INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**ESTUDO COMPARATIVO DE RADIOFÁRMACOS PARA ANGIOGÊNESE NA
DETECÇÃO DE MELANOMA**

ÉRICA APARECIDA DE OLIVEIRA

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

Orientadora:

Dra. Bluma Linkowski Faintuch

SÃO PAULO

2011

Aos meus pais, que me ensinaram que tudo é possível, desde que sejamos honestos e íntegros; que sonhar e concretizar os sonhos só depende da nossa vontade.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua presença constante em minha vida, sem que eu precise pedir, pelo auxílio nas minhas escolhas e por me confortar nas horas difíceis.

À minha orientadora Dra. Bluma Linkowski Faintuch, pelos importantes ensinamentos tanto científicos quanto pessoais, pela amizade e apoio, e pelo conforto nas horas difíceis.

À minha mãe, Márcia Aparecida da Silva Oliveira, que sempre está ao meu lado, me incentivando e, muitas vezes, propiciando a realização dos meus sonhos, me amparando e dando forças, em todos os momentos de dificuldade, sempre com muito amor.

Ao Dr. Eutímio Gustavo Fernandez Núñez, pelo auxílio fundamental nos experimentos e pelos conhecimentos compartilhados e ao Rafael Pereira de Souza Santos, pela ajuda em alguns experimentos.

À grande amiga Fernanda Faião Flores, pelo ensinamento em alguns experimentos, pelo apoio, incentivo e amizade sempre.

Aos profissionais do Biotério do IPEN, especialmente a Maria Neide Ferreira Mascarenhas, pelos animais concedidos.

À Dra. Ana Maria Moro e a Roselaine Campos Targino, do Instituto Butantan – Laboratório de Anticorpos Monoclonais, pelo cultivo das células tumorais.

Ao Natanael Gomes da Silva, pela aquisição das imagens cintilográficas.

Ao Dr. Charles Jeffrey Smith, do Departamento de Radiologia da Universidade do Missouri - EUA, pela doação das biomoléculas, proporcionando, assim, a execução desta pesquisa.

Aos professores da pós-graduação pelos ensinamentos.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, pela infra-estrutura.

À Comissão Nacional de Energia Nuclear - CNEN, por ter concedido a bolsa de mestrado para realização do presente trabalho.

Aos familiares, amigos e colegas pelo apoio, conselhos, companhia e amizade.

Enfim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a execução desse trabalho, seja pela ajuda constante ou por uma palavra de amizade!

Muito Obrigada!

“A Ciência pode impor limites ao conhecimento, mas não deve impor limites à imaginação.”

Bertrand Russell

ESTUDO COMPARATIVO DE RADIOFÁRMACOS PARA ANGIOGÊNESE NA DETECÇÃO DE MELANOMA

Érica Aparecida de Oliveira

RESUMO

Diagnóstico precoce e tratamento de melanoma, um tumor cutâneo com o pior prognóstico, é extremamente importante para um resultado clínico favorável. A biblioteca de peptídeos “phage display” é um recurso útil de triagem para identificar peptídeos bioativos que interagem com alvos em cânceres. O objetivo desse estudo foi a avaliação de dois traçadores de tecnécio-99m com sequências peptídicas RGD e NGR, conjugados com o quelante bifuncional MAG3. Os conjugados peptídicos (10 µL de uma solução µg/µL) foram marcados com tecnécio-99m usando tampão de tartarato de sódio. A avaliação radioquímica foi feita por ITLC e confirmada por CLAE. O coeficiente de partição foi determinado e ensaios de internalização foram realizados em duas linhagens celulares de melanoma (B16F10 e SKMEL28). A avaliação da biodistribuição dos traçadores foi realizada em animais saudáveis em diferentes tempos e também em camundongos portadores de células tumorais aos 120 min após a sua administração. Estudos de bloqueamento também foram conduzidos pela co-injeção de peptídeo frio. O desempenho dos conjugados peptídicos mostraram-se bastante parecidos em diversas avaliações. Eles foram radiomarcados com alta pureza radioquímica (>97%). Ambos são hidrofílicos, com excreção renal preferencial. A captação tumoral foi maior para células SKMEL28 do que para as células B16F10, especialmente para o $^{99m}\text{Tc-MAG3-PEG8-c(RGDyK)}$ ($7,85 \pm 2,34$ %DI/g) aos 120 min pós-injeção. O desempenho do $^{99m}\text{Tc-MAG3-PEG8-c(RGDyK)}$ foi superior que o do traçador com NGR, quanto à captação no melanoma humano podendo ser considerado como um promissor radiofármaco para diagnóstico de melanoma.

COMPARATIVE STUDY OF ANGIOGENESIS RADIOPHARMACEUTICALS FOR MELANOMA DETECTION

Érica Aparecida de Oliveira

ABSTRACT

Early diagnosis and treatment of melanoma, a cutaneous tumor with a serious prognosis, is extremely important for optimal clinical outcome. Phage display peptide libraries are a useful screening resource for identifying bioactive peptides that interact with cancer targets. The aim of this study was the evaluation of two technetium-99m tracers for angiogenesis detection in melanoma model, using cyclic peguilated pentapeptide with RGD and NGR motifs conjugated with bifunctional chelator MAG3. The conjugated peptides (10 μL of a $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ solution) were labeled with technetium-99m using a sodium tartrate buffer. Radiochemical evaluation was done by ITLC and confirmed by HPLC. Partition coefficient was determined and internalization assays were performed in two melanoma cells (B16F10 and SKMEL28). Biodistribution evaluation of the tracers was done in healthy animals at different times and also in mice bearing the tumor cells at 120 min post injection. Blocking studies were also conducted by co-injection of cold peptides. The conjugated showed the same profile in many evaluations. They were radiolabeled with high radiochemical purity ($>97\%$). Both were hydrophilic, with preferential renal excretion. Tumor uptake was higher for human melanoma cells than for murine melanoma cells, specially for $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG3-PEG}_8\text{-c(RGDyK)}$ ($7.85 \pm 2.34 \text{ \%ID/g}$) at 120 min post injection. The performance of $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyK)}$ was much better than NGR tracer concerning human melanoma uptake and might be considered in future investigations focusing radiotracers for melanoma diagnosis.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Radiofármacos	16
1.1.1 Radioisótopos para imagem diagnóstica	18
1.2 Biomoléculas radiomarcadas	18
1.3 <i>Phage Display</i>	21
1.4 Peptídeo com a sequência RGD e a relação com as Integrinas	22
1.5 Peptídeo com a sequência NGR e a relação com a Aminopeptidase N	25
1.6 Melanoma	29
1.7 Relação: Câncer, Angiogênese, Peptídeo RGD e Peptídeo NGR	32
1.8 Radioisótopo tecnécio-99m	36
1.8.1 Marcação de biomoléculas com ^{99m}Tc	39
1.9 Agente quelante bifuncional	40
1.9.1 Mercaptoacetiltriglicina (MAG_3)	41
1.10 Espaçadores	42
1.11 Considerações Finais	42
2 OBJETIVOS	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Materiais	44
3.1.1 Equipamentos	44
3.1.2 Reagentes e solventes	45
3.1.3 Outros	46
3.1.4 Animais	47

3.2 Métodos	47
3.2.1 Marcação dos Conjugados Peptídicos RGD e NGR com Tecnécio-99m	47
3.2.2 Avaliação radioquímica dos conjugados radiomarcados	48
3.2.3 Determinação da lipofilicidade dos produtos radiomarcados	48
3.2.4 Biodistribuição em camundongos Swiss sadios	49
3.2.5 Cultivo celular	50
3.2.6 Ensaios <i>in vitro</i> de internalização	50
3.2.7 Inoculação das células tumorais em camundongos Nude	51
3.2.8 Biodistribuição em camundongos portadores de tumor	51
3.2.9 Aquisição de imagens cintilográficas	52
3.2.10 Análise estatística	52
4 RESULTADOS	53
4.1 Radiomarcção e avaliação radioquímica dos conjugados radiomarcados	53
4.2 Determinação da lipofilicidade dos produtos radiomarcados	54
4.3 Biodistribuição em camundongos <i>Swiss sadios</i>	54
4.4 Ensaios <i>in vitro</i> de internalização	57
4.5 Biodistribuição em camundongos portadores de tumor	59
4.6 Aquisição de imagens cintilográficas	62
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÕES	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE TABELAS

Página

TABELA 1 – Porcentagem da dose total injetada dos radiomarcados ^{99m}Tc -MAG ₃ -PEG ₈ -c(RGDyk) e ^{99m}Tc -MAG ₃ -PEG ₈ -c(NGRyk) em camundongos <i>Swiss sadios</i> em diferentes tempos	57
TABELA 2 – Biodistribuição do ^{99m}Tc -MAG ₃ -PEG ₈ -c(RGDyk) e do ^{99m}Tc -MAG ₃ -PEG ₈ -c(NGRyk) em camundongos <i>Nude</i> portadores de células tumorais de melanoma murino B16F10 e de melanoma humano SKMEL28 aos 120 min p.i. (n=6)	60

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Método de <i>phage display</i> para investigação de interação de proteínas	22
FIGURA 2 – Peptídeo cíclico RGDyk	25
FIGURA 3 – Peptídeo cíclico NGRyk	27
FIGURA 4 – Vasculatura e microambiente tumoral	33
FIGURA 5 – Efeito potencial da formação de isoaspartato em moléculas contendo NGR, RGD ou DGR na interação com receptores de membrana de células endoteliais	35
FIGURA 6 – Receptores alvo em células tumorais, endoteliais ou em ambas	36
FIGURA 7 – Diagrama do decaimento do ^{99}Mo a $^{99\text{m}}\text{Tc}$	37
FIGURA 8 – Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$	38
FIGURA 9 – Representação esquemática do desenho de um radiofármaco	41
FIGURA 10 – Molécula de mercaptoacetilglicilglicilglicina (MAG_3)	41
FIGURA 11 – Molécula de polietilenoglicol com oito subunidades de	42

óxido de etileno

FIGURA 12 – Estrutura molecular do conjugado peptídico S-acetil-MAG₃-PEG₈-c(RGDyk); Fórmula Molecular: C₅₆H₉₁N₁₃O₂₂S; Massa Exata: 1329,61; Peso Molecular: 1330,46 45

FIGURA 13 – Estrutura molecular do conjugado peptídico S-acetil-MAG₃-PEG₈-c(NGRyk); Fórmula Molecular: C₅₆H₉₂N₁₄O₂₁S; Massa Exata: 1328,63; Peso Molecular: 1329,48 45

FIGURA 14 - Radiocromatogramas: (A) ^{99m}Tc-MAG₃-PEG₈-c(RGDyk); (B) ^{99m}Tc-MAG₃-PEG₈-c(NGRyk); (C) Na^{99m}TcO₄. 53

FIGURA 15 – Biodistribuição do ^{99m}Tc-MAG₃-PEG₈-c(RGDyk) em camundongos Swiss sadios (n=6) 55

FIGURA 16 – Biodistribuição do ^{99m}Tc-MAG₃-PEG₈-c(NGRyk) em camundongos Swiss sadios (n=6) 56

FIGURA 17 - Tempo de internalização do (A) ^{99m}Tc-MAG₃-PEG₈-c(RGDyk) em células B16F10; (B) ^{99m}Tc-MAG₃-PEG₈-c(RGDyk) em células SKMEL; (C) ^{99m}Tc-MAG₃-PEG₈-c(NGRyk) em células B16F10; (D) ^{99m}Tc-MAG₃-PEG₈-c(NGRyk) em células SKMEL28 a 37°C. Valores de desvios na casa de centésimos não são visualizados nos gráficos 58

FIGURA 18 – Captação dos radiotraçadores em tumor e em tumor bloqueado 120 min após a injeção em células tumorais de melanoma B16F10 e SKMEL28 61

FIGURA 19 – Razões tumor/órgão e tumor/tecidos para células B16F10 (T=Tumor; S=Sangue; M=Músculo; O=Osso; I= Intestinos; F=Fígado; R=Rins)	61
FIGURA 20 – Razões tumor/órgão e tumor/tecidos para células SKMEL28 (T=Tumor; S=Sangue; M=Músculo; O=Osso; I= Intestinos; F=Fígado; R= Rins)	62
FIGURA 21 – Imagens cintilográficas em camundongos <i>Nude</i> portadores de células tumorais de melanoma (A) ^{99m}Tc -MAG ₃ -PEG ₈ -c(RGDyk) em células B16F10; (B) ^{99m}Tc -MAG ₃ -PEG ₈ -c(NGRyk) em células B16F10; (C) ^{99m}Tc -MAG ₃ -PEG ₈ -c(RGDyk) em células SKMEL; (D) ^{99m}Tc -MAG ₃ -PEG ₈ -c(NGRyk) em células SKMEL28	63

LISTA DE ABREVIATURAS

%DI	Porcentagem de dose injetada
^{11}C	Carbono-11
^{111}In	Índio-111
^{121}Tl	Tálio-121
^{123}I	Iodo-123
^{131}I	Iodo-131
^{177}Lu	Lutécio-177
^{188}Re	Rênio-188
^{18}F	Flúor-18
^{64}Cu	Cobre-64
^{67}Ga	Gálio-67
^{68}Ga	Gálio-68
^{90}Y	Ítrio-90
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	Tecnécio-99 metaestável
ACN	Acetonitrila
APN	Aminopeptidase N
Bq	Becquerel
Ci	Curie
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
cpm	Contagens por minuto
D	Dáton
DGR	Peptídeo com a sequência ácido aspártico-glicina-arginina
DME/F12	Meio de cultura de Eagle modificado/mistura nutriente de Ham F12
DNA	Ácido desoxirribonucléico

DOTA	Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético
DP	Desvio padrão
DTPA	Ácido dietilenotriaminopentaacético
EDDA	Ácido N',N'-etilenodiaminodiacético
eV	Eletrovolt
FDG	Fluorodeoxiglicose
g	Grama
HAEC	Células endoteliais aórticas humanas
HUVEC	Células endoteliais de veia umbilical humana
HYNIC	6-hidrazinonicotinamida
Int. Delgado	Intestino delgado
Int. Grosso	Intestino grosso
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
ITLC-SG	do inglês <i>Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel</i> , suporte para cromatografia de camada delgada
L	Litro
m	Metro
M	Mol
MAG2	Mercaptoacetildiglicina
MAG3	Mercaptoacetiltriglicina
MEK	Metiletilcetona
min	Minuto
Nal(TI)	Iodeto de sódio tálio
NGR	Peptídeo com a sequência asparagina-glicina-arginina
NHS	Éster N-hidroxisuccinamida
NODAGA	Ácido 1,4,7-tetraazaciclononano-1-glutárico-4,7-diacético

°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Coeficiente de partição
p.a.	Para análise
p.i.	Pós-injeção
PBS	Tampão fosfato-salina
PEG8	polietilenoglicóis
PET	Tomografia de Emissão de Póstron
pH	Potencial hidrogeniônico
PIMT	Proteína L-isoAsp-O-metiltransferase
ppm	Parte por milhão
R _f	Fator de retenção
RGD	Peptídeo com a sequência arginina-glicina-ácido aspártico
RPMI	Meio de cultura desenvolvido pelo Instituto Memorial <i>Roswell</i> Park
SFB	Soro fetal bovino
SNM	Society of Nuclear Medicine
SPECT	Tomografia Computatorizada por Emissão de Fóton Único
T _{1/2}	Tempo de meia-vida
TFA	Ácido trifluoroacético
t _R	Tempo de retenção
U	Unidade de massa
UV/VIS	Espectroscopia no ultravioleta visível
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
xg	Giros
αMSH	Hormônio alfa-melanócito estimulante

1 INTRODUÇÃO

A medicina dispõe de métodos que permitem que determinadas doenças sejam diagnosticadas antes que se manifestem fisicamente no homem. O sucesso do diagnóstico de precisão teve como contribuição o desenvolvimento na Medicina Nuclear de biomoléculas marcadas com alta especificidade para um órgão. Por meio de cintilografias, são realizadas imagens dos sítios que expressam receptores específicos para as biomoléculas em questão, minimizando por outra parte, a exposição a outros órgãos (Obenaus e col., 1999).

A Medicina Nuclear é uma modalidade da medicina inserida na Radiologia, por ser predominantemente diagnóstica. As técnicas de imagem nuclear são amplamente utilizadas para aplicações clínicas devido a sua alta sensibilidade (Lee e col., 2010). Nela são realizados exames de imagem com a utilização de radiofármacos (Okarvi, 2004).

A Medicina Nuclear teve seu pioneirismo em 1935, com o trabalho de George Hevesy que usou o fósforo-32 (originalmente produzido por F. Joliot e J. Curie em 1934), em estudos de biodistribuição em animais, e com Joseph Hamilton que fez tentativas para tratar pacientes com leucemia com sódio-24 em 1936 (Weiner e Thakur, 1995).

1.1 Radiofármacos

Os radiofármacos, drogas que contém um radionuclídeo, são rotineiramente, usados na Medicina Nuclear. Um bom radiofármaco é aquele que apresenta uma farmacocinética ideal, caracterizada pelo baixo tempo de retenção no sangue e alta captação do órgão de interesse ou alta razão de captação órgão/tecido (Egli e col., 1999).

Um caso particular de radiofármacos são os peptídeos radiomarcados, utilizados em diversas áreas de interesse, como oncologia, neurologia, cardiologia, na pesquisa de focos de infecção/inflamação e na pesquisa de trombose/aterosclerose. A aplicação em oncologia, para diagnóstico e tratamento de tumores específicos, representa, sem dúvida, a área mais estudada, com

maior número de radiotraçadores desenvolvidos, alguns dos quais comercialmente disponíveis (Signore e col., 2001).

A capacidade da biomolécula de reconhecer os receptores determinará a fixação do radiofármaco no tecido pretendido e não deverá ser alterada com a incorporação do radionuclídeo (Oliveira e col., 2006).

A biodistribuição de radiofármacos pode ser determinada também pelas propriedades químicas e físicas ou pelas interações biológicas do produto (Fichna e Janecka, 2003). Para o diagnóstico, a radiação deve ser capaz de penetrar o corpo e ser detectada por um instrumento externo ao paciente. Para que uma boa imagem seja obtida, a energia gama do radioisótopo deve estar entre 100 e 200 keV. Porém, na prática, energias entre 80 e 300 keV também são utilizadas (Jurisson e col., 1993).

Os radiofármacos podem ser divididos em duas classes: aqueles cuja biodistribuição é determinada exclusivamente pelas propriedades químicas e físicas, e aqueles cuja distribuição final é determinada por sua ligação a um receptor ou outras interações biológicas. Essa última classe é freqüentemente chamada de radiofármacos alvo-específicos (Liu e Edwards, 1999).

Os radiofármacos utilizados para diagnóstico estão classificados em radiofármacos de perfusão (ou 1ª geração) e radiofármacos específicos (ou 2ª geração) (Dilworth e col., 1998). Os radiofármacos de perfusão são transportados no sangue e atingem o órgão alvo na proporção do fluxo sanguíneo. Não têm locais específicos de ligação e pensa-se que são distribuídos de acordo com tamanho e carga do composto. Os radiofármacos específicos são direcionados por moléculas biologicamente ativas, como, por exemplo, anticorpos e peptídeos, que se ligam a receptores celulares ou são transportados para o interior de determinadas células. A capacidade da biomolécula de reconhecer os receptores vai determinar a fixação do radiofármaco no tecido pretendido e não deverá ser alterada com a incorporação do radionuclídeo (Jurisson e col., 1993; Fichna e Janecka, 2003). A maior parte dos radiofármacos em uso clínico corresponde a radiofármacos de perfusão, mas atualmente são os radiofármacos específicos que detêm a atenção da investigação na área da química radiofarmacêutica.

Uma vez que os radiofármacos tenham sido preparados e a pureza dos mesmos tenha sido determinada, o material é injetado no paciente e fornece informações sobre sua localização através da emissão dos raios gama, os quais

são detectados em equipamento denominado câmara de cintilação ou gama câmara (Weiner e Thakur 1995, Oliveira e col., 2006).

1.1.1. Radioisótopos para imagem diagnóstica

Os radioisótopos usados em medicina nuclear com propósito diagnóstico são essencialmente os emissores de radiação gama e pósitrons.

Para uso diagnóstico, os radioisótopos emitem radiação eletromagnética que penetra o tecido e é detectado externamente, promovendo a aquisição de imagens. Raios gama ou raios X distribuem suas energias uniformemente através do tecido, podendo atravessar tecidos bastante espessos (Weiner e Thakur, 1995).

As primeiras imagens cintilográficas foram realizadas em gama câmaras e depois em Tomógrafos por emissão de fóton simples (SPECT), que fornecia uma imagem tridimensional, com o uso de radioisótopos como ^{67}Ga , ^{111}In , ^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{188}Re e ^{121}I (Okarvi, 2008).

Após o advento dos radionuclídeos produzidos em ciclotron de meia vida curta, como ^{18}F , ^{11}C e ^{123}I , ou de gerador como o ^{68}Ga , e dos Tomógrafos por Emissão de Pósitrons (PETs), o número de traçadores para PET tem aumentado progressivamente, deixando o campo dos radiofármacos com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ restrito a um pequeno grupo. Apesar disso, a introdução de novos métodos de marcação baseados em $^{99\text{m}}\text{Tc}$ cresceu continuamente nos últimos anos, evidenciando uma especificidade maior e resolução melhor para pequenas estruturas biológicas (Duatti, 2009).

1.2 Biomoléculas radiomarcadas

Os primeiros relatos de anticorpos monoclonais radiomarcados surgiram no final da década de 1980 e início da década de 1990, com grande potencial para o diagnóstico de câncer (Morales e col., 2000). Porém os estudos demonstraram alguns inconvenientes do radiotraçador como depuração sanguínea muito lenta, devido ao grande tamanho da molécula (150.000 daltons) e dificuldade de penetração na massa tumoral pouco perfundida (Xue e col., 1996).

Os peptídeos radiomarcados surgiram como uma alternativa aos anticorpos em forma de moléculas menores. Peptídeos são proteínas, que desempenham um papel crucial em quase todos os processos biológicos. São constituídas de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas. A degradação e a reciclagem de aminoácidos é um processo constante e dinâmico. Novos métodos de sintetizar peptídeos de cadeia longa e em grande quantidade, assim como a sua purificação, caracterização e otimização, têm resultado em uma explosão de peptídeos potencialmente úteis e de interesse no desenvolvimento comercial (Weiner e Thakur, 2005).

Em geral, peptídeos tem favorável farmacocinética e padrões de distribuição nos tecidos, como rápida depuração sanguínea em tecidos não-alvos. Alguns peptídeos tem boa permeabilidade que permitem rápido acesso aos tecidos e órgãos de interesse. Além disso, peptídeos geralmente apresentam baixa toxicidade e imunogenicidade, e são bastante flexíveis em modificações químicas e radiomarcações (Chen e Conti, 2010).

Peptídeos regulatórios representam um grupo de diferentes famílias de moléculas conhecidas por agir em múltiplos alvos no corpo humano em concentrações extremamente baixas (Reubi, 1997). No entanto, esta classe de peptídeos controlam e modulam as funções de quase todos os órgãos chaves e processos metabólicos e sua ação é mediada por receptores de membrana específicos. Em sua maioria, estes receptores são pertencentes ao grupo de proteínas acopladas a proteína G, podendo influenciar portanto, em muitos sistemas intracelulares efetores (Reubi, 2003; Veulens e Rodríguez, 2009).

Muitos peptídeos têm o papel de reguladores das funções e crescimento celulares, não apenas em condições normais, mas também em processos patológicos, como por exemplo, na qualidade de ligantes de receptores ou ainda interferindo na progressão do câncer (Weiner e Thakur, 2005).

Um campo em constante crescimento é o de peptídeos dirigidos a tumores. Isso porque os receptores peptídicos se expressam frequentemente em vários cânceres primários humanos, muito mais do que em tecidos adjacentes à neoplasia (Weiner e Thakur, 2005).

A transformação neoplásica pode resultar em um aumento acentuado no número de receptores peptídicos que ocorrem fisiologicamente em um tecido. Sabe-se que a ativação oncogênica ou regulação epigenética e outros mecanismos compensatórios podem alterar a expressão do receptor peptídico (Reubi, 2003).

Surgiram, portanto, os primeiros estudos com diversos peptídeos como o peptídeo vasoativo intestinal (VIP), análogos da somatostatina (lanreotida, octreotida, octreotato) radiomarcados com sucesso para a obtenção de imagens em pacientes com tumores (Riccabona e Decristoforo, 2003). Este sucesso deveu-se a alta afinidade dos mesmos com o receptor, boa internalização e retenção nas células, assim como a rápida eliminação de tecidos não-alvo (Heppeler e col., 2000).

Novos peptídeos foram sendo investigados como os com a sequência arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), peptídeos liberadores de gastrina (análogos da bombesina), angiotensina, anexina, colecistoquinina e outros (Decristoforo e col., 2006; Korde e col., 2007; Kothari e col., 2007; Reubi, 2003; Zhang e col., 2004).

Em paralelo à procura genérica por novos receptores peptídicos, buscam-se radiopeptídeos e peptídeos citotóxicos para uso potencial em alvos pré-definidos, e a otimização da captação pelo receptor é uma das maiores prioridades. O objetivo dessas pesquisas é o de obter maior efetividade no tratamento e/ou diagnóstico de enfermidades oncológicas.

O desenvolvimento de agentes radiomarcados baseados na interação de ligante-receptor deve obedecer a etapas preliminares como estudos pré-clínicos, ainda que se façam restrições à extrapolação dos dados para resultados favoráveis em humanos. Ainda assim, estes parâmetros pré-clínicos são essenciais para predizer a chance de sucesso ou falha nas futuras aplicações.

Os peptídeos têm sido radiomarcados com diferentes radioisótopos para uso diagnóstico e em menor grau para terapia (Weiner e Thakur, 2005; Okarvi, 2008).

1.3 Phage Display

Uma técnica emergente para descoberta de peptídeos alvo-específicos envolve a triagem de bibliotecas de *phage display*. A técnica *phage display* tem sido empregada com a finalidade de identificar ligantes através de interações moleculares e de igual maneira obter informações sobre a relação receptor-ligante (Deutscher, 2010).

A técnica de *phage display* foi usada pela primeira vez por George Smith em 1985. Demorou bastante tempo para apreciarem o potencial dessa nova ferramenta, mas o número crescente de publicações relatando o seu uso atesta a versatilidade dessa técnica para muitas aplicações, incluindo mapeamento de epítomos, o isolamento de proteínas de alta afinidade, engenharia proteica e descoberta de drogas (Castel e col., 2011).

Phage Display é baseado na expressão de moléculas de interesse (peptídeos ou proteínas) como uma fusão com a terminação amino ou carboxil da proteína presente na superfície do bacteriófago (Smith, 1985; Souriau e col., 1998). Isso faz com que seja possível expor proteínas/peptídeos combinatórios de bibliotecas na superfícies de fagos recombinantes. As proteínas/peptídeos expostos são então selecionados por um procedimento de seleção por afinidade, baseado na habilidade delas de se ligarem a um alvo específico, como um anticorpo, uma enzima, um receptor, um ácido nucléico ou outra molécula não-proteica (Souriau e col., 1998). O processo de seleção consiste em muitos ciclos repetitivos, cada um composto por captura, lavagem e eluição em etapas, para enriquecimento progressivo e amplificação da população do fago carregando moléculas com alta afinidade para o alvo. Essas moléculas são então, testadas individualmente, para avaliar suas atividades ou habilidades para efetuar a função desejada, permitindo assim, a triagem de vasta sequência, promovendo meios de melhorar a afinidade peptídica e gerar peptídeos únicos que se liguem a qualquer alvo dado (FIG. 1) (Castel e col., 2011; Deutscher, 2010).

Então, a partir dessa técnica foram selecionados os dois peptídeos utilizados nesse estudo e descritos a seguir.

FIGURA 1 – Método de *phage display* para investigação de interação de proteínas. (A) Preparação do bacteriófago. A codificação do DNA do peptídeo desejado é ligada ao fago vetor fundido com o gene da proteína de superfície. O fago é então introduzido na *Escherichia coli*, que produz fagos apresentando uma proteína de superfície híbrida que contém o peptídeo. (B) Bibliotecas de fagos contendo bilhões de peptídeos diferentes também podem ser gerados. Nesse exemplo, a biblioteca é injetada em um camundongo com tumor cerebral e o fago que se liga seletivamente aos vasos sanguíneos que abastecem o tumor são isolados e amplificados. Um peptídeo que se liga especificamente aos vasos sanguíneos tumorais podem, então, ser isolados a partir de um fago purificado. Assim como, um peptídeo pode ser usado como alvo de drogas ou toxinas no tumor (Alberts e col., 2002)

1.4 Peptídeo com a sequência RGD e a relação com as Integrinas

A sequência arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), específico na adesão celular a partir do receptor inibidor da angiogênese, foi descoberta na fibronectina, por Pierschbacher e Ruoslahti (1984). Smith e Cheresch (1988) identificaram o receptor da integrina $\alpha_v\beta_3$ através do *phage display*.

Os peptídeos sintéticos de sequência RGD antagonistas da integrina $\alpha_v\beta_3$ foram subsequentemente mostrados como inibidores do crescimento da nova vasculatura e regressão efetiva em cobaias portadoras de tumores, levando

o tumor a inanição por falta de suplemento sanguíneo. A maioria das integrinas, incluindo as unidades $\alpha_v\beta_3$ reconhecem a sequência, Arg-Gly-Asp (RGD) (Dijkgraaf e col., 2007).

A família de integrinas é composta por 25 membros identificados e são heterodímeros de 19 subunidades α e 8 subunidades β (Desgrosellier e col., 2010). São proteínas de adesão celular que controlam a ligação à membrana extracelular. As integrinas são moléculas de glicoproteínas, receptores da transmembrana celular não covalentes e exercem atividades variadas dentro e fora da célula, proporcionando comunicação efetiva entre as células e o meio que as envolve, de modo bidirecional. Seus ligantes possuem papel crítico em processos fisiológicos, incluindo ligação às células, proliferação, remodelação óssea e cicatrização de feridas. Além disso, as integrinas podem contribuir em eventos patológicos, como trombose, aterosclerose, invasão tumoral, angiogênese e metástases, infecções por microorganismos e disfunções imune (Liu e col., 2008; Zhou e col., 2011a). As integrinas tem sido propostas como alvos moleculares para tratamento de câncer, trombose e outras doenças nas últimas duas décadas, e o papel das integrinas tem sido extensivamente revisado (Desgrosellier e col., 2010; Zhou e col., 2011a).

Entre os 25 membros da família de integrinas, a integrina $\alpha_v\beta_3$ é a mais estudada, pelo seu papel em crescimento tumoral e angiogênese (Zhou e col., 2011a). A integrina $\alpha_v\beta_3$ é geralmente expressa em baixos níveis em células epiteliais e células endoteliais maduras, mas é altamente expressada em tumores, incluindo osteosarcomas, neuroblastomas, glioblastomas, melanomas, carcinomas de mama, pulmão e próstata (Albelda e col., 1990; Falcioni e col., 1994; Gasparini e col., 1998; Meitar e col., 1996; Sengupta e col., 2001; Schnell e col., 2008).

Foi relatado que a integrina $\alpha_v\beta_3$ é superexpressa não somente em células tumorais, mas também em células endoteliais da neovasculatura tumoral. A superexpressão da $\alpha_v\beta_3$ em células endoteliais ativadas pode modular a adesão celular e migração durante a angiogênese tumoral e sua expressão em células de carcinoma potencializa metástases pela facilitação da invasão e movimento das células tumorais através dos vasos sanguíneos. Também foi demonstrado que o

nível de expressão de $\alpha_v\beta_3$ se correlaciona bem com o potencial de metástase e agressividade de muitos tumores (Meitar e col., 1996; Zitzmann e col., 2002).

Enquanto algumas integrinas seletivamente reconhecem uma simples proteína ligante na membrana celular (exemplo, $\alpha_5\beta_1$ reconhece primeiramente a fibronectina), outras podem se ligar a vários ligantes (exemplo, integrina $\alpha_v\beta_3$ liga-se a vibronectina, fibronectina, fibrinogênio, colágeno denaturado ou proteolísado e outras proteínas da matriz) (Jin e Varner, 2004).

Uma integrina $\alpha_v\beta_3$ não ligada, e presumivelmente bloqueada, pode promover apoptose em células endoteliais vasculares. Stupack e col. (2001) demonstraram que o domínio citoplasmático β_3 da subunidade da integrina liga-se a caspase-8 e ativa-a.

A integrina $\alpha_v\beta_3$ também pode ser um alvo para fatores anti-angiogênicos, angiostatina, endostatina, antitrombina e anastelina (Yi e Ruoslahti, 2001). O peptídeo RGD liga-se à integrina $\alpha_v\beta_3$ e/ou em outras integrinas, por exemplo, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Jin e Varner, 2004).

Peptídeos lineares RGD mostraram-se altamente susceptíveis a degradação devido a reação do resíduo ácido aspártico com a estrutura do peptídeo. Além das pesquisas terem evoluído de RGD linear para RGD cíclico, estudos recentes foram realizados com moléculas RGD dímeras, tetrâmeras e octâmeras, demonstrando uma maior afinidade de ligação e maior captação tumoral (Dijkgraaf e col. 2007; Li e col., 2007; Liu e col.; 2008, Liu e col.; 2011). A avaliação quanto a influência do tamanho da molécula de RGD direcionada a diagnóstico e terapia foi comentada por Wester e Kesller em 2005. Já foi demonstrado que a ciclização dos peptídeos RGD via ligantes, como ponte dissulfeto, tioéter, e anéis aromáticos rígidos, frequentemente leva ao aumento da afinidade de ligação e seletividade no receptor (D'Andrea e col., 2006; Gottschalk e col.; 2002).

A estrutura cíclica da molécula de RGD conformacionada com o acréscimo dos aminoácidos tirosina e lisina pode ser observada na FIG. 2.

FIGURA 2 - Peptídeo cíclico RGDyk

O peptídeo RGD já foi radiomarcado com vários radioisótopos como ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{68}Ga , ^{125}I , ^{18}F , ^{90}Y e ^{64}Cu (Chen e col., 2004a, 2004b; Decristoforo e col., 2008; Dikkgraaf e col., 2007; Liu e col., 2008; Liu e col., 2011; Wu e col., 2005).

Estudos com RGD associado a outros peptídeos, formando heterodímeros como Bombesina-RGD e RGD- αMSH (Hormônio alfa-melanócito estimulante) foram realizados para melhorar a afinidade de ligação às células, através da habilidade de se ligar a dois receptores diferentes (Li e col., 2008; Liu e col., 2009; Yang e col., 2009, 2010).

Progressos significantes tem sido feitos no uso para imagem de tumor por SPECT (Tomografia Computadorizada por Emissão de Fóton Único) ou PET (Tomografia de Emissão de Pósitron). Dentre o radiotraçadores avaliados em vários modelos pré-clínicos em animais portadores de tumor, o ^{18}F Galacto-RGD e o ^{18}F AH111585 estão atualmente sob investigação clínica para imagens não-invasivas da expressão de $\alpha_v\beta_3$ em pacientes com câncer (Beer e col., 2005, 2008; Kenny e col., 2008; Morrison e col., 2009).

1.5 Peptídeo com a sequência NGR e a relação com a Aminopeptidase N

Peptídeos com a sequência asparagina-glicina-arginina (NGR), também obtida de biblioteca de peptídeos *phage display*, foram estudados como transportadores de citocinas, drogas quimioterapêuticas e lipossomas em vasos

sanguíneos tumorais. O peptídeo NGR se liga a aminopeptidase N (APN). Com relação as peptidases, uma das mais estudadas é a aminopeptidase N, também conhecida como CD13, entre outros, ligada a membrana e dependente de Zinco²⁺ (Buehler e col., 2006; Pasqualini e col., 2000; Wickström e col., 2011).

A APN é sintetizada como um precursor intracelular de 967 resíduos e após a tradução, modificada no Complexo de Golgi para produzir uma molécula madura de superfície de 150-240kDa, compreendendo um pequeno domínio citoplasmático N-terminal, uma parte transmembranaral simples e um domínio extracelular contendo o sítio ativo (Razak e Newland, 1992). Dentro da proteína madura glicosilada, 25-30% do peso molecular é composto por carboidratos. Diferentes utilizações dos sítios O-glicosilados, resultam em cinco isoformas, no mínimo, que são reconhecidas diferencialmente por anticorpos (O'Connell e col., 1991).

Estudos *in vitro* de vários peptídeos da biblioteca *phage display* contra a integrina $\alpha_5\beta_1$ levaram a seleção de vários peptídeos contendo RGD e também o peptídeo NGRAHA (Koivunen e col., 1993). Mais tarde, oito peptídeos contendo a sequência NGR foram isolados mediante triagem de peptídeos cíclicos na biblioteca, sob condições experimentais similares (Koivunen e col., 1994). Estudos posteriores baseados numa seleção da biblioteca *in vitro* para $\alpha_v\beta_3$, revelaram vários peptídeos diferentes contendo o motivo NGR (Healy e col., 1995). Em outra linha de pesquisa, triagens *in vivo* do *phage display* foram realizadas para isolar peptídeos que se ligam a tumores. Os resultados obtidos mostraram que a sequência CNGRCVSGCAGRC se ligou a vasculatura tumoral e a co-injeção de CNGRC, NGR cíclico, inibiu essa ligação. Os peptídeos NGRAHA e CVLNGRMEC, também localizam seletivamente tumores (Arap e col., 1998). Na verdade, foi mostrado que peptídeos contendo o motivo NGR podem marcar células endoteliais e pericitos não somente em tumores, mas também em outras condições fisiológicas ou patológicas, como inflamação e desordens na retina.

Se integrinas podem diretamente ou indiretamente contribuir com a interação NGR/APN é ainda desconhecido. A APN existe tanto ligada a membrana como em forma solúvel. Ambas as formas catalisam a remoção de resíduos N-terminal, preferencialmente neutros, de pequenos peptídeos. Muitos substratos naturais foram descobertos para a APN, incluindo peptídeos

vasoativos, hormônios neuropeptídeos, citocinas e peptídeos imunomodulatórios (Riemann e col., 1999).

É possível que a seletividade dos peptídeos NGR para a APN endotelial esteja relacionada a glicosilação diferencial ou a mudanças conformacionais causadas pela formação do complexo com esse ou outros componentes desconhecidos. A acessibilidade seletiva devido a arquiteturas estruturalmente anormais da vasculatura angiogênica é também provável que desempenhem um papel (Ozawa e col., 2008).

Peptídeos cíclicos (FIG. 3) e lineares contendo NGR provaram serem úteis para ligação alvo-ligante de várias drogas e partículas a vasos angiogênicos em tumores, ressaltando o valor dessas ferramentas no desenvolvimento de drogas (Colombo e col., 2002). No entanto, as descobertas de que o NGR pode se converter rapidamente em isoDGR pela desamidação da asparagina, gerando ligantes $\alpha_v\beta_3$, sugerem que o NGR poderia representar um cronômetro molecular para geração de sítios integrina-ligantes em drogas, assim como em proteínas nativas. Em particular, a conversão espontânea do NGR em isoDGR na fibronectina pode representar um novo mecanismo de geração de sítios ligantes de $\alpha_v\beta_3$ que regula funções nas células endoteliais e crescimento tumoral. A geração de sítios isoDGR em proteínas, pela desamidação do NGR, ou pela isomerização do DGR, pode representar um mecanismo geral a mais para regulação de suas funções (Corti e col., 2008).

FIGURA 3 – Peptídeo cíclico NGRyk

Durante estudos para identificar peptídeos que se liguem especificamente a tumores sólidos, Pasqualini e col. (1995) identificaram fagos expressando a sequência asparagina-glicina-arginina (NGR) que se ligava estritamente em vasos sanguíneos angiogênicos. O estudo seguinte revelou a APN como o receptor principal para o peptídeo NGR e foi demonstrado que esse receptor era expresso exclusivamente em células endoteliais angiogênicas, mas não em vasculatura normal (Pasqualini e col., 2000). Estudos posteriores confirmaram esses resultados e estenderam os estudos para demonstrar a expressão da APN em células endoteliais vasculares, incluindo células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) e células endoteliais de aorta humana (HAEC) (Fukasawa e col., 2006). Anticorpos contra a APN, assim como inibidores enzimáticos dessa protease, inibem a angiogênese, indicando que essa peptidase pode também estar envolvida na migração de células endoteliais (Bhagwat e col., 2001, Pasqualini e col., 2000).

Os peptídeos NGR estão presentes em algumas proteínas naturais, incluindo a fibronectina que contém quatro resíduos NGR (Dimatteo e col., 2006). Vários componentes e partículas tem sido acopladas ou adicionadas sinteticamente ao peptídeo NGR, em uma tentativa de melhorar seus atributos de alvo a neovasculatura, incluindo drogas citotóxicas, citocinas, componentes anti-angiogênicos, partículas virais, componentes fluorescentes, agentes de contraste, complexos de DNA, e outros modificadores de resposta biológicos (Curnis e col., 2000; Garde e col., 2007; Gleave e col., 1998; Grifman e col., 2001; Holle e col., 2004; Moffatt e col., 2005; Sacchi e col., 2006; Wallbrunn e col., 2008; Zarovni e col., 2004; Zhang e col., 2005).

A aminopeptidase N também é expressa em muitas células de tecidos normais, incluindo células mielóides, células apresentadoras de antígeno, queratinócitos, mastócitos, células epiteliais do túbulo proximal renal, intestino delgado, próstata e ducto biliar (Curnis e col., 2002; Dixon e col., 1994).

A APN também está envolvida na transdução do sinal: a ligação de APN em monócitos com anticorpos monoclonais causa a liberação de cálcio de estoques intracelulares e influxo de ambientes extracelulares, provoca fosforilação de proteínas quinase ativadas por mitogen, JNK e p38, e induz secreção de citocinas (Santos e col., 2000).

Existem estudos em andamento com diversas variações da molécula de NGR em fases pré-clínicas e até clínicas, com o objetivo de inibir o crescimento de tumores sólidos através da ligação à APN (Wickström e col., 2011).

Além do resumo apresentado na reunião anual da *Society of Nuclear Medicine* – SNM, em 2009, e publicado no *The Journal Nuclear of Medicine*, pelo mesmo grupo deste presente trabalho (Wiecek e col., 2009), somente um resumo foi publicado com NGR radiomarcado na mesma revista, referente à reunião de 2011. Ma e col. (2011) radiomarcaram o peptídeo NGR com o rênio-188 para imagem de hepatoma humano.

1.6 Melanoma

Cânceres são doenças genéticas resultantes de mutações acumuladas no DNA. Essas mutações estão associadas ao descontrole de funções essenciais como a proliferação, diferenciação e morte celular, gerando células cujo DNA apresenta-se instável (Melo e col., 2003). Hanahan e Weinberg (2000) classificaram essas características em seis grupos: autossuficiência quanto aos fatores de crescimento, insensibilidade a fatores inibitórios de proliferação, evasão de apoptose, potencial replicativo infinito, invasão tecidual e metástase, e angiogênese sustentada.

A radiação solar ultravioleta promove mudanças malignas na pele através de efeitos mutagênicos diretos no DNA. Os efeitos ocorrem pela estimulação dos constituintes celulares da pele que produzem fatores de crescimento, pela redução das defesas imune cutâneas e pela promoção de espécies reativas de oxigênio da melanina que causam dano ao DNA e supressão da apoptose (Meyskens e col., 2004).

O melanoma é a forma de câncer mais agressiva entre os cânceres de pele. Desenvolve-se como resultado do acúmulo de anormalidades em vias genéticas dos melanócitos (células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele). Estas anormalidades promovem proliferação celular e previnem vias normais de apoptose em resposta ao DNA lesado. O melanócito alterado é assim predisposto a acumular danos no DNA, resultando em mutações

gênicas que permitem todos os aspectos do fenótipo maligno, incluindo estimulação de crescimento dos vasos sanguíneos, evasiva da resposta imune, invasão tumoral e metástases (Satyamoorthy e Herlyn, 2002). Tem predominância em adultos brancos e é menos freqüente (4%) do que os outros tumores de pele (basocelulares e de células escamosas), porém sua letalidade é mais elevada, devido a sua alta possibilidade de metástase (INCA, 2009).

O melanoma metastiza mais comumente pelas vias linfáticas ao linfonodo regional. No entanto, espalhamento hematogênico é mais provável em doenças avançadas. Ambos, tempo e locais de disseminação são imprevisíveis, o melanoma tem o potencial de metastizar para qualquer órgão (Patnana e col., 2011).

Apesar da letalidade elevada, porém sua incidência é baixa, 2.960 casos novos em homens e 2.970 casos novos em mulheres, a cada ano no Brasil. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na Região Sul. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que anualmente ocorram cerca de 132 mil casos novos desse câncer no mundo e, em termos de prevalência, seja cerca de 2,5%. Tem-se observado um expressivo crescimento na incidência desse tumor em populações de cor de pele branca (INCA, 2009).

Enquanto a incidência de muitos tumores sólidos está gradualmente decaindo, a incidência do melanoma cutâneo ainda cresce, cerca de 6-7% por ano, fazendo desse câncer um problema clínico significativo (Bevona e Sober, 2002).

É reconhecido, por exemplo, que em torno de 5% de todos os melanomas são não-pigmentados com incidência reportada variando de 1,6 a 10% (Brown e Nelson, 1999). Como resultado, melanomas amelanóticos são às vezes confundidos com células basais ou carcinoma de células escamosas, ou até lesões inflamatórias benignas, seborréias queratósas ou verrugas comuns. Melanomas nodulares são mais prováveis que melanomas de espalhamento superficial na falta de pigmentação evidente, e em um estudo recente, mais de 50% dos melanomas nodulares eram predominantemente amelanóticos (vermelho ou rosa), no entanto quase todos os melanomas de espalhamento superficial eram principalmente preto ou marrom. Melanomas nodulares frequentemente falham no preenchimento dos critérios diagnósticos ABCD

(assimetria, bordas irregulares, coloração variada e diâmetro maior que 6mm) em outros aspectos também, e podem ser difíceis de reconhecer em estágios precoces de evolução (Chamberlain e col., 2003).

O prognóstico do melanoma de pele está fortemente relacionado ao estágio em que é detectado, podendo ser considerado bom se detectado nos estádios iniciais. Nos últimos anos, houve uma grande melhora na sobrevida dos pacientes com esse tipo de câncer, principalmente devido à detecção precoce do mesmo. Mas doenças avançadas são geralmente refratárias a quimioterapia convencional. Nos países desenvolvidos, a sobrevida média estimada em cinco anos é de 73%, enquanto que, para os países em desenvolvimento, a sobrevida média é de 56%. A média mundial estimada é de 69% (INCA, 2009; Mendes e col., 2008).

O diagnóstico por imagem tem papel importante na avaliação de tumores como o melanoma metastático, que pode envolver múltiplos órgãos. A tomografia computadorizada é atualmente a técnica mais amplamente utilizada para estadiamento tumoral, monitoramento e avaliação da resposta terapêutica, mas ultrassom, ressonância magnética e PET-CT também tem papel importante na imagem desse tumor (Patnana e col., 2011).

Embora a tomografia computadorizada e a ressonância magnética sejam os métodos preferidos para avaliar nódulos no pulmão e metástases cerebrais, respectivamente, há boas evidências para usar o PET-CT na detecção de metástases em tecidos moles profundos, linfonodos e vísceras (Krug e col., 2008).

Em pacientes com melanoma em estágio III-IV avaliados por diagnóstico convencional, foram efetuados posteriormente exames de PET e PET-CT, utilizando ^{18}F -FDG (fluorodeoxiglicose) com a finalidade de mudança da conduta nestes pacientes em até 64% dos casos (Krug e col., 2008).

Como consequência dos benefícios limitados do ^{18}F -FDG na avaliação de linfonodos sentinela, o desejo de combater com sucesso melanomas recorrentes e metastáticos tem aberto o interesse no desenvolvimento de traçadores relacionados a características específicas das células de melanoma. Uma classe de compostos que retrata a biossíntese de melanina e

metalopectídeos ligantes a receptores melanocortin tipo 1 superexpresso em melanomas pertence a essa nova categoria, e agentes promissores, anticorpos e imagens angiogênicas continuam a residir nessa área de pesquisa e desenvolvimento (Cheng e col., 2007; Greguric e col., 2009; Decristoforo e col., 2008).

O PET-CT tem o potencial de cobrir todo o corpo, o que não é facilmente realizado com nenhuma outra técnica. No entanto, suas limitações incluem resolução espacial (~6mm), falha na detecção de metástases não ávidas por FDG e falta de especificidade (como em condições benignas, como infecções e inflamações, que podem ser ávidas por FDG). Em muitas malignidades, baixa captação de FGD pelo tumor está associada com menor agressividade clínica comportamental do tumor, mas isso não é claramente demonstrado pelo melanoma (Jiménez-Requena e col., 2010; Patnana e col., 2011).

1.7 Relação: Câncer, Angiogênese, Peptídeo RGD e Peptídeo NGR

O fenômeno de angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) é fundamental no desenvolvimento do corpo humano e em alguns processos fisiológicos (Dobrucki e Sinusa, 2007).

Os vasos sanguíneos podem se desenvolver na embriogênese mediante dois tipos de processos: a vasculogênese que consiste no processo de diferenciação inicial de células mesenquimais em hemangioblastos (precursores das células endoteliais e sanguíneas); e a angiogênese, formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes. A angiogênese é um processo necessário tanto para a embriogênese como para o crescimento somático, cicatrização, regeneração de órgãos e tecidos, crescimento do corpo lúteo e do endotélio. Consiste em uma cascata de processos que se resume basicamente na degradação da matriz extracelular, proliferação e migração das células endoteliais (capilares). O desenvolvimento dos vasos sanguíneos pode gerar a angiogênese patológica auxiliando, por exemplo, o crescimento de tumores. A hipótese de que o crescimento de tumores e metástases são dependentes de angiogênese foi primeiramente proposta por Judah Folkman em 1971 (Folkman, 1971; Folkman,

1995). Esta hipótese é hoje em dia apoiada por extensas evidências experimentais.

A angiogênese é bastante controlada por processo de múltiplas etapas, nas quais fatores pró-angiogênicos estão em equilíbrio para neutralizar um ao outro. Quando há um desequilíbrio, devido tanto a uma maior ou menor regulação de mediadores anti-angiogênicos, a angiogênese é induzida (Brack e col., 2004).

As células tumorais podem obter nutrientes e oxigênio por difusão passiva na distância aproximada de 0,2 a 0,5mm levando a um crescimento tumoral de aproximadamente 2 a 3mm³, contendo alguns milhões de células. A taxa de crescimento de células em tumores sem neovascularização fica em equilíbrio com a sua taxa de mortalidade. Os novos vasos sanguíneos suprem as células tumorais e remove os produtos de seu metabolismo (FIG. 4). Ao contrário da angiogênese vista em tecidos normais, a angiogênese tumoral apresenta vasos vazantes, diâmetros irregulares, paredes finas, fluxo sanguíneo aberrante e áreas de necrose. Também são observadas diferenças com relação à expressão de moléculas de superfície das células endoteliais dos vasos sanguíneos tumorais e normais (Melo e col., 2003; Folkman, 1995).

FIGURA 4 – Vasculatura e microambiente tumoral (Ruoslahti, 2002)

A angiogênese é considerada como um importante alvo para imagem e terapia. A imagem molecular não-invasiva da angiogênese deverá prover informações valiosas sobre a caracterização de tumores sólidos em termos de perfusão de tumores e consequentemente focando um tratamento eficaz (Cai e col., 2005).

Vale ressaltar que tumores são microambientes heterogêneos que apresentam, além do tecido tumoral, as células estromais (fibroblastos, adipócitos, células da musculatura lisa, do sistema imune e inflamatórias) e que juntos, participam do processo de progressão tumoral (Hanahan e col., 2000).

A angiogênese é uma característica de muitos melanomas cutâneos, uma neoplasia altamente maligna, que foi descrita pela primeira vez por Warren e Shubik (1966). A rápida angiogênese em melanomas aumenta drasticamente o risco de letalidade e contribui para a progressão do tumor.

Um dos modelos tumorais mais utilizados em estudos antiangiogênicos é o melanoma, que tem origem no melanoblasto da pele. Os resultados insatisfatórios obtidos com as modalidades tradicionais de tratamento do melanoma cutâneo metastático têm estimulado a realização de estudos experimentais com novos métodos (Junqueira e col., 1997).

A identificação de sequências curtas de peptídeos, como Arg-Gly-Asp (RGD) e Asn-Gly-Arg (NGR) do *phage display*, foi de importante contribuição no campo das drogas-alvo e obtenção de imagens. Essas sequências curtas de peptídeos são atrativas porque são passíveis de síntese em larga escala, modificações químicas e não são imunogênicas (Kok e col., 2002).

Na FIG. 5, conjugados contendo NGR (drogas, partículas e vírus) podem interagir com a forma endotelial da Aminopeptidase N (CD13). É desconhecido se sítios NGR de determinada proteína natural (por exemplo a fibronectina) podem também interagir com o CD13. Formações não enzimáticas de isoaspartato em sítios de NGR ou RGD em fibronectina, e potencialmente em outras proteínas, pode gerar isoDGR ou RgisoD. Enquanto isoDGR e RGD pode interagir com integrinas na superfície das células (por exemplo $\alpha_v\beta_3$), DGR e RgisoD estão desativas. A proteína L-isoAsp-O-metiltransferase (PIMT) pode enzimaticamente converter isoDGR em DGR e RgidoD em RGD. Enquanto a PIMT pode resgatar RGD da forma RgisoD, essa enzima pode regular de uma

maneira negativa a função do isoDGR. Sítios de NGR podem trabalhar, além disso, como cronômetros moleculares para a formação de novos sítios de ligação de integrinas com potencial regulação enzimática. A princípio, reações similares podem ocorrer também em proteínas contendo DGR (Corti e col., 2008). A sequência NGR assemelha-se a do RGD, podendo se ligar a integrinas, porém com menor afinidade (Pasqualini e col., 1997).

FIGURA 5 – Efeito potencial da formação de isoaspartato em moléculas contendo NGR, RGD ou DGR na interação com receptores de membrana de células endoteliais (Corti e col., 2008)

Portanto, o sítio de ligação ao endotélio tumoral destas sequências são diferentes. A expressão diferente em células cancerígenas desses biomarcadores fazem deles, alvos atrativos para transferência de drogas que podem se ligar a essas biomoléculas seletivamente (FIG. 5) (Desgrosellier e Cheresh, 2010).

Na FIG. 6 pode ser observado como um receptor usando um composto com propriedades de penetração no tumor e um receptor que é compartilhado pelo vaso tumoral e pelas células tumorais fornecem uma vantagem adicional (Ruoslahti e col., 2010).

FIGURA 6 – Receptores alvo em células tumorais, endoteliais ou em ambas. Os receptores alvo podem estar nas células tumorais, nos vasos tumorais ou compartilhados por ambos. (A) Compostos que reconhecem somente células tumorais fornecem pouca melhora do que os compostos não-alvo. (B) Compostos que reconhecem vasos tumorais acumulam-se no tumor, mas sua entrada no tecido tumoral baseia-se em mecanismos passivos. (C) Compostos que reconhecem ambos vasos e células tumorais combinam a (limitada) eficiência dos dois mecanismos alvo. (D) Compostos com penetração tumoral (até agora somente peptídeos com essas características são conhecidos) fornecem um sistema alvo particularmente potente (Ruoslahti e col., 2010).

1.8 Radioisótopo tecnécio-99m

O progresso em técnicas de diagnóstico em Medicina Nuclear, desde a primeira aplicação do tecnécio-99 meta estável (^{99m}Tc) em 1960, é verdadeiramente notável (Banerjee e col., 2001).

O elemento químico tecnécio não é encontrado na crosta terrestre em abundância, pois o mesmo não é gerado continuamente pela reação ou decomposição de outros elementos presentes no planeta. Pequenas amostras de tecnécio foram encontradas em rochas, provavelmente devido aos raios cósmicos que bombardearam a Terra (Faintuch, 1997).

O tecnécio, cujo número atômico é 43, foi descoberto em 1925 pelos cientistas Noddack, Tacke e Berg, os quais o chamaram, inicialmente, de *massarium*. Eles se basearam nos espectros e emissão de raios X obtidos com concentrados de vários minerais, como por exemplo, a columbita (Faintuch, 1997).

O nome "tecnécio" foi originado do grego *tecfinetos* que significa "artificial" e empregado, primeiramente, por Paneth em 1947, justamente por ser o primeiro elemento radioativo produzido pelo homem (Banerjee e col., 2001).

O tecnécio é um metal de transição situado no Grupo 7 da Tabela Periódica. Apresenta propriedades tanto ácidas como básicas. Seu ponto de fusão é de 2.200°C e seu ponto de ebulição 4.877°C (Banerjee e col., 2001, 2005).

O ótimo desempenho em Medicina Nuclear pode ser atribuído as suas propriedades nucleares e químicas, as quais consistem na emissão de fóton gama com energia monocromática de 140 keV de energia (89% de abundância), ideal para aquisição de imagens cintilográficas. Seu tempo de meia-vida de aproximadamente 6h (FIG. 7) é suficientemente longo para realizar a síntese do radiofármaco e suficientemente pequeno para minimizar a dose de radiação ao paciente (Banerjee e col., 2005).

FIGURA 7 – Diagrama do decaimento do ^{99}Mo a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Marques e col., 2001)

O uso do tecnécio também foi muito facilitado com o desenvolvimento de geradores molibdênio-99/tecnécio-99m e a formulação de kits liofilizados, tornando o seu uso uma realidade em radiofarmácia hospitalar (Banerjee e col., 2001, Faintuch e col., 2005).

O ^{99m}Tc somente se tornou disponível para utilização rotineira em 1958, com o desenvolvimento do gerador ^{99}Mo - ^{99m}Tc no *Brookhaven National Laboratory* – EUA. O desenvolvimento do gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) permitiu que o uso do radionuclídeo ^{99m}Tc se tornasse economicamente viável em seu uso rotineiro (Jurisson e Lydon, 1999).

Os geradores permitem obter um radionuclídeo de $t_{1/2}$ curto a partir de um radionuclídeo de $t_{1/2}$ longo. As propriedades químicas dos dois radionuclídeos têm que ser distintas para que sejam facilmente separados (Saha, 1998).

Este gerador pode ser produzido utilizando três métodos químicos diferentes - cromatográfico, sublimação e extração por solventes. O procedimento mais utilizado é o cromatográfico, justamente por apresentar um excelente custo-benefício. A coluna cromatográfica deste gerador é baseado em um sistema de alumina com o isótopo ^{99}Mo como produto de fissão (Banerjee e col., 2001; Boyd, 1982). O ^{99m}Tc é produzido pelo radionuclídeo "pai" (^{99}Mo) com tempo de meia vida de 2,75 dias e é eluído a baixas concentrações, da ordem de 10 pmol/L (Alberto e col., 1999).

A atividade do radionuclídeo "filho" (^{99m}Tc) vai aumentando à medida que o radionuclídeo "pai" (^{99}Mo) vai decaindo. O ^{99}Mo , na forma química de MoO_4^{2-} , encontra-se adsorvido numa coluna de alumina e por eluição com soro fisiológico é apenas eluído o $^{99m}\text{TcO}_4^{4-}$, recolhido sob vácuo, enquanto o molibdato fica retido na coluna (FIG. 8) (Oliveira e col., 2006).

FIGURA 8 – Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Oliveira e col., 2006)

O eluído de um gerador pode ser utilizado diretamente em aplicações clínicas, constituindo, neste caso, a substância radiofarmacêutica, ou pode servir para preparar radiofármacos mais complexos. O eluído deve ser obtido na forma estéril e isenta de pirogênios. A utilização do gerador deve ser feita de forma a nunca se perder a esterilidade e a apirogenicidade (Oliveira e col., 2006).

Um gerador ideal deverá ter uma proteção de chumbo para minimizar a exposição à radiação do experimentador, deve ser simples, rápido de utilizar e originar eluídos isentos do radionuclídeo “pai”, do material que constitui a coluna, assim como isento de outros possíveis radionuclídeos contaminantes (Saha, 1998).

Os radiofármacos de tecnécio-99 meta estável (^{99m}Tc) tornaram-se importantes ferramentas para o diagnóstico de várias doenças ou disfunções de órgãos e sistemas que compõem o corpo humano (Marques, 2001).

1.8.1 Marcação de biomoléculas com ^{99m}Tc

Várias técnicas de marcação de biomoléculas com tecnécio foram desenvolvidas na última década. A estratégia de marcação deve ser selecionada apropriadamente e otimizada visando uma alta estabilidade do produto radiomarcado, propriedade hidrofílica e baixa ligação às proteínas plasmáticas. O ^{99m}Tc pode se apresentar em nove diferentes estados de oxidação (–I a +VII). A estabilidade desses estados de oxidação depende do tipo de ligantes e do meio químico. Na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), o isótopo ^{99m}Tc possui o número de oxidação +VII, que é o mais estável em solução aquosa, porém nesta forma química o tecnécio não consegue se ligar às moléculas para formação de compostos de coordenação. Sendo assim, o uso de agentes redutores e técnicas de complexação para estabilizar o radioisótopo se fazem necessários (Banerjee e col., 2005; Jurison e Lydon, 1999).

As reações de complexação podem ser realizadas com vários tipos de agentes quelantes, cujos números de coordenação podem variar de 4 a 9. Entre os diversos tipos de agentes quelantes vale a pena mencionar os que contêm os núcleos $(^{99m}\text{TcO})^{3+}$ e $(^{99m}\text{TcO}_2)^+$. Na década de 1990 surgiram os agentes quelantes bifuncionais ácido dietilenotriamino pentaacético (DTPA), ácido hidrazinonicotínico (HYNIC) e mecaptoacetiltriglicina (MAG_3) e precursores como

^{99m}Tc -nitrido [$(^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N})^{2+}$]. Mais recentemente foram estudados o sistema ligante (3+1) e o precursor ^{99m}Tc -carbonila [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO}_3)]^{+1}$ (Fichna e Janecka, 2003, Faintuch e col., 2007).

1.9 Agente quelante bifuncional

Um ligante bifuncional possui dois propósitos: a ligação ao radionuclídeo de maneira segura sem dissociação *in vivo* e a formação de um apêndice estrutural para ligação à biomolécula mantendo a máxima integridade biomolecular. Portanto, a extremidade que se liga ao marcador precisa possuir elevada estabilidade cinética sob condições biológicas, enquanto a outra terminação do quelato bifuncional permite a ligação covalente à molécula biológica (Banerjee e col., 2005) .

Sua estereoquímica é importante quando da síntese de radiofármacos para receptores específicos. Quando utilizados para formar complexos com ^{99m}Tc , apresentam estabilidade termodinâmica e um número bastante reduzido de formação de isômeros (Kowalsky e Falen, 2004).

Um dos primeiros agentes quelantes utilizado foi o ácido dietilenotriamino pentaacético (DTPA), porém essencialmente para os radioisótopos ^{111}In , ^{90}Y e ^{99}Tc (Kowalsky e Falen, 2004). Outro agente, o 6-hidrazinonicotinamida (HYNIC), a partir de sua síntese por Abrams e col. (1990), tem sido empregada nas marcações de biomoléculas com $^{99m}\text{Tc}/^{188}\text{Re}$ apresentando resultados promissores por causa de sua alta eficiência de marcação especialmente com análogos da somatostatina (Plachcinska e col., 2004) e oligonucleotídeos antisense (Zhang e col., 2000).

A FIG. 9 mostra uma ilustração esquemática do radiotraçador alvo-específico, que são geralmente complexos de um radiometal com um conjugado da biomolécula com o quelante. O radiotraçador alvo específico contendo metal pode ser dividido em quatro partes: biomolécula, espaçador, agente quelante bifuncional e radionuclídeo. A biomolécula serve como um carreador para transporte alvo-específico ao tecido desejado com muitos receptores alvo. O ligante radiomarcado liga-se a esses receptores com alta afinidade e

especificidade, resultando em captação seletiva do radiotraçador. A escolha do radionuclídeo depende da utilidade clínica do radiotraçador (Zhou e col., 2011a).

FIGURA 9 – Representação esquemática do desenho de um radiofármaco (Liu e col., 2003)

1.9.1 Mercaptoacetilglicilglicilglicina (MAG3)

O quelante mercaptoacetilglicilglicilglicina (MAG₃) (FIG. 10), é um dos diversos amidotióis que tem sido extensivamente utilizado com sucesso para radiomarcagem de proteínas e outras moléculas com ^{99m}Tc (Winnard Jr. e col., 1997). O desenvolvimento do ^{99m}Tc-MAG₃, envolve não somente cuidado na seleção do ligante coordenador (N₃S), mas também estratégias de localização do substituinte carboxilato na seqüência peptídica, já que os ligantes são escolhidos para conferir propriedades específicas ao complexo final, como lipofilicidade, carga iônica e tamanho da molécula. Winnard Jr. e col. (1997) sintetizaram o éster N-hidroxisuccinamida (NHS) com MAG₃, com o grupo acetil como protetor. Este grupo, é rapidamente removido em pH neutro ou ligeiramente básico, em soluções a temperatura ambiente (Wang e col., 2006). Além disso, o número de etapas sintéticas é reduzido e uma maior estabilidade do complexo *in vivo* foi encontrada (Winnard Jr. e col., 1997).

FIGURA 10 – Molécula de mercaptoacetilglicilglicilglicina (MAG₃)

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de um radiofármaco peptídico de tecnécio-99m dirigido ao diagnóstico de melanoma.

O objetivo específico é a caracterização de novos radiotraçadores baseados na relação entre o processo de angiogênese, seus receptores como integrina e aminopeptidase N e a ligação com a sequência de aminoácidos utilizada. Para isto o escopo do presente estudo foi o desenvolvimento de marcação de dois conjugados peptídicos a saber S-acetil-MAG₃-PEG₈-c(RGDyK) e S-acetil-MAG₃-PEG₈-c(NGRyK) com tecnécio-99m, e avaliação biológica em modelos tumorais experimentais, na condição de estudos pré-clínicos para possíveis novas drogas.

3 MATERIAS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) – Shimadzu, Kyoto, Japão
- detector de radiação Radiomatic Flo-one – Packard, EUA;
- Balança analítica, modelo M-220 – Denver Instruments, EUA;
- Purificador de água Ellox acoplado a sistema de purificação MilliQ, EUA;
- Calibrador de doses, modelo CRC-15R – Capintec Inc., EUA;
- Contador automático tipo poço com cristal NaI(Tl), modelo D5002, cobra II, auto-gamma, A. Packard, Camberra, EUA;
- Refrigerador Biflex 450 L Frostfree, Biplex 450 – Cônsul, Brasil;
- Freezer vertical com temperatura de -70 °C – Eletrolab, Brasil;
- Bomba de vácuo, modelo 825 T – Fisaton, Brasil;
- Estufa, modelo Orion 515 – Farrem, Brasil;
- Aquecedor Thermomixer comfort R (0-100°C)- Eppendorf®, EUA;
- Medidor de pH, modelo DM-31 – Digimed, Brasil;
- Agitador de tubos, modelo AP56 – Phoenix, Brasil;
- Centrífuga, modelo HIMAC-CF 7D2 – HITACHI, EUA;
- Capela com sistema de exaustão – BRASLAB Equipamentos para Laboratório Ltda, Brasil;
- Gama-câmara equipada com os seguintes módulos:
 - Detector Gama - Mediso, Hungria.
 - Colimador – Mediso, Hungria.
 - Software Console TH22 v.7.02 – Mediso, Hungria.
 - Software InterviewXP® v1.05.014 – Mediso, Hungria.
- Espectrômetro de absorção atômica, modelo Z-5300-HITACHI- Japão;
- Espectrofotômetro visível na região do ultravioleta (UV), modelo DMS-80, Perkin Elmer;
- Detector de radiação tipo poço, modelo Nuclear Spectrometer LB2040, Berthold, Alemanha.

3.1.2 Reagentes e solventes

- Radioisótopo tecnécio-99m, obtido do gerador molibdênio-99/tecnécio-99m produzido na Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), Brasil;
- Solução fisiológica estéril (cloreto de sódio) 0,9% – Equiplax, Brasil;
- Conjugados Peptídicos: S-acetil-MAG₃-PEG₈-c(RGDyk) (FIG. 12) e S-acetil-MAG₃-PEG₈-c(NGRyk) (FIG. 13) – piChem, Áustria;

FIGURA 12 – Estrutura molecular do conjugado peptídico S-acetil-MAG₃-PEG₈-c(RGDyk); Fórmula Molecular: C₅₆H₉₁N₁₃O₂₂S; Massa Exata: 1329,61; Peso Molecular: 1330,46

FIGURA 13 – Estrutura molecular do conjugado peptídico S-acetil-MAG₃-PEG₈-c(NGRyk); Fórmula Molecular: C₅₆H₉₂N₁₄O₂₁S; Massa Exata: 1328,63; Peso Molecular: 1329,48

- Gás nitrogênio, grau de pureza 99,99% – White Martins, Brasil;
- Ácido ascórbico, grau de pureza 99% – Sigma Aldrich, EUA;
- Tartarato disódico dihidratado – Riedel-de Haen[®], Alemanha;
- Cloreto estanoso dihidratado – Merck, Alemanha;
- Fosfato disódico anidro – Merck, Alemanha;
- Fosfato de sódio monobásico – Merck, Alemanha;
- Bicarbonato de sódio, grau de pureza 99% - Sigma Aldrich, EUA;
- Hidróxido de amônio – Sigma Aldrich, EUA;
- Acetato de amônio, grau de pureza 99% – Sigma Aldrich, EUA;
- Heparina (Liquemine[®]), solução 5000 U.I./mL – Roche, Brasil;
- Metiletilcetona, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Acetonitrila, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Ácido trifluoracético, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Octanol, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Ácido clorídrico, grau de pureza 37% p.a. – Merck, Alemanha;
- Células da linhagem tumoral de melanoma murino B16F10 - American Type Culture Collection – ATCC, EUA;
- Células de linhagem tumoral de melanoma humano SKMEL28 - American Type Culture Collection – ATCC, EUA;
- Uretana, grau de pureza 99% – Sigma Aldrich, EUA;
- Éter dietílico, grau de pureza p.a. – Merck, Alemanha;
- Glicina – Sigma Aldrich, EUA;
- Meio de cultura RPMI + 1% FCS - Cultilab[®], Brasil;
- Meio de cultura DME/F12 + 1% FCS - Cultilab[®], Brasil.

3.1.3 Outros

- Fitas cromatográficas ITLC-SG (*Instant Thin Layer Chromatography - Silica Gel*), 5 × 20 cm – Pall Corporation, EUA;
- Fitas cromatográficas Whatman N°1 - Whatman International Ltda., Inglaterra;
- Pipetas automáticas de 10, 100 e 1000µL – Eppendorf[®], EUA;
- Placas de 6 e de 12 poços, estéreis- Corning Incorporated[®], EUA;

- Tubos reacionais de 1,5 mL, transparentes, mono-poliméricos- Axygen Scientific® (MCT-150-C) – EUA;
- Seringas de insulina de 1,0 mL– B&D, EUA;
- Capilares de 100 µL– Microcaps, EUA;
- Membranas filtrantes 0,22 µm - Millipore®, EUA;
- Fitas de pH, Neutralit pH 5-10 - Merck, Alemanha;
- Vidrarias em geral e instrumentos cirúrgicos.

3.1.4 Animais

- Camundongos da linhagem *Swiss*, Peso corpóreo 20-25g– Biotério IPEN/CNEN-SP, Brasil;
- Camundongos da linhagem *Nude*, Peso corpóreo 15-20g – Biotério IPEN/CNEN-SP, Brasil.

3.2 Métodos

3.2.1 Marcação dos Conjugados Peptídicos RGD e NGR com Tecnécio-99m

O radioisótopo tecnécio-99m foi eluído de um gerador molibdênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$), em solução de cloreto de sódio 0,9% na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$).

Os sais dos conjugados peptídicos foram diluídos em água estéril na concentração de 751,6 µM (RGD) e 752,1 µM (NGR).

A radiomarcagem dos conjugados foi realizada seguindo-se o protocolo de Wang e col. (2006) e já utilizado anteriormente pelo nosso grupo (Teodoro e col., 2011).

Duas soluções foram preparadas previamente à marcação e nitrogenadas. Primeiramente uma solução tampão tartarato, com a dissolução de tartarato dissódico dihidratado a uma concentração de 50 mg/mL em uma mistura de 0,5 M de bicarbonato de sódio, 0,25 M de acetato de amônio e 0,18 M de hidróxido de amônio, em igual proporção (1:1:1) com pH 8,5-9. Também foi preparada uma solução de ácido ascórbico em ácido clorídrico 0,1 M (1 mg/mL).

Em um tubo de reação colocou-se 10 µL de solução de conjugado peptídico (751,6 µM para o RGD e 752,1 µM para o NGR), 45 µL de solução de

acetato de amônio 0,25 M, 15 µL de solução tampão tartarato, 3 µL de uma solução de cloreto estânico em ácido ascórbico/ácido clorídrico (4 mg/mL) e 300 µL de Na^{99m}TcO₄ com atividade variando entre 74 e 1850 MBq. A mistura final, de pH 8,5-9, foi agitada e a reação realizada a 100°C por 20 minutos.

3.2.2 Avaliação radioquímica dos conjugados radiomarcados

A avaliação radioquímica foi realizada por Cromatografia de Camada Delgada ascendente em fitas de sílica gel (ITLC-SG) usando dois sistemas de solventes: metiletilcetona e acetonitrila 50%. O cálculo radioquímico foi determinado em porcentagem da atividade de cada espécie radioquímica em relação a atividade total da fita, sempre de acordo com o fator de retenção (R_f) correspondente.

A avaliação radioquímica também foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usando uma coluna C18 de fase reversa com fluxo de 1mL/min. O sistema de solventes no CLAE consistiu em água contendo 0,1% de ácido trifluoracético - TFA (solvente A) e acetonitrila contendo 0,1% de ácido trifluoracético – TFA (solvente B). O sistema de gradientes começou com uma composição de solventes de 95% de A e 5% de B e seguiu um gradiente linear de 30% de A e 70% de B de 0 a 25 minutos e 5% de A e 95% de B dos 25 aos 30 minutos.

3.2.3 Determinação da lipofilicidade dos produtos radiomarcados

A determinação da lipofilicidade dos radiomarcados foi realizada por meio do teste de coeficiente de partição (P), utilizando n-octanol e água como solventes (Okarvi, 2004).

Uma alíquota de 100 µL do complexo radiomarcado foi adicionada a uma mistura de 6 mL de n-octanol e água (1:1). A mistura foi homogeneizada e, com a finalidade de se separar as duas fases (aquosa e orgânica), centrifugado à 5000xg durante 3 min à temperatura ambiente. Após a centrifugação e repouso, foram coletadas amostras de 100 µL de cada fase em triplicata e colocadas em

tubos para a determinação da atividade. O coeficiente de partição (P) foi calculado de acordo com a equação abaixo e expresso em $\log P$.

$$\log P = \frac{cpm(\text{octanol})}{cpm(\text{água})}$$

onde: cpm = contagem por minuto.

3.2.4 Biodistribuição em camundongos sadios

Os estudos de biodistribuição *in vivo* dos conjugados radiomarcados foram realizados com aprovação do Comitê de Ética do IPEN/CNEN-SP. A água e a alimentação estiveram disponíveis durante todo o período de experimentação. Foram usados camundongos da linhagem Swiss em grupos de 6 animais por tempo.

Foram injetados 100 µL de uma solução (5 µM) da droga na veia caudal dos camundongos sadios com atividade de 37-74 MBq. Os estudos foram conduzidos após o sacrifício dos animais aos 5, 30, 60, 90, 120, 360 minutos após administração das drogas.

Tecidos e órgãos (sangue, coração, pulmão, rins, baço, estômago, pâncreas, fígado, intestino grosso e delgado, músculo, osso), de todos os camundongos foram retirados, pesados e colocados em tubos para que a sua atividade radioativa fosse medida em contador do tipo poço de NaI(Tl). A cauda foi retirada para correção da atividade administrada.

O padrão foi preparado com o mesmo volume de droga administrada nos camundongos, e colocado para a contagem da atividade no mesmo momento em que a atividade dos órgãos foi mensurada. As porcentagens de dose injetada por órgão (%DI/órgão) e por grama (%DI/g), de todos os órgãos avaliados, foram calculadas considerando o padrão como 100% da dose administrada aos camundongos, e os experimentos conduzidos considerando um número amostral de seis animais por tempo estudado.

A porcentagem de dose injetada no sangue total foi calculada para uma volemia de 7% do peso corpóreo do animal multiplicado pela %DI/mL de cada tempo estudado. A porcentagem de dose injetada (%DI) do músculo e do osso

total foi calculada assumindo, respectivamente, um volume de 40% e 10% do peso corpóreo respectivamente.

3.2.5 Cultivo celular

Células tumorais de melanoma murino da linhagem B16F10 e células tumorais de melanoma humano da linhagem SKMEL28 foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 + 10% SFB (Soro feral bovino) e DME/F12 + 10% SFB, respectivamente, com 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

O cultivo foi realizado em garrafas próprias para o cultivo celular sob atmosfera de 5% CO₂ a 37°C. Após atingirem a confluência, as células tumorigênicas foram então tripsinizadas, centrifugadas (5 min a 100xg) e ressuspendidas em tampão fosfato-salina (PBS, pH=7,4).

Para a realização dos ensaios *in vitro*, as células foram ressuspendidas em meio de cultura contendo 1% de SFB, e então distribuídas nos em placas de seis poços a uma concentração final de 1×10^6 células/poço. O volume final para as placas de seis poços foi de 2 mL, respectivamente. Após 24 horas de incubação, as placas foram disponibilizadas para os ensaios.

Para a inoculação nos animais, as células foram ressuspendidas em solução de PBS na concentração de $5 \times 10^6/0,1$ mL.

3.2.6 Ensaios *in vitro* de internalização

Os ensaios de internalização das moléculas de $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyk)}$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$ foram realizados utilizando-se o protocolo de Garcia-Garayoa e col. (2002) com algumas modificações. Foi realizada uma lavagem com meio de cultura gelado. Para a determinação de ligação total do radiotraçador às células adicionou-se aos poços 1400 µL de meio de cultura e 100 µL do produto radiomarcado marcado (1,35 nM). Para a determinação da ligação não específica, 1300 µL de meio de cultura, 100 µL de produto não-marcado (15 µM) e 100 µL de do radiotraçador foram adicionados aos poços.

As placas foram então incubadas por 5, 30, 60, 90 e 120 minutos a 37°C. O sobrenadante foi coletado em tubos para contagem radioativa e as células lavadas duas vezes com solução de tampão fosfato salina (PBS) gelado. A atividade associada à superfície celular foi removida por uma lavagem ácida de 5 minutos com solução tampão glicina (50 mM glicina e 1 M NaCl, pH= 2,8) à temperatura ambiente, e coletado para a contagem da atividade. Finalmente, a quantidade do radiotraçador internalizado foi obtido pela lise das células com NaOH (1N), e a atividade também mensurada em contador do tipo poço de NaI(Tl).

3.2.7 Inoculação das células tumorais em camundongos

As células de melanoma (5×10^6 células/0,1 mL) da linhagem B16F10 e SKMEL28 foram injetadas subcutaneamente no dorso superior direito dos camundongos *Nude* em grupos de 6 animais. O acompanhamento do crescimento tumoral foi realizado a cada três dias e os estudos realizados quando os tumores sólidos estivessem visíveis, palpáveis e atingissem um tamanho de aproximadamente 1 cm de diâmetro. O tempo estimado de desenvolvimento do tumor nos animais ficou compreendido entre uma semana para animais portadores das células B16F10 e de três semanas para animais portadores das células SKMEL28.

3.2.8 Biodistribuição em camundongos portadores de tumor

Os estudos de biodistribuição em modelo tumoral foram conduzidos conforme descrito no item 3.2.4. em camundongos *Nude* previamente inoculados com células tumorais. Este estudo foi conduzido apenas em um tempo (120 minutos após a administração do radiotraçador).

Estudos de bloqueio tumoral foram realizados com a finalidade de avaliar a especificidade dos radiomarcados. Para esta avaliação, os camundongos receberam concomitantemente a mesma dose dos conjugados radiomarcados e uma dose de 0,1 mL (5 μ M) dos respectivos conjugados peptídicos frios, a saber, S-acetil-MAG₃-PEG₈-c(RGDyk) e S-acetil-MAG₃-PEG₈-c(NGRyk).

3.2.9 Aquisição de imagens cintilográficas

Os animais foram anestesiados com 40 µL de uretana 16,7%. Imagens planares em γ -câmara foram obtidas após 2 horas da administração dos radiotraçadores para animais bloqueados e não-bloqueados.

3.2.10 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o teste *t de student* para dados ímpares, para determinar diferenças significativas entre os grupos nos estudos de especificidade da biodistribuição descritos acima. As diferenças no nível de confiança de 95% ($p < 0,05$) foram consideradas significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Radiomarcção e avaliação radioquímica dos conjugados radiomarcados

A pureza radioquímica obtida por cromatografia de camada delgada demonstrou que o produto radiomarcado e a impureza TcO_2 ficavam no início da fita ($R_f=0$) quando metiletilcetona foi utilizado como solvente. Com acetonitrila 50%, o produto se desloca ($R_f=1$) juntamente com a impureza de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ livre na forma de pertecnetato de sódio (NaTcO_4).

Os valores da pureza radioquímica obtidos para o $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyK)}$ foram de $97,2 \pm 0,53\%$ e para o $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyK)}$ foram de $99,3 \pm 0,4\%$, em análise por CLAE (FIG. 14). Os resultados obtidos por CLAE com tempo de retenção (t_R) de 10,92 min e 10,69 min, respectivamente, confirmaram os encontrados através da cromatografia de camada delgada, resultando em uma única espécie radioquímica principal para cada conjugado radiomarcado.

FIGURA 14 - Radiocromatogramas: (A) $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyK)}$; (B) $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyK)}$; (C) $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$.

4.2 Determinação da lipofilicidade dos produtos radiomarcados

Os valores do coeficiente de partição ($\log P$) dos radiotraçadores foram -3,33 para o traçador RGD e -3,15 para o traçador NGR, mostrando que não houve diferença significativa entre eles ($p>0,05$). Ambos encontram-se na faixa de hidrofiliicidade.

4.3 Biodistribuição em camundongos saudáveis

Os resultados do estudo de biodistribuição para ambos radiotraçadores em animais Swiss saudáveis estão demonstrados em porcentagem de dose injetada por grama (%DI/g) nas FIG. 15 e FIG. 16. Os radioconjugados mostraram perfis similares, para a maioria dos órgãos.

A maior captação para ambos radiotraçadores $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyK)}$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyK)}$ ocorreu aos 5 minutos após a injeção, nos rins ($15,06 \pm 5,60$ %DI/g e $30,05 \pm 5,14$ %DI/g, respectivamente), ($p<0,05$), seguidos pelos intestinos e pulmões ($8,29 \pm 1,90$ %DI/g para o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyK)}$ e $6,88 \pm 1,17$ %DI/g para o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyK)}$).

Foi observada uma notável captação sanguínea no primeiro tempo de avaliação (5 min), diminuindo em torno de 50% após os 30 min e 95% em 120 min após a injeção. Foi observada também que o traçador RGD em relação ao NGR tem uma depuração nos órgãos mais lenta e também maior captação, com exceção para os rins e sangue.

Uma elevada captação no intestino delgado ($6,18 \pm 1,48$ %DI/g) foi obtida aos 30 min p.i. para o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyK)}$, mantendo-se elevada ($6,08 \pm 1,38$ %DI/g) até os 120 min p.i. Uma queda da radioatividade retida no intestino delgado ($2,34 \pm 0,77$ %DI/g, 240 min p.i.), acompanhada por um subsequente aumento na captação no intestino grosso foi observada em ambos 240 min e 360 min p.i. ($3,29 \pm 0,41$ %DI/g e $2,05 \pm 0,30$ %DI/g, respectivamente).

FIGURA 15 – Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyk)}$ em camundongos Swiss sadios (n=6)

Para o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$, houve uma queda na captação no intestino delgado a partir dos 5 min p.i. ($3,10 \pm 0,83$ %DI/g), com um único pico aos 120 min p.i. ($2,37 \pm 1,18$ %DI/g), tornando a diminuir novamente ($0,22 \pm 0,12$ %DI/g aos 360 min). No intestino grosso, houve um ligeiro aumento aos 240 min e 360 min p.i. ($1,80 \pm 1,15$ %DI/g e $1,02 \pm 0,77$ %DI/g, respectivamente).

FIGURA 16 – Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$ em camundongos Swiss sadios (n=6)

A porcentagem da dose total injetada dos radiomarcados pode ser observada na TAB. 1. Aos 5 min p.i., há um grande acúmulo de atividade no sangue, músculo e osso para ambos radiomarcados. A partir dos 120 min p.i. há uma grande redução desses valores, causados pela depuração e eliminação da radioatividade pelas vias de excreção. Ambos radiomarcados apresentarem padrões similares na redução do acúmulo da radioatividade no sangue, sendo que o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$, apresentou uma depuração mais rápida no músculo e nos ossos, quando comparado ao $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyk)}$.

TABELA 1 – Porcentagem da dose total injetada dos radiomarcados $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyk)}$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$ em camundongos *Swiss* sadios em diferentes tempos

Órgão/tecido		5 min	30 min	60 min	120 min	240 min	360 min
%DI							
Sangue	RGD	14,49	5,12	1,82	0,75	0,22	0,11
	NGR	15,99	6,77	2,36	0,55	0,11	0,31
Músculo	RGD	29,63	10,95	7,69	6,18	4,12	0,89
	NGR	18,34	11,69	3,45	1,38	1,31	0,06
Osso	RGD	9,33	5,10	2,99	2,28	1,22	2,73
	NGR	7,04	3,74	1,35	0,75	1,26	0,24

4.4 Ensaios *in vitro* de internalização

Os estudos de internalização *in vitro* podem ser observados na FIG. 17. A ligação total do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyk)}$ às células B16F10 alcançaram o maior valor no menor tempo avaliado, que foi após 5 min de incubação ($1,02 \pm 0,01\%$) diminuindo em tempos posteriores. Nessas células, em torno de 10% do radiotraçador foi internalizado. Nas células SKMEL28, o desempenho foi totalmente diferente. A ligação total e a internalização aumentaram com o tempo de incubação, atingindo o valor máximo aos 120 min, de $1,4 \pm 0,01\%$ e $1,17 \pm 0,01\%$, respectivamente. Nesse caso, a internalização foi de 83,57%.

Para o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$, a ligação total em células B16F10 teve um pico aos 30 min de incubação ($1,28 \pm 0,12\%$), diminuindo após esse período e a internalização seguiu o mesmo padrão. Nesse caso, 27% do radiotraçador foi internalizado. A ligação total ($0,41 \pm 0,09\%$) e internalização (50%) do traçador NGR em células SKMEL28 variou pouco nos diferentes tempos de incubação, mantendo-se baixos em todos eles.

FIGURA 17 - Tempo de internalização do (A) ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(RGDyk) em células B16F10; (B) ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(RGDyk) em células SKMEL; (C) ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(NGRyk) em células B16F10; (D) ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(NGRyk) em células SKMEL28 a 37°C. Valores de desvios na casa de centésimos não são visualizados nos gráficos.

4.5 Biodistribuição em camundongos portadores de tumor

As propriedades farmacocinéticas e alvo para melanoma do ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(RGDyk) e do ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(NGRyk) são mostradas na TAB. 2. A captação média pela maioria dos órgãos e tecidos, para ambos os radiotraçadores, em camundongos portadores de células tumorais, foram abaixo ou na faixa de 1% DI/g, com exceção para rins e intestinos.

TABELA 2 – Biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyk)}$ e do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$ em camundongos *Nude* portadores de células tumorais de melanoma murino B16F10 e de melanoma humano SKMEL28 aos 120 min p.i. (n=6)

Órgão/tecido (%DI/g $\pm$ DP)	Células B16F10				Células SKMEL28			
	RGD	RGD block	NGR	NGR block	RGD	RGD block	NGR	NGR block
Sangue	0,54 $\pm$ 0,33	0,18 $\pm$ 0,04	0,21 $\pm$ 0,05	0,26 $\pm$ 0,04	0,42 $\pm$ 0,33	0,13 $\pm$ 0,04	0,59 $\pm$ 0,47	0,25 $\pm$ 0,13
Coração	0,45 $\pm$ 0,17	0,13 $\pm$ 0,04	0,29 $\pm$ 0,17	0,29 $\pm$ 0,21	0,41 $\pm$ 0,16	0,11 $\pm$ 0,05	0,27 $\pm$ 0,16	0,13 $\pm$ 0,04
Pulmões	1,16 $\pm$ 0,40	0,47 $\pm$ 0,12	0,72 $\pm$ 0,48	0,50 $\pm$ 0,15	0,97 $\pm$ 0,41	0,25 $\pm$ 0,06	0,81 $\pm$ 0,46	0,41 $\pm$ 0,16
Rins	2,38 $\pm$ 1,30	1,10 $\pm$ 0,34	2,42 $\pm$ 1,05	2,79 $\pm$ 1,14	1,72 $\pm$ 0,54	0,92 $\pm$ 0,44	2,34 $\pm$ 0,85	1,60 $\pm$ 0,55
Baço	0,63 $\pm$ 0,16	0,42 $\pm$ 0,21	0,25 $\pm$ 0,14	0,37 $\pm$ 0,15	0,49 $\pm$ 0,20	0,20 $\pm$ 0,03	0,31 $\pm$ 0,12	0,24 $\pm$ 0,14
Estômago	1,67 $\pm$ 0,61	0,45 $\pm$ 0,12	0,56 $\pm$ 0,26	0,50 $\pm$ 0,23	1,42 $\pm$ 0,76	0,78 $\pm$ 0,20	0,57 $\pm$ 0,21	0,31 $\pm$ 0,09
Pâncreas	0,41 $\pm$ 0,22	0,27 $\pm$ 0,18	0,32 $\pm$ 0,22	0,42 $\pm$ 0,13	0,43 $\pm$ 0,19	0,12 $\pm$ 0,05	0,38 $\pm$ 0,19	0,14 $\pm$ 0,08
Fígado	0,90 $\pm$ 0,47	0,82 $\pm$ 0,49	0,65 $\pm$ 0,26	0,66 $\pm$ 0,22	1,01 $\pm$ 0,40	0,50 $\pm$ 0,25	0,72 $\pm$ 0,19	0,42 $\pm$ 0,12
Int. Grosso	2,08 $\pm$ 0,88	2,29 $\pm$ 1,61	0,83 $\pm$ 0,49	1,34 $\pm$ 0,60	2,15 $\pm$ 0,69	0,67 $\pm$ 0,20	1,18 $\pm$ 0,45	0,85 $\pm$ 0,66
Int. Delgado	2,53 $\pm$ 1,31	1,84 $\pm$ 0,33	3,35 $\pm$ 1,77	4,44 $\pm$ 1,37	2,74 $\pm$ 1,07	1,82 $\pm$ 0,42	2,63 $\pm$ 1,16	1,08 $\pm$ 0,80
Músculo	0,41 $\pm$ 0,17	0,24 $\pm$ 0,06	0,17 $\pm$ 0,12	0,21 $\pm$ 0,14	0,44 $\pm$ 0,22	0,05 $\pm$ 0,05	0,31 $\pm$ 0,22	0,08 $\pm$ 0,02
Osso	0,70 $\pm$ 0,17	0,83 $\pm$ 0,44	0,71 $\pm$ 0,44	0,30 $\pm$ 0,10	0,71 $\pm$ 0,23	0,11 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,39	0,24 $\pm$ 0,10
Tumor	1,06 $\pm$ 0,19	0,27 $\pm$ 0,03	0,85 $\pm$ 0,34	0,51 $\pm$ 0,11	7,85 $\pm$ 2,34	1,17 $\pm$ 0,22	1,07 $\pm$ 0,23	0,42 $\pm$ 0,12

Os resultados de biodistribuição exibiram uma captação tumoral substancial para animais portadores de células do tumor SKMEL28 com $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyk)}$ (7,85 $\pm$ 2,34 %DI/g), quando comparado com a captação pelo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$ (1,07 $\pm$ 0,23 %DI/g), ($p \leq 0,001$). O tumor foi bloqueado 85% com o uso de 100 μg de peptídeo frio para o primeiro traçador e 60% com uma quantidade equivalente de NGR frio (TAB. 2, FIG. 18).

FIGURA 18 – Captação dos radiotraçadores em tumor e em tumor bloqueado 120 min após a injeção em células tumorais de melanoma B16F10 e SKMEL28

A captação tumoral ($1,06 \pm 0,19$ %DI/g) do $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyk)}$ em células de melanoma B16F10 foi novamente maior quando comparado ao $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$ ($0,85 \pm 0,34$ %DI/g) ($p < 0,05$), mas não tão notável como para as células SKMEL28 (TAB. 2, FIG. 18).

FIGURA 19 – Razões tumor/órgão e tumor/tecidos para células B16F10 (T=Tumor; S=Sangue; M=Músculo; O=Osso; I= Intestinos; F=Fígado; R= Rins)

FIGURA 20 – Razões tumor/órgão e tumor/tecidos para células SKMEL28 (T=Tumor; S=Sangue; M=Músculo; O=Osso; I= Intestinos; F=Fígado; R= Rins)

Altas razões tumor/sangue (4,05) e tumor/músculo (5,0) foram obtidas para o traçador NGR em animais portadores de células B16F10 do que para o traçador RGD (FIG. 19). As razões da captação foram maiores para o ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(RGDyk) em células SKMEL28 especialmente para tumor/sangue (18,7) e tumor/músculo (17,8) (FIG. 20).

4.6 Aquisição de imagens cintilográficas

A última etapa do estudo proposto foi a aquisição de imagem cintilográfica (FIG. 21). A partir dela podemos avaliar o comportamento do radiofármaco em um tempo conhecido e também a visualização tumoral através dos aparelhos de imagem diagnóstica disponíveis atualmente.

Os tumores de melanoma no flanco dos animais foram claramente visualizados para o ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(RGDyk). Porém para o radioconjugado ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(NGRyk), a visualização só pode ser observada com células B16F10, devido a uma falha em nosso equipamento. Ambos radioconjugados exibiram alta captação tumoral em relação aos órgãos normais, com exceção aos órgãos excretórios, excluindo o ^{99m}Tc -NGR em células SKMEL28.

FIGURA 21 – Imagens cintilográficas em camundongos *Nude* portadores de células tumorais de melanoma (A) ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(RGDyk) em células B16F10; (B) ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(NGRyk) em células B16F10; (C) ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(RGDyk) em células SKMEL; (D) ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(NGRyk) em células SKMEL28

5 DISCUSSÃO

O desenvolvimento de um novo radiotraçador para alvos como um processo de angiogênese, que ocorre em tumores, pode ser uma vantagem em diagnósticos. Esse traçador pode ser usado principalmente em tumores epiteliais, onde esse processo é mais frequente.

A biblioteca de peptídeos *phage display* tem contribuído para encontrar sequências de peptídeos específicos para esse objetivo, combinando angiogênese, receptor e sequência de aminoácidos. Peptídeos lineares podem rapidamente serem degradados *in vivo*, resultando em alta captação renal com acumulação não-específica no tumor. Devido a esta característica a ciclização foi empregada para melhorar a estabilidade peptídica (Sutcliffe-Goulden e col., 2002). Peptídeos cíclicos, são mais resistentes a proteólise e são conformacionalmente forçados e presos na conformação ativa, sugerindo que a ciclização melhora a eficácia alvo tumoral (Ogawa e col., 2003). Diferenças de características biológicas de RGD e NGR, linear e cíclico, já foram descritas antes (Kim e col., 2005; Kostidis e col., 2004; Metaferia e col., 2010; Verrier e col., 2002).

As sequências de peptídeos usadas nesse estudo são diferentes, mas o quelante bifuncional (MAG₃) e o espaçador (PEG₈) foram os mesmos. O agente quelante bifuncional, assim como o espaçador, são comumente usados em procedimento de radiomarcção para melhorar a estabilidade. O quelante bifuncional mercaptoacetiltriglicina (MAG₃) já foi usado para radiomarcção de biomoléculas com ^{99m}Tc, e as características desse método de marcação já são bem conhecidas (Banerjee e col., 2005; Winnard e col., 1997). O polietilenoglicol (PEG) é um polímero altamente investigado para modificações covalentes em moléculas biológicas.

Constam na literatura vários estudos com moléculas de RGD, usando diferentes quelantes, tais como o DTPA, HYNIC, DOTA, MAG₂, de maneira que o comportamento das moléculas seriam exclusivamente relacionadas as suas sequências de aminoácidos e conformação estrutural (Decristoforo e col., 2006; Hagen e col., 2000; Liu e col., 2001; Shi e col., 2009; Zhou e col., 2011b).

O tecnécio é ainda o radionuclídeo para diagnósticos mais amplamente disponível, com características físicas ótimas, portanto, derivados de ^{99m}Tc -marcado poderiam ser mais amplamente disponibilizados e clinicamente aplicados.

As impurezas radioquímicas que podem surgir numa radiomarcagem têm origem na decomposição dos radiofármacos, devido à ação do solvente, temperatura, pH, luz, presença de agentes oxidantes ou redutores, e radiólise. A definição de pureza radioquímica é o percentual do radionuclídeo na forma química de interesse em uma determinada amostra radioativa. Desta forma, as principais impurezas radioquímicas encontradas nas marcações que utilizam a técnica do agente quelante bifuncional são o pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e o colóide $^{99m}\text{TcO}_2$ (Oliveira e col., 2006). Eventualmente pode ocorrer também a formação de isômeros. O que não foi observado neste estudo.

Pelo padrão de CLAE dos ^{99m}Tc -peptídeos conjugados mostrado na FIG. 14, somente um único pico foi observado para ambos traçadores, sugerindo que somente um único produto foi formado, com alta pureza radioquímica. Os valores de tempo de retenção e de coeficiente de partição foram bem parecidos para ambos conjugados. O pico similar no perfil de radio-CLAE entre eles, deve ser devido aos pesos moleculares, hidrofiliidade e estrutura semelhantes.

O coeficiente de partição é uma medida da lipofiliidade de um composto e é definido como a razão da concentração do mesmo, no equilíbrio, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, como por exemplo, a água e o octanol (Silva e Ferreira, 2003). Ele também é uma importante propriedade físico-química de um fármaco, pois a farmacocinética e biodistribuição *in vivo* do fármaco dependem da sua característica hidrofílica ou lipofílica (Kothari e col., 2003).

Usualmente, o valor do coeficiente final é expresso em $\log P$, sendo que um composto lipofílico deve apresentar um coeficiente superior a 0,9. Quanto maior o valor do coeficiente de partição, maior a afinidade da substância pela fase orgânica. No entanto, substâncias hidrofílicas apresentam baixo $\log P$. Essa característica, em radiofarmácia, é favorável a uma depuração sanguínea e uma rápida excreção renal, importantes na visualização por imagem do órgão de interesse (Zhang e col., 2002).

Como já era esperado, o complexo $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyK)}$ apresentou caráter hidrofílico ($\log P = -3,33$), sendo este resultado próximo ao obtido por Decristoforo e col. (2006) em suas marcações de conjugados de RGD marcados com ^{99m}Tc ($\log P$ em torno de $-3,5$). Knetsch e col. (2011) também obtiveram um resultado parecido ($\log P = -3,6$) em sua marcação de NODAGA-RGD com gálio-68. Não foram encontrados na literatura valores de $\log P$ para conjugados com NGR.

A biodistribuição de radiofármacos é essencial à determinação da sua eficácia e utilidade. Isto inclui a absorção, distribuição através dos tecidos, depuração sanguínea e excreção após a administração da droga. A excreção do radiofármaco faz-se por meio dos mecanismos existentes (por exemplo, excreção pulmonar, hepática e renal) e segue uma lei exponencial semelhante ao decaimento do radionuclídeo (Oliveira e col., 2006).

Os achados na avaliação da biodistribuição relacionados aos rins, fígados e intestinos, confirmam os valores de coeficiente de partição, mostrando uma alta hidrofiliabilidade como característica para os radioconjugados e sugerindo a via urinária como a via de excreção principal. Entretanto, uma porcentagem significativa de radioatividade manteve-se no trato hepatobiliar.

Um modelo ideal de biodistribuição, é aquele em que qualquer radioatividade não ligada ao tumor e/ou não-específica, seja rapidamente depurada do sangue e eficientemente excretada sem significativa retenção por nenhum órgão normal ou não-alvo. Desde que a depuração hepatobiliar é necessariamente acompanhada por um relativamente baixo trânsito gastrointestinal da droga, antes que a radioatividade seja depurada do corpo, uma rota de excreção inteiramente renal do radiofármaco é desejada. Também, a redução da quantidade de radioatividade retida nos órgãos não-alvos e na circulação sanguínea são parâmetros importantes na determinação do tempo de aquisição das imagens cintilográficas (Schotellius e Wester, 2009).

Seguindo a rota de excreção dos conjugados radiomarcados em nosso estudo, observou-se que após os 5 min da administração do traçador, e de alta captação renal, há uma queda constante na atividade nos rins, corroborando com os resultados de depuração sanguínea e indicando a excreção de ambos radiofármacos.

Uma baixa captação da radioatividade por todos os órgãos foi observada nos estudos de biodistribuição. Os baixos níveis de radioatividade encontrados no estômago (<3%) em todos os tempos estudados, para ambos radioconjugados, indicam a estabilidade dos radiocomplexos frente a uma reoxidação.

Geralmente, quando peptídeos são marcados com o agente quelante bifuncional MAG_3 , ocorre excreção via hepatobiliar. Estudos na literatura apontam que o agente renal $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ é transportado para o trato gastrointestinal via sistema hepatobiliar, justificando portanto, uma remanescente captação nestes órgãos durante a excreção do radiofármaco mesmo em tempos tardios (Taylor e col., 2004). O $^{99\text{m}}\text{Tc-MAG}_3$ é secretado principalmente pelos túbulos proximais (90%) devido à suas ligações as proteínas, com somente uma pequena quantidade sendo filtrada ou eliminada pelo fígado (Vivier e Dacher, 2009).

Os peptídeos menores e mais hidrofílicos são geralmente removidos rapidamente do plasma pela filtração glomerular nos rins. A lipofilicidade normalmente seria vista como indesejável, pois seria esperado que o radiofármaco excretado fosse levado para o trânsito intestinal. No entanto, o metabolismo no trato gastrointestinal pode resultar em liberação do radionuclídeo na corrente sanguínea de uma forma na qual sofre eliminação renal (Lister-James e col., 1997). Mas, considerando a alta captação dos rins para ambos conjugados, este evento não ocorre. Essa hidrofiliicidade é importante como característica no transporte de drogas, porque afeta a maneira com que a droga vai alcançar o local de ação a partir do local de administração. Drogas altamente hidrofílicas podem se ligar a proteínas plasmáticas e essa ligação pode modificar as propriedades farmacocinéticas e a concentração no sangue (Stevenson e col., 2000 e 1994). Em cânceres, esse evento é menor, e a rápida depuração sanguínea confirma que isso não acontece para ambas as drogas (Svensson, 1986).

É importante ressaltar que o tempo de meia vida biológica de um radiofármaco está diretamente relacionado às suas propriedades estruturais bem como estabilidade do radiocomplexo *in vivo*. Portanto, uma rápida depuração de um fármaco em tempos precoces não demonstra ser um aspecto positivo, quanto

ao seu tempo de circulação no organismo, e consequentemente ao seu tempo de acumulação nos sítios tumorais.

Dentre os parâmetros para determinação e escolha dos tempos que serão avaliados no modelo tumoral, as captações totais no sangue, ossos e músculo, representam um conjunto de fatores crucial para a boa aquisição de uma imagem cintilográfica.

No entanto, as %DI calculadas para sangue, músculo e osso totais (TAB. 2), indicam que a realização da avaliação em modelos tumorais seria mais adequada em tempos superiores aos 120 min p.i., onde a maior concentração da dose injetada (99%) foi depurada do sangue, para ambos os radiomarcados.

A internalização é um importante mecanismo na comunicação intracelular, que compreende a degradação e a reciclagem da maioria dos peptídeos agonistas e seus receptores, resultando na acumulação celular do ligante. Embora seja um fenômeno altamente variável e dependente dos tipos e subtipos de receptores envolvidos, este mecanismo desempenha um papel fundamental na intensidade do sinal cintilográfico (Reubi, 2003).

Os estudos de internalização mostraram-se favoráveis ao conjugado $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyK)}$ em células SKMEL28. Houve um aumento da ligação total e internalização do produto em relação ao aumento do tempo de incubação. Estes resultados corroboram os estudos de biodistribuição em animais portadores de células tumorais. Tanto o conjugado $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyK)}$ em células B16F10, quanto o conjugado $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyK)}$ em ambas células tumorais, apresentaram desempenhos inferiores.

Os resultados de internalização confirmam que ambos radiotraçadores ligam-se tanto em receptores expressos em células como em vasos tumorais, pois houve uma captação em animais portadores de células tumorais maior do que os resultados obtidos nos estudos *in vitro* em células tumorais, como já descrito na literatura (Fukasawa e col., 2006; Ruoslahti e col., 2010; Zitzmann e col., 2002). Usar um composto com propriedades de penetração no tumor, que é o caso de pequenos peptídeos, e um receptor que é compartilhado pelo vaso tumoral e pelas células tumorais fornecem uma vantagem adicional à marcação tumoral para fins diagnósticos e terapêuticos.

A conduta da avaliação do estudo tumoral em animais no tempo de 2h, decidida devido aos dados de depuração sanguínea, para o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$ mostrou-se entretanto não muito conveniente com relação a captação tumoral. Pelos resultados dos ensaios *in vitro*, concluiu-se que o pico de ligação do traçador às células B16F10 ocorreu aos 5 min após a incubação, diminuindo em tempos maiores e com as células SKMEL28 o pico de ligação ocorreu aos 30 min de incubação. Isso significa que o traçador liga-se às células mas é externalizado muito rapidamente. Portanto um novo estudo deverá ser conduzido futuramente em tempo mais precoce e observado se a radiação de fundo permitirá observar a captação tumoral.

Os estudos de bloqueio dos receptores específicos, que são definidos como a quantidade da droga fria (peptídeo não-radiomarcado) que é administrada antes ou simultaneamente com o radiotraçador com a finalidade de bloquear os órgãos/tecidos, foram realizados (FIG. 18) e indicaram a especificidade dos produtos estudados quase em sua totalidade. A exceção foi observada apenas para o $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$ em células B16F10.

Este comportamento era esperado pois segundo a literatura (Liu e col., 2008, Mina-Osorio e col., 2008), células epiteliais e vasculares normais também apresentam os receptores da integrina $\alpha_v\beta_3$ e da aminopeptidase N, porém em menor quantidade que no microambiente tumoral, bloqueando portanto, a ação do radiofármaco. Além disso, um efetivo bloqueio de órgãos que apresentam receptores para a biomolécula em estudo, agem como fator confirmatório de que a mesma ainda continua ativa e desempenhando sua ação. O bloqueamento de ambos receptores (integrina $\alpha_v\beta_3$ e APN) podem gerar efeitos anti-angiogênese na célula e resultar num efeito terapêutico do tumor (Stupack e col., 2001, Wickström e col., 2011).

A avaliação das razões tumor/órgãos não-alvos agem como fatores preditivos na aquisição das imagens cintilográficas, bem como para os estudos clínicos. Primordialmente, razões elevadas de tumor/sangue, tumor/músculo e tumor/osso são essenciais para uma boa visualização tumoral, já que correspondem a boa parte do peso corpóreo.

O desempenho do traçador RGD foi muito melhor do que o NGR, com maior captação tumoral, maior razão tumor/sangue e tumor/músculo e maiores valores de bloqueamento, mostrando ser mais específico, principalmente para o melanoma humano com células SKMEL28.

Sancey e col. (2007) estudaram a molécula ^{99m}Tc -cRGD e ^{99m}Tc -RAFT-RGD, que possui quatro moléculas de RGD, em células de melanoma murino B16F10 e obtiveram captação tumoral de $1,6 \pm 0,4$ %DI/g e $2,4 \pm 0,5$ %DI/g, respectivamente, aos 60 minutos p.i. Haubner e col. (2004) estudaram a molécula ^{99m}Tc -DKCK-RGD em células de melanoma humano M21 e obtiveram valores de $2,24 \pm 0,35$ %DI/g aos 240 min p.i. Decristoforo e col. (2006) estudaram, também em células M21, o composto ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-RGD e obtiveram a captação tumoral de $2,73 \pm 0,26$ %DI/g, aos 60 min, e $2,06 \pm 0,37$ %DI/g aos 240 min. Todos apresentaram alta captação renal, indicando essa como a via principal de excreção dos radiotraçadores, porém os compostos ^{99m}Tc -cRGD e ^{99m}Tc -RAFT-RGD também apresentaram alta captação hepática. O alto valor de captação obtido pela molécula ^{99m}Tc -RAFT-RGD, deve-se ao fato da molécula ser tetrâmera, que já foi provada em outros estudos, como sendo melhor (Liu e col., 2008). Quanto aos outros estudos, há diferenças na linhagem de células de melanoma utilizadas, além de diferentes coligantes, o que podem ter colaborado para a captação mais acentuada, quando comparadas aos resultados de ^{99m}Tc -RGD e ^{99m}Tc -NGR deste estudo. A captação tumoral obtida com o ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(RGDyk) em células SKMEL28 destaca-se perante esses trabalhos.

O tumor pode ser claramente visualizado nas imagens dos animais portadores de células B16F10 com ambos radiotraçadores e somente com o ^{99m}Tc -RGD em animais portadores de células SKMEL28. Pode ser visualizado também uma alta captação nos órgão de excreção e no sítio de injeção da droga, veia caudal. A alta radioatividade na bexiga, demonstrada em todas as imagens, indica a excreção urinária, corroborando portanto, com os dados obtidos na biodistribuição em camundongos portadores de tumor.

Houve uma considerável captação na cabeça na imagem do animal portador de células SKMEL28 com o conjugado ^{99m}Tc -MAG₃-PEG₈-c(RGDyk). Esse evento também foi observado por Zhou e col. (2011a) com o conjugado ^{111}In (DOTA-3G-RGD₂). O melanoma maligno é a terceira causa mais comum de

metástases cerebrais, atrás somente do câncer de pulmão e mama, tendo a maior tendência de metastatizar no cérebro de todos os neoplasmas primários em adultos (Sloan e col., 2009). Fazakas e col. (2011) sugerem que durante a formação da metástase cerebral, células de melanoma danificam a integridade da barreira hematoencefálica pela indução de apoptose em células endoteliais e pela interrupção da continuidade das junções apertadas. Explicando, assim, a captação cerebral na imagem cintilográfica e também a considerável captação nos pulmões, demonstrada nos estudos de biodistribuição.

6 CONCLUSÕES

Os dois conjugados peptídicos $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyk)}$ e $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$ foram marcados com tecnécio-99m, com alta pureza radioquímica, tornando-os aptos para estudos biológicos sem necessidade de uma purificação.

Ambos demonstraram serem hidrofílicos com valores de $\log P$ negativos.

O $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyk)}$ apresentou maiores ligações à células tumorais humanas quando comparado ao $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$.

Na biodistribuição dos traçadores observou-se excreção renal de ambos, demonstrada pela alta captação renal.

Os radiotraçadores demonstraram rápida depuração sanguínea, sendo que no tempo de 120 min, quando os índices são inferiores à 0,5% DI/mL, foi escolhido para uma avaliação em animais portadores do tumor.

O composto $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(RGDyk)}$ apresentou a melhor captação tumoral comparado ao $^{99m}\text{Tc-MAG}_3\text{-PEG}_8\text{-c(NGRyk)}$, com destaque, em células de melanoma humano SKMEL28, estimulando estudos clínicos futuros e o desenvolvimento de kits liofilizados como agentes diagnóstico de pacientes com melanoma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, M.J.; JUWEID, M.; TENKATE, C.I.; SCHWARTZ D.A.; HAUSER M.M.; GAUL F.E. Technetium-99m human polyclonal IgG radiolabeled via the hydrazino nicotinamide derivative for imaging focal sites of infection in rats. **J. Nucl. Med.**, v.31, p.2022-2028, 1990.
- ALBELDA, S.M.; METTE, S.A.; ELDER, D.E.; STEWART, R.; DAMJANOVICH, L.; HERLYN, M.; BUCK, C.A. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the $\beta 3$ subunit with tumor progression. **Cancer Res.**, v.50, p.6757-6764, 1990.
- ALBERTO, R.; SCHIBLI, R.; WAIBEL, R.; ABRAM, U.; SCHUBIGER, A.; Basic aqueous chemistry of $[M(OH)_3(CO)_3]^+$ ($M = Re, Tc$) directed towards radiopharmaceutical application. **Coord. Chem. Rev.**, v.190-192, p.901-919, 1999.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Molecular Biology of the Cell. 4 ed. New York, N.Y.: Garland Science, 2002.
- ARAP, W.; PASQUALINI, R.; RUOSLAHTI, E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. **Science**, v.279, p.377-380, 1998.
- BANERJEE, S.R.; MARESCA, K.P.; FRANCESCONI, L.; VALLIANT, J.; BABICH, J.W.; ZUBIETA, J. New directions in the coordination chemistry of ^{99m}Tc : a reflection on technetium core structures and a strategy for new chelate design. **Nucl. Med. Biol.**, v.32, p.1-20, 2005.
- BANERJEE, S.; PILLAI, M.R.A.; RAMAMOORTHY, N. Evaluation of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. **Semin. Nucl. Med.**, v.31, n.4, p.260-277, 2001.
- BEER, A.J.; HAUBNER, R.; GOEBEL, M.; LUDERSCHMIDT, S.; SPILKER, M.E.; WESTER, H.J.; WEBER, W.A.; SCHWAIGER, M. Biodistribution and pharmacokinetics of the $\alpha\beta 3$ -selective tracer ^{18}F -Galacto-RGD in cancer patients. **J. Nucl. Med.**, v.46, p.1333-1341, 2005.
- BEER, A.J.; NIEMEYER, M.; CARLSEN, J.; SARBIA, M.; NÄHRIG, J.; WATZLOWIK, P.; WESTER, H.J.; HARBECK, N.; SCHWAIGER, M. Patterns of $\alpha\beta 3$ expression in primary and metastatic human breast cancer as shown by ^{18}F -Galacto-RGD PET. **J. Nucl. Med.**, v.49, p.255-259, 2008.
- BEVONA C.; SOBER A.J. Melanoma incidence trends. **Dermatol. Clin.**, v.20, n.4, p.589-595, 2002.
- BHAGWAT, S.V.; LAHDENRANTA, J.; GIORDANO, R.; ARAP, W.; PASQUALINI, R.; SHAPIRO, L.H. CD13/APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation. **Blood**, v.97, n.3, p.652-659, 2001.
- BOYD, R. E. Technetium-99m Generators - The Available Options. **Int. J. Appl. Radiat. Isot.**, v.33, n.10, p.801- 809, 1982.
- BRACK, S.S.; DINKELBORG, L.M.; NERI, D. Molecular targeting of angiogenesis for imaging and therapy. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, v.31, p.1327-1341, 2004.

BROWN, T.J.; NELSON, B.R. Malignant melanoma: a clinical review. **Cutis**, v.63, p.275–78, 281–84, 1999.

BUEHLER, A.; ZANDVOORT, M.A.M.J.; STELT, B. J.; HARCKERNG, T.M.; SCHRANS-STASSEN, B.H.G.J.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; CLEUTJENS, J.P.M.; DUIJVESTIJN, A.; SMEETS, M.B.; KLEIJN, D.PV.; POST, M.J.; MUINCK, E.D. cNGR: a Novel Homing Sequence for CD13/APN Targeted Molecular Imaging of Murine Cardiac Angiogenesis In Vivo. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v.26, p.2681-2687, 2006.

CAI, W.; GAMBHI, S.; CHEN, X.; Multimodality tumor imaging targeting integrin $\alpha_v\beta_3$. **BioTechniques**, v.39, p.S6-S17, 2005.

CASTEL, G.; CHTÉOUI, M.; HEYD, B.; TORDO, N. Phage Display of Combinatorial Peptide Libraries: Application to Antiviral Research. **Molecules**, v.16, p.3499-3518, 2011.

CHAMBERLAIN, A.J.; FRITSCHI, L.; KELLY, J.W. Nodular melanoma: patients' perceptions of presenting features and implications for earlier detection. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.48, p.694–701, 2003

CHEN, K.; CONTI, P.S. Target-specific delivery of peptide-based probes for PET imaging. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.62, p.1005–1022, 2010.

CHEN, X.; PARK, R.; SHARINIAN, A. H.; BADING, J.R.; CONTI, P.S.; Pharmacokinetics and tumor retention of ^{125}I -labeled RGD peptide are improved by PEGylation. **Nucl. Med. Biol.**, v.31,n.1, p.11-19, 2004a.

CHEN, X.; PARK, R.; SHARINIAN, A. H.; TOHME, M.; KHANKALDYAN, V.; BOZORGZADEH, M.H.; BADING, J.R.; MOATS, R.; LANG, W.E.; CONTI, P.S.; ^{18}F -labeled RGD peptide: initial evaluation for imaging brain tumor angiogenesis. **Nucl. Med. Biol.**, v.31, n.2, p.179-189, 2004b.

CHENG, Z.; ZHANG, L.; GRAVES, E.; XIONG, Z.; DANDEKAR, M.; CHEN, X.; GAMBHIR, S.S. Small-animal PET of melanocortin 1 receptor expression using a ^{18}F -labeled α -melanocyte-stimulating hormone analog. **J. Nucl. Med.**, v.48, n.6, p.987-994, 2007.

COLOMBO, G.; CURNIS, F.; DE MORI, G.M.; GASPARRI, A.; LONGONI, C.; SACCHI, A.; LONGHI, R.; CORTI, A.; Structure–activity relationships of linear and cyclic peptides containing the NGR tumor-homing motif. **J. Biol. Chem.**, v.277, p.47891–47897, 2002.

CORTI, A.; CURNIS, F.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. The neovasculature homing motif NGR: more than meets the eye. **Blood**. v.112, n.7, p.2628-2635, 2008.

CURNIS, F.; ARRIGONI, G.; SACCHI, A.; FISCHETTI, L.; ARAP, W.; PASQUALINI, R.; CORTI, A. Differential binding of drugs containing the NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia, and myeloid cells. **Cancer Res.**, v.62, p.867-874, 2002.

CURNIS, F.; SACCHI, A.; BORGNA, L.; MAGNI, F.; GASPARRI, A.; CORTI, A. Enhancement of tumor necrosis factor alpha antitumor immunotherapeutic properties by targeted delivery to aminopeptidase N (CD13). **Nat. Biotechnol.**, v.18, p.1185-1190, 2000.

- D'ANDREA, L.D.; DEL GATTO, A.; PEDONE, C.; BENEDETTI, E. Peptide-based molecules in angiogenesis. **Chem. Biol. Drug Des.**, v.67, p.115-26, 2006.
- DECRISTOFORO C.; FAINTUCH B.L.; REY A.; GUGGENBERG E. von; RUPPRICH M.; HERNANDEZ I.G.; TEODORO R.; HAUBNER R. [^{99m}Tc] HYNIC-RGD for imaging integrin $\alpha\text{v}\beta 3$ expression. **Nucl. Med. Biol.**, v.33, p.945-952, 2006.
- DECRISTOFORO, C.; HERNANDEZ GONZALEZ, I.; CARLSEN, J.; RUPPRICH, M.; HUISMAN, M.; VIRGOLINI, I.; WESTER, H.J.; HAUBNER, R. ^{68}Ga - and ^{111}In -labelled DOTA-RGD peptides for imaging of $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin expression. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, v.35, n.8, p.1507-1515, 2008.
- DENARDO, S.J.; YAO, Z.; LAM, K.M.; SONG, A.; BURKER, P.A.; MERICK, G.R.; LAMBORN, K.R.; O'DONNELL, R.T.; DENARDO, G.L. Effect of molecular size of pegylated peptide on the pharmacokinetics and tumor targeting in lymphoma-bearing mice. **Clin. Cancer Res.**, v.1, n.9, p.38545-38645, 2003.
- DESGROSELLIER, J.S.; CHERESH, D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nat. Rev. Cancer**, v.10, p.9-22, 2010.
- DEUTSCHER, S.L. Phage display in molecular imaging and diagnosis of cancer. **Chem. Rev.**, v.110, p.3196–3211, 2010.
- DIJKGRAAF, I.; KRUIJTZER, A.W.; LIU, S.; SOEDE, A.C.; OYEN, W.J.G.; CORSTENS, F. H. M.; LISKAMP, R. M. J.; BOERMAN, O.C.; Improved targeting of the $\alpha\text{v}\beta 3$ integrin by multimerisation of RGD peptides. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, v.34, n.2, p.267-273, 2007.
- DILWORTH, J.R.; PARROT, S.J. The biomedical chemistry of technetium and rhenium. **Chem. Soc. Rev.**, v.27, p.43-55, 1998.
- DIMATTEO, P.; CURNIS, F.; LONGHI, R.; COLOMBO, G.; SACCI, A.; PROTTI, M. P.; PONZONI, M.; TOMA, S.; CORTI, A.; Immunogenic and structural properties of the Asn-Gly-Arg (NGR) tumor neovasculature-homing motif. **Mol. Immunol.**, v.43, p.1509–1518, 2006.
- DIXON, J.; KAKLAMANIS, L.; TURLEY, H.; HICKSON, I.D.; LEEK, R.D.; HARRIS, A.L.; GATTER, K.C. Expression of aminopeptidase-n (CD 13) in normal tissues and malignant neoplasms of epithelial and lymphoid origin. **J. Clin. Pathol.**, v.47, p.43-47, 1994.
- DOBRUCKI, L.W.; SINUSA, A.J.; Imaging angiogenesis. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v.18, p.90-96, 2007.
- DUATTI, A. **Role of ^{99m}Tc in diagnostic imaging**. In: Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Status and Trends: IAEA Radioisotopes and Radiopharmaceuticals, Series n.1. Vienna: International Atomic Energy Agency, 2009.
- EGLI, A.; ALBERTO, R.; TANNAHILL, L.; SCHIBLI, R.; ABRAM, U.; SCHAFFLAND, A.; WAIBEL, R.; TOURWÉ, D.; JEANNIN, L.; ITERBEKE, K.; SCHUBIGER, P. A. Organometallic ^{99m}Tc -aquaion labels peptide to an unprecedented high specific activity. **J. Nucl. Med.**, v.40, p.1913-1917, 1999.

FAINTUCH, B.L. **Estudo de marcação, biodistribuição e análise compartimental da N-acetilcisteína marcada com ^{99m}Tc . Investigação comparativa com MIBI- ^{99m}Tc .** 1997. Tese (Doutorado) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo, São Paulo.

FAINTUCH, B.L.; SANTOS, R.L.S.R.; TEODORO, R.; MURAMOTO, E.; MORGANTI, L.; NUNES, I.V.S.; OKAMOTO, M.R.Y. Labeling of small biomolecules using novel technetium-99m cores: results of a coordinated research project 2003-2006, **International Atomic Energy Agency** (IAEA) Technical reports series, ISSN 0074-1914; n.459, Vienna, 2007.

FAINTUCH, B.L.; SANTOS, R.L.S.R.; SOUZA, A.L.F.M.; HOFFMAN, T.J.; GREELEY, M.; SMITH, C.J.; ^{99m}Tc -HYNIC-Bombesin (7-14) NH_2 : Radiochemical Evaluation with Co-ligands EDDA (EDDA=Ethylenediamine-N,N'-diacetic Acid), Tricine, and Nicotinic Acid. **Synth. React. Inorg. M.**, v.35, p 43-51, 2005.

FALCIONI, R.; CIMINO, L.; GENTILESCHI, M.P.; CIMINO, L.; GENTILESCHI, M.P.; D'AGNANO, I.; ZUPI, G.; KENNEL, S.J.; SACCHI, A. Expression of $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$, and $\beta 5$ integrins by human lung carcinoma cells of different histotypes. **Exp. Cell Res.**, v.210, p.113-122, 1994.

FAZAKAS, C.; WILHELM, I.; NAGYÖSZI, P.; FARKAS, A.E.; HASKÓ, J.; MOLNÁR, J.; BAUER, H.; BAUER, H.C.; AYAYDIN, F.; DUNG, N.T.; SIKLÓS, L.; KRIZBAL, I.A. Transmigration of Melanoma Cells through the Blood-Brain Barrier: Role of Endothelial Tight Junctions and Melanoma-Released Serine Proteases. **PLoS One**, v.6, n.6, p.e20758, 2011.

FICHNA, J.; JANECKA, A. Synthesis of Target-Specific Radiolabeled Peptides for Diagnostic Imaging. **Bioconjug. Chem.**, v.14, p.3-17, 2003.

FOLKMAN J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **N. Engl. J. Med.**, v. 285, p.1182-1186, 1971.

FOLKMAN J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. **N. Engl. J. Med.**, v.333, p.1757-1763, 1995.

FUKASAWA, K.; FUJII, H.; SAITO, H.Y.; KOIZUMI, K.; AOZUKA, Y.; SEKINE, K.; YAMADA, M.; SAIKI, I.; NISHIKAWA, K. Aminopeptidase N (APN/CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis. **Cancer Lett.**, v.243, p.135-143, 2006.

GARCIA-GARAYOA, E.; BLAUENSTEIN, P.; BRUEHMEIER, M.; BLANC, A.; ITERBEKE, K.; CONRATH, P.; TOURWE, D.; SCHUBIGER, A. Preclinical evaluation of a new, stabilized neurotensin(8-13) pseudopeptide radiolabeled with ^{99m}Tc . **J. Nucl. Med.**, v.43, p.374-383, 2002.

GARDE, S.V.; FORTE, A.J.; GE, M.; LEPEKHIN, E.A.; PANCHAL, C.J.; RABBANI, S.A.; WU, J.J. Binding and internalization of NGR peptide-targeted liposomal doxorubicin (TVT-DOX) in CD13-expressing cells and its antitumor effects. **Anticancer Drugs.**, v.18, p.1189-1200, 2007.

GASPARINI, G.; BROOKS, P.C.; BIGANZOLI, E.; VERMEULEN, P.B.; BONOLDI, E.; DIRIX, L.Y.; RANIERI, G.; MICELI, R.; CHERESH, D.A. Vascular integrin $\alpha\beta 3$: a new prognostic indicator in breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v.4, n.11, p.2625-2634, 1998.

GLEAVE, M.E.; ELHILALI, M.; FRADET, Y.; DAVIS, I.; VENNER, P.; SAAD, F.; KLOTZ, L.H.; MOORE, M.J.; PATON, V.; BAJAMONDE, A. Interferon gamma-1b compared with placebo in metastatic renal-cell carcinoma. Canadian Urologic Oncology Group. **N. Engl. J. Med.**, v.338, n.18, p.1265-1271, 1998.

GOTTSCHALK, K.E.; KESSLER, H. The structures of integrins and in-tegrin-ligand complexes: Implications for drug design and signal transduction. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v.41, p.3767-3774, 2002.

GREGURIC, I.; TAYLOR, S.R.; DENOYER, D.; BALLANTYNE, P.; BERGHOFER, P.; ROSELT, P.; PHAM, T.Q.; MATTNER, F.; BOURDIER, T.; NEELS, O.C.; DOROW, D.S.; LOC'H, C.; HICKS, R.J.; KATSIFIS, A. Discovery of [18F]N-(2-(diethylamino)ethyl)-6-fluoronicotinamide: a melanoma positron emission tomography imaging radiotracer with high tumor to body contrast ratio and rapid renal clearance. **J. Med. Chem.**, v.52, p.5299–5302, 2009.

GRIFMAN, M.; TREPEL, M.; SPEECE, P.; GILBERT, L.B.; ARAP, W.; PASQUALINI, R.; WEITZMAN, M.D. Incorporation of tumor-targeting peptides into recombinant adeno-associated virus capsids. **Mol. Ther.**, v.3, p.964-975, 2001.

HAGEN P.M. van; BREEMAN, W.A.; BERNARD, H.F.; SCHAAR, M.; MOOIJ, C.M.; SRINIVASAN, A.; SCHMIDT, M.A.; KRENNING, E.P.; DE JONG, M. Evaluation of a radiolabeled cyclic DTPA-RGD analog for tumor imaging and radionuclide therapy. **Int J Cancer (Radiat Oncol Invest)**, v.90, p.186-198, 2000.

HANAHAN. D.; WEINBERG R. A., The hallmarks of cancer. **Cell.**, v.100, p.57-70, 2000.

HAUBNER, R.; BRUCHERTSEIFER, F.; BOCK, M.; KESSLER, H.; SCHWAIGER, M.; WESTER, H.J. Synthesis and biological evaluation of a (99m)Tc-labelled cyclic RGD peptide for imaging the $\alpha\text{v}\beta 3$ expression. **Nuklearmedizin.**, v.43, n.1, p.26-32, 2004.

HEALY, J.M.; MURAYAMA, O.; MAEDA, T.; YOSHINO, K.; SEKIGUCHI, K.; KIKUCHI, M. Peptide ligands for integrin $\alpha v \beta 3$ selected from random phage display libraries. **Biochemistry.**, v.34, n.12, p.3948-3955, 1995.

HEPPELER, A.; FROIDEVAUX, S.; EBERLE, A.N.; MAECKE, H.R. Receptor targeting for tumour localisation and therapy with radiopeptides. **Curr. Med. Chem.**, v.7, p.971-994, 2000.

HOLLE, L.; SONG, W.; HICKS, L.; HOLLE, E.; HOLMES, L.; WEI, Y.; LI, J.; WAGNER, T.; YU, X. In vitro targeted killing of human endothelial cells by co-incubation of human serum and NGR peptide conjugated human albumin protein bearing $\alpha (1-3)$ galactose epitopes. **Oncol. Rep.**, v.11, n.3, p.613-616, 2004.

INCA - **Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.

JIMÉNEZ-REQUENA, F.; DELGADO-BOLTON, R.C.; FERNÁNDEZ- PÉREZ, C.; GAMBHIR, S.S.; SCHWIMMER, J.; PÉREZ-VÁZQUEZ, J.M.; CARRERAS-

- DELGADO, J.L. Meta-analysis of the performance of ^{18}F -FDG PET in cutaneous melanoma. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.**, v.37, p.284–300, 2010.
- JIN, H.; VARNER, J. Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. **Br J Cancer**, v.90, p.561-565, 2004.
- JUNQUEIRA G.; BRAGA, L.M.G.M.; MOTTA, M.S.; PILLA, H.S., Modelo experimental de melanoma murino em camundongos. **An. Bras. Dermatol.**, v.72, p.487-489, 1997.
- JURISSON, S.S.; LYDON, J.D. Potencial technetium small molecule radiopharmaceutical. **Chem. Rev.**, v.99, p.2205-2218, 1999.
- JURISSON, S.; BERNING, D.; JIA, W.; MA, D. Coordination Compounds in Nuclear Medicine. **Chem. Rev.**, v.93, p.1137-1156, 1993.
- KENNY, L.M.; COOMBES, R.C.; OULIE, I.; CONTRACTOR, K.B.; MILLER, M.; SPINKS, T.J.; MCPARLAND, B.; COHEN, P.S.; HUI, A.M.; PALMIERI, C.; OSMAN, S.; GLASER, M.; TURTON, D.; AL-NAHHAS, A.; ABOAGYE, E.O. Phase I trial of the positron-emitting Arg-Gly-Asp (RGD) peptide radioligand ^{18}F -AH111585 in breast cancer patients. **J. Nucl. Med.**, v.49, p.879-886, 2008.
- KIM, J.; HONG, S.Y.; PARK, H.S.; KIM, D.S.; LEE, W. Structure and function of RGD peptides derived from disintegrin proteins. **Mol. Cells.**, v.19, n.2, p.205-11, 2005.
- KNETSCH, P.A.; PETRIK, M.; GRIESSINGER, C.M.; RANGGER, C.; FANI, M.; KESENHEIMER, C.; VON GUGGENBERG, E.; PICHLER, B.J.; VIRGOLINI, I.; DECRISTOFORO C.; HAUBNER, R. [^{68}Ga]NODAGA-RGD for imaging $\alpha\beta 3$ integrin expression. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging**, v.38, p.1303–1312, 2011.
- KOIVUNEN, E.; GAY, D.A.; RUOSLAHTI, E. Selection of peptides binding to the alpha 5 beta 1 integrin from phage display library. **J. Biol. Chem.**, v.268, p.20205-20210, 1993.
- KOIVUNEN, E.; WANG, B.; RUOSLAHTI, E. Isolation of a highly specific ligand for the alpha 5 beta 1 integrin from a phage display library. **J. Cell Biol.**, v.124, p.373-380, 1994.
- KOK, R. J.; SCHRAA, A. J.; BOS, E. J.; MOORLAG, H. E.; ASGEIRSDOTTIR, S. A.; EVERTS, M.; MEIJER, D. K. F.; MOLEMA, G. Preparation and functional evaluation of RGD-modified proteins as alpha(v)beta(3) integrin directed therapeutics. **Bioconjugate Chem.**, v.13,n.1, p.128-135, 2002.
- KORDE, A.; PANDEY, U.; BANERJEE, S.; DEV SARMA, H.; MUKHERJEE, A.; VENKATESH, M. Preparation and biological studies of (^{125}I)-DOTA-TATE. **Appl. Radiat. Isot.**, v.65, n.6, p.687-690, 2007.
- KOSTIDIS, S.; STAVRAKLOUDIS, A.; BIRIS, N.; TSOUKATOS, D.; SAKARELLOS, C.; TSIKARIS, V. The relative orientation of the Arg and Asp side chains defined by a pseudodihedral angle as a key criterion for evaluating the structure-activity relationship of RGD peptides. **J. Pept. Sci.**, v.10, n.8, p.494-509, 2004.
- KOTHARI, K.K.; RAGHURAMAN, K.; PILLARSETTY, N.K.; HOFFMAN, T.J.; OWEN, N.K.; KATTI, K.V.; VOLKERT, W.A. Syntheses, in vitro and in vivo characterization of a $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -(I)-tricarbonyl-benzylamino-dihydroxymethyl phosphine (NP_2) chelate. **Appl. Radiat. Isot.**, v.58, p.543-549, 2003.

- KOTHARI, K.; PRASAD, S.; KORDE, A.; MUKHERJEE, A.; MATHUR, A.; JAGGI, M.; VENKATESH, M.; PILLAI, A.M.; MUKHERJEE, R.; RAMAMOORTHY, N. (99m)Tc(CO)(3)-VIP analogues: Preparation and evaluation as tumor imaging agent. **Appl. Radiat. Isot.**, v.65, n.4, p.382-386, 2007.
- KOWALSKY, R.J.; FALEN, S.W. **Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine**. 2. ed. American Pharmacists Association, Washington DC, 2004.
- KRUG, B.; CROTT, R.; LONNEUX, M.; BAURAIN, J.F.; PIRSON, A.S.; VANDER BORGHT, T. Role of PET in the initial staging of cutaneous malignant melanoma: systematic review. **Radiology**, v.249, p.836–844, 2008.
- LEE, S., XIE, J., CHEN, X. Peptide-based probes for targeted molecular imaging. **Biochem.**, v.49, n.7, p.1364-1376, 2010.
- LI, Z., CAI, W., CAO, Q., CHEN, K., WU, Z., HE, L., CHEN, X. ⁶⁴Cu-labeled tetrameric and octameric RGD peptide for small-animal PET of tumor αvβ3 integrin expression. **J. Nucl. Med.**, v.48, n.7 p.1162-1171, 2007.
- LI, Z.B., WU, Z., CHEN, K., RYU, E.K., CHEN, X. ¹⁸F-labeled BBN-RGD Heterodimer for Prostate Cancer Imaging. **J. Nucl. Med.**, v.49, p.453-461, 2008.
- LISTER-JAMES, J.; MOYER, B.R.; DEAN, R.T. Pharmacokinetic considerations in the development of peptide-based imaging agents. **Q. J. Nucl. Med.**, v.41, n.2, p.111-118, 1997.
- LIU, S.; CHEUNG, E.; RAJOPADHYE, M.; ZIEGLER, M.C.; EDWARDS, D.S. ⁹⁰Y- and ¹⁷⁷Lu-labeling of a DOTA-conjugated vitronectin receptor antagonist for tumor therapy. **Bioconj. Chem.**, v.12, p.559-568, 2001.
- LIU, S.; EDWARDS, D.S. ^{99m}Tc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. **Chem. Rev.**, v.99, p.2235-2268, 1999.
- LIU, S.; KIM, Y.S., HSIEH, W.Y., SREERAMA, S.G.; Coligant effect on the solution stability, biodistribution and metabolism of the ^{99m}Tc-labeled cyclic RGDfK tetramer. **Nucl. Med. Biol.**, v.35, p.111-121, 2008.
- LIU, S.; ROBINSON, S.P.; EDWARD, D.S. Integrin avb3 directed radiopharmaceuticals for tumor imaging. **Drugs of the Future**, v.28, n.6, p. 551-564, 2003.
- LIU, Z., SHI, J., JIA, B., LIU, Y., ZHAO, H., LI, F., TIAN, J., CHEN, X., LIU, S., WANG, F. Two (90)-Labeled Multimeric RGD Peptides RGD4 and 3PRGD2 for Integrin Targeted Radionuclide Therapy. **Mol. Pharm.**, v.8, n.2, p.591-599, 2011.
- LIU, Z., YAN, Y., CHIN, F.T., WANG, F., CHEN, X. Dual integrin and gastrin-releasing peptide receptor targeted tumor imaging using 18F-labeled PEGylated RGD-bombesin heterodimer 18F-FB-PEG3-Glu-RGD-BBN. **J. Med. Chem.**, v.52, n.2, p.425–432, 2009.
- MA, W.; SUO, Y.; YANG, W.; WANG, J. Re-188 labeling NGR peptide and its study in nude mice bearing human HePG2 hepatoma. **J. Nucl. Med.**, v.52, p.1603, 2011. Supplement 1

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

MEITAR, D.; CRAWFORD, S.E.; RADEMAKER, A.W.; COHN, S.L. Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc-amplification, and poor outcome in human neuroblastoma. **J Clinical Oncol.**, v.14, p.405-414, 1996.

MELO, F. H. M.; JUNQUEIRA, M. S.; CHAMMAS, R., Mecanismos de Invasão e metástases. In: BRENTANI, M.M; KOWALSKI, L.P.; COELHO, F.R.G., **Bases da Oncologia**, 2 ed., Editora Marina e Tedmedd Editora, São Paulo, v. 2, p.201-226, 2003.

MENDES, P.F.; XANDER, P.; NOVAES E BRITO R.R.; MORTARA, R.A.; JASIULIONIS, M.G.; LOPES, J.D. A cell surface 230 kDa protein from murine melanoma involved with tumor malignancy. **Cancer Lett.** v.262, n.2, p.276–285, 2008.

METAFERIA, B.B.; RITTLER, M.; GHEEYA, J.S.; LEE, A.; HEMPEL, H.; PLAZA, A.; STETLER-STEVENSON, W.G.; BEWLEY, C.A.; KHAN, J. Synthesis of novel cyclic NGR/RGD peptide analogs via on resin click chemistry. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v.20, n.24, p.7337-7340, 2010.

MEYSKENS, F.L.J.; FARMER, P.J.; ANTON-CULVER, H. Etiologic pathogenesis of melanoma: a unifying hypothesis for the missing attributable risk. **Clin. Cancer Res.**, v.10, p.2581–2583, 2004.

MINA-OSORIO, P. The moonlighting enzyme CD13: old and new functions to target. **Trends Mol. Med.**, v.14, p.361–371, 2008.

MOFFATT, S.; WIEHLE, S.; CRISTIANO, R.J. Tumor-specific gene delivery mediated by a novel peptide-polyethylenimine-DNA polyplex targeting aminopeptidase N/CD13. **Hum. Gene Ther.**, v.16, p.57-67, 2005.

MORALES M.A.A.; DUCONGÉ J.; ALVAREZ-RUIZ D.; BECQUER-VIART M.L.A.; NUÑEZ-GANDOLFF G.; FERNÁNDEZ E.; CABALLERO-TORRES I.; IZNAGA-ESCOBAR N. Humanized Versus Murine Anti-Human Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibodies for Immunoscintigraphic Studies. **Nucl. Med. Biol.**, v.27, p.199-206, 2000.

MORRISON MS, RICKETTS SA, BARNETT J, CUTHBERTSON A, TESSIER J, WEDGE SR. Use of a novel Arg-Gly-Asp radioligand, ¹⁸F-AH111585, to determine changes in tumor vascularity after antitumor therapy. **J. Nucl. Med.**, v. 50, p.116-122, 2009.

OBENAU, E.R.; EDREIRA, M.M.; CRUDO, J.L. **Análogos de Somatostatina marcados com ^{99m}Tc**. Comision Nacional de Energia Atômica. Centro Atômico Ezeiza. Unidad de Actividad Radioquímica, Radiofármacos, 1999.

O'CONNELL, P.J.; GERKIS, V.; D'APICE, A.J. Variable O-glycosylation of CD13 (aminopeptidase N). **J. Biol. Chem.**, v.266, p.4593-4597, 1991.

OGAWA, M.; HATANO, K.; OISHI, S.; KAWASUMI, Y.; FUJII, N.; KAWAGUCHI, M.; DOI, R.; IMAMURA, M.; YAMAMOTO, M.; AJITO, K.; MUKAI, T.; SAJI, H.; ITO, K. Direct electrophilic radiofluorination of a cyclic RGD peptide for *in vivo* alpha(v)beta3 integrin related tumor imaging. **Nucl. Med. Biol.**, v.30, p.1-9, 2003.

- OKARVI, S. M. Synthesis, radiolabeling and in vitro and in vivo characterization of a technetium-99m-labeled alpha-M2 peptide as a tumor imaging agent. **J. Peptide Res.**, v.63, p.460-468, 2004.
- OKARVI, S.M. Peptide-based radiopharmaceutical and cytotoxic conjugates: Potencial tools against cancer. **Cancer Treatment Reviews**, v.34, p.13-26, 2008.
- OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA, D.; COELHO, P. VEIGA, F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. **Rev. Bras. Ciênc. Farmac.**, v.42, n.2, p.151-65, 2006.
- OZAWA, M.G.; ZURITA, A.J.; DIAS-NETO, E.; NUNES, D.N.; SIDMAN, R.L.; GELOVANI, J.G.; ARAP, W.; PASQUALINI, R. Beyond receptor expression level: the relevance of target accessibility in ligand-directed pharmacodelivery systems. **Trends Cardiovasc. Med.**, v.18, n.4, p.126-132, 2008.
- PASQUALINI, R.; KOIVUNEN, E.; KAIN, R.; LAHDENRANTA, J.; SAKAMOTO, M.; STRYHN, A.; ASHMUN, R.A.; SHAPIRO, L.H.; ARAP, W.; RUOSLAHTI, E. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. **Cancer Res.**, v.60, p.722-727, 2000.
- PASQUALINI, R.; KOIVUNEN, E.; RUOSLAHTI, E. A peptide isolated from phage display libraries is a structural and functional mimic of an RGD-binding site on integrins. **J. Cell. Biol.**, v.130, p.1189-1196, 1995.
- PASQUALINI, R., KOIVUNEN, E., RUOSLAHTI, E. α_v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands. **Nat. Biotechnol.**, v.15, p. 542-546, 1997.
- PATNANA, M.; BRONSTEIN, Y.; SZKLARUK, J.; BEDI, D.G.; HWU, W.J.; GERSHENWALD, J.E.; PRIETO, V.G.; NG, C.S. Multimethod imaging, staging, and spectrum of manifestations of metastatic melanoma. **Clin. Radiol.**, v.66, n.3, p.224-236, 2011.
- PIERSCHBACHER, M. D.; RUOSLAHTI, E. The cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small fragments of the molecule. **Nature**, v. 309, p. 30-33, 1984.
- PLACHCINSKA, A.; MIKOLAJCZAK, R.; MAECKE, H.; KOZAK, J.; MICHALSKI, A.; RZESZUTEK, K.; KUSMIEREK, J. Efficacy of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC scintigraphy in differential diagnosis of solitary pulmonary nodules. **Cancer Biother Radiopharm.**, v. 19, n. 5, p. 613-620, 2004.
- RAZAK, K.; NEWLAND, A.C. The significance of aminopeptidases and haematopoietic cell differentiation. **Blood Rev.**, v.6, p.243-250, 1992.
- REUBI, J.C. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. **Endocr. Rev.**, v.24, p.389-427, 2003.
- REUBI, J.C. Regulatory peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. **Q. J. Nucl. Med.**, v.41, p.63-70, 1997.
- RICCABONA, G.; DECRISTOFORO, C. Peptide targeted imaging of cancer. **Cancer Biother Radiopharm**, v.18, p.675-87, 2003.
- RIEMANN, D.; KEHLEN, A.; LANGNER, J. CD13--not just a marker in leukemia typing. **Immunol Today.**, v.20, p.83-88, 1999.

- RUOSLAHTI, E. Specialization of tumour vasculature. **Nat. Rev. Cancer.**, v.2, n.2, p.83-90, 2002.
- RUOSLAHTI, E.; SANGEETA, N.; BHATIA, S.N.; SAILOR, M.J. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. **J. Cell Biol.**, v.188, n.6, p.759–768, 2010.
- SACCHI, A.; GASPARRI, A.; GALLO-STAMPINO, C.; TOMA, S.; CURNIS, F.; CORTI, A. Synergistic antitumor activity of cisplatin, paclitaxel, and gemcitabine with tumor vasculature-targeted tumor necrosis factor- α . **Clin. Cancer Res.**, v.12, p.175-182, 2006.
- SAHA, G.B. **Fundamentals of nuclear pharmacy**. Springer, 1998. p. 34-170.
- SANCEY, L.; ARDISON, V.; RIOU, L.M.; AHMADI, M.; MARTI-BATLLE, D.; BOTURYN, D.; DUMY, P.; FAGRET, D.; GHEZZI, C.; VUILLEZ, J.P. In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin-targeted tracer ^{99m}Tc -RAFT-RGD. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.**, v.34, n.12, p.2037-2047.
- SANTOS, A.N.; LANGNER, J.; HERRMANN, M.; RIEMANN, D. Aminopeptidase N/CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes. **Cell Immunol.** v.201, p.22-32, 2000.
- SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M. Cellular and molecular biology of human melanoma. **Cancer Biol. Ther.**, v.1, p.14–17, 2002.
- SCHNELL, O.; KREBS, B.; WAGNER, E.; ROMAGNA, A.; BEER, A.J.; GRAU, S.J.; THON, N.; GOETZ, C.; KRETZSCHMAR, H.A.; TONN, J.C.; GOLDBRUNNER, R.H. Expression of integrin $\alpha\beta3$ in gliomas correlates with tumor grade and is not restricted to tumor vasculature. **Brain Pathol.**, v.18, p.378-86, 2008.
- SCHOTELLIUS, M.; WESTER, H. Molecular imaging targeting peptide receptors. **Methods**, v.28, p.161-177, 2009.
- SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, N.; MITRA, A.; RAY, S.; DASGUPTA, S.; CHATTERJEE, A. Role of $\alpha\beta3$ integrin receptors in breast tumor. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v.20, p.585-590, 2001.
- SHI, J.; KIM, Y.S.; CHAKRABORTY, S.; JIA, B.; WANG, F.; LIU, S. 2-Mercaptoacetylglycylglycyl (MAG2) as a bifunctional chelator for ^{99m}Tc -labeling of cyclic RGD dimers: effect of technetium chelate on tumor uptake and pharmacokinetics. **Bioconjug. Chem.**, v.20, n.8, p.1559-68, 2009.
- SIGNORE, A.; ANNOVAZZI, A.; CHIANELLI, M.; CORSETTI, F.; WIELE, C.V.; WATHERHOUSE, R.N.; SCOPINARO, F. Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy. **Eur. J. Nucl. Med.**, v.28 p.1555-1565, 2001.
- SILVA, L. R.; FERREIRA, M. M. C. Estudo do Coeficiente de Partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 312-318, 2003.
- SLOAN, A.E.; NOCK, C.J.; EINSTEIN, D.B. Diagnosis and treatment of melanoma brain metastasis: a literature review. **Cancer Control**, v.16, p.248–255, 2009.

SMITH, G.P. Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. **Science**, v.228, p.1315-1317, 1985.

SMITH, J. W., CHERESH, D.A. The arg-gly-asp binding domain of the vitronectin receptor: photoaffinity crosslinking implicates amino acid residues 61-203 of the β subunit. **J Biol Chem.**, v. 263, p. 18726–18731, 1988.

SMITH-JONES, P. M.; STOLZ, B.; ALBERT, R.; KNECHT, H.; BRUNS, C. Synthesis, biodistribution and renal handling of various chelate-somatostatin conjugates with metabolizable linking groups. **Nucl. Med. Biol.** v.24, n.8, p.761-769, 1997.

SOURIAU, C.; HUA, T.; LEFRANC, M.; WEILL, M. Présentation à la surface de phages filamenteux: Les multiples applications du phage display. **Médecine/Sciences**, v.14, p.300-309, 1998.

STEVENSON, D.; MILLER, S.; WILSON, I.D. **Extraction Methods in Organic Analysis**. 1ed. England: Editora Sheffield Acad. Press, 2000.

STEVENSON, D.; WILSON, I.D. 1 ed. **Sample preparation for Biomedical and Environmental Analysis**. New York: Editora Plenum, 1994.

STUPACK, D.G.; PUENTE, X.S.; BOUTSABOUALOY, S.; STORGARD, C.M.; CHERESH, D. A. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. **J. Cell Biol.**, v.155, p.459–470, 2001.

SUTCLIFFE-GOULDEN, J.L.; O'DOHERTY, M.J.; MARSDEN, P.K.; HART, I.R.; MARSHALL, J.F.; BANSAL, S.S. Rapid solid phase synthesis and biodistribution of ^{18}F -labelled linear peptides. **Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imag.**, v.29, p.754-759, 2002.

SVENSSON, C.K.; WOODRUFF, M.N.; BAXTER, J.G.; LALKA, D. Free drug concentration monitoring in clinical practice. Rationale and current status. **Clin. Pharmacokinet.**, v.11, n.6, p.450-460, 1986.

TAYLOR, A. T.; LIPOWSKA, M.; HANSEN, L.; MALVEAUX, E.; MARZILLI, L. M. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAEC Complexes: New Renal Radiopharmaceuticals Combining Characteristics of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG₃ and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC. **J. Nucl. Med.**, v.45, p.885-891, 2004.

TEODORO, R., FAINTUCH, B.L., NÚÑEZ, E.G., QUEIRÓZ, R.G. Neurotensin(8-13) analogue: radiolabeling and biological evaluation using different chelators. **Nucl. Med. Biol.**, n.38, v.1, p.113-120, 2011.

VERRIER, S.; PALLU, S.; BAREILLE, R.; JONCZYK, A.; MEYER, J.; DARD, M.; AMÉDÉE, J. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. **Biomaterials**, v.23, n.2, p.585-596, 2002.

VEULENS, A.N.; RODRÍGUEZ, R. G protein coupled receptors as targets for drug design. **Biotech. Appl.**, v.26, p.24-33, 2009.

VIVIER, P.H.; DACHER, J.N. Pharmacokinetics of ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)-MAG3. **AJR Am. J. Roentgenol.**, v.193, n.4, p.W36, 2009. Author reply W362.

- WALLBRUNN, A. von; WALDECK, J.; HÖLTKE, C.; ZÜHLSDORF, M.; MESTERS, R.; HEINDEL, W.; SCHÄFERS, M.; BREMER, C. In vivo optical imaging of CD13/APN-expression in tumor xenografts. **J. Biomed. Opt.**, v.13, n.1, p.011007, 2008.
- WANG, Y.; LIU, G.; HNATOWICH, D.J. Methods for MAG₃ conjugation and ^{99m}Tc radiolabeling of biomolecules. **Nature Protocols**, v.1, n.3, p.1477-1480, 2006.
- WARREN, B.A., SHUBIK, P. The growth of the blood supply to melanoma transplants in the hamster cheek pouch. **Lab. Invest.**, v.15, p.464-478, 1966.
- WEINER R.E.; THAKUR M.L. Radiolabeled Peptides in Oncology: role in diagnosis and treatment. **Biodrugs.**, v.19, n.3, p.145-163, 2005.
- WESTER, H.J.; KESLLER, H. Molecular targeting with peptides or peptide-polymer conjugates: Just a question of size?. **J.Nucl. Med.**, v.46, n.12, p.1940-1945, 2005.
- WICKSTRÖM, M.; LARSSON, R.; NYGREN, P.; GULLBO, J. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. **Cancer Sci.**, v.102, n.3, p.501-508, 2011.
- WIECEK, D.; FAINTUCH, B.L.; TEODORO, R.; FERNANDEZ, E.; SMITH, C. Radiolabeling and biodistribution studies of the new angiogenesis tracer cyclic Asn-Gly-Arg (NGR). **J. Nucl. Med.**, v.50, p.1917, 2009. **Supplement 2**
- WINNARD Jr., P.; CHANG, F.; RUSCHOWSKI, M.; MARDIROSSIAN, G. and HNATOWICH, D. J. Preparation and use of NHS-MAG₃ for technetium-99m labeling DNA. **Nucl. Med. Biol.**, v.24, p.425-432, 1997.
- WU, Y.; ZHANG, X.Z.; XIONG, Z.M.; CHENG, Z.; FISHER, D.R.; LIU, S. MicroPET imaging of glioma av-integrin expression using ⁶⁴Cu labeled tetrametric RGD peptide. **J. Nucl. Med.**, v.56, p.1707-1718, 2005.
- XUE L.Y.; NOUJAIM A.A.; SYKES T.R.; WOO T.K.; PENG Z.; Studies on Metabolism of Directly Labeled ^{99m}Tc-antibody in Mice. **Q. J. Nucl. Med.**, v.40, n.4, p.341-350, 1996.
- YANG, J.; GUO, H.; GALAZZI, F.; BERWICK, M.; PADILLA, R.S.; MIAO, Y. Evaluation of a Novel Arg-Gly-Asp-Conjugated r-Melanocyte Stimulating Hormone Hybrid Peptide for Potential Melanoma Therapy. **Bioconjugate Chem.**, v.20, p.1634–1642, 2009.
- YANG, J.; GUO, H.; MIAO, Y. Technetium-99m-labeled Arg-Gly-Asp-conjugated alpha-melanocyte stimulating hormone hybrid peptides for human melanoma imaging. **Nucl. Med. Biol.**, v.37, n.8, p.873-883, 2010.
- YI, M.; RUOSLAHTI, E. A fibronectin fragment inhibits tumor growth, angiogenesis, and metastasis. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v.98, p.620–624, 2001.
- ZAROVNI, N.; MONACO, L.; CORTI, A. Inhibition of tumor growth by intramuscular injection of cDNA encoding tumor necrosis factor alpha coupled to NGR and RGD tumor-homing peptides. **Hum. Gene Ther.**, v.15, p.373-382, 2004.

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

ZHANG, Z.; HARADA, H.; TANABE, K.; HATTA, H.; HIRAOKA, M.; NISHIMOTO, S. Aminopeptidase N/CD13 targeting fluorescent probes: synthesis and application to tumor cell imaging. **Peptides**. v.26, p.2182-2187, 2005.

ZHANG, J.B.; WANG, X.B.; LI, C.Y. Synthesis and biodistribution of a new ^{99m}Tc nitrido complex for cerebral imaging. **Nucl. Med. Biol.**, v.29, p.665-669, 2002.

ZHANG, Y.M.; LIU, N.; ZHU, Z.H.; RUSCKOWSKI, M.; HNATOWITCH, D.J. Influence of different chelators (HYNIC, MAG₃ and DTPA) on tumor cell accumulation and mouse biodistribution of technetium-99m labeled to antisense DNA. **Eur. J. Nucl. Med.**, v.27, n. 11, p. 1700-1707, 2000.

ZHOU, Y.; CHAKRABORTY, S.; LIU, S. Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Radiotracers for Imaging Tumors and Thrombosis by SPECT. **Theranostics**, v.1, p.58-82, 2011a.

ZHOU, Y.; KIM, Y.S.; CHAKRABORTY, S.; SHI, J.; GAO, H.; LIU, S. (99m)Tc-Labeled Cyclic RGD Peptides for Noninvasive Monitoring of Tumor Integrin $\alpha(v)\beta(3)$ Expression. *Mol Imaging.*, 2011b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21521559>>. Acesso em 20 de julho de 2011.

ZITZMANN, S.; EHEMANN, V.; SCHWAB, M. Arginine-glycine-aspartic acid (RGD)-peptide binds to both tumor and tumor-endothelial cells in vivo. **Cancer Res.**, v.62, p.5139-5143, 2002.