais controlam o processo em resposta a estímulos internos e externos (Brasileiro Filho et al., 1998).

Ao longo de sua existência, as células são expostas a agentes mutagênicos e sofrem erros de duplicação, resultando em alterações sutis e progressivas na sequência do DNA. Quanto maior o número de mitoses de uma célula, maior a chance de ocorrência de alterações no seu DNA. Eventualmente, uma dessas mutações somáticas pode alterar a função de um gene fundamental e fornecer uma vantagem no crescimento e multiplicação da célula mutante, permitindo a expansão do clone. Alterações adicionais em genes relevantes para a manutenção da integridade do genoma podem acelerar a taxa de mutações e levar ao surgimento de células mutantes capazes de proliferar desenfreadamente, invadir e colonizar diversas regiões do organismo (Ojopi e Neto, 2004). Portanto, a célula neoplásica sofre alteração intrínseca nos seus mecanismos regulatórios da multiplicação, adquire autonomia de crescimento e se torna independente dos controles externos.

Feitas as considerações anteriores, as neoplasias podem ser entendidas como proliferações anormais de células que têm crescimento autônomo e tendem a perder sua diferenciação. O termo neoplasia significa literalmente o processo de um “novo crescimento”, denominado neoplasma. Já o termo “tumor” foi originalmente aplicado ao edema causado por uma inflamação. Os neoplasmas também causam edemas, mas há muito tempo o emprego não-neoplásico de tumor saiu de uso. Câncer é o termo comum para todos os tumores malignos (Robbins e Cotran, 2005). Cancerígeno ou oncogênico é o estímulo ou agente capaz de causar câncer (Brasileiro Filho et al., 1998).

Embora o câncer seja uma doença complexa, o meio ambiente e fatores não genéticos desempenham um papel importante em muitos estágios do processo neoplásico, as variedades dessas malignidades são decorrentes de algum fator que danifica o DNA, sem que haja reparo correto. (Ojopi e Neto, 2004).

1.1 Classificação das neoplasias

As neoplasias podem ser divididas em benignas e malignas, considerando-se seu comportamento e evolução. As neoplasias benignas geralmente não são letais nem causam sérios transtornos para o portador; por isso, podem evoluir durante muito tempo sem colocar em risco a vida do indivíduo. Ao contrário, as neoplasias malignas têm crescimento acelerado e muitas provocam perturbações homeostáticas graves que acabam levando o paciente à morte (Brasileiro Filho et al., 1998).

1.1.1 Neoplasias benignas

As células neoplásicas benignas em geral são bem diferenciadas e podem até ser indistinguíveis das células normais correspondentes. As atipias celulares e arquiteturais são discretas, ou seja, o tumor reproduz bem o tecido que lhe deu origem. Como a taxa de divisão celular é pequena, ou seja, o índice mitótico é baixo, o crescimento também é lento, o que permite o desenvolvimento adequado de vasos

sanguíneos, assegurando a boa nutrição das células. Desse modo, degenerações, necroses e hemorragias são pouco comuns. Além disso, não compromete a nutrição do portador e nem produz substâncias que possam provocar anemia ou caquexia (Brasileiro Filho et al., 1998).

Nos tumores benignos as células crescem unidas entre si, não infiltram os tecidos vizinhos e formam uma massa geralmente esférica. Esse crescimento é dito expansivo e provoca compressão das estruturas adjacentes. Com frequência forma-se uma cápsula fibrosa em torno do tumor e a neoplasia fica bem delimitada, podendo ser completamente removida por cirurgia. Em geral, os tumores benignos não recidivam após ressecção cirúrgica (Brasileiro Filho et al., 1998).

1.1.2 Neoplasias malignas ou câncer

As células das neoplasias malignas, também chamadas de células cancerosas, têm propriedades bioquímicas, morfológicas e funcionais variadas. Como sua taxa de multiplicação é elevada (alto índice mitótico), seu crescimento é usualmente rápido e o mesmo não acontece com o estroma e os vasos sanguíneos, que se desenvolvem mais lentamente, resultando muitas vezes em degenerações, necroses, hemorragias e ulcerações (Brasileiro Filho et al, 1998).

Em razão da perda da diferenciação celular, as células malignas apresentam atipias variadas, desde discretas até muito intensas; neste caso perdem seus aspectos morfológicos específicos. As células cancerosas apresentam também alterações importantes da membrana plasmática, que as tornam menos aderentes entre si e facilitam sua migração do tumor neoplásico primário ou original. Com isso elas podem se movimentar, infiltrar-se em tecidos adjacentes, penetrar em vasos sanguíneos e linfáticos e, a partir deles, migrar para outros órgãos e tecidos do organismo e neles originar novos tumores, denominados metástases (Brasileiro Filho et al., 1998).

Devido ao crescimento infiltrativo, os limites do câncer com as estruturas adjacentes são pouco definidos e, como consequência, a remoção completa do tumor muitas vezes torna-se difícil. Em muitos casos, em torno da lesão principal

existem ilhotas ou cordões de células neoplásicas que se proliferam, podendo dar origem a novos tumores.

Por tudo isso, a remoção cirúrgica é mais difícil e faz-se necessário retirar certa quantidade de tecido normal adjacente. Ainda assim, existe o risco de recidiva (Brasileiro Filho et al., 1998).

1.2 Neoplasias malignas cerebrais

As neoplasias malignas do Sistema Nervoso Central (SNC) representam 1,9% de todas as neoplasias malignas no mundo, sendo o 14º tipo de tumor maligno mais frequente em homens, com risco estimado de 3,9/ 100 mil, e o 15º em mulheres, com risco de 3,0/ 100 mil. No Brasil, somente no ano de 2014, foram estimados 4960 novos casos em homens e 4130 novos casos em mulheres. (Instituto Nacional do Câncer, 2014).

O SNC consiste do cérebro e da medula espinhal. As principais divisões anatômicas cerebrais são o cérebro e o cerebelo, sendo os neurônios e a glia os principais componentes celulares do sistema nervoso. Os neurônios são a unidade funcional do SNC e são responsáveis pela transmissão dos impulsos nervosos, já a glia ou neurógliia tem a função de fornecer suporte metabólico e estrutural aos neurônios. A neurógliia apresenta duas classes principais de células: a micrógliia, com função fagocítica em lesões ou infecções no sistema nervoso, e a macrógliia. Os oligodendrócitos e as células de Schwann que formam a bainha de mielina, os astrócitos, com funções metabólicas e estruturais, e as células ependimárias que revestem o sistema ventricular, são os quatro tipos de macrógliia (Martin, 2013).

Pelo fato dos neurônios não possuírem centríolos e apresentarem natureza não mitótica, neoplasias originadas de neurônios são extremamente raras, por outro lado, as neoplasias desenvolvidas a partir de células gliais são bastante comuns, sendo denominadas gliomas (Macedo, 2013).

Os gliomas são os tumores cerebrais malignos mais frequentes, representando cerca de 81% de todos os tumores primários do SNC, sendo mais comum em adultos. Observa-se um aumento na incidência de glioma nos últimos 25 anos, tanto em crianças como em adultos acima dos 45 anos. Sendo a taxa de

incidência, deste tipo de tumor, mais alta entre grupos populacionais de maior nível socioeconômico, provavelmente em razão do melhor acesso às tecnologias que permitem o diagnóstico. Esse perfil também pode ser observado nos países desenvolvidos em relação aos países em desenvolvimento (Laperriere et al., 2002; Laks et al., 2010; Instituto Nacional do Câncer, 2014; Ostrom et al., 2014).

As formas malignas do tumor de cérebro apresentam uma perspectiva devastadora de morbidade e mortalidade, sendo as células de glioma muito resistentes aos diversos tipos de tratamentos, tais como: quimioterapia, radioterapia e cirurgia (Laks et al., 2010).

Embora o tratamento possa prolongar a vida do paciente, a maioria dos tumores cerebrais não é curável (Lazarczyk et al., 2007; Vähä-koskela et al., 2013).

Os gliomas intracranianos são tumores cerebrais intrínsecos classificados de acordo com suas características histológicas seguindo o sistema de classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS): gliomas de grau IV (glioblastoma multiforme) apresentam o pior prognóstico com sobrevida inferior a 12 meses; glioma de grau III (gliomas anaplásicos) também tem prognóstico próximo ao de grau IV; gliomas de grau II (astrocitomas) apresentam um melhor prognóstico, com uma sobrevida de 8-10 anos e os gliomas de grau I são considerados em sua maioria curáveis (Cordier et al., 2010a).

A diferenciação histológica, o grau de infiltração de células tumorais para outras áreas do cérebro sadio e as taxas de crescimento variável determinam essas taxas de sobrevida. Os gliomas de baixo grau afetam um grupo mais jovem, sendo a segundo tipo de câncer que mais causa morte em adolescentes e adultos jovens com idade entre 15 e 35 anos, perdendo para leucemia, ressaltando a necessidade de tratamento eficaz (Kneifel et al., 2006).

Em gliomas de grau II, é recomendada inicialmente a administração da quimioterapia e/ou radioterapia, para somente depois decidir sobre a ressecção, uma estratégia mais radical (Cordier et al., 2010a).

1.2.1 Glioblastoma multiforme (GBM)

O glioblastoma multiforme (GBM) é a forma mais comum de glioma, representando cerca de 45% dos casos. Caracteriza-se por um crescimento rápido do tumor que se forma a partir de tecido da glia, possuindo células muito diferentes das células normais. Apresentam alta agressividade e letalidade (Ostrom et al., 2014; National Cancer Institute, 2015)

O GBM ou astrocitoma de grau IV, segundo classificação da OMS, é raro em crianças sendo o tumor cerebral mais frequente em adultos, representando 65% do total. O termo multiforme é devido à natureza heterogênea dessas neoplasias e sua composição histológica variada. Estes tumores são caracterizados pela infiltração difusa nos tecidos adjacentes impedindo que a ressecção completa seja realizada.

O tratamento para este tipo de tumor é a ressecção seguida da combinação de radioterapia e quimioterapia (Laks et al., 2010; National Cancer Institute, 2015).

Mesmo com o tratamento ainda pode ocorrer recidiva local, isso tem levado ao estudo de outras formas de intensificar a dose de radiação em um esforço para melhorar o tratamento e aumentar o tempo de vida, pois é uma doença que na maioria dos casos é invariavelmente fatal. Pacientes com GBM tem uma sobrevida média global de cerca de 1 ano (Laperriere et al, 2002).

A ressecção do GBM, seguida de radioterapia combinada é aceita como terapia padrão atual, no entanto, se o tumor estiver localizado em áreas do cérebro responsáveis por funções como a fala ou função motora, essa abordagem terapêutica agressiva, muitas vezes não pode ser eficazmente aplicada (Laks et al., 2010).

1.3 Substância P e seus receptores

Peptídeos são moléculas formadas por aminoácidos unidos por ligações peptídicas, podendo ser constituídos por apenas dois aminoácidos ou por até 50 aminoácidos. Existem duas formas de peptídeos, os naturais e os sintéticos (Marzzoco e Torres, 2007).

A Substância P (SP) é um neuropeptídeo composto por 11 aminoácidos (Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂) identificado em 1971 por Chang (Lazarczyk et al., 2007). É um dos membros mais importantes da família das

taquicininas, caracterizada pela sequência C terminal Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂, onde o X da sequência pode representar Fenilalanina (Phe), Isoleucina (Ile) ou Valina (Val). (Breeman et al., 1996; Van Hagen et al., 1996).

As taquicininas são neuropetídeos excitatórios sintetizados em células neuronais e gliais do sistema nervoso central e periférico humano que participam em condições fisiológicas e patológicas. Agem como neurotransmissores excitatórios e/ou neuromoduladores que induzem a síntese de DNA, estimulando a divisão e proliferação celular, sendo suas respostas biológicas desencadeadas a partir da ligação destes peptídeos aos receptores específicos, pertencentes à família de receptores acoplados à proteína G (Lazarczyk et al., 2007).

A SP é o membro mais importante da família das taquicininas e possui importante papel na modulação da transmissão da dor de aferentes periféricos e centrais por receptores neuroquinina 1 e 2. A SP e outras taquicininas também podem participar na patogênese de doenças inflamatórias, induzindo degranulação de mastócitos *in vitro*, regulando a quimiotaxia, liberando enzimas lisossômicas dos macrófagos, regulando a expansão de células T e B e a produção de imunoglobinas (Van Hagen et al., 1996; Lazarczyk et al., 2007).

A nomenclatura para receptores taquicininas comumente aceita, define 3 tipos de receptores homólogos: o receptor SP (NK-1), o receptor neuroquinina A (NK-2) e o receptor neuroquinina B (NK-3). Os receptores de taquicinina apresentam grande distribuição tecidual e interagem com seus ligantes em associação com diversas respostas, tais como: neurotransmissão sensorial, respostas imunológicas, contração e relaxamento endotélio dependente do músculo vascular, liberação de histamina, extravasamento plasmático, inflamação, comportamento sexual e potencialmente, regeneração nervosa e tratamento de úlcera (Breeman et al., 1996; Muñoz e Coveñas, 2010).

A SP tem uma distribuição generalizada no sistema nervoso central e sistema nervoso periférico, apresentando grande afinidade pelos receptores neuroquininas tipo 1 (NK-1), sendo o principal ligante endógeno desse tipo de receptor que são encontrados em neurônios, em células periféricas, incluindo células ósseas, além de estarem super expressos em gliomas malignos de grau II a IV (Goto e Tanaka, 2002; Cordier et al., 2010a; Nevares et al., 2010).

Estudos sugerem que as taquicininas e seus receptores estão envolvidos no desenvolvimento e progressão de várias neoplasias, já que vários tipos de cânceres humanos apresentam receptores de peptídeos (Muñoz e Coveñas, 2010).

Receptores NK-1 estão superexpressos em carcinoma medular da tireóide, câncer de pulmão, pâncreas, mama e gliomas (incluindo glioblastomas), sendo na grande maioria das vezes encontrados em vasos sanguíneos intra e peritumoral. Essa localização tumoral e vascular pode ter implicações clínicas (Hennig et al., 1995; Breeman et al., 1996; Kneifel et al., 2007).

Após a ligação ao seu receptor específico, NK-1, a SP regula funções biológicas relacionadas ao desenvolvimento do câncer como a indução da proliferação de células tumorais, a angiogênese e a migração das células tumorais para invasão e metástase (Muñoz, Rosso e Coveñas, 2010).

Um número elevado de receptores NK-1 foi revelado em tumores malignos cerebrais quando comparados a tecidos cerebrais normais, sendo o número de receptores NK-1 expressos diretamente proporcional ao estágio da doença e ao grau de malignidade (Reubi, 2003; Lazarczyk et al., 2007; Muñoz e Coveñas, 2010).

Tem sido evidenciado que a ligação SP-NK1 está envolvida no desenvolvimento do glioma e em sua progressão (Lazarczyk, Matyja e Lipkowski, 2007; Palma e Maggi, 2000). Com isso a SP é uma candidata em potencial para utilização como molécula carregadora de um isótopo radioativo no tratamento dessas doenças.

1.4 Terapia de neoplasias malignas

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 (teleterapia) 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, a teleterapia e a braquiterapia exigem o conhecimento preciso da

localização e configuração geométrica 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 multifocais ou de sítios metastáticos, para contornar essa limitação, a medicina nuclear tem direcionado seus esforços para a terapia radioisotópica ou terapia radionuclídica (Zalutsky, 2003).

A investigação e conhecimento de características moleculares intrínsecas das células tumorais permite o desenvolvimento de fármacos receptor-específicos, utilizados em terapia molecular. Essa classe de fármacos, na qual se inclui os anticorpos e os peptídeos acoplados a radioisótopos, pode apresentar atividade terapêutica intrínseca ou ainda carrear um agente citotóxico contra biomoléculas de superfície da célula tumoral (Engel et al., 2007).

O objetivo dessa técnica é semelhante ao da teleterapia e braquiterapia: maximizar a dose de radiação absorvida pelo tumor e reduzir ao mínimo a irradiação dos órgãos normais. Além do efeito terapêutico, a utilização de isótopos radioativos permite a aquisição de imagens do radioligante acumulado no tumor, fornecendo informações úteis a respeito de sua interação e características bioquímicas das células tumorais, quando o radioisótopo emite radiação gama (γ) (Zalutsky, 2003).

A escolha do radionuclídeo apropriado para uma aplicação terapêutica específica deve ser cuidadosa, estando diretamente relacionada com as propriedades físicas e químicas do radionuclídeo e também com a natureza da radiação (Dong, Liu e Wang, 2014).

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

- Meia-vida física, considerada ótima entre 1 e 14 dias;
- Tipos de emissão (α , β^- e elétron Auger), bem como energia e intensidade da radiação;
- Atividade específica;
- Química favorável à síntese do radiofármaco;
- Vias de administração;
- Dosimetria interna;
- Farmacocinética *in vivo* do radiofármaco e do radioisótopo livre;
- Custo de produção.

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

As partículas β^- são elétrons emitidos em altíssima velocidade, do núcleo de um átomo instável, podendo apresentar energia e alcance variáveis (Zweit, 1996).

Os radionuclídeos emissores de partículas β^- são classificados em 3 grupos de acordo com a energia e alcance da partícula emitida (Zweit, 1996).

- Radionuclídeos emissores β^- de baixa energia;
- Radionuclídeos emissores β^- de média energia;
- Radionuclídeos emissores β^- de alta energia.

Os elementos emissores β^- classificados como de baixa energia, possuem emissões que variam de 0,08 a 0,18 MeV e apresentam um alcance, na água, entre 0,4 e 0,9 mm sendo seus representantes o iodo-131 (^{131}I) e o lutécio-177 (^{177}Lu). O samário-153 (^{153}Sm) é o principal exemplo de um emissor β^- de média energia que apresentam emissões entre 0,23 e 0,36 MeV, com alcance entre 1,2 e 1,8 mm. Já as emissões dos emissores β^- de alta energia variam entre 0,5 e 1,0 MeV e apresentam alcance entre 2,2 e 5,0 mm, sendo o rênio-188 (^{188}Re) e o ítrio-90 (^{90}Y) representantes desse grupo (Zweit, 1996).

A TAB. 1 mostra alguns radioisótopos que são frequentemente usados na produção de radiofármacos para fins terapêuticos e suas propriedades físicas correspondentes.

TABELA 1 - Características físicas de radioisótopos emissores β^- , utilizados na terapia de tumores.

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

E_γ (keV)/A = Energia gama principal/Abundância

Fonte: Adaptação de Welch, 2005.

Ao interagir com a matéria, as partículas β^- podem sofrer alterações de sua trajetória, e consequentemente redução de sua energia cinética, a qual pode chegar a zero. Uma vez que a transferência linear de energia (LET) nessa interação é relativamente baixa (0,2 keV/ μ m), pode-se afirmar que essas partículas são pouco eficientes em lesar o DNA das células alvo. Portanto, para serem utilizados como agentes terapêuticos, os emissores β^- devem estar presentes em altas concentrações no tecido tumoral, transferindo milhares de elétrons a cada célula cancerosa. Essa especificidade é assegurada pela molécula carreadora (Kassis, 2003; Pujatti, 2009).

1.4.1 Terapia de neoplasias malignas cerebrais

Uma alternativa para o tratamento dos gliomas malignos é a terapia radionuclídea. Essa técnica utiliza moléculas radiomarcadas que se ligam seletivamente às células tumorais e nelas depositam dose citotóxica de radiação, provocando a morte dessas células.

A maioria dos protocolos de terapia radionuclídea para tumores cerebrais malignos envolve a administração de peptídeos marcados com radioisótopos emissores β^- (Kneifel et al., 2006).

Peptídeos apresentam várias vantagens sobre macromoléculas clássicas ou drogas. Do ponto de vista químico, são fáceis de sintetizar e podem resistir a condições extremas, necessárias para quelação e radiomarcção. Do ponto de vista biológico, apresentam depuração do sangue rápida e elevadas taxas de captação, além de serem específicos para tecidos tumorais, evitando danos às células normais, diferente dos outros agentes utilizados contra tumores (Khan e Beck-Sickinger, 2008).

Durante a última década, radiofármacos baseados em peptídeos e seus derivados radiomarcados tem despertado bastante interesse, incentivando grande número de pesquisas em medicina nuclear. Esses peptídeos podem ser utilizados para diagnóstico quando marcados com emissores gama (^{99m}Tc , ^{111}In e ^{67}Ga) ou na terapia com radionuclídeo para receptor de peptídeo (TRRP) quando marcados com

emissores beta (^{131}I , ^{90}Y , ^{188}Re , ^{177}Lu) ou alfa (^{213}Bi) (Dong, Liu e Wang, 2014; Dijkgraaf et al., 2007).

A TRRP é um método de radioterapia que utiliza peptídeos radiomarcados direcionados especificamente para atingir receptores expressos em número muito elevado na superfície de células cancerosas humanas (Dong et al., 2014; Reubi et al., 2005).

Esse procedimento é indicado para doença primária ou metastática, sendo minimamente invasivo, com poucos danos aos tecidos vizinhos normais, podendo ser utilizado como uma estratégia altamente seletiva para tratar diretamente o tumor ou como complemento a quimioterapia (Nanda et al., 2010).

Combinações de TRRP com outras modalidades de tratamento, como a quimioterapia ou o pré-tratamento com radiosensibilizadores, podem aumentar o impacto do tratamento (De Visser et al., 2008).

1.5 Derivados da SP radiomarcados para terapia de tumores cerebrais

Os agentes antitumorais utilizados na prática clínica atualmente, drogas chamadas citostáticas, são compostos que apresentam um perfil de segurança muito baixo e efeitos colaterais graves.

Estes efeitos clínicos são devido ao fato desses medicamentos não serem específicos contra células tumorais e, portanto, as pesquisas buscam uma droga com potencial antitumoral igual ou maior, mas com menos efeitos colaterais. Isso só pode ser alcançado se a droga for usada contra um alvo específico localizado nas células do tumor (Kneifel et al., 2007).

Na última década tem sido observado um crescente interesse na expressão de receptores e na síntese de peptídeos específicos para esses receptores aumentados durante proliferação do tumor (Ansquer et al., 2009).

Pesquisadores estão buscando a identificação de novos alvos moleculares para bloquear o crescimento do tumor. Neste sentido, espera-se que, em um futuro próximo novos produtos, mais eficazes e seguros, estarão disponíveis para o tratamento de tumores (Muñoz e Coveñas, 2010).

Peptídeos radiomarcados estão sendo usados para imagem e tratamento de tumores que tenham receptores positivos. Os peptídeos podem ser produzidos facilmente e têm uma rápida penetração no tecido e uma baixa antigenicidade (Reubi, 2003; Elgazzar, 2006).

Para evitar a perda completa da afinidade de ligação do peptídeo radiomarcado com o receptor é necessário o uso do agente quelante, que para certos radionuclídeos metálicos são indispensáveis (Reubi, 2003).

Os primeiros peptídeos produzidos e utilizados foram os análogos da somatostatina. Outros peptídeos como minigastrina, peptídeo-1 análogo de glucagon (GLP-1), colecistocinina (CCK), bombesina (BN) / peptídeo liberador de gastrina (GRP), substância P (SP), neurotensina (NT), neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeos com sequência RGD, formada pelos aminoácidos arginina, glicina e ácido aspártico (Arg-Gly-Asp), são promissores para TRRP e estão sendo utilizados no desenvolvimento de radiofármacos, atualmente em fase de estudos pré-clínico e clínico (Dong, Liu e Wang, 2014; Ansquer, Kraeber-Bodéré e Chatal, 2009).

A SP radiomarcada com diferentes radionuclídeos tem sido descrita e proposta para detecção e tratamento *in vivo* de doenças como doença óssea inflamatória, artrite reumatóide e tumores, como carcinóides e gliomas (Henning et al., 1995; Breeman et al., 1996; Kneifel et al., 2007).

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

A SP também pode ser complexada ao quelante DOTAGA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1-ácido glutárico-4,7,10 ácido triacético) e ser marcada com outros radionuclídeos para diagnóstico e terapia. A SP acoplada ao DOTAGA ou DOTA após radiomarcagem, preserva afinidade pelo receptor NK-1 e seu peso molecular de 1,8 KDa facilita a distribuição intratumoral após a aplicação local (Cordier et al., 2010b).

A injeção intratumoral e/ou intracavitária de SP-DOTAGA e/ou SP-DOTA radiomarcados representa uma ferramenta versátil para controle local dos gliomas malignos. O fato de que 95% dos gliomas malignos se manifestam clinicamente como lesões unifocais que recorrem ao local principal, ressalta a necessidade de tratamentos locais, como um pilar essencial do tratamento (Cordier et al., 2010b).

Essa técnica facilita a cirurgia criando uma lesão calcificada bem demarcada, o que é difícil sem pré-tratamento, além de reduzir o sangramento na operação devido ao efeito da radiação na vascularização tumoral (Van Hagen et al., 1996; Kneifel et al., 2006).

Esses peptídeos quelados vêm sendo marcados com diferentes radionuclídeos, entre eles, $^{90}\text{YCl}_3$, $^{177}\text{LuCl}_3$, $^{213}\text{BiCl}_3$ e $^{111}\text{InCl}_3$ e avaliados em fase clínica e pré-clínica (Dong et al., 2014).

Atualmente o SP- ^{90}Y vem sendo o radiofármaco mais testado para ser utilizado em TRRP para tumores cerebrais (Cordier et al., 2010b).

Reubi (2003) em um estudo piloto utilizando SP-DOTA- ^{90}Y como vetor de terapia local em glioblastoma, obteve resultados encorajadores, com acúmulo e tempo de permanência alto no local do tumor, sendo essa a principal explicação para os bons resultados preliminares com esta técnica.

Kneifel et al. (2007) realizaram um estudo piloto em 20 pacientes com gliomas de grau II a IV para avaliar a resposta clínica, biodistribuição e toxicidade a curto e longo prazo do DOTAGA-SP. Este vetor foi radiomarcado com ^{90}Y , ^{177}Lu e ^{213}Bi para terapia e com ^{111}In para avaliação da distribuição para cálculo de dose. O conjugado com SP mostrou alta afinidade pelo receptor NK-1 no tecido do tumor cerebral. Clinicamente, distribui-se de acordo com a geometria do tumor. Dos 20 pacientes apenas um apresentou edema radiogênico sintomático. A estabilização da doença ou melhora do estado neurológico foi observada em 13 dos 20 pacientes, mostrando ser essa uma estratégia inovadora para controle local de gliomas malignos.

Cordier et al. (2010b) estudaram a SP marcada com ^{90}Y como tratamento neo-adjuvante, sendo aplicada localmente após biópsia, que confirmou GBM, seguida pela ressecção do glioma pré-tratado. Essa técnica mostrou-se viável sem descompensação da pressão intracranial e sem toxicidade relevante. Bons resultados e melhora de sobrevida foram observados, sendo a ressecção do tumor facilitada devido à necrose causada pela radiação e falso encapsulamento do tumor. Dos 16 pacientes estudados, 14 mantiveram ou melhoraram a função neurológica.

Porém, apesar dos resultados preliminares animadores, o uso do SP- ^{90}Y na terapia de gliomas localizados em áreas críticas do cérebro pode ser perigoso, pois o ^{90}Y apresenta um alcance tecidual médio de 5 mm e máximo de 12 mm, podendo assim danificar áreas cerebrais adjacentes ao tumor (Kneifel et al., 2006; Cordier et al., 2010a).

Visando minimizar esse dano surge como alternativa a utilização do $^{177}\text{LuCl}_3$, um radioisótopo emissor β^- que apresenta um alcance tecidual menor (máximo de 1,5 mm), preservando assim o tecido adjacente sadio (Cordier et al., 2010a).

Chen et al.(2008) avaliaram a eficácia de agentes estabilizantes na preparação de peptídeos marcados com ^{177}Lu . A metionina foi avaliada para prevenção da oxidação peptídica do resíduo de metionina durante o processo de marcação da proteína e o ácido gentísico na prevenção da radiólise em marcações com alta atividade. Foi observado que a adição de um excesso de metionina apresenta papel importante na prevenção da oxidação e que a adição de ácido gentísico, logo após a marcação da SP com alta atividade de ^{177}Lu previne a radiólise do composto marcado, aumentando sua estabilidade e a ligação do peptídeo com as células tumorais.

Estes resultados sugerem que o desenvolvimento de uma formulação para preparação da SP-DOTA- ^{177}Lu para ser utilizada em ensaios clínicos de terapia local deve incluir a metionina, além do ácido gentísico para marcação com alta atividade.

Estudos foram realizados no Centro de Radiofarmácia do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CR-IPEN) e os resultados preliminares indicaram que a preservação dos resíduos de metionina, durante a marcação, possibilitou maior ligação do peptídeo radiomarcado às células tumorais *in vitro* (Araújo et al., 2009).

Outra alternativa neste cenário é a síntese de análogos peptídicos com estabilidade melhorada sem, no entanto, sofrerem alterações nas propriedades de ligação ao receptor (Khan e Beck-Sickinger, 2008).

Para superar esse desafio, surge a perspectiva de desenvolvimento de um novo análogo da substância P, com estrutura modificada para prevenir a oxidação do resíduo metionina, que apresente maior estabilidade e especificidade pelas células tumorais preservada.

O desenvolvimento de análogos de peptídeo que apresentem uma maior estabilidade e preservem a afinidade de ligação ao receptor, pode levar a um maior acúmulo de radioatividade nas células tumorais, oferecendo assim melhores resultados (De Visser et al., 2008).

Por tudo que foi exposto, conclui-se que o desenvolvimento de um radiofármaco receptor específico para terapia de tumores cerebrais poderá

representar uma importante alternativa terapêutica para pacientes com tumores inoperáveis ou mesmo para facilitar a cirurgia, nos casos em que esta seja indicada.

A escolha do peptídeo sintético SP baseia-se na facilidade de obtenção do mesmo, já conjugado a um quelante bifuncional para marcação com lutécio-177. A proposta de modificação da estrutura da SP, com a substituição do resíduo de metionina por norleucina (FIG. 1), de modo a prevenir a oxidação deste resíduo de aminoácido durante e após a radiomarkação, representa o ineditismo deste trabalho, sendo o impacto de tal substituição na eficiência de marcação, bem como na estabilidade e afinidade do peptídeo radiomarcado por células tumorais estudado neste trabalho.

FIGURA 1 - Estruturas químicas dos aminoácidos Metionina (A) e Norleucina (B).

2 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento deste trabalho é justificado pelo interesse no desenvolvimento de um radiofármaco inédito a ser utilizado para o tratamento de tumores sólidos cerebrais, sendo esse radiofármaco baseado em um análogo da substância P estável às condições de marcação e com capacidade de ligação aos receptores tumorais preservada.

O desenvolvimento de um radiofármaco para terapia de tumores cerebrais poderá representar uma nova possibilidade dentro do limitado arsenal terapêutico para esse tipo de tumor, aumentando a possibilidade de controle da doença e sobrevida dos pacientes.

3 OBJETIVO

Estudar a marcação de um novo análogo da Substância P com lutécio-177 (^{177}Lu) e caracterizar suas propriedades *in vitro* e *in vivo*, visando a obtenção de um radiofármaco inédito e com potencial aplicação na terapia de tumores cerebrais e realizar estudos preliminares de marcação deste novo análogo com Ítrio-90 (^{90}Y).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Infraestrutura

Os estudos foram desenvolvidos nos laboratórios de Pesquisa e Desenvolvimento de Radiofármacos na Instalação de Radiofarmácia, no laboratório de Cultura Celular do Centro de Biotecnologia (CB) e no Biotério, todos localizados no 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, respectivamente.

4.1.2 Reagentes

- Peptídeo Substância P (SP) quelado ao grupamento DOTA (DOTA-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂) - Anaspec, EUA;
- Peptídeo análogo a SP quelado ao grupamento DOTA (DOTA-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Nle-NH₂) - Anaspec, EUA;
- Cloreto de Lutécio - ¹⁷⁷LuCl₃ - IDB, Holanda;
- Cloreto de Ítrio - ⁹⁰YCl₃ - Nordion, Canadá;
- Ácido cítrico - C₆H₈O₇ (Cromato Produtos Químicos, Brasil);
- Citrato de sódio diidratado - Na₃C₆H₅O₇.2H₂O (J. T. Baker, EUA);
- Acetonitrila - C₂H₃N (Merck, Alemanha);
- Acetato de Sódio – NaCH₃COO - Sigma
- Água purificada por equipamento de osmose reversa (Purificador Milli-RX 45 Millipore, EUA);
- Ácido Gentísico - C₇H₆O₄ - Sigma
- Ácido Ascórbico - C₆H₈O₆ - Sigma

- Metionina - $C_5H_{11}NO_2S$ - Sigma
- Resina Quellung 100 - (BioRad, EUA);
- Solventes orgânicos grau HPLC - Sigma
- Soro Fetal Bovino (SFB), GIBCO-BRL (Gaithersburg, MD, EUA);
- Meio de cultura Dulbecco MEM:HAMF12 (1:1) com hepes, L-glutamina, piruvato de sódio, aminoácidos essenciais, bicarbonato de sódio - Vitrocell, Brasil;
- Meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) - Vitrocell, Brasil;
- Meio de cultura Dulbecco's Eagle (Gibco, Gaithersburg, MD);
- Solução penicilina:estreptomicina - Cultilab, Brasil;
- Tripsina bovina - Cultilab, Brasil.

4.1.3 Equipamentos e demais materiais

- Balança analítica (M220 - Denver Instrument, EUA);
- Balança semi-analítica (LT Lutron, EUA);
- Centrífuga MIKRO 220R (Hettich, Alemanha);
- Agitador/aquecedor Thermomixer comfort 1,5 mL (Eppendorf, EUA);
- Agitador de tubos tipo vortex (Vertex, Brasil);
- Medidor de pH (Tecnopon, Brasil)
- Calibrador de atividade (CRMTM-35R - Capintec, EUA);
- Contador automático tipo poço com cristal NaI(Tl) (D5002 cobra II - Packard-Canberra, EUA);
- Suporte cromatográfico para cromatografia em camada delgada - TLC-SG (Pall Life Sciences, EUA);
- Fitas de fibra de vidro impregnadas com sílica gel 60 para cromatografia em camada delgada – TLC-SG – Gellman Science
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência composto por sistema modulado constituído por bomba LC-10 ATvp, controlador automático de gradiente FCV-10 AL, degaseificador DGU-20A5, injetor automático de amostras SIL-10ADvp, detector UV SPD-10A e forno CTO-10 Avp (Shimadzu, Japão);

- Detector radioativo (câmara de cintilação - NaI) do sistema cromatográfico (Shell Jr. 1000/2000, Shell-usa, EUA);
- Coluna de fase reversa C₁₈ para cromatografia líquida de alta eficiência (200 x 4,60 mm, 5 µm - Waters, EUA);
- “Glove-box” para marcações - Laboratório de P&D da Radiofarmácia.
- Estufa de cultura celular, modelo 3159 – Forma Scientific (Marietta, OH, EUA)
- Fluxo laminar classe II A/B3, modelo 1140 – Forma Scientific (Marietta, EUA).
- Microscópio óptico (E100, Nikon, Japão);
- Membrana filtrante de poliestireno, hidrofílica, poro 0,22 µm (Millipore, EUA);
- Pipetas automáticas (Brand e Socorex);
- Vidraria em geral, tais como béqueres, erlemeyers, balões volumétricos, provetas e pipetas;
- Material plástico descartável em geral, tais como ponteiras, seringas, tubos tipo eppendorf, tubos cônicos tipo Falcon e placas de cultura.

4.1.4 Células

- Células tumorais de glioma humano M059J - Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), Brasil;
- Células tumorais de glioblastoma humano U-87MG - Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN), Brasil;

4.1.5 Animais

- Camundongos *BALB/c* sadios, com seis a dez semanas de idade e 20 a 25 gramas de peso, todos machos - Biotério IPEN.
- Camundongos *Nude*, com seis a dez semanas de idade e 15 a 20 gramas de peso com modelo tumoral, todos machos - Biotério IPEN.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparação dos peptídeos utilizados

Os peptídeos SP e seu análogo, quelados ao grupamento DOTA, foram sintetizados e fornecidos pela empresa Anaspec (EUA) com purezas acima de 95%. Esse novo análogo foi obtido pela troca do aminoácido Metionina (Met) pelo aminoácido Norleucina (Nle) na posição 11 da cadeia peptídica da SP. Durante a realização desse trabalho, esses peptídeos foram denominados respectivamente SP(Met¹¹)-DOTA e SP(Nle¹¹)-DOTA.

Os peptídeos SP(Met¹¹)-DOTA e SP(Nle¹¹)-DOTA foram adquiridos com purezas acima de 95% como observado nos certificados emitidos pelo fornecedor. O controle de qualidade realizado pela empresa por CLAE e por Espectrometria de Massa, utilizando-se a Ionização por Eletrospray (ESI), confirma de forma precisa e fidedigna a alta pureza desses peptídeos.

Após pesar 1 miligrama (mg) de cada peptídeo, em balança analítica, e diluir essa massa com 1 mL de tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5, obtendo-se uma amostra com concentração de 1 mg/mL, os peptídeos foram então separados em alíquotas de 10, 20 e 100 microlitros (µL), identificados e armazenados no freezer a -20°C para uso posterior.

4.2.2 Análise da oxidação do resíduo de metionina

Visando avaliar a oxidação peptídica da metionina, observada por Araújo et al. (2009) e Lima (2011) em estudos com a SP(Met¹¹)-DOTA, e confirmar a importância da adição de um excesso de metionina no meio de marcação com objetivo de prevenir a oxidação peptídica, inicialmente, foram realizados estudos preliminares da marcação dos peptídeos SP(Met¹¹)-DOTA e SP(Nle¹¹)-DOTA com o cloreto de lutécio (¹⁷⁷LuCl₃), na ausência e presença de excesso de metionina no meio.

As marcações foram realizadas utilizando-se a condição padrão determinada anteriormente (Araújo et al., 2009; Lima, 2011), sendo 74 MBq (2,0 mCi) da solução de $^{177}\text{LuCl}_3$ em HCl 0,05 N adicionados à 10 μg de peptídeo diluído em tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5 e incubados a uma temperatura de 90°C por 30 minutos, sob agitação de 350 rpm. Todos os tampões foram preparados com água chellex (água purificada tratada com resina chellex 100, trocadora de íons), para remoção de cátions presentes.

Para avaliar seu efeito na prevenção da oxidação peptídica, a metionina foi adicionada ao meio de marcação, obtendo-se uma concentração final de 6 mg/mL. A pureza radioquímica das marcações realizadas nas diferentes condições foi avaliada por técnicas cromatográficas, descritas no item 4.2.4.

4.2.3 Avaliação dos parâmetros da radiomarkação dos derivados da substância P

Após realização dos estudos de oxidação peptídica da metionina, a SP(Nle¹¹) quelada ao grupamento DOTA foi radiomarcada com $^{177}\text{LuCl}_3$ sendo os parâmetros de marcação variados visando determinar a melhor condição de marcação com lutécio-177 para esse derivado. Variações na massa de peptídeo (1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 μg), na atividade de ^{177}Lu (37,0; 74,0; 111,0; 148,0; 185,0; 259,0 e 481,0 MBq), na temperatura (10, 25, 40, 70, 80 e 90°C) e no tempo de incubação (5, 15, 30 e 60 minutos) foram avaliadas.

Marcações preliminares da SP(Nle¹¹) quelada ao DOTA com $^{90}\text{YCl}_3$ também foram realizadas visando avaliar a possibilidade de uma futura utilização desse radioisótopo para obtenção de radiofármaco para terapia de tumores cerebrais.

Após todas as marcações a pureza radioquímica foi determinada como descrito no item 4.2.4.

4.2.4 Análise da pureza radioquímica dos derivados radiomarcados

A pureza radioquímica é definida como a porcentagem do total da radioatividade que se encontra na forma química desejada, ou seja, na forma de peptídeos marcados com lutécio-177 ou ítrio-90.

A análise da pureza radioquímica das marcações da SP(Met¹¹)-DOTA e SP(Nle¹¹)-DOTA foi realizada por dois sistemas cromatográficos analíticos para pesquisar a presença de radiolantanídeo não ligado (¹⁷⁷LuCl₃ ou ⁹⁰YCl₃), a cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel 60 e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.2.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) - TLC-SG

O perfil cromatográfico do lutécio (¹⁷⁷Lu) livre foi determinado a partir da aplicação de uma alíquota da amostra de ¹⁷⁷LuCl₃ sobre uma fita impregnada com sílica gel 60 (TLC-SG), sendo a fita cortada em 10 segmentos de um centímetro (cm) após o desenvolvimento da cromatografia, utilizando-se tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0, e a radioatividade determinada no contador automático tipo poço devidamente calibrado.

Com auxílio de um capilar, uma alíquota das mistura de radiomarcção de ambos os peptídeos foi aplicada sobre o suporte de TLC-SG (1,5 x 10 cm) cerca de 2 cm a partir do começo da fita. Após secagem, procedeu-se à cromatografia utilizando como fase móvel tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0. Em seguida, a fita TLC-SG foi cortada em 10 segmentos de 1 cm e a radioatividade determinada no contador automático tipo poço devidamente calibrado para o radioisótopo.

A pureza radioquímica das marcações dos diferentes peptídeos, assim como o perfil cromatográfico do lutécio (¹⁷⁷Lu) livre foram determinados em duplicata.

4.2.4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise da pureza radioquímica da SP(Met¹¹)-DOTA e SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcadas também foi realizada em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), equipado com detector UV e de radiação, utilizando-se uma coluna de fase reversa C₁₈ (200 x 4,60mm, 5 µm), com fluxo de 1,0 mL/min e gradiente linear de 10 a 90% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA)/acetonitrila 0,1% v/v (solução A) em TFA/água 0,1% v/v (solução B) por 15 minutos, sendo em

seguida a composição mantida por mais 5 minutos para estabilização do sistema. Para realização das análises foram aplicadas no sistema alíquotas de 10 µL da diluição da amostra em 1 mL de tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5.

Para fins comparativos os perfis do $^{177}\text{LuCl}_3$ e dos dois peptídeos foram analisados pelo mesmo sistema.

4.2.5 Análise da estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada

Para análise da estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada foram realizadas marcações com alta atividade de ^{177}Lu (10 vezes maiores), mantendo-se a relação massa do peptídeo:atividade do radionuclídeo determinada como padrão, sendo as demais condições de marcação como temperatura, tempo e agitação mantidas.

O uso do ácido ascórbico (AA) e do ácido gentísico (AG) como possíveis agentes estabilizantes também foi estudado, sendo esses agentes adicionados logo após uma marcação com alta atividade de ^{177}Lu , obtendo-se uma concentração final de 6 mg/mL. Para servir como controle, uma marcação sem adição de estabilizantes também foi realizada e submetida às mesmas condições.

A influência de uma diluição na estabilidade do produto marcado também foi avaliada. Após uma marcação com alta atividade e adição do AA e AG, obtendo-se uma concentração final de 6 mg/mL, as preparações foram diluídas a um volume final 10 vezes maior, sendo uma terceira marcação realizada em paralelo e submetida às mesmas condições, exceto pela adição do agente estabilizante, utilizada para determinar a influência da diluição na estabilidade do produto.

As purezas radioquímicas das preparações foram avaliadas após incubação sob refrigeração (2-8°C), no freezer (-20°C) e em soro humano (37°C) por meio das técnicas de CCD e CLAE.

Aproveitando o estudo de estabilidade em soro humano a 37°C, a porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas também foi determinada para o radiofármaco SP(Nle¹¹)-DOTA- ^{177}Lu .

4.2.5.1 Análise da estabilidade sob refrigeração (2-8° C)

As misturas de radiomarcção foram incubadas sob refrigeração (2-8°C) por até 168 horas (sete dias), retirando-se uma alíquota imediatamente após a marcação e a cada 24 horas de incubação para análise da pureza radioquímica por CCD e CLAE, conforme descrito anteriormente. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.2.5.2 Análise da estabilidade em Freezer (- 20°C)

As preparações da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcadas foram também incubadas no freezer à - 20°C por até 48 horas (dois dias), retirando-se uma alíquota a cada 24 horas de incubação para análise da pureza radioquímica por CCD e CLAE, conforme descrito anteriormente. Os ensaios também foram realizados em duplicata.

4.2.5.3 Análise da estabilidade em soro humano a 37° C

Para obtenção do soro humano, foram coletados 10 mL de sangue de doador sadio sem anticoagulante e após centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, o coágulo de fibrina foi separado e a amostra novamente centrifugada para separação do soro.

As preparações contendo a SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada foram incubadas em soro humano (37 MBq/mL) a 37°C sob agitação de 350 rpm por 1, 4 e 24 horas.

Decorrido o tempo, uma alíquota das misturas foi retirada para análise por CCD e CLAE. Para análise por CLAE, uma alíquota da mistura de marcação foi retirada em cada tempo e após adição do mesmo volume de etanol padrão analítico (p.a) foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos para precipitar as proteínas plasmáticas. O sobrenadante foi então diluído com solução salina 0,9% até 1,0 mL e alíquotas de 10 µL analisadas por CLAE.

4.2.5.4 Determinação da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas *in vitro*

Para avaliar a ligação da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu às proteínas plasmáticas uma alíquota de 200 µL da amostra do radiofármaco incubada no soro a 37°C foi retirada em cada tempo de análise (1, 4 e 24 horas) e após adição de 200 µL de etanol p.a foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos para total precipitação das proteínas plasmáticas. Foram então retiradas alíquotas de 5 µL do sobrenadante, em triplicata, sendo a atividade dessas alíquotas determinadas em contador automático tipo poço devidamente calibrado para o radioisótopo.

Após total separação, a atividade do pellet de proteínas também foi determinada no contador e a porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas (LP) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$LP (\%) = \frac{\text{Atividade (cpm) do precipitado}}{\text{Atividade (cpm) do precipitado} + \text{Atividade (cpm) do sobrenadante}} \times 100 \quad \text{EQ.1}$$

4.2.6 Estudo celular *in vitro*

A capacidade de ligação do radiofármaco SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu às células tumorais foi avaliada através de estudos celulares *in vitro* com diferentes linhagens de células que expressam receptores para SP (M059J, U-87MG).

Estudos utilizando a SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada, na ausência e na presença de metionina no meio (6 mg/mL) também foram realizados, visando uma comparação com a capacidade de ligação do radiofármaco SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, obtido após a substituição do aminoácido metionina por norleucina na posição 11 da SP.

4.2.6.1 Cultivo celular

Todas as células tumorais utilizadas nesse estudo foram cultivadas no Centro de Biotecnologia do IPEN, seguindo as condições de cultivo ideais para cada linhagem.

As células M059J de glioma humano (Banco de Células do Rio de Janeiro) foram cultivadas a 37°C e 5% de CO₂ em meio de cultura Dulbecco MEM:HAMF12 (1:1) com hepes, L-glutamina, piruvato de sódio, aminoácidos essenciais, antibióticos e bicarbonato de sódio, enriquecido com 20% de soro fetal bovino (SFB).

As células tumorais de glioblastoma humano U-87MG (Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN) foram cultivadas em meio de cultura Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) com adição de 10% de SFB e antibióticos, a 37°C e 5% de CO₂.

Ao atingirem 80% de confluência na placa de cultura, as células foram tripsinizadas e ressuspensas no meio adequado, sendo mantidas sobre refrigeração até o momento da realização do ensaio de ligação *in vitro* ou implantação nos animais para desenvolvimento do modelo tumoral *in vivo* (item 4.2.7.2).

4.2.6.2 Ensaios de ligação *in vitro*

Após análise microscópica do crescimento e viabilidade celular, as células foram utilizadas para realização de ensaios de ligação *in vitro* visando avaliar a capacidade do radiofármaco de se ligar à essas células.

Para a realização dos ensaios foram utilizadas $0,5 \times 10^6$ células diluídas em 0,5 mL de meio de cultura contendo 1% de soro fetal bovino (SFB) em tubos com fundo cônico e tampa. Para cada linhagem de célula tumoral, foram utilizados três tubos para determinar a ligação total (LT) e três para determinar a ligação não específica (LNE), totalizando 6 tubos.

Após a radiomarcagem da SP(Nle¹¹)-DOTA e da SP(Met¹¹)-DOTA na ausência e presença de excesso de metionina no meio de marcação (6 mg/mL) com ¹⁷⁷LuCl₃, nas condições padrões, e obtenção de um produto com alta pureza radioquímica (> 95%), os ensaios para determinar a ligação desses radiofármacos às células tumorais foram realizados da seguinte forma:

- Preparou-se 5 mL de solução 4 µM da molécula fria em meio de cultura contendo 1% SFB e 10 mL de uma solução contendo aproximadamente $1,66 \times 10^{-3}$ MBq

($4,5 \times 10^{-5}$ mCi) da molécula marcada em 0,25 mL de meio de cultura contendo 1% de SFB.

- Adicionou-se 0,25 mL do meio de cultura contendo 1% de SFB aos tubos da LT e 0,25 mL da solução contendo a molécula fria aos tubos da LNE;
- Após homogeneizar os tubos no vortex rapidamente, 0,25 mL da solução da molécula marcada foi adicionada a todos os tubos que foram novamente homogeneizados no vortex rapidamente e incubados sob refrigeração (2-8°C) por 1 hora e 30 minutos, sob agitação;
- Decorrido o tempo, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm e após remoção do sobrenadante foi adicionado 1 mL de meio de cultura contendo 1% de SFB a todos os tubos;
- Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 3000 rpm e o sobrenadante retirado, sendo a atividade do pellet determinada em contador automático tipo poço devidamente calibrado para o radioisótopo.

A atividade total adicionada (AT) foi calculada como a média das medidas da atividade de três amostras de 0,25 mL da solução da molécula marcada, determinadas em contador tipo poço devidamente calibrado.

Para cada linhagem de célula a porcentagem de ligação total (% LT), a porcentagem de ligação não específica (% LNE) e a porcentagem de ligação específica (% LE), foram calculadas utilizando-se as seguintes equações:

$$\% LT = \frac{\text{Media das contagens nos tubos LT}}{\text{Media das contagens nos tubos AT}} \times 100 \quad \text{EQ. 2}$$

$$\% LNE = \frac{\text{Media das contagens nos tubos LNE}}{\text{Media das contagens nos tubos AT}} \times 100 \quad \text{EQ. 3}$$

$$\% LE = \% LT - \% LNE \quad \text{EQ. 4}$$

A partir dos valores de %LT, %LNE e %LE encontrados foram obtidos gráficos indicando as porcentagens de ligação específica relativa (%LEr), para cada preparação, visando a interpretação mais clara dos resultados, sendo as %LEr calculadas como sendo iguais a porcentagem de ligação específica em relação a ligação total.

4.2.7 Estudos de biodistribuição

Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN e realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), visando reduzir ao máximo o número de animais utilizados, bem como o sofrimento e estresse destes.

4.2.7.1 Estudo de biodistribuição em animais sadios

Os estudos de biodistribuição em animais sadios foram realizados com camundongos da linhagem *BALB/c* sadios todos adultos e machos (Biotério – IPEN) utilizando o método invasivo.

Os animais receberam por via endovenosa (veia caudal) 0,185 MBq (50 μ Ci) da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu diluídos em 100 μ L de solução salina 0,9%. Após 1, 4 ou 24 horas os animais foram puncionados na veia do plexo orbital com capilar de vidro heparinizado especial para coleta de 100 μ L da alíquota sanguínea, sendo imediatamente eutanasiados para retirada dos órgãos que depois de lavados e pesados, tiveram a radioatividade determinada em contador tipo poço calibrado para o radionuclídeo de interesse. Além da amostra sanguínea e da cauda foram retirados os seguintes órgãos considerados de interesse: cérebro, pulmão, pâncreas, coração, baço, fígado, estômago, rins, intestino e fêmur além de parte do músculo da coxa.

As porcentagens da atividade injetadas por órgão (%AI) e por grama de órgão (%AI/g) foram calculadas em função da média das contagens em triplicata de um padrão da dose administrada utilizando-se as seguintes equações:

$$\%AI = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{cpm padrão}} \times 100 \quad \text{EQ. 5}$$

$$\% AI / g = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{peso órgão (g)} \times \text{cpm padrão}} \times 100 \quad \text{EQ. 6}$$

Para determinar a porcentagem de atividade injetada no osso (%AI/osso) retirou-se o fêmur do camundongo e calculou-se a porcentagem de atividade por grama assumindo-se o peso do esqueleto como 12% do peso total do camundongo (EQ. 7) e para calcular a porcentagem de atividade injetada no músculo foi retirada parte do músculo da coxa e calculou-se a porcentagem de atividade por grama considerando os músculos como 40% do peso total do camundongo (EQ. 8).

$$\%AI / osso = \frac{\text{cpm fêmur} \times 12 \times \text{peso do camundongo (g)}}{\text{peso do fêmur (g)} \times \text{cpm padrão}} \quad \text{EQ. 7}$$

$$\%AI / músculo = \frac{\text{cpm músculo} \times 40 \times \text{peso do camundongo (g)}}{\text{peso do músculo (g)} \times \text{cpm padrão}} \quad \text{EQ. 8}$$

A porcentagem da atividade injetada por mL de sangue (% AI/mL sangue) foi calculada em função da média das contagens do padrão (EQ. 9) e a porcentagem da atividade injetada no sangue total (% AI/sangue) como a %AI/mL sangue multiplicada pela volemia (EQ. 10), sendo a volemia (volume total de sangue do camundongo) equivalente a 7,78% do seu peso total (EQ. 11).

$$\%AI / \text{mL sangue} = \frac{\text{cpm de 1 mL de sangue}}{\text{cpm padrão}} \times 100 \quad \text{EQ. 9}$$

$$\%AI / \text{sangue} = \%AI / \text{mL sangue} \times \text{volemia} \quad \text{EQ. 10}$$

$$\text{Volemia (mL)} = \text{peso do camundongo(g)} \times 0,0778 \quad \text{EQ. 11}$$

Visando comparar a biodistribuição em animais sadios da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu com a SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, os estudos de biodistribuição foram repetidos utilizando-se esses dois radiofármacos, sendo a SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu radiomarcada, na presença de metionina no meio (6 mg/mL).

4.2.7.2 Estudo de biodistribuição em animais com modelo tumoral

Os estudos de biodistribuição em animais com modelo tumoral foram realizados em camundongos das linhagens *Nude*, todos adultos e machos (Biotério – IPEN), utilizando o método invasivo.

Após o cultivo e confirmação microscópica do crescimento e viabilidade celular, as células M059J foram implantadas nos animais para desenvolvimento do modelo tumoral *in vivo*.

Foram injetadas $1,5 \times 10^6$ células de glioma humano M059J, ressuspendidas em 100 μL de uma mistura de PBS e matrigel alta concentração (2:1 v/v), por via subcutânea no dorso de cada animal. Três semanas após a injeção das células, quando a massa tumoral atingiu cerca de 0,3 g, os estudos de biodistribuição foram realizados conforme descrito anteriormente para os camundongos *BALB/c* sadios (item 4.2.7.1), porém para os animais com modelo tumoral, além de todos os órgãos retirados anteriormente para estudo da biodistribuição dos animais sadios, o tumor também foi retirado para a determinação da %AI/órgão e %AI/g.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da pureza radioquímica dos derivados radiomarcados

Como mencionado anteriormente, no item 4.2.4, a análise da pureza radioquímica das marcações da SP(Met¹¹)-DOTA e SP(Nle¹¹)-DOTA foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica gel 60 e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

5.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD) – TLC-SG

A FIG. 2 mostra o perfil cromatográfico da amostra de ¹⁷⁷LuCl₃, indicando que nesse sistema o ¹⁷⁷Lu livre migra com fator de retenção (Rf) 0,9 - 1,0 concentrando-se nos fragmentos 9 e 10 da fita, enquanto a SP(Met¹¹)-DOTA e a SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcadas, sem adição de excesso de metionina ao meio, migram com Rf 0,1 - 0,2 permanecendo nos fragmentos 1 e 2 da fita (FIG. 3 e FIG. 4), assim como observado por Araújo et al. (2009).

Desta forma, o sistema de CCD proposto mostrou-se eficaz na separação do produto radiomarcado da impureza lutécio-177 livre.

FIGURA 2 - Perfil cromatográfico da amostra de ¹⁷⁷LuCl₃ em CCD utilizando sílica gel 60 como suporte e tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 como fase móvel.

FIGURA 3 - Perfil cromatográfico da SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada com ¹⁷⁷Lu, sem adição de metionina ao meio, em CCD utilizando sílica gel 60 como suporte e tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 como fase móvel.

FIGURA 4 - Perfil cromatográfico da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada com ¹⁷⁷Lu, sem adição de metionina ao meio, em CCD utilizando sílica gel 60 como suporte e tampão citrato/ácido cítrico 0,1 M pH 5,0 como fase móvel.

5.1.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O perfil cromatográfico do lutécio (¹⁷⁷Lu) livre e da SP(Met¹¹)-DOTA e SP(Nle¹¹)-DOTA, radiomarcadas com ¹⁷⁷Lu, também foram determinados em sistema de CLAE com uma coluna de fase reversa C₁₈ (200 x 4,60mm, 5 μm) e detector radioativo. Uma alíquota (10 μL) da amostra de ¹⁷⁷LuCl₃ foi aplicada na coluna e submetida a um fluxo de 1,0 mL/min e gradiente linear de 10 a 90% (v/v) de

TFA/acetonitrila 0,1% v/v (solução A) em TFA/água 0,1% v/v (solução B) por 15 minutos, mantendo-se essa composição por mais 5 minutos para estabilização do sistema.

O cromatograma da amostra de $^{177}\text{LuCl}_3$ apresentou um pico com TR = 2,80 minutos referente ao ^{177}Lu livre (FIG. 5).

FIGURA 5 - Perfil cromatográfico da amostra de $^{177}\text{LuCl}_3$ em CLAE (radioativo; coluna C_{18} 200 mm x 4,60 mm, 5 μm ; fluxo 1,0 mL/min).

Após radiomarcagem dos peptídeos SP(Met¹¹)-DOTA e SP(Nle¹¹)-DOTA com $^{177}\text{LuCl}_3$ na condição padrão (apresentada no item 4.2.2), uma alíquota (10 μL) das misturas de marcação foram aplicadas no sistema de CLAE e submetidas às mesmas condições da amostra de $^{177}\text{LuCl}_3$ aplicada anteriormente.

A FIG. 6 mostra o cromatograma obtido após aplicação de uma alíquota da mistura da marcação do peptídeo SP(Met¹¹)-DOTA com $^{177}\text{LuCl}_3$. Três picos distintos foram observados, o primeiro com TR = 2,80 minutos refere-se ao ^{177}Lu livre, o segundo com TR = 10,30 minutos provavelmente referente a SP(Met¹¹)-DOTA- ^{177}Lu oxidada e o terceiro com TR = 11,05 minutos referente a SP(Met¹¹)-DOTA- ^{177}Lu .

FIGURA 6 – Perfil cromatográfico da SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada com $^{177}\text{LuCl}_3$, sem adição de metionina ao meio, em CLAE (radioativo; coluna C_{18} 200 mm x 4,60 mm, 5 μm ; fluxo 1,0 mL/min).

O cromatograma obtido a partir da aplicação de uma alíquota da mistura de marcação da SP(Nle¹¹)-DOTA com ¹⁷⁷LuCl₃ apresentou dois picos, o primeiro com TR = 2,80 minutos referente ao lutécio-177 livre e o segundo com um TR = 11,45 minutos refere-se a SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada (FIG. 7).

FIGURA 7 - Perfil cromatográfico da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada com ¹⁷⁷LuCl₃, sem adição de metionina ao meio, em CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min).

A pequena diferença observada nos tempos de retenção dos peptídeos era esperada e pode ser explicada pela menor polaridade apresentada pela SP(Nle¹¹)-DOTA. Essa menor polaridade é consequência direta da substituição do aminoácido metionina pelo aminoácido sintético norleucina na posição 11 da SP.

A norleucina é um aminoácido apolar assim como a metionina, e também apresenta uma cadeia lateral formada por hidrocarboneto, porém o fato de possuir uma cadeia lateral com maior número de carbonos e sem o enxofre, faz desse aminoácido sintético mais apolar que a metionina, o que torna a SP(Nle¹¹)-DOTA mais apolar do que a SP (Met¹¹)-DOTA e justifica seu maior tempo de retenção (TR), já que nesse sistema cromatográfico utilizado (fase reversa), compostos mais polares apresentam tempos de retenção menores.

Os perfis cromatográficos obtidos confirmam os resultados encontrados anteriormente por Lima (2011), que relatou a oxidação dos resíduos de metionina da SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada, na ausência de excesso de metionina no meio, provavelmente devido à alta temperatura, pH ácido e efeito da radiólise.

Esses perfis foram utilizados como padrões nas análises cromatográficas subsequentes, visto que a utilização da técnica de CLAE na análise de peptídeos radiomarcados é extremamente importante, pois essa técnica apresenta uma maior resolução, quando comparada com a CCD, sendo potencialmente capaz de separar

espécies proteicas radiomarcadas resultantes da degradação da espécie original. Isto se tornará especialmente útil nos estudos de estabilidade *in vitro* e nos estudos de avaliação da oxidação do resíduo de metionina.

5.2 Análise da oxidação do resíduo de metionina

Após marcação da SP(Met¹¹)-DOTA com cloreto de lutécio (¹⁷⁷LuCl₃) na ausência e presença de excesso de metionina no meio de marcação e análise da pureza radioquímica das preparações por CLAE foi possível determinar a influência da adição de metionina no processo de oxidação peptídica.

Ao analisar o cromatograma da SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada nas condições padrões sem adição de metionina ao meio (FIG. 8-A1) observa-se três picos, o primeiro com TR = 2,80 minutos refere-se ao ¹⁷⁷Lu livre, o segundo com TR = 10,30 minutos refere-se a SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada oxidada e o terceiro com TR = 11,05 minutos referente a SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada não oxidada. Já na marcação com excesso de metionina no meio (6 mg/mL), o pico da SP(Met¹¹)-DOTA oxidada não foi observado, estando presentes apenas os picos do ¹⁷⁷Lu livre e da SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada não oxidada (FIG. 8-A2).

FIGURA 8 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada com ¹⁷⁷LuCl₃ nas condições padrões sem adição de metionina no meio (A1) e com adição de metionina no meio (A2).

Após incubação dessas preparações por 24 horas à temperatura ambiente foi observado que a SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada sem adição de metionina estava totalmente oxidada, apresentando-se como um grande pico com o TR = 10,30

minutos (FIG. 9-A1). Já na marcação com adição de metionina no meio (FIG. 9-A2), observa-se um pequeno pico com TR = 10,30 minutos referente SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada oxidada e um pico mais significativo com TR = 11,05 minutos referente à SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada não oxidada, comprovando o importante papel da metionina na prevenção da oxidação peptídica como sugerido por Chen et al. (2008) e Lima (2011), não somente para prevenir a oxidação do peptídeo radiomarcado no momento da reação de marcação, mas também posteriormente, conforme demonstrado no estudo de estabilidade (24 horas após a marcação).

FIGURA 9 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada com ¹⁷⁷LuCl₃ nas condições padrões após 24 horas de incubação à temperatura ambiente sem adição de metionina no meio (A1) e com adição de metionina no meio (A2).

Em seguida, a SP(Nle¹¹)-DOTA foi radiomarcada com ¹⁷⁷LuCl₃ na condição padrão na ausência e presença de excesso de metionina no meio, sendo a pureza radioquímica das preparações determinadas por CLAE.

No cromatograma referente à SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada sem adição de metionina no meio (FIG. 10-A1) e no cromatograma da marcação com adição de excesso de metionina ao meio de marcação (FIG. 10-A2) são observados dois picos, o primeiro com TR = 2,80 minutos referente ao lutécio-177 livre e o segundo com o TR = 11,45 minutos referente SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada não oxidada, indicando assim que a substituição do resíduo de metionina por norleucina na posição 11 da SP é uma alternativa promissora para a prevenção efetiva da oxidação peptídica.

FIGURA 10 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada com ¹⁷⁷LuCl₃ nas condições padrões sem adição de metionina no meio (A1) e com adição de metionina no meio (A2).

Após incubação das preparações à temperatura ambiente por 24 horas, suas purezas radioquímicas foram determinadas por CLAE.

Os cromatogramas da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada na ausência de metionina (FIG. 11-A1) e na presença de excesso de metionina no meio (FIG. 11-A2) obtidos após a incubação mostram os mesmos picos apresentados imediatamente após a marcação, referentes ao ¹⁷⁷Lu livre e à SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada não oxidada, demonstrando assim uma boa estabilidade da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada quando incubada por 24 horas à temperatura ambiente.

FIGURA 11 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada com ¹⁷⁷LuCl₃ nas condições padrões após 24 horas de incubação à temperatura ambiente sem adição de metionina no meio (A1) e com adição de metionina no meio (A2).

Esses resultados corroboram a suposição de que o pico adicional (TR = 10,3 minutos) observado no perfil de CLAE da SP(Met¹¹)-DOTA radiomarcada corresponde à oxidação do resíduo de metionina da estrutura peptídica e

evidenciam a perspectiva de utilização da SP(Nle¹¹)-DOTA em substituição à SP(Met¹¹)-DOTA, tornando esse novo análogo um agente promissor para ser utilizado na terapia de tumores cerebrais por apresentar uma maior estabilidade e uma efetiva prevenção da oxidação peptídica. Entretanto, o resultado dos estudos de afinidade por células receptor-positivas será decisivo para a definição do real papel da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada.

5.3 Estudo dos parâmetros de radiomarcção da SP(Nle¹¹)-DOTA

Visando determinar a melhor condição de marcação da SP(Nle¹¹)-DOTA com ¹⁷⁷LuCl₃, foram realizados estudos para avaliar a influência da massa de peptídeo, da atividade de ¹⁷⁷Lu, da temperatura e do tempo de incubação na pureza radioquímica das marcações.

5.3.1 Efeito da atividade de ¹⁷⁷LuCl₃ sobre a pureza radioquímica

Após marcação da SP(Nle¹¹)-DOTA na condição padrão variando-se apenas a atividade de ¹⁷⁷Lu, a pureza radioquímica das preparações foi determinada por CCD em duplicata e os resultados estão apresentadas na TAB.2.

TABELA 2 - Efeito da atividade de ¹⁷⁷LuCl₃ sobre a pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu.

Atividade de ¹⁷⁷ Lu		Pureza radioquímica (%)	Número de marcações	Atividade específica (MBq/μg)
MBq	mCi			
37,0	1,0	99,35 ± 0,13	2	3,7
74,0	2,0	99,40 ± 0,24	6	7,4
111,0	3,0	97,58 ± 0,81	2	11,1
148,0	4,0	99,31 ± 0,45	4	14,8
185,0	5,0	98,74 ± 0,11	1	18,5
259,0	7,0	88,34 ± 0,89	1	25,9
481,0	13,0	47,84 ± 0,54	1	48,1

Altas purezas radioquímicas ($> 95\%$) foram obtidas com a atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ entre 37,0 e 185,0 MBq, obtendo-se um radiofármaco com atividade específica variando de 3,7 a 18,5 MBq/ μg .

Ao utilizarmos atividades mais altas do radioisótopo observa-se uma diminuição na pureza radioquímica das preparações, sugerindo que o limite de 18,5 MBq/ μg não deve ser ultrapassado.

Analisando a FIG. 12 nota-se que a maior pureza radioquímica foi obtida quando utilizada uma atividade de 74 MBq (2,0 mCi) de $^{177}\text{LuCl}_3$, porém a utilização de uma atividade de 148 MBq (4,0 mCi) foi determinada como condição padrão devido a maior atividade específica (14,8 MBq/ μg) e uma pureza radioquímica praticamente igual àquela obtida quando utilizada uma atividade de 74 MBq. Neste sentido, vale ressaltar que a atividade específica do peptídeo radiomarcado é uma característica muito importante que deve ser levada em conta, especialmente quando o radiofármaco é receptor-específico. A presença de excesso de massa do peptídeo não radiomarcado poderia competir com o peptídeo radiomarcado pelos sítios receptores nas células tumorais, diminuindo a captação tumoral.

FIGURA 12 - Efeito da atividade de $^{177}\text{LuCl}_3$ sobre a pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA- ^{177}Lu .

5.3.2 Efeito da massa de peptídeo sobre a pureza radioquímica

Dada a importância da atividade específica da radiomarcção, realizou-se ainda um estudo no qual a SP(Nle¹¹)-DOTA foi radiomarcada com ¹⁷⁷LuCl₃ utilizando-se a condição padrão, exceto a massa de peptídeo que foi variada com intuito de avaliar sua influência na pureza radioquímica e determinar a máxima atividade específica para a marcação do peptídeo SP(Nle¹¹)-DOTA com lutécio-177.

As purezas radioquímicas das preparações obtidas pela radiomarcção de diferentes massas de SP(Nle¹¹)-DOTA com ¹⁷⁷Lu foram determinadas por CCD em duplicata, sendo os resultados apresentados na TAB. 3.

Observa-se que purezas radioquímicas satisfatórias (> 95%) foram obtidas quando utilizadas massas de peptídeo entre 5,0 e 40,0 µg, obtendo-se um radiofármaco com atividade específica variando de 14,8 a 1,85 MBq/µg respectivamente, porém quando pequenas massas (1,0 e 2,5 µg) foram utilizadas as purezas radioquímicas foram baixas.

TABELA 3 - Efeito da massa de SP(Nle¹¹)-DOTA sobre a pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu

Massa de peptídeo (µg)	Pureza radioquímica (%)	Número de marcações	Atividade específica (MBq/µg)
1,0	18,75 ± 1,01	1	74,0
2,5	65,43 ± 3,72	1	29,6
5,0	99,19 ± 0,02	1	14,8
10,0	99,40 ± 0,24	6	7,4
20,0	99,67 ± 0,21	1	3,7
40,0	99,34 ± 0,46	1	1,85

A FIG. 13 mostra de forma clara que ao utilizarmos massas de SP(Nle¹¹)-DOTA acima de 5,0 µg obtivemos purezas radioquímicas superiores a 99%.

FIGURA 13 - Efeito da massa de SP(Nle¹¹)-DOTA sobre a pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu.

Estes resultados corroboram os resultados encontrados no item 5.4.1, indicando que a atividade específica máxima que deve ser utilizada, sem comprometer a pureza radioquímica, é de 14,8 MBq/µg, obtida nesse estudo a partir da marcação de uma massa de 5,0 µg de peptídeo, no entanto optou-se por definir como padrão a utilização de uma massa de 10,0 µg de peptídeo radiomarcado com uma atividade de 148 MBq (4,0 mCi), mantendo-se assim a atividade específica encontrada como ideal nos estudos de variação da atividade de ¹⁷⁷LuCl₃ e de massa de SP(Nle¹¹)-DOTA.

5.3.3 Efeito da temperatura sobre a pureza radioquímica

As purezas radioquímicas das preparações da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcadas com ¹⁷⁷LuCl₃ em diferentes temperaturas foram determinadas por CCD em duplicata e são apresentadas na TAB. 4.

TABELA 4 - Efeito da temperatura sobre a pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu.

Temperatura (°C)	Pureza radioquímica (%)	Número de marcações
10	0,76 ± 0,04	1
25	2,92 ± 1,05	1
40	14,54 ± 0,41	1
70	94,64 ± 3,89	4
80	94,98 ± 3,74	3
90	99,40 ± 0,24	6

De acordo com a TAB. 4 e FIG. 14 observa-se que a maior pureza radioquímica foi obtida quando a marcação foi realizada em uma temperatura de 90°C, sendo assim essa temperatura foi definida como temperatura padrão para marcação da SP(Nle¹¹)-DOTA com ¹⁷⁷Lu.

FIGURA 14 - Efeito da temperatura sobre a pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu.

5.3.4 Efeito do tempo de incubação sobre a pureza radioquímica

As purezas radioquímicas determinadas por CCD em duplicata foram satisfatórias (> 95%) para todos os tempos de incubação estudados (TAB. 5).

TABELA 5 - Efeito do tempo de incubação sobre a pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu.

Tempo (minutos)	Pureza radioquímica (%)	Número de marcações
5	96,95 ± 0,03	1
15	99,70 ± 0,18	2
30	99,40 ± 0,24	6
60	95,73 ± 2,14	2

Observa-se que os melhores resultados foram obtidos com 15 e 30 minutos de incubação e quando utilizados tempo menores (5 minutos) ou maiores (60 minutos) a pureza radioquímica sofre uma diminuição (FIG. 15). O tempo de 5 minutos provavelmente não foi suficiente para completar a reação de marcação e a queda da pureza radioquímica para o tempo de 60 minutos pode ser justificada pelo efeito de radiólise associado ao tempo excessivo de aquecimento ao qual o peptídeo foi submetido.

FIGURA 15 - Efeito do tempo de incubação sobre a pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu.

Como a diferença entre as purezas radioquímicas obtidas após 15 e 30 minutos de reação não foi significativa, a incubação de 30 minutos foi escolhida como padrão para a realização dos demais estudos devido à segurança na

reprodução de bons resultados e a compatibilidade com o tempo de meia-vida do elemento radioativo.

5.3.5 Condição padrão de marcação

Baseando-se nos resultados do estudo para avaliar a influência da variação dos parâmetros de marcação na pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA quando marcada com lutécio-177 a seguinte condição padrão de marcação foi definida: Adição de 148 MBq (4 mCi) da solução de ¹⁷⁷LuCl₃ em HCl 0,05N à 10 µg de SP(Nle¹¹)-DOTA diluída em tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5 seguida pela incubação a uma temperatura de 90°C por 30 minutos, sob agitação de 350 rpm.

5.4 Análise da estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada

A estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada sob refrigeração, em freezer e no soro humano foi analisada após radiomarcagem com alta atividade. O uso de agentes estabilizantes e da diluição visando um aumento na estabilidade *in vitro* do produto radiomarcado também foram avaliados.

5.4.1 Estudo da estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada com alta atividade

Após radiomarcagem da SP(Nle¹¹)-DOTA nas condições padrões extrapolando a relação massa:atividade determinada como padrão (10 µg peptídeo : 148 MBq de ¹⁷⁷LuCl₃) em 10 vezes, o que resultou na marcação de 100 µg do peptídeo com 1480 MBq (40,0 mCi), as preparações tiveram sua estabilidade *in vitro* no soro humano, sob refrigeração e no freezer analisadas por CCD e CLAE.

5.4.1.1 Análise da estabilidade sob refrigeração (2-8°C)

A estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada e armazenada sob refrigeração foi avaliada através da determinação de sua pureza radioquímica por CCD e CLAE imediatamente após a marcação e após incubação de 24, 48, 72, 96, 120 e 168 horas sob refrigeração (2-8°C).

Pela análise da pureza radioquímica determinada por CCD observou-se uma alta pureza radioquímica ($99,30 \pm 0,29\%$) imediatamente após a marcação, porém após incubação sob refrigeração a pureza radioquímica diminui gradualmente e em apenas 24 horas já são observados valores abaixo do satisfatório (FIG. 16).

FIGURA 16 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD após marcação com alta atividade e incubação sob refrigeração (2-8°C) por até 168 horas.

A análise dos cromatogramas apresentados na FIG. 17 confirma a baixa estabilidade sob refrigeração da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada com alta atividade.

Na FIG. 17-A são observados dois picos, um pequeno pico com TR = 2,80 minutos referente ao ¹⁷⁷Lu livre e um outro com uma área bem maior e um TR = 11,45 minutos referente a SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada, isso evidencia a alta pureza radioquímica obtida pela marcação.

Após 24 horas de incubação sob refrigeração (FIG. 17-B), observa-se um aumento significativo do pico referente ao ¹⁷⁷Lu livre (TR = 2,80 minutos) e o

surgimento de um novo pico, mais largo, com um TR = 10,90 minutos provavelmente referente à SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu degradada indicando assim uma baixa estabilidade desse radiofármaco quando armazenado sob refrigeração.

Análises realizadas após tempos de armazenamento maiores mostram um aumento gradual no pico referente ao lutécio-177 livre e uma diminuição no pico referente à SP(Nle¹¹)-DOTA, sendo que após sete dias de incubação o pico referente à SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada não é mais observado (FIG. 17-G).

FIGURA 17 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu imediatamente após marcação com alta atividade (A) e 24 horas (B), 48 horas (C), 72 horas (D), 96 horas (E), 120 horas (F) e 168 horas (G) após incubação sob refrigeração (2-8°C).

Essa baixa estabilidade do produto marcado com alta atividade é explicada pela radiólise (formação de radicais livres reativos para peptídeos) que pode ser evitada através do uso de agentes estabilizantes e do congelamento da amostra.

5.4.1.2 Análise da estabilidade em freezer (-20°C)

A SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada com alta atividade teve sua estabilidade *in vitro* avaliada após incubação de até 48 horas em freezer (-20°C).

As purezas radioquímicas determinadas imediatamente após a marcação e após incubação de 24 e 48 horas são apresentadas na FIG. 18 e demonstram uma boa estabilidade do radiofármaco quando armazenado no freezer por até dois dias.

FIGURA 18 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD após marcação com alta atividade e incubação em freezer (-20°C) por até 48 horas.

Essa boa estabilidade do radiofármaco no freezer foi confirmada pela análise por CLAE. O cromatograma obtido imediatamente após a marcação (FIG. 19-A) apresenta um pequeno pico referente ao ¹⁷⁷Lu livre (TR = 2,80 minutos) e um pico mais significativo referente à SP(Nle¹¹)-DOTA. Após 24 horas de armazenamento no freezer (FIG. 19-B) observa-se um pequeno aumento do pico referente ao lutécio-177 livre e o surgimento de um terceiro pico com TR = 10,90 minutos referente a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu degradada, porém o pico referente ao radiofármaco intacto (TR = 11,45 minutos) continua predominante confirmando assim os resultados obtidos por CCD.

FIGURA 19 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu imediatamente após marcação com alta atividade (A) e 24 horas após incubação em freezer (B).

Esses resultados indicam que o armazenamento do radiofármaco no freezer (-20°C) após marcação com alta atividade é um método efetivo para obtenção de uma maior estabilidade do produto, indicando que o congelamento da amostra tem um importante papel na prevenção da radiólise permitindo assim a utilização do radiofármaco em dia posterior a marcação.

Este estudo é de extrema importância para definição das condições a serem utilizadas para o transporte do radiofármaco, quando considera-se a possibilidade de aplicação clínica deste composto radiomarcado. Desta forma, o produto poderia ser comercializado, uma vez que o transporte na forma congelada pode ser realizado, sendo uma prática comum aos radiofármacos baseados em proteínas atualmente comercializados pelo IPEN.

5.4.1.3 Análise da estabilidade em soro humano a 37°C

A estabilidade da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em soro humano foi avaliada pela determinação de sua pureza radioquímica, por CCD, imediatamente após a marcação e após 1, 4 e 24 horas de incubação no soro a 37°C.

Os resultados apresentados na FIG. 20 mostram uma estabilidade satisfatória do radiofármaco em soro humano em até 24 horas após radiomarcagem indicando uma boa estabilidade metabólica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu.

FIGURA 20 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD após marcação com alta atividade e após incubação em soro humano à 37°C por 1, 4 e 24 horas.

Essa boa estabilidade metabólica é uma propriedade importante do radiofármaco para garantir assim sua permanência no local de administração na forma íntegra (terapia por administração intratumoral ou intracavitária) e o seu potencial para interação com os receptores das células tumorais.

Porém, a alta pureza radioquímica observada após 24 horas de incubação (99,15 ± 0,04%) associada a alta pureza radioquímica após 4 horas, chamam a atenção para uma possível falta de sensibilidade do sistema de CCD utilizado para determinação da estabilidade do radiofármaco em soro humano.

Nesse sistema, quando o pH do plasma está acima de 6,5, o ¹⁷⁷Lu livre formado, que normalmente se apresenta na forma de cátions (¹⁷⁷Lu⁺³), poderá apresentar-se na forma de óxidos de lutécio insolúveis, que permanecem na origem da fita apresentando um TR semelhante ao do peptídeo radiomarcado, causando uma falsa impressão de alta pureza radioquímica.

5.4.2 Influência do uso de agentes estabilizantes na estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada

Com base nos resultados obtidos no estudo de estabilidade *in vitro* após marcação com alta atividade, principalmente em relação à baixa estabilidade do produto marcado quando armazenado sob refrigeração (2-8°C), novos estudos de estabilidade visando avaliar o uso de agentes estabilizantes foram realizados.

O ácido ascórbico e o ácido genticóico foram estudados como possíveis estabilizantes, sendo adicionados ao meio após a marcação em uma concentração

final de 6 mg/mL. Para servir de controle, uma marcação sem adição de estabilizante foi realizada e submetida às mesmas condições.

5.4.2.1 Análise da estabilidade com agentes estabilizantes sob refrigeração (2-8°C)

A estabilidade das preparações foi avaliada através da determinação da pureza radioquímica por CCD e CLAE imediatamente após a marcação com alta atividade (1480 MBq:100µg peptídeo) e após incubação de 24, 48, 96 e 120 horas sob refrigeração (2-8°C).

Ao analisar os resultados obtidos por CCD (FIG.21), observa-se que a adição de agentes estabilizantes promove aumento da estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada quando armazenada sob refrigeração, sendo o ácido gentísico um agente estabilizante mais eficiente do que o ácido ascórbico nessas condições.

FIGURA 21 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD após marcação com alta atividade e após incubação sob refrigeração (2-8°C) por 24, 48, 96 e 120 horas com e sem adição de estabilizantes.

A análise das purezas radioquímicas realizada por CLAE e apresentada na FIG. 22 confirma os resultados encontrados por CCD.

Todas as preparações apresentaram alta pureza radioquímica imediatamente após a marcação, com um pico muito pequeno de ¹⁷⁷Lu livre (TR = 2,80 minutos) e um pico predominante de SP(Nle¹¹)-DOTA com TR = 11,45 minutos (FIG. 22-A1, B1 e C1).

Após 24 horas de incubação sob refrigeração, observa-se na preparação sem adição de estabilizante (FIG. 22-A2) um grande aumento no pico referente ao ^{177}Lu livre, tornando-se o principal, e uma significativa redução no pico da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada associada ao aparecimento de um terceiro pico com TR = 10,90 minutos referente ao radiofármaco degradado o que evidência a baixa estabilidade desse produto sob refrigeração em marcações com alta atividade sem adição de agentes estabilizantes, assim como observado no item 5.5.1.1. Já nas preparações contendo estabilizantes, apesar do surgimento desse terceiro pico (TR = 10,90 minutos) o pico referente à SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada continua predominante indicando uma maior estabilidade (FIG. 22-B2 e C2).

A análise da pureza radioquímica após 96 horas de incubação indica que a preparação contendo ácido ascórbico como estabilizante passa a apresentar o pico referente ao ^{177}Lu como principal (FIG. 22-B4), já a preparação utilizando ácido gentísico mantém como predominante o pico referente ao radiofármaco marcado (FIG. 22-C4).

Somente após incubação por 120 horas o pico referente ao lutécio-177 livre torna-se predominante na preparação contendo o ácido gentísico (FIG. 22-C5).

FIGURA 22 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA- ^{177}Lu sem adição de estabilizante (A), com adição de ácido ascórbico (B) e com adição de ácido gentísico (C) imediatamente após marcação com alta atividade (1) e após incubação por 24 horas (2), 48 horas (3), 96 horas (4) e 120 horas (5) sob refrigeração (2-8°C).

Esses resultados sugerem que o uso de agentes estabilizantes é um método efetivo para obtenção de uma maior estabilidade *in vitro* do produto marcado, pelo fato desses agentes prevenirem a radiólise, comum principalmente em radiofármacos utilizados em terapia devido às altas atividades necessárias.

5.4.2.2 Análise da estabilidade com agentes estabilizantes em freezer (-20°C)

Após marcação com alta atividade as preparações da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada contendo ácido ascórbico e ácido gentísico como agentes estabilizantes e a preparação sem adição de estabilizantes tiveram suas purezas radioquímicas determinadas por CCD e CLAE imediatamente após a marcação e após incubação por 24 horas em freezer (-20°C).

As preparações contendo agentes estabilizantes e mesmo a preparação sem adição de estabilizante mostraram uma boa estabilidade quando armazenadas no freezer, sendo as purezas radioquímicas determinadas por CCD, de todas elas, superior a 95% após 24 horas de congelamento (FIG. 23).

FIGURA 23 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD após marcação com alta atividade e após incubação em freezer (-20°C) por 24 horas com e sem adição de estabilizantes.

A análise dos cromatogramas obtidos por CLAE e apresentados na FIG. 24 evidencia essa boa estabilidade do radiofármaco quando armazenado em freezer.

Mesmo a preparação sem adição de estabilizante apresentando um terceiro pico referente ao radiofármaco degradado ($TR = 10,90$ minutos), após 24 horas, todas as preparações mostram o pico referente à $SP(Nle^{11})$ -DOTA radiomarcada ($TR = 11,45$ minutos) como o principal, indicando o predomínio do radiofármaco estável. Observa-se ainda que as preparações contendo agente estabilizante apresentam uma pureza radioquímica maior do que a preparação sem estabilizante (FIG. 24-A2, B2 e C2).

FIGURA 24 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C_{18} 200 mm x 4,60 mm, 5 μ m; fluxo 1,0 mL/min) da $SP(Nle^{11})$ -DOTA- ^{177}Lu sem adição de estabilizante (A), com adição de ácido ascórbico (B) e com adição de ácido gentísico (C) imediatamente após marcação com alta atividade (1) e após incubação por 24 horas (2) em freezer ($-20^{\circ}C$).

Esses resultados confirmam a hipótese de que o congelamento da amostra tem um importante papel na prevenção da radiólise e sugere que o simples congelamento do radiofármaco, sem a adição de estabilizante, é suficiente para garantir uma boa estabilidade ao produto.

5.4.2.3 *Análise da estabilidade com agentes estabilizantes em soro humano a $37^{\circ}C$*

A estabilidade da $SP(Nle^{11})$ -DOTA radiomarcada com e sem adição de agente estabilizante foi avaliada pela determinação de sua pureza radioquímica, por CCD, imediatamente após a marcação e após 1, 4 e 24 horas de incubação em soro humano a $37^{\circ}C$.

Os resultados apresentados na FIG.25 mostram uma estabilidade satisfatória do radiofármaco em soro humano até 24 horas após radiomarcção, indicando uma boa estabilidade metabólica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu.

Porém, as altas purezas radioquímicas observadas após 24 horas associadas ao aumento das purezas radioquímicas após 4 horas, indicam a necessidade de uma análise utilizando um método mais sensível e específico como a CLAE, já que nesse sistema o pH do plasma acima de 6,5, forma óxidos de lutécio insolúveis que apresentam um TR semelhante ao do peptídeo radiomarcado, causando uma falsa impressão de alta pureza radioquímica.

FIGURA 25 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD após marcação com alta atividade e após incubação em soro humano a 37°C por 1, 4 e 24 horas com e sem adição de estabilizantes.

5.4.3 Influência da diluição na estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada

A partir dos resultados obtidos no estudo de estabilidade *in vitro* com adição de agentes estabilizantes decidiu-se avaliar a influência de uma diluição, após a marcação com alta atividade, na estabilidade do produto marcado.

A SP(Nle¹¹)-DOTA foi radiomarcada com alta atividade e após marcação a mistura foi diluída até um volume 10 vezes maior (500 µL). Foram realizadas três marcações, em duas delas foi adicionado um dos estabilizantes (ácido ascórbico ou

ácido gentísico) e na terceira nenhum estabilizante foi adicionado, sendo todas diluídas com tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5 até o mesmo volume final e as estabilidades em soro, sob refrigeração e em freezer determinadas por CCD e CLAE.

5.4.3.1 Análise da estabilidade com diluição sob refrigeração (2-8°C)

As purezas radioquímicas imediatamente após a marcação com alta atividade seguida da diluição e após incubação de 24, 48, 72, 96 e 168 horas sob refrigeração (2-8°C) foram determinadas por CCD e CLAE.

Os resultados obtidos por CCD indicam que a diluição foi eficaz para manter a estabilidade da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada quando armazenada sob refrigeração (FIG. 26).

Purezas radioquímicas satisfatórias (> 95%) foram observadas em até 96 horas de incubação sob refrigeração para todas as amostras e até 168 horas no caso da preparação contendo ácido gentísico (FIG. 26).

FIGURA 26 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD imediatamente após marcação com alta atividade e diluição e após incubação sob refrigeração (2-8°C) por até 168 horas com e sem adição de estabilizantes.

Os resultados obtidos por CLAE confirmam essa efetividade da diluição após a marcação na obtenção de uma maior estabilidade do radiofármaco armazenado sob refrigeração. Observa-se pelos cromatogramas que todas as preparações

apresentam uma pureza radioquímica adequada após incubação por até sete dias sob refrigeração, mesmo sendo observado o surgimento de um pequeno pico com TR = 10,90 minutos referente à SP(Nle¹¹)-DOTA degradada nas preparações sem adição de estabilizante e com adição de ácido ascórbico. Já a preparação contendo ácido gentísico não apresenta esse pico (FIG. 27).

FIGURA 27 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu sem adição de estabilizante (A), com adição de ácido ascórbico (B) e com adição de ácido gentísico (C) imediatamente após marcação com alta atividade e diluição (1) e após incubação por 24 horas (2), 48 horas (3), 72 horas (4), 96 horas (5) e 168 horas (6) sob refrigeração (2-8°C).

5.4.3.2 Análise da estabilidade com diluição em freezer (-20°C)

A determinação das purezas radioquímicas por CCD indicam uma boa estabilidade de todas as preparações quando congeladas após diluição, sendo essas purezas satisfatórias para congelamentos de até 48 horas (FIG. 28).

FIGURA 28 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD imediatamente após marcação com alta atividade e diluição e após incubação em freezer (-20°C) por até 48 horas com e sem adição de estabilizantes.

A análise realizada por CLAE e apresentada na FIG. 29 confirma essa boa estabilidade do radiofármaco quando congelado por até 48 horas. Observa-se que a pureza radioquímica manteve-se praticamente inalterada em todas as preparações, exceto naquela sem adição de estabilizante que apresenta um terceiro pico muito baixo referente ao radiofármaco degradado (TR = 10,90 minutos).

FIGURA 29 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu sem adição de estabilizante (A), com adição de ácido ascórbico (B) e com adição de ácido gentísico (C) imediatamente após marcação com alta atividade e diluição (1) e após incubação por 24 horas (2) e 48 horas (3) em freezer (-20°C).

Esses resultados confirmam o importante efeito da diluição para obtenção de uma maior estabilidade *in vitro* do radiofármaco que associada ao congelamento da

amostra permite a utilização do radiofármaco em até dois dias com uma pureza radioquímica semelhante àquela obtida no momento da marcação.

5.4.3.3 Análise da estabilidade com diluição em soro humano a 37°C

A estabilidade da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em soro humano foi avaliada pela determinação de sua pureza radioquímica, por CCD e CLAE, imediatamente após a marcação e após 1, 4 e 24 horas de incubação em soro humano a 37°C.

Os resultados apresentados na FIG. 30 mostram purezas radioquímicas satisfatórias de todas as preparações após incubação no soro humano por até 24 horas, indicando uma boa estabilidade metabólica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu assim como observado anteriormente nos itens 5.5.1.3 e 5.5.2.3.

FIGURA 30 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu determinada por CCD imediatamente após marcação com alta atividade e diluição e após incubação em soro humano a 37°C por 1, 4 e 24 horas com e sem adição de estabilizantes.

Devido as altas purezas radioquímicas observadas após 24 horas associadas ao aumento das purezas radioquímicas entre 1 e 4 horas, a estabilidade desse radiofármaco também foi determinada por CLAE.

Os resultados obtidos por CLAE indicam que o radiofármaco começa a ser metabolizado pelas enzimas do soro antes de 1 hora, originando um metabólito formado pela SP(Nle¹¹)-DOTA degradada que apresenta-se no cromatograma como um pico com TR = 9,80 minutos. Uma estabilidade satisfatória é observada somente

até 4 horas de incubação. Após 24 horas no soro o radiofármaco está praticamente todo metabolizado e o ^{177}Lu livre torna-se predominante (FIG. 31).

FIGURA 31 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C_{18} 200 mm x 4,60 mm, 5 μm ; fluxo 1,0 mL/min) da SP(Nle¹¹)-DOTA- ^{177}Lu sem adição de estabilizante (A), com adição de ácido ascórbico (B) e com adição de ácido gêntísico (C) imediatamente após marcação com alta atividade e diluição (1) e após incubação por 1 hora (2), 4 horas (3) e 24 horas (4) em soro humano a 37°C. A porcentagem da área de cada pico está indicada.

Apesar deste radiofármaco não ser indicado para administração intravenosa, mas sim administração intratumoral ou intracavitária (cavidade gerada pela remoção do tumor cerebral), o estudo de estabilidade no plasma humano é sugestivo da estabilidade *in vivo* do composto. Espera-se que o radiofármaco permaneça no local de aplicação na forma íntegra, por um período de tempo necessário para que a radiação possa promover o efeito terapêutico desejado sobre as células tumorais. Caso parte deste radiofármaco saia do local da aplicação e atinja a circulação, poderá sofrer metabolização, gerando lutécio livre e derivados mais polares, conforme demonstrado neste estudo de CLAE.

5.4.3.4 Determinação da porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas *in vitro*

Os resultados da ligação da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada às proteínas plasmáticas *in vitro* após incubação a 37° C por diferentes tempos são apresentados na FIG. 32. Observa-se que apenas uma pequena fração do radiofármaco se liga às

proteínas plasmáticas, essa baixa ligação sugere um clareamento sanguíneo e uma biodistribuição *in vivo* rápidos.

Nota-se ainda que no intervalo entre 1 e 4 horas a fração do radiofármaco ligada permanece praticamente constante, sendo em seguida observada uma diminuição significativa na ligação às proteínas séricas para o tempo de 24 horas, provavelmente decorrente do processo de metabolização do peptídeo radiomarcado, conforme demonstrado no item 5.5.3.3.

FIGURA 32 - Porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu.

5.5 Estudos preliminares de marcação com ⁹⁰YCl₃

A SP(Nle¹¹)-DOTA foi radiomarcada com ⁹⁰YCl₃ utilizando-se a condição padrão para marcação com ¹⁷⁷LuCl₃ (item 5.4.5), sendo as purezas radioquímicas determinadas por CCD em duplicata. Após a realização de duas marcações uma pureza radioquímica de 98,94 ± 1,01% foi obtida, sugerindo que a marcação da SP(Nle¹¹)-DOTA com ⁹⁰Y, nas condições padronizadas para o ¹⁷⁷Lu, fornece bons resultados.

Visando avaliar a estabilidade *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA-⁹⁰Y uma marcação com alta atividade 592 MBq (16mCi) foi realizada, sendo a estabilidade do marcado analisada por CCD após armazenamento sob refrigeração (2-8°C) e em freezer (-20°C) por 24 horas.

Uma alta pureza radioquímica ($99,21 \pm 0,25\%$) foi observada imediatamente após a marcação, permanecendo satisfatória ($98,85 \pm 0,97\%$) após congelamento da amostra por 24 horas. Por outro lado, a amostra armazenada sob refrigeração apresentou diminuição da pureza radioquímica ($71,86 \pm 5,01\%$) após 24 horas, indicando uma baixa estabilidade da preparação quando armazenada sob refrigeração (TAB. 6).

TABELA 6 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-⁹⁰Y determinada por CCD após marcação com alta atividade e após incubação sob refrigeração (2-8°C) e em freezer por 24 e 48 horas.

Armazenamento	Pureza radioquímica (%)	
	Imediata	24 horas
Sob refrigeração (2-8°C)	$99,21 \pm 0,25$	$71,86 \pm 5,01$
Freezer (-20°C)	$99,21 \pm 0,25$	$98,85 \pm 0,97$

Esses resultados sugerem que o congelamento da amostra previne a radiólise e indicam a necessidade da utilização de outro artifício para melhorar a estabilidade da SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada, com altas atividades de ⁹⁰Y, quando se deseja armazenamento sob refrigeração.

Visando uma maior estabilidade, a adição de ácido gentísico ao meio (6 mg/mL) imediatamente após a marcação da SP(Nle¹¹)-DOTA com alta atividade (592 MBq) de ⁹⁰YCl₃ foi testada, sendo as purezas radioquímicas da preparação determinadas por CCD e CLAE após incubação de 24 e 48 horas sob refrigeração.

As purezas radioquímicas determinadas por CCD (TAB. 7) indicam uma boa estabilidade da preparação contendo ácido gentísico mesmo após armazenamento sob refrigeração por até 48 horas.

TABELA 7 - Pureza radioquímica da SP(Nle¹¹)-DOTA-⁹⁰Y determinada por CCD após marcação com alta atividade e incubação sob refrigeração (2-8°C) por até 48 horas com adição de ácido gentísico (6 mg/mL)

Condição de marcação	Pureza radioquímica (%)		
	Imediata	24 horas	48 horas
Com ácido gentísico (6 mg/mL)	$97,48 \pm 0,32$	$98,66 \pm 0,71$	$98,17 \pm 1,14$

A análise da pureza radioquímica realizada por CLAE, confirma o aumento da estabilidade da SP(Nle¹¹)-DOTA-⁹⁰Y após adição de ácido gentísico ao meio.

Observa-se imediatamente após a marcação (FIG. 33-A) a presença de dois picos, o primeiro com TR = 2,15 minutos referente ao ⁹⁰Y livre e o segundo com TR = 10,25 minutos referente à SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada. Após incubação por 24 (FIG. 33-B) e 48 horas (FIG. 33-C) esses dois picos continuam predominantes, porém surge um pequeno pico (TR = 9,87 minutos) referente à SP(Nle¹¹)-DOTA radiomarcada degradada. A diminuição nos TRs é devido ao maior fluxo utilizado (1,5 mL/min).

FIGURA 33 - Perfil de CLAE (radioativo; coluna C₁₈ 200 mm x 4,60 mm, 5 µm; fluxo 1,5 mL/min) da SP (Nle¹¹)-DOTA-⁹⁰Y imediatamente após marcação com alta atividade (A), 24 horas (B) e 48 horas (C), após incubação sob refrigeração (2-8°C) com adição de ácido gentísico (6 mg/mL).

5.6 Estudo celular *in vitro*

Para avaliar a especificidade do radiofármaco SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu na identificação do tumor cerebral foram realizados estudos celulares *in vitro* com as células de tumor cerebral M059J e U-87MG.

A TAB. 8 apresenta os resultados obtidos após realização do ensaio com as células U-87MG. Observa-se que a SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na ausência de metionina, apresenta uma menor porcentagem de ligação específica (%LE) quando comparada a SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na presença de metionina, e a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, sugerindo que a oxidação do resíduo de metionina interfere na ligação do radiofármaco a seus receptores nas células tumorais.

TABELA 8 - Estudo de ligação *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu e da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada sem e com adição de metionina ao meio (6 mg/mL), utilizando células tumorais de glioblastoma humano U87MG.

	SP(Met ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	SP(Met ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu + excesso metionina	SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu
%LT	0,89 ± 0,06	1,24 ± 0,03	2,50 ± 0,07
%LNE	0,62 ± 0,06	0,86 ± 0,04	1,75 ± 0,06
%LE	0,26 ± 0,03	0,39 ± 0,04	0,75 ± 0,12

Ao analisarmos a porcentagem de ligação específica relativa (%LE_r), observa-se uma %LE_r em torno de 30,0% para todas as preparações, indicando uma boa especificidade da SP por essas células. Uma menor %LE_r (p=0,01) da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na ausência de metionina, foi observada quando comparada à SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu indicando que a oxidação do resíduo de metionina interfere na ligação do radiofármaco à seus receptores específicos nas células tumorais (FIG. 34).

Observa-se ainda na FIG. 34 que apesar de apresentar o dobro da porcentagem de ligação total (%LT) às células, a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou uma menor %LE_r quando comparada a SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na presença de metionina, porém essa diferença não foi significativa (p=0,21) e sugere que a substituição do aminoácido metionina por norleucina na posição 11 não compromete a capacidade de ligação da SP às células de glioblastoma humano U-87MG.

Com base nos resultados obtidos com as células tumorais U-87MG, o radiofármaco SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcado na ausência de metionina no meio de marcação, não foi utilizado nos estudos de ligação *in vitro* utilizando células M059J.

FIGURA 34 - Estudo da ligação *in vitro* da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu e da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na presença e ausência de excesso de metionina no meio (6 mg/mL), com células tumorais de glioblastoma humano U-87MG.

Ensaio de ligação *in vitro* utilizando as células de glioma humano M059J foram realizados para a SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na presença de metionina e para a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, que apresentaram os melhores resultados nos estudos utilizando as células U-87MG, sendo os resultados apresentados na TAB. 9.

TABELA 9 - Estudo de ligação *in vitro* da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada com adição de metionina ao meio (6 mg/mL) e da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, utilizando células tumorais de glioma humano M059J.

	SP(Met ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu + excesso metionina	SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu
% LT	1,95 ± 0,06	2,24 ± 0,06
% LNE	0,68 ± 0,10	0,79 ± 0,06
% LE	1,27 ± 0,03	1,44 ± 0,10

Os resultados obtidos demonstram a especificidade dos radiofármacos utilizados pelas células M059J, com percentagens de ligação específica (%LE) maiores que as observadas para as células U-87MG. Uma maior %LE para a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu foi observada quando comparada à SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na presença de metionina (TAB. 9), confirmando os resultados encontrados nos ensaios com as células U-87MG.

Ao compararmos as %LEr, observa-se uma discretamente maior ($p=0,25$) %LEr para a SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na presença de metionina, quando comparada à SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, confirmando que a alteração do

aminoácido metionina na posição 11 da SP pelo aminoácido norleucina, visando a prevenção da oxidação peptídica, não compromete a capacidade de ligação desse neuropeptídeo aos receptores tumorais (FIG.35).

FIGURA 35 - Estudo da ligação *in vitro* da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, radiomarcada na presença de excesso de metionina no meio (6 mg/mL) e da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu com células tumorais de glioma humano M059J.

Pelo fato dos radiofármacos utilizados apresentarem uma maior %LE às células de glioma humano M059J, essas células foram utilizadas para realização dos estudos de biodistribuição em animais com modelo tumoral, sendo os resultados desse estudo apresentados no item 5.8.2.

5.7 Estudo de biodistribuição

Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEN e realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). Foram utilizados camundongos *BALB/c* para os estudos de biodistribuição em animais saudáveis e camundongos *Nude* para os estudos de biodistribuição em animais com modelo tumoral, todos adultos e machos.

5.7.1 Estudo de biodistribuição em animais saudáveis

Após receber uma dose de 1,85 Mbq/100µL do radiofármaco, por via endovenosa caudal, os animais foram sacrificados em 1, 4 e 24 horas, sendo utilizados três animais para cada tempo.

Os resultados do estudo de biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em %AI/órgão estão apresentados na TAB. 10 e FIG. 36.

Observa-se um rápido clareamento sanguíneo e captação significativa e persistente nos rins após a administração, indicando que a excreção se dá principalmente por via renal.

Não foi observada captação no cérebro, demonstrando que o radiofármaco, assim como esperado, não atravessa a barreira hematoencefálica, por isso sua indicação na terapia de tumores cerebrais é através de uma injeção intratumoral ou intracavitária.

A captação nos ossos representa a liberação do lutécio-177, a partir da metabolização do peptídeo radiomarcado *in vivo*. A captação óssea observada para o composto foi baixa e não apresentou incremento com o tempo, indicando que o produto radiomarcado não libera o radionuclídeo *in vivo*, sendo provavelmente eliminado na forma complexada ao DOTA.

Observa-se também discreta captação hepática e intestinal, o que sugere que o composto seja parcialmente excretado pela via intestinal.

TABELA 10 - Biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *BALB/c* machos sadios em %AI/órgão (n=3)

ORGÃO	% AI/órgão		
	1 Hora	4 Horas	24 Horas
SANGUE	0,523 ± 0,053	0,074 ± 0,018	0,020 ± 0,006
CORAÇÃO	0,018 ± 0,002	0,006 ± 0,001	0,003 ± 0,001
PULMÕES	0,072 ± 0,032	0,035 ± 0,015	0,022 ± 0,002
PÂNCREAS	0,034 ± 0,015	0,032 ± 0,003	0,029 ± 0,019
BAÇO	0,024 ± 0,001	0,022 ± 0,011	0,021 ± 0,003
ESTÔMAGO	0,141 ± 0,011	0,120 ± 0,018	0,119 ± 0,002
FÍGADO	0,385 ± 0,057	0,255 ± 0,015	0,293 ± 0,080
RINS	2,429 ± 0,304	2,788 ± 0,815	1,954 ± 0,325
INTESTINOS	4,005 ± 0,282	4,252 ± 1,154	3,460 ± 0,471
MÚSCULO	1,125 ± 0,425	1,053 ± 0,607	0,820 ± 0,375
OSSO	0,620 ± 0,109	0,644 ± 0,202	0,613 ± 0,183
CÉREBRO	0,009 ± 0,002	0,004 ± 0,003	0,001 ± 0,000

FIGURA 36 - Biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *BALB/c* machos saudáveis em % Al/órgão (n=3)

Os resultados em porcentagem de atividade injetada por grama de tecido ou mililitro de sangue (%Al/g ou %Al/mL) são apresentados na TAB. 11 e FIG. 37.

TABELA 11 - Biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *BALB/c* machos saudáveis em %Al/g de órgão ou mL de sangue (n=3)

ÓRGÃO	% Al/g de órgão ou mL e sangue		
	1 Hora	4 Horas	24 Horas
SANGUE	0,294 ± 0,018	0,047 ± 0,025	0,012 ± 0,003
CORAÇÃO	0,282 ± 0,055	0,083 ± 0,025	0,036 ± 0,009
PULMÕES	0,840 ± 0,306	0,152 ± 0,032	0,166 ± 0,022
PÂNCREAS	0,275 ± 0,063	0,191 ± 0,017	0,094 ± 0,121
BAÇO	0,541 ± 0,111	0,273 ± 0,036	0,474 ± 0,015
ESTÔMAGO	0,558 ± 0,082	0,437 ± 0,070	0,308 ± 0,012
FÍGADO	0,433 ± 0,139	0,253 ± 0,085	0,239 ± 0,062
RINS	11,216 ± 2,820	10,524 ± 0,013	7,837 ± 0,396
INTESTINOS	1,996 ± 0,077	2,183 ± 0,310	1,548 ± 0,013
MÚSCULO	0,125 ± 0,031	0,103 ± 0,036	0,045 ± 0,055
OSSO	0,238 ± 0,073	0,282 ± 0,087	0,284 ± 0,095
CÉREBRO	0,030 ± 0,002	0,012 ± 0,006	0,002 ± 0,000

FIGURA 37 - Biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *BALB/c* machos sadios em % Al/g de órgão ou mL de sangue (n=3)

Visando comparar a biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu e da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em animais sadios, os estudos de biodistribuição foram realizados com o derivado SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu como descritos no item 4.2.7.1, utilizando-se camundongos *BALB/c* machos sadios em triplicata.

Os resultados obtidos no estudo de biodistribuição da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em porcentagem de atividade injetada por órgão (%Al/órgão) estão apresentados na TAB.12 e FIG.38

TABELA 12 - Biodistribuição da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *BALB/c* machos sadios em %Al/órgão (n=3)

ORGÃO	% Al/órgão		
	1 Hora	4 Horas	24 Horas
SANGUE	0,396 ± 0,047	0,116 ± 0,035	0,137 ± 0,034
CORAÇÃO	0,013 ± 0,003	0,035 ± 0,013	0,008 ± 0,003
PULMÕES	0,088 ± 0,025	0,091 ± 0,058	0,049 ± 0,015
PÂNCREAS	0,049 ± 0,009	0,020 ± 0,006	0,034 ± 0,013
BAÇO	0,070 ± 0,022	0,066 ± 0,024	0,054 ± 0,002
ESTÔMAGO	0,298 ± 0,034	0,377 ± 0,183	0,205 ± 0,007
FÍGADO	0,441 ± 0,029	0,456 ± 0,080	0,389 ± 0,053
RINS	4,937 ± 0,162	4,388 ± 1,591	3,275 ± 0,631
INTESTINOS	6,998 ± 0,188	7,009 ± 0,382	6,884 ± 1,209
MÚSCULO	0,907 ± 0,104	1,248 ± 0,144	1,113 ± 0,573
OSSO	1,792 ± 0,169	1,397 ± 0,327	1,509 ± 0,230
CÉREBRO	0,012 ± 0,004	0,015 ± 0,006	0,004 ± 0,001

FIGURA 38 - Biodistribuição da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *BALB/c* machos sadios em % AI/órgão (n=3)

Os resultados obtidos no estudo de biodistribuição da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em porcentagem de atividade injetada por grama de tecido ou mililitro de sangue (%AI/g ou %AI/mL) estão apresentados na TAB. 13 e FIG. 39.

TABELA 13 - Biodistribuição da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *BALB/c* machos sadios em %AI/g de órgão ou mL de sangue (n=3)

ORGÃO	% AI/g de órgão ou mL e sangue		
	1 Hora	4 Horas	24 Horas
SANGUE	0,197 ± 0,030	0,064 ± 0,023	0,072 ± 0,011
CORAÇÃO	0,147 ± 0,054	0,304 ± 0,284	0,072 ± 0,019
PULMÕES	0,473 ± 0,024	0,555 ± 0,195	0,248 ± 0,037
PÂNCREAS	0,225 ± 0,021	0,181 ± 0,033	0,196 ± 0,027
BAÇO	0,995 ± 0,312	0,927 ± 0,154	0,902 ± 0,033
ESTÔMAGO	0,875 ± 0,063	1,314 ± 0,610	0,679 ± 0,087
FÍGADO	0,385 ± 0,066	0,457 ± 0,142	0,358 ± 0,012
RINS	17,982 ± 0,799	16,032 ± 4,212	12,539 ± 1,064
INTESTINOS	3,243 ± 0,220	3,599 ± 0,301	3,485 ± 0,488
MÚSCULO	0,088 ± 0,013	0,133 ± 0,023	0,118 ± 0,071
OSSO	0,577 ± 0,033	0,503 ± 0,122	0,517 ± 0,028
CÉREBRO	0,045 ± 0,002	0,037 ± 0,017	0,011 ± 0,003

FIGURA 39 - Biodistribuição da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *BALB/c* machos sadios em %AI/g de órgão ou mL de sangue (n=3)

Visando facilitar a interpretação dos resultados obtidos no estudo comparativo de biodistribuição da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu e da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, em animais sadios, os resultados organizados considerando-se os órgão de maior interesse (sangue, rins, ossos), nos diferentes tempos do estudo (1, 4 e 24 horas).

A FIG. 40 apresenta os resultados em porcentagem de atividade injetada por mililitro de sangue (%AI/mL), nos diferentes tempos do estudo.

FIGURA 40 - Comparação da biodistribuição, em %AI/ mL de sangue, entre a SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu e a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *BALB/c* machos sadios, 1 hora, 4 horas e 24 horas após administração do radiofármaco (n= 3).

Um rápido clareamento sanguíneo foi observado para os dois radiofármacos, confirmando os resultados encontrados no item 5.5.3.4 que indicaram uma baixa porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, sugerindo seu rápido clareamento sanguíneo (FIG. 40).

A FIG. 41 apresenta os resultados da porcentagem de atividade injetada por grama de rim (%AI/g órgão), nos diferentes tempos do estudo. Uma alta captação renal foi observada para os dois radiofármacos, indicando que a eliminação em ambos os casos, ocorre preferencialmente por via renal. O fato da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentar uma maior captação renal, sugere que esse radiofármaco seja eliminado de forma mais rápida, provavelmente devido a sua maior polaridade. A substituição do aminoácido metionina pelo aminoácido norleucina, para obtenção da SP(Nle¹¹)-DOTA, confere uma menor polaridade à esse novo análogo, tendo como consequência uma eliminação renal mais lenta (FIG. 41).

FIGURA 41 - Comparação da biodistribuição, em %AI/g de órgão para os rins, entre a SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu e a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos BALB/c machos saudáveis, 1 hora, 4 horas e 24 horas após administração do radiofármaco (n= 3).

Do ponto de vista dosimétrico, essa eliminação renal mais lenta da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu pode apresentar-se como uma desvantagem, considerando-se que eventualmente uma parte do radiofármaco administrado localmente no cérebro pode atingir a circulação.

Uma maior captação óssea da SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu é observada ao compararmos as porcentagem de atividade injetada por grama de osso (%AI/g órgão). Como o lutécio-177 livre tende a se acumular no tecido ósseo, essa maior captação óssea observada para a SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu é indicativa de que esse radiofármaco apresenta uma maior instabilidade *in vivo* (FIG. 42).

FIGURA 42 - Comparação da biodistribuição, em %AI/g de órgão para os ossos, entre a SP(Met¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu e a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos BALB/c machos saudáveis, 1 hora, 4 horas e 24 horas após administração do radiofármaco (n= 3).

5.7.2 Estudo de biodistribuição em animais com modelo tumoral

Para realização dos estudos de biodistribuição em animais com modelo tumoral, utilizou-se as células tumorais de glioma humano M059J para o desenvolvimento do modelo tumoral, pois os resultados dos estudos de ligação às células *in vitro*, apresentados no item 5.7, indicaram uma maior porcentagem de ligação específica do radiofármaco à essa linhagem de célula, quando comparada às células de U-87MG.

Após aplicação das células M059J e desenvolvimento da massa tumoral, os animais receberam por via endovenosa (veia caudal) 0,185 MBq (50 µCi) da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu diluídos em 100 µL de solução salina 0,9%, sendo o estudo

de biodistribuição realizado como descrito para os animais sadios no item 4.2.7.1, exceto pelo fato do tumor ter sido considerado neste estudo.

Os resultados do estudo de biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em %AI/órgão estão apresentados na TAB. 14 e FIG. 43.

TABELA 14 - Biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *Nude* machos com modelo tumoral de glioma (M059J) em %AI/órgão (n=4)

ORGÃO	% AI/órgão		
	1 Hora	4 Horas	24 Horas
SANGUE	6,85 ± 0,27	5,22 ± 0,45	1,86 ± 0,76
CORAÇÃO	0,14 ± 0,07	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
PULMÕES	1,67 ± 0,43	1,24 ± 0,36	0,07 ± 0,04
PÂNCREAS	0,20 ± 0,07	0,06 ± 0,02	0,02 ± 0,00
BAÇO	0,27 ± 0,14	0,42 ± 0,05	0,15 ± 0,09
ESTÔMAGO	1,62 ± 0,74	0,72 ± 0,29	0,28 ± 0,12
FÍGADO	4,50 ± 1,23	5,46 ± 0,48	1,74 ± 0,09
RINS	17,34 ± 7,95	20,49 ± 5,50	7,00 ± 1,89
INTESTINOS	22,15 ± 4,23	20,44 ± 2,74	7,84 ± 3,39
MÚSCULO	8,19 ± 2,50	4,01 ± 1,49	3,831 ± 2,47
OSSO	7,55 ± 1,34	7,88 ± 1,27	4,04 ± 1,91
CÉREBRO	0,15 ± 0,08	0,04 ± 0,01	0,01 ± 0,00
TUMOR	0,45 ± 0,33	1,84 ± 0,49	0,54 ± 0,24

FIGURA 43 - Biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *Nude* machos com modelo tumoral de glioma (M059J) em % AI/órgão (n=4)

Os resultados em porcentagem de atividade injetada por grama de tecido ou mililitro de sangue (%AI/g ou %AI/mL) são apresentados na TAB. 15 e FIG. 44.

TABELA 15 - Biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *Nude* machos com modelo tumoral de glioma (M059J) em %AI/g de órgão ou mL de sangue (n=4)

ORGÃO	% AI/g de órgão ou mL e sangue		
	1 Hora	4 Horas	24 Horas
SANGUE	5,06 ± 0,22	3,58 ± 0,60	1,32 ± 0,55
CORAÇÃO	2,15 ± 0,72	0,53 ± 0,29	0,25 ± 0,15
PULMÕES	11,27 ± 2,52	9,44 ± 4,11	0,51 ± 0,23
PÂNCREAS	3,13 ± 0,69	0,65 ± 0,26	0,22 ± 0,05
BAÇO	5,71 ± 2,51	3,68 ± 1,91	1,11 ± 0,49
ESTÔMAGO	4,58 ± 1,03	2,98 ± 1,47	1,05 ± 0,19
FÍGADO	4,90 ± 1,26	5,83 ± 1,47	1,84 ± 0,82
RINS	81,84 ± 29,09	94,40 ± 20,84	34,05 ± 14,84
INTESTINOS	12,41 ± 2,18	10,35 ± 3,28	4,35 ± 0,98
MÚSCULO	1,17 ± 0,31	0,55 ± 0,20	0,53 ± 0,35
OSSO	3,59 ± 0,61	3,54 ± 0,89	1,86 ± 0,81
CÉREBRO	0,44 ± 0,24	0,14 ± 0,04	0,04 ± 0,03
TUMOR	4,51 ± 1,42	2,64 ± 0,85	1,15 ± 0,47

FIGURA 44 - Biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *Nude* machos com modelo tumoral de glioma (M059J) em %AI/g de órgão ou mL de sangue (n=4).

Os resultados obtidos após realização do estudo de biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em animais com modelo tumoral confirmam os resultados observados no estudo de biodistribuição em animais sadios, item 5.8.1.

Um rápido clareamento sanguíneo para esse radiofármaco foi observado, assim como uma alta captação nos rins, indicando que a excreção se dá principalmente por via renal (FIG. 44).

A baixa captação observada no cérebro, confirma que o radiofármaco, assim como esperado, não atravessa a barreira hematoencefálica, sendo assim indicado na terapia de tumores cerebrais como uma injeção intratumoral ou intracavitária (FIG. 44).

A baixa captação no fígado e nos ossos indicam uma boa estabilidade do radiofármaco *in vivo* e a ausência de impurezas, visto que o ¹⁷⁷Lu coloidal se acumula no fígado e as espécies catiônicas nos ossos (FIG. 44).

A captação no tumor sugere a presença de receptores específicos para a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu nas células tumorais M059J (FIG. 44).

A TAB. 16 apresenta a razão entre a %AI/g de tumor e a %AI/mL de sangue para o estudo de biodistribuição em animais com modelo tumoral.

TABELA 16 - Razão tumor : sangue da biodistribuição da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos *Nude* machos com modelo tumoral de glioma (M059J) em %AI/g de tumor : %AI/ mL de sangue, 1 hora, 4 horas e 24 horas após administração intravenosa (n=4).

SP(Nle ¹¹)-DOTA- ¹⁷⁷ Lu	1 hora	4 horas	24 horas
%AI/g de tumor	4,51	2,64	1,15
%AI/ mL de sangue	5,06	3,58	1,32
%AI/g de tumor : %AI/ mL de sangue	0,89	0,74	0,87

Observa-se na TAB. 16 que a razão tumor : sangue se mantém constante após 24 horas da administração, indicando que a ligação do radiofármaco à célula tumoral é receptor específica.

Essa especificidade da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu pelas células tumorais de glioma humano M059J, confirmam uma potencial aplicação desse radiofármaco na terapia de tumores cerebrais.

Os resultados deste trabalho estimulam o desenvolvimento de um novo protocolo de estudo pré-clínico, utilizando modelos de animais com tumor cerebral, para avaliar a eficácia de ligação e permanência do radiofármaco após administração intratumoral, estimar danos ao tecido cerebral sadio adjacente ao tumor e avaliar a distribuição sistêmica da SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu, com vistas a obter dados para avaliação dosimétrica. Tais estudos são fundamentais para garantir a segurança da aplicação clínica deste novo radiofármaco.

6 CONCLUSÕES

A análise da oxidação do resíduo de metionina da SP(Met¹¹)-DOTA, comprovou a importância da adição de excesso de metionina no meio de marcação para prevenção da oxidação desse peptídeo. A alta estabilidade apresentada, nos estudos, pelo novo análogo da SP, SP(Nle¹¹)-DOTA, durante e após o processo de radiomarkação, torna a utilização desse análogo uma alternativa promissora para prevenção efetiva da oxidação peptídica.

Após estudar os parâmetros da radiomarkação da SP(Nle¹¹)-DOTA, a adição de 148 MBq (4 mCi) da solução de ¹⁷⁷LuCl₃ em HCl 0,05N à 10 µg de SP(Nle¹¹)-DOTA diluída em tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5 seguida pela incubação a uma temperatura de 90°C por 30 minutos, sob agitação de 350 rpm foi definida com condição padrão.

A SP(Nle¹¹)-DOTA apresenta uma baixa estabilidade *in vitro*, menos de 24 horas, quando radiomarcada com alta atividade de ¹⁷⁷LuCl₃ e mantida sob refrigeração (2-8°C). O congelamento (-20°C) e o uso de agentes estabilizantes (ácido ascórbico e ácido gentísico), em uma concentração final de 6 mg/mL, apresentaram-se como métodos efetivos para garantir uma alta estabilidade *in vitro*, após a marcação com alta atividade, podendo assim o radiofármaco ser utilizado em dia posterior à marcação. A diluição após a marcação, para um volume 10 vezes maior, também mostrou-se um método efetivo para garantir a estabilidade *in vitro* do produto, permitindo assim que seja armazenado e utilizado em dia posterior.

Os estudos de marcação da SP(Nle¹¹)-DOTA com ⁹⁰YCl₃ apresentaram bons resultados e o radiofármaco SP(Nle¹¹)-DOTA-⁹⁰Y mostrou uma boa estabilidade *in vitro*, quando congelado (-20°C) e quando utilizado ácido gentísico, em uma concentração final de 6 mg/mL, indicando a possibilidade de marcação desse análogo com Ítrio-90 (⁹⁰Y), para utilização na terapia de tumores cerebrais.

Após realização dos ensaios de ligação às células U-87 MG e M059J, concluiu-se que a oxidação do resíduo de metionina interfere na ligação do radiofármaco aos seus receptores específicos, sendo necessário a prevenção da oxidação peptídica para que a ligação ocorra de forma adequada. A SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou uma boa especificidade pelas células tumorais, principalmente pelas células de glioma humano M059J, sugerindo que a substituição do aminoácido metionina por

norleucina na posição 11 não compromete a capacidade de ligação da SP(Nle¹¹) às células tumorais.

Por apresentar uma baixa porcentagem de ligação às proteínas plasmáticas, a SP(Nle¹¹)-DOTA-¹⁷⁷Lu mostra um rápido clareamento sanguíneo e biodistribuição, sendo preferencialmente eliminada por via renal. Esse radiofármaco apresenta uma boa estabilidade *in vivo* e se liga às células tumorais por ligações receptor específicas. No entanto é incapaz de atravessar a barreira hematoencefálica, sendo sua indicação através de uma injeção intratumoral ou intracavitária.

Com base nesses dados conclui-se que a SP(Nle¹¹)-DOTA, radiomarcada com ¹⁷⁷Lu, fornece um radiofármaco inédito que devido às suas propriedades *in vitro* e *in vivo* favoráveis, apresenta uma potencial aplicação na terapia de tumores cerebrais, representando uma nova possibilidade dentro do limitado arsenal terapêutico para esse tipo de tumor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSQUER, C.; KRAEBER-BODÉRE, F.; CHATAL, J.F. Current status and perspectives in peptide receptor radiation therapy. **Curr Pharm Des.** v.15, p.2453-62, 2009.

ARAÚJO, E.B.; COLTURATO, M.T.; MENGATTI, J.; MASSICANO, A.V.F.; PUJATTI, P.B.; AKANJI, A.; COUTO, R.M.; CARVALHO, G.L.; OLIVEIRA, R. **Preclinical evaluation and formulation of ^{177}Lu and ^{90}Y -labelled peptides and monoclonal antibodies for cancer therapy.** IN: Report on the 3rd Research Co-ordination Meeting. IAEA. Macedônia, 2013

ARAÚJO, E.B.; PUJATTI, P.B.; MENGATTI, J. Radiolabeling of substance P with lutetium-177 and biodistribution study in rat pancreatic tumor xenografted nude mice. **Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).** v.56, p. 12-7, 2010.

BRASILEIRO FILHO, G.; GUIMARÃES, R.C.; BOGLIOLO, L. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia Geral.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. Cap. 8

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

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

CORDIER, D.; FORRER, F.; BRUCHERTSEIFER, F.; MORGENSTERN, A.; APOSTOLIDIS, C.; GOODS, S.; MULLER-BRAND, J.; MACKE, H.; REUBI, J.C.; MERLO, A. Targeted alpha-radionuclide therapy of functionally critically located gliomas with ^{213}Bi -DOTA-[Thi₈,Met(O₂)₁₁]-substance P: a pilot trial. **Eur J Nucl Med Mol Imaging.** v.37, p.1335-44, 2010a.

CORDIER, D.; FORRER, F.; KNEIFEL, S.; SAILER, M.; MARIANI, L.; MACKLE, H.; MULLER-BRAND, J.; MERLO, A. Neoadjuvant targeting of glioblastoma multiforme with radiolabeled DOTAGA-substance P results from a phase I study. **J Neurooncol.** v.100, p.129-36, 2010b.

DE VISSER, M.; VERWIJNEN, S.M.; DE JONG, M. Update: improvement strategies for peptide receptor scintigraphy and radionuclide therapy. **Cancer Biother Radiopharm.** v.23, p.137-57, 2008.

DIJKGRAAF, I.; BOERMAN, O.C.; OVEN, W.C.; CORSTENS, F.H.; GOTTHARDT, M. Development and application of peptide-based radiopharmaceuticals. ***Anticancer Agents Med Chem.*** v.7, p.543-51, 2007.

DONG, C.; LIU, Z.; WANG, F. Peptide-based radiopharmaceuticals for targeted tumor therapy. ***Current Medicinal Chemistry.*** v.21, p.139-152, 2014.

ELGAZZAR, A. H. ***The pathophysiologic basis of nuclear medicine.*** Springer, 2006.

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.

GOTO, T.; TANAKA, T. Tachykinins and tachykinin receptors in bone. ***Microscopy research and technique,*** v. 58, n. 2, p. 91-97, 2002.

HENNIG, I.M.; LAISSUE, J.A.; HORISBERGER, U.; REUBI, J.C. Substance-P receptors in human primary neoplasms: tumoral and vascular localization. ***Int J Cancer.***v.61, p.786-92, 1995.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativa 2014 Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf> >. Acesso em 19 abr. 2015.

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

KHAN, I.U.; BECK-SICKINGER, A.G. Targeted tumor diagnosis and therapy with peptide hormones as radiopharmaceuticals. ***Anticancer Agents Med Chem.*** v.8, p. 186-99, 2008.

KNEIFEL, S.; BERNHARDT, P.; UUSIJARVI, H.; GOOD, S.; PLASSWILM, L.; BUITRAGO-TÉLLEZ, C.; MULLER-BRAND, J.; MACKE, H.; MERLO, A. Individual voxelwise dosimetry of targeted ⁹⁰Y labeled substance P radiotherapy for malignant gliomas. ***Eur J Nucl Med Mol Imaging.*** v.34, p.1388-95, 2007.

KNEIFEL, S.; CORDIER, D.; GOODS, S.; IONESCU, M.C.; GHAFFARI, A.; HOFER, S.; KRETZSCHMAR, M.; TOLNAY, M.; APOSTOLIDIS, C.; WASER, B.; ARNOLD, M.; MAECKE, H.R.; REUBI, J.C.; MERLO, A. Local targeting of malignant gliomas by the diffusible peptidic vector 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1-glutaric acid-4,7,10-triacetic acid-substance P. ***Clin Cancer Res.*** v.12, p.3843-50, 2006.

LAKS, D. R.; VISNYEI,K.; KORNBIUM, H.I. Brain tumor stem cells as therapeutic targets in models of glioma. ***Yonsei Med J,*** v.51, n.5, p. 633-640, 2010.

LAPERRIERE, N.; ZURAW, L.; CAIRNCROSS, G.; The Cancer Care Ontario Practice Guidelines Initiative Neuro-Oncology Disease Site Group. Radiotherapy for

newly diagnosed malignant glioma in adults: a systematic review. **Radiotherapy and Oncology**, v. 64, p. 259-273, 2002.

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

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

LIMA, C.M. Estudo da marcação e biodistribuição da substância P utilizando Lutécio-177 como radiotraçador. São Paulo, 2011. (Dissertação de Mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares).

MACEDO, S. Profiling new histological biomarker for oligodendrogliomas. Lisboa, 2013. (Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa).

MARTIN, J. H. **Neuroanatomia: Texto e atlas**. Porto Alegre: Artmed, 2013. Cap. 1.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. Cap. 2.

MUÑOZ, M.; ROSSO, M.; COVEÑAS, R. The NK-1 Receptor: A New Target in Cancer Therapy. **Curr Drug Targets**, v.12, p.909-921, 2011.

MUÑOZ, M.; ROSSO, M.; COVEÑAS, R. A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists. **Curr Med Chem.** v.17, p.504-16, 2010.

MUÑOZ, M.; COVEÑAS, R. Neurokinin-1 receptor: a new promising target in the treatment of cancer. **Discov Med.** v.10, p.305-13, 2010.

NANDA, P.K.; LANE, S.R.; RETZLOFF, L.B.; PANDEY, U.S.; SMITH, C.J. Radiolabeled regulatory peptides for imaging and therapy. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.** v.17, p.69-76, 2010.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Brain Tumor**. Disponível em: < <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/brain>>. Acesso em: 19 abr. 2015.

NEVARES, N.; LOPEZ, A. C.; PUERTA, N.Y.; ZAPATA, M.; PÉREZ, J.; ROJO, A. M.; CRUDO, J. L. Ensayos *in vitro* del péptido marcado ¹⁷⁷Lu-DOTA-Substancia P y evaluación de los cálculos dosimétricos em la etapa preclínica. **Alasbimn Journal**, year 12, n°49, Article AJ49-4, 2010.

OJOPI, E.P.B.; NETO, E.D. Genômica e Oncologia. IN: **Genômica**. São Paulo: Atheneu, 2004. Cap. 19.

OSTROM, Q.T.; BAUCHET, L.; DAVIS, F. G.; DELTOUR, I.; FISHER, J. L.; LANGER, C. E.; PEKMEZCI, M.; SCHWARTZBAUM, J. A.; TURNER, M. C.; WALSH, K. M.; WRENSCH, M.R. AND BARNHOLTZ-SLOAN, J. S. The

epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review. **Neuro-Oncology**, 16(7), 896–913, 2014.

PALMA, C.; MAGGI, C.A. The role of tachykinins via NK1 receptors in progression of human gliomas. **Life Sciences** 67:985-1001, 2000.

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

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

REUBI, J.C.; MACKE, H.R.; KRENNING, E.P. Candidates for peptide receptor radiotherapy today and in the future. **J Nucl Med**. v.46, p.67s-75S, 2005.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. Neoplasia. In: ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 282-356, 2005.

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

VÄHÄ-KOSKELA, M. J. V.; LE BOEUF, F.; LEMAY, C.; SILVA, N.; DIALLO, J.; COX, J.; BECKER, M.; CHOI, Y.; ANANTH, A.; SELLERS, C.; BRETON, S.; ROY, D.; FALLS, T.; BRUN, J.; HEMMINKI, A.; HINKKANEN, A.; BELL, J.C. Resistance to Two Heterologous Neurotropic Oncolytic Viruses, Semliki Forest Virus and Vaccinia Virus, in Experimental Glioma. **Journal of Virology**. v.87 n.4. p. 2363-2366, 2013.

VAN HAGEN, P.M.; BREEMAN, W.A.; REUBI, J.C.; POSTEMA, P.T.; VAN DER ANKER-LUGTENBURG, P.J.; KWEKKEBOOM, D.J.; LAISSUE, J.; WASE, B.; LAMBERTS, S.W.; VISSER, T.J.; KRENNING, E.P. Visualization of the thymus by substance P receptor scintigraphy in man. **Eur J Nucl Med**. v.23, p.1508-1513, 1996.

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

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.

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