

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

LEONARDO LIMA FUSCALDI

**EMPREGO DO PEPTÍDEO ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ NA
IDENTIFICAÇÃO DE TUMOR DE PRÓSTATA DA LINHAGEM LNCaP EM
MODELO EXPERIMENTAL**

Belo Horizonte - MG

2012

LEONARDO LIMA FUSCALDI

**EMPREGO DO PEPTÍDEO ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ NA
IDENTIFICAÇÃO DE TUMOR DE PRÓSTATA DA LINHAGEM LNCaP EM
MODELO EXPERIMENTAL**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso – UFMG

Coorientadora Profa. Dra. Simone Odília A. Fernandes – UFMG

Colaboradora Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira – UFMG

Colaborador Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali – UFMG

Colaborador Doutorando André Luís Branco de Barros - UFMG

Belo Horizonte - MG

2012

F993e Fuscaldi, Leonardo Lima.
Emprego do peptídeo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ na identificação de tumor de próstata da linhagem LNCaP em modelo experimental / Leonardo Lima Fuscaldi. – 2012.
82 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso.
Coorientadora: Profa. Dra. Simone Odília A. Fernandes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Próstata – Câncer – Teses. 2. Câncer – Diagnóstico – Teses. 3. Medicina nuclear – Teses. 4. Radiofármacos – Teses. 5. Traçadores radioativos – Teses. I. Cardoso, Valbert Nascimento. II. Fernandes, Simone Odília A.. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 539.7

FOLHA DE APROVAÇÃO

LEONARDO LIMA FUSCALDI

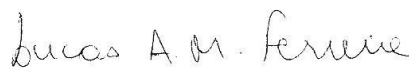
“Emprego do peptídeo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ na identificação de tumor de próstata da linhagem LNCaP, em modelo experimental”

Dissertação, como requisito parcial para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada em vinte e sete de fevereiro de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA



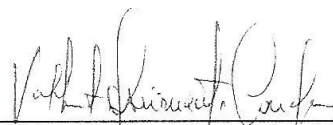
Prof. Dr. Luiz Gonzaga Vaz Coelho - UFMG



Prof. Dr. Lucas Antônio Miranda Ferreira- UFMG



Prof. Dra. Simone Odília A. Fernandes - UFMG



Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso - UFMG

Dedico esse trabalho àqueles que, graças ao respeito e ao amor, me apoiaram incondicionalmente: meus pais, João Bosco e Margarete.

AGRADECIMENTOS

Obrigado a todas as pessoas especiais que cruzaram o meu caminho e que me fizeram crescer e alcançar os meus objetivos.

Aos meus pais, João Bosco e Margarete, e aos meus irmãos, Cris e Ricardo, pelo apoio incondicional em mais essa etapa. Vocês formam a base da minha vida e são a minha referência. Obrigado pela confiança e pelo respeito. Amo vocês!

Aos meus cunhados, primos e tios, pela torcida. Ao meu sobrinho Igor e ao Bititinho, pelas brincadeiras, me fazendo lembrar um pouquinho da minha infância.

Aos professores Valbert e Simone, por me permitirem fazer parte do Laboratório de Radioisótopos e por acreditarem em mim, sempre me incentivando durante todo esse trabalho. Eu cresci muito nesse período com vocês.

À professora Mônica, por abrir as portas do Laboratório de Farmacotécnica e pela imensa colaboração nesse trabalho.

Ao professor Geovanni e a todos do Laboratório de Patologia Comparada (ICB/UFMG), pela importante colaboração na análise histopatológica.

Ao doutorando André, que além de colaborar nesse trabalho, sempre esteve à disposição para o que fosse preciso. *Gracias por todo!*

À querida Lú, pelos primeiros passos no Laboratório de Radioisótopos como seu IC e por acreditar em mim e por ser tão amiga.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Radioisótopos. Ao Vanderli e à Etna, por sempre serem tão prestativos. Aos colegas pós-graduandos das ciências farmacêuticas e de alimentos, pelo companheirismo, especialmente à Raquel, Kátia e Anne. Aos alunos de IC, pela ajuda. Agradeço especialmente à Carol, que esteve comigo desde que entrei no laboratório, e ao Caiubi, por ter sido um aluno de IC tão dedicado.

A todos os funcionários, alunos e professores do Laboratório de Farmacotécnica, que me acolheram tão bem e com que eu tive uma convivência muito agradável. Obrigado especial a Cláudia, Diego, Guilherme e Samuel!

Aos funcionários do biotério da FAFAR, Adelaide e Batista, que me auxiliaram e me deram dicas importantes com relação aos animais, e foram sempre tão prestativos.

Aos funcionários do biotério do IPEN (São Paulo), especialmente à Maíra e à Neide, por agilizarem a aquisição dos animais, sempre com imensa cordialidade.

Aos funcionários da Ecograf, especialmente à Maria José, pela disponibilidade em me fornecer tecnécio-99m sempre que precisei.

A todos os professores que tive na graduação e no mestrado, pelos ensinamentos.

A todos os amigos da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela convivência agradável.

Aos Cabritos Mochileiros, tão presentes nesse período, me dando todo o apoio, cada um de uma maneira particular. Augustão, Biel, Lelet, Madame, Nerd e Priscila, obrigado pela amizade!

Ao Juninho, pela amizade e por me aguentar durante anos, mesmo com todas as minhas particularidades.

Ao Junior, por ter ficado ao meu lado nos altos e baixos dessa etapa da minha vida.

Aos meus amigos de Ponte Nova, Renan e Maraísa, que sempre estiveram com o pensamento positivo para mim e que me proporcionaram bons momentos quando nos encontrávamos.

A todos meus outros amigos, pelos bons momentos que passamos juntos.

À CNEN, pela bolsa de mestrado, e à FAPEMIG, pelo apoio financeiro ao projeto.

RESUMO

O câncer de próstata é um dos tumores de maior incidência entre os homens, apresentando elevados índices de mortalidade. Os atuais métodos de diagnóstico não são capazes de identificá-lo nos estágios iniciais, resultando muitas vezes em diagnóstico tardio com metástase. Assim, existe por parte da comunidade científica uma busca incessante por métodos de diagnóstico capazes de detectar com precocidade o tumor, facilitando o tratamento e aumentando as chances de cura. Nesse sentido, a medicina nuclear propicia métodos capazes de detectar tumores em estágios iniciais, pois se baseia em alterações bioquímicas e fisiológicas do tecido, como a super-expressão de receptores para o peptídeo liberador de gastrina (GRPr`s) pelas células de tumor de próstata. A bombesina, um tetradecapeptídeo isolado do sapo *Bombina bombina*, apresenta alta afinidade por esse receptor, pois é análoga ao peptídeo liberador de gastrina. Portanto, este trabalho tem como objetivo preparar o complexo $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ e usá-lo na identificação de tumor de próstata, linhagem LNCaP, em modelo experimental. Nos ensaios *in vitro*, alíquotas de 0,026 MBq do radiopeptídeo foram incubadas com 2×10^6 células LNCaP em banho-maria à 37°C, por 1 e 4 horas, com e sem adição prévia do peptídeo frio (n=3). O tumor de próstata foi induzido no flanco superior direito de camundongos, machos BALB/c nude, por meio da injeção subcutânea de 5×10^6 células LNCaP ressuspendidas em 150 μL de Matrigel:meio RPMI-1640 (1:1). O perfil de biodistribuição (n=5) e as imagens cintilográficas (n=3) foram obtidos 1 e 4 horas após a administração intravenosa de 7,4 MBq do $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$. Para tanto, foram utilizados camundongos machos BALB/c sadios e animais com tumor de próstata com 15, 20 e 25 dias de desenvolvimento. Os resultados do estudo *in vitro* mostraram que a fração do radiopeptídeo que se ligou às células foi de $2,08 \pm 0,30\%$ (1 hora) e $2,44 \pm 0,18\%$ (4 horas). Dos percentuais que se ligaram, as frações que se internalizaram foram de $25,64 \pm 3,14\%$ (1 hora) e $25,27 \pm 2,05\%$ (4 horas). Por outro lado, a incubação prévia das células com o peptídeo frio reduziu a ligação em 32,21% (1 hora) e 43,85% (4 horas). A internalização foi reduzida em 57,88% (1 hora) e 53,70% (4 horas). O perfil de biodistribuição do $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ nos camundongos sadios e com tumor de próstata mostrou uma rápida depuração sanguínea, com elevada captação pelos rins. O percentual da dose injetada (%DI) do radiotraçador captado

pelo tumor foi estatisticamente maior quando este apresentava 25 dias de desenvolvimento, aproximadamente 1% (1 hora) e 0,1% (4 horas). As imagens cintilográficas corroboraram com o perfil de biodistribuição do radiofármaco, observando-se intensa captação do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelos rins e pela bexiga, em todos os grupos investigados. Por outro lado, o foco tumoral foi melhor visualizado nos camundongos com tumor de próstata com 25 dias de desenvolvimento, apresentando tamanho em torno de 7,6 mm. Os resultados obtidos dos ensaios *in vitro* mostraram que o radiopeptídeo ligou-se especificamente aos GRPr's presentes nas células LNCaP. Os dados dos estudos de biodistribuição e de imagens cintilográficas sugerem que o ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pode ser usado para a identificação de tumor de próstata, linhagem LNCaP, por meio de imagens cintilográficas, em modelo experimental.

Palavras-Chave: tumor de próstata; LNCaP; bombesina; tecnécio-99m.

ABSTRACT

Prostate cancer is one of the most prevalent tumors in men, showing high mortality rates. Current diagnostic methods are not able to identify early prostate carcinoma, often resulting in a late diagnosis with established metastasis. Thus, there is by the scientific community an incessant search for diagnostic methods for early assessment of prostate cancer, facilitating the treatment and increasing the chances of cure. In this context, nuclear medicine provides a diagnostic method which can detect tumors at an early stage, because it is based on biochemical and physiological changes of the tissue, such as overexpression of gastrin releasing peptide receptors (GRPr`s) by prostate cancer cells. Bombesin, a tetradecapeptide isolated from the frog *Bombina bombina*, has a high affinity for the GRPr`s, since it is analogous to gastrin releasing peptide. Therefore, this study aims to prepare the complex ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ and use it for the identification of prostate tumor, LNCaP line, in an experimental model. For *in vitro* assays, aliquots of 0.026 MBq of the radiopeptide were incubated with 2×10^6 LNCaP cells in a water bath at 37°C, for 1 and 4 hours, with and without prior addition of cold peptide (n=3). Prostate tumors were induced into the upper right flank of male BALB/c nude mice by subcutaneous injection of 5×10^6 LNCaP cells resuspended in 150 μL of Matrigel:RPMI-1640 medium (1:1). Biodistribution profile (n=5) and scintigraphic images (n=3) were obtained at 1 and 4 hours after intravenous injection of 7.4 MBq of ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎. To assess this, healthy male BALB/c mice and tumor-bearing male BALB/c nude mice with 15, 20 and 25 days of tumor development were used. *In vitro* study results showed that the fraction of the radiopeptide which bound to LNCaP cells was $2.08 \pm 0.30\%$ (1 hour) and $2.44 \pm 0.18\%$ (4 hours). From the percentage which was bound, the internalized fractions were $25.64 \pm 3.14\%$ (1 hour) and $25.27 \pm 2.05\%$ (4 hours). On the other hand, prior incubation of LNCaP cells with cold peptide reduced binding percentage in 32.21% (1 hour) and 43.85% (4 hours). Internalization percentage was reduced in 57.88% (1 hour) and 53.70% (4 hours). Biodistribution profile of ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesin₍₇₋₁₄₎ in healthy and tumor-bearing mice showed rapid blood clearance, with high uptake by the kidneys. Percentage of injected dose (%ID) of the radiotracer captured by the tumor focus was significantly higher after 25 days of tumor development, approximately 1% (1 hour) and 0.1% (4 hours). Scintigraphic images have confirmed the

radiopharmaceutical biodistribution profile, showing intense uptake of ^{99m}Tc -HYNIC- βAla -Bombesin₍₇₋₁₄₎ by kidneys and bladder, in all investigated groups. In contrast, the tumor focus was best viewed in tumor-bearing mice with 25 days of tumor development, with tumor size around 7.6 mm. *In vitro* assay results showed that the radiopeptide binds specifically to GRPr's present in LNCaP cells surface. Biodistribution and scintigraphic images data suggest that ^{99m}Tc -HYNIC- βAla -Bombesin₍₇₋₁₄₎ is able to identify prostate tumor, LNCaP line, by scintigraphic images in experimental model.

Keywords: prostate tumor; LNCaP; bombesin; technetium-99m.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 1 | Representação esquemática da porção inferior do abdômen, mostrando a localização da próstata..... | 24 |
| 2 | Classificação dos modelos animais empregados na oncologia experimental..... | 30 |
| 3 | Sequência de aminoácidos do peptídeo liberador de gastrina e da bombesina..... | 37 |
| 4 | Estrutura dos agentes quelantes para o ^{99m}Tc..... | 40 |
| 5 | Complexo peptídico ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ e seus coligantes..... | 41 |
| 6 | Esquema da contagem do número de células nos 4 quadrantes (círculos maiores) da câmara de Neubauer..... | 45 |
| 7 | Contador de radiação gama – <i>Wizard</i> (Turku/Finlândia)..... | 48 |
| 8 | Câmara de cintilação a raios gama - <i>Nuclide™ TH 22</i> (Budapeste/Hungria)..... | 51 |
| 9 | Relação alvo/não-alvo obtida por meio da imagem cintilográfica..... | 52 |
| 10 | Estágios de desenvolvimento do tumor de próstata experimental após o implante das células LNCaP nos camundongos machos BALB/c nude..... | 58 |
| 11 | Imagens cintilográficas obtidas após administração do ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nos camundongos machos BALB/c..... | 65 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Tipos de câncer mais frequentes em 2008, para ambos os sexos..... | 18 |
| 2 | Percentuais de ligação e de internalização do ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nas células LNCaP, sem bloqueio prévio pelo peptídeo frio..... | 55 |
| 3 | Percentuais de ligação e de internalização do ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nas células LNCaP, com bloqueio prévio pelo peptídeo frio..... | 56 |
| 4 | Percentuais de ligação e de internalização do ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nas células LNCaP..... | 57 |
| 5 | Perfil de biodistribuição do ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nos camundongos machos BALB/c sadios..... | 60 |
| 6 | Perfil de biodistribuição do ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nos camundongos machos BALB/c nude com tumor de próstata com 25 dias de desenvolvimento..... | 61 |
| 7 | Percentual da dose injetada (%DI) do ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ captado pelo tumor em relação ao tamanho do mesmo..... | 63 |
| 8 | Percentual da dose injetada por grama de tecido (%DI/g) do ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ captado pelo tecido tumoral..... | 64 |
| 9 | Relação alvo/não-alvo (tumor/músculo) obtida pelas imagens cintilográficas..... | 67 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|---|
| %DI | Percentual da dose injetada |
| %DI/g | Percentual da dose injetada por grama de tecido |
| ^{111}In | Índio-111 |
| ^{131}I | Iodo-131 |
| ^{18}F | Flúor-18 |
| ^{18}FDG | Flúor-18-desoxiglicose |
| ^{201}Tl | Tálio-201 |
| ^{67}Ga | Gálio-67 |
| ^{99}Mo | Molibdênio-99 |
| $^{99\text{m}}\text{Tc}$ | Tecnécio-99 metaestável |
| $^{99\text{m}}\text{Tc-MDP}$ | Metilenodifosfonato-Tecnécio-99 metaestável |
| $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ | Tecnécio-99 metaestável hidrolisado |
| $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ | Tecnécio-99 metaestável livre ou íon pertecnetato |
| AR4-2J | Linhagem celular murina de tumor pancreático acinar |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| BB1 | Subtipo 1 do receptor de bombesina (receptor de neuromedina B) |
| BB2 | Subtipo 2 do receptor de bombesina (receptor do peptídeo liberador de gastrina) |
| BB3 | Subtipo 3 do receptor de bombesina (receptor órfão) |
| BB4 | Subtipo 4 do receptor de bombesina (receptor anfíbio) |
| BBN | Bombesina |
| BBN ₍₇₋₁₄₎ | Sequência truncada da bombesina contendo os 8 aminoácidos da porção C terminal |
| BD | <i>Becton Dickinson Company</i> |
| CCD | Cromatografia em camada delgada |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| cpm | Contagem por minuto |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DU145 | Linhagem celular humana de tumor de próstata derivada de metástase cerebral |
| EDDA | Ácido etilenodiaminodiacético |

| | |
|------------------------------------|---|
| GRP | Peptídeo liberador de gastrina |
| GRPr | Receptor do peptídeo liberador de gastrina |
| H&E | Hematoxilina-eosina |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HMPAO | Hexametilpropilenoaminóxima |
| HPV | Vírus do papiloma humano |
| HT-29 | Linhagem celular humana de adenocarcinoma de cólon |
| HYNIC | Ácido hidrazinonicotínico |
| INCA | Instituto Nacional de Câncer |
| IPEN | Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares |
| keV | Quiloelétron volt |
| LEHR | <i>Low energy high resolution</i> |
| LNCaP | Linhagem celular humana de tumor de próstata derivada de metástase linfonodal |
| LSD | <i>Least square difference</i> |
| MBq | Megabequerel |
| MCF7 | Linhagem humana de tumor de mama |
| MDA-MB231 | Linhagem humana de tumor de mama |
| N ₂ S ₂ | Diaminoditiol |
| N ₃ S | Triaminotiol |
| Na ^{99m} TcO ₄ | Pertecnetato de sódio |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PC3 | Linhagem celular humana de tumor de próstata derivada de metástase óssea |
| PDGF | Fator de crescimento derivado de plaquetas |
| PET | Tomografia por emissão de pósitron |
| PET/CT | Tomografia por emissão de pósitron associada à tomografia computadorizada |
| PGF | Fator de crescimento de fibroblasto |
| PSA | Antígeno prostático específico |
| PSMA | Antígeno de membrana específico da próstata |

| | |
|--------------------------------------|---|
| q.s.p | Quantidade suficiente para |
| RNM | Ressonância nuclear magnética |
| rpm | Rotação por minuto |
| SCID | Camundongos imunodeficientes severos |
| SnCl ₂ ·2H ₂ O | Cloreto estanoso dihidratado |
| SPECT | Tomografia computadorizada por emissão de fóton único |
| SPSS | <i>Statistical package for the social sciences</i> |
| S-S | Ligação dissulfeto |
| TC | Tomografia computadorizada |
| VEGF | Fator de crescimento do endotélio vascular |
| VIP | Peptídeo intestinal vasoativo |
| β-Ala | Beta-alanina |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1 Câncer..... | 17 |
| <u>1.1.1 Carcinogênese.....</u> | 19 |
| <u>1.1.2 Angiogênese.....</u> | 21 |
| <u>1.1.3 Super-expressão de receptores.....</u> | 22 |
| 1.2 Câncer de próstata..... | 23 |
| <u>1.2.1 Diagnóstico.....</u> | 25 |
| <u>1.2.2 Pesquisa de metástases.....</u> | 27 |
| <u>1.2.3 Novos estudos.....</u> | 28 |
| 1.3 Medicina nuclear..... | 31 |
| <u>1.3.1 Tecnécio-99m.....</u> | 33 |
| <u>1.3.2 Marcadores específicos.....</u> | 34 |
| <u>1.3.3 Peptídeos.....</u> | 35 |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 42 |
| 3 OBJETIVO..... | 43 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 43 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 43 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 44 |
| 4.1 Material..... | 44 |
| 4.2 Cultivo e manutenção das células LNCaP..... | 44 |
| 4.3 Marcação do complexo peptídico HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ com ^{99m} Tc..... | 46 |
| <u>4.3.1 Radiomarcção para o teste de afinidade do ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP.....</u> | 46 |
| <u>4.3.2 Radiomarcção para os estudos de biodistribuição e imagem em animais.....</u> | 47 |
| <u>4.3.3 Determinação do rendimento de radiomarcção.....</u> | 47 |
| 4.4 Teste de afinidade <i>in vitro</i> do ^{99m} Tc-HYNIC-βAla-Bombesina ₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP..... | 47 |
| 4.5 Modelo experimental de tumor de próstata..... | 49 |
| 4.6 Estudos de biodistribuição..... | 50 |

| | |
|--|-----------|
| 4.7 Imagens cintilográficas..... | 51 |
| 4.8 Análise estatística..... | 53 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 54 |
| 5.1 Marcação do complexo peptídico HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ com átomos de ^{99m}Tc..... | 54 |
| 5.2 Teste de afinidade <i>in vitro</i> do ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP..... | 54 |
| 5.3 Modelo experimental de tumor de próstata..... | 58 |
| 5.4 Estudos de biodistribuição..... | 59 |
| 5.5 Imagens cintilográficas..... | 64 |
| 6 CONCLUSÕES..... | 69 |
| 7 PERSPECTIVAS..... | 70 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 71 |
| ANEXO A..... | 81 |
| ANEXO B..... | 82 |
| ANEXO C..... | 82 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é um termo genérico utilizado para um conjunto de mais de 100 doenças que se caracterizam pela multiplicação desordenada de células que invadem tecidos e órgãos (tumor primário), podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (metástase). Metástases são a principal causa de morte por câncer. Outros termos que podem ser utilizados como sinônimos de câncer são tumor maligno e neoplasia (WHO, 2011).

O câncer está entre as causas mais comuns de morte no mundo. Em 2008, foram registrados cerca de 12,7 milhões de novos casos e a doença foi responsável por aproximadamente 13% (7,6 milhões) de todas as mortes ocorridas no mundo naquele ano (FERLAY, 2010). A perspectiva da Organização Mundial de Saúde (OMS) é que a taxa de mortalidade por câncer continue aumentando, atingindo 11,5 milhões de óbitos em 2030, um crescimento de 51% (WHO, 2011). Essa elevação seria influenciada em parte pelo envelhecimento da população mundial, visto que a idade é um fator de risco para o desenvolvimento do câncer (DEPINHO, 2000). Os números estimados não são maiores devido à expectativa de redução na mortalidade com base nas intensas pesquisas na área da oncologia. O número de novos casos de câncer esperados para 2030 é de 15,5 milhões em todo o mundo (WHO, 2011).

Os tipos mais frequentes de câncer no ano de 2008, para ambos os sexos, foram os cânceres de mama, de próstata e de pulmão, como pode ser observado no gráfico a seguir (**Gráfico 1**).

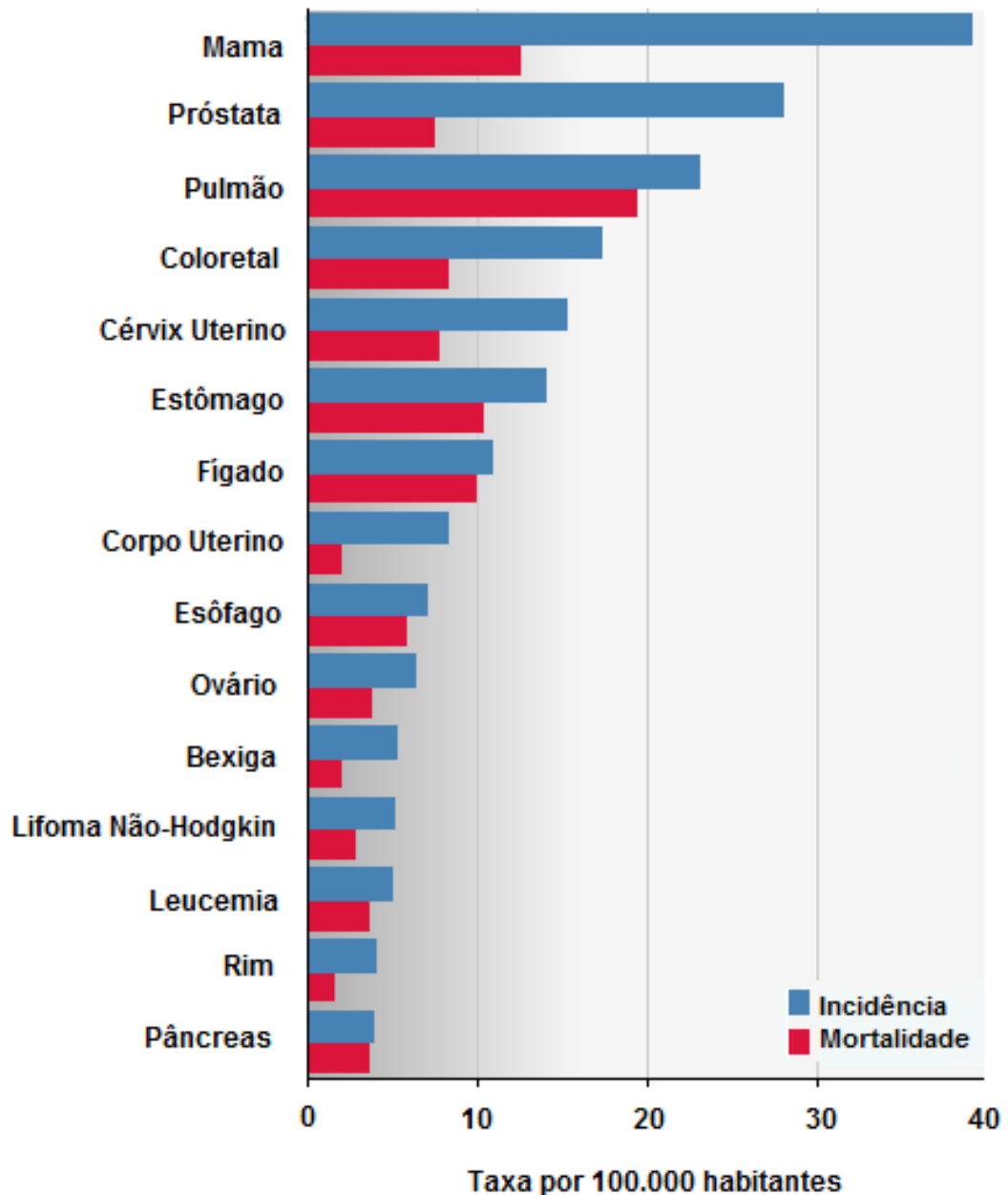


Gráfico 1 – Tipos de câncer mais frequentes em 2008, para ambos os sexos (adaptado de FERLAY, 2010).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima 518.510 novos casos de câncer para o ano de 2012. Destes, 134.170 (25,9%) corresponderão ao câncer de pele não melanoma. À exceção deste tipo de câncer, os tipos mais incidentes entre os homens serão os cânceres de próstata, de pulmão, colorectal e de estômago, e entre as mulheres serão os cânceres de mama, de colo uterino, colorectal e da glândula tireóide, apresentando perfil semelhante ao observado nas estatísticas mundiais (INCA/MS, 2011).

A prevenção do câncer é de extrema importância, sendo um componente essencial de todos os programas de saúde para o controle da doença, uma vez que cerca de 40% de todas as mortes causadas por câncer podem ser evitadas. Importantes fatores de risco para o desenvolvimento da doença são passíveis de prevenção, mas ainda causam milhares de óbitos por câncer todos os anos no mundo (WHO, 2011):

- Consumo do tabaco – responsável por 1,8 milhões de mortes;
- Sobrepeso, obesidade e inatividade física – juntos são responsáveis por 274.000 mortes;
- Consumo excessivo de álcool – responsável por 351.000 mortes;
- Infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) – responsável por 235.000 mortes;
- Carcinógenos ocupacionais – responsáveis por pelo menos 152.000 mortes.

1.1.1 Carcinogênese

O surgimento do câncer se dá a partir de uma única célula e se constitui, basicamente, de quatro etapas: iniciação, promoção, progressão e disseminação.

Na etapa de iniciação, uma célula normal sofre a ação de um ou mais agentes cancerígenos, os quais provocam alterações no DNA (mutações genéticas) e a célula passa a receber instruções erradas para as suas atividades (PATRICK, 2005). Esse estímulo cancerígeno pode ser de três tipos (FILHO *et al.*, 2004):

- agente físico, como a radiação ionizante;
- agente químico, como alguns componentes do tabaco, solventes orgânicos e aditivos químicos presentes nos alimentos industrializados;
- agente biológico, como alguns tipos do HPV e os vírus das hepatites B e C.

As alterações no DNA podem ocorrer em dois tipos de genes, os oncogenes e os genes supressores de tumor. Ambos são extremamente importantes para a manutenção do equilíbrio celular, visto que apresentam funções relacionadas ao controle do ciclo celular, ao reparo do DNA e a apoptose (WEINBERG, 2008).

Os oncogenes são originados dos protooncogenes e não desempenham adequadamente as funções anteriormente realizadas por seus antecessores, os protooncogenes. Como resultado dessa alteração, pode ocorrer aumento ou falha na síntese do produto desses genes, que pode ser, por exemplo, um receptor ou um fator de crescimento. Em ambos os casos ocorrerá proliferação desordenada das células. São exemplos de oncogenes os genes *ras* e *myc*, que estão envolvidos no desenvolvimento da maioria dos tumores (BOS, 1989; BISHOP, 1991, WEINBERG, 2008).

Os genes supressores de tumor apresentam funções de reparo do DNA e de regulação do ciclo celular. Portanto, o envolvimento desses genes na formação do câncer acontece quando os mesmos são desativados. Assim, as células perdem um importante aliado na contenção da formação do tumor, sendo este mecanismo tão importante quanto à ativação dos oncogenes. Dentre os genes supressores de tumor destacam-se o gene *p53* e o gene *Rb*, envolvidos na regulação do ciclo celular. Dessa forma, mutações em um ou ambos os genes são determinantes para a formação dos cânceres (HAHN e WEINBERG, 2002; ROBBINS e COTRAN, 2010).

Na etapa de promoção, os agentes oncogênicos promovem a proliferação da célula cancerosa (COUSSENS e WERB, 2002). Essa etapa da carcinogênese, bem como a anterior, gera modificações nas funções celulares, ocasionando alterações nas propriedades de membrana, nas interações célula-célula e no metabolismo celular, o que propicia a formação dos tumores (PAUWELS *et al.*, 1998).

Após o seu surgimento, o câncer passa pela etapa de progressão, em que pode sofrer modificações biológicas, tornando-se, em geral, mais agressivo e maligno. A última etapa da carcinogênese é a disseminação ou metástase, caracterizada pela migração de uma célula cancerosa do seu sítio de origem para outro órgão ou tecido, através de duas vias principais, a sanguínea e a linfática. No novo sítio, há a formação de uma nova lesão tumoral, mas sem continuidade com o tumor primário (FILHO *et al.*, 2004).

1.1.2 Angiogênese

Para que os tumores cresçam além de 1-2 mm de tamanho, há a necessidade de um suprimento aumentado de sangue, uma vez que as células neoplásicas precisam de um aporte elevado de nutrientes para a manutenção de seu acentuado metabolismo. Esse maior aporte sanguíneo é garantido pela angiogênese, ou seja, a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes e/ou de células tronco endoteliais circulantes, sendo fundamental para o crescimento tumoral e para o processo de metástase (CARMELIET, 2003; VIRREY *et al.*, 2008; CHUA *et al.*, 2010; JUN *et al.*, 2010).

A angiogênese é altamente específica para o processo neoplásico, visto que, exceto na cicatrização de feridas ou nos tecidos do sistema reprodutor feminino, apenas 0,01% das células endoteliais normais estão envolvidas na angiogênese (HANAHAN e FOLKMAN, 1996).

A indução da angiogênese deve-se a uma resposta ao stress causado pela hipóxia e pelo baixo pH (HARRIS, 2002), sendo controlada por um equilíbrio entre moléculas endógenas anti-angiogênicas e pró-angiogênicas (NYBERG *et al.*, 2005). Dentre essas moléculas, podemos citar os fatores de crescimento pró-angiogênico, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento de fibroblasto (PGF), além de enzimas proteolíticas, como as metaloproteinases e a plasmina. A hipóxia presente no tumor estimula as células cancerosas a secretar estes fatores no interstício, levando a degradação da membrana basal ao redor dos vasos pré-existentes, o que permite a migração de células endoteliais e, conseqüentemente, a formação de novos vasos (DESHPANDE *et al.*, 2010; VERBRIDGE *et al.*, 2010).

No processo normal de angiogênese, os novos vasos formados se tornam maduros e se estabilizam rapidamente (CARMELIET e JAIN, 2000). Por outro lado, os vasos sanguíneos tumorais são caracterizados por estruturas tortuosas e irregulares, além de serem extremamente permeáveis devido à dilatação, à presença de fenestras e à falta de membrana basal (JAIN *et al.*, 2002). O aumento na permeabilidade não é acompanhado pelo aumento na drenagem pelos vasos linfáticos. Assim, vasos

tumorais angiogênicos permitem a passagem de macromoléculas da circulação para o interstício tumoral e, uma vez no interstício, essas macromoléculas ficam retidas na região do tumor por falta de drenagem linfática intratumoral, sendo um fator importante para explicar a distribuição de fármacos antitumorais e agentes de diagnóstico para o microambiente do tumor (RUOSLAHTI, 2002; MUNN, 2003; GOSH *et al.*, 2008).

1.1.3 Super-expressão de receptores

Diversos processos fisiológicos tornam-se exacerbados quando uma célula sofre malignização e podem ser usados para distinguir o tecido normal do canceroso (de BARROS *et al.*, 2010). Por exemplo, uma célula normal pode expressar na superfície externa de sua membrana citoplasmática uma série de receptores de moléculas endógenas. Quando essa célula torna-se cancerosa, há um aumento na expressão desses receptores na superfície celular (SCHOTTELIUS e WESTER, 2009). Uma variedade de receptores foi identificada em maior proporção em tecidos tumorais, especialmente receptores de peptídeos, como demonstrado a seguir (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais receptores de peptídeos super-expressos em células tumorais humanas (adaptado de SCHOTTELIUS e WESTER, 2009).

| RECEPTORES | TUMORES COM SUPER-EXPRESSÃO DE RECEPTORES |
|---|--|
| Receptor de Somatostatina subtipo 2 (sst ₂) | Trato gastrointestinal, cérebro, pulmão, mama, rim, sistema linfático. |
| $\alpha\beta$ 3-Integrina | Cérebro, ovário, mama, pele, pulmão. |
| Receptor de Colecistocinina-B/Gastrina (CCK-B) | Tireóide, pulmão, cérebro, ovário. |
| Receptor do Peptídeo Liberador de Gastrina (GRPr) | Próstata, mama, pulmão. |

/continua

Tabela 1 (Conclusão)

| | |
|---|--|
| Receptor de Melanocortina-1 (MC1r) | Pele. |
| Receptor do Peptídeo Intestinal Vasoativo (VPAC1) | Mama, ovário, endométrio, próstata, bexiga, cólon, esófago, cérebro. |
| Receptor de Neurotensina (NTr) | Pâncreas, osso, cérebro, mama, cólon. |
| Receptor do Peptídeo Tipo-Glucagon 1 (GLP-1) | Pâncreas, ovário, próstata, cérebro, tireóide, adrenal. |
| Receptor do Neuropeptídeo Y (Y1/Y2) | Mama, ovário, adrenal, cérebro, rim, trato gastrointestinal, osso. |
| Receptor de Quimiocina (CXCR4) | Sistema Linfático, mama, próstata, pulmão. |
| Receptor do Hormônio Liberador de Gonadotropina (GnRHr) | Ovário, endométrio, próstata, mama. |

A super-expressão de receptores de peptídeos em células cancerosas, quando comparada à expressão endógena, permite a diferenciação entre os tecidos sadio e tumoral. Assim, esses receptores podem ser utilizados como alvo para agentes terapêuticos e/ou de diagnóstico (REUBI *et al.*, 2002; KÖRNER *et al.*, 2007; FERRO-FLORES *et al.*, 2010; HAUBNER e DECRISTOFORO, 2011).

1.2 Câncer de próstata

A próstata é uma glândula pequena localizada na porção inferior do abdômen, logo abaixo da bexiga e à frente do reto (**Figura 1**). Ela envolve a porção inicial da uretra, tubo pelo qual a urina armazenada na bexiga é eliminada, e produz parte do sêmen, líquido espesso que contém os espermatozoides, liberado durante o ato sexual.

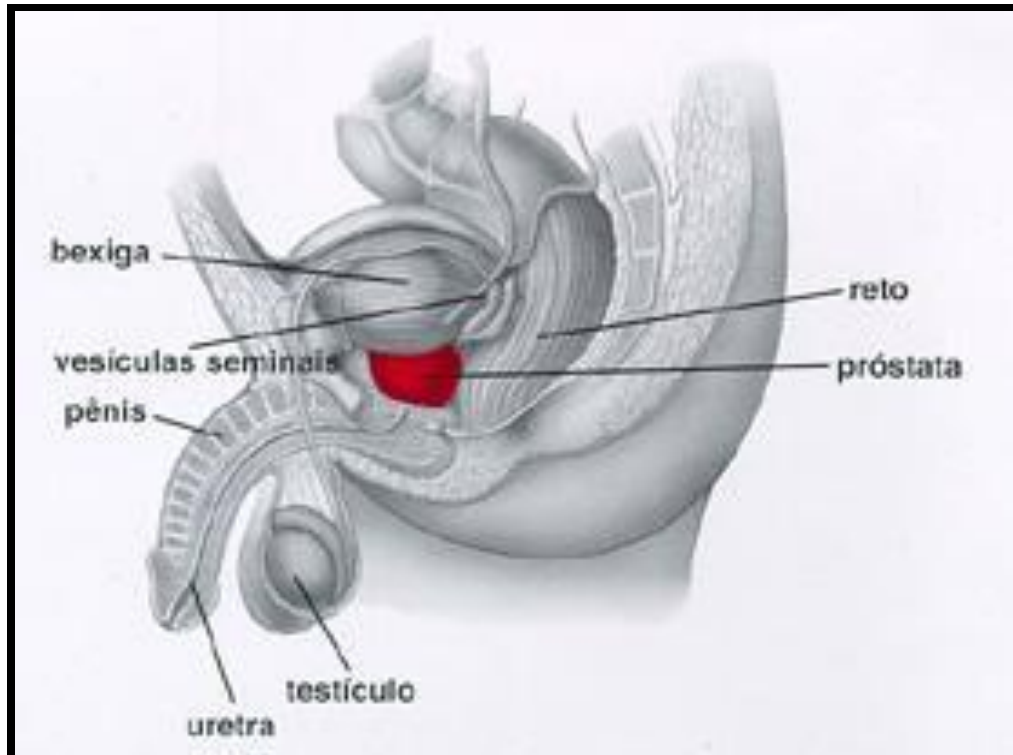


Figura 1 – Representação esquemática da porção inferior do abdômen, mostrando a localização da próstata.

O carcinoma de próstata tem acentuada relevância, pois é o 2º tipo de câncer mais prevalente entre os homens no mundo, sendo inferior apenas ao tumor pulmonar. Em 2008, foram registrados 899.102 novos casos da doença, segundo dados mundiais, representando 13,6% dos casos de câncer entre os homens naquele ano (FERLAY, 2010).

No Brasil, o câncer de próstata também está em 2º lugar entre os tumores que afetam a população masculina, atrás apenas do câncer de pele não melanoma. As estimativas para 2012 apontam cerca de 60.180 novos casos de carcinoma de próstata no país, o que corresponderia à uma taxa bruta de incidência da doença de 62,54 casos / 100.000 homens (INCA/MS, 2011).

O carcinoma de próstata é considerado o câncer da 3ª idade, visto que 75% dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos. Outros fatores de risco para o desenvolvimento da doença, além da idade, são dieta, etnia e predisposição genética (PAUWELS *et al.*, 1998; KAUR *et al.*, 2006; VERMA *et al.*, 2011).

O câncer de próstata comporta-se, inicialmente, como um tumor dependente de andrógenos, como testosterona e 5 α -dihidrotestosterona. Assim, sofre regressão clínica em resposta a tratamentos farmacológicos ou cirúrgicos que causam redução nos níveis plasmáticos de tais hormônios. Entretanto, a maioria desses tumores sofre alterações que os convertem de um estado dependente de andrógenos para uma forma refratária a esses hormônios. Com isso, tais terapias se tornam ineficazes (JUARRANZ *et al.*, 2001; LO *et al.*, 2007; NABHAN *et al.*, 2011; VERMA *et al.*, 2011). As bases moleculares para a progressão do tumor de próstata para uma forma independente de andrógenos ainda é pouco conhecida. Porém, sabe-se que os receptores de andrógenos podem ser ativados indiretamente por substâncias cujos receptores de membrana acoplados a proteína G são expressos nas células tumorais de próstata (XIE *et al.*, 2007).

As células normais da próstata expressam, na superfície externa de sua membrana citoplasmática, diversos receptores de peptídeos, cujas expressões encontram-se exacerbadas nas células tumorais da próstata. Como exemplos desses receptores, podem-se citar os receptores do peptídeo liberador de gastrina (GRP), do peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e da somatostatina (JUARRANZ *et al.*, 2001; WEINER e THAKUR, 2002; SCHOTTELIUS e WESTER, 2009). Assim como em outros tipos de tumores, essa diferença na expressão de receptores de peptídeos, entre as células prostáticas normais e cancerosas, permite a diferenciação entre os tecidos sadio e tumoral, podendo funcionar como alvos para agentes terapêuticos e/ou de diagnóstico.

1.2.1 Diagnóstico

Os atuais métodos utilizados para o diagnóstico do câncer de próstata são o toque retal, a dosagem do antígeno prostático específico (PSA) e a biópsia (INCA/MS, 2002; de VISSCHERE *et al.*, 2010; VERMA *et al.*, 2011).

O toque retal é o exame mais utilizado e tem como objetivo avaliar a forma, a simetria, a firmeza e a nodularidade da glândula, além de detectar próstatas grosseiramente alargadas (de VISSCHERE *et al.*, 2010). Entretanto, esse procedimento avalia apenas as porções posterior e lateral da próstata,

negligenciando 40 a 50% dos tumores. Dessa forma, apresenta uma sensibilidade de apenas 55 a 68% e um valor preditivo positivo em torno de 25 a 28% (INCA/MS, 2002).

A dosagem do PSA é um exame que deve ser associado ao toque retal. O nível de 4 ng/ml é aceito como valor limite normal. Quando a dosagem do PSA está acima de 10 ng/ml, há indicação formal para biópsia. Para níveis do PSA entre 4 e 10 ng/ml, deve-se também acompanhar periodicamente a evolução desses níveis e levar em consideração a relação PSA livre/total. Porém, há questionamentos sobre o ponto de corte ideal e clinicamente significativo dos níveis do PSA, uma vez que as células epiteliais da próstata, além das células cancerosas, também o produzem. Dessa forma, os níveis do PSA podem aumentar em casos benignos, como prostatite e hiperplasia benigna prostática, e em processos fisiológicos normais, como a ejaculação (INCA/MS, 2002; de VISSCHERE *et al.*, 2010). Além disso, sabe-se que alguns tumores não alteram os níveis do PSA e que níveis desse antígeno não estão correlacionados com a invasão de linfonodos, ou seja, metástases. Com isso, o valor preditivo positivo para esse método, no homem assintomático, é de apenas 28 a 35% (ETZIONI *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2008; SALAGIERSKI e SCHALKEN, 2010).

O diagnóstico conclusivo do câncer de próstata é realizado pelo estudo histopatológico do tecido obtido pela biópsia da glândula, que deve ser considerada sempre que achados anormais forem obtidos no toque retal ou na dosagem do PSA. Porém, é um procedimento bastante invasivo e, em função das falhas do toque retal e da dosagem do PSA, muitos pacientes são submetidos à biópsia desnecessariamente (SALAGIERSKI e SCHALKEN, 2010). Para orientar a biópsia da próstata, é indicada a ultrassonografia pélvica (ou prostática transretal, se disponível), que também pode ser útil na determinação do volume prostático e na avaliação da extensão local da doença (INCA/MS, 2002; de VISSCHERE *et al.*, 2010).

O relatório anatomopatológico deve fornecer a graduação histológica do sistema de Gleason, cujo objetivo é dar informações sobre o estadiamento do carcinoma de próstata, como a provável taxa de crescimento do tumor e a sua tendência à

disseminação, além de ajudar na determinação do melhor tratamento para o paciente (INCA/MS, 2002). Para tanto, a pontuação obtida na escala de Gleason precisa ser combinada ao exame físico e à dosagem do PSA. Porém, a escala Gleason não é capaz de prever a invasão de linfonodos, que é o caminho padrão para a disseminação de tumores (SCOPINARO *et al.*, 2003).

1.2.2 Pesquisa de metástases

A busca por metástases é indicada para todo paciente portador de câncer de próstata com nível do PSA maior que 20 ng/ml ou dosagem do PSA entre 10 e 20 ng/ml e graduação histológica de Gleason maior que 7 (INCA/MS, 2002).

A pesquisa de metástases linfonodais é feita por meio da ultrassonografia, da tomografia computadorizada (TC) ou da ressonância nuclear magnética (RNM). A busca pelo carcinoma de próstata metastático também pode ser realizada por meio da cintilografia (INCA/MS, 2002). O radiofármaco ^{99m}Tc -MDP é um difosfonato (metileno difosfonato) complexado com o radioisótopo tecnécio-99m (^{99m}Tc) e apresenta afinidade pelo tecido ósseo, sendo usado, portanto, para a detecção de metástases nesse tecido. A cintilografia óssea com ^{99m}Tc -MDP é bastante sensível, mas apresenta baixa especificidade (THRALL e ZIESSMAN, 2003). Recentemente, imagens de tomografia por emissão de pósitron associada à tomografia computadorizada (PET/CT) utilizando o ^{18}F -Fluoreto de sódio têm mostrado resultados promissores na avaliação de metástase óssea em pacientes com câncer de próstata. Esta técnica apresenta a combinação de melhores propriedades farmacocinéticas do ^{18}F -Fluoreto em relação ao ^{99m}Tc -MDP, como clareamento sanguíneo mais rápido e captação óssea duas vezes maior, com resolução superior do PET em relação à cintilografia, além da correlação morfológica devido à TC. Embora seja mais sensível que a cintilografia óssea com ^{99m}Tc -MDP, a técnica de PET/CT utilizando ^{18}F -Fluoreto apresenta um custo muito elevado, limitando seu emprego. Entretanto, o PET/CT com ^{18}F -Fluoreto possui a potencialidade de substituir a pesquisa convencional de metástase óssea por meio da cintilografia com ^{99m}Tc -MDP nos próximos anos (BEHESHTI *et al.*, 2009; SNM, 2011). Outro radiofármaco que pode ser empregado na avaliação de metástase óssea em pacientes com câncer de próstata é o *ProstaScint* (^{111}In -*Capromab Pendetide*). Este

é um anticorpo monoclonal contra o antígeno de membrana específico da próstata (PSMA). As células metastáticas de câncer de próstata apresentam uma marcante super-expressão do PSMA (EMONDS *et al.*, 2009; SCHROEDER *et al.*, 2009).

1.2.3 Novos estudos

Como exposto anteriormente, os atuais métodos de diagnóstico do câncer de próstata são relativamente pouco sensíveis e incapazes de identificar a doença com precocidade (VERMA *et al.*, 2011), resultando muitas vezes em diagnóstico tardio com presença de metástase, o que reduz as chances de cura dos pacientes. Além disso, o diagnóstico conclusivo do carcinoma de próstata pode ser obtido apenas pela biopsia da glândula, que é um método bastante invasivo.

Tendo em vista essas dificuldades, há uma busca por métodos capazes de realizar o diagnóstico do câncer de próstata com precocidade e precisão, visto que isso poderá contribuir para aumentar a sobrevivência dos pacientes (THAKUR *et al.*, 1997), pois quanto mais inicialmente a doença for diagnosticada, maiores serão as chances de cura dos pacientes, além de permitir um tratamento menos agressivo e mutilante. Além disso, a detecção precoce do tumor de próstata poderia reduzir os altos custos decorrentes do tratamento do câncer em estádios avançados ou da doença metastática (INCA/MS, 2002).

1.2.3.1 Linhagens celulares

Diversas linhagens de células são utilizadas para a pesquisa de novos agentes terapêuticos e/ou de diagnóstico para o câncer de próstata, sendo que a maioria desses estudos utiliza três tipos de linhagens celulares humanas principais: linhagens PC3, DU145 e LNCaP (EMONDS *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2009).

As células PC3 e DU145 foram isoladas de metástases óssea e cerebral, respectivamente. Ambas são independentes de andrógenos e estão associadas com taxas de proliferação relativamente altas (EMONDS *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2009).

Por outro lado, as células LNCaP são derivadas de metástase de linfonodo e são dependentes de andrógenos (EMONDS *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2009). Essa linhagem celular apresenta a capacidade de se desenvolver facilmente em culturas de tecidos (HOROSZEWICZ *et al.*, 1983; GRIGORIEV *et al.*, 2000). As células LNCaP são bastante utilizadas, pois mimetizam bem o câncer de próstata, visto que, em estágio inicial, apresentam-se sensíveis aos andrógenos, porém tem a capacidade de se converterem, tanto *in vivo* como *in vitro*, em células independentes de andrógenos, como acontece com a doença no homem (ULRIX *et al.*, 1999; BREVINI-GANDOLFI *et al.*, 2001; XIE *et al.*, 2007).

1.2.3.2 Modelos animais

Os modelos animais são extremamente importantes para o bom desenvolvimento de métodos de diagnóstico e de terapia, visto que os estudos em humanos apresentam sérias limitações, como custo elevado, tempo prolongado e restrições éticas, e os ensaios bioquímicos e celulares muitas vezes não refletem as condições *in vivo* (TALMADGE *et al.*, 2007).

Os dados obtidos em estudos *in vivo* podem diferir, dependendo da espécie animal utilizada e, até mesmo, do sexo da cobaia. Além disso, os modelos animais não representam exatamente a realidade no ser humano. Assim, as limitações gerais associadas ao uso de cobaias são inevitáveis. Entretanto, a escolha adequada do modelo animal utilizado e a análise criteriosa dos resultados obtidos podem fornecer informações bastante relevantes sobre um possível novo agente terapêutico ou de diagnóstico (SCHOTTELIUS e WESTER, 2009).

Assim, nos estudos sobre o câncer de próstata, bem como em toda a oncologia experimental, uma variedade de modelos animais tem sido testada, com o intuito de representar a doença de forma mais fidedigna ao que ocorre no ser humano. Esses modelos podem ser classificados de acordo com muitos aspectos (**Figura 2**).

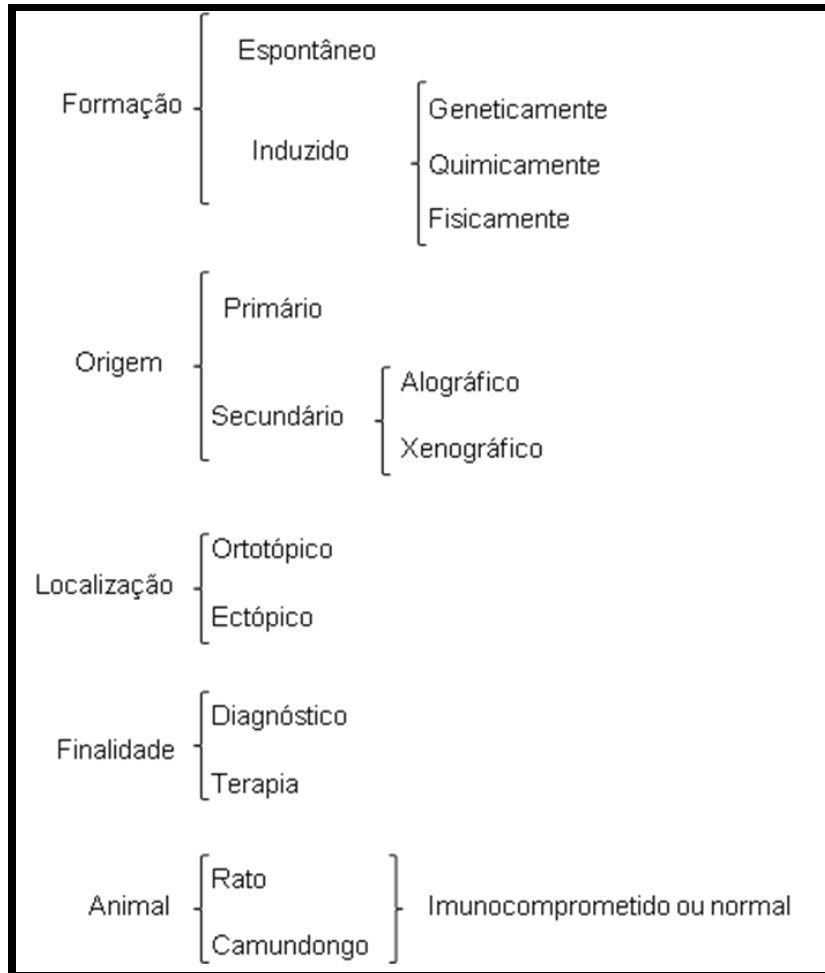


Figura 2 – Classificação dos modelos animais empregados na oncologia experimental (adaptado de NI *et al.*, 2009).

O câncer pode ser desenvolvido em um modelo animal de forma alográfica, quando o tumor induzido é proveniente da própria espécie animal utilizada, ou de forma xenográfica, quando o tumor induzido é proveniente de uma espécie diferente, como é o caso dos tumores sólidos de origem humana transplantados em animais. Neste caso, o tumor pode se desenvolver somente em animais imunocomprometidos. Camundongos nude (deficientes em células T) e camundongos imunodeficientes severos (SCID – deficientes em células T e B) são exemplos desses modelos de animais imunossuprimidos empregados para o estudo de tumores de origem humana. Esses animais demandam cuidados especiais nas condições experimentais, como gaiolas estéreis com maravalha, comida e água autoclavadas, uma vez que devem ser mantidos em ambiente livre de patógenos. No entanto, esses modelos são os mais utilizados atualmente para o desenvolvimento de tumor na oncologia experimental (PETERSON e HOGHTON, 2004; TALMADGE *et al.*, 2007; NI *et al.*, 2009).

Outro ponto relevante sobre a indução do câncer em modelo animal relaciona-se ao sítio do implante, que pode ser ortotópico ou ectópico. No primeiro caso, as células cancerosas são implantadas no órgão correspondente, ou seja, no caso do câncer de próstata, as células tumorais são inoculadas na próstata do animal. O implante ortotópico, entretanto, apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de um domínio apurado da técnica e a impossibilidade de acompanhar o desenvolvimento do tumor. Já o implante ectópico consiste na indução do tumor em um sítio diferente ao órgão correspondente, como a inoculação subcutânea. Essa modalidade, além de ser menos invasiva e mais fácil, permite o monitoramento do tamanho do tumor e o acompanhamento do seu desenvolvimento *in vivo* (EMONDS *et al.*, 2009).

1.3 Medicina nuclear

A medicina nuclear é uma especialidade médica em que se empregam radionuclídeos ou radioisótopos para fins de radioterapia ou de diagnóstico. Este é obtido por meio da imagem do corpo que, por sua vez, se deve à captação da radioatividade emitida pelo radionuclídeo utilizado (THRALL e ZIESSMAN, 2003). Dentre as técnicas empregadas para a obtenção das imagens destacam-se a tomografia por emissão de pósitron associada à tomografia computadorizada (PET/CT) e a tomografia computadorizada por emissão de fóton único (SPECT), também conhecida por cintilografia (ECKLEMAN *et al.*, 2008; FERRO-FLORES *et al.*, 2010).

Se o radioisótopo apresenta afinidade por algum órgão ou tecido, como é o caso do iodo-131 (^{131}I), que apresenta afinidade pela tireóide, não há necessidade de associá-lo a nenhuma molécula. Entretanto, se o radionuclídeo não apresenta afinidade por nenhuma parte do corpo, é preciso combiná-lo a um composto que o direcione para um alvo específico. A maioria dos radioisótopos utilizados em medicina nuclear encontra-se associada a um componente químico, sendo conhecido como radiofármaco (SAHA, 2004; THRALL e ZIESSMAN, 2003).

Os radionuclídeos e os radiofármacos são administrados, em sua maioria, por via intravenosa e se distribuem pelo organismo, alcançando os órgãos ou tecidos pelos quais possuem afinidade. Uma vez em seu alvo, os radioisótopos e os radiofármacos não interferem na fisiologia/bioquímica das células e apresentam a habilidade de seguir um determinado processo sem alterá-lo. Por esse motivo, radionuclídeos e radiofármacos são conhecidos como radiotraçadores (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

As imagens em medicina nuclear são baseadas em alterações fisiológicas e bioquímicas do órgão ou tecido em análise, sendo definidas como visualização, caracterização e medida de processos biológicos a níveis molecular e celular (THAKUR e LENTLE, 2005; MANKOFF, 2007; SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009). Portanto, o diagnóstico é obtido com bastante precocidade, detectando-se a doença em sua fase inicial. Por outro lado, as técnicas convencionais de imagem, como a ultrassonografia, a TC, a RNM e o exame de raios-x, muitas vezes necessitam de alterações anatômicas e morfológicas do órgão em estudo e, conseqüentemente, detectam a doença em estádios mais adiantados (EMONDS *et al.*, 2009; de BARROS *et al.*, 2010; FERRO-FLORES *et al.*, 2010).

Dessa forma, a medicina nuclear propicia um meio de diagnóstico não invasivo e capaz de detectar tumores em estágios iniciais, aumentando as chances de cura dos pacientes (CONTI *et al.*, 1996; THAKUR *et al.*, 1997). Na oncologia clínica, além da detecção, as imagens auxiliam na localização, na caracterização e no estadiamento das lesões nos pacientes com câncer, direcionando intervenções terapêuticas e dando respostas sobre a evolução do tratamento e do prognóstico. Além disso, devido à sua maior acurácia, essas imagens podem auxiliar na detecção da recorrência da doença. Desta forma, atualmente é difícil imaginar avanços na oncologia sem a contribuição de imagens bioquímicas e moleculares (de BARROS *et al.*, 2010; BEER, *et al.*, 2011; HIGGINS e POMPER, 2011).

Há uma grande variedade de radionuclídeos empregados em medicina nuclear, como iodo-131 (^{131}I), índio-111 (^{111}In), tálio-201 (^{201}Tl), flúor-18 (^{18}F), tecnécio-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), gálio-67 (^{67}Ga), dentre outros (SAHA, 2004).

1.3.1 Tecnécio-99m

O tecnécio-99m (^{99m}Tc) é o radionuclídeo mais utilizado em medicina nuclear, visto que apresenta propriedades físicas e químicas ideais para um radioisótopo. Sua meia-vida física é de 6,01 horas, suficiente para os processos de radiomarcagem e de obtenção da imagem, mas sem expor o paciente por tempo prolongado à radiação. É um emissor gama puro, ou seja, não emite radiação na forma de partículas, e seus fótons apresentam baixa energia, igual a 140 keV. Tais características contribuem para níveis reduzidos de exposição do paciente à radiação. Além disso, o ^{99m}Tc apresenta um custo relativamente baixo e uma elevada disponibilidade a partir do gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m (JURISSON *et al.*, 1993; JONES, 1995; MARQUES *et al.*, 2001; YANG *et al.*, 2003; de BARROS *et al.*, 2010).

O gerador de Molibdênio-99/Tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) consiste em uma coluna de vidro contendo no seu interior alumina, onde o ^{99}Mo , denominado radionuclídeo pai, encontra-se fortemente adsorvido. Ao se desintegrar, emitindo uma partícula β , o ^{99}Mo sofre transmutação e dá origem ao ^{99m}Tc , radionuclídeo filho. Este não possui afinidade pela resina de alumina e seus átomos são eluídos do gerador com solução de cloreto de sódio 0,9%, na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$). Nessa forma, os átomos de ^{99m}Tc encontram-se com o estado de oxidação +7 (DEWANJEE, 1990; SAHA, 2004).

O tecnécio é um metal de transição da família VII B e possui número atômico igual a 43, podendo existir em oito estados de oxidação (-1 a +7). A estabilidade desses estados de oxidação depende do tipo de ligação e do ambiente químico. Os estados +4 e +7 são os mais estáveis e são representados em óxidos, sulfetos, haletos e pertecnetatos (DEWANJEE, 1990; SAHA, 2004).

Como descrito anteriormente, o ^{99m}Tc é obtido do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ na forma de íon pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e apresenta estado de oxidação igual a +7. Nesse estado de oxidação, o ^{99m}Tc é uma espécie não reativa e incapaz de se ligar a qualquer composto. Já o ^{99m}Tc reduzido é uma espécie quimicamente reativa e combina-se com uma grande variedade de grupos doadores de elétrons, como aminas, amidas,

tióis e fosfatos, formando uma ligação covalente coordenada. Portanto, é necessário reduzir o estado de oxidação do ^{99m}Tc . Para tanto, são empregados agentes redutores no processo de radiomarcagem, sendo o cloreto de estanho II dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o mais comumente usado na preparação de compostos ligados ao ^{99m}Tc (NOWOTNIK, 1990; SAHA, 2004).

1.3.2 Marcadores específicos

Em oncologia, a medicina nuclear atua em duas direções, os procedimentos denominados *Catch-all* e os procedimentos *Catch-one* (BRITTON e GRANOWSKA, 2002).

Nos procedimentos *Catch-all* há elevada sensibilidade, mas a técnica não é específica (BRITTON e GRANOWSKA, 2002). Como exemplo pode-se citar a cintilografia óssea, empregando como radiofármaco o ^{99m}Tc -MDP. Esse radiotraçador acumula-se em qualquer parte do tecido ósseo onde haja alguma alteração, como metástase, inflamação, granuloma e infecção. A cintilografia óssea é altamente sensível, mas sua especificidade depende do contexto clínico. Por exemplo, o acúmulo do ^{99m}Tc -MDP em alguma região do osso de um paciente com diagnóstico confirmado de câncer de próstata e que se queixa de dor óssea é altamente sugestivo de metástase nesse tecido (THRALL e ZIESSMAN, 2003).

Já nos procedimentos *Catch-one*, o radiotraçador é elaborado de forma específica para o processo da doença, sem perder em sensibilidade (BRITTON e GRANOWSKA, 2002). Nesse caso, para a marcação de tumores, muitas alternativas podem ser utilizadas. O flúor-18-desoxiglicose (^{18}FDG), que é um marcador do metabolismo da glicose, e o flúor-18-L-timidina, que é um marcador da síntese de DNA, podem ser empregados, visto que ambos os processos encontram-se aumentados nas células tumorais. Há ainda marcadores da progressão tumoral, que normalmente não ocorrem nos tecidos normais, como os fatores envolvidos na angiogênese e na hipóxia (COOK, 2003). Além desses marcadores, podem ser utilizados pequenas moléculas, peptídeos, proteínas e anticorpos radiomarcados, visto que, como discutido anteriormente, há uma exacerbação na expressão de receptores para esses compostos nas células cancerosas, quando comparada com

a expressão fisiológica nas células normais (EMONDS *et al.*, 2009; SCHOTTELIUS e WESTER, 2009).

1.3.3 Peptídeos

Dentre os agentes de imagem tumoral que se baseiam na super-expressão de receptores na superfície das células cancerosas, os peptídeos apresentam maior aceitação, visto que possuem melhores características, especialmente quando comparados aos anticorpos. Estes são substâncias de alto peso molecular, o que dificulta sua perfusão pelo tecido tumoral, apresentando elevados níveis na circulação sanguínea e prejudicando a visualização do tumor. Além disso, muitos anticorpos tem o potencial de produzir reações imunológicas. Por outro lado, os peptídeos possuem baixo peso molecular (até 50 aminoácidos), o que proporciona uma penetração facilitada no tecido tumoral e uma depuração sanguínea mais rápida. Outra característica importante dos peptídeos é a baixa antigenicidade. Por fim, os peptídeos apresentam estabilidade metabólica e tolerância a modificações em sua estrutura, resultantes do processo de radiomarcção (WEINER e THAKUR, 2002; SCHOTTELIUS e WESTER, 2009; HAUBNER e DECRISTOFORO, 2011).

Nos últimos anos, muitos receptores para peptídeos têm sido identificados em maior proporção em tecidos tumorais (WEINER e THAKUR, 2002). Assim, peptídeos radiomarcados podem fornecer compostos que apresentem aplicações para a terapia e/ou o diagnóstico de diversos tumores (DURKAN *et al.*, 2007). Alguns peptídeos cujos receptores encontram-se super-expressos em tumores estão representados a seguir (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Principais peptídeos, suas principais funções e tecidos tumorais com maior expressão de receptores para esses peptídeos (adaptado de WEINER e THAKUR, 2002).

| PEPTÍDEO | FUNÇÕES | TUMORES COM MAIOR EXPRESSÃO DE RECEPTORES |
|-----------|--------------------------------------|---|
| Bombesina | Contração do trato gastrointestinal. | Glioblastoma e tumores de próstata, mama, estômago, cólon e pâncreas. |

/continua

Tabela 2 (Conclusão)

| | | |
|-------------------------------|---|--|
| Colecistocinina B | Contração da vesícula biliar e secreção de ácido. | Tumores gastrointestinais, ovarianos e tireoidianos. |
| Somatostatina | Inibição da liberação de fatores de crescimento. | Tumores neuroendócrinos. |
| Peptídeo Intestinal Vasoativo | Vasodilatação e promoção do crescimento. | Tumores de pulmão, pâncreas, próstata, bexiga e ovário. |
| Substância P | Vasodilatação e neuro-modulação. | Tumores gliais, tireoidianos e de mama. |
| Neurotensina | Regulação de funções de crescimento. | Meningiomas e tumores de próstata, pâncreas, pulmão e cólon. |

No caso específico do câncer de próstata, as células tumorais apresentam expressão aumentada de receptores de bombesina, de peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e de neurotensina, como observado na tabela 2. Esses peptídeos e seus análogos estão sendo exaustivamente estudados com o intuito de se obter novos radiofármacos capazes de promover um diagnóstico seguro e precoce da doença (THAKUR *et al.*, 1997; GARRISON *et al.*, 2007; KOTHARI *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007; LANE *et al.*, 2008; EMONDS *et al.*, 2009).

Desde o início dos estudos de radiotraçadores peptídicos para a visualização de tumores, no final da década de 1980, poucos passaram dos estudos pré-clínicos para os ensaios clínicos. Há apenas um radiopeptídeo disponível na clínica, o ¹¹¹In-Octreoscan. Este é um análogo da somatostatina marcado com ¹¹¹In aprovado pelo FDA para a visualização de tumores neuroendócrinos (SCHOTTELIUS e WESTER, 2009).

1.3.3.1 Bombesina

A bombesina (BBN), um neuropeptídeo formado por 14 aminoácidos, foi isolada da pele do sapo *Bombina bombina* e é análoga ao GRP (**Figura 3**). Suas atividades farmacológicas incluem a estimulação da liberação de hormônios, como gastrina e

somatostatina, e da contração do músculo liso do estômago e do intestino. Além disso, os receptores de BBN, expressos em células cancerosas, apresentam efeitos mitogênicos e estimulam a proliferação tumoral, quando ativados por seu agonista (LANGER e BECK-SICKINGER, 2001; FERRO-FLORES *et al.*, 2010; MANSI *et al.*, 2011).

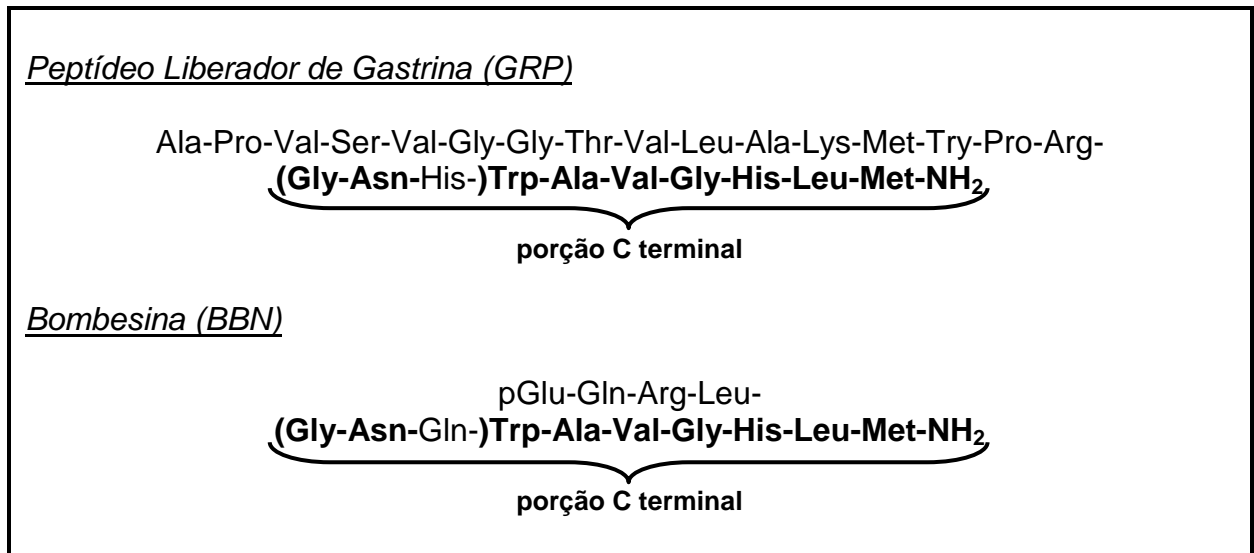


Figura 3 - Sequência de aminoácidos do peptídeo liberador de gastrina e da bombesina (adaptado de SCHROEDER *et al.*, 2009).

Há quatro subtipos de receptores de BBN, o receptor de neuromedina B (BB1), o receptor do peptídeo liberador de gastrina (BB2 ou GRPr), o receptor órfão (BB3) e o receptor anfíbio (BB4). Todos são receptores acoplados a proteína G, sendo os três primeiros encontrados em mamíferos e o BB4 encontrado apenas em anfíbios (REUBI *et al.*, 2002; SCHROEDER, *et al.*, 2010). O câncer de próstata, assim como o de pulmão, cólon, pâncreas e mama, apresenta expressão exacerbada desses receptores, especialmente do subtipo BB2 ou GRPr (FLEISCHMANN *et al.*, 2007; de BARROS *et al.*, 2011; LEARS *et al.*, 2011). No caso específico da próstata, há baixa expressão desses receptores no tecido sadio e na hiperplasia benigna prostática (SCHROEDER *et al.*, 2011). Assim, os GRPr's são potenciais alvos para o diagnóstico e a terapia do câncer de próstata.

Alguns estudos têm utilizado a BBN radiomarcada com o intuito de identificar tumores, empregando a sequência completa do peptídeo ou uma sequência truncada, contendo os oito aminoácidos da porção C terminal (BBN₍₇₋₁₄₎), uma vez

que essa sequência de aminoácidos é necessária para a manutenção da afinidade pelo sítio de ligação no receptor. Além disso, a retirada dos seis aminoácidos da porção N terminal da BBN aumenta sua meia-vida biológica (SCHROEDER *et al.*, 2009; de BARROS *et al.*, 2010). Como resultado, há uma elevação no tempo de circulação do peptídeo, favorecendo seu acúmulo no sítio tumoral. Também é na porção N terminal que um agente quelante para o radionuclídeo desejado é acoplado (FAINTUCH *et al.*, 2008; ACCARDO *et al.*, 2010; de BARROS *et al.*, 2010).

Estudos com análogos de BBN radiomarcados mostraram que os agonistas foram internalizados pelas células que expressam os receptores para esse peptídeo. Já os antagonistas não apresentaram essa característica. Assim, os agonistas são mais adequados para o uso como agentes de diagnóstico (BREEMAN *et al.*, 1999; FAINTUCH *et al.*, 2008; MANSI *et al.*, 2011).

Atualmente, nenhum análogo de BBN radiomarcado está disponível na clínica. Todos se encontram nos estágios pré-clínico e clínico de seu desenvolvimento (SCHOTTELIUS e WESTER, 2009). No caso específico do câncer de próstata, os análogos de BBN têm apresentado bons resultados nos estudos *in vitro* e *in vivo* (SCHOTTELIUS e WESTER, 2009; SANCHO *et al.*, 2011). Nos ensaios clínicos, os resultados também são promissores. Entretanto, o número de estudos é pequeno, assim como o número de pacientes investigados. Assim, ensaios clínicos mais abrangentes são necessários para avaliar a real potencialidade dos análogos de BBN radiomarcados em detectar o tumor de próstata em seres humanos (SANCHO *et al.*, 2011).

1.3.3.2 Radiomarcção de peptídeos

Os dois radionuclídeos mais utilizados para a marcação de peptídeos são o ^{99m}Tc e o ^{111}In . Este apresenta meia-vida física de 67 horas e, como é produzido em ciclotron, possui baixa disponibilidade e alto custo. Por outro lado, como descrito anteriormente, o ^{99m}Tc apresenta características ideais para um radioisótopo, como tempo de meia-vida de 6,01 horas, emissão gama de baixa energia (140 keV), custo relativamente baixo e elevada disponibilidade a partir do gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$. Portanto, os peptídeos radiomarcados com esse radionuclídeo são considerados

ideais para a realização de diagnóstico por meio de imagens cintilográficas. As características dos peptídeos, como rápida depuração sanguínea e facilitada perfusão pelos tecidos, aliadas as qualidades do ^{99m}Tc propiciam adequada relação alvo/não alvo para o tecido em análise, resultando em imagens de boa qualidade (LANGER e BECK-SICKINGER, 2001).

A radiomarcção de peptídeos pode ser realizada de três maneiras. A primeira delas é a marcação direta, em que o isótopo radioativo liga-se diretamente ao peptídeo, sendo uma técnica simples e de fácil realização. Porém, esse processo é limitado aos peptídeos que apresentam ligações dissulfeto (S-S), como a somatostatina. As outras duas maneiras fazem uso de agentes quelantes, capazes de complexar com o radioisótopo desejado. O agente quelante pode ser acoplado ao peptídeo antes ou após sua complexação com o radionuclídeo. O acoplamento do quelante com o peptídeo antes da radiomarcção é a técnica mais empregada, visto que após a formação e purificação do composto final (peptídeo + agente quelante) procede-se a marcação com o radioisótopo de maneira mais simples e rápida (LANGER e BECK-SICKINGER, 2001).

Os agentes quelantes para o ^{99m}Tc exibem baixa taxa de dissociação do radionuclídeo e propiciam ao seu átomo um estado de oxidação desejado. Uma grande variedade de quelantes tem sido desenvolvida para a radiomarcção com ^{99m}Tc , como os triaminotiois (N_3S), os diaminoditiois (N_2S_2), o hexametilpropilenoaminoxima (HMPAO) e o ácido hidrazinonicotínico (HYNIC), representados a seguir (**Figura 4**) (BLOK *et al.*, 2004; GANDOMKAR *et al.*, 2007; de BARROS, 2010).

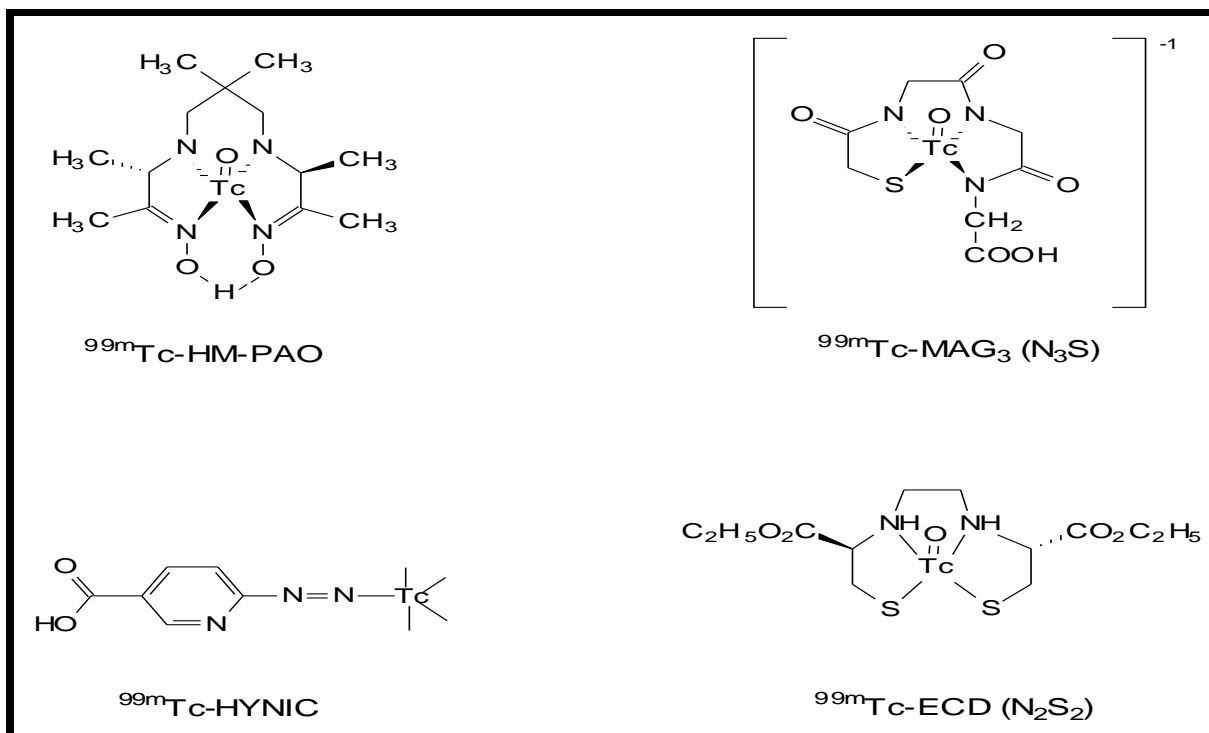


Figura 4 - Estrutura dos agentes quelantes para o ^{99m}Tc (JURISSON *et al.*, 1993).

O HYNIC complexa-se com o ^{99m}Tc de maneira rápida e com bons rendimentos, podendo ser acoplado a diversos tipos de moléculas, como proteínas, peptídeos e glicoproteínas (LAVERMAN *et al.*, 1999; WELLING *et al.*, 2004; BANERJEE *et al.*, 2005; KING *et al.*, 2007). Devido ao seu caráter monodentado, a complexação do HYNIC com o ^{99m}Tc é realizada na presença de co-ligantes, como a tricina e o ácido etilenodiaminodiacético (EDDA), que estabilizam o metal, formando uma ligação estável (GANDOMKAR *et al.*, 2007; MIRANDA-OLVERA *et al.*, 2007; de BARROS *et al.*, 2010). A presença de ácido carboxílico, em uma de suas extremidades, faz do HYNIC um agente quelante apto a reações de acoplamento com aminas e, portanto, capaz de associar-se a extremidade nitrogenada de peptídeos, formando o complexo peptídeo-agente quelante (GREENLAND *et al.*, 2003; SURFRAZ *et al.*, 2007).

Para a radiomarcagem da BBN, o HYNIC é um bom agente quelante. A reação de seu grupo ácido carboxílico com a extremidade nitrogenada da BBN não prejudica a ligação do peptídeo aos seus receptores. Esta ocorre pela extremidade C-terminal. Ademais, pode-se adicionar um espaçador, entre o HYNIC e a BBN (sequência completa ou truncada), para não comprometer a interação do peptídeo com seu receptor. Para tanto, pode ser utilizado o aminoácido beta-alanina (β -Ala). A

marcação do complexo HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ com átomos de ^{99m}Tc , na presença dos co-ligantes tricina e EDDA, encontra-se representada a seguir (**Figura 5**).

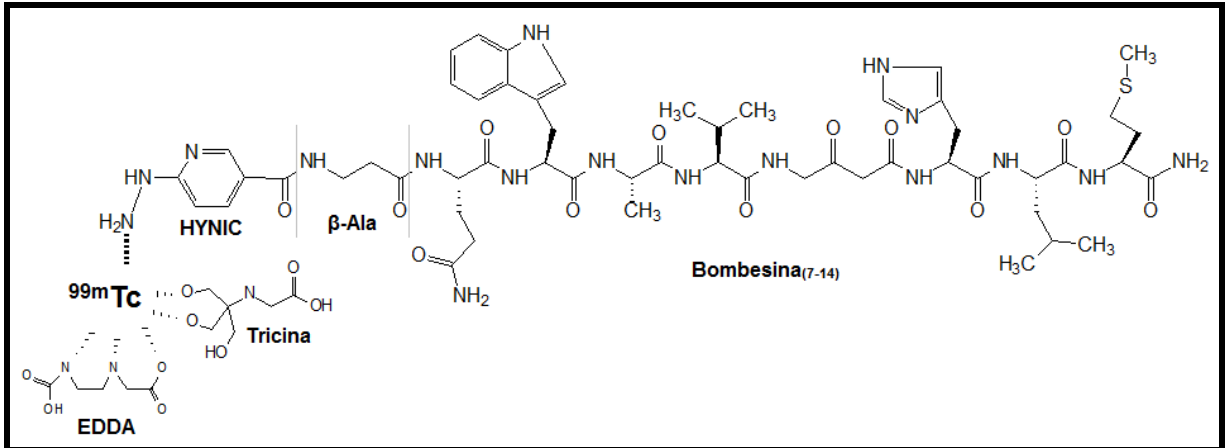


Figura 5 – Complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ e seus coligantes (adaptado de de BARROS *et al.*, 2010).

Assim, a administração do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ poderá fornecer informações sobre a presença de receptores para a BBN no organismo.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer é uma doença em que células se dividem descontroladamente e invadem tecidos e órgãos, originando o tumor primário. Essas células podem espalhar-se para outras partes do organismo, causando as metástases. Estas são a principal causa de morte por câncer.

Dentre os diversos tipos de tumores, o carcinoma de próstata tem acentuada relevância, pois é um dos mais prevalentes entre os homens no mundo, sendo inferior apenas ao tumor pulmonar. No Brasil, o carcinoma de próstata também é o 2º tipo de câncer mais frequente na população masculina, sendo o primeiro o câncer de pele não melanoma. Atualmente, o diagnóstico do câncer de próstata é feito por meio do toque retal e da dosagem do PSA. Entretanto, o valor preditivo positivo do toque retal e da dosagem do PSA é relativamente baixo, detectando o câncer em estágio mais avançado, muitas vezes com metástases já estabelecidas, reduzindo as chances de cura dos pacientes. Tendo em vista essas dificuldades, novos métodos de diagnóstico estão sendo investigados com o propósito de identificar de maneira precoce o tumor de próstata.

Nesse contexto, peptídeos radiomarcados têm sido bastante estudados como possíveis agentes de imagem tumoral, visto que há uma super-expressão de receptores para esses compostos nas células cancerosas, quando comparada com a expressão nas células sadias. Dentre esses marcadores tumorais, destaca-se o peptídeo BBN para a detecção do câncer de próstata, já que ocorre uma super-expressão de receptores de BBN na superfície das células tumorais de próstata, havendo baixa expressão desses receptores no tecido sadio e na hiperplasia benigna prostática.

Com base no exposto, torna-se razoável pensar na utilização do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ para a identificação do câncer de próstata por meio de imagens de bases moleculares que, devido as suas características, poderiam contribuir para o diagnóstico precoce dessa doença.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a potencialidade do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-bombesina₍₇₋₁₄₎ na identificação de tumor de próstata em modelo experimental.

3.2 Objetivos específicos

- Marcar o complexo peptídico HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ com átomos de ^{99m}Tc ;
- Avaliar a afinidade *in vitro* do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP;
- Desenvolver um modelo experimental de tumor de próstata em camundongos machos BALB/c nude, utilizando as células LNCaP, e avaliar o seu desenvolvimento por meio de análise histopatológica;
- Avaliar a biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ após sua administração intravenosa em camundongos machos BALB/c normais (sadios) e nude (com tumor de próstata em diferentes estágios de desenvolvimento);
- Obter imagens cintilográficas após a administração intravenosa do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ em camundongos machos BALB/c normais (sadios) e nude (com tumor de próstata em diferentes estágios de desenvolvimento).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

O complexo peptídico HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foi adquirido da *GL Biochem* (China). O ^{99m}Tc foi obtido de um gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ adquirido do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN (Brasil). Os demais reagentes para a radiomarcagem foram adquiridos da *Sigma-Aldrich Chemical Company* (EUA).

As células LNCaP, o meio de cultura RPMI-1640 e o soro fetal bovino foram adquiridos da *American Type Culture Collection - ATCC* (EUA). A tripsina foi adquirida da *Invitrogen* (Brasil). O matrigel foi adquirido da *Becton Dickinson Company - BD* (Brasil).

Os camundongos machos BALB/c nude e normais foram adquiridos do biotério da Fundação de Apoio e Fomento à Inovação Tecnológica, à Pesquisa e ao Ensino do IPEN (Brasil). Após aquisição, os animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (LTF/FAFAR/UFMG). Os camundongos nude, utilizados para o desenvolvimento do modelo experimental de tumor de próstata (item 4.5), foram mantidos em gaiolas com maravalha, água e ração (sem restrição) autoclavadas, em estantes com ar filtrado, controle de temperatura e ciclo claro-escuro (12:12). Os camundongos normais, utilizados como controle sadio, foram mantidos em gaiolas com maravalha, água e ração (sem restrição) comuns, em estantes comuns. Todos os experimentos realizados em animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG), protocolo nº 34/2010 (**Anexo A**).

4.2 Cultivo e manutenção das células LNCaP

Para o cultivo e a manutenção das células LNCaP foi utilizado o protocolo elaborado pela ATCC (ATCC, 2004).

As células humanas de tumor de próstata da linhagem LNCaP foram mantidas em garrafas de cultivo celular contendo meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e com 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram incubadas em estufa à 37°C sob atmosfera de 5% de CO₂.

Para a realização dos experimentos, retirou-se o meio de cultura da garrafa contendo as células LNCaP e adicionou-se 2 mL de tripsina na mesma, colocando-a na estufa (37°C e atmosfera de 5% de CO₂) por 5 minutos, para promover o desligamento das células de seu fundo. Em seguida, para inativar a tripsina, acrescentou-se 4 mL do meio de cultura suplementado na garrafa de cultivo. Todo seu conteúdo foi transferido para um tubo falcon de 15 mL. Posteriormente, o conteúdo do tubo falcon foi submetido ao processo de centrifugação por 5 minutos, sob 1200 rpm. Logo após, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o pellet de células em 500 µL do meio de cultura suplementado. Por fim, foi determinada a concentração celular por meio da contagem do número de células nos quatro quadrantes da câmara de Neubauer em microscópio invertido, utilizando-se a solução de azul de tripan 0,4% como corante (**Figura 6**).

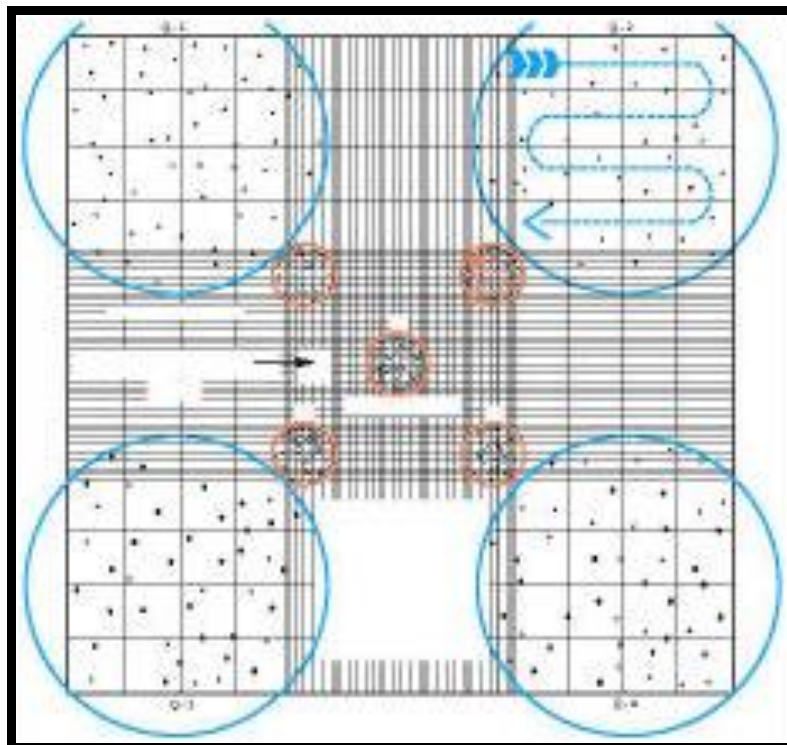


Figura 6 - Esquema da contagem do número de células nos 4 quadrantes (círculos maiores) da câmara de Neubauer.

As células mortas se apresentavam em azul, uma vez que o azul de tripan entra no citoplasma, em função do comprometimento da membrana. Estas não foram contadas. Já as células viáveis se apresentavam apenas com a membrana colorida em azul. A concentração celular foi determinada por meio da fórmula representada a seguir:

$$N^{\circ} \text{ de células / mL} = (\text{contagem total} / 4) \times \text{fator de diluição} \times 10^4.$$

Após a determinação da concentração celular, a suspensão de células foi diluída com meio de cultura suplementado de acordo com a potência celular necessária para o experimento em questão: teste de afinidade do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP (item 4.4) ou desenvolvimento do modelo experimental de tumor de próstata (item 4.5).

4.3 Marcação do complexo peptídico HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ com átomos de ^{99m}Tc

Para a radiomarcção do complexo peptídico HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ e posterior determinação do rendimento de radiomarcção foram utilizadas metodologias propostas por FAINTUCH *et al.*, 2008.

4.3.1 Radiomarcção para o teste de afinidade do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP

Em um frasco foram adicionados 5 mg de EDDA e 20 mg de tricina, solubilizando-os em 0,5 mL de salina. Em seguida, foram adicionados 5 μ g do complexo peptídico HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ e 10 μ L de uma solução de SnCl_2 em HCl 0,25 N (1 mg/mL). Posteriormente, o pH foi ajustado para 7-8, utilizando-se uma solução aquosa de NaOH 0,1 N (o volume acrescentado foi devidamente anotado). Então, o frasco foi lacrado e foi feito vácuo no mesmo. A seguir, adicionou-se 0,37 MBq de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ em salina, q.s.p 1,0 mL. A mistura reagente foi mantida em banho-maria fervente (100°C) por 15 minutos e resfriada a temperatura ambiente. Por fim, adicionou-se 428 μ L de salina no frasco, obtendo-se, ao final do processo de

radiomarcção, a concentração de 0,3 nmol de ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ em 0,1 mL de solução.

4.3.2 Radiomarcção para os estudos de biodistribuição e imagem em animais

O protocolo utilizado para a marcação do complexo peptídico HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ com ^{99m}Tc , para os estudos em animais, foi similar ao protocolo descrito no item 4.3.1. As diferenças foram:

- Utilizou-se 10 μg do complexo peptídico HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎;
- A atividade de $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ adicionada foi de 74 MBq;
- Não houve a etapa final de diluição do complexo peptídico radiomarcado com 428 μL de salina.

4.3.3 Determinação do rendimento de radiomarcção

O rendimento de radiomarcção, em ambos os protocolos, foi determinado por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se como fase estacionária a sílica-gel e como fases móveis a metiletilcetona e a acetonitrila:água (1:1), para a determinação do percentual de tecnécio livre ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) e de tecnécio hidrolisado ($^{99m}\text{TcO}_2$), respectivamente. O rendimento de radiomarcção foi determinado por meio da fórmula representada a seguir:

$$\% \text{ } ^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)} = 100 - (\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_4^- + \% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_2).$$

4.4 Teste de afinidade *in vitro* do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP

Para a avaliação da afinidade do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP foi utilizado o método descrito por SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009, com algumas modificações.

Em *eppendorfs* foram colocadas 2×10^6 células LNCaP e acrescentado meio de cultura suplementado (q.s.p 0,9 mL). Em seguida, foi adicionado 0,1 mL da solução de ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ (0,3 nmol), descrita no item 4.3.1. Os

ependorfs foram incubados em banho-maria à 37°C sob leve agitação por 1 hora (n=3). O estudo também foi realizado para o tempo de incubação de 4 horas (n=3). Após o período de incubação, os conteúdos dos *ependorfs* foram submetidos ao processo de centrifugação por 5 minutos, sob 2000 g. A seguir, sobrenadantes e *pellets* foram separados e tiveram suas radioatividades determinadas em um contador de radiação gama (**Figura 7**).



Figura 7 - Contador de radiação gama – Wizard (Turku/Finlândia).

A radioatividade encontrada no *pellet* representava os peptídeos que se ligaram às células LNCaP, permanecendo adsorvidos à superfície celular ou sofrendo o processo de internalização. Assim, o percentual de ligação do complexo peptídico $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ nas células LNCaP foi calculado por meio da fórmula representada a seguir:

$$\% \text{ Ligação} = \frac{\text{cpm } \textit{pellet}}{\text{cpm } \textit{pellet} + \text{cpm sobrenadante}} \times 100 .$$

Em seguida, os *pellets* foram ressuspensos em 0,5 mL de tampão ácido (0,2 M de ácido acético em 0,5 M de NaCl – pH 2,8), para a remoção dos peptídeos adsorvidos na superfície celular. Os conteúdos dos *ependorfs* foram novamente submetidos ao processo de centrifugação por 5 minutos, sob 2000 g. A seguir, sobrenadantes e *pellets* foram separados e tiveram suas radioatividades determinadas em um contador de radiação gama (**Figura 7**). Nessa etapa, a radioatividade encontrada no *pellet* representava os peptídeos que se ligaram às células LNCaP e sofreram o processo de internalização. Assim, o percentual de internalização do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nas células LNCaP, dentre os peptídeos que se ligaram às células, foi calculado por meio da fórmula representada a seguir:

$$\% \text{ Internalização} = \frac{\text{cpm } \textit{pellet}}{\text{cpm } \textit{pellet} + \text{cpm sobrenadante}} \times 100 .$$

A afinidade específica do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP também foi determinada para cada um dos tempos de incubação, 1 e 4 horas (n=3). Para tanto, a única alteração no protocolo do teste de afinidade foi a adição de 43 nmol do HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, 15 minutos antes da adição de 0,3 nmol do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. Ou seja, foi utilizada uma quantidade de peptídeo frio (não radiomarcado) cerca de 140 vezes maior que a quantidade de peptídeo radiomarcado, para bloquear a ligação e a internalização do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nas células LNCaP. O restante do procedimento foi conduzido de forma idêntica à descrita anteriormente.

4.5 Modelo experimental de tumor de próstata

O modelo experimental de tumor de próstata foi desenvolvido em camundongos machos BALB/c nude (item 4.1). O foco tumoral foi induzido, com algumas modificações, conforme descrito por: MIGITA *et al.*, 2009; SCHNEIDER *et al.*, 2009; TRAUGER *et al.*, 2009.

Após uma semana de adaptação dos animais às condições do biotério do LTF/FAFAR/UFMG, descritas no item 4.1, o tumor de próstata foi induzido no flanco

superior direito dos camundongos nude por meio da injeção subcutânea de células LNCaP (5×10^6) ressuspendidas em 150 μ L de Matrigel:meio RPMI-1640 (1:1). Após a inoculação das células tumorais, aguardou-se o desenvolvimento do tumor durante 15, 20 e 25 dias. Ao final do período de crescimento tumoral, cada grupo de animais foi encaminhado para os estudos de imagem e biodistribuição.

Após os estudos de biodistribuição, os fragmentos de tecido tumoral foram encaminhados para análise histopatológica no Laboratório de Patologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), sob a supervisão do Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali. Os tecidos foram fixados em formol a 10% tamponado e processados para inclusão em parafina. Secções histológicas de 4 μ m foram coradas pela hematoxilina-eosina (H&E) para avaliação histopatológica. As imagens dos cortes histológicos dos fragmentos de tecido tumoral foram capturadas por uma câmera digital *Spot Insight Color* adaptada a um microscópio *Olympus* (BX-40). Para análise das imagens foram utilizados o *SPOT[®] software* (versão 3.4.5) e *Corel DRAW[®]* (versão 7.468).

4.6 Estudos de biodistribuição

Os estudos de biodistribuição foram conduzidos de acordo com DINIZ *et al.*, 2008, com algumas modificações.

Após o período de desenvolvimento tumoral (15, 20 e 25 dias), foram administrados, pela via intravenosa (veia caudal), 7,4 MBq de ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ a cada animal. Nos tempos de 1 e 4 horas após a injeção do radiofármaco (n=5 para cada tempo), os camundongos foram anestesiados com uma solução de xilazina (15 mg/Kg) e cetamina (80 mg/Kg) e, em seguida, submetidos à eutanásia. Órgãos e tecidos, como baço, coração, estômago, fígado, intestino delgado, pâncreas, pulmões, rins, sangue, tireóide, tumor e músculo contralateral, foram retirados, pesados e tiveram sua radioatividade determinada em um contador de radiação gama (**Figura 7**). Utilizou-se padrões de dose para corrigir o decaimento físico do ^{99m}Tc e para calcular o percentual da dose injetada (%DI) e o percentual da dose injetada por grama de tecido (%DI/g) para cada órgão. Esses padrões continham a mesma dose injetada nos camundongos e tiveram sua radioatividade determinada

simultaneamente com a dos órgãos e tecidos dos animais. O %DI e o %DI/g para cada órgão foram calculados por meio das fórmulas representadas a seguir:

$$\%DI = \frac{\text{cpm órgão}}{\text{cpm padrão}} \times 100$$

$$\%DI/g = \frac{\text{cpm órgão/massa órgão}}{\text{cpm padrão}} \times 100$$

O mesmo procedimento foi realizado em camundongos machos BALB/c normais, sem o foco tumoral (sadios), para controle (n=5 para cada tempo, 1 e 4 horas).

4.7 Imagens cintilográficas

A obtenção das imagens cintilográficas e a avaliação quantitativa das mesmas foram realizadas de acordo com DINIZ *et al.*, 2008, com algumas modificações.

Após o período de desenvolvimento tumoral (15, 20 e 25 dias), foram administrados, pela via intravenosa (veia caudal), 7,4 MBq de ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ a cada animal. Nos tempos de 1 e 4 horas após a injeção do radiofármaco (n=3 para cada tempo), os camundongos foram anestesiados com uma solução de xilazina (15 mg/Kg) e cetamina (80 mg/Kg) e, em seguida, colocados em posição de decúbito ventral sob uma câmara de cintilação à raios gama (**Figura 8**).



Figura 8 - Câmara de cintilação a raios gama - Nuclide™ TH 22 (Budapeste/Hungria).

O mesmo procedimento foi realizado em camundongos machos BALB/c normais, sem o foco tumoral (sadios), para controle (n=3 para cada tempo, 1 e 4 horas).

Uma janela de 20% de simetria foi utilizada para um pico de energia de 140 keV e um colimador de baixa energia do tipo *Low Energy High Resolution* (LEHR) foi utilizado para direcionar os raios. As imagens foram obtidas durante 10 minutos e armazenadas em uma matriz 256 x 256 pixels.

Para avaliar de forma quantitativa a captação do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelo foco tumoral, as imagens cintilográficas foram analisadas por meio da determinação da relação alvo/não-alvo, conforme ilustrado a seguir (**Figura 9**).

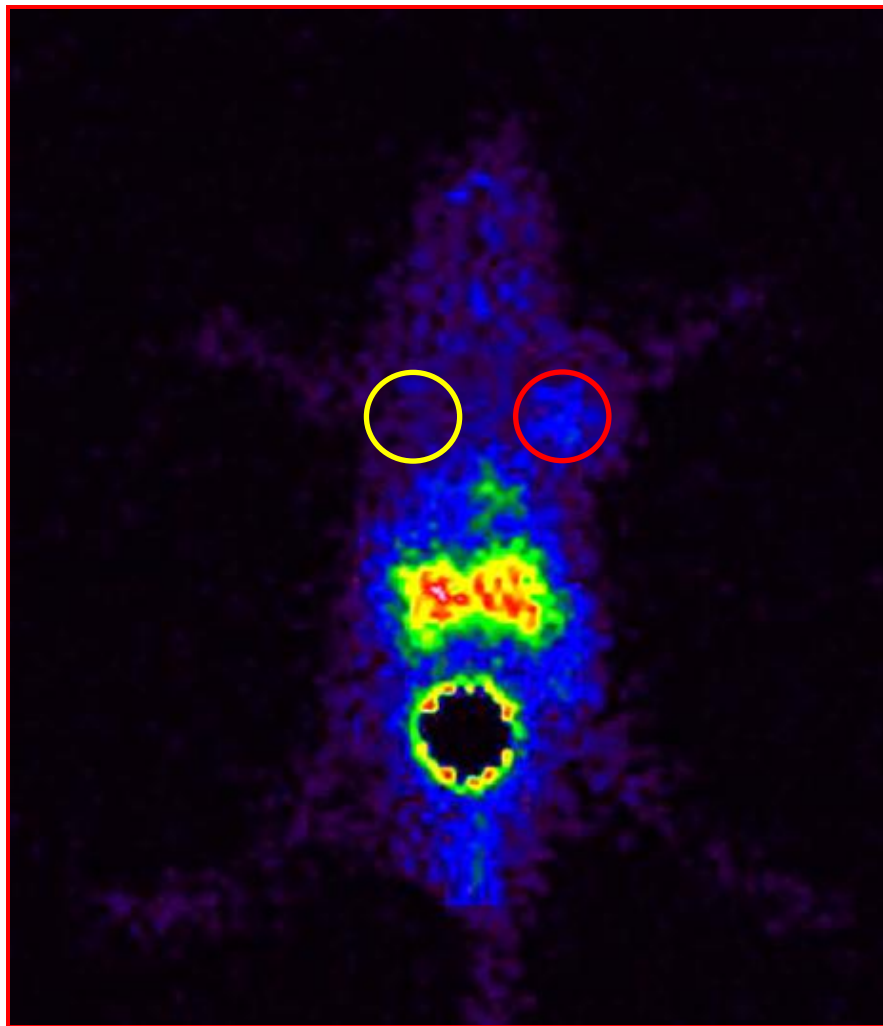


Figura 9 – Relação alvo/não-alvo obtida por meio da imagem cintilográfica.

Inicialmente, foi feito um delineamento em torno da área alvo (tumor – círculo à direita) e da área não-alvo (músculo contralateral – círculo à esquerda). Em seguida, obteve-se as contagens de cada uma das áreas delineadas e calculou-se a relação alvo/não-alvo por meio da fórmula representada a seguir:

$$\text{Relação alvo/não-alvo} = \frac{\text{contagem na área alvo}}{\text{contagem na área não-alvo}} .$$

4.8 Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi feito com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences - SPSS* (versão 13.0). Inicialmente foi aplicado a cada conjunto de dados o teste de normalidade *Shapiro-Wilk* para verificar se os dados apresentavam ou não distribuição normal.

As variáveis contínuas de distribuição normal foram apresentadas como ‘média ± desvio padrão’. A comparação das médias entre três grupos foi feita pelo teste *ANOVA*. Quando foi encontrada diferença significativa no *ANOVA*, utilizou-se o teste de comparação múltipla dois a dois *Least Square Difference (LSD)*. A comparação dos resultados entre dois grupos foi feita pelo teste *t-Student*.

As variáveis contínuas de distribuição não-normal foram apresentadas como ‘mediana ± intervalo interquartil (3° - 1°)’. A comparação das medianas entre três grupos foi feita pelo teste de *Kruskal-Wallis*. Quando foi encontrada diferença significativa no *Kruskal-Wallis*, utilizou-se o teste de comparação múltipla dois a dois *Mann-Whitney*, com a correção de *Bonferroni*. A comparação dos resultados entre dois grupos foi feita pelo teste de *Mann-Whitney*.

Foram consideradas como diferenças significativas valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Marcação do complexo peptídico HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ com átomos de ^{99m}Tc

A marcação do HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ com ^{99m}Tc apresentou rendimento adequado em ambos os protocolos utilizados. No protocolo do teste de afinidade (item 4.3.1), o rendimento de radiomarcagem foi de 93,12±2,36%. Já a radiomarcagem de acordo com o protocolo dos estudos em animais (item 4.3.2) apresentou um rendimento de 96,38±2,36%. Em ambos os casos, o rendimento de radiomarcagem foi superior a 90%, o que significa níveis aceitáveis das impurezas radioquímicas, ^{99m}TcO₄⁻ e ^{99m}TcO₂, conforme descrito pela Farmacopeia Americana (USP, 2011). Além disso, esses resultados estão em conformidade com valores previamente relatados por pesquisadores do nosso grupo (de BARROS *et al.*, 2010).

5.2 Teste de afinidade *in vitro* do ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP

Os dados obtidos no teste de afinidade do ^{99m}Tc-HYNIC-βAla-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP mostraram que a fração de peptídeos que se ligaram às células foi de 2,08±0,30% e 2,44±0,18%, para os tempos de 1 e 4 horas de incubação, respectivamente. Dentre os peptídeos que se ligaram às células, a fração que se internalizou foi de 25,64±3,14% e 25,27±2,05%, para os tempos de 1 e 4 horas, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos de incubação avaliados, tanto para o percentual de ligação, quanto para o percentual de internalização (**Gráfico 2**).

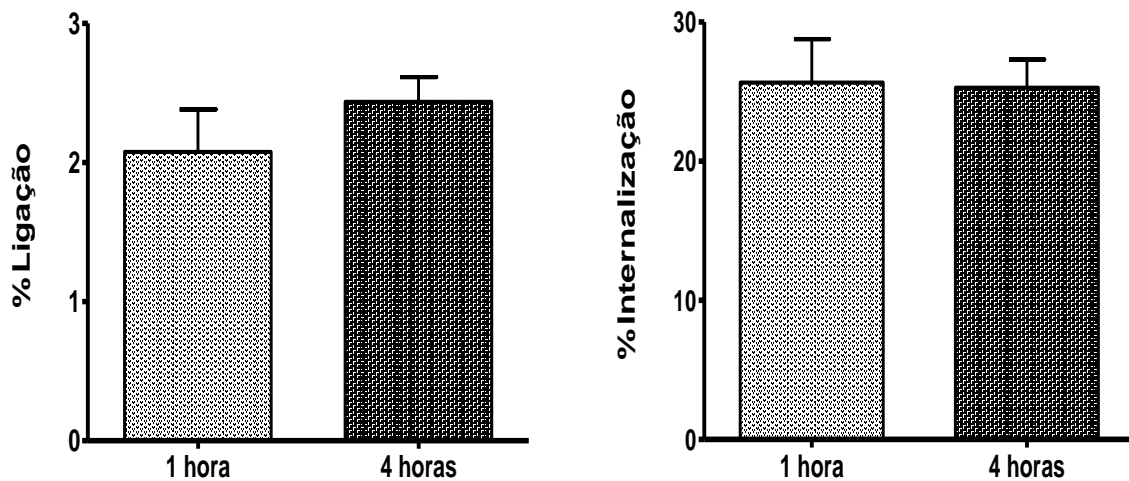


Gráfico 2 – Percentuais de ligação e de internalização do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nas células LNCaP, sem bloqueio prévio pelo peptídeo frio. Os valores estão representados como 'média \pm desvio padrão' (n=3).

O percentual de ligação do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nas células LNCaP foi próximo aos valores descritos na literatura. Nestes estudos, os pesquisadores relataram percentuais de ligação entre 4 e 7% para o peptídeo bombesina, complexado a diferentes espaçadores e agentes quelantes e marcado com ^{111}In , nas células PC-3 (tumor de próstata humano) e AR4-2J (tumor pancreático acinar de rato) (ZHANG *et al.*, 2004; MANSI *et al.*, 2009). Não foram encontrados dados na literatura para o percentual de ligação do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎. Com relação ao percentual de internalização, trabalhos descritos na literatura mostraram valores da ordem de 20 a 33% nas células PC-3, de 22 a 35% nas células AR4-2J, de 13 a 17% nas células MCF7 e de 14 a 19% nas células MDA-MB231, sendo as duas últimas linhagens humanas de tumor de mama. Nesses estudos também foi utilizado o peptídeo bombesina complexado a diferentes espaçadores e agentes quelantes e marcado com ^{99m}Tc ou ^{111}In (ZHANG *et al.*, 2004; FRAGOGEORGI *et al.*, 2009; MANSI *et al.*, 2009; SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009). Para o ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, o percentual de internalização nas células PC-3 foi de 18,5% após 2 horas de incubação (FAINTUCH *et al.*, 2008). A internalização é um fator importante para a geração de imagens cintilográficas, uma vez que o radiofármaco permanece mais tempo no sítio tumoral, otimizando o procedimento de diagnóstico (LISTER-JAMES *et al.*, 1997; HOFFMAN *et al.*, 2003).

O teste de afinidade específica do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP, com bloqueio prévio pelo peptídeo frio, apresentou percentuais de ligação de $1,41 \pm 0,11\%$ e $1,37 \pm 0,22\%$, para os tempos de 1 e 4 horas de incubação, respectivamente. Por sua vez, a internalização foi de $10,80 \pm 1,17\%$ e $11,70 \pm 2,86\%$ para os tempos de 1 e 4 horas, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos de incubação investigados, tanto para o percentual de ligação, quanto para o percentual de internalização (**Gráfico 3**).

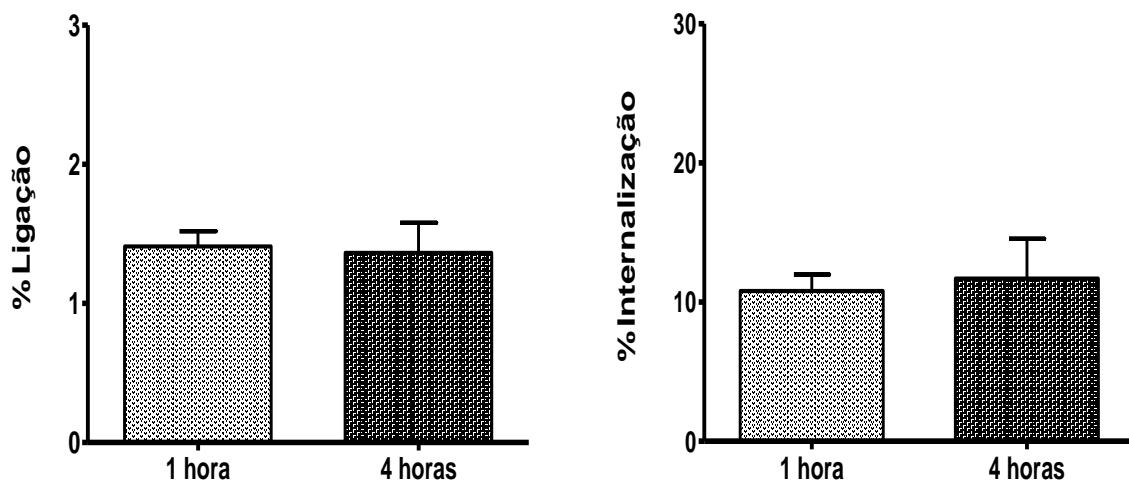


Gráfico 3 – Percentuais de ligação e de internalização do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nas células LNCaP, com bloqueio prévio pelo peptídeo frio. Os valores estão representados como 'média \pm desvio padrão' (n=3).

Em alguns trabalhos descritos na literatura sobre a afinidade específica do peptídeo bombesina, complexado a diferentes espaçadores e agentes quelantes e marcado com ^{99m}Tc ou ^{111}In , por diferentes linhagens celulares (PC3, AR4-2J, MCF7 e MDA-MB231) não foram relatados os valores obtidos, mas os pesquisadores descreveram uma redução na afinidade do peptídeo pelas células (ZHANG *et al.*, 2004; FRAGOGEORGI *et al.*, 2009; SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009).

Para avaliar melhor o teste de afinidade específica do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP, comparou-se os resultados dos testes com e sem bloqueio prévio pelo peptídeo frio. Houve redução estatisticamente significativa nos percentuais de ligação e de internalização, em ambos os tempos de incubação investigados, no teste com bloqueio prévio pelo peptídeo frio quando comparado ao teste sem bloqueio (**Gráfico 4**).

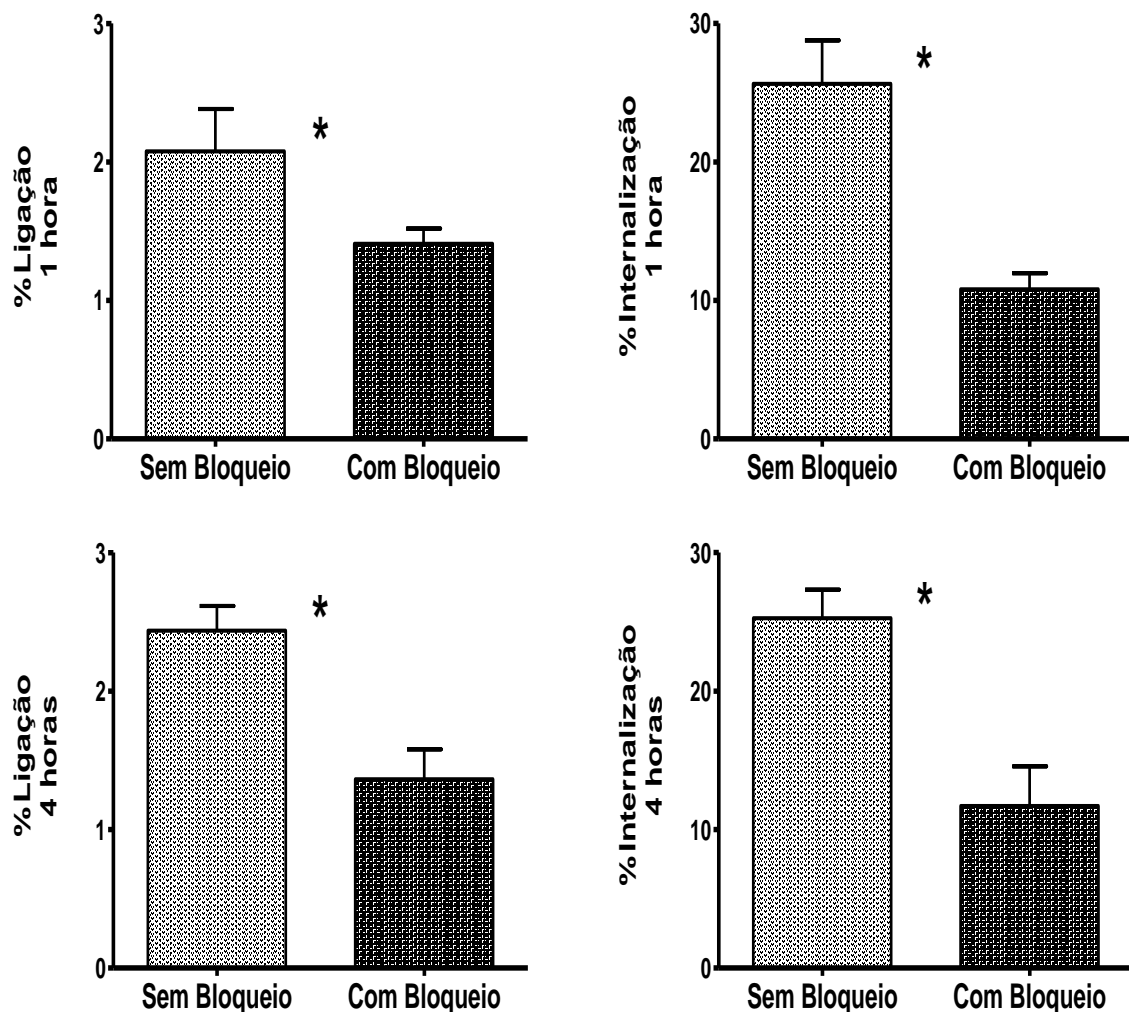


Gráfico 4 – Percentuais de ligação e de internalização do $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ nas células LNCaP.

Os valores estão representados como 'média \pm desvio padrão' (n=3).
Asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Para o tempo de 1 hora de incubação, o percentual de ligação teve uma queda de 32,21% e o de internalização reduziu 57,88%, diante do bloqueio prévio pelo peptídeo frio. Por sua vez, no tempo de 4 horas de incubação, o bloqueio pelo peptídeo frio reduziu a porcentagem de ligação em 43,85% e a de internalização em 53,70%. Esses resultados sugerem que a interação do $^{99m}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$ com as células LNCaP ocorre de maneira específica e, provavelmente, deve-se a interação do radiopeptídeo com os GRPr's super-expressos nas células tumorais de próstata (FLEISCHMANN *et al.*, 2007; de BARROS *et al.*, 2011; LEARS *et al.*, 2011). Assim, os dados desse estudo *in vitro* sinalizam para a perspectiva de investigar essa interação *in vivo*, ou seja, em modelo experimental de tumor de próstata, utilizando as células LNCaP.

5.3 Modelo experimental de tumor de próstata

O modelo experimental de tumor de próstata, obtido por meio do implante das células humanas da linhagem LNCaP em camundongos machos BALB/c nude, desenvolveu-se com sucesso. Após 15, 20 e 25 dias do implante das células nos animais, obteve-se tumores com diferentes tamanhos e estágios de desenvolvimento (**Figura 10**).

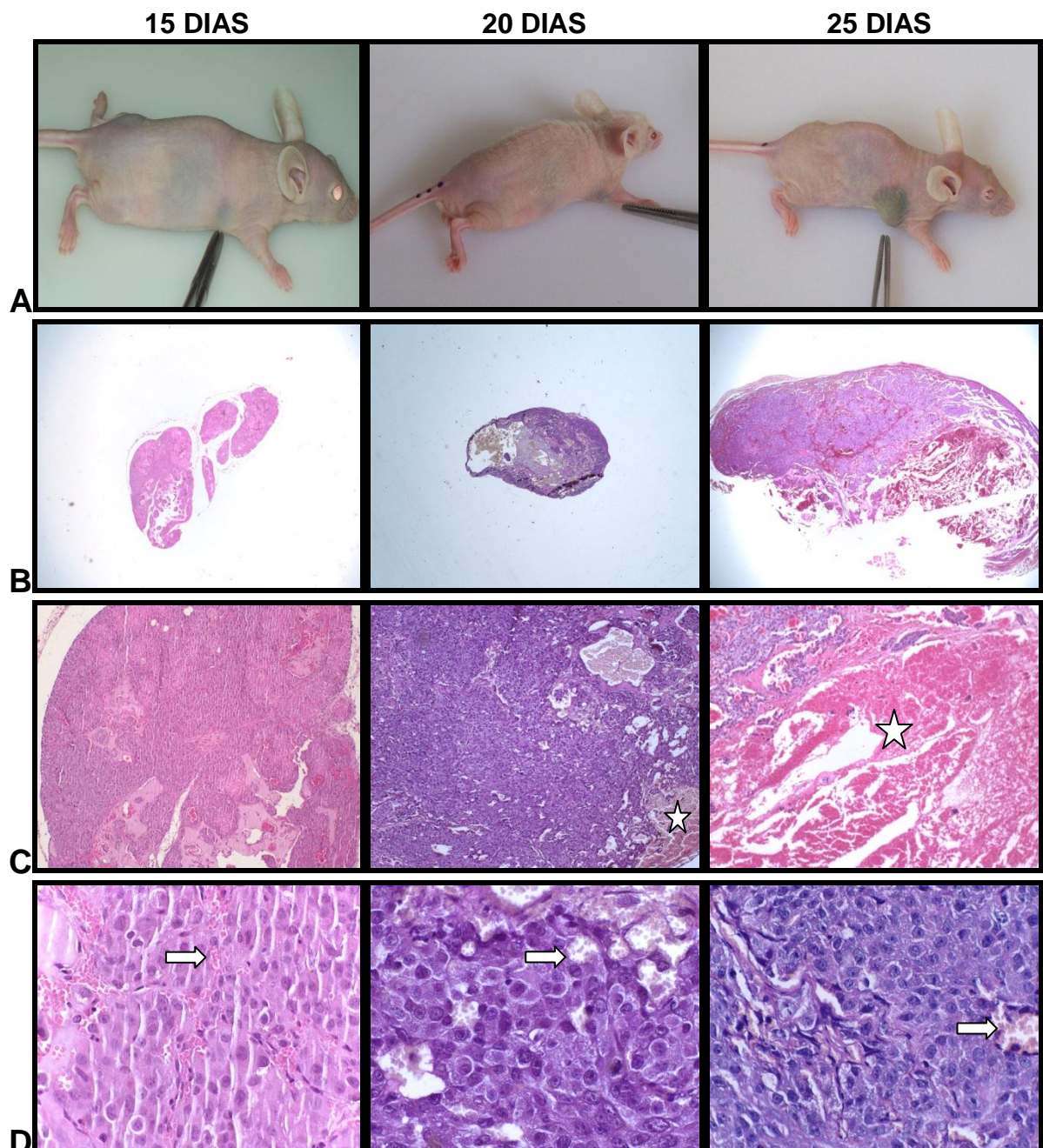


Figura 10 – Estágios de desenvolvimento do tumor de próstata experimental após o implante das células LNCaP nos camundongos machos BALB/c nude. (A) Nódulo tumoral. (B, C e D) Aspecto microscópico do tumor, coloração H&E e aumento de 2x, 10x e 60x, respectivamente. (☆ hemorragia; ⇒ vasos)

Os tamanhos dos tumores, 15, 20 e 25 dias após o implante das células LNCaP nos camundongos, foram de $5,21\pm 0,45\text{mm}$, $5,45\pm 0,48\text{mm}$ e $7,58\pm 0,90\text{mm}$, respectivamente (**Figura 10.A**). Já as massas foram de $0,08\pm 0,02\text{g}$, $0,08\pm 0,02\text{g}$ e $0,28\pm 0,06\text{g}$, respectivamente. Os tumores caracterizaram-se por crescimento epitelial em arranjo sólido nos diferentes estágios analisados (**Figura 10.B, C e D**). Com 15 dias de desenvolvimento observou-se um estroma conjuntivo mais evidente e moderada proliferação vascular, além de áreas simulando espaços císticos, por vezes contendo material acidofílico (**Figura 10.B, C e D**). Por sua vez, os tumores com 25 dias de crescimento apresentaram delicado estroma conjuntivo e aumento da formação vascular, havendo ainda a presença de focos hemorrágicos (**Figura 10.C**). Nos tumores com 20 dias de desenvolvimento observaram-se aspectos morfológicos intermediários entre os de 15 e 25 dias. É importante ressaltar que a presença do estroma conjuntivo no tecido tumoral pode reduzir a penetração do radiofármaco no mesmo, dificultando seu acesso às células. Por outro lado, a presença de vasos neoformados no tecido tumoral é extremamente importante para a progressão do câncer (CARMELIET, 2003; VIRREY *et al.*, 2008; CHUA *et al.*, 2010; JUN *et al.*, 2010). No entanto, sabe-se que esta nova rede endotelial é formada de maneira desordenada, com uma estrutura tortuosa e irregular (JAIN *et al.*, 2002) e, portanto, a permeabilidade entre as células está aumentada (RUOSLAHTI, 2002; MUNN, 2003; GOSH *et al.*, 2008). Essas características podem ser úteis no direcionamento do radiofármaco para as células tumorais.

5.4 Estudos de biodistribuição

O perfil de biodistribuição do complexo peptídico $^{99\text{m}}\text{Tc-HYNIC-}\beta\text{Ala-Bombesina}_{(7-14)}$, em camundongos machos BALB/c saudáveis, encontra-se representado a seguir (**Gráfico 5**).

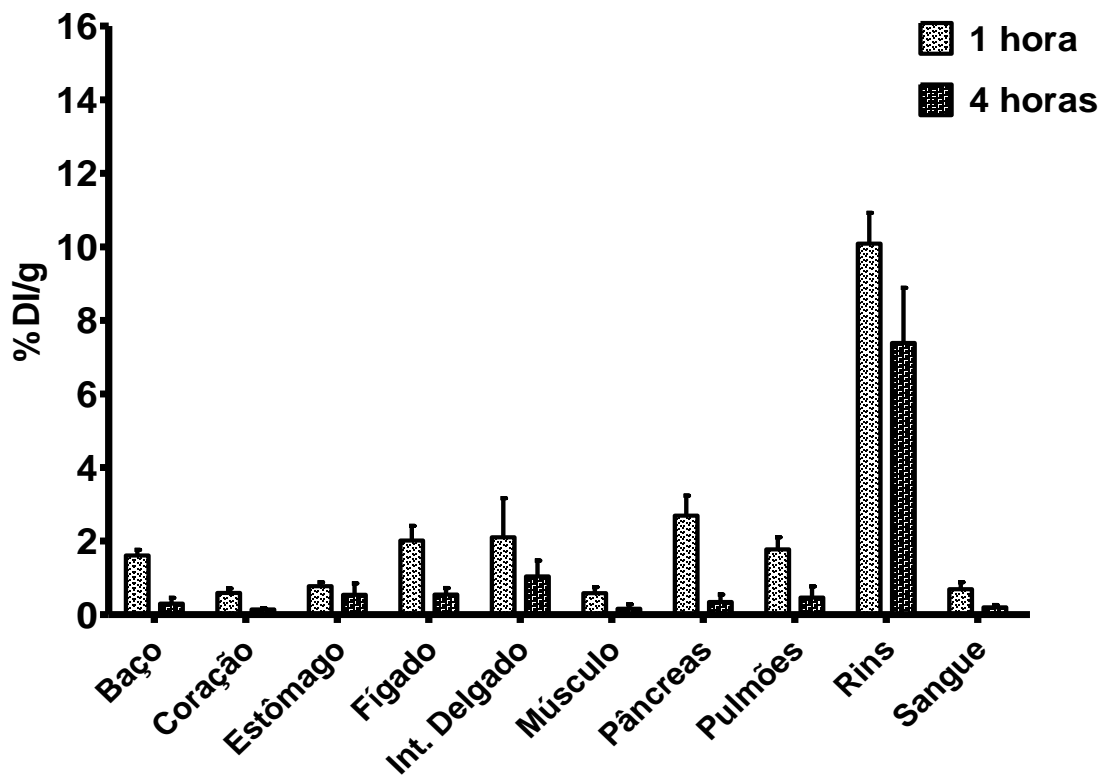


Gráfico 5 – Perfil de biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nos camundongos machos BALB/c sadios (n=5).

A biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ mostrou uma rápida depuração sanguínea, indicada pelo reduzido %DI/g do sangue, já no tempo de 1 hora após a administração do radiopeptídeo. Esta rápida depuração sanguínea foi acompanhada por uma captação acentuada pelos rins, indicando que a eliminação do radiofármaco ocorre pela via renal, o que está em conformidade com a natureza hidrofílica da molécula. Embora a eliminação renal possa ser um inconveniente para a aplicação clínica do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, devido a proximidade da próstata com o sistema geniturinário, especialmente com a bexiga, estudos tem demonstrado o contrário. SCOPINARO *et al.*, 2003 relataram a potencialidade de outro análogo da BBN, marcado com ^{99m}Tc , em detectar o tumor de próstata e a metástase em linfonodos pélvicos em seres humanos, por meio de imagens cintilográficas. Neste estudo, os autores relataram a possibilidade de se utilizar a lavagem contínua da bexiga para aqueles pacientes cuja detecção do tumor não foi possível logo após a administração do radiotraçador.

O perfil de biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ mostrou também que o pâncreas e o intestino delgado apresentaram as maiores captações do radiofármaco depois dos rins, o que se justifica pela presença de GRPr's nesses órgãos (SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009). Os dados obtidos abrem a possibilidade de se utilizar esse radiopeptídeo, também, para a identificação de tumores de pâncreas, em estudos posteriores.

A biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nos camundongos BALB/c é semelhante àquela encontrada na espécie *Swiss* por FAINTUCH *et al.*, 2008. Além disso, outros trabalhos descritos na literatura relataram perfis similares de biodistribuição para o peptídeo BBN, complexado a diferentes espaçadores e agentes quelantes com caráter hidrofílico como o do HYNIC (FRAGOGEORGI *et al.*, 2009; SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009).

O perfil de biodistribuição do complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, em camundongos machos BALB/c com tumor de próstata, encontra-se representado no **Gráfico 6** (25 dias) e nos **anexos B** (15 dias) e **C** (20 dias).

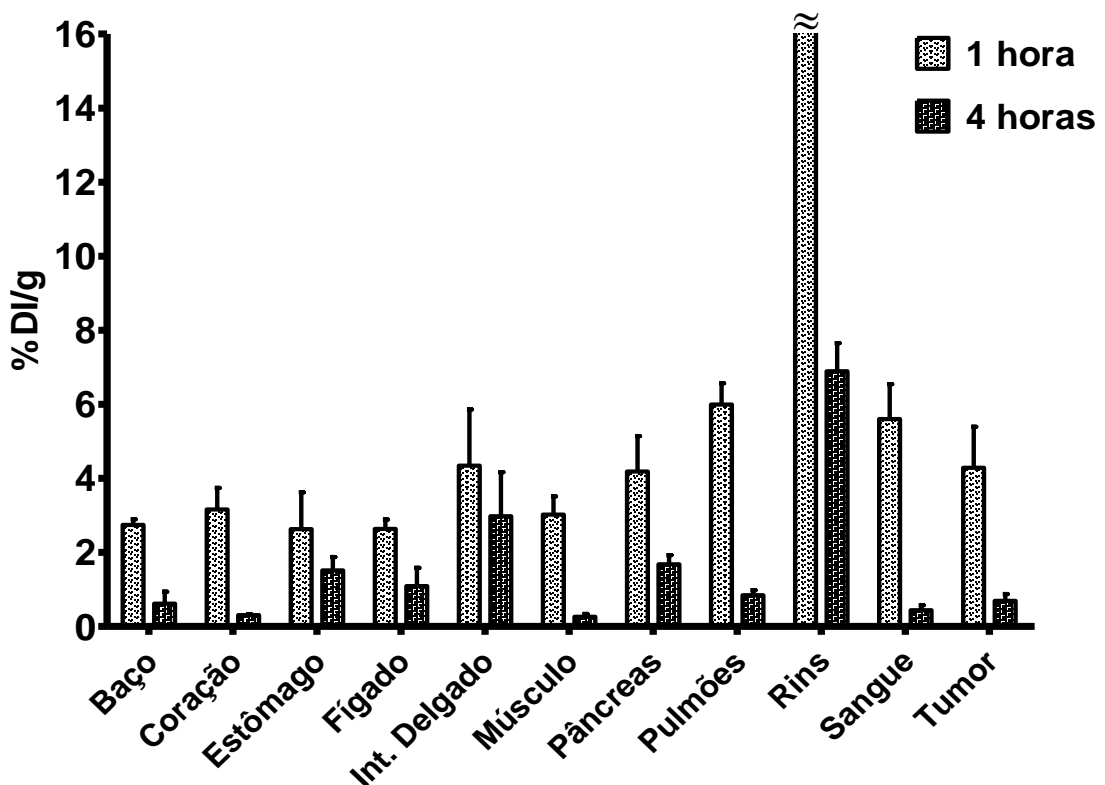


Gráfico 6 – Perfil de biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nos camundongos machos BALB/c nude com tumor de próstata com 25 dias de desenvolvimento (n=5).

A biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nos camundongos com tumor de próstata demonstrou um perfil semelhante àquele observado nos animais sadios com relação a eliminação renal. No tempo de 1 hora após a administração do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, o percentual de captação do radiotraçador pelo tumor foi da ordem de 4%. FAINTUCH *et al.*, 2008 encontraram um percentual de captação de 3,0% do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelo tumor de próstata (células PC3), decorridos 90 minutos após a administração do radiofármaco. Já SHI *et al.*, 2008 descreveram um valor de aproximadamente 1,0% de captação do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelo tumor de cólon (células HT-29), 1 hora após a injeção do radiopeptídeo. Por sua vez, MANSI *et al.*, 2011 relataram um percentual de captação de 5,5% de um derivado de bombesina marcado com ^{68}Ga pelo tumor de próstata (células LNCaP), após 1 hora da injeção do radiotraçador. Portanto, os dados obtidos nesse trabalho estão em consonância com aqueles descritos na literatura. A captação pelo pâncreas e pelo intestino delgado, no tempo de 1 hora, é da mesma ordem de grandeza daquela obtida para o tumor, reforçando a presença dos GRPr's nestes tecidos (SANTOS-CUEVAS *et al.*, 2009). No tempo de 4 horas, a captação do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelo tumor foi inferior a 1,0%. Este dado também está em conformidade com a literatura. SHI *et al.*, 2008 encontraram um valor de aproximadamente 0,5% para a captação desse mesmo radiotraçador pelo tumor de cólon (células HT-29). Cabe ressaltar que a captação do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelo tumor de próstata, obtida nesse trabalho no tempo de 4 horas, foi inferior à captação pelo pâncreas e pelo intestino delgado, provavelmente devido a menor densidade de GRPr's no tumor, associada a maior depuração do radiotraçador presente nos vasos sanguíneos constituintes do tecido tumoral.

A dose do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, acumulada no tecido tumoral 1 e 4 horas após a administração do radiotraçador, aumentou com o crescimento do tumor, em ambos os tempos investigados. Além disso, com o desenvolvimento do tumor também houve um aumento de sua massa (**Gráfico 7**).

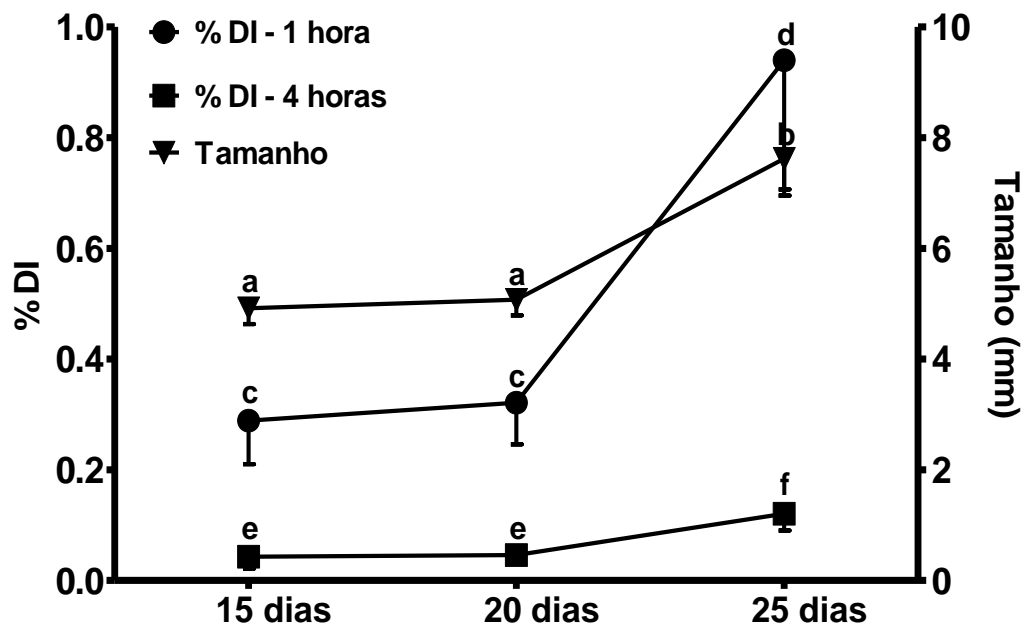


Gráfico 7 – Percentual da dose injetada (%DI) do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ captado pelo tumor em relação ao tamanho do mesmo.

Os valores estão representados como 'média \pm desvio padrão' (n=5).

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas para o mesmo grupo ($p < 0,05$).

Como pode ser observada pela análise histopatológica (item 5.3), a quantidade de estroma conjuntivo no tumor foi inversamente proporcional ao estágio de desenvolvimento do mesmo. Por outro lado, a intensidade da proliferação vascular foi diretamente proporcional. Dessa forma, com o maior tempo de desenvolvimento do foco tumoral, maior %DI do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ fluiu para o interior do tecido e ligou-se às células LNCaP (**Gráfico 7**). Entretanto, como mencionado anteriormente, a massa do tumor também aumentou com o seu desenvolvimento (**Gráfico 7**). Assim, quando foi calculado o %DI/g, os valores relativos obtidos tornaram-se similares para os três estágios de crescimento do tumor investigados (**Gráfico 8**).

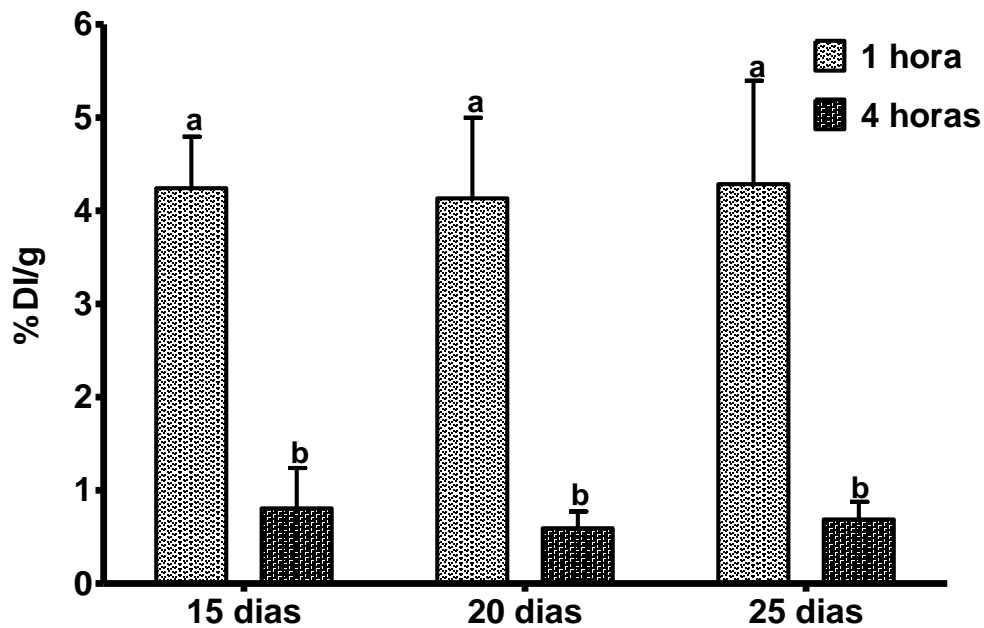


Gráfico 8 – Percentual da dose injetada por grama de tecido (%DI/g) do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ captado pelo tecido tumoral.

Os valores estão representados como 'média \pm desvio padrão' (n=5).

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Observa-se pelo gráfico 8 que, nos diferentes estágios de desenvolvimento do tumor avaliados, houve redução estatisticamente significativa do %DI/g entre os tempos de 1 e 4 horas após a administração do peptídeo radiomarcado, atribuída à depuração do mesmo do tecido tumoral (**Gráfico 8**).

5.5 Imagens cintilográficas

As imagens cintilográficas, obtidas 1 e 4 horas após a administração intravenosa do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ nos camundongos machos BALB/c sadios e com tumor de próstata com 15, 20 e 25 dias de desenvolvimento, estão ilustradas a seguir (**Figura 11**).

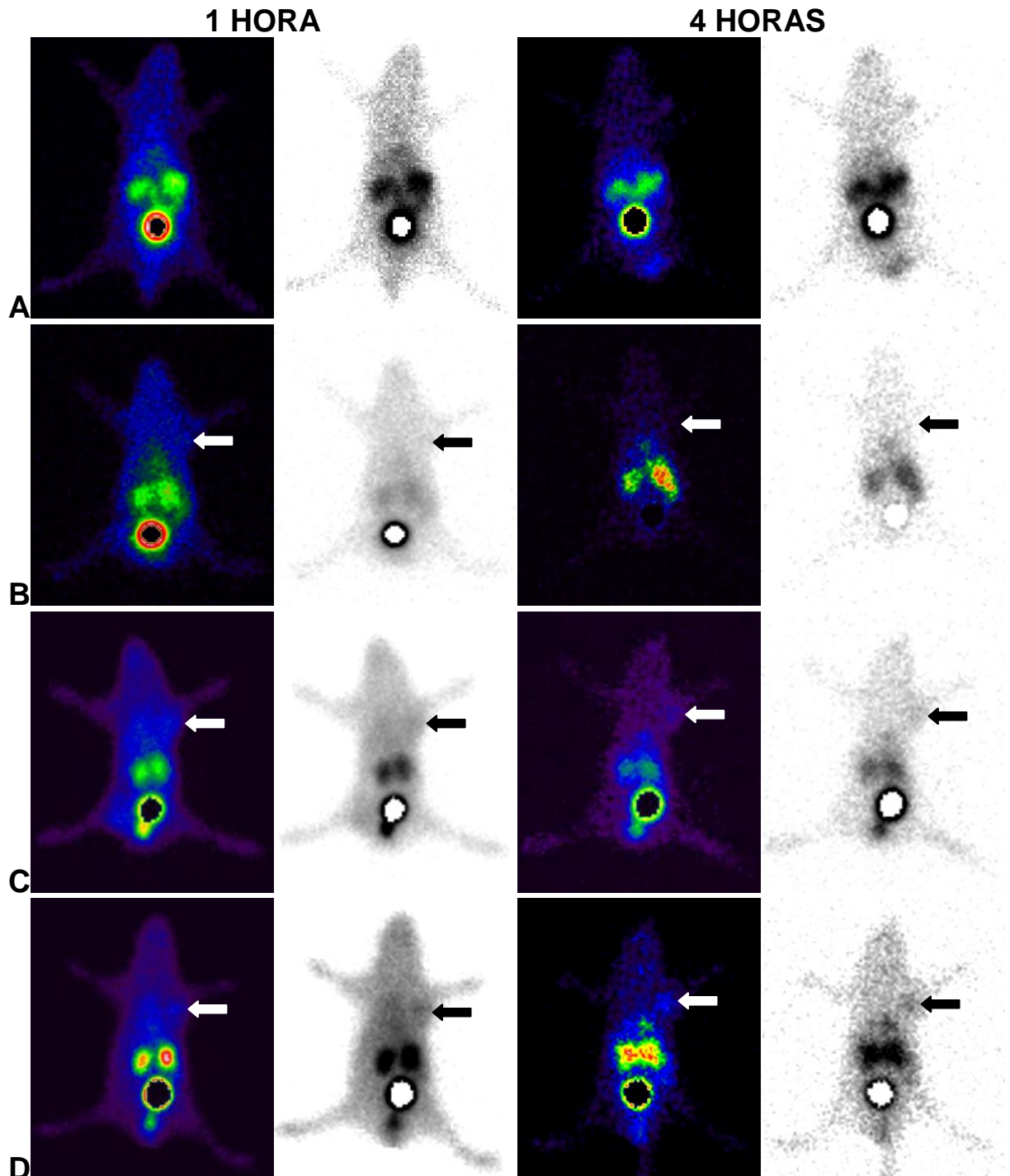


Figura 11 - Imagens cintilográficas obtidas após administração do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ nos camundongos machos BALB/c (n=3). (A) Sadios. (B, C e D) Tumor de próstata com 15, 20 e 25 dias de desenvolvimento, respectivamente. As setas indicam o foco tumoral.

O perfil do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina $_{(7-14)}$ obtido pelas imagens cintilográficas dos camundongos sadios, em ambos os tempos estudados, apresentou uma elevada captação do radiofármaco pelos rins e pela bexiga (**Figura 11.A**). Este órgão foi retirado das imagens para melhor visualização do contorno do animal, uma

vez que o percentual de radiação associado à bexiga foi bastante alto. Esse perfil corrobora o encontrado nos estudos de biodistribuição, indicando a via urinária como via de eliminação do radiopeptídeo. Além disso, não foram observados acúmulos de radioatividade na tireóide, no estômago, no fígado e no baço, o que está de acordo com os dados do rendimento de radiomarcagem (item 5.1), atestando níveis aceitáveis das impurezas radioquímicas, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e $^{99m}\text{TcO}_2$.

As cintilografias dos camundongos com tumor de próstata também apresentaram acentuada captação do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelos rins e pela bexiga, em ambos os tempos investigados e para os três estágios de desenvolvimento do tumor avaliados (**Figura 11.B, C e D**). As imagens cintilográficas dos animais com tumor de próstata com 15 dias de crescimento não apresentaram acúmulo do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ na região do foco tumoral (flanco superior direito – setas: **Figura 11.B**), nos tempos estudados. Por outro lado, as cintilografias dos camundongos com tumor de próstata com 20 e 25 dias de desenvolvimento apresentaram acúmulo do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ na região do tumor (flanco superior direito – setas: **Figura 11.C e D**). Entretanto, este acúmulo foi mais evidente no tempo de 4 horas após a administração do radiopeptídeo, para o tumor com 25 dias de crescimento. Ressalta-se que o tumor com 25 dias de desenvolvimento apresentava apenas cerca de 7,6 mm de tamanho. NAKASHIMA *et al.*, 2004 mostraram que a RNM endorectal é útil na detecção do foco tumoral de próstata somente quando o mesmo apresenta um tamanho superior a 1,0 cm. Portanto, os resultados encontrados nesse estudo mostram que o ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ é capaz de identificar o foco tumoral de próstata em estágio mais precoce de seu desenvolvimento. Além disso, diversos trabalhos descritos na literatura apresentaram imagens com perfis semelhantes aos encontrados nesse trabalho. FAINTUCH *et al.*, 2008, SHI *et al.*, 2008 e de BARROS *et al.*, 2010 apresentaram imagens cintilográficas após administração do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ em animais com tumor de próstata (células PC3), de cólon (células HT-29) e de Ehrlich, respectivamente. Nas descrições das imagens, os autores relataram captação pelos rins e pela bexiga e elevado acúmulo na região tumoral. Por sua vez, MANSI *et al.*, 2011 apresentaram imagem de PET/CT, após administração de um derivado de bombesina marcado com ^{68}Ga em camundongos

com tumor de próstata (células LNCaP), em que também foi possível visualizar rins, bexiga e foco tumoral.

Os resultados das análises quantitativas das imagens cintilográficas dos animais com tumor de próstata encontram-se a seguir (**Gráfico 9**).

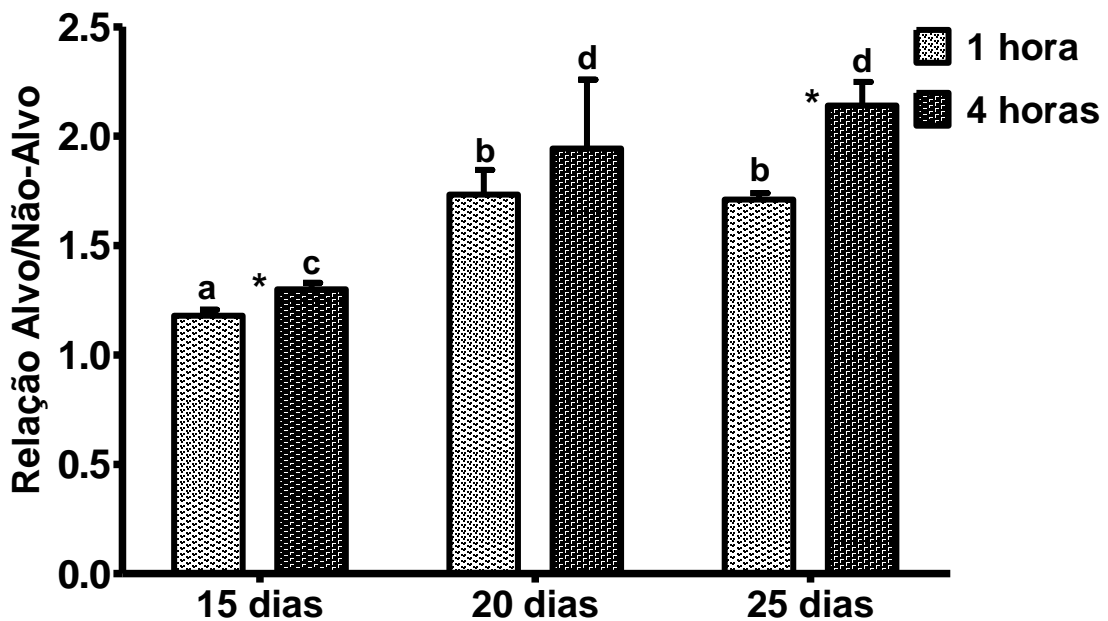


Gráfico 9 – Relação alvo/não-alvo (tumor/músculo) obtida pelas imagens cintilográficas.

Os valores estão representados como 'média \pm desvio padrão' (n=3).

Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de 15, 20 e 25 dias para o mesmo tempo ($p < 0,05$).

Asterisco (*) indica diferenças estatisticamente significativas entre os tempos de 1 e 4 horas para o mesmo grupo ($p < 0,05$).

Observa-se pelo gráfico que as relações alvo/não-alvo, 4 horas após a administração do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎, para os estágios de 15 e 25 dias de desenvolvimento do tumor foram estatisticamente superiores aquelas obtidas no tempo de 1 hora. Para as cintilografias dos camundongos com tumor de próstata com 20 dias de crescimento, as relações obtidas nos tempos investigados não apresentaram diferença estatisticamente significativa, embora tenha ocorrido um ligeiro aumento no tempo de 4 horas. Os aumentos observados 4 horas após a injeção do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ podem ser explicados pela maior taxa de depuração do radiopeptídeo do músculo contralateral, quando comparada àquela do tumor. No tumor (alvo) o radiotraçador encontra-se ligado e internalizado nas células LNCaP, uma vez que as mesmas super-expressam GRPr's, o que não ocorre no músculo contralateral (não-alvo).

As relações alvo/não-alvo, 1 hora após a administração do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nos camundongos com tumor de próstata, foram maiores nos animais com foco tumoral com 20 e 25 dias de desenvolvimento, quando comparadas com a relação dos camundongos com tumor de próstata com 15 dias de crescimento. Entretanto, entre os grupos com tumor com 20 e 25 dias de desenvolvimento não foi observada diferença estatisticamente significativa. O mesmo ocorreu para o tempo de 4 horas após a injeção do radiofármaco. Para os animais com foco tumoral com 15 dias de crescimento, os valores das relações alvo/não-alvo foram menores que 1,5 em ambos os tempos avaliados. Por outro lado, as relações obtidas nas imagens cintilográficas dos camundongos com tumor de próstata com 20 e 25 dias de desenvolvimento foram maiores que 1,5 nos tempos investigados, atingindo um valor maior que 2,0 no tempo de 4 horas para o grupo com foco tumoral com 25 dias de crescimento. De acordo com PHILLIPS, 1999 para que substâncias radiomarcadas possam ser consideradas como potenciais agentes de diagnóstico, a relação alvo/não-alvo deve ser maior que 1,5. Esse valor indica uma captação pelo menos 50% maior no tecido alvo em relação ao tecido não-alvo.

Os resultados das relações alvo/não-alvo estão em consonância com as observações das imagens cintilográficas, pois nos animais com tumor de próstata com 15 dias de desenvolvimento não foi observado qualquer acúmulo do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ na região tumoral. Por outro lado, as cintilografias revelaram captação do radiotraçador na região tumoral para os camundongos com estágios de 20 e 25 dias de desenvolvimento do tumor, com maior ênfase para o tempo de 4 horas. Cumpre ressaltar que no tempo de 4 horas do grupo com foco tumoral de 25 dias de desenvolvimento obteve-se a melhor visualização do tumor pelas imagens cintilográficas, corroborando com o valor da relação alvo/não-alvo superior a 2,0. Portanto, as imagens cintilográficas e os dados obtidos sugerem que o ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ poderá ser empregado como possível agente de diagnóstico para a identificação do tumor de próstata.

6 CONCLUSÕES

A marcação do complexo peptídico HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ com átomos de ^{99m}Tc apresentou rendimentos adequados, superiores a 90%, para ambos os protocolos realizados.

O estudo *in vitro* mostrou afinidade do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ pelas células LNCaP, indicando interação específica entre o radiotraçador e os GRPr's presentes nas células.

O modelo experimental de tumor de próstata em camundongos machos BALB/c nude, utilizando as células LNCaP, mostrou padrão de desenvolvimento compatível com características de tecido maligno.

O estudo de biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nos camundongos machos BALB/c sadios mostrou perfil de excreção renal, com captação por pâncreas e intestino delgado. Nos animais com tumor de próstata, o perfil de biodistribuição foi similar àquele observado para os camundongos sadios, observando-se também acúmulo do radiotraçador no foco tumoral.

Observou-se compatibilidade entre as imagens cintilográficas e o perfil de biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nos camundongos sadios e com tumor de próstata.

A melhor visualização do tumor de próstata pelas imagens cintilográficas foi observada no tempo de 4 horas para os camundongos com tumor com 25 dias de desenvolvimento.

O complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ foi capaz de identificar as células LNCaP, *in vitro* e *in vivo*, tornando-se um potencial agente de diagnóstico para este tipo de tumor.

7 PERSPECTIVAS

Investigar a possibilidade de se utilizar o complexo ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ na identificação de tumor de próstata em seres humanos, a exemplo do que foi descrito por SCOPINARO *et al.*, 2003.

Empregar o complexo peptídico ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ na identificação de tumor de pâncreas, em modelo experimental.

Empregar outros radiopeptídeos na identificação de tumores, como por exemplo o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) radiomarcado na identificação de tumor de cólon-retal, em modelo experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCARDO, A.; MANSI, R.; MORISCO, A.; MANGIAPIA, G.; PADUANO, L.; TESAURO, D.; RADULESCU, A.; AURILIO, M.; ALOJ, L.; ARRA, C.; MORELLI, G. Peptide modified nanocarriers for selective targeting of bombesin receptors. **Molecular Biosystems**, v. 6, p. 878-887, 2010.

ATCC – American Type Culture Collection: Product Information Sheet for CRL-1740. Manassas: ATCC, 2004.

BANERJEE, J. 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. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 32, p. 1-20, 2005.

BEER, A. J.; EIBER, M.; SOUVATZOGLOU, M.; SCHWAIGER, M.; KRAUSE, B. J. Radionuclide and hybrid imaging of recurrent prostate cancer. **The Lancet Oncology**, v. 12, p. 181-191, 2011.

BEHESHTI, M.; PIRICH, C.; LANGSTEGER, W. Conventional Tc-99m-based bone scan versus fluoride positron emission tomography combined with computed tomography in the assessment of bone metastases in prostate cancer patients. **Imaging Decisions**, v. 13, p. 88-96, 2009.

BISHOP, J. M. Molecular themes in oncogenesis. **Cell**, v. 64, p. 235-248, 1991.

BLOK, D.; FEITSMA, H. I. J.; KOOY, Y. M. C.; WELLING, M. M.; OSSENDORP, F.; VERMEIJ, P.; DRIJFHOUT, J. W. New chelation strategy allows for quick and clean ^{99m}Tc -labeling of synthetic peptides. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 31, p. 815-820, 2004.

BOS, J. L. *Ras* oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Research**, v. 49, p. 4682-4689, 1989.

BREEMAN, W. A.; JONG, M.; BERNARD, B.F.; KWEKKBOOM, D. F.; SRINIVASAN, A.; van der PLUIJIM, M. E.; HOFLAND, L. J.; VISSER, T. J.; KRENNING, E. P. **International Journal of Cancer**, v. 83, p. 657, 1999.

BREVINI-GANDOLFI, T. A. L.; CILLO, F.; FAVETTA, L. A.; MONTAGNA, A.; MOTTA, M. Somatostatin up-regulates topoisomerase II alpha expression and effects LNCaP cell cycle. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 176, p. 103-110, 2001.

BRITTON, K. E; GRANOWSKA, M. Cancer imaging with radiolabelled antibodies and peptides. **Nuclear Medicine Review**, v. 5, n. 2, p. 89-92, 2002.

CARMELIET, P.; JAIN, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 249-257, 2000.

CARMELIET, P. Angiogenesis in health and disease. **Nature Medicine**, v. 9, n. 6, p. 653-660, 2003.

CHUA, T. C., YAO, P.; AKTHER, J.; MORRIS, D. L. Impact of Tumor Angiogenesis in Peritoneal Mesothelioma after Radical Cytoreduction and Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy. **Pathology & Oncology Research**, v. 16, p. 217-222, 2010.

CONTI, P. S.; LILIEN, D. L.; HAWLEY, K.; KEPPLER, J.; GRAFTON, S. T.; BADING, J. R. PET and [¹⁸F]-FDG in oncology: A clinical uptake. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 23, p. 717-735, 1996.

COOK, G. J. R. Oncological molecular imaging: nuclear medicine techniques. **The British Journal of Radiology**, v. 76, p. 152-158, 2003.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

de BARROS, A. L. B.; MOTA, L. G.; FERREIRA, C. A.; OLIVEIRA, M. C.; de GOÉS, A. M.; CARDOSO, V. N. Bombesin derivative radiolabeled with technetium-99m as agent for tumor identification. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 6182-6184, 2010.

de BARROS, A. L. B.; MOTA, L. G.; SOARES, D. C. F.; COELHO, M. M. A.; OLIVEIRA, M. C.; CARDOSO, V. N. Tumor bombesin analog loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes as tool for tumor identification. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, p. 7373-7375, 2011.

de VISSCHERE, P.; OOSTERLINCK, W.; de MEERLEER, G.; VILLEIRS, G. Clinical and imaging tools in the early diagnosis of prostate cancer, a review. **JBR-BTR**, v. 93, p. 62-70, 2010.

DEPINHO, R. A. The age of cancer. **Nature**, v. 408, p. 248-254, 2000.

DESHPANDE, N.; PYSZ, M. A.; WILLMANN, J. K. Molecular ultrasound assessment of tumor angiogenesis. **Angiogenesis**, v. 13, p. 175-188, 2010.

DEWANJEE, M. K. The chemistry of ^{99m}Tc-labeled radiopharmaceuticals. **Seminars in Nuclear Medicine**, v. 20, n. 1, p. 5-27, 1990.

DINIZ, S. O. F.; REZENDE, C. M.; SERAKIDEDS, R.; FERREIRA, R. L.; RIBEIRO, T. G.; MARTIN-COMIN, J.; CARDOSO, V. N. Scintigraphic imaging using technetium-99m-labeled ceftizoxime in a experimental model of acute osteomyelitis in rats. **Nuclear Medicine Communications**, v. 29, p. 830-836, 2008.

DURKAN, K.; LAMBRECHT, F. Y.; UNAK, P. Radiolabeling of bombesin-like peptide with ^{99m}Tc: ^{99m}Tc-litorin and biodistribution in rats. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, p. 1516-1520, 2007.

ECKLEMAN, W. C.; REBA, R. C.; KELLOFF, G. J. Target imaging: an important biomarker for understanding diseases progression in the era of personalized medicine. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 748-759, 2008.

EMONDS, K. M.; SWINNEN, J. V.; MORTELMANS, L.; MOTTAGHY, F. M. Molecular imaging of prostate cancer. **Methods**, v. 48, p. 193-199, 2009.

ETZIONI, R.; PENSON, D. F.; LEGLER, J. M.; TOMMASO, D.; BOER, R.; GANN, P. H.; FEVER, E. J. Overdiagnosis due to prostate-specific antigen screening: Lessons from U.S. prostate cancer incidence trends. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 94, n. 13, p. 981-990, 2002.

FAINTUCH, B. L.; TEODORO, R.; DUATTI, A.; MURAMOTO, E.; FAINTUCH, S.; SMITH, C. J. Radiolabeled bombesin analogs for prostate cancer diagnosis: preclinical studies. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 35, p. 401-411, 2008.

FERLAY, J.; SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso: 26/11/2011.

FERRO-FLORES, G.; RAMÍRES, F. M.; MELÉNDEZ-ALAFORT, L.; SANTOS-CUEVAS, C. L. Peptides for *in vivo* target-specific cancer imaging. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 87-97, 2010.

FILHO, G. B.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do Crescimento e da Diferenciação Celular. Em: BOGLIOLO, L.; FILHO, G. B. **Patologia Geral**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap. 8, p.173-234.

FLEISCHMANN, A.; WASER, B.; REUBI, J. C. Overexpression of gastrin-releasing peptide receptors in tumor-associated blood vessels of human ovarian neoplasms. **Cellular Oncology**, v. 29, p. 421-33, 2007.

FRAGOGEORGI, E. A.; ZIKOS, C.; GOURNI, E.; BOUZIOTIS, P.; PARAVATOU-PETSOTAS, M.; LOUDOS, G.; MITSOKAPAS, N.; XANTHOPOULOS, S.; MAVRI-VAVAYANNI, M.; LIVANIOU, E.; VARVARIGOU, A. D.; ARCHIMANDRITIS, S. C. Spacer site modifications for the improvement of the *in vitro* and *in vivo* binding properties of (99m)Tc-N(3)S-X-bombesin[2-14] derivatives. **Bioconjugate Chemistry**, v. 5, p. 856-867, 2009.

GANDOMKAR, M.; NAJAFI, R.; SHAFIEI, M.; EBRAHIMI, S. E. S. Confirmation of hidrazone formation in HYNIC-peptide conjugate preparation, and its hydrolysis during labeling with ^{99m}Tc. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 65, p. 805-808, 2007.

GARRISON, J. C.; ROLD, T. L.; SIECKMAN, G. L.; FIGUEROA, S. D.; VOLKERT, W. A.; JURISSON, S. S.; HOFFMAN, T. J. *In vivo* evaluation and small-animal PET/CT of a prostate cancer mouse model using ⁶⁴Cu bombesin analogs: side-by-side comparison of the CB-TE2A and DOTA chelation systems. **The journal of nuclear medicine**. v. 48, p. 1327-1337, 2007.

GHOSH, K.; THODETI, C. K.; DUDLEY, A. C.; MAMMOTO, A.; KLAGSBRUN, M.; INGBER, D. E. Tumor-derived endothelial cells exhibit aberrant Rho-mediated mechanosensing and abnormal angiogenesis in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 32, p. 11305-11310, 2008.

GREENLAND, W. E. P.; HOWLAND, K.; HARDY, J.; FOGELMAN, I.; BLOWER, P. J. Solid-phase synthesis of peptide radiopharmaceuticals using Fmoc-*N*- ϵ -(HYNIC-Boc)-lysine, a technetium-binding amino acid: application to Tc-99m-labeled salmon calcitonin. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 1751-1757, 2003.

GRIGORYEV, D. N.; LONG, B. J.; NJAR, V. C. O.; BRODIE, A. H. M. Pregnenolone stimulates LNCaP prostate cancer cell growth via the mutated androgen receptor. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 75, p. 1-10, 2000.

HAHN, W.; WEINBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. **Nature Reviews – Cancer**, v. 2, p. 331-341, 2002.

HANAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, 353-364, 1996.

HARRIS, A. L. Hypoxia - a key regulatory factor in tumour growth. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 1, p. 38-47, 2002.

HAUBNER, R.; DECRISTOFORO, C. Radiotracer II: peptide-based radiopharmaceuticals. In: **Small Animal Imaging: basics and practical guide**. Berlim: Springer Berlin Heidelberg, 2011. Part 3, p. 247-266.

HIGGINS, L. J.; POMPER, M. G. The evolution of imaging in cancer: current state and future challenges. **Seminars in Oncology**, v. 38, p. 3-15, 2011.

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

HOROSZEWICZ, J. S.; LEONG, S. S.; KAWINSKI, E.; KARR, J. P.; ROSENTHAL, H.; CHU, T. M.; MIRAND, E. A.; MURPHY, G. P. LNCaP model of human prostatic carcinoma. **Cancer Research**, v. 43, p. 1809-1818, 1983.

INCA/MS – Instituto Nacional de Câncer / Ministério da Saúde: Câncer de próstata: consenso. Rio de Janeiro: INCA, 2002.

INCA/MS – Instituto Nacional de Câncer / Ministério da Saúde: Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

JAIN, R. K.; MUNN, L. L.; FUKUMURA, D. Dissecting tumour pathophysiology using intravital microscopy. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 266-276, 2002.

JONES, A. G. Technetium in nuclear medicine. **Radiochimica Acta**, v. 70/71, p. 289-297, 1995.

JUARRANZ, M. G.; BOLAÑOS, O.; GUTIÉRREZ-CAÑAS, I.; LERNER, E. A.; ROBBERECHT, P.; CARMANA, M. J.; PRIETO, J. C.; RODRIGUEZ-HENCHE, N. Neuroendocrine differentiation of the LNCaP prostate cancer cell line maintains the expression and function of VIP and PACAP receptors. **Cellular signaling**, v. 13, p. 887-894, 2001.

JUN, H. Y.; YIN, H. H.; KIM, S. H.; PARK, S. H.; KIM, H. S.; YOON, K. H. Visualization of Tumor Angiogenesis Using MR Imaging Contrast Agent Gd- DTPA-anti-VEGF Receptor 2 Antibody Conjugate in a Mouse Tumor Model. **Korean Journal of Radiology**, v. 11, n. 4, p. 449-456, 2010.

JURISSON, S.; BERNING, D.; JIA, W.; DANGSHE, M. Coordination compounds in nuclear medicine. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 3, p. 1137-1156, 1993.

KAUR, M.; AGARWAL, R.; AGARWAL, C. Grape seed extract induces anoikis and caspase-mediated apoptosis in human prostate carcinoma LNCaP cells: possible role of ataxia telangiectasia mutated-p53 activation. **Molecular cancer therapy**, v. 5, n. 5, p. 1265-1274, 2006.

KING, R. C.; SURFRAZ, M. B.; BIAGINI, S. C. G.; BLOWER, P. J.; MATHER, S. J. How do HYNIC-conjugated peptides bind technetium? Insights from LC-MS and stability studies. **Dalton Transactions**, v. 1, p. 4998-5007, 2007.

KÖRNER, M.; STÖCKLI, M.; WASER, B.; REUBI, J.C. GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for *in vivo* targeting. **Journal of Nuclear Medicina**, v. 48, p. 736-743, 2007.

KOTHARI, K.; PRASAD, S.; KORDE, A.; MUKHERJEE, A.; MATHUR, A.; JAGGI, M.; VENKATESH, M. PILLAI, A. M. R.; MUKHERJEE, R.; RAMAMOORTHY, N. $^{99m}\text{Tc}(\text{CO}_3)$ -VIP analogues: preparation and evaluation as tumor imaging agent. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 65, p. 382-386, 2007.

LANE, S. R.; VEERENDRA, B.; ROLD, T. L.; SIECKMAN, G. L.; HOFFMAN, T. J.; JURISSON, S. S.; SMITH, C. J. $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -DTMA bombesin conjugates having high affinity for the GRP receptor. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 35, p. 263-272, 2008.

LANGER, M.; BECK-SICKINGER, A. G. Peptides as carrier for tumor diagnosis and treatment. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 1, p. 71-93, 2001.

LAVERMAN, P. DAMS, E. T. M.; OYEN, W. J. G.; STORM, G.; KOENDERS, E. B.; PREVOST, R.; van der MEER, J. W. M.; CORSTENS, F. H. M.; BOERMAN, O. C. A novel method to label liposomes with ^{99m}Tc by the hydrazine nicotinyl derivative. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 40, n. 1, p. 192-197, 1999.

LEARS, K. A.; FERDANI, R.; LIANG, K.; ZHELEZNYAK, A.; ANDREWS, R.; SHERMAN, C. D.; ACHILEFU, S.; ANDERSON, C. J.; ROGERS, B. E. *In vitro* and *in vivo* evaluation of ^{64}Cu -labeled SarAr-bombesin analogs in gastrin-releasing peptide receptor-expressing prostate cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 52, p. 470–477, 2011.

LISTER-JAMES, J.; MOYER, B. R.; DEAN, R. T. Pharmacokinetic consideration in the development of peptide-based imaging agents. **Quarterly Journal of Nuclear Medicine**, v. 41, p. 111-118, 1997.

LO, S.; KING, I.; ALLÉRA, A.; KLINGMÜLLER, D. Effect of various pesticides on human 5 α -reductase activity in prostate and LNCaP cells. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 502-508, 2007.

MANKOFF, D. A. A definition of molecular imaging. **The Journal of Nuclear Medicine**, v. 48, p. 18N-21N, 2007.

MANSI, R.; WANG, X.; FORRER, F.; KNEIFEL, S.; TAMMA, M. L.; WASER, B.; CESCATO, R.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. Evaluation of a 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid-conjugated bombesin based radioantagonist for the labeling with single-photon emission computed tomography, positron emission tomography, and therapeutic radionuclides. **Clinical Cancer Research**, v. 15, p. 5240-5249, 2009.

MANSI, R.; WANG, X.; FORRER, F.; WASER, B.; CESCATO, R.; GRAHAM, K.; BORKOWSKI, S.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. Development of a potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for targeting GRPr-positive tumours. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 38, p. 97–107, 2011.

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. **Radiologia Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 233-239, 2001.

MIGITA, T.; RUIZ, S.; FORNARI, A.; FIORENTINO, M.; PRIOLO, C.; ZADRA, G.; INAZUKA, F.; GRISANZIO, C.; PALESCANDOLO, E.; SHIN, E.; FIORE, C.; XIE, W.; KUNG, A. L.; FEBBO, P. G.; SUBRAMANIAN, A.; MUCCI, L.; MA, J.; SIGNORETTI, S.; STAMPFER, M.; HAHN, W.; FINN, S.; LODA, M. Fatty acid synthase: a metabolic enzyme and candidate oncogene in prostate cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, p. 519-532, 2009.

MIRANDA-OLVERA, A. D.; FERRO-FLORES, G.; PEDRAZA-LÓPEZ, M.; MURPHY, C. A.; LÉON-RODRÍGUEZ, L. M. Synthesis of oxytocin HYNIC derivatives as potential diagnosis agents for breast cancer. **Bioconjugate Chemistry**, v. 18, p. 1560-1567, 2007.

MUNN, I. I. Aberrant vascular architecture in tumors and its importance in drug-based therapies. **Drug Discovery today**, v. 8, n. 9, p. 396-403, 2003.

NABHAN, C.; PARSONS, B.; TOULOUKIAN, E. Z.; STADLER, W. M. Novel approaches and future directions in castration-resistant prostate cancer. **Annals of Oncology**, v. 22, p. 1948–1957, 2011.

NAKASHIMA, J.; TANIMOTO, A.; IMAI, Y.; MUKAI, M.; HORIGUCHI, Y.; NAKAGAWA, K.; OYA, M.; OHIGASHI, T.; MARUMO, K.; MURAI, M. Endorectal MRI for prediction of tumor site, tumor size, and local extension of prostate cancer. **Urology**, v. 64, p. 101-105, 2004.

NI, Y.; WANG, H.; CHEN, F.; LI, J.; DEKEYZER, F.; FENG, Y.; YU, J.; BOSMANS, H.; MARCHAL, G. Tumor models and specific contrast agents for small animal imaging in oncology. **Methods**, v. 48, p. 125–138, 2009.

NOWOTNIK, D. P. Physico-chemical concepts in the preparation of technetium radiopharmaceuticals. In: SAMPSON, C. B. **Textbook of radiopharmacy theory and practice**. V.3. Gordon and Breach Science Publishers S.A., 1990. Cap. 3, p. 53-72.

NYBERG, P.; XIE, L.; KALLURI, R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. **Cancer Research**, v. 65, n. 10, p. 3967-3979, 2005.

PATRICK, G. L. Anti-cancer agents. In: **An introduction to medicinal chemistry**. 5^a ed. New York: Oxford University Press, 2005. Cap. 18, p. 489-557.

PAUWELS, E. K. J.; RIBEIRO, M. J.; STOOT, J. H.; MCCREADY, V. R.; BOURGUIGNON, M.; MAZIERE, B. FDG accumulation and tumor biology. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 25, p. 317-322, 1998.

PETERSON, J. K.; HOUGHTON, P. J. Integrating pharmacology and in vivo cancer models in preclinical and clinical drug development. **European Journal of Cancer**. v. 40, p. 837-844, 2004.

PHILLIPS, W.T. Delivery of gamma-imaging agents by liposomes. **Advanced drug delivery reviews**, v. 37, p. 13-32, 1999.

REUBI, J. C.; WENGER, S.; SCHMUCKLI-MAURER, J.; SCHAER, J. C.; GUGGER, M. Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand ¹²⁵I-[D-TYR⁶, β-ALA¹¹, PHE¹³, NLE¹⁴]Bombesin₍₆₋₁₄₎. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 1139-1146, 2002.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8^a ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010.

RUOSLAHTI, E. Specialization of tumour vasculature. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 83-90, 2002.

SAHA, G. B. **Fundamentals of Nuclear Pharmacy**. 5th ed. New York: Springer-Verlag, 2004.

SALAGIERSKI, M.; SCHALKEN, J. A. PCA3 and TMPRSS2-ERG: promising biomarkers in prostate cancer diagnosis. **Cancers**, v. 2, p. 1432-1440, 2010.

SANCHO, V.; DI FLORIO, A.; MOODY, T. W.; JENSEN, R. T. Bombesin receptor-mediated imaging and cytotoxicity: review and current status. **Current Drug Delivery**, v. 8, p. 79-134, 2011.

SANTOS-CUEVAS, C. L.; FERRO-FLORES, G.; MERPHY, C. A.; RAMÍREZ, F. M.; LUNA-GUTIÉRREZ, M. A.; PEDRAZA-LOPEZ, M.; GÁRCIA-BECERA, R.; ORDAZ-ROSADO, D. Design, preparation, *in vitro* and *in vivo* evaluation of ^{99m}Tc -N₂S₂-Tat(49-57)-bombesin: A target-specific hybrid radiopharmaceutical. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 375, p. 75-83, 2009.

SCHNEIDER, D. W.; HEITNER, T.; ALICKE, B.; LIGHT, D. R.; MCLEAN, K.; SATOZAWA, N.; PARRY, G.; YOO, J.; LEWIS, J. S.; PARRY, R. In vivo biodistribution, PET imaging and tumor accumulation of ^{86}Y - and ^{111}In -Antimindin/RG-1, engineered antibody fragments in LNCaP tumor-bearing nude mice. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 50, p. 435-443, 2009.

SCHOTTELIUS, M.; WESTER, H. J. Molecular imaging targeting peptide receptors. **Methods**, v. 48, p. 161-177, 2009.

SCHROEDER, R. P. J.; van WEERDEN, W. M.; BANGMA, C.; KRENNING, E. P.; de JONG, M. Peptide receptor imaging of prostate cancer with radiolabelled bombesin analogues. **Methods**, v. 48, p. 200-204, 2009.

SCHROEDER, R. P. J.; de VISSER, M.; van WEERDEN, W. M.; de RIDDER, C. M. A.; RENEMAN, S.; MELIS, M.; BREEMAN, W. A. P.; KRENNING, E. P.; de JONG, M. Androgen-regulated gastrin-releasing peptide receptor expression in androgen-dependent human prostate tumor xenografts. **International Journal of Cancer**, v. 126, p. 2826–2834, 2010.

SCHROEDER, R. P. J.; van WEERDEN, W. M.; KRENNING, E. P.; BANGMA, C. H.; BEMDSEN, S.; GRIEVINK-DE LIGT, C. T.; GROEN, H. C.; RENEMAN, S.; de BLOIS, E.; BREEMAN, W. A. P.; de JONG, M. Gastrin-releasing peptide receptor-based targeting using bombesin analogues is superior to metabolism-based targeting using choline for in vivo imaging of human prostate cancer xenografts. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 38, p. 1257–1266, 2011.

SCOPINARO, F.; VINCENTIS, G.; VARVARIGOU, A. D.; LAURENTI, C.; LORI, F.; REMEDIANI, S.; CHIARINI, S.; STELLA, S. ^{99m}Tc -bombesin detects prostate cancer and invasion of pelvic lymph nodes. **European Journal of Nuclear Medicine Imaging**, v. 30, n. 10, p. 1378-1382, 2003.

SHI, J.; JIA, B.; LIU, Z.; YANG, Z.; YU, Z.; CHEN, K.; CHEN, X.; LIU, S.; WANG, F. ^{99m}Tc -labeled bombesin₍₇₋₁₄₎NH₂ with favorable properties for SPECT imaging of colon cancer. **Bioconjugate Chemistry**, v. 19, p. 1170–1178, 2008.

SNM – Society of Nuclear Medicine: Decision memo for positron emission tomography (NaF-18) to identify bone metastasis of cancer. Virginia: SNM, 2011.

SURFRAZ, M. B.; KING, R.; MATHER, S. J.; BIAGINI, S. C. G.; BLOWER, P. J. Trifluoroacetyl-HYNIC peptides: synthesis and ^{99m}Tc radiolabeling. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, p. 1418-1422, 2007.

TALMADGE, J. E.; SINGH, R. K.; FIDLER, I. J.; RAZ, A. Murine models to evaluate novel and conventional therapeutic strategies for cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 3, p. 793-804, 2007.

THAKUR, M. L.; KOLAN, H.; LI, J.; WIADERKIEWICZ, R.; PALLELA, V. R.; DUGGARAJU, R.; SCHALLY, A. V. Radiolabeled somatostatin analogs in prostate cancer. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 24, p. 105-113, 1997.

THAKUR, M. L.; LENTLE, B. C. Report of a summit on molecular imaging. **Radiology**, v. 236, p. 753-755, 2005.

THRALL, J. H.; ZIESSMAN, H. A. **Medicina Nuclear**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

TRAUGER, R.; COREY, E.; BELL, D.; WHITE, S.; GARSD, A.; STICKNEY, D.; READING, C.; FRINCKE, J. Inhibition of androstenediol-dependent LNCaP tumour growth by 17α -ethynyl- 5α -androstane- 3α , 17β -diol (HE3235). **British Journal of Cancer**, v. 100, p. 1068-1072, 2009.

ULRIX, W.; SWINNEN, J. V.; HEYNS, W.; VERHOEVEN, G. The differentiation-related gene 1, *Drg 1*, is markedly upregulated by androgens in LNCaP prostatic adenocarcinoma cells. **FEBS Letters**, v. 455, p. 23-26, 1999.

USP – United States Pharmacopeia - National Formulary (USP 34 - NF 29), 2011.

VERBRIDGE, S. S.; CHOI, N. W.; ZHENG, Y.; BROOKS, D.J.; STROOCK, A.D.; FISCHBACH, C. Oxygen-Controlled Three-Dimensional Cultures to Analyze Tumor Angiogenesis. **Tissue Engineering**. v. 16, n. 7, p. 2133- 2141, 2010.

VERMA, M.; PATEL, P.; VERMA, M. Biomarkers in prostate cancer epidemiology. **Cancers**, v. 3, p. 3773-3798, 2011.

VIRREY, J. J.; DONG, D.; STILES, C.; PATTERSON, J. B.; PEN, L.; NI, M.; SCHONTHAL, A. H.; CHEN, T. C.; HOFMAN, F. M.; LEE, A. S. Stress Chaperone GRP78/BiP Confers Chemoresistance to Tumor-Associated Endothelial Cells. **Molecular Cancer Research**, v. 6, n. 8, p. 1268- 1275, 2008.

XIE, Y.; WOLFF, D. W.; LIN, M.; TU, Y. Vasoactive intestinal peptide transactivates the androgen receptor through a protein kinase a-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway in prostate cancer LNCaP cells. **Molecular Pharmacology**, v. 72, p. 73-85, 2007.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2008.

WEINER, R. E.; THAKUR, M. L. Radiolabeled peptides in the diagnosis and therapy of oncological diseases. **Applied Radiation and Isotopes**, v. 57, p. 749-763, 2002.

WELLING, M. M.; VISENTINI, R.; FEITSMA, H. J. J.; LUPETTI, A.; PAUWELS, E. K. J.; NIBBERING, P. H. Infection detection in mice using ^{99m}Tc -labeled HYNIC and N_2S_2 chelate conjugated to the antimicrobial peptide UBI 29-41. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 31, n. 4, p. 503-509, 2004.

WHO – World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/en/>. Acesso: 22/11/2011.

YANG, D. J.; KIM, C.; SCHECHTER, N. R.; AZHDARINIA, A.; YU, D.; OH, C., BRYANT, J. L.; WON, J.; KIM, E. E.; PODOLOFF, D. A. Imaging with ^{99m}Tc -ECDG targeted at the multifunctional glucose transport system: feasibility study with rodents. **Radiology**, p. 465-473, 2003.

YU, S. Q.; LAI, K. P.; XIA, S. J.; CHANG, H. C.; CHANG, C.; YEH, S. The diverse and contrasting effects of using human prostate cancer cell lines to study androgen receptor roles in prostate cancer. **Asian Journal of Andrology**, v. 11, p. 39-48, 2009.

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 Research**, v. 64, p. 6707-6715, 2004.

ZHANG, H.; SCHUHMACHER, J.; WASER, B.; WILD, D.; EISENHUT, M.; REUBI, J. C.; MAECKE, H. R. DOTA-PESIN, a DOTA-conjugated bombesin derivative designed for the imaging and targeted radionuclide treatment of bombesin receptor-positive tumors. **European Journal of Nuclear Medicine Imaging**, v. 34, p. 1198-1208, 2007.

ZHANG, K.; ARUVA, M. R.; SHANTHLY, N.; CARDI, C. A.; RATTAN, S.; PATEL, C.; KIM, C.; McCUE, P. A.; WICKSTROM, E.; THAKUR, M. L. PET Imaging of VPAC1 expression in experimental and spontaneous prostate cancer. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 49, n. 1, p. 112-121, 2008.

ANEXO A – Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG).



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -**

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 34/2010**, relativo ao projeto intitulado "*Emprego do complexo 99MTC-HYNIC-BOMBESINA livre e encapsulado em lipossomas PH-sensíveis para identificação de tumores em modelo experimental*", que tem como responsável(is) **Valbert Nascimento Cardoso**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **28/ 04/2010**.

Este certificado expira-se em **28/ 04/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 34/2010**, related to the project entitled "*Utilization of 99MTC-HYNIC-BOMBESIN free and trapped in stealth liposomes to identify tumours in experimental model*", under the supervisors of **Valbert Nascimento Cardoso**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 28, 2010**.

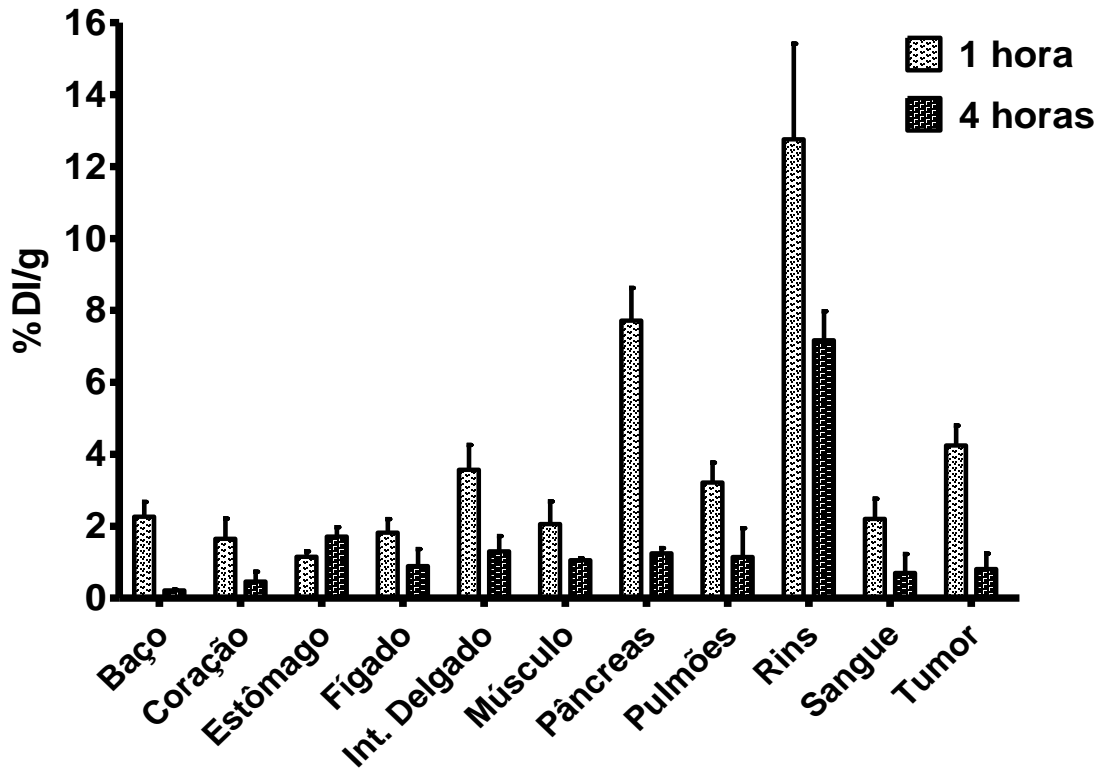
This certificate expires in **April 28, 2015**.

Belo Horizonte, 3 de Maio de 2010.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO B – Perfil de biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nos camundongos machos BALB/c nude com tumor de próstata com 15 dias de desenvolvimento (n=5).



ANEXO C – Perfil de biodistribuição do ^{99m}Tc -HYNIC- β Ala-Bombesina₍₇₋₁₄₎ nos camundongos machos BALB/c nude com tumor de próstata com 20 dias de desenvolvimento (n=5).

