

ESCOLA  
SUPERIOR  
DE TECNOLOGIA  
DA SAÚDE  
DE LISBOA



INSTITUTO  
POLITÉCNICO  
DE LISBOA

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**

**ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA**

**Análogos do Neuropeptídeo Y marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  para  
detecção de receptores Y1 expressos no cancro da mama**

**Marta Sofia de Oliveira Antunes**

Orientadora: Doutora Paula Dolores Galhofas Raposinho, IST/ITN

**Mestrado em Medicina Nuclear**

Área de Especialização – Radiofarmácia

**Lisboa, 2012**

**INSTITUTO POLITÉCNICO DE LISBOA**

ESCOLA SUPERIOR DE TECNOLOGIA DA SAÚDE DE LISBOA

**Análogos do Neuropeptído Y marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  para  
detecção de receptores Y1 expressos no cancro da mama**

**Marta Sofia de Oliveira Antunes**

Orientadora: Doutora Paula Dolores Galhofas Raposinho, IST/ITN

**Júri**

Doutor António Rocha Paulo

Doutora Ana Isabel Monteiro Grilo

Doutora Célia Maria da Cruz Fernandes

**Mestrado em Medicina Nuclear**

Área de Especialização – Radiofarmácia

(esta versão incluiu as críticas e sugestões feitas pelo júri)

**Lisboa, 2012**

*A Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa e o Instituto Politécnico de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.*



## Agradecimentos

À minha orientadora Doutora Paula Raposinho, a quem gostaria de fazer um especial agradecimento pelo entusiasmo, pelos ensinamentos, pela sua dedicação e simpatia e sobretudo pela imensa disponibilidade durante a realização deste trabalho.

Ao Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do IST/ITN, pela disponibilidade das instalações e material, sem o qual não teria sido possível a realização deste trabalho.

Ao doutorando Maurício Morais pela partilha de conhecimentos e pelo apoio fundamental na síntese do péptido. Muito obrigada!

À Doutora Filipa Mendes pelo empenho na realização do ensaio western blot.

À Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, na pessoa da Doutora Lina Vieira, pela disponibilização de recursos materiais que possibilitaram a realização de parte do trabalho.

Às minhas amigas Mafalda Mota e Susana Dimas pela amizade, apoio e incentivo, por estarem sempre presentes.

Ao Rafael pelo carinho e sobretudo pela compreensão e paciência em momentos mais difíceis.

À minha irmã Catarina pelo grande exemplo.

E finalmente, aos meus pais Teresa e Rogério, pelo amor incondicional, ajuda, paciência e por serem a minha maior referência.



## Resumo

O cancro da mama constitui uma das neoplasias mais frequentes, sendo por isso necessário melhorar as técnicas de imagem existentes, para um diagnóstico eficaz.

Os tumores sobreexpressam frequentemente receptores que permitem o seu alveijamento específico por radiopéptidos. Os receptores do neuropéptido Y (NPY) encontram-se entre os mais promissores candidatos, tornando-se alvos potencialmente úteis para imagem e terapia. O cancro da mama, em particular, apresenta uma elevada incidência e densidade na expressão destes receptores, especificamente do subtipo Y1. Um dos grandes desafios da radiofarmácia consiste, assim, na marcação de análogos do NPY com  $^{99m}\text{Tc}$ , para visualização do receptor Y1.

O objectivo deste trabalho consistiu em sintetizar e caracterizar química e radioquimicamente dois análogos do NPY (um curto e um longo), marcados com  $^{99m}\text{Tc}$  e respectiva avaliação biológica, em modelos tumorais de carcinoma da mama.

A síntese do análogo longo foi efectuada por síntese de péptidos em fase sólida (SPPS) automática, com irradiação de microondas e o crude peptídico obtido foi caracterizado por HPLC e espectrometria de massa. Os resultados demonstraram que a síntese não foi bem-sucedida.

A expressão do receptor Y1 foi avaliada, por western blot, em várias linhas celulares tumorais, tendo-se verificado elevada expressão do receptor em várias dessas linhas, em particular nas células MDA-MB-231 e MDA-MB-435S, de cancro da mama.

Não foi possível efectuar a marcação e avaliação biológica dos análogos do NPY. No entanto, resultados anteriores efectuados com o radiopéptido curto  $^{99m}\text{Tc}$ -pz-Glu-NPY1 demonstram uma baixa internalização celular (em células MCF-7 de cancro da mama), sugerindo um eventual comportamento antagonista, que deverá ser averiguado.

**Palavras-chave:** cancro da mama, NPY, receptor Y1, SPPS, pirazolo

## Abstract

Breast cancer is one of the most common cancers and therefore, there is a need to improve existing imaging techniques for effective diagnosis.

The tumors frequently overexpress receptors that allow its specific targeting by radiopeptides. Neuropeptide Y (NPY) receptors are among the most promising candidates, making it potentially useful for imaging and therapy. Breast cancer, in particular, shows a high incidence and density in expression of these receptors, specifically Y1 subtype. One of the great challenges of radiopharmacy consists therefore in radiolabeling NPY analogues with  $^{99m}\text{Tc}$ , for Y1-receptor targeting.

The aim of this work was to prepare and perform radiochemical and chemical characterization of two analogues of NPY (one short and one long), labeled with  $^{99m}\text{Tc}$  and its biological evaluation in tumor models of breast cancer.

Synthesis of the long analogue was achieved by automated solid phase peptide synthesis (SPPS), using microwave irradiation and the crude peptide obtained was characterized by HPLC and mass spectrometry. The results demonstrate that synthesis was not successful.

The Y1-receptor expression has been evaluated by western blot in several tumor cell lines and it was found a higher intensity of receptor expression in MDA-MB-231 and MDA-MB-435S breast cancer cells.

The radiolabeling and biological evaluation of NPY analogues was not possible. However, previous results with the short analogue  $^{99m}\text{Tc}$ -pz-Glu-NPY1 showed a low cell internalization (in MCF-7 breast cancer cells), suggesting an antagonist behavior for the radiopeptide, which should be investigated.

**Key-words:** breast cancer, NPY, Y1-receptor, SPPS, pyrazolyl

# Índice Geral

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>1.1 Cancro da mama</b> .....	1
1.1.1 Considerações gerais.....	1
1.1.2 Papel da medicina nuclear na abordagem ao cancro da mama.....	4
1.1.2.1 <sup>18</sup> F-FDG PET e PEM.....	5
1.1.2.2 Cintimamografia.....	7
1.1.2.3 Linfocintigrafia.....	9
1.1.2.4 Cintigrafia óssea e <sup>18</sup> F-Fluoreto PET.....	10
1.1.2.5 Radiofármacos específicos.....	13
<b>1.2 Péptidos como sondas de imagem molecular</b> .....	15
1.2.1 Considerações gerais.....	15
1.2.2 Características dos radiopéptidos.....	17
1.2.3 Radiomarcção de péptidos.....	20
1.2.3.1 Radiomarcção de péptidos com <sup>99m</sup> Tc.....	21
1.2.4 Síntese automática de péptidos em fase sólida.....	25
1.2.5 Análogos do Neuropeptido Y para imagem molecular de cancro da mama.....	29
1.2.5.1 Considerações gerais sobre o Neuropeptido Y.....	29
1.2.5.2 Análogos longos do Neuropeptido Y radiomarcados.....	31
1.2.5.3 Análogos curtos do Neuropeptido Y radiomarcados.....	33
<b>2. ÂMBITO E OBJECTIVOS DO TRABALHO</b> .....	35
<b>2.2 Objectivo geral</b> .....	35
<b>2.2 Objectivos específicos</b> .....	36
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	37
<b>3.1 Síntese e caracterização química do análogo longo do NPY</b> .....	37
3.1.1 Materiais.....	37
3.1.2 Procedimento experimental.....	37

<b>3.2 Cultura celular</b> .....	43
3.2.1 Materiais.....	43
3.2.2 Procedimento experimental.....	43
<b>3.3 Avaliação da expressão do receptor Y1</b> .....	45
3.3.1 Materiais.....	45
3.3.2 Procedimento experimental.....	46
3.3.2.1 Extractos celulares.....	46
3.3.2.2 Quantificação proteica.....	47
3.3.2.3 Ensaio Western Blot.....	47
<b>3.4 Marcação radioactiva dos análogos do NPY</b> .....	51
3.4.1 Materiais e procedimento experimental.....	51
<b>3.5 Estudos de internalização celular</b> .....	52
3.5.1 Materiais e procedimento experimental.....	52
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	53
<b>4.1 Considerações gerais</b> .....	53
<b>4.2 Síntese e caracterização química do análogo longo do NPY</b> .....	53
<b>4.3 Avaliação da expressão do receptor Y1</b> .....	56
<b>4.4 Marcação radioactiva do pz-Glu-NPY1</b> .....	58
<b>4.5 Internalização celular do <sup>99m</sup>Tc-pz-Glu-NPY1</b> .....	60
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	65
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	67
<b>APÊNDICES</b> .....	73

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.1</b> – Classificação histológica geral dos tumores mamários, com base no critério da invasão tumoral.....	3
<b>Tabela 1.2</b> – Propriedades, simbologia e estrutura dos aminoácidos proteinogénicos.....	15
<b>Tabela 1.3</b> – Radiopéptidos em estudos clínicos na Europa, os respectivos receptores peptídicos e indicações clínicas.....	19
<b>Tabela 1.4</b> – Expressão dos receptores do NPY em tumores humanos e nos tecidos normais correspondentes.....	31
<b>Tabela 2.1</b> – Sequência peptídica do hNPY, pNPY e dos dois análogos (longo e curto), em estudo.....	35
<b>Tabela 3.1</b> – Lista de solventes e reagentes utilizados na síntese e caracterização química do análogo longo do NPY.....	37
<b>Tabela 3.2</b> – Lista dos materiais utilizados nos procedimentos de cultura celular.....	43
<b>Tabela 3.2</b> – Lista dos materiais utilizados na realização de extractos celulares, quantificação proteica e ensaio Western Blot.....	46
<b>Tabela 4.1</b> – Valores de afinidade para o receptor Y1 de vários análogos do NPY (curtos e longos).....	63



## Índice de Figuras

<b>Figura 1.1</b> – Taxa de incidência de cancro da mama por 100.000 mulheres, a nível mundial.....	2
<b>Figura 1.2</b> – $^{18}\text{F}$ -FDG PET de uma paciente com cancro da mama. A imagem demonstra captação fisiológica no cérebro, bexiga, rins, intestinos, músculos e fígado e lesões metastáticas supraclaviculares e mediastínicas .....	6
<b>Figura 1.3</b> – Mamografia e PEM da mesma paciente. (A) Na mamografia verifica-se densidade fibroglandular, com microcalcificações não-palpáveis, considerada provavelmente benigna pelo clínico. (B) Nas imagens PEM, evidencia-se captação focal intensa, confirmada por biopsia como carcinoma ductal <i>in situ</i> .....	7
<b>Figura 1.4</b> – Composição de imagens de cintimamografia de várias pacientes com lesões mamárias, obtidas num equipamento dedicado de dois detectores. IDC – carcinoma ductal infiltrativo; ILC – carcinoma lobular infiltrativo; DCIS – carcinoma ductal <i>in situ</i> .....	9
<b>Figura 1.5</b> – Linfocintigrafia para pesquisa de gânglio sentinela em paciente com tumor mamário. Imagens em projecção anterior, com identificação do gânglio sentinela axilar (A) e um gânglio linfático satélite da cadeia mamária interna (B).....	10
<b>Figura 1.6</b> – Imagens de restadiamento de uma paciente do sexo feminino de 52 anos, com cancro da mama, 6 meses após mastectomia da mama direita e remoção de nódulos linfáticos axilares. Os estudos SPECT com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP (A) e PET com $^{18}\text{F}$ -Fluoreto (B) demonstram múltiplas lesões ósseas metastáticas .....	12
<b>Figura 1.7</b> – Estrutura típica de uma sonda peptídica (específica) para imagem tumoral.....	18
<b>Figura 1.8</b> – Estrutura química dos ligandos poliaminopolicarboxílicos mais comuns.....	20
<b>Figura 1.9</b> – Gerador de $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ de coluna seca .....	21
<b>Figura 1.10</b> – Diagrama de decaimento radioactivo do $^{99}\text{Mo}$ e do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .....	22
<b>Figura 1.11</b> – Condições de preparação do precursor $\text{fac-}[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ , através do kit <i>Isolink</i> <sup>®</sup> . $\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$ – redutor e fonte de CO; $\text{Na}_2$ (tartarato) – ligando que estabiliza os estados de oxidação intermédios do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , evitando a formação de $^{99\text{m}}\text{TcO}_2$ ; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ e $\text{Na}_2\text{CO}_3$ – bases que mantêm o pH básico, pois o boranocarbonato é instável a pH ácido.....	23
<b>Figura 1.12</b> – Complexos- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ com diferentes AQBFS, formados a partir do precursor tricarbonilo.....	24

<b>Figura 1.13</b> – Estrutura genérica do AQBF derivado do pirazolo (pz).....	25
<b>Figura 1.14</b> – Princípio da SPPS. X: grupo protector $N^{\alpha}$ temporário. Y: grupo protector semi-permanente da cadeia lateral. R: C-terminal .....	27
<b>Figura 1.11</b> – Estrutura química dos grupos Boc (A) e Fmoc (B).....	27
<b>Figura 1.12</b> – Grupos protectores das cadeias laterais dos aminoácidos, mais usados na estratégia Fmoc.....	28
<b>Figura 1.13</b> – Reagentes de acoplamento mais comuns.....	29
<b>Figura 1.14</b> – Modelo computacional representativo da estrutura do neuropéptido Y.....	30
<b>Figura 3.1</b> – Sintetizador automático de péptidos, por microondas (Liberty, CEM™) existente nas instalações do Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do IST/ITN.....	38
<b>Figura 3.2</b> – Estrutura química da resina Rink Amide MBHA.....	38
<b>Figura 3.3</b> – Desprotecção $N^{\alpha}$ , através da piperidina .....	40
<b>Figura 3.4</b> – Gradiente de HPLC do controlo analítico do crude peptídico.....	42
<b>Figura 3.5</b> – Esquema representativo da electroforese em gel de poliacrilamida-SDS.....	48
<b>Figura 3.6</b> – Transferência das amostras proteicas do gel para a membrana de nitrocelulose.....	49
<b>Figura 4.1</b> – HPLC do controlo analítico ao crude peptídico (azul) e “branco” realizado previamente (preto) (detector UV).....	54
<b>Figura 4.2</b> – Espectro de massa (ESI-MS) do crude peptídico.....	55
<b>Figura 4.3</b> – Curva padrão, para determinação da quantificação proteicas nos extractos celulares.....	57
<b>Figura 4.4</b> – (A) Gel de acrilamida (corado) com todas as amostras proteicas. (B) Análise western blot da expressão do receptor Y1, em várias linhas celulares tumorais.....	57
<b>Figura 4.5</b> – Síntese do radiocomplexo $^{99m}\text{Tc-pz-Glu-NPY1}$ .....	59
<b>Figura 4.6</b> – (A) HPLC do complexo $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-pz-Glu-NPY1}$ (detector $\gamma$ ) após purificação ( $T_R=19,3$ min). (B) – Identificação química do complexo $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-pz-Glu-NPY1}$ (cor-de-rosa) por comparação com o complexo $\text{Re}(\text{CO})_3\text{-pz-Glu-NPY1}$ (azul) (detector UV).....	60
<b>Figura 4.7</b> – Internalização do complexo $^{99m}\text{Tc-pz-GluNPY1}$ purificado em células MCF-7.....	61

## Lista de Abreviaturas e Acrónimos

**Ac** – Anticorpo

**AM** – Ácido[(R,S)- $\alpha$ [1-(9H-Fluoreno-9-il)-metoxiformamido]-2,4-dimetoxibenzilo]fenoxiacético

**AMPC** – Adenosina monofosfato cíclica

**AQBF** – Agente quelante bifuncional

**Boc** – butoxicarbonil

**BSA** – Albumina de soro bovino (*Bovine serum albumin*)

**CB** – “*Cross-bridge*”

**CB-TE2A** – 4,11-bis(carboximetil)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6,6,2]hexadecano

**CCK** – Colecistoquinina

**CDIS** – Carcinoma ductal *in situ*

**CLIS** – Carcinoma lobular *in situ*

**COMU** – 1-[(1-(cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)-dimethylaminomorpholino methylene)]methanaminium hexafluorophosphate

**CPPC** – Cancro do pulmão de pequenas células

**CT** – Tomografia Computorizada (*Computed Tomography*)

**DC** – *Detergent-compatible*

**DCC** – N,N'-diciclohexilcarbodiimida

**DCM** – Diclorometano

**DI** – Dose injectada

**DIC** – N, N'-diisopropilcarbodiimida

**DIPEA** – N,N-Diisopropiletilamina

**DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**DMF** – N,N-Dimetilformamida

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DTT** – Ditiotreitól

**DOTA** – Ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético

**DTPA** – Ácido dietilenotriaminopentacético

**ECACC** – *European Collection of Cell Cultures*

**EGFR** – Receptor do factor de crescimento epidérmico

**eq** – Equivalente

**ER** – Receptor do estrogénio

**ESI-MS** – Espectrometria de Massa com Ionização por Electrospray

**FBS** – Soro fetalico bovino (*Fetal bovine serum*)

**FDA** – *Food and Drug Administration*

**FES** – 16- $\alpha$ - $^{18}\text{F}$ fluoro-17- $\beta$ -estradiol

**$^{18}\text{F}$ -FDG** –  $^{18}\text{F}$ -Fluorodesoxiglucose (*[ $^{18}\text{F}$ ]-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose*)

**Fmoc** – 9-Fluorenilmetiloxicarbonil

**Fmoc-AA-OH** – Aminoácido protegido com o grupo Fmoc

**GRP** – Péptido libertador de gastrina

**HATU** – N-[(*dimethylamino*)-1H-1,2,3-triazole[4,5-*b*]pyridine-1-ylmethylene]-N-methylmethanaminium hexafluorophosphate N-oxide

**HBTU** – hexafluorofosfato de 2-(1H-Benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurônio

**HER2** – Receptor-2 do factor de crescimento epidérmico humano

**HF** – Ácido hidrofluorídrico

**HOBt** – 1-hidroxibenzotriazol

**HEPES** – Ácido N-2-hidroxietil-piperazina-N-etanosulfónico

**HPLC** – Cromatografia líquida de alta pressão

**HRP** – Enzima peroxidase de rabanete

**IARC** – Agência Internacional de Investigação do Cancro (*International Agency for Research on Cancer*)

**IGF-1R** – Receptor do factor de crescimento insulínico tipo 1

**IRM** – Imagem por Ressonância Magnética

**IST/ITN** – Instituto Superior Técnico/ Instituto Tecnológico e Nuclear

**IUPAC-IUB** – *International Union of Pure and Applied Chemistry - International Union of Biochemistry*

**MBHA** – p-metilbenzidrilamina

**$\alpha$ -MSH** –  $\alpha$ -Hormona estimuladora das melanocortinas

**MTT** – 4-metil-tritil

**NMP** – N-metil-2-pirrolidona

**NOTA** – Ácido 1,4,7-triazaciclono-nano-1,4,7-triacético

**NPY** – Neuropeptido Y

**PAGE** – Electroforese em gel de poliacrilamina

**Pbf** – 2,2,4,6,7-pentametil-diidrobenzofurano-5-sulfonil

**PBS** – Tampão fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)

**PEG** – Polietilenoglicol

**PEM** – Mamografia por emissão de positrões (*Positron Emission Mammography*)

**PET** – Tomografia por emissão de positrões (*Positron Emission Tomography*)

**PNGase F** – *Peptide N-Glycosidase F*

**PSA** – Persulfato de amónio

**PyBOP** – *1-benzotriazolyl-oxo-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate*

**RGD** – Arginina-Glicina-Ácido aspártico

**rpm** – Rotações por minuto

**RP-HPLC** – Cromatografia líquida de alta pressão em fase reversa

**RPMI** – meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

**SDS** – Dodecil sulfato de sódio

**SPECT** – Tomografia por emissão de fóton único (*Single Photon Emission Computed Tomography*)

**SPPS** – Síntese de péptidos em fase sólida (*Solid-phase Peptide Synthesis*)

**t-Bu** – *tert*-butil

**<sup>99m</sup>Tc-HMDP** – <sup>99m</sup>Tc-hidroximetileno difosfonato

**<sup>99m</sup>Tc-MDP** – <sup>99m</sup>Tc-metileno difosfonato

**TETA** – Ácido 1,4,8,11-tetraazaciclododecano-1,4,8,11-tetraacético

**TFA** – Ácido trifluoroacético

**TGF-β** – Factor transformador de crescimento β

**TEMED** – N,N,N',N'-tetrametilenediamina

**T<sub>R</sub>** – Tempo de retenção

**Tris** – Tris(hidroximetil)aminometano

**Trt** – Tritel

**US** – Ultrassonografia

**VEGF** – Factor de crescimento vascular endotelial

**VIP** – Péptido intestinal vasoactivo

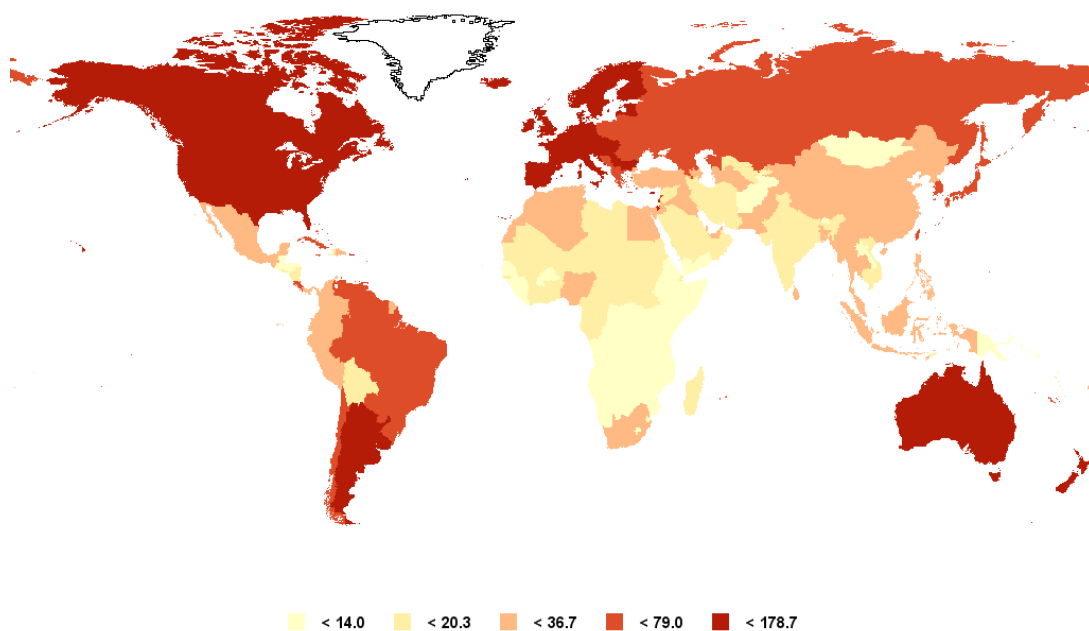
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 CANCRO DA MAMA

### 1.1.1 Considerações gerais

Hoje em dia, as doenças neoplásicas constituem um grave problema de saúde pública a nível mundial. Segundo as estimativas do mais recente projecto da Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC) – GLOBOCAN 2008 – ocorreram 12,7 milhões de novos casos de cancro e 7,6 milhões de mortes por cancro em todo o mundo, no ano de 2008 (1). De facto, a incidência do cancro está a aumentar em vários países, como resultado de diversos factores, de onde se destaca o envelhecimento da população, bem como determinados estilos de vida associados a hábitos pouco saudáveis, nomeadamente o sedentarismo, dieta desequilibrada e consumo de álcool e tabaco (2).

O cancro da mama, em particular, é o tumor maligno mais frequente em todo o mundo, constituindo cerca de 23% (1,38 milhões) de todos os novos casos de cancro, estimados em 2008. Esta neoplasia ocupa o quinto lugar entre as causas de morte mais frequentes por doença oncológica, constituindo cerca de 14% (458 mil) do número total de óbitos por cancro e a principal causa de morte nas mulheres. Actualmente, é o tipo de cancro com maior incidência quer nos países desenvolvidos, quer nos países em desenvolvimento. As taxas de incidência variam entre 19,3 por 100.000 mulheres na África Ocidental e 89,9 por 100.000 mulheres na Europa Ocidental. A incidência é mais elevada (> 80/100.000) nas regiões desenvolvidas (com excepção do Japão) e mais baixa (< 40/100.000) nas regiões menos desenvolvidas. As taxas de mortalidade por cancro da mama são significativamente mais baixas (6-19 por 100.000 mulheres) do que as da incidência, devido à sobrevivência mais favorável nas regiões desenvolvidas. A elevada incidência, juntamente com um prognóstico geralmente favorável, faz com que o cancro da mama seja igualmente o tumor com maior prevalência, estimando-se que se encontram vivas aproximadamente 5,19 milhões de mulheres a quem foi diagnosticada a doença nos últimos cinco anos (1,2). Na Europa, designadamente em Portugal, é também o tipo de cancro com maior incidência e a principal causa de morte por neoplasia na população feminina (16% do total de mortes por causa oncológica) (1,3). Na figura 1.1, encontra-se representada a incidência de cancro da mama na população feminina, nas diferentes regiões mundiais (1).



**Figura 1.1** – Taxa de incidência de cancro da mama por 100.000 mulheres, a nível mundial (1).

Aproximadamente um terço das mulheres com cancro da mama desenvolvem metástases à distância (especialmente nos nódulos linfáticos, osso, fígado e pulmões), o que agrava significativamente o prognóstico e diminui a probabilidade de sobrevivência. Estima-se que uma em cada nove mulheres venham a desenvolver cancro da mama, em alguma altura da sua vida. A população masculina também é susceptível à doença, contudo, o aparecimento de cancro da mama em homens é considerado raro (2,3). São vários os factores de risco associados ao cancro da mama, incluindo: história familiar de cancro, primeira gravidez tardia, nuliparidade, menarca precoce, menopausa tardia, obesidade (especialmente em mulheres pós-menopausa), determinados tipos de medicação (e.g. contraceptivos orais e terapia hormonal pós-menopausa) e ingestão de álcool. Por outro lado, determinados factores encontram-se associados com a diminuição do risco de desenvolvimento desta neoplasia, nomeadamente: gravidez precoce, amamentação e actividade física regular (2). A partir da década de 90, verificou-se uma diminuição significativa da mortalidade e morbilidade por cancro da mama em vários países europeus, bem como nos Estados Unidos da América, o que se deveu sobretudo aos avanços nos métodos de detecção da doença e à evolução e disponibilização de tratamentos mais adequados e eficazes. Actualmente, as modalidades terapêuticas (locais e sistémicas) mais frequentemente utilizadas no cancro da mama envolvem a cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal (1-3).

Todos os carcinomas da mama são classificados, pela Organização Mundial de Saúde, com base no tipo histológico e/ou citológico. Ademais, devem sempre ser tidos em conta factores como: localização; tamanho; forma; consistência; cor; aparência das margens; e relação com estruturas mamárias (e.g. mamilo, pele) ou extramamárias adjacentes (e.g. músculo). A característica histológica mais importante do tumor primário (com origem nas células epiteliais mamárias) é a presença ou ausência de invasão tumoral para além da arquitectura ductal (tabela 1.1). Tumores que não ultrapassam os limites estruturais dos ductos mamários, são designados não invasivos e raramente metastizam. Por outro lado, os tumores invasivos demonstram capacidade de disseminação, através do sistema linfático ou hematológico (4).

**Tabela 1.1** – Classificação histológica geral dos tumores mamários, com base no critério da invasão tumoral.

<b>Não-invasivo</b>
Carcinoma ductal <i>in situ</i> (CDIS)
Carcinoma lobular <i>in situ</i> (CLIS)
<b>Invasivo</b>
Carcinoma ductal invasivo
Carcinoma lobular invasivo
Outras variantes menos comuns

Outras características histológicas relevantes incluem a localização do tumor no sistema ducto-lobular (ductal, lobular ou misto), a presença ou ausência de invasão linfovascular e microcalcificações. A expressão de receptores hormonais (e.g. receptor do estrogénio, receptor da progesterona e HER2/neu) constitui outra característica relevante, na classificação dos tumores mamários, uma vez que se correlaciona com a agressividade e comportamento tumoral (4).

A existência de um sistema de estadiamento do cancro da mama (TNM – que caracteriza o tumor (T), nódulos linfáticos (N) e metástases (M)) é bastante importante, pois permite prever o prognóstico, fornecendo simultaneamente informação fundamental acerca das opções de tratamento mais adequadas para cada estadio da doença (apêndice 1) (4).

As modalidades de imagem médica desempenham um papel fundamental no acompanhamento clínico de doentes com cancro da mama, nos vários estadios da doença (detecção e diagnóstico inicial, estadiamento e monitorização da eficácia

terapêutica). Actualmente, o principal objectivo da imagem clínica de cancro da mama – identificar tumores de dimensões reduzidas, em mulheres assintomáticas – assenta no princípio já bem estabelecido, de que a detecção precoce promove um aumento da sobrevida. Como tal, têm sido efectuados esforços consideráveis no sentido de melhorar a capacidade das técnicas de imagem, na detecção de lesões tumorais de cancro da mama. No entanto, distinguir diferenças entre tecido normal e neoplásico em estudos radiológicos (traduzidas em diferenças de parâmetros de imagem), pode tornar-se desafiante, uma vez que os dois tipos de tecidos apresentam características variáveis que se podem confundir e sobrepor. Como resultado, a obtenção de falsos-positivos e falsos-negativos é comum.

A mamografia é considerada o *gold standard* na detecção desta neoplasia, encontrando-se associada a uma redução de cerca de 40% na taxa de mortalidade. Ainda assim, apresenta valores de sensibilidade e especificidade moderados, como resultado de limitações relacionadas com diversos parâmetros (e.g. tamanho e localização das lesões tumorais, bem como com a densidade do tecido mamário). Neste sentido, recorre-se actualmente a técnicas de imagem complementares mais robustas, de forma a aumentar a eficácia na detecção de cancro da mama, nomeadamente a ultrassonografia (US) e imagem por ressonância magnética (IRM). A disponibilidade, facilidade de utilização e capacidade de produzir imagens em tempo-real, são factores que fazem da US um dos principais métodos de imagem para guiar biopsias de tecido mamário, bem como outros procedimentos de intervenção. Já a IRM constitui uma ferramenta clínica emergente, especialmente utilizada na determinação da extensão da doença (detecção de doença multifocal e multicêntrica), numa fase pré e pós cirúrgica (5).

### **1.1.2 Papel da medicina nuclear na abordagem ao cancro da mama**

As modalidades de imagem utilizadas de forma mais rotineira na prática clínica diária, na realização do diagnóstico e/ou estadiamento de pacientes com cancro da mama (e.g. mamografia, US e IRM), revelam-se de algum modo limitadas, uma vez que apenas fornecem informação essencialmente anatómica/morfológica. Por sua vez, a imagem molecular, onde se inserem as modalidades de imagem da Medicina Nuclear tomografia por emissão de fotão único (SPECT) e tomografia por emissão de positrões (PET), pode dar um contributo essencial na abordagem clínica efectuada ao paciente, desempenhando um papel bastante relevante no diagnóstico, estadiamento

e restadiamento da doença, bem como na avaliação da resposta à terapia. De facto, a imagem molecular apresenta várias potencialidades, designadamente a capacidade de oferecer informação funcional (patofisiológica) dos vários tecidos e órgãos. Assim, torna possível a visualização, caracterização e quantificação de processos biológicos a nível celular e molecular, nomeadamente do metabolismo e proliferação tumoral (6,7). Ademais, torna-se bastante útil e pertinente para o conhecimento da expressão de alvos moleculares específicos das lesões tumorais, o que constitui valor adicional para a optimização das modalidades de terapia direccionada (8). Quando aplicada ao cancro da mama, a imagem molecular recorre a variações em diversas características tecidulares (e.g. vascularização, expressão de antigénios, metabolismo da glucose, pH intersticial e concentração de oxigénio), de forma a distinguir tecido normal e neoplásico (6,7).

A potencialidade da Medicina Nuclear na monitorização da resposta do tumor à terapia é de particular interesse, uma vez que possibilita uma avaliação da eficácia terapêutica, para além das alterações anatómicas (e.g. dimensão das lesões). Isto é, permite avaliar fenómenos fisiológicos ou metabólicos que geralmente precedem os morfológicos e que podem constituir indicadores precoces de adaptação/ resistência tumoral (8).

As modalidades de imagem molecular SPECT e PET apresentam, geralmente, bons resultados na detecção de lesões neoplásicas de cancro da mama. Entre os estudos de imagem de medicina nuclear, com maior pertinência na aplicação ao cancro da mama, destacam-se:  $^{18}\text{F}$ -FDG PET e PEM, cintimamografia, linfocintigrafia, cintigrafia óssea e estudos com radiofármacos específicos.

### 1.1.2.1 $^{18}\text{F}$ -FDG PET e PEM

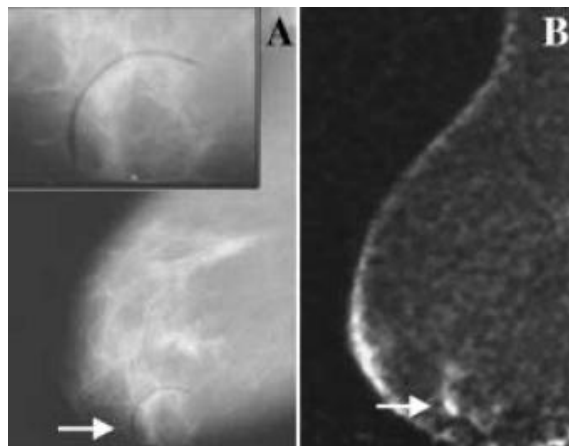
A  $^{18}\text{F}$ -Fluorodesoxiglucose (FDG) constitui o radiofármaco PET mais utilizado no âmbito oncológico. Sendo um análogo da glucose, a  $^{18}\text{F}$ -FDG permite a visualização do metabolismo glicolítico, que geralmente se encontra aumentado nas células neoplásicas, comparativamente às células normais. A FDG é transportada para o meio intracelular através das proteínas transportadoras da glucose e é posteriormente fosforilada pela hexocinase. A FDG-6-fosfato (formada após fosforilação) não progride na cadeia glicolítica, ficando retida a nível celular. A acumulação do composto nas células malignas, leva a uma elevada razão tumor/fundo, o que proporciona uma boa qualidade de imagem (6). A figura 1.2 é exemplificativa de um estudo PET com  $^{18}\text{F}$ -FDG, de uma paciente com cancro da mama.

A captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG pelas células do carcinoma da mama, encontra-se correlacionada com alguns factores, e.g. tipo histológico, índice de proliferação celular (quanto maior a proliferação, maior a captação), tamanho das lesões tumorais (menor sensibilidade para lesões < 1 cm) e grau de diferenciação celular. O carcinoma ductal *in situ* e as formas bem-diferenciadas de cancro da mama são os tipos de tumor em que se verifica uma captação de  $^{18}\text{F}$ -FDG mais reduzida (6,7,9,10). Devido à sua captação por vários tecidos com elevado metabolismo da glucose, a  $^{18}\text{F}$ -FDG apresenta algumas limitações como radiotraçador tumoral, nomeadamente a falta de especificidade. De facto, observam-se frequentemente resultados falsos-positivos, e.g. captação na ectasia ductal, na displasia proliferativa da mama e em tecido inflamatório/infeccioso (7). As principais aplicações da  $^{18}\text{F}$ -FDG PET no cancro da mama incidem essencialmente: no estadiamento (detecção de disseminação locoregional e à distância da doença), contribuindo para a decisão sobre o tratamento mais adequado para a paciente; na avaliação de recorrência tumoral e monitorização pós terapêutica (7,9,10). Contudo, a  $^{18}\text{F}$ -FDG PET não se encontra indicada para a detecção/visualização de lesões primárias de cancro da mama por várias razões (e.g. falta de resolução espacial, efeito de volume parcial, posicionamento da paciente inadequado e artefactos de movimento respiratório) (11). A  $^{18}\text{F}$ -FDG PET apresenta uma sensibilidade consideravelmente elevada (78-100%) e uma especificidade bastante variável (20-100%), na detecção de metástases à distância (12). A eficácia da técnica pode ser melhorada pela introdução da tomografia computadorizada (TC) – modalidade híbrida PET/TC – através da qual é possível obter simultaneamente uma melhor localização anatómica das lesões e correcção de atenuação das imagens PET.



**Figura 1.2** –  $^{18}\text{F}$ -FDG PET de uma paciente com cancro da mama. A imagem demonstra captação fisiológica no cérebro, bexiga, rins, intestinos, músculos e fígado e lesões metastáticas supraclaviculares e mediastínicas (6).

A  $^{18}\text{F}$ -FDG pode também ser utilizada no âmbito da mamografia por emissão de positrões (PEM), uma técnica emergente de elevada resolução, que tem por base um equipamento dedicado, que consiste na compressão da mama por dois detectores planares opostos (figura 1.3). Ao contrário da PET convencional, a  $^{18}\text{F}$ -FDG PEM é útil na detecção inicial e no diagnóstico de cancro da mama, permitindo a visualização de lesões primárias de dimensões reduzidas (3 mm) (6,9,11). Os resultados de um estudo multicêntrico demonstraram uma sensibilidade de 91% e especificidade de 93% da PEM, na detecção de lesões de cancro da mama (13).



**Figura 1.3** – Mamografia e PEM da mesma paciente. (A) Na mamografia verifica-se densidade fibroglandular, com microcalcificações não-palpáveis, considerada provavelmente benigna pelo clínico. (B) Nas imagens PEM, evidencia-se captação focal intensa, confirmada por biopsia como carcinoma ductal *in situ* (5).

Apesar de a  $^{18}\text{F}$ -FDG apresentar, actualmente, uma vasta aplicação no contexto oncológico, não constitui um radiotraçador específico do cancro da mama, fornecendo apenas informação relativa à actividade metabólica dos tumores (6-8).

### 1.1.2.2 Cintimamografia

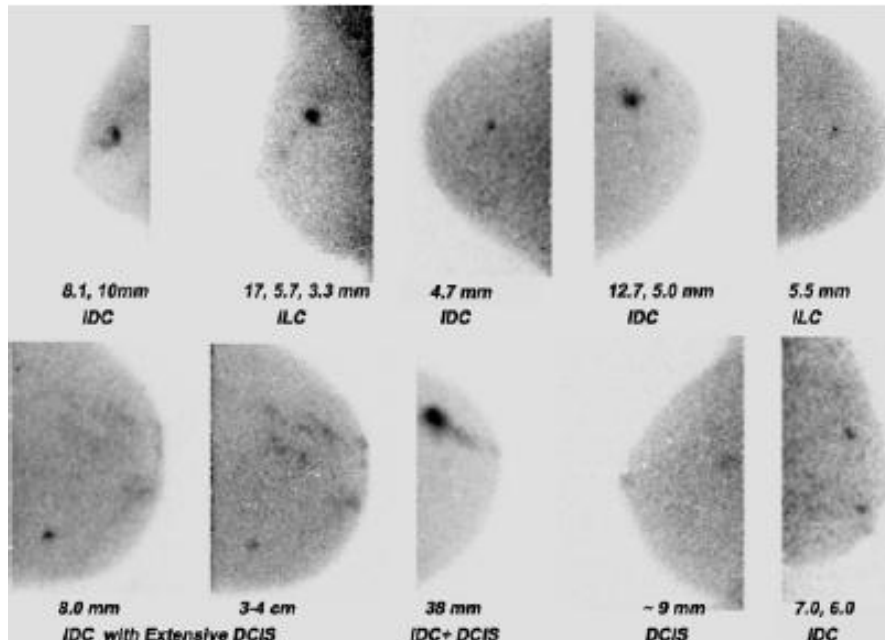
A cintimamografia insere-se no âmbito da Medicina Nuclear convencional e é realizada geralmente com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Sestamibi. Este radiofármaco, inicialmente utilizado apenas como agente de perfusão do miocárdio, consiste numa pequena molécula catiónica e lipofílica, que atravessa a membrana celular por difusão passiva, em função da diferença de potencial eléctrico da membrana (90 mV) e concentra-se essencialmente (cerca de 95%) nas mitocôndrias (cuja membrana apresenta um potencial de 200 mV). O mecanismo de captação celular desta molécula encontra-se relacionado com um metabolismo energético e/ou proliferação celular aumentados.

Assim, a captação de  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi pelas células neoplásicas depende de vários factores, e.g. fluxo sanguíneo regional, potencial eléctrico da membrana plasmática e mitocondrial, angiogénese e metabolismo celular. Vários estudos demonstraram que a captação de  $^{99m}\text{Tc}$ -Sestamibi é superior em tipos de carcinoma da mama com características mais agressivas (e.g. elevados índices de proliferação celular, elevada densidade microvascular e elevado fluxo sanguíneo tumoral). Contudo, o mecanismo de captação tumoral destes radiofármacos não se encontra completamente esclarecido (7,9,10,14).

A cintimamografia apresenta uma sensibilidade de 85% e especificidade de 84%, na detecção de lesões primárias da mama. Quanto à detecção de metástases nodulares axilares, esta técnica apresenta uma sensibilidade de 77-79% e especificidade de 84-89% (10). Os falsos-positivos obtidos na cintimamografia incluem: infecção; inflamação; doença granulomatosa; fibroadenoma; doença fibroquística; papiloma intraductal; e hiperplasia focal atípica. Por outro lado, a existência de lesões de dimensões reduzidas (< 1 cm) e/ou não-palpáveis, leva frequentemente à obtenção de falsos-negativos. Ainda assim, a técnica híbrida SPECT/TC permite melhorar a detecção de lesões pequenas (9,10,14). A realização de cintimamografia encontra-se especialmente indicada em casos de mamografia inconclusiva, mamas densas, mamas com implantes, lesões mamárias multifocais e/ou bilaterais, pacientes de alto risco, pesquisa de disseminação nodular axilar, microcalcificações questionáveis e previsão e avaliação da resposta do tumor à quimioterapia (10,14).

A realização de cintimamografia através de uma câmara-gama convencional é limitada pela resolução espacial intrínseca relativamente baixa e geometria de detecção sub-ótima (devido à distância entre o detector e a mama). Mais recentemente, têm sido desenvolvidas câmaras-gama de elevada resolução, constituindo equipamentos dedicados com campos de visão e detectores mais reduzidos, que permitem a técnica de compressão mamária. Estas câmaras possibilitam igualmente uma maior flexibilidade no posicionamento da paciente, o que se traduz em melhor qualidade de imagem, na medida em que é possível reduzir a interferência de outros órgãos na imagem (particularmente coração e fígado), conduzindo a um aumento significativo na razão alvo-fundo. Os resultados preliminares da utilização destes equipamentos dedicados, na visualização de lesões mamárias pré-biópsia, demonstraram uma melhoria na detecção de lesões não-palpáveis, lesões inferiores a 1 cm e carcinoma *in situ*, comparativamente às câmaras-

gama convencionais (10,14). Na figura 1.4 observam-se alguns exemplos de lesões mamárias, de dimensões reduzidas, visualizadas através de cintimamografia.

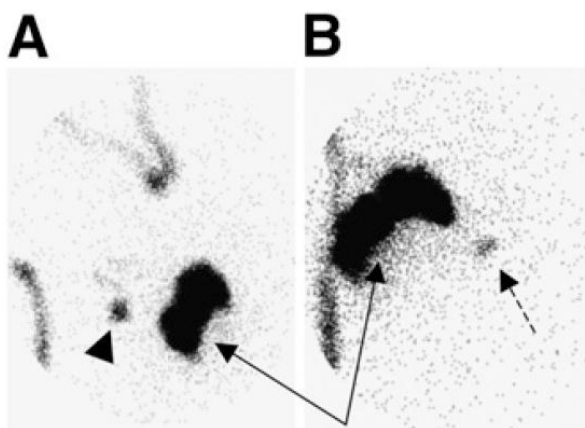


**Figura 1.4** – Composição de imagens de cintimamografia de várias pacientes com lesões mamárias, obtidas num equipamento dedicado de dois detectores. IDC – carcinoma ductal infiltrativo; ILC – carcinoma lobular infiltrativo; DCIS – carcinoma ductal *in situ* (10).

### 1.1.2.3 Linfocintigrafia

A presença de gânglios axilares metastizados continua a ser um dos parâmetros mais importantes no prognóstico do cancro da mama. A linfocintigrafia consiste numa técnica baseada na pesquisa e determinação do gânglio sentinela – definido como o primeiro gânglio de uma determinada região ganglionar a receber drenagem linfática de um tumor primário. Após o sucesso da aplicação inicial deste conceito, no estadiamento de melanoma cutâneo, o mesmo foi aplicado ao cancro da mama. Nesta metodologia, é utilizado um radiofármaco coloidal (e.g.  $^{99m}\text{Tc}$ - colóides de enxofre ou derivados de albumina), que após ser injectado no tumor por injeção intratumoral, peritumoral ou periaureolar, é drenado pelos vasos linfáticos até ao gânglio linfático mais próximo. Desta forma, o gânglio sentinela e eventualmente os gânglios adjacentes (designados por satélites) são identificados por imagem e/ou sonda- $\gamma$ , sendo posteriormente removidos cirurgicamente e analisados. Caso as amostras examinadas sejam negativas quanto à presença de células malignas disseminadas, a

probabilidade de envolvimento metastático nos restantes gânglios da cadeia linfática axilar é bastante reduzida e como tal, o esvaziamento axilar total é evitado. Por outro lado, se se verificar a presença de células neoplásicas no gânglio sentinela, a remoção ganglionar total pode ser necessária, para avaliar a extensão da disseminação metastática axilar. A linfocintigrafia permitiu, desta forma, diminuir a morbilidade (e.g. incluindo uma incidência significativa de linfedema), associada ao procedimento tradicional de estadiamento nodular axilar, que consistia na remoção cirúrgica total dos gânglios linfáticos axilares (7,9,10). A figura 1.5 é exemplificativa de uma pesquisa de gânglio sentinela, através de linfocintigrafia, numa paciente com tumor mamário.



**Figura 1.5** – Linfocintigrafia para pesquisa de gânglio sentinela em paciente com tumor mamário. Imagens em projecção anterior, com identificação do gânglio sentinela axilar (A) e um gânglio linfático satélite da cadeia mamária interna (B) (9).

#### 1.1.2.4 Cintigrafia óssea e <sup>18</sup>F-Fluoreto PET

Cerca de 30-85% dos pacientes com cancro da mama, em estadios avançados da doença, desenvolvem metástases ósseas, podendo estas ser de origem osteoblástica (formação óssea), osteoclástica (reabsorção óssea) ou lesões mistas. Os locais mais comuns de metastização óssea incluem a coluna vertebral, pélvis, costelas, crânio e fémur. As metástases ósseas deterioram significativamente a qualidade de vida do paciente, pois geralmente causam complicações (e.g. dor óssea, fracturas patológicas, hipercalcémia e compressão da medula espinal). A detecção precoce de doença metastática óssea permite prevenir tais complicações, e consequentemente melhora a qualidade de vida dos pacientes, bem como a sua sobrevivência (9,15).

A cintigrafia óssea constitui o método mais utilizado, no âmbito da Medicina Nuclear convencional, na detecção de metástases ósseas de pacientes com cancro da mama. Os radiofármacos mais comuns para a realização deste exame, são os

difosfonatos  $^{99m}\text{Tc}$ -metileno difosfonato ( $^{99m}\text{Tc}$ -MDP) e  $^{99m}\text{Tc}$ -hidroximetileno difosfonato ( $^{99m}\text{Tc}$ -HMDP), cuja captação em metástases ósseas reflecte a vascularização e actividade osteoblástica (remodelação óssea) aumentada, que geralmente se verifica neste tipo de lesões. Esta técnica apresenta uma sensibilidade de 62-100% e especificidade de 78-100%, na detecção de lesões ósseas metastáticas. Apesar de ser considerada uma técnica bastante sensível a um custo razoável, é limitada pela frequente falta de especificidade, visto que vários outros processos patológicos (e.g. trauma, alterações degenerativas e inflamação) apresentam igualmente actividade osteoblástica e fluxo sanguíneo aumentados, podendo assim resultar em elevadas taxas de falsos-positivos. Por outro lado, ocorrem frequentemente resultados falsos-negativos em casos de lesões avasculares (e.g. regiões necrosadas), metástases osteolíticas de crescimento rápido e lesões com fraca remodelação óssea (7,9,15).

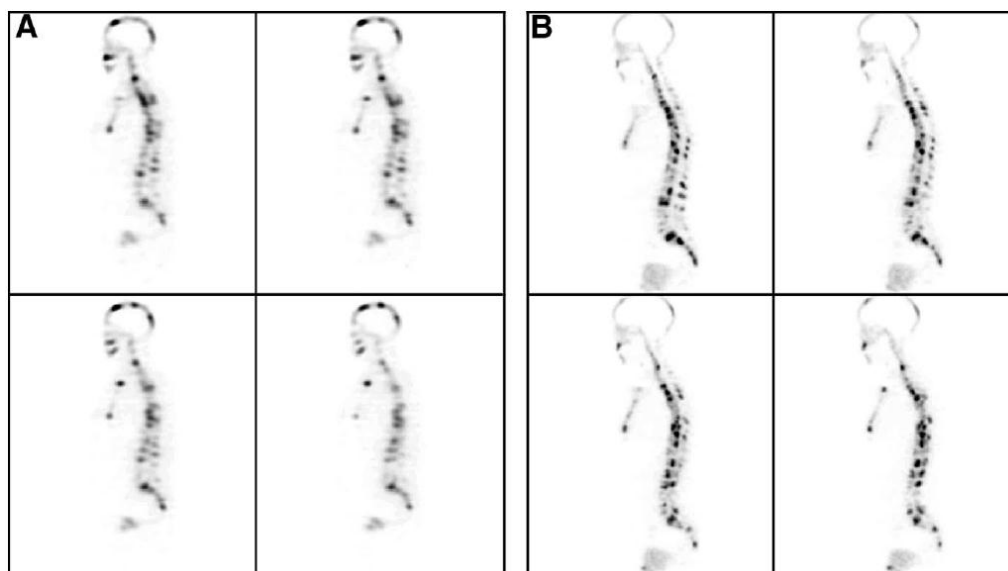
Quando realizada numa fase pós-terapêutica, a cintigrafia óssea permite visualizar uma resposta positiva do tumor à terapia (com diminuição da intensidade de captação ou do número de lesões focais) ou a progressão da doença (com aparecimento de novas lesões). Contudo, a eficácia da cintigrafia óssea na monitorização da resposta ao tratamento é limitada pela baixa especificidade inerente e pelo facto de que muitos processos de cura se encontram associados a um aumento de remodelação óssea (e.g. fenómeno “flare” em pacientes após realização de terapia hormonal, caracterizado pelo aumento de captação dos  $^{99m}\text{Tc}$ -difosfonatos, nos primeiros meses após o tratamento, devido à nova formação óssea verificada durante o processo de reparação) (15).

A cintigrafia óssea constitui um procedimento de estadiamento de cancro da mama bem estabelecido, que deve ser sempre considerado em mulheres com tumores de grandes dimensões (T3 e T4) ou com doença metastática conhecida (e.g. evidência de envolvimento axilar), independentemente da presença de sintomas. Ademais, deve ser realizada cintigrafia óssea em mulheres com queixas de dor em zonas específicas, de forma a avaliar a existência de doença metastática óssea, independentemente da dimensão tumoral (7). Trata-se de uma técnica considerada diagnóstica quando se verifica um envolvimento metastático ósseo bastante disseminado. Nos outros casos, quando o padrão cintigráfico é menos suspeito ou na presença de uma lesão focal única, torna-se necessária a avaliação com outras modalidades de imagem (e.g. TC e IRM) ou mesmo confirmação histológica (15).

A realização de estudos SPECT ou SPECT/TC adicionais permitem melhorar a especificidade da cintigrafia óssea planar, promovendo uma melhor localização e caracterização de lesões solitárias e lesões em estruturas esqueléticas complexas, como a coluna vertebral, crânio e pélvis (e.g. lesões localizadas na região média e posterior da coluna vertebral têm maior probabilidade de serem de origem metastática, do que degenerativa) (15).

O  $^{18}\text{F}$ -Fluoreto (F) é um radiofármaco PET não específico, para a avaliação de metástases ósseas. O seu mecanismo de captação no osso é similar ao dos difosfonatos  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HMDP e baseia-se na permuta com os iões hidróxido dos cristais de hidroxiapatite (predominantemente na superfície do osso), constituindo assim um bom indicador de remodelação óssea. A PET e PET/TC com  $^{18}\text{F}$ -Fluoreto apresenta várias vantagens, como: captação óssea duas vezes superior do que com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP; depuração sanguínea significativamente mais rápida, o que resulta numa maior razão alvo/fundo; maior sensibilidade na detecção de lesões osteoblásticas e osteolíticas; e maior resolução espacial inerente à PET. Contudo, a taxa de falsos-positivos é geralmente superior com  $^{18}\text{F}$ -Fluoreto PET, pois esta técnica é igualmente mais sensível para a detecção de lesões benignas (7,9,15).

A figura 1.6 constitui uma comparação entre imagens SPECT (cintigrafia óssea) e PET (com  $^{18}\text{F}$ -Fluoreto) de uma paciente com cancro da mama, com múltiplas lesões ósseas metastáticas.



**Figura 1.6** – Imagens de restadiamento de uma paciente do sexo feminino de 52 anos, com cancro da mama, 6 meses após mastectomia da mama direita e remoção de nódulos linfáticos axilares. Os estudos SPECT com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP (A) e PET com  $^{18}\text{F}$ -Fluoreto (B) demonstram múltiplas lesões ósseas metastáticas (15).

### 1.1.2.5 Radiofármacos específicos

Nas últimas décadas, os conhecimentos fundamentais adquiridos na área da biologia celular e molecular do cancro, resultaram na identificação de diversos biomarcadores celulares, alguns deles considerados como alvos potenciais para imagem molecular e/ou fins terapêuticos. Entre eles, destacam-se os antigénios, enzimas e receptores membranares, os quais desempenham papéis fundamentais em processos patológicos, encontrando-se frequentemente sobreexpressos nos tecidos neoplásicos. O potencial interesse destes alvos moleculares tem sido intensivamente estudado e a identificação e *design* de ligandos específicos de elevada afinidade, tem sido e continua a ser uma área de investigação intensa (6).

Os radiofármacos específicos são genericamente constituídos por uma molécula que contém um ligando específico, e.g. um anticorpo, fragmento de anticorpo, péptido ou outro ligando de baixo peso molecular (com elevada afinidade para um determinado alvo molecular), e que incorpora igualmente um radionúclido. São várias as características das células neoplásicas, que se revelam adequadas para o desenvolvimento de radiotraçadores específicos para imagem tumoral de cancro da mama, nomeadamente a expressão de determinados receptores – e.g. receptor do estrogénio (ER), receptores do neuropéptido Y e receptores membranares de factores de crescimento, como o receptor do factor de crescimento epidérmico humano do subtipo 2 (HER2), receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR), receptor do factor de crescimento insulínico tipo 1 (IGF-1R). Adicionalmente, as células tumorais excretam factores de crescimento – e.g. factor de crescimento vascular endotelial (VEGF), factor transformador de crescimento  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) – que também se tornam potenciais alvos moleculares para imagem. Por fim, podem igualmente ser utilizados alvos envolvidos na angiogénese (e.g. receptores-VEGF, integrina  $\alpha_v\beta_3$ , fibronectina e endostadina) e hipóxia, visto que estes processos se encontram relacionados com o crescimento tumoral (6).

Entre os radiotraçadores específicos já desenvolvidos no âmbito do cancro da mama, destaca-se o 16- $\alpha$ -[ $^{18}\text{F}$ ]fluoro-17- $\beta$ -estradiol (FES), que constitui um ligando específico com afinidade para o receptor ER, preferencialmente para o subtipo ER $\alpha$  (mas também ER $\beta$ ). O interesse deste radiotraçador, como sonda de imagem molecular, deve-se ao facto de cerca de 70% dos pacientes com cancro da mama terem tumores na sua maioria ER-positivos. Vários estudos FES PET, realizados em pacientes com cancro da mama, demonstraram que a captação de FES se correlaciona com a densidade tumoral imunohistoquímica de ER e sugerem uma

potencial aplicação do FES na determinação do estado destes receptores, especialmente em pacientes com múltiplos tumores ou tumores onde se torna difícil realizar biópsia e também na monitorização da resposta a terapias anti-hormonais (6,16).

Outro exemplo é a marcação radioactiva do anticorpo monoclonal IgG1 trastuzumab (utilizado clinicamente como agente terapêutico em pacientes com carcinoma da mama metastizado), com  $^{111}\text{In}$  (SPECT) ou  $^{89}\text{Zr}$  (PET). Este anticorpo constitui um ligando específico para o HER2, que por sua vez se encontra envolvido na sobrevivência tumoral, proliferação, maturação, angiogénese e possui efeitos anti-apoptóticos. O HER2 encontra-se sobreexpresso em cerca de 25-30% dos pacientes com cancro da mama, tornando-se desta forma um bom alvo molecular. Num estudo realizado com  $^{111}\text{In}$ -trastuzumab (desenvolvido para imagem SPECT), verificou-se a detecção de um maior número de lesões em pacientes com sobreexpressão de HER2, comparativamente aos procedimentos de estadiamento convencional (17). O radiotraçador PET  $^{89}\text{Zr}$ -trastuzumab demonstrou igualmente uma boa captação tumoral, em lesões metastáticas de cancro da mama e uma boa capacidade de quantificação não-invasiva de HER2 (18).

O VEGF constitui um dos factores de crescimento mais importantes envolvidos na angiogénese tumoral, sendo produzido de forma abundante pelas células neoplásicas. São vários os radiotraçadores desenvolvidos para imagem de VEGF, nomeadamente anticorpos e fragmentos de anticorpos radiomarcados (e.g.  $^{111}\text{In}/^{89}\text{Zr}$ -bevacizumab,  $^{124/125}\text{I}$ -VG76e e  $^{124}\text{I}$ -HuMV833) (6).

A investigação no âmbito da Radiofarmácia torna-se fundamental para o desenvolvimento de novos radiotraçadores de elevada sensibilidade e especificidade, para visualização da expressão e actividade de alvos moleculares e processos biológicos específicos do cancro da mama, contribuindo para uma maior eficácia na detecção desta doença.

## 1.2 PÉPTIDOS COMO SONDAS DE IMAGEM MOLECULAR

### 1.2.1 Considerações gerais

Os péptidos são pequenas moléculas constituídas por vários aminoácidos, ligados através de ligações peptídicas. O número de aminoácidos constituintes de um péptido pode variar entre 2 e 50. A tabela 1.2 descreve as características dos aminoácidos proteinogénicos (naturais e essenciais), bem como os símbolos e abreviaturas por que são conhecidos. A estrutura química dos aminoácidos encontra-se representada no apêndice 2.

**Tabela 1.2** – Propriedades e simbologia dos aminoácidos proteinogénicos.

Propriedades	Aminoácido	Símbolo*	Abreviatura*
<b>Cadeias laterais neutras e apolares</b>	Glicina	Gly	G
	Alanina	Ala	A
	Valina	Val	V
	Leucina	Leu	L
	Isoleucina	Ile	I
	Fenilalanina	Phe	F
	Triptofano	Trp	W
	Metionina	Met	M
	Prolina	Pro	P
<b>Cadeias laterais neutras e polares</b>	Serina	Ser	S
	Treonina	Thr	T
	Tirosina	Tyr	Y
	Asparagina	Asn	N
	Glutamina	Gln	Q
	Cisteína	Cys	C
<b>Cadeias laterais ácidas (carga negativa)</b>	Ácido Aspártico	Asn	D
	Glutamato	Glu	E
<b>Cadeias laterais básicas (carga positiva)</b>	Histidina	His	H
	Lisina	Lys	L
	Arginina	Arg	R

\*Nomenclatura de acordo com as regras estabelecidas pelo *Biochemistry Committee* da IUPAC-IUB

Ao contrário das proteínas, os péptidos geralmente não possuem uma estrutura tridimensional (terciária) bem definida. Até hoje, foram identificados cerca de 850 péptidos (entre os quais hormonas, neurotransmissores, neuromoduladores, citoquinas e inibidores da hormona do crescimento), cuja síntese ocorre maioritariamente no tecido neuronal, tecido linfático ou no sistema endócrino. Os péptidos reguladores (naturais/endógenos) representam um grupo de diferentes famílias de moléculas, caracterizadas pela sua actuação em múltiplos alvos no organismo humano (a concentrações extremamente baixas), controlando e modulando diversas funções fisiológicas e processos metabólicos. O seu papel como moléculas mensageiras flexíveis requer uma rápida degradação enzimática no sangue, de forma a evitar a sua actuação prolongada. Desta forma, a semi-vida biológica dos péptidos endógenos é geralmente curta (19-21).

A acção biológica dos péptidos é mediada por receptores específicos da membrana celular, sendo a maioria pertencente ao grupo dos receptores acoplados à proteína G (com estrutura em hélice e sete domínios transmembranares). Os péptidos ligam-se ao domínio extracelular do receptor, seguindo-se uma rápida transformação conformacional do mesmo e subsequentemente a transdução do sinal. Em determinados casos, ligandos potentes podem levar à internalização celular do complexo receptor/ligando. Os receptores encontram-se expressos em diversos tecidos (e.g. cérebro, tracto gastrointestinal, sistema endócrino, rins, pulmões, sistema imunológico, sistema vascular e sistema nervoso periférico) e podem influenciar vários sistemas intracelulares, relacionados com diversos processos (e.g. proliferação celular e apoptose), o que contribui para o interesse crescente dos péptidos no âmbito da oncologia, como agentes terapêuticos ou de imagem (19-22).

Uma das principais razões associadas à pertinência da aplicação dos péptidos como sondas de imagem molecular, relaciona-se com a possibilidade de alveijamento tumoral, na medida em que uma larga variedade de receptores tumorais (para os quais os péptidos apresentam uma elevada afinidade de ligação) se encontram frequentemente sobreexpressos em carcinomas primários humanos, comparativamente ao tecido normal adjacente e/ou ao tecido de origem. Por este motivo, os péptidos radiomarcados são actualmente reconhecidos como uma nova geração de radiofármacos, com elevado potencial como sondas para diagnóstico e/ou terapia. São vários os péptidos com particular interesse no âmbito da oncologia e diversos os tipos de cancro em que os receptores correspondentes se encontram sobreexpressos (19-22). No apêndice 3 encontram-se alguns exemplos de péptidos

com capacidade de alvejamento tumoral, com potencial interesse como sondas de diagnóstico e/ou terapia de vários tipos de cancro.

### 1.2.2 Características dos radiopéptidos

A quantificação da expressão de receptores tumorais é fundamental na selecção de pacientes para terapias direccionadas, bem como na monitorização da eficácia terapêutica. Actualmente, existe a possibilidade de efectuar esta quantificação, através de técnicas de imagem funcional, utilizando radiofármacos baseados em péptidos radiomarcados. Uma vez que os péptidos endógenos apresentam, de forma geral, uma curta semi-vida biológica devido à rápida degradação enzimática (incompatível com qualquer aplicação clínica), a sua marcação radioactiva não tem interesse para o desenvolvimento de radiofármacos. Desta forma, são usualmente sintetizados análogos peptídicos com base em péptidos reguladores, que apresentam maior estabilidade *in vivo* (19-22).

A estrutura típica de uma sonda peptídica específica para imagem tumoral, em particular as baseadas em radiometais, pode ser geralmente sub-dividida em 4 elementos: o péptido, um espaçador, um agente quelante bifuncional (AQBF) e o radionúclido (figura 1.7). O péptido possui as características estruturais necessárias para a ligação específica da sonda ao receptor alvo, no tecido neoplásico. Eventualmente, entre o péptido e o AQBF pode ser introduzido um espaçador (uma molécula que permite assegurar a distância adequada entre estas duas estruturas), de forma a minimizar a perda de actividade biológica do péptido (mantendo uma elevada afinidade de ligação ao receptor), e que permite também modelar as propriedades farmacocinéticas do péptido. O AQBF consiste num ligando que permite a estabilização do centro metálico e, simultaneamente, possibilita a ligação à biomolécula, sendo desejável que não altere as suas propriedades biológicas. Assim, o AQBF apresenta dois potenciais sítios de ligação: um grupo funcional, responsável pela ligação covalente ao péptido (ou espaçador) e um outro grupo, destinado à complexação do radioisótopo (20).

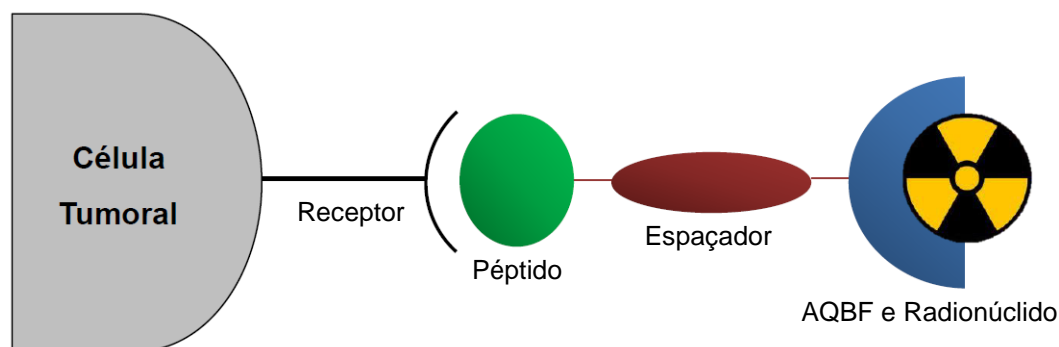


Figura 1.7 – Estrutura típica de uma sonda peptídica específica para imagem tumoral.

Os radiopéptidos devem apresentar as seguintes características: elevada especificidade e afinidade de ligação para o receptor, elevada estabilidade em condições fisiológicas, elevada captação tumoral, baixa captação em tecidos não-alvo, rápida depuração sanguínea e eliminação por via renal. Os péptidos radiomarcados apresentam diversas vantagens relativamente a outros tipos de radiotraçadores (e.g. anticorpos e proteínas): maior afinidade de ligação para os receptores tumorais; dimensões reduzidas (rápida penetração no tecido tumoral); farmacocinética mais favorável (rápida depuração sanguínea e de tecidos não-alvo, maior fixação tumoral e melhores razões alvo-fundo); fácil conjugação a ligandos bifuncionais; boa tolerância a condições de marcação adversas; baixa toxicidade; baixa imunogenicidade; e fácil produção, através de síntese automática em fase sólida (SPPS). Contudo, a utilização dos péptidos pode ser dificultada pela sua biodisponibilidade limitada e pela rápida degradação metabólica por ação de peptidases endógenas. Ainda assim, existem actualmente vários métodos propostos para inibir o metabolismo enzimático dos péptidos (e.g. introdução de aminoácidos fosforilados; substituição de ligações dissulfureto por ligações tioéter; introdução de aminoácidos sintéticos; introdução de amino-álcoois; amidação do C-terminal; ciclização completa ou parcial – que pode levar não só a uma maior resistência à biodegradação enzimática, mas também à obtenção de compostos com uma conformação mais rígida, com maior afinidade de ligação aos receptores tumorais). A velocidade de degradação proteolítica do péptido é um parâmetro a otimizar, pois se for demasiado rápida a acumulação no tumor é insuficiente. Quanto à via de excreção, os péptidos radiomarcados devem ser hidrofílicos, de modo a assegurar uma rápida eliminação por via renal. Quanto maior for a lipofilia, maior será a excreção por via hepatobiliar e mais intensa será a captação abdominal, que poderá mascarar eventuais lesões tumorais. A via e velocidade de excreção dos péptidos podem ser modeladas através de diferentes

estratégias, como a introdução de aminoácidos hidrofílicos na cadeia peptídica, glicosilação (introdução de hidratos de carbono) ou ligação a cadeias de polietilenoglicol (PEG) – peguilação. O PEG é um polímero não-tóxico, não-imunogénico, altamente solúvel em água, que leva a que os péptidos se tornem mais hidrofílicos e menos susceptíveis à degradação enzimática (19-22).

Actualmente, apesar da intensa investigação verificada nas últimas duas décadas, no campo dos péptidos radiomarcados, existe apenas um análogo da somatostatina aprovado como radiofármaco em utilização clínica –  $^{111}\text{In}$ -DTPA-octreótido (OctreoScan<sup>®</sup>, aprovado em 1994 pela FDA – *Food and Drug Administration*). Na tabela 1.3 encontram-se os radioligandos peptídicos para imagem e terapia, em estudos clínicos na Europa (23).

**Tabela 1.3** – Radiopéptidos em estudos clínicos na Europa, os respectivos receptores peptídicos e indicações clínicas. Adaptado de (23).

Péptido	Receptor	Indicação Clínica	Radiopéptido
<b>Somatostatina</b>	sst2	Tumores Neuroendócrinos	$^{111}\text{In}$ -DOTA-landeotido $^{111}\text{In}$ - $^{90}\text{Y}$ -/ $^{177}\text{Lu}$ -/ $^{68}\text{Ga}$ -DOTATOC $^{177}\text{Lu}$ -/ $^{68}\text{Ga}$ -DOTATATE $^{111}\text{In}$ -DOTA-BASS $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-TOC/-TATE $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -N4-TATE $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -depreotido $^{18}\text{F}$ -deoxifructosil-TATE $^{68}\text{Ga}$ -DOTANOC
	sst2/sst3/sst5		
<b>Bombesina</b>	Receptor GRP	Cancro da próstata, cancro da mama e tumor estromal gastrointestinal	$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -RP527 $^{68}\text{Ga}$ -BZH3 $^{64}\text{Cu}$ -CBC-AR06 $^{68}\text{Ga}$ -/ $^{177}\text{Lu}$ -AMBA
<b>CCK</b>	CCK2r	Carcinoma medular da tiróide	$^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Glu-minigastrina $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -demogastrin 2
<b>Péptidos RGD</b>	Integrina $\alpha_v\beta_3$	Várias	$^{18}\text{F}$ -galacto-RGD $^{18}\text{F}$ -RGD-K5 $^{18}\text{F}$ -AH111585
<b>Substância P</b>	Neuroquinina 1	Glioblastoma	$^{213}\text{Bi}$ -DOTA-substance P $^{111}\text{In}$ -/ $^{90}\text{Y}$ -DOTAGA-substance P

### 1.2.3 Radiomarcção de péptidos

Durante o processo de marcação radioactiva, o péptido deve preservar a sua actividade biológica, bem como a sua afinidade de ligação para o receptor. Para tal, como já referido, é frequentemente utilizado um espaçador que distancia o péptido do AQB. Contudo, a introdução do radionuclido, juntamente com o espaçador e um agente quelante, pode levar a alterações físicas do péptido, que conseqüentemente podem provocar uma farmacocinética desfavorável, incluindo uma menor capacidade de captação tumoral (como resultado da perda de afinidade para o receptor) (20,21). Assim, na marcação de hormonas peptídicas, a escolha do AQB é determinante para o desempenho geral do composto, devendo possibilitar a obtenção de complexos radioactivos com uma elevada estabilidade termodinâmica e elevada inércia cinética *in vivo*, e com perfil de biodistribuição e características de alveamento tumoral adequados. Preferencialmente, o AQB deve ser um ligando multidentado, com mais do que um par de electrões livres, de modo a formar complexos estáveis com diferentes radionúclidos. Diversos ligandos poliaminopolicarboxílicos (cíclicos e acíclicos) têm sido introduzidos como AQB, sendo os mais utilizados o DTPA, DOTA, TETA, NOTA e derivados “cross-bridge” (CB) (figura 1.8), especialmente na marcação de biomoléculas com radiometais como o  $^{67/68}\text{Ga}^{3+}$ ,  $^{111}\text{In}^{3+}$ ,  $^{90}\text{Y}^{3+}$  e  $^{64}\text{Cu}^{2+}$  (19-22). Um dos braços carboxílicos do ligando pode ser utilizado na ligação ao péptido, tipicamente através da formação de uma ligação amida, com uma amina primária de um resíduo de lisina ou com o N-terminal do péptido. Alternativamente, pode ser introduzido um grupo funcional na estrutura metilénica do AQB, deixando todos os braços carboxílicos disponíveis para a coordenação ao radiometal. Geralmente, os ligandos macrocíclicos (e.g. DOTA, NOTA e TETA) permitem obter complexos metálicos mais estáveis e quimicamente inertes, do que os complexos formados com ligandos acíclicos (e.g. DTPA) (20-22).

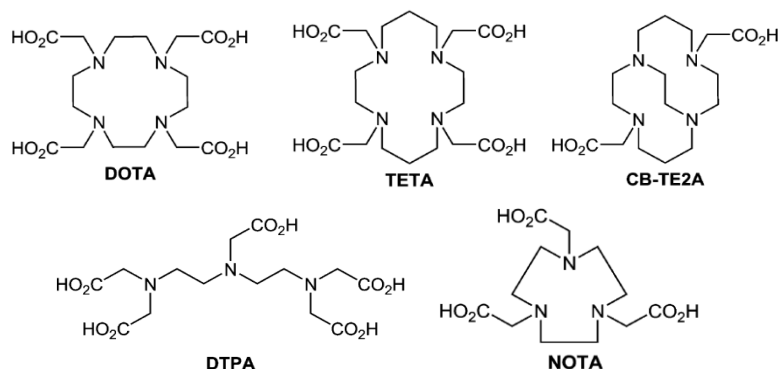


Figura 1.8 – Estrutura química dos ligandos poliaminopolicarboxílicos mais comuns.

Os péptidos devem ser marcados com elevada actividade específica (para evitar a saturação dos receptores) e elevada pureza radioquímica. Os processos de marcação e purificação devem ser realizados num curto espaço de tempo, tendo em consideração os períodos de semi-desintegração relativamente curtos dos radioisótopos (19-22).

### 1.2.3.1 Radiomarcção de péptidos com $^{99m}\text{Tc}$

O tecnécio é um metal de transição *d*, do grupo VII da tabela periódica, descoberto em 1937 por Perrier e Segre. O  $^{99m}\text{Tc}$  constitui o radioisótopo SPECT mais utilizado, em estudos clínicos e pré-clínicos em medicina nuclear. A sua larga utilização deve-se a vários factores: propriedades físicas adequadas a uma boa qualidade de imagem SPECT, designadamente a energia gama emitida (140 keV), suficientemente elevada para atravessar os tecidos e permitir a obtenção de imagens dos órgãos; período de semi-desintegração ( $T_{1/2} = 6,02$  horas) adequado (suficientemente longo para permitir a síntese do radiofármaco, o seu controlo de qualidade, a administração ao paciente e a aquisição de imagens e suficientemente curto para minimizar a dose de radiação a que o paciente está sujeito); química de coordenação diversificada; elevada actividade específica; baixo custo; e elevada disponibilidade e facilidade de obtenção, através do gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  (19-24).

O gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  consiste num sistema composto por uma coluna cromatográfica de óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), na qual se encontra adsorvido o  $^{99}\text{Mo}$  na forma de  $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$  (figura 1.9). O  $^{99}\text{Mo}$  decai dando origem ao  $^{99m}\text{Tc}$ , que é obtido na forma de  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  numa concentração final de  $10^{-9}$ - $10^{-12}$  M, ao eluir o gerador com uma solução salina (NaCl) 0,9 % (estéril e apirogénica). Devido à diferença de cargas entre o  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  e o  $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$  é possível eluir selectivamente o pertecnetato, permanecendo o anião molibdato adsorvido na coluna (24).

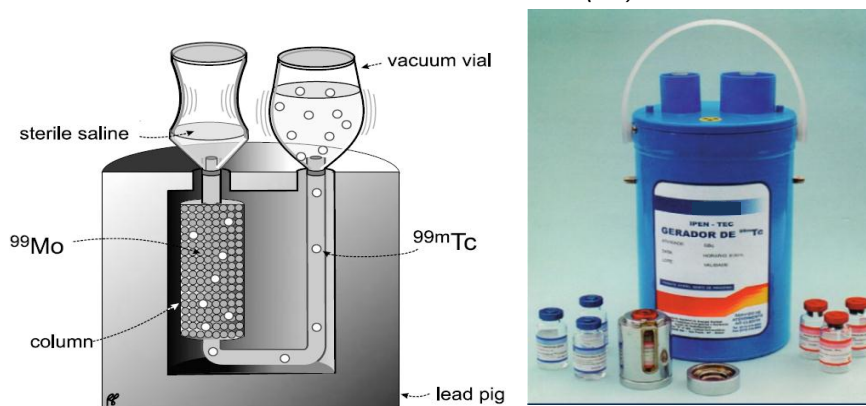
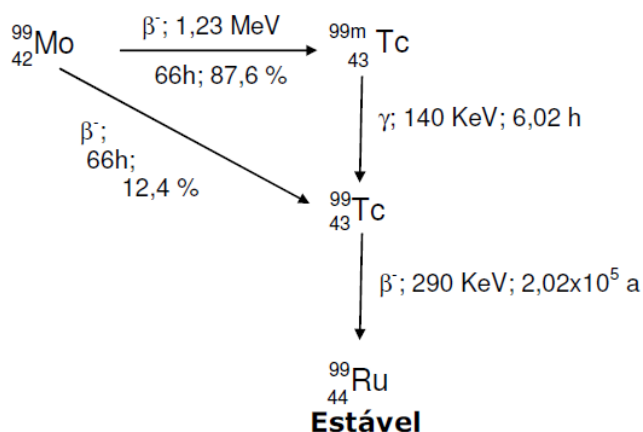


Figura 1.9 – Gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  de coluna seca (24).

O  $^{99}\text{Mo}$  decai quer para o estado metaestável  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , quer directamente para o estado fundamental  $^{99}\text{Tc}$  (emissão  $\beta^-$ ). O  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  decai para  $^{99}\text{Tc}$  por transição isomérica, que por sua vez decai por emissão  $\beta^-$  para  $^{99}\text{Ru}$  estável. O esquema de decaimento destes radionúclidos encontra-se representado na figura 1.10, bem como os respectivos períodos de semi-desintegração e energias emitidas (24).



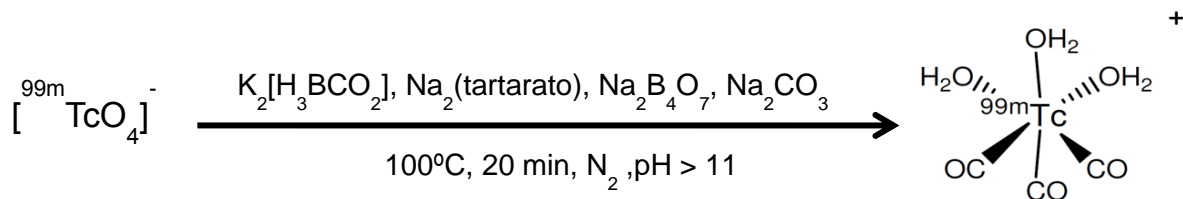
**Figura 1.10** – Diagrama de decaimento radioactivo do  $^{99}\text{Mo}$  e do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

A radiomarcagem de moléculas com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  é geralmente realizada em solução aquosa, com redução do pertecnetato de sódio ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) no estado de oxidação Tc(VII), a estados de oxidação inferiores (através de agentes redutores como o cloreto estanoso), previamente à sua complexação. Não é possível a caracterização de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -complexos através dos métodos convencionais utilizados em química inorgânica, devido à baixa concentração de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Assim, a identificação estrutural destes complexos é efectuada recorrendo à síntese dos compostos análogos de Re inactivo (mais difíceis de reduzir e cineticamente mais inertes), cujo comportamento químico é semelhante ao do  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Uma das técnicas mais utilizadas é o HPLC, acoplado a um detector de radiação gama e a um detector UV (22).

As abordagens de radiometalação de péptidos com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  incluem métodos de marcação directa ou indirecta. No primeiro caso, o radionúclido é coordenado directamente à biomolécula, através da redução de ligações dissulfeto a grupos tiol livres, capazes de se ligar ao  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Trata-se de uma metodologia simples, mas que requer que o péptido possua grupos funcionais com capacidade de coordenação ao radionúclido e que não sejam determinantes da sua actividade biológica. Além disso, geralmente levam à criação de ligações não-específicas do radioisótopo. Nos métodos indirectos (com recurso a AQBFS) existem duas abordagens distintas: pré e pós-

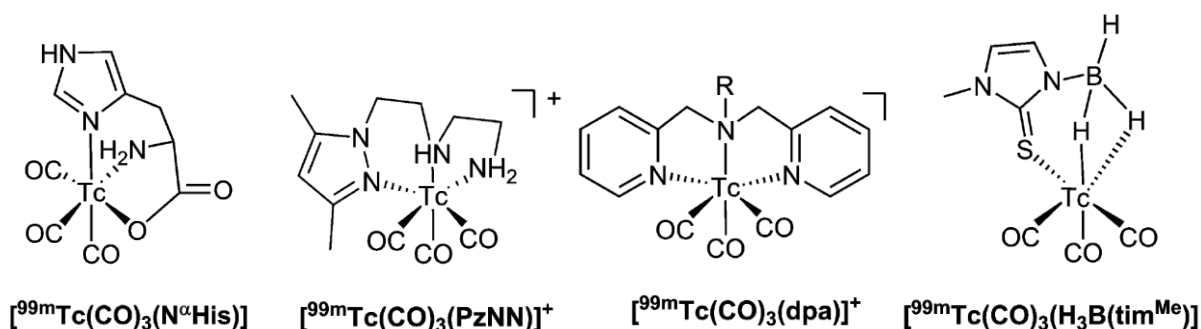
marcação. No método de pré-marcação, o AQBFB e o  $^{99m}\text{Tc}$  formam inicialmente um complexo, seguindo-se depois a conjugação ao péptido. Esta metodologia é bastante complexa e morosa, pois envolve vários passos de purificação, de forma a obterem-se compostos com elevada actividade específica. No método de pós-marcação, forma-se primeiramente um bioconjugado entre o péptido e o AQBFB, que é posteriormente marcado com  $^{99m}\text{Tc}$  (por redução directa do  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  ou por via de um complexo intermediário, e.g.  $^{99m}\text{Tc}$ -glucoheptonato ou  $^{99m}\text{Tc}$ -tricina). Actualmente é o método mais utilizado, pois a marcação do bioconjugado é efectuada no último passo, o que permite reduzir significativamente o tempo de marcação. Contudo, uma desvantagem desta abordagem é que o péptido é submetido às condições reaccionais exigidas pela marcação, o que pode reduzir a sua imunoreactividade. A diversidade da química do  $^{99m}\text{Tc}$  permite a utilização de diferentes estratégias de marcação, em termos de estados de oxidação e selecção de AQBFBs (e.g. DTPA). O estado de oxidação final a que o Tc(VII) é reduzido, depende não só da natureza do agente redutor, mas também das condições reaccionais e do tipo de ligando na presença do qual o metal é reduzido (20,21).

A aproximação tricarbonilo constitui uma das abordagens mais interessantes na marcação de péptidos com  $^{99m}\text{Tc}$ , tendo sido alvo de especial atenção nos últimos anos. Esta aproximação envolve a utilização de um kit (*Isolink*<sup>®</sup>, Covidean), que corresponde a uma mistura liofilizada de boranocarbonato, tartarato de sódio, borato de sódio e carbonato de sódio. A marcação deste kit com  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , permite a obtenção do precursor organometálico de  $^{99m}\text{Tc(I)} - fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$  – em meio aquoso (figura 1.11). Este precursor pode ser utilizado na preparação de novos complexos de Tc(I), potencialmente úteis como radiofármacos, por substituição das moléculas de  $\text{H}_2\text{O}$  com ligandos de natureza bem diversa. O kit encontra-se comercialmente disponível apenas para fins de investigação.



**Figura 1.11** – Condições de preparação do precursor  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{OH}_2)_3]^+$ , através do kit *Isolink*<sup>®</sup>.  $\text{K}_2[\text{H}_3\text{BCO}_2]$  – redutor e fonte de CO;  $\text{Na}_2(\text{tartarato})$  – ligando que estabiliza os estados de oxidação intermédios do  $^{99m}\text{Tc}$ , evitando a formação de  $^{99m}\text{TcO}_2$ ;  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  e  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  – bases que mantêm o pH básico, pois o boranocarbonato é instável a pH ácido.

A robustez química do centro metálico  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  e a labilidade das três moléculas de água possibilitam a exploração de uma química bem definida e de fácil bioconjugação. A marcação de péptidos baseada neste tipo de aproximação organometálica tem sido descrita por vários grupos de investigação, utilizando vários tipos de AQBFs. De forma geral, os complexos formados a partir de quelatos tridentados demonstram maior estabilidade *in vivo*, comparativamente aos agentes bidentados. A aplicação da aproximação tricarbonilo leva geralmente à obtenção de complexos com elevada estabilidade cinética e termodinâmica. Consideram-se potenciais desvantagens da utilização do kit *Isolink*<sup>®</sup> a necessidade de se ter de conduzir a marcação em dois passos, e em geral a quente, e o facto de que a unidade  $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  confere frequentemente demasiada lipofilia, aos complexos formados, o que potencia a sua excreção hepatobiliar e prejudica o seu perfil biológico (o que pode ser ultrapassado com a utilização dos AQBFs apropriados) (22). Na figura 1.12 observam-se alguns exemplos da utilização do precursor tricarbonilo, na formação de complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  com diferentes AQBFs.



**Figura 1.12** – Complexos- $^{99m}\text{Tc}$  com diferentes AQBFs, formados a partir do precursor tricarbonilo.

Nos últimos anos, tem sido demonstrada a eficácia dos AQBFs tridentados, derivados do pirazolo (pz) (e.g.  $3,5\text{Me}_2\text{-pz}(\text{CH}_2)_2\text{N}((\text{CH}_2)_3\text{COOH})(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ ), na marcação de péptidos, recorrendo à aproximação tricarbonilo. Estes ligandos pirazolilo-diamina revelaram-se efectivos na estabilização do centro organometálico  $fac-[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ , permitindo a marcação de vários péptidos, nomeadamente análogos da bombesina, da  $\alpha$ -hormona estimuladora das melanocortinas ( $\alpha$ -MSH) e tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) (25-29). A estrutura genérica do AQBF derivado do pirazolo encontra-se representada na figura 1.13.

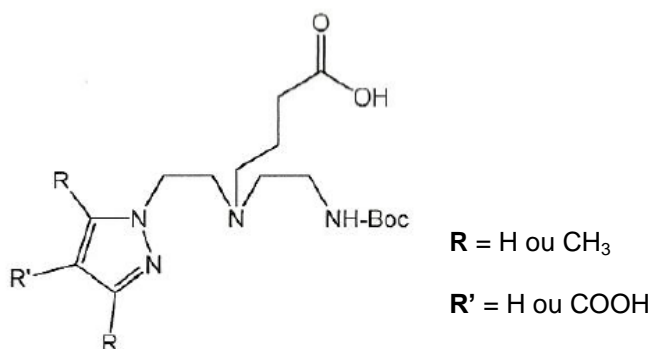


Figura 1.13 – Estrutura genérica do AQB derivado do pirazolo (pz).

#### 1.2.4 Síntese automática de péptidos em fase sólida

A síntese de péptidos em fase sólida (SPPS), desenvolvida por Bruce Merrifield, tornou-se o principal método de síntese de péptidos a nível da investigação em biologia, biomedicina, desenvolvimento de fármacos, etc. A introdução de suportes sólidos funcionalizados, que permitem a ancoragem de aminoácidos, revolucionou o campo da ciência de péptidos e inaugurou a metodologia SPPS. Esta técnica envolve a realização de um conjunto de reacções orgânicas, efectuadas sobre substratos ligados covalentemente a resinas poliméricas. Nos últimos anos, vários aspectos da SPPS têm sido alvo de grande desenvolvimento científico, aumentando significativamente a aplicação dos péptidos sintéticos (30-32).

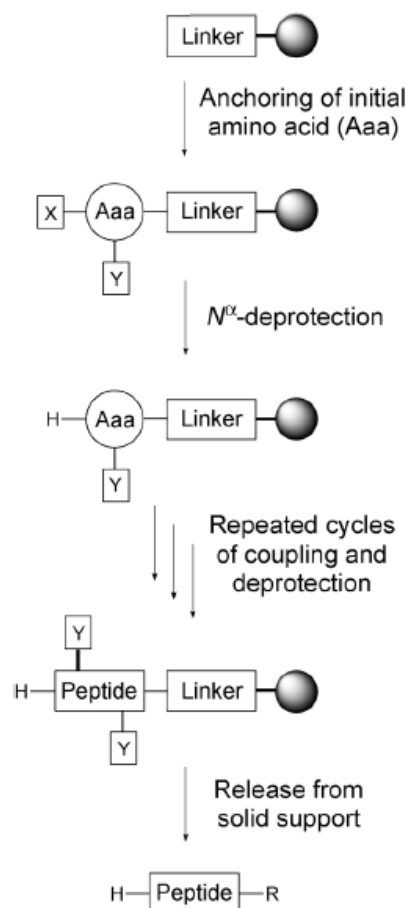
A SPPS apresenta diversas vantagens relativamente à síntese convencional em solução: é mais rápida e automatizada; não é necessário isolar os produtos intermediários; permite maiores rendimentos de reacção (pela utilização de excesso de reagentes); permite a obtenção de produtos mais puros; e é mais conveniente (o excesso de reagentes é eliminado por simples lavagem em cada passo) (30,31).

A SPPS envolve a participação de um conjunto de elementos, dos quais se destacam: grupos protectores (temporários) da amina terminal dos aminoácidos –  $N^\alpha$ ; grupos protectores das cadeias laterais dos aminoácidos; reagentes de acoplamento; suportes sólidos; e *linkers* (não aminoácidos), que promovem a ligação entre o suporte sólido e o primeiro aminoácido. Os suportes sólidos utilizados em SPPS devem obedecer a determinados requisitos, como: inércia química a todos os solventes e reagentes usados durante o processo de síntese; ausência de interacção com a cadeia peptídica; fácil manipulação; e facilidade de modificação química, de tal forma que o primeiro aminoácido da sequência possa ligar-se eficazmente ao suporte.

Existem essencialmente três tipos distintos de suportes sólidos para SPPS: poliestireno (resina sintética preparada por copolimerização de estireno com uma pequena quantidade (tipicamente 1%) de divinilbenzeno); poliamida; e poliestireno enxertado com polietilenoglicol (PEG). A ligação entre o péptido e a resina tem que ser estável a tratamentos repetitivos necessários para a remoção do grupo protector do grupo  $N^{\alpha}$  e acoplamento dos aminoácidos. O *linker* utilizado forma geralmente uma ligação amida com a resina polimérica e uma ligação éster ou amida com o primeiro aminoácido a incorporar. A presença do *linker* confere maior flexibilidade química à síntese, uma vez que pode ser concebido de forma a permitir a modificação da força e natureza da ligação entre o primeiro aminoácido e a resina, tornando-a mais ou menos susceptível a determinados reagentes, sendo possível escolher espaçadores sensíveis a ácidos, bases, nucleófilos, etc. Deste modo, o espaçador determina as condições específicas de clivagem do péptido (30,31).

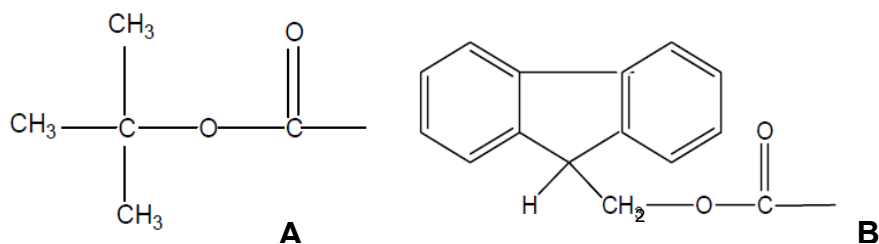
Como princípio da SPPS (figura 1.14), os aminoácidos (protegidos no  $N^{\alpha}$  terminal e nas cadeias laterais) são acoplados sequencialmente numa cadeia peptídica em crescimento, ancorada à resina, na direcção  $C \rightarrow N$  terminal. Assim, a síntese peptídica ocorre geralmente do último aminoácido (C-terminal) para o primeiro aminoácido (N-terminal) da sequência, pelo que se faz reagir o grupo  $NH_2$  livre do último aminoácido já incorporado à cadeia, com o grupo carboxilo (activado) do aminoácido que se vai incorporar, estabelecendo-se desta forma uma ligação amida. Em cada ciclo de acoplamento de aminoácidos, o grupo protector  $N^{\alpha}$  do último aminoácido incorporado pode ser removido selectivamente, sem afectar os grupos protectores das cadeias laterais. As reacções na SPPS são efectuadas na presença de reagentes solúveis em excesso, que podem ser removidos por filtração e lavagens. Após a construção total na sequência de aminoácidos desejada, o péptido é removido da resina e geralmente, os grupos protectores semi-permanentes das cadeias laterais são removidos concomitantemente. Durante esta remoção, as condições de reacção devem ser suficientemente agressivas para permitirem a clivagem da ligação, mas adequadas para que se mantenha a integridade da estrutura peptídica. Das várias abordagens usadas para a clivagem e desprotecção do péptido no final da síntese, destacam-se: fotólise; clivagem nucleofílica; hidrogenólise; e acidólise (mais comum). Na acidólise, são geradas frequentemente espécies catiónicas altamente reactivas que podem, eventualmente, reagir com resíduos de aminoácidos que contêm grupos funcionais nucleofílicos (Trp, Met, Tyr e Cys). Para evitar este tipo de reacções, são usados reagentes nucleofílicos (*scavengers*), que capturam os catiões e impedem a

ocorrência de reacções indesejáveis. Os *scavengers* mais comuns são o anisole, o *p*-cresol, o etan-1,2-diol, o sulfureto de dimetilo e trialquilsilanos. Assim, pode optar-se por diferentes combinações de tipos e proporções de *scavengers* a adicionar ao ácido, obtendo-se os chamados “cocktails” de clivagem (30-32).



**Figura 1.14** – Princípio da SPPS. X: grupo protetor  $N^\alpha$  temporário. Y: grupo protetor semi-permanente da cadeia lateral. R: C-terminal (31).

Existem dois tipos fundamentais de protecção dos grupos  $N^\alpha$  dos aminoácidos em SPPS: a química Boc e a química Fmoc, cuja denominação se deve aos grupos protectores utilizados (figura 1.15).



**Figura 1.15** – Estrutura química dos grupos Boc (A) e Fmoc (B).

A estratégia Boc requer ácidos como o TFA ou similar, para a remoção repetitiva dos grupos protectores Boc e ácido hidrofúorídrico (HF), bastante corrosivo e tóxico, para clivagem do péptido do suporte sólido. Já a estratégia Fmoc envolve condições químicas mais suaves, sendo o grupo Fmoc removido por amins secundárias, como a piperidina, a concentrações relativamente baixas (e.g. 20% em DMF). Uma vez que o grupo Fmoc é ortogonal aos restantes grupos protectores, usualmente utilizados na síntese de péptidos, a protecção temporária dos grupos  $N^{\alpha}$  dos aminoácidos (com o grupo Fmoc), torna-se compatível com a protecção semi-permanente das cadeias laterais dos aminoácidos por grupos protectores, removíveis com TFA. Assim, considerando as condições químicas requeridas por ambas as estratégias de síntese, a estratégia Fmoc é habitualmente preferida e rotineiramente mais utilizada (31).

Nas últimas décadas, foram desenvolvidos vários grupos protectores semi-permanentes para as cadeias laterais dos aminoácidos, no contexto da estratégia Fmoc. A protecção dos grupos funcionais das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos trifuncionais (e.g. Glu, Asp, Arg, Cys e Lys) é especialmente importante para o sucesso da síntese peptídica, pois permite evitar a ocorrência de reacções secundárias. Geralmente, os grupos protectores mais utilizados são: *t-Bu* para Glu, Asp, Ser, Thr e Tyr; Pbf para Arg; e Trt para Cys, Asn, Gln e His (figura 1.16) (31).

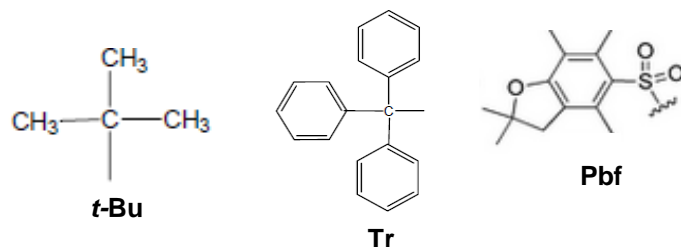


Figura 1.16 – Grupos protectores das cadeias laterais dos aminoácidos, mais usados na estratégia Fmoc.

Um pré-requisito fundamental para a formação das ligações amida entre os aminoácidos durante a síntese, é a activação prévia do grupo carboxilato livre do aminoácido a incorporar (por um reagente de acoplamento), para que este possa reagir com o último resíduo da cadeia peptídica (já desprotegido). Entre os primeiros reagentes de acoplamento introduzidos destacam-se as carbodiimidias (e.g. DCC e DIC), normalmente usadas em combinação com auxiliares nucleófilos como o HOBT. Posteriormente, foram desenvolvidos outros reagentes, que reduzem significativamente o tempo de acoplamento e minimizam a epimerização (e.g. HBTU, HATU, PyBOP e COMU) (31). Na figura 1.17 encontra-se representada a estrutura dos reagentes de acoplamento mais utilizados.

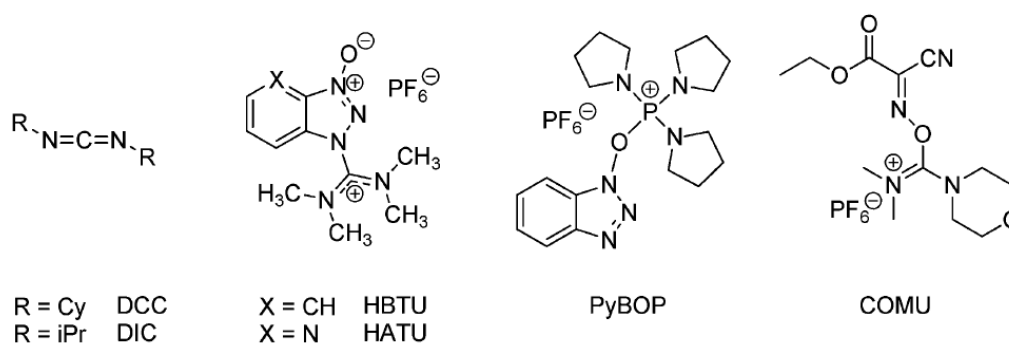


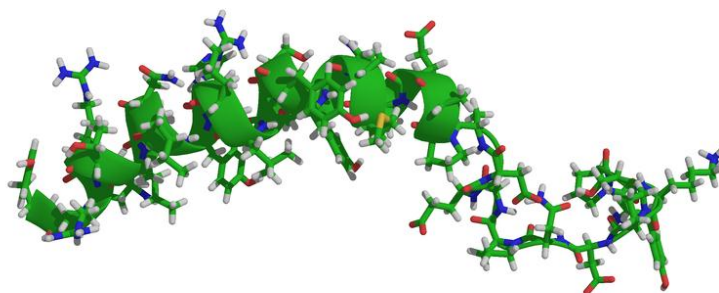
Figura 1.17 – Reagentes de acoplamento mais comuns.

Mais recentemente, a aplicação da irradiação por microondas à SPPS permitiu reduzir significativamente os tempos de reacção e/ou aumentar a pureza dos produtos peptídicos sintéticos obtidos. A irradiação por microondas promove um aquecimento preciso da mistura reaccional, durante os processos de acoplamento e desprotecção- $N^\alpha$ , o que se torna benéfico e especialmente relevante para sínteses difíceis. No aquecimento por condução, a energia é transferida para a mistura reaccional através de correntes convectivas ou condutividade térmica. Já o aquecimento por microondas (dieléctrico a 2,45 GHz) ocorre por distribuição da energia, directamente para o solvente, devido a interacções entre o material com o campo eléctrico alternado (31,33).

## 1.2.5 Análogos do Neuropeptido Y para imagem molecular de cancro da mama

### 1.2.5.1 Considerações gerais sobre o Neuropeptido Y

O Neuropeptido Y (NPY) consiste num péptido endógeno de 36 aminoácidos, com a seguinte sequência: Tyr-Pro-Ser-Lys-Pro-Asp-Asn-Pro-Gly-Glu-Asp-Ala-Pro-Ala-Glu-Asp-Met-Ala-Arg-Tyr-Tyr-Ser-Ala-Leu-Arg-His-Tyr-Ile-Asn-Leu-Ile-Thr-Agr-Gln-Arg-Tyr-NH<sub>2</sub> (figura 1.18). Juntamente com o péptido YY (PYY) e com o polipéptido pancreático (PP), o NPY forma a família dos polipéptidos pancreáticos. O NPY é um dos neuropeptidos mais abundantes no cérebro e encontra-se associado a diversas funções fisiológicas, sobretudo ao nível do sistema nervoso central, incluindo inibição na ansiedade, estimulação do apetite, aumento da retenção da memória, controlo de reacções ansiolíticas e antipiréticas e modulação da actividade de outros neurotransmissores. Ao nível do sistema nervoso periférico, o NPY actua na vasoconstrição, secreção e motilidade gastrointestinal, produção de insulina e secreção renal (20,34).



**Figura 1.18** – Modelo computacional representativo da estrutura do neuropéptido Y.

Até à data, foram clonados cinco subtipos de receptores, para os quais o NPY apresenta uma afinidade na ordem dos nanomolar (nM) – Y1, Y2, Y4, Y5, y6 – encontrando-se os quatro primeiros bem caracterizados. Estes receptores pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (34). O facto dos receptores do NPY (particularmente o Y1 e Y2) se encontrarem sobreexpressos em vários tipos de tumores (e.g. carcinomas da mama, cancro do ovário, tumores da família do sarcoma de Ewing, neuroblastomas e glioblastomas de alto grau, entre outros), torna-os potenciais alvos para imagem tumoral (35-42). Na tabela 1.4 pode observar-se a expressão dos receptores Y1 e Y2, em diversos tipos de tumores humanos e tecidos normais (não-neoplásicos) correspondentes.

Em relação ao cancro da mama, a possível aplicação dos receptores Y como alvos tumorais, no desenvolvimento de novas sondas de imagem molecular baseadas em radiopéptidos análogos do NPY, foi primeiramente especulada por Reubi et al (41). Foi assim demonstrada, por autoradiografia, uma incidência de 85% do receptor Y1 em tumores primários da mama (expresso em grandes quantidades) e de 100% nas metástases linfáticas examinadas. Ademais, verificou-se uma expressão homogênea nos três tipos de tumor mais frequentes (41,42). Curiosamente, ao contrário do que se observa no tecido mamário normal (em que o subtipo de receptor predominantemente expresso é o Y2), verifica-se uma sobreexpressão do subtipo Y1 nas células de cancro da mama. Este fenómeno é então sugestivo da ocorrência de uma alteração fisiológica na expressão dos receptores Y, durante a transformação neoplásica das células (41). Desta forma, péptidos selectivos para o alvo molecular receptor Y1 têm sido considerados como sondas bastante promissoras para imagem molecular e terapia de carcinomas da mama. No entanto, os análogos do NPY radiomarcados não foram ainda muito explorados (19, 20, 22,23).

**Tabela 1.4** – Expressão dos receptores do NPY em tumores humanos e nos tecidos normais correspondentes (35).

Tumor	Incidência de receptores do NPY	Receptores do NPY expressos	Densidade dos receptores do NPY	Receptores do NPY expressos nos tecidos não-neoplásicos	Ref.
Carcinoma da mama	76/89 (85%)	Y1 > Y2	+++	Y2	41
Adenocarcinoma do ovário	7/22 (32%)	Y1 + Y2	+	nd	38
Tumor do estroma dos cordões sexuais do ovário	10/10 (100%)	Y1 + Y2	++	Y1 (estroma perivascular) Y2 (células de Leydig)	38
Tumor adrenais corticais	14/15 (93%)	Y1	+++	Y1	39
Feocromocitoma	7/20 (35%)	Y1 < Y2	++	-	39
Paraganglioma	14/23 (61%)	Y1 < Y2	+++	nd	39
Tumor neuroblástico	18/20 (90%)	Y2	++	nd	39
Carcinoma renal	14/24 (56%)	Y1	++	Y1	40
Neuroblastoma	8/10 (80%)	Y1 + Y2	++	Y1	40

+++ : densidade elevada; ++ : densidade moderada; + : densidade baixa; nd : não disponível

### 1.2.5.2 Análogos longos do Neuropeptido Y radiomarcados

Num estudo de Zwanziger D et al, pretendeu-se desenvolver análogos do NPY, com potencial interesse para imagem molecular de tumores mamários (43). Os péptidos foram conjugados ao AQBQ DOTA, tendo sido o bioconjugado mais promissor marcado com  $^{111}\text{In}$  – [Lys( $^{111}\text{In}$ -DOTA)<sup>4</sup>, Phe<sup>7</sup>, Pro<sup>34</sup>]NPY. Ensaios de ligação competitiva *in vitro*, realizados em vários tipos de linhas celulares tumorais, demonstraram que o análogo de 36 aminoácidos [Phe<sup>7</sup>, Pro<sup>34</sup>]NPY (com apenas duas modificações estruturais relativamente ao péptido natural), foi aquele que efectivamente apresentou maior afinidade para o receptor Y1. Este péptido, quando conjugado ao AQBQ ([Lys(DOTA)<sup>4</sup>, Phe<sup>7</sup>, Pro<sup>34</sup>]NPY) manteve uma elevada afinidade de ligação para o receptor Y1, especialmente nas células de adenocarcinoma da mama humano MCF-7 ( $9,1 \pm 0,1$  pK<sub>i</sub>) e de neuroepitelioma humano SK-N-MC ( $9,5 \pm 0,2$  pK<sub>i</sub>). Já o péptido conjugado ao DOTA no N-terminal apresentou uma ligeira perda de afinidade, comparativamente à conjugação na cadeia lateral da lisina. Tal facto,

demonstrou que a flexibilidade do *N*-terminal é um factor crucial para a interacção do bioconjugado com o receptor Y1 (43).

Os estudos de biodistribuição do complexo [Lys(<sup>111</sup>In-DOTA)<sup>4</sup>, Phe<sup>7</sup>, Pro<sup>34</sup>]NPY (em *nude mice* com tumores induzidos com células MCF-7 de carcinoma da mama), não apresentaram resultados muito encorajadores, demonstrando uma baixa captação tumoral do radioligando (1,7% DI/g aos 30 minutos após injeção), bem como uma elevada captação renal (86,8% DI/g às 4 horas após injeção). Tais resultados foram correlacionados com a natureza do próprio AQBF utilizado, com a degradação enzimática do composto (mais rápida *in vivo*) e com a ausência de purificação (separação do péptido não marcado), que pode levar à saturação dos receptores impedindo a ligação do radioligando (43).

Gandomkar M et al conjugou o mesmo análogo do NPY ([Phe<sup>7</sup>, Pro<sup>34</sup>]NPY) ao AQBF DTPA (acoplado ao *N*-terminal do péptido) e marcou-o com <sup>111</sup>In (44). O complexo <sup>111</sup>In-DTPA-[Phe<sup>7</sup>, Pro<sup>34</sup>]NPY demonstrou uma elevada estabilidade *in vitro*, em soro humano a 37°C (cerca de 75% do péptido intacto às 24h). O composto apresentou igualmente uma boa capacidade de internalização (5,36 ± 0,56% às 0,5h e 22,03 ± 1,68% às 4h), em células tumorais humanas SK-N-MC (que expressam o receptor Y<sub>1</sub>). A farmacocinética do composto foi determinada em ratos *Lewis* machos saudáveis, tendo-se observado uma rápida depuração sanguínea e excreção renal e hepatobiliar lenta (dada a captação nos rins e fígado às 24h). No entanto, não existe informação relativa à avaliação biológica *in vivo* deste composto em modelos tumorais (44).

Mais recentemente, num estudo de Khan U et al, o mesmo análogo do NPY – [Phe<sup>7</sup>,Pro<sup>34</sup>]-NPY – foi conjugado com o ligando bifuncional N<sup>α</sup>-*histidinyl acetyl* (N<sup>α</sup>His-ac) e marcado com <sup>99m</sup>Tc, recorrendo à aproximação tricarbonílo [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>. O complexo de Re inactivo Lys<sup>4</sup>(Re(CO)<sub>3</sub>-(N<sup>α</sup>His-ac))- [Phe<sup>7</sup>, Pro<sup>34</sup>]NPY apresentou elevada afinidade para o receptor Y1, com valores de IC<sub>50</sub> baixos e comparáveis nas duas linhas celulares com expressão deste receptor (MCF-7: 5,2 ± 1,0 nM e SK-N-MC: 1,3 ± 0,1 nM) e boa especificidade (IC<sub>50</sub> > 90 nM para os receptores Y2 e Y5). Neste estudo também se verificou que a conjugação do análogo na cadeia lateral na lisina, constitui uma estratégia mais eficaz, visto que leva a uma maior afinidade para o receptor. Este conjugado demonstrou igualmente boa capacidade de internalização em células HEK293-hY<sub>1</sub>-EYFP que expressam o receptor Y1, e boa farmacocinética

em estudos de biodistribuição em coelhos (quando marcado com  $^{99m}\text{Tc}$ ), verificando-se rápida depuração plasmática e baixa captação renal. O complexo radiometálico  $^{99m}\text{Tc}$ -(N<sup>o</sup>His)-[Phe<sup>7</sup>,Pro<sup>34</sup>]-NPY foi então testado em humanos, constituindo o primeiro estudo clínico preliminar com análogos do NPY radiomarcados, para imagem molecular em pacientes com cancro da mama. Os resultados deste estudo foram bastante promissores, uma vez que se observou uma clara fixação tumoral (1h após a injeção), tanto nos tumores primários como também em lesões metastáticas. As imagens, obtidas em pacientes com tumores da mama de diferentes estadios, revelaram-se bastante selectivas e com boa qualidade, sugerindo que a sobreexpressão do receptor Y1 em carcinomas da mama, constitui efectivamente uma possibilidade de alveamento tumoral, através da utilização de ligandos análogos do NPY radiomarcados (45).

#### 1.2.5.3 Análogos curtos do Neuropeptido Y radiomarcados

No desenvolvimento de análogos do NPY radiomarcados, foram também considerados análogos truncados (mais curtos relativamente ao péptido original de 36 aminoácidos). A utilização destes análogos apresenta algumas vantagens, nomeadamente o facto de a sua síntese ser menos dispendiosa e de promoverem geralmente melhores resultados, quanto à eficiência de marcação. Contudo, a truncagem dos péptidos pode afectar a afinidade de ligação ao receptor e de facto, o *design* de novos análogos curtos do NPY não tem sido muito facilitado (46).

O grupo de Beck-Sickinger A sintetizou vários análogos curtos do NPY, cuja estrutura foi concebida com base no conhecimento prévio da estrutura-actividade do péptido original, designadamente o facto da prolina<sup>30</sup> e a parte C-terminal, em particular a Arg33 e Arg 35, serem essenciais para a afinidade de ligação ao receptor Y1, a leucina<sup>34</sup> promover a estrutura em hélice e as posições 31 e 32 interferirem com as propriedades agonistas do péptido. Desta forma, foram sintetizados 19 análogos truncados de 9 resíduos de aminoácido (contendo a parte C-terminal), dos quais se destacou o péptido [Pro<sup>30</sup>, Nle<sup>31</sup>, Bpa<sup>32</sup>, Leu<sup>34</sup>]NPY(28-36). Este péptido foi resultado de várias substituições com aminoácidos proteinogénicos e não-proteinogénicos, em determinadas posições na sequência peptídica do péptido original. Para os estudos de afinidade de ligação ao receptor *in vitro*, foram utilizadas linhas celulares com diferente expressão de receptores Y (MCF-7 – Y1, SMS-KAN – Y2 e HEC-1b-hY5 – Y5). O

análogo [Pro<sup>30</sup>, Nle<sup>31</sup>, Bpa<sup>32</sup>, Leu<sup>34</sup>]NPY(28-36), revelou-se um agonista selectivo para o receptor Y<sub>1</sub>, com um IC<sub>50</sub> na ordem dos nM (29,7 nM) para o receptor Y<sub>1</sub> e > 1000 para os subtipos Y<sub>2</sub> e Y<sub>5</sub>. A internalização selectiva do composto (mediada pelo receptor Y<sub>1</sub>), foi também confirmada por microscopia em células HEK293-hY1R-EYFP. O análogo demonstrou elevada estabilidade metabólica em plasma humano, com uma semi-vida de aproximadamente 5h. Uma vez que este análogo curto apresentou boas propriedades *in vitro*, o seu interesse biológico e potencial como radioligando para imagiologia de tumores que expressem o receptor Y<sub>1</sub>, deverá ser comprovado em estudos futuros (46).

Num estudo de Guérin B, um outro análogo curto do NPY – [Pro<sup>30</sup>, Tyr<sup>32</sup>, Leu<sup>34</sup>]-NPY(28–36) (BVD15), foi modificado com a introdução de lisinas e conjugado ao DOTA em diferentes posições. O conjugado com DOTA na cadeia lateral da lisina – [Lys(DOTA)<sup>4</sup>]-BVD15 – e respectivo complexo metálico de cobre (Cu), apresentaram boa afinidade em células humanas de cancro da mama MCF-7 (K<sub>i</sub> de 63 nM e 29 nM, respectivamente) (47).

Não existem resultados *in vivo*, relativos à avaliação biológica de complexos radiometálicos deste péptido truncado em modelos tumorais. No entanto, este mesmo antagonista curto do NPY (BVD15) foi recentemente marcado com <sup>18/19</sup>F e avaliado para imagem de cancro da mama e neuroblastoma por PET (48). O análogo <sup>19</sup>F-ALK-BVD revelou uma boa afinidade tanto nas células de carcinoma da mama MCF-7 (K<sub>i</sub> = 31 ± 18 nM), como nas células do neuroblastoma SK-N-MC (K<sub>i</sub> = 14,8 ± 5,8 nM). Quanto aos estudos de biodistribuição, o composto <sup>18</sup>F-ALK-BVD apresentou uma farmacocinética favorável, mas com captação tumoral negligível nos animais com lesões tumorais de cancro da mama (0,1±0,04%ID/g) e de neuroblastoma (0,7±0,2%ID/g), o que sugere uma fraca mediação da captação celular pelo receptor Y<sub>1</sub>. Nos estudos de imagem PET a intensidade de captação nas lesões de neuroblastoma foi ligeiramente superior, comparativamente à das lesões de cancro da mama. Em ambos os modelos tumorais foi confirmada a elevada expressão *ex vivo* do receptor Y<sub>1</sub>, por imunohistoquímica (48).

## 2. ÂMBITO E OBJECTIVOS DO TRABALHO

### 2.1 OBJECTIVO GERAL

O trabalho apresentado nesta dissertação surge no seguimento de estudos prévios realizados, no grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do IST/ITN (Sacavém), baseados na síntese, conjugação e marcação radioactiva de um análogo curto do NPY (agonista e selectivo para o receptor Y1) e respectiva avaliação biológica preliminar. Nestes estudos, o análogo curto [Pro<sup>30</sup>, Nle<sup>31</sup>, Bpa<sup>32</sup>, Leu<sup>34</sup>]NPY(28-36) (NPY1) foi conjugado aos ligandos bifuncionais DOTA e pz (um derivado do pirazolo) e marcado radioactivamente, com sucesso, com <sup>67</sup>Ga e <sup>99m</sup>Tc (com recurso à aproximação tricarbonilo), respectivamente.

Assim, o presente trabalho teve como principal objectivo desenvolver e avaliar o potencial de dois péptidos derivados do NPY, marcados com <sup>99m</sup>Tc, na visualização da expressão do receptor Y1 (*in vitro* e *in vivo*), em modelos tumorais de cancro da mama. Desta forma, pretendeu-se utilizar um análogo curto de 9 aminoácidos (truncado) e um longo de 36 aminoácidos (“*full-length*”), para o alveijamento do receptor Y1 (expresso no cancro da mama).

Na tabela 2.1 encontram-se representadas as sequências peptídicas dos análogos do NPY em estudo (curto e longo) e observam-se as modificações estruturais dos mesmos, relativamente ao NPY humano endógeno (hNPY) e ao análogo *porcine* NPY (pNPY).

**Tabela 2.1** – Sequência peptídica do hNPY, pNPY e dos dois análogos (longo e curto), em estudo.

Péptido	Sequência peptídica
hNPY	YPSKPDNPGEDAPAEDMARYYSALRHYINLITRQRY-NH2
pNPY	YPSKPDNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRQRY-NH2
[Arg <sup>6</sup> ,Pro <sup>34</sup> ]pNPY	YPSKPRNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRPRY-NH2
[Pro <sup>30</sup> , Nle <sup>31</sup> , Bpa <sup>32</sup> , Leu <sup>34</sup> ]NPY(28-36) (NPY1)	Ile-Asn-Pro-Nle-Bpa-Arg-Leu-Arg-Tyr-NH2

A escolha destes dois análogos em particular, baseou-se no facto de ambos terem demonstrado, em estudos prévios, uma elevada afinidade e especificidade de ligação ao receptor Y1 (46, 49). O análogo curto é o mesmo utilizado nos estudos anteriores realizados pelo grupo de Ciências Radiofarmacêuticas e já se encontrava previamente sintetizado e conjugado ao AQBFPz e ao espaçador Glu (pz-Glu-NPY1).

Para marcação dos análogos com  $^{99m}\text{Tc}$ , pretendeu-se conjugar os mesmos a uma unidade pirazolo-diamina (utilizada como agente quelante bifuncional) e seguir a aproximação tricarbonílo, usando o precursor  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ .

Este trabalho teve assim o intuito de contribuir para o desenvolvimento das aplicações clínicas da Medicina Nuclear, no âmbito da patologia mamária, nomeadamente para o desenvolvimento de uma nova sonda de imagem SPECT, baseada num análogo do NPY, específica para o alvejamento do receptor Y1 no cancro da mama.

### 2.2 OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

O trabalho desenvolvido contempla os seguintes objectivos específicos:

- 1) Sintetizar por fase sólida o análogo longo do NPY e caracterizá-lo por ESI-MS e HPLC;
- 2) Conjugar o péptido longo do NPY ao agente bifuncional quelante pz (constituído por uma unidade pirazolo-diamina) e caracterizar o conjugado por ESI-MS e HPLC;
- 3) Marcar radioactivamente os conjugados pz-péptido (para o análogo curto e longo) com  $^{99m}\text{Tc}$ , através da unidade organometálica  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ , e efectuar a sua purificação e caracterização por HPLC;
- 4) Avaliar a expressão do receptor Y1 em diferentes linhas celulares tumorais (do cancro da mama e outras), através de uma análise *Western Blot*;
- 5) Avaliar biologicamente os radiopéptidos:
  - a. Avaliar *in vitro* a capacidade de internalização celular, em linhas celulares do cancro da mama que expressam o receptor Y1;
  - b. Determinar a fixação tumoral específica e o perfil farmacocinético: biodistribuição em *xenografts* de cancro da mama (murganhos imunodeficientes portadores de cancro de mama induzidos com células tumorais humanas).

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ANÁLOGO LONGO DO NPY

##### 3.1.1 Materiais

Para a síntese do péptido pretendido recorreu-se a vários reagentes e solventes, que se especificam na tabela 3.1.

**Tabela 3.1** – Lista de solventes e reagentes utilizados na síntese e caracterização química do análogo longo do NPY.

Solventes e reagentes	Fornecedor
<b>Aminoácidos</b> (Fmoc-AA-OH) (excepto Lisina)	CEM Liberty
<b>Lisina</b> (Fmoc-Lys(MTT)-OH) (852065)	Novabiochem
<b>Resina</b> Rink Amide MBHA LL (100-200 mesh) (855045)	Novabiochem
<b>Anidrido acético</b>	Panreac Química, SA
<b>DCM</b> (32222) puro pa.a. ≥ 99,9%	Sigma-Aldrich
<b>DIPEA</b> (496219) 99,5%, biotech. Grade	Sigma-Aldrich
<b>DMF</b> (UN2265)	Fisher Chemical
<b>HBTU</b> (851006)	Novabiochem
<b>NMP</b> (494496) biotech. grade, ≥ 99,5%	Sigma-Aldrich
<b>Piperidina</b> (571261) biotech. grade, ≥ 99,5%	Sigma-Aldrich
<b>TFA</b>	Sigma-Aldrich

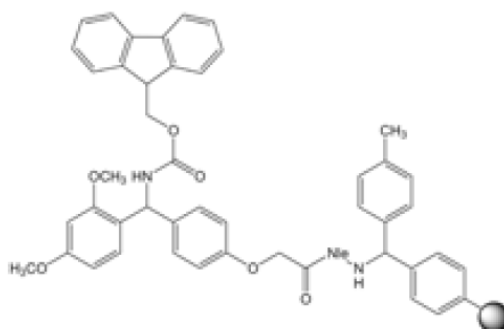
##### 3.1.2 Procedimento experimental

O análogo longo do NPY (de 36 aminoácidos) – [Arg<sup>6</sup>,Pro<sup>34</sup>]pNPY – de sequência YPSKPRNPGEDAPAEDLARYYSALRHYINLITRPRY-NH<sub>2</sub> e massa molecular calculada de 4263,8 Da, foi sintetizado por SPPS por irradiação de microondas. Para tal, foi utilizado um sintetizador Liberty, CEM de 12 canais (figura 3.1).



**Figura 3.1** – Sintetizador automático de péptidos, por microondas (Liberty, CEM™), existente nas instalações do Grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do IST/ITN.

A SPPS foi efectuada com recurso à estratégia Fmoc, sobre uma resina de matriz de poliestireno (com 1% de divinilbenzeno). Trata-se de uma resina funcionalizada com 4-metilbenzidrilamina (MBHA), que incorpora um espaçador (*linker*) Fmoc-AM-OH, ligado à resina através de uma norleucina (Nle) – resina Rink Amide MBHA (4-(2',4'-Dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-MBHA) (figura 3.2). Foi utilizada uma versão especial desta resina – Rink Amide MBHA LL (*low loading*) – com baixo grau de substituição (300 mg, 0,36 mmol/g) e uma escala de 0,1 mmol.



**Figura 3.2** – Estrutura química da resina Rink Amide MBHA.

Previamente ao início da síntese automática do péptido, foi criado no *software* PepDriver™ (no computador ligado ao equipamento), um método específico para esta síntese em particular, onde foi possível definir vários parâmetros relacionados com a mesma, incluindo: a sequência de aminoácidos pretendida; os vários passos de desprotecção *N*<sup>o</sup> (de remoção do grupo Fmoc) e de acoplamento, específicos para

cada resíduo de aminoácido; as condições de irradiação por microondas aplicadas a cada ciclo; tipo de ligação do C-terminal, do primeiro aminoácido incorporado na sequência, à resina; método de desprotecção final do péptido. Neste caso, no final da síntese, após a formação da sequência peptídica, optou-se por não se efectuar a clivagem do péptido da resina, nem se realizar a desprotecção final (remoção do grupo Fmoc do N-terminal, do último aminoácido adicionado à cadeia peptídica). Desta forma, o produto final obtido no equipamento consistiu no péptido ainda acoplado à resina, com protecção tanto do N-terminal como das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos. Os aminoácidos utilizados, com protecção da cadeia lateral foram: Tyr (com *t*-Bu); Arg (com Pbf); Thr (com *t*-Bu); Asn (com Trt); His (com Trt); Ser (com *t*-Bu); Asp (com *Ot*-Bu); Glu (com *Ot*-Bu); e Lys (com MTT).

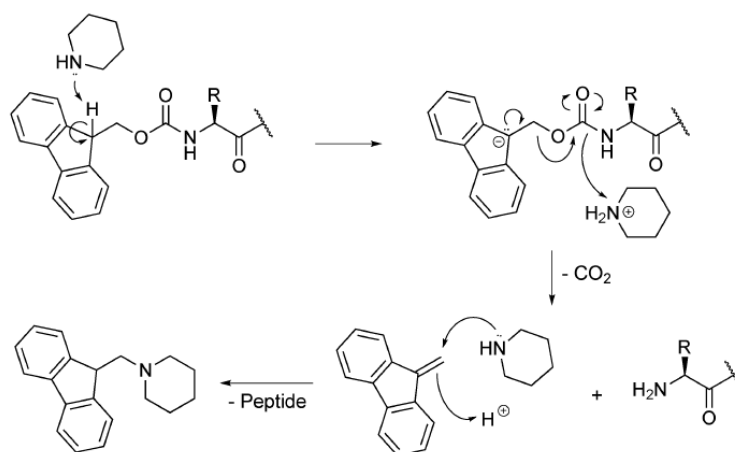
A síntese do péptido [Arg<sup>6</sup>,Pro<sup>34</sup>]NPY decorreu por um período de cerca de 37 h. Tendo em conta que se tratou de um processo de síntese automático, requereu mínima intervenção manual por parte do operador, designadamente na pesagem e medição dos volumes dos reagentes e solventes utilizados, colocação de filtros nos canais de saída para os frascos de plástico de cada aminoácido e nos frascos de vidro das soluções de desprotecção, acoplamento e *capping*, colocação dos respectivos frascos nas posições adequadas no sintetizador e mudança das garrafas de DMF (solvente utilizado em maior quantidade), sensivelmente a meio da síntese.

O *software* PepDriver™ possui um menu “calculadora”, a partir do qual foi possível determinar de forma simples e rápida a quantidade necessária de resina, reagentes e solventes, para a síntese (apêndice 4). Cada aminoácido, activador (HBTU) e activador base (DIPEA), foram utilizados nas concentrações *standard* recomendadas pelo fabricante de 0,2 M, 0,5 M e 2 M, respectivamente. O solvente utilizado para as soluções de desprotecção (piperidina), HBTU e *capping* (anidrido acético) foi o DMF. Para a solução de DIPEA utilizou-se NMP como solvente (pois o DIPEA à concentração de 2 M não é miscível em DMF).

Os aminoácidos, a resina e o activador (armazenados a 5°C), foram retirados do frigorífico e deixados à temperatura ambiente alguns minutos antes da sua pesagem, de forma a evitar que a água proveniente do fenómeno de condensação pudesse afectar a pesagem e conseqüentemente o rendimento da síntese.

Como em qualquer SPPS (figura 1.14), os aminoácidos foram acoplados sequencialmente na cadeia peptídica na direcção C → N terminal. A síntese foi iniciada com o *loading* da resina, que correspondeu a 3 ciclos de lavagem (7 mL de DMF e 7 mL de DCM cada) e filtração da mesma. O acoplamento do 1º aminoácido

(Tyr) foi efectuado mediante a formação de uma ligação amida (entre a resina e o aminoácido). De seguida, iniciaram-se os ciclos de desprotecção e acoplamento dos 36 aminoácidos. Foi realizado *capping* (com anidrido acético) a partir do 21º aminoácido incorporado na sequência (inclusive), o que permitiu a acetilação dos grupos amina livres dos aminoácidos que não reagiram, ficando desta forma protegidos e impedidos de reagir posteriormente com os grupos carboxilato de outros aminoácidos (2 min, 65-80°C a 1 watt). Para a desprotecção dos grupos amina dos aminoácidos, foi utilizada uma solução de 20% de piperidina em DMF, que permite remover selectivamente os grupos Fmoc (que são ortogonais aos grupos protectores das cadeias laterais) (figura 3.3). A desprotecção  $N^{\alpha}$  decorreu com irradiação de microondas (35 watts) e incluiu dois tratamentos com piperidina (intercalados por filtragem): o primeiro de 37-45 seg (35-42°C) e o segundo de 3-5 min (55-80°C).



**Figura 3.3** – Desprotecção  $N^{\alpha}$  através da piperidina (31).

Para cada ciclo de acoplamento, foram utilizados 5 eq de aminoácido, 5 eq de HBTU (que activa o grupo carboxilato do aminoácido a introduzir) e 10 eq de DIPEA (que activa o grupo amina do ultimo aminoácido introduzido). Cada aminoácido foi acoplado por um método de *double coupling* (duas etapas de acoplamento): até ao 10º aminoácido com irradiação por microondas de 25 watts (5 + 5 min, a 80°C); a partir do 11º aminoácido a 0 watts (6 + 6 min, a 50°C). A Arg requereu condições de reacção especiais, particularmente um tempo de acoplamento bastante superior (30-40 min cada etapa). Os processos de acoplamento dos aminoácidos Pro e Asn foram sempre realizados a elevadas temperaturas (80°C). Entre cada etapa de desprotecção e acoplamento foram sempre efectuadas lavagens com DMF (5-7 mL).

No final da síntese, foram efectuadas lavagens do sistema com DCM e DMF. O produto final obtido consistiu num precipitado amarelo (resina + péptido), que foi lavado com DCM e DMF (para eliminar eventuais impurezas), filtrado e seco sob

atmosfera de azoto. A quantidade estimada de péptido obtida foi: 11,8533 g (resina + péptido + falcon) – 10,5803 g (falcon) – 0,3 g (resina) = 0,973 g (péptido).

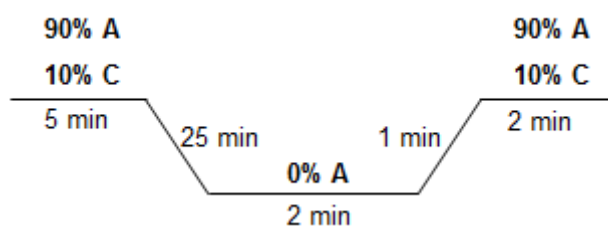
Do total de produto obtido, retirou-se uma pequena quantidade para caracterização química (o restante ficou armazenado no frigorífico), tendo-se seguido os seguintes passos:

- **Clivagem do péptido da resina e desprotecção das cadeias laterais dos aminoácidos (em fase sólida)**

- 1) Preparou-se a solução de desprotecção: 95 % TFA na presença de 5% de dois *scavengers* (tioanisole/ p-tiocresol 1:1);
- 2) Incubou-se o produto final (péptido protegido acoplado à resina) com solução de desprotecção, durante 2h (com agitação permanente);
- 3) Filtrou-se a resina a vácuo (em atmosfera de azoto). Previamente, lavou-se o filtro e o frasco de filtragem com solução de desprotecção;
- 4) Lavou-se a solução filtrada com TFA e posteriormente, concentrou-se por evaporação do TFA em atmosfera de azoto (durante alguns minutos);
- 5) Separou-se os péptidos (contidos na solução filtrada) dos *scavengers* e dos grupos protectores, resultantes da desprotecção, por precipitação em éter frio (para maximizar a precipitação dos péptidos). O éter foi utilizado com um excesso de cerca de 10x;
- 6) Dividiu-se a amostra em 2 falcons e colocou-se a -20°C, durante cerca de 30 min;
- 7) Centrifugou-se a 4°C, durante 10 min a 3000 rpm. Decantou-se o éter e lavou-se o precipitado branco formado (péptido) novamente com éter, com a ajuda do vórtex;
- 8) Repetiu-se o passo 7 mais três vezes consecutivas;
- 9) Após a última centrifugação, decantou-se o éter, secou-se o péptido por evaporação, em atmosfera de azoto (durante cerca de 20 min);
- 10) Solubilizou-se o péptido com uma solução aquosa de TFA a 0,1% e liofilizou-se, durante cerca de 20 h.

- **Análise por HPLC**

- 1) A análise por HPLC foi realizada com uma bomba de cromatografia PerkinElmer 200, acoplada a um detector UV-vis Shimadzu SPD 10AV, utilizando uma coluna analítica de fase reversa DiscoveryBIO Wide Pore (Supelco, Sigma-Aldrich) C18 (250 mm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), com poros de 300 Å de diâmetro;
- 2) Previamente à injeção do crude péptídico no HPLC, foi efectuado uma corrida controlo – “branco”;
- 3) A cromatografia foi efectuada com 50  $\mu$ L de amostra, durante 30 min, utilizando como eluentes: solução aquosa de TFA a 0,1% (A) e acetonitrilo com 0,1% TFA (C), com um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. O gradiente utilizado encontra-se descrito na figura 3.4.



**Figura 3.4** – Gradiente de HPLC do controlo analítico do crude peptídico.

- **Caracterização por ESI-MS**

Após a realização da análise por HPLC, a amostra foi caracterizada por espectrometria de massa, utilizando um equipamento de ESI-MS Bruker HCT.

## 3.2 CULTURA CELULAR

### 3.2.1 Materiais

Os materiais utilizados nos procedimentos incluídos na cultura celular, encontram-se descritos na tabela 3.2.

**Tabela 3.2** – Lista dos materiais utilizados nos procedimentos de cultura celular.

	Fornecedor
Células	EACC
DMEM, com Glutamax I	Gibco-Invitrogen™
MEM	Gibco-Invitrogen™
DMSO	Sigma-Aldrich
FBS	Gibco-Invitrogen™
PBS	Gibco-Invitrogen™
RPMI	Gibco-Invitrogen™
Solução de antibióticos (penicilina/estreptomicina)	Gibco-Invitrogen™
Tripsina-EDTA	Gibco-Invitrogen™

### 3.2.2 Procedimento experimental

Durante a manipulação de células foram seguidos todos os procedimentos de segurança biológica, incluindo esterilidade de todas as soluções e equipamentos e técnicas de assépcia.

Foram realizadas culturas de linhas celulares tumorais humanas de: carcinoma na mama (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435S), do ovário (A2780), da próstata (PC-3) e adenocarcinoma cervical (HeLa). As células cresceram em meio de cultura DMEM, contendo GlutaMax I ou RPMI, suplementado com 10% de FBS (previamente inativado pelo calor) e 1% de solução de antibióticos (penicilina/ estreptomicina), em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> e 75 cm<sup>2</sup> (apêndice 5).

- **Início de culturas a partir de células congeladas e armazenadas em azoto líquido**

- 1) Descongelaram-se rapidamente as alíquotas de células a 37°C (durante 1-2 min), com agitação constante. Passaram-se as alíquotas com álcool a 70%, antes de as transferir para a câmara de fluxo laminar;
- 2) Transferiram-se as células para frascos de cultura apropriados e diluíram-se (lentamente) em DMEM ou RPMI (à temperatura ambiente ou a 37°C). Para algumas linhas celulares é importante retirar previamente o DMSO (crioprotector usado na congelação das alíquotas mas tóxico acima dos 4°C) lavando as células com 5 mL de meio de cultura e separando-as por centrifugação (2 min, 950 rpm), para remover o DMSO;
- 3) As células foram cultivadas em atmosfera húmida, com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C (numa estufa Heraeus, Germany), sendo o meio de cultura renovado quando gasto (cada 2 ou 3 dias). As várias linhas celulares usadas neste trabalho crescem aderentes e em monocamadas até atingirem cerca de 80% de confluência, altura em que se deve proceder à sua diluição (sub-cultura).

- **Sub-culturas de linhas celulares aderentes**

- 1) Foram realizadas sub-culturas das várias linhas celulares, quando se observou (ao microscópio invertido) que as culturas estavam confluentes ou perto da confluência (80%), sem a presença de fungos ou bactérias;
- 2) Removeu-se (aspirou-se) o meio de cultura gasto e lavaram-se as células com 3 mL PBS;
- 3) As células aderentes ao fundo do frasco de cultura foram soltas por adição de 1 mL de tripsina-EDTA, que deve cobrir toda a superfície de cultura e actuar durante 2-10 min (dependendo da linha celular) a 37°C, até que as células fiquem todas em suspensão. Observou-se ao microscópio invertido;
- 4) Inactivou-se a tripsina com meio de cultura (volume 3x superior ao da tripsina, neste caso 3 mL) e ressuspenderam-se as células;
- 5) Diluiu-se a suspensão de células com meio de cultura, usando um novo frasco de cultura. O factor de diluição dependeu da velocidade de crescimento de cada linha celular e do estado de confluência no momento da sub-cultura;

6) A cultura celular ocorreu em atmosfera húmida, com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

- **Congelação de células (realização de alíquotas de armazenamento)**

- 1) Observaram-se as culturas celulares ao microscópio invertido, para avaliar a confluência e confirmar a ausência de fungos ou bactérias;
- 2) Removeu-se o meio gasto e lavou-se com 3 mL de PBS;
- 3) Adicionou-se 1 mL de tripsina-EDTA, colocaram-se as células na estufa (até se soltarem) e inactivou-se a tripsina com 3 mL de meio;
- 4) Centrifugou-se (2 min, 950 rpm) e aspirou-se o meio de cultura;
- 5) Ressuspenderam-se as células em meio de congelação: DMEM ou RPMI, com FBS (10% do volume de meio de cultura, no mínimo) e DMSO (10% do volume total);
- 6) Foram efectuadas alíquotas de solução de células, em tubos de congelação devidamente identificados (cerca de 10<sup>6</sup> células/mL/tubo);
- 7) Uma vez que o processo de congelação deve ser lento, colocaram-se as alíquotas a -20°C durante cerca de 1h, antes de os transferir para a arca congeladora a -80°C;
- 8) Transferiram-se as alíquotas para azoto líquido (longa armazenagem).

### 3.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR Y1

#### 3.3.1 Materiais

Os materiais utilizados nos procedimentos para a avaliação da expressão do receptor Y1 em várias linhas celulares tumorais, encontram-se na tabela 3.3.

**Tabela 3.3** – Lista dos materiais utilizados na realização de extractos celulares, quantificação proteica e ensaio Western Blot.

	Fornecedor
Anticorpo de coelho $\alpha$ -NPY-Y1R (ab 73897)	abcam <sup>®</sup>
BSA	Sigma-Aldrich
Conjugado anticorpo IgG-HRP de cabra ( $\alpha$ -Ac coelho)	Bio-Rad
Corante azul de comassie	Sigma-Aldrich
Glicina	Bio-Rad
Inibidores de proteases	Roche
Kit DC “Protein Assay”	Bio-Rad
Kit <i>SuperSignal West Pico Substrate</i>	Thermo Scientific
Leite magro em pó Molico	Nestlé
Marcador para electroforese ColorBurst™	Sigma-Aldrich
Membrana de nitrocelulose	Protan™
Reagente CellLytic™ M	Sigma-Aldrich
SDS 20% UltraPure	Gibco-Invitrogen™
Solução de fixador (GBX)	Kodak
Solução de revelador (GBX)	Kodak
TEMED	AppliChem
Tris UltraPure	national diagnostics

### 3.3.2 Procedimento experimental

#### 3.3.2.1 Extractos celulares

Foram obtidos extractos celulares de todas as linhas celulares tumorais, quando estas se encontravam em cultura e em confluência, recorrendo ao seguinte protocolo:

- 1) Removeu-se o meio de cultura gasto e lavou-se (2x) com 5 mL de PBS frio;
- 2) Adicionou-se 600-800  $\mu$ L de reagente CellLytic™ M frio suplementado com um cocktail de inibidores de proteases, para provocar a lise das células;
- 3) Após 15 min em gelo, os lisados foram transferidos para falcons de 15 mL e foram centrifugados (20 min, 9700 rpm a 4°C);
- 4) O sobrenadante (extracto) foi recolhido para *eppendorfs* e armazenado a -80°C.

### 3.3.2.2 *Quantificação proteica*

A quantificação proteica de alíquotas dos lisados celulares foi determinada por uma técnica colorimétrica, utilizando o kit DC “*Protein Assay*” (baseado no método de Lowry modificado), que inclui três reagentes: A (solução alcalina de tartarato de cobre); B (reagente *Folin* diluído); e S (solução surfactante). Este ensaio é baseado na reacção das proteínas dos extractos celulares com o cobre (em meio alcalino) e subsequente redução do reagente *Folin*. O desenvolvimento de cor azul (absorvância máxima a 750 nm) deve-se essencialmente aos aminoácidos tirosina e triptofano, mas também cisteína e histidina. O ensaio foi realizado com o seguinte protocolo:

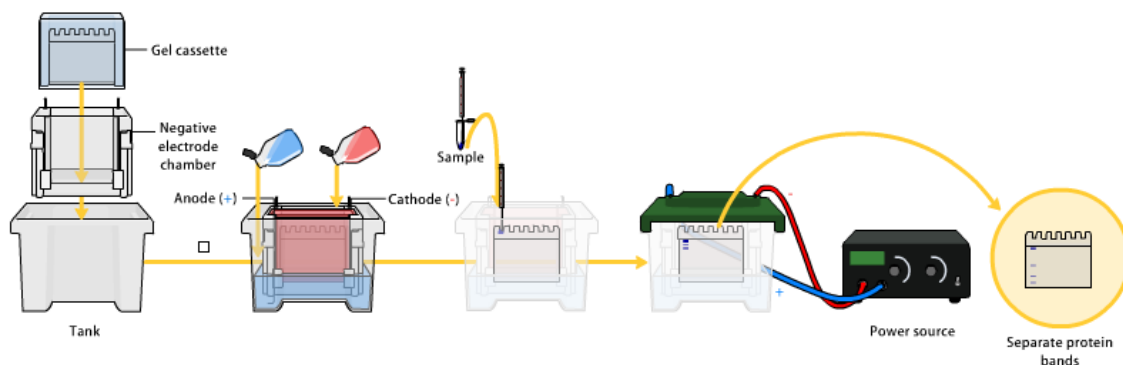
- 1) Para a execução da curva de calibração foi utilizada uma solução de albumina de soro bovino (BSA) ultrapura (10 mg/ mL, alíquotada e guardada a -20°C). A partir desta solução, foram preparadas 8 soluções padrão de concentrações conhecidas (0; 0,15; 0,25; 0,5; 0,75; 1,5; 2,5; e 5 mg/ mL), por diluição com o reagente CellLytic™;
- 2) Pipetou-se 5 µL de cada solução padrão de BSA ou 5 µL das amostras de lisados, numa placa de microtitulação (96 poços);
- 3) Adicionou-se 25 µL de reagente A' (20 µL de reagente S por/ mL de reagente A) a cada poço;
- 4) Adicionou-se 200 µL de reagente B a cada poço;
- 5) Agitou-se suavemente, e deixou-se em repouso durante 15 min;
- 6) Leu-se a absorvância a 750 nm;
- 7) Determinou-se a concentração de proteína dos extractos celulares, a partir da equação da recta de calibração, obtida a partir de soluções padrão de BSA com concentrações conhecidas.

### 3.3.2.3 *Ensaio Western Blot*

A expressão do receptor Y1 nas linhas celulares tumorais MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435S, A2780, PC-3 e HeLa foi avaliada por Western Blot. Para este estudo, procedeu-se previamente à determinação da concentração total de proteína (como descrito em 3.3.2.2) nos extractos celulares obtidos em 3.3.2.1 e posteriormente, seguiu-se o seguinte protocolo experimental:

- 1) Preparou-se o sistema de electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE)-SDS (figura 3.5);

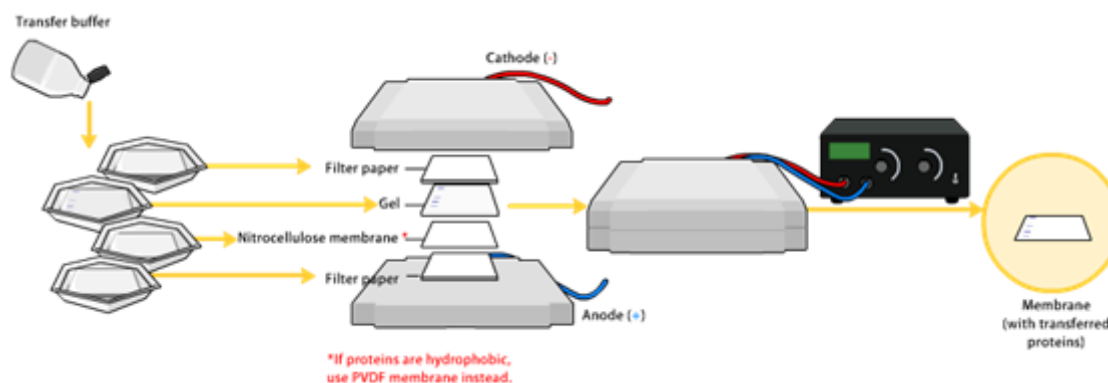
- 2) Preparou-se o gel para PAGE-SDS, com 10% de acrilamida (percentagem adequada ao peso molecular do receptor Y1 – 44 kDa): 6,7 mL de água destilada; 4,5 mL de tampão Tris 1,5 M; 6 mL de acrilamida a 30%; 0,18 mL de glicerol a 10%; 0,18 mL de SDS a 10%; 0,135 mL de PSA a 10%; e 0,01 mL de TEMED a 100%;



**Figura 3.5** – Esquema representativo da electroforese em gel de poli-acrilamida-SDS.

- 3) Pipetou-se imediatamente a solução entre as placas de vidro e sílica do sistema, até uma altura de aproximadamente 6 cm. Colocou-se uma camada de cerca de 1 mL de água (para obter uma superfície plana) e deixou-se polimerizar (cerca de 45 min);
- 4) Removeu-se a água e colocou-se o pente, para formação dos poços de aplicação das amostras;
- 5) Preparou-se o gel de concentração (de 4% de acrilamida): 7 mL de água destilada; 3 mL de tampão Tris 0,5 M; 1,6 mL de acrilamida a 30%; 0,12 mL de glicerol a 10%; 0,12 mL de SDS a 10%; 0,09 mL de PSA a 10%; e 0,01 mL de TEMED a 100%. Encheram-se as placas com esta solução e deixou-se polimerizar;
- 6) Preparou-se o tampão de electroforese tris-glicina (pH 8,3): 14,4 g de glicina (0,192 M); 3,27 g de Tris (0,025 M); em solução de SDS 0,1% (preparada por diluição 1/200 da solução aquosa SDS a 20%). Montou-se o sistema de electroforese, preenchendo os tanques com este tampão;
- 7) Preparou-se o tampão de amostra: 1,25 mL de Tris; 3 mL de SDS 10% (detergente que confere carga negativa às proteínas e promove a sua linearização); 0,2 mL de corante azul de bromofenol 1% (que permite visualizar as proteínas no gel); 1 mL de glicerol 100% (para aumentar a densidade das amostras); 4,55 mL de água; 154 mg de DTT (agente redutor que reduz os grupos SH e que também permite a linearização das proteínas);

- 8) Prepararam-se as amostras de 50 µg de extracto, por diluição (1:6) das mesmas em tampão de amostra;
- 9) Aplicaram-se as amostras e o marcador ColorBurst™ (mistura de proteínas com pesos moleculares conhecidos) no gel e procedeu-se à electroforese (com voltagem constante de 100 V), durante 2h 50min;
- 10) Preparou-se o tampão de transferência (500 mL): 1,5 g de Tris; 7,2 g de glicina; água; e 20% de metanol.
- 11) Preparou-se o aparelho de transferência do gel para uma membrana de nitrocelulose. Molhou-se o gel, a membrana e os filtros usados com tampão de transferência;
- 12) Transferiram-se electroforéticamente as proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose, aplicando uma corrente eléctrica fixa de 400 mA, durante cerca de 1h 15min (figura 3.6);



**Figura 3.6** – Transferência das amostras proteicas do gel para a membrana de nitrocelulose.

- 13) Lavou-se a membrana numa solução de PBS-T (PBS + Tween20 a 0,1%) e submergiu-se o gel em corante azul de comassie, em agitação constante (50 rpm) à temperatura ambiente, durante cerca de 2h. Posteriormente, a membrana ficou armazenada a 5°C (no frigorífico) e o gel à temperatura ambiente, durante a noite;
- 14) Lavou-se o gel com solução descorante (10% ácido acético, 30% metanol e água), para descorar as regiões que não correspondem a bandas proteicas;
- 15) Preparou-se a solução de bloqueio da membrana de nitrocelulose com 5% de leite magro em pó em PBS-T (para bloquear os locais de ligação não específica aos anticorpos (Ac));
- 16) Preparou-se a solução de Ac primário de coelho ( $\alpha$ -NPY-Y1R), por diluição (1:1000) em solução de leite com PBS-T (12 mL de solução de leite em PBS-T + 12 µL de solução de Ac);

- 17) Incubou-se a membrana com a solução de leite com Ac primário à temperatura ambiente, em agitação constante (50 rpm), cerca de 1h 40min. Posteriormente, efectuaram-se 3 lavagens com PBS-T (10 min cada), em agitação constante a 100 rpm;
- 18) Preparou-se a solução de Ac secundário IgG-HRP de cabra ( $\alpha$ -IgG de coelho), por diluição (1:3000) com a solução de leite com PBS-T (12 mL de solução de leite em PBS-T + 4  $\mu$ L de solução de Ac);
- 19) Incubou-se a membrana com a solução de Ac secundário à temperatura ambiente, em agitação constante (50 rpm), cerca de 1h. Posteriormente, efectuaram-se 3 lavagens com PBS-T (10 min cada), em agitação constante a 100 rpm;
- 20) Por último, foi efectuada a detecção do receptor Y1 transferido para a membrana, utilizando o kit "SuperSignal WestPico Substrate". A detecção realizou-se por um processo de quimioluminescência, baseado na reacção de oxidação do luminol catalizada pela enzima HRP (contida no Ac secundário), em condições alcalinas. Imediatamente após a oxidação, o luminol (substrato) fica num estado excitado, emitindo luz ao decair. A emissão máxima de luz dá-se aos 5-20 min após o início da reacção, a um comprimento de onda de 428 nm, podendo assim ser detectada por exposição a filme de autoradiografia sensível ao azul.
  - 20.1) Numa câmara escura, incubaram-se as amostras com uma solução de reagentes de detecção A (substrato) e B (catalisador) (1:1), durante 5 min;
  - 20.2) Após o tempo de incubação, colocou-se a membrana tapada com película aderente numa cassete de exposição com uma chapa de raios-x (em câmara escura). Efectuaram-se exposições de 1, 2 e 5 min;
  - 20.3) Procedeu-se à revelação da chapa (em câmara escura), colocando-a numa solução de revelador (1-3 min), lavando-a com água e passando-a por uma solução de fixador.

### 3.4 MARCAÇÃO RADIOACTIVA DOS ANÁLOGOS DO NPY

#### 3.4.1 Materiais e procedimento experimental

Devido a questões logísticas não foi possível efectuar a marcação radioactiva dos análogos do NPY, com  $^{99m}\text{Tc}$ . Contudo, o procedimento experimental adoptado teria em consideração a experiência prévia na marcação do conjugado pz-Glu-NPY1 (condições já optimizadas) e incluiria os seguintes passos:

- 1) Eluir o  $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$  a partir do gerador de  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  (Mallinckrodt, Ultra-TechneKow<sup>®</sup> FM ou ELUMATIC III<sup>®</sup>), usando uma solução salina a 0,9% e medir a actividade numa câmara de ionização (Aloka, Curimeter IGC-3);
- 2) Preparar o precursor  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  através da marcação de um kit liofilizado Isolink<sup>®</sup> (Covidien-Mallinckrodt) com  $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$  (1-2 mL), durante 30 min a 100°C. Após arrefecimento, ajustar o pH da solução a 7. Determinar o rendimento e a pureza radioquímica por RP-HPLC;
- 3) Marcar radioactivamente o conjugado pz-análogo NPY através da adição de 100  $\mu\text{L}$  da solução de conjugado ( $10^{-4}$  M) a 900  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{fac-}[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  (37-74 MBq), num frasco previamente purgado com azoto e selado com tampa de borracha e cápsula de alumínio. Incubar a mistura reaccional por 45 minutos a 85°C, em solução aquosa (pH 7). Determinar o rendimento, caracterizar os complexos de  $^{99m}\text{Tc}$  (por comparação do seu tempo de retenção com o tempo de retenção dos complexos análogos de Re(I)) e purificar o radiopéptido (para aumentar a sua actividade específica) por RP-HPLC;
- 4) Recolher o radiopéptido marcado num falcon plástico de 50 mL, contendo 0,2 mL de PBS com 0,2% de BSA (para evitar adsorção);
- 5) Analisar o radiopéptido purificado por RP-HPLC, para confirmar a sua pureza e estabilidade após os processos de purificação, neutralização e evaporação do solvente orgânico (da solução de radiopéptido purificado).

No apêndice 6 descrevem-se as condições cromatográficas das análises HPLC efectuadas ao complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -pz-Glu-NPY1 – controlo analítico e após purificação. Em ambos os casos foi utilizada uma coluna analítica Nucleosil C18, 250 x 4 mm; loop 100 $\mu\text{L}$  e como solventes: solução aquosa 0,1% TFA (A) e acetonitrilo 0,1%TFA (B).

## 3.5 ESTUDOS DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR

### 3.5.1 Materiais e procedimento experimental

O procedimento experimental geral, para os estudos de internalização celular dos radiopéptidos (em células de cancro da mama MCF-7, MDA.MB-231 e MDA.MB-435S), incluiria os seguintes passos:

- 1) Efectuar cultura celular das várias linhas celulares, como descrito em 3.2.2;
- 2) Determinar a concentração e viabilidade celular, por contagem de células com azul tripano;
- 3) Colocar, em placas de 24 poços, cerca de  $0,2 \times 10^6$  células/poço em meio de cultura e deixá-las aderir durante a noite a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>;
- 4) Incubar as células (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>) com cerca de 200,000 cpm do complexo metálico em 0,5 mL de meio de ensaio (MEM com 25 nM de HEPES e 0,2% de BSA), durante períodos de 5 min a 4h;
- 5) Interromper a internalização por lavagem das células com meio de ensaio gelado;
- 6) Remover a fracção de radiopéptido ligado à membrana celular, com duas lavagens com um tampão ácido (50 mM glicina.HCl/100 mM NaCl, pH 2.8), durante 5 min à temperatura ambiente;
- 7) Neutralizar o pH ácido das células com uma solução de PBS 0,2% BSA gelado;
- 8) Provocar a lise celular com uma solução de NaOH 1 M, durante 10 min a 37°C, para determinar a fracção de radiopéptido internalizado;
- 9) Medir a radioactividade internalizada e ligada à superfície das células utilizando um contador gama. Calcular a percentagem de radiopéptido internalizado, ligado à membrana e a percentagem de captação total (soma das duas fracções anteriores), em função da actividade total aplicada a cada poço;
- 10) Para avaliar a captação e internalização celular específica do composto (mediada pelo receptor Y1), realiza-se um estudo em paralelo, utilizando o agonista potente pNPY (1 µM), para bloquear os receptores Y1.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Vários receptores de hormonas peptídicas estão sobreexpressos em tumores humanos, permitindo o seu alveijamento específico para imagem e terapia (22). Os receptores do NPY encontram-se entre os mais recentes e promissores candidatos no âmbito do cancro da mama, que apresenta uma elevada incidência e densidade na expressão do receptor Y1 (35).

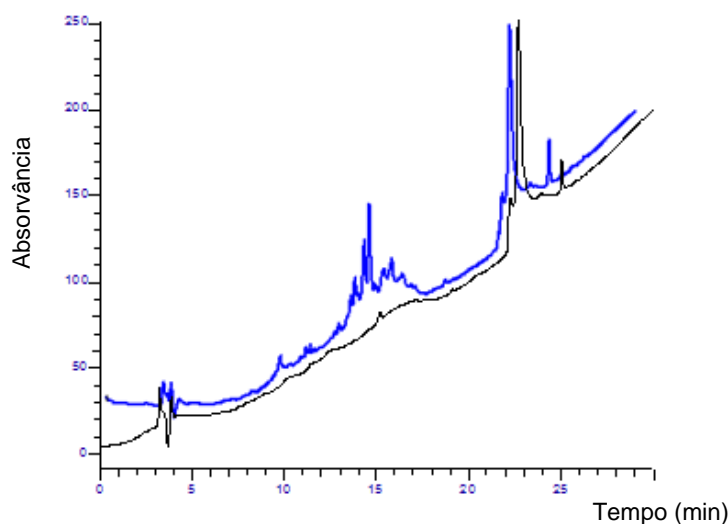
Para a escolha dos análogos em estudo neste trabalho, foi levada em consideração informação prévia relativa a estudos de estrutura-actividade para análogos do NPY. Tais estudos demonstram que a parte C-terminal do NPY desempenha um papel fundamental na capacidade de ligação e activação do receptor Y1, sendo a arginina<sup>35</sup> o aminoácido mais importante, para a interacção directa com o aspartato 6.59 do receptor. A leucina<sup>34</sup> é essencial para promover a estrutura em hélice e as posições 31 e 32 interferem com as propriedades agonistas do péptido. Quanto às modificações efectuadas na estrutura original do péptido, a substituição por uma prolina na posição 34, promove selectividade para o receptor Y1 e a substituição dos aminoácidos 6 e 7, por uma arginina e fenilalanina (respectivamente), aumenta a afinidade de ligação ao receptor Y1 (46,49,50).

### 4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO ANÁLOGO LONGO DO NPY

A síntese do análogo longo do NPY [Arg<sup>6</sup>,Pro<sup>34</sup>]pNPY foi efectuada de forma automática por SPPS, com recurso à química Fmoc, pois esta requer condições químicas mais suaves que a estratégia Boc, para a desprotecção e clivagem do péptido (30). A resina utilizada (Rink Amide MBHA) e o respectivo grau de substituição (0,36 mmol/g – *low loading*), foram escolhidos por serem indicados para sínteses de péptidos longos (mais difíceis). No final da síntese, optou-se pela não clivagem do péptido da resina (pois o ácido usado pode danificar o sintetizador caso exista alguma fuga e normalmente este procedimento é realizado manualmente com elevado rendimento) e pela não desprotecção do péptido, obtendo-se assim um precipitado amarelo (péptido protegido ligado à resina). A presença do grupo Fmoc no último aminoácido da sequência pode ajudar no processo posterior de purificação, pois o péptido que se pretende obter, de sequência completa contém um grupo protector

volumoso na amina terminal, ao contrário das espécies precursoras e incompletas. Além disso, quando a amina terminal do péptido está protegida, é mais difícil ocorrerem reacções secundárias durante o armazenamento do péptido.

Após clivagem e desprotecção das cadeias laterais do péptido, o crude peptídico obtido foi analisado por HPLC (figura 4.1).



**Figura 4.1** – HPLC do controlo analítico ao crude peptídico (azul) e “branco” realizado previamente (preto) (detector UV).

O pico observado aos 23 min no cromatograma (do “branco” e da amostra), deve-se ao solvente e gradiente usados na análise por HPLC. Pela análise do cromatograma não se verifica a existência de um pico claramente predominante, que se possa atribuir à espécie pretendida, mas sim vários picos ( $T_R$  de 13 a 18 min), correspondendo a diferentes espécies. No entanto, nenhuma destas espécies corresponde ao péptido pretendido conforme resultado da análise do espectro obtido por ESI-MS (figura 4.2).

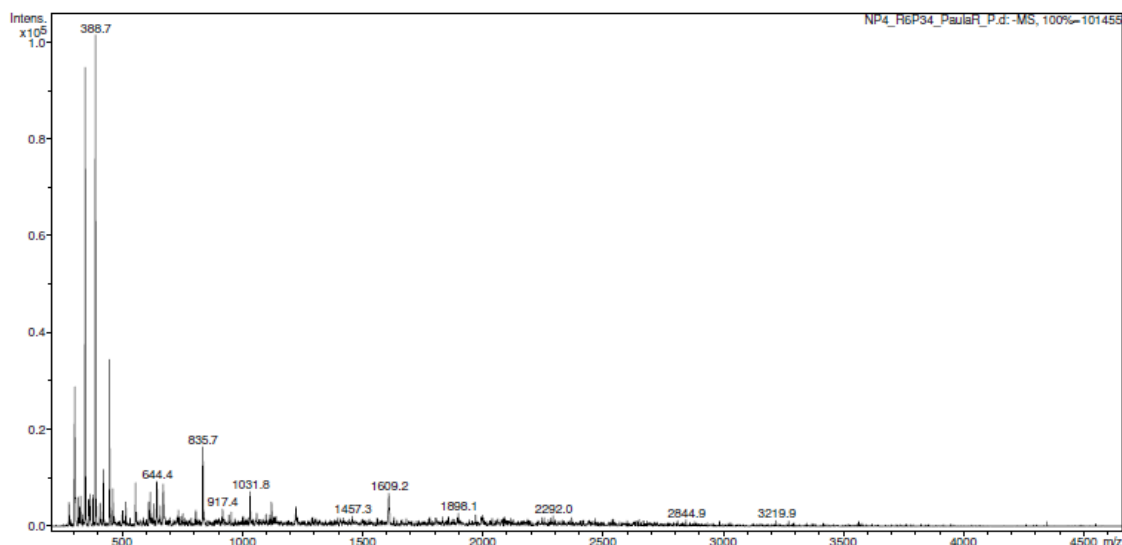


Figura 4.2 – Espectro de massa (ESI-MS) do crude peptídico em modo positivo.

De facto, tendo em conta que a massa da molécula peptídica ( $M$ ) é 4487,04 Da (péptido de 4263,80 Da + Fmoc de 223,24 Da) e apesar da observação dos picos  $MNa^+$  e  $MK^+$  (permutas entre prótons ( $H^+$ ) e catiões metálicos ( $Na^+$ ,  $K^+$ ) que ocorrem no processo de preparação e armazenamento da amostra) ser corrente em ESI-MS, não se observaram conjuntos massa/carga ( $m/z$ ), e.g.  $MH^+$ ,  $MNa^+$ ,  $MK^+$ , que confirmassem a presença do péptido  $[Arg^6,Pro^{34}]pNPY$  na mistura peptídica resultante desta síntese. Assim sendo, não se prosseguiu com a purificação da mistura peptídica com a separação e identificação das diferentes espécies.

O insucesso ou obtenção de baixos rendimentos, na síntese de péptidos longos é relativamente frequente, devido sobretudo ao impedimento estérico e agregação intra- e intermolecular. Aminoácidos com maior tendência a formar  $\beta$ -sheets, originam frequentemente agregação durante a síntese do péptido (devido às suas ligações de hidrogénio e propriedades hidrofóbicas), e.g. Ala, Val, Ile, Asn e Gln (a maioria presente na sequência peptídica pretendida). Estes problemas conduzem geralmente à terminação prematura ou deleções na sequência peptídica. Vários métodos têm sido propostos para os minimizar (e.g. pseudoprolinas, sais caotrópicos), cuja utilidade é limitada e variável (31,51). A síntese do  $[Arg^6,Pro^{34}]pNPY$  envolveu a irradiação por microondas, cuja aplicação geralmente permite diminuir os níveis de agregação e leva à redução dos tempos de reacção e/ou aumento da pureza dos produtos obtidos (31,52). Contudo, a aplicação de microondas com temperaturas elevadas (ou acima da temperatura ambiente) aumenta o risco de reacções secundárias (e.g. epimerização e formação de aspartimida) (31).

Como alternativas à síntese efectuada, poderiam considerar-se as seguintes modificações: a utilização de outro tipo de resina com melhores resultados na síntese de péptidos longos (e.g. de poliestireno enxertado com PEG, como a resina NovaPEG Rink Amide); utilizar como solução de desprotecção 5% de piperazina ou 20% de piperidina com HOBt 0,5 M em DMF, para diminuir a possibilidade de epimerização ou formação de aspartimida; efectuar a síntese de dois fragmentos do péptido, que posteriormente seriam acoplados (31, 51-53). Se a síntese fosse realizada num sintetizador manual, poderia considerar-se um protocolo de arrefecimento intermediário (a -10°C) em solução de etanol gelado (31).

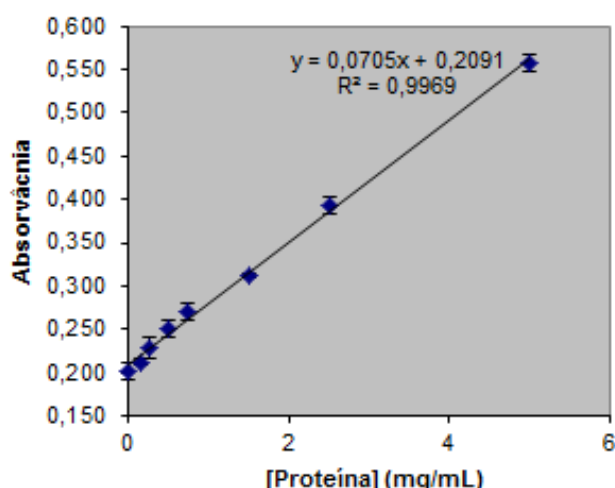
Se a síntese do péptido tivesse sido bem-sucedida, determinar-se-ia a concentração efectiva do mesmo por espectrofotometria, após purificação, com base na lei de Lambert-Beer ( $Abs = \epsilon lc$ ):

$$c = \frac{Abs \text{ (da amostra, lida a 280 nm)}}{n \text{ (n}^\circ \text{ de Tyr existentes no péptido)} \times \epsilon \text{ (coeficiente de absorção molar da Tyr)} \times l \text{ (percurso óptico)}}$$

Tendo em conta estudos realizados anteriormente, e de forma a manter a afinidade de ligação ao receptor, proceder-se-ia posteriormente à conjugação do péptido ao AQBF pz na cadeia lateral da Lys<sup>4</sup> (e não no grupo amina do N-terminal, importante para a ligação do péptido ao receptor Y1) (43,45). A conjugação seria feita em fase sólida, que requer menos passos de purificação. O grupo protector da cadeia lateral da Lys<sup>4</sup> MTT (diferente de todos os outros) seria selectivamente removido em solução ácida diluída (0,1% TFA em DCM), o grupo Fmoc em solução básica (20% de piperidina em DMF) e os restantes grupos protectores em 95% TFA. Seria depois sintetizado o complexo metálico de Re, necessário para a caracterização do complexo <sup>99m</sup>Tc-pz-[Arg<sup>6</sup>,Pro<sup>34</sup>]pNPY.

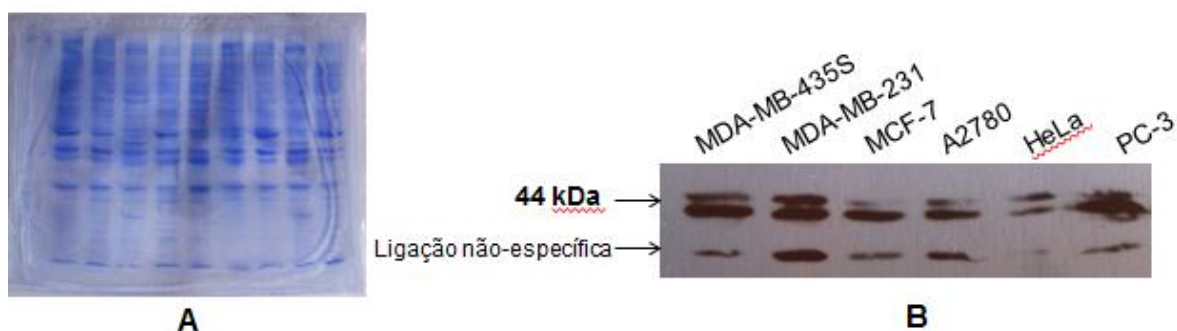
### 4.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO RECEPTOR Y1

Para a avaliação qualitativa, por western blot, da expressão do receptor Y1 em várias linhas celulares tumorais foi necessário determinar previamente a concentração proteica dos extractos celulares respectivos. Para tal, foi obtida uma recta padrão a partir de soluções de BSA com concentrações conhecidas e respectivos valores de absorvância (figura 4.3). O coeficiente de regressão linear ( $R^2$ ) obtido foi de 0,9969 ( $\approx 1$ ) logo, a recta obtida permitiu estimar correctamente a concentração total de proteína dos extractos celulares. Os resultados encontram-se de forma mais detalhada no apêndice 7.



**Figura 4.3** – Curva padrão, para determinação da quantificação proteica nos extractos celulares.

Quanto aos resultados do western blot, como se pode verificar pelo aspecto do gel de acrilamida após PAGE-SDS, as amostras proteicas são bem visualizadas e foram devidamente separadas (figura 4.4 A). A parte inferior do gel surge menos corada, resultado das proteínas (bandas) mais pequenas, que migram mais rapidamente, serem mais facilmente transferidas para a membrana de nitrocelulose.



**Figura 4.4** – (A) Gel de acrilamida (corado) com todas as amostras proteicas. (B) Análise western blot da expressão do receptor Y1, em várias linhas celulares tumorais.

Na análise western blot (figura 4.4 B), observa-se a expressão do receptor Y1 a 44 kDa, como esperado, tendo em conta resultados de estudos semelhantes, realizados também noutro tipo de células (e.g. 4T1 do carcinoma da mama murino e SK-N-MC de neuroblastoma humano) ou tecidos (e.g. lisados/ homogenatos de cérebro de rato) (54-57). Contudo, não se observa apenas uma banda mas sim duas (a segunda provavelmente de 42 kDa), o que constitui um resultado comum em análises western blot. Neste caso, a segunda banda observada poderá corresponder a

isoformas da proteína (receptor). No entanto, a ocorrência de mais de uma banda está frequentemente associada à presença de formas glicosiladas. Para testar essa hipótese, poder-se-ia proceder à eventual deglicosilação da proteína (e.g. com um tratamento enzimático com PNGase F), cujo resultado demonstraria apenas uma banda (58). Na figura 4.4 B verifica-se igualmente uma outra banda (comum a todas as linhas celulares), de menor peso molecular, que pode ser devida a uma ligação não-específica do Ac. Esta hipótese poderia ser confirmada, realizando-se um estudo de bloqueio do receptor com um péptido de elevada afinidade para o Y1R, no qual apenas as bandas específicas deveriam ser bloqueadas e desaparecer. Algumas soluções para evitar o aparecimento de múltiplas bandas em western blot incluem: efectuar lavagens mais rápidas e com maior agitação; aumentar a concentração de solução de bloqueio nos passos de incubação com o Ac primário e secundário; diminuir a concentração de Ac primário e secundário; efectuar a detecção das bandas por um método menos sensível. Quanto à expressão do receptor Y1 nas diferentes linhas celulares tumorais, confirmou-se a intensa expressão nas células de cancro da mama (superior nas células MDA-MB-435S e MDA-MB-231, relativamente às células MCF-7), tendo-se verificado igualmente bandas intensas (forte expressão) nas células de carcinoma da próstata. As células HeLa (de carcinoma cervical), utilizadas como controlo negativo, apresentaram a expressão do Y1R mais reduzida, seguidas das células A2780 (de carcinoma do ovário). Para corroborar a expressão relativa do receptor Y1 nas várias linhas celulares, seria importante avaliar simultaneamente a expressão da actina (controlo interno) nas mesmas. No entanto, uma vez que esta proteína apresenta um peso molecular muito semelhante ao receptor Y1, tal não foi possível.

A avaliação da expressão do receptor Y1 nas diferentes linhas celulares do carcinoma da mama teve como objectivo a escolha do modelo tumoral mais adequado, para realização de estudos *in vitro* e *in vivo* de fixação tumoral dos radiopéptidos.

#### **4.4 MARCAÇÃO RADIOACTIVA DO pz-Glu-NPY1**

Um dos grandes desafios actuais da radiofarmácia consiste na marcação de péptidos (e.g. análogos do NPY) com  $^{99m}\text{Tc}$ , o radionúclido mais usado em SPECT, devido às suas diversas vantagens (já enumeradas em 1.2.3.1). Recentemente, os complexos de Tc(I) do tipo tricarbonilo, com utilização de AQBFB tridentados derivados

do pirazolo, têm assumido uma importância crescente na investigação e desenvolvimento de novos radiofármacos de  $^{99m}\text{Tc}$ , pela sua flexibilidade e possibilidade de obtenção de complexos com elevada estabilidade cinética e termodinâmica (25-29).

Visto que a síntese do análogo longo não foi bem-sucedida, não foi possível realizar a sua conjugação ao AQBf pz, nem a marcação com  $^{99m}\text{Tc}$  e posterior avaliação biológica.

O análogo curto do NPY – [Pro<sup>30</sup>, Nle<sup>31</sup>, Bpa<sup>32</sup>, Leu<sup>34</sup>]NPY(28-36) (NPY1) encontrava-se previamente sintetizado e conjugado ao AQBf pz com espaçador Glu, que permite distanciar o péptido do AQBf (com o intuito de manter a afinidade para o receptor Y1) e modelar a farmacocinética, sobretudo devido à presença de um grupo COOH de carga negativa na sua cadeia lateral. No entanto, devido à integração do ITN (onde foi realizado o trabalho) no IST, surgiram várias limitações logísticas, que impediram a realização da marcação radioactiva deste péptido. Ainda assim, apresentam-se de seguida resultados de estudos anteriores (não publicados), da marcação do conjugado pz-Glu-NPY1 com  $^{99m}\text{Tc}$ , realizados pelo grupo de Ciências Radiofarmacêuticas do IST/ITN. O esquema da figura 4.5 descreve as condições de marcação, que envolveram a síntese do radiocomplexo  $^{99m}\text{Tc}$ -pz-Glu-NPY1.

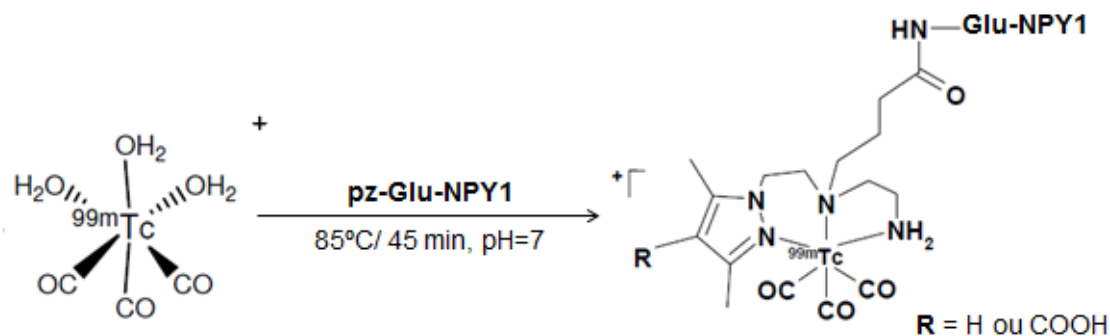
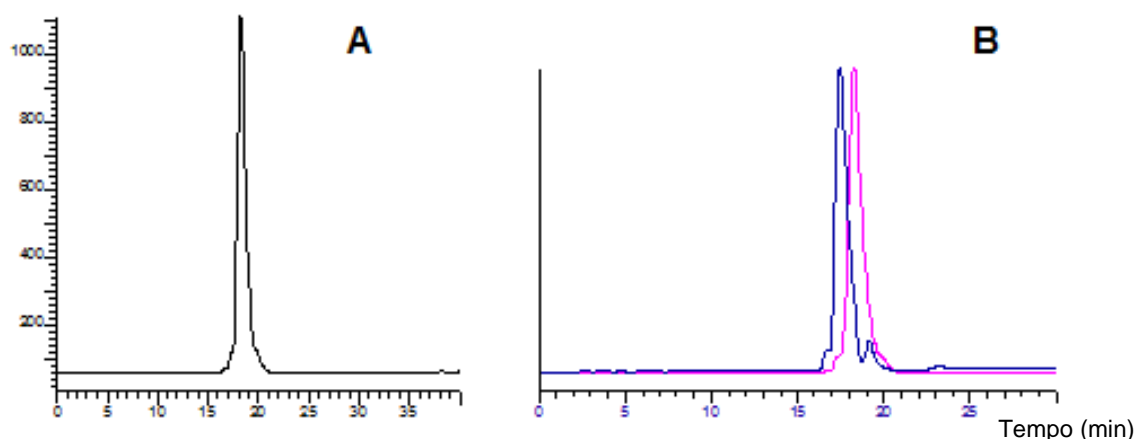


Figura 4.5 – Síntese do radiocomplexo  $^{99m}\text{Tc}$ -pz-Glu-NPY1.

Na figura 4.6 A, apresenta-se o cromatograma de HPLC do complexo  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{pz-Glu-NPY1})]$  (após purificação por HPLC), com um único pico ( $T_R = 19,3$  min), atribuído à espécie radioquímica pretendida. A caracterização/identificação do complexo de  $^{99m}\text{Tc}$  foi efectuada comparando o seu perfil cromatográfico (detecção  $\gamma$ ), com o do complexo análogo de Re (detecção UV a 254 nm), isolado e caracterizado macroscopicamente.

Na figura 4.6 B, verifica-se que nos cromatogramas os dois complexos têm  $T_R$  muito semelhantes, o que leva a supor estarmos na presença de compostos análogos. As ligeiras diferenças verificadas nos  $T_R$  relacionam-se com o facto de o detector de UV e o detector  $\gamma$  estarem montados em série, impossibilitando a detecção simultânea dos dois complexos.



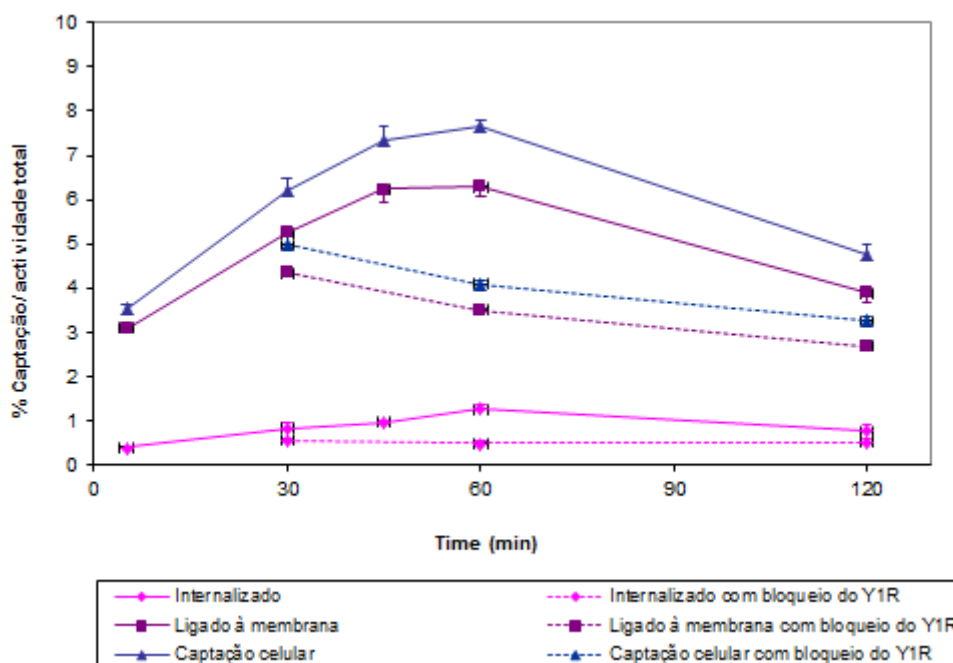
**Figura 4.6** – (A) HPLC do complexo  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-pz-Glu-NPY1}$  (detector  $\gamma$ ) após purificação ( $T_R=19,3$  min). (B) – Identificação química do complexo  $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-pz-Glu-NPY1}$  (cor-de-rosa) por comparação com o complexo  $\text{Re}(\text{CO})_3\text{-pz-Glu-NPY1}$  (azul) (detector UV a 254 nm).

#### 4.5 INTERNALIZAÇÃO CELULAR DO $^{99m}\text{Tc-pz-Glu-NPY1}$

Os estudos de internalização celular de um radioligando quantificam sobretudo a sua capacidade de captação celular, mediada por um determinado receptor. Quanto maior for a percentagem de internalização, maior será o potencial agonista do composto (capacidade de se ligar ao receptor, activando-o e desencadeando uma resposta intracelular), que frequentemente se relaciona com a sua capacidade de retenção celular e conseqüentemente com a eficiência de acumulação e alvejamento tumoral, reflectindo-se numa melhor qualidade de imagem e/ou eficácia terapêutica (59,60). No caso de uma estimulação do receptor Y1 com pNPY (agonista potente), observa-se uma rápida e completa internalização celular do receptor (61).

Pelos motivos enunciados em 4.4, não foi possível realizar ensaios *in vitro* de internalização celular dos análogos radiomarcados do NPY. Contudo, apresentam-se os resultados de estudos, anteriormente realizados no grupo de Ciências Químicas e Radiofarmacêuticas (não publicados), de captação e internalização celular do complexo  $^{99m}\text{Tc-pz-Glu-NPY1}$ , em células MCF-7 de cancro da mama (figura 4.7). O composto apresenta uma fraca capacidade de internalização celular, sendo o valor

máximo de  $1,26 \pm 0,12$  % da actividade total administrada às células aos 60 min de incubação. Contudo, o radiopéptido apresenta uma captação celular global razoável, influenciada pela percentagem que se liga à membrana ( $6,29 \pm 0,24$  % aos 60 min). Os resultados do estudo realizado em paralelo, com bloqueio do receptor Y1 com uma elevada concentração de pNPY (1 mM), demonstram que houve uma diminuição da percentagem de radiopéptido internalizado (cerca de 38%) e ligado à membrana (cerca de 55%), o que sugere que a captação na membrana e a internalização são parcialmente mediadas pelo receptor Y1, sugerindo que se trata assim de uma ligação específica.



**Figura 4.7** – Internalização do complexo  $^{99m}\text{Tc}$ -pz-GluNPY1 purificado em células MCF-7.

Apesar de os resultados não terem sido muito encorajadores, no sentido de aferir o potencial agonista de internalização celular do radiopéptido, considerando que existe efectivamente ligação específica do mesmo à membrana celular (apesar de reduzida internalização), coloca-se a questão se o péptido poderá ter adquirido propriedades antagonistas, devido às modificações estruturais efectuadas (e.g. introdução do AQBf e  $^{99m}\text{Tc}$ ). Para averiguar esta hipótese, em primeiro lugar deveriam ser efectuados estudos de afinidade para o Y1R, pois apesar do péptido NPY1 ter revelado boa afinidade ( $\text{IC}_{50} = 29,7 \pm 6,8$  nM) (46), nunca foi avaliada a sua afinidade após conjugação ao AQBf (neste caso ao derivado de pirazolo pz) e após complexação com o metal. Assim, deveria ser determinada a afinidade do análogo Glu-NPY1 para

determinar se a introdução do resíduo Glu não altera significativamente o valor de  $IC_{50}$  do conjugado (pz-Glu-NPY1) e do complexo inactivo de Re (Re-pz-Glu-NPY1). Os resultados de afinidade obtidos permitiriam verificar se a fraca internalização observada, não se deve a uma eventual perda na capacidade de ligação do composto ao Y1R. Posteriormente, caso se verificasse que a afinidade era mantida, poderiam efectuar-se vários tipos de estudos para testar as propriedades agonistas/antagonistas do péptido (e.g. estudos enzimáticos de acumulação intracelular de AMPc estimulada pela forskolina, para determinação da actividade ( $EC_{50}$ ); estudos de internalização celular por imunofluorescência, para se averiguar se o péptido inibe a internalização celular de um agonista potente como o pNPY; e ensaios de libertação intracelular de cálcio, para avaliar a influência da presença do péptido na actividade de um agonista). Caso se comprovasse que o complexo peptídico é de facto um antagonista, não seria necessariamente um aspecto negativo. Vários estudos realizados sobretudo com análogos da somatostatina e bombesina, demonstraram o elevado potencial de péptidos antagonistas como sondas de imagem molecular. Apesar de não internalizarem, estes péptidos demonstraram (comparativamente a agonistas): semelhante afinidade de ligação aos receptores, ligação a um maior número de receptores, captação e retenção tumoral *in vivo* significativamente superior, e razões tumor/ órgãos normais superiores (62-69). Tais resultados sugerem assim, que a internalização celular poderá não constituir um requisito fundamental para imagem tumoral *in vivo*. Wild D, et al realizou o primeiro estudo em humanos com aplicação de um antagonista da somatostatina ( $^{111}\text{In}$ -DOTA-BASS) para imagem tumoral, tendo-se verificado igualmente um perfil de biodistribuição mais favorável (menor captação dos rins, fígado e baço) e fixação tumoral superior (70).

Ainda em relação aos resultados da internalização do  $^{99m}\text{Tc}$ -pz-Glu-NPY1, é de notar que foram realizados numa única linha celular de cancro da mama, receptor do estradiol-positiva (MCF-7). No entanto, era objectivo deste trabalho avaliar-se a capacidade de internalização noutras linhas celulares de cancro da mama, particularmente em células MDA-MB-231 e MDA-MB-435S (bastante invasivas e receptor do estradiol-negativas), visto terem sido as que revelaram maior intensidade na expressão do Y1R no ensaio western blot.

De igual modo, era também objectivo deste trabalho avaliar-se a fixação tumoral específica e perfil farmacocinético, com estudo de biodistribuição *in vivo* em *xenografts* de cancro da mama (e.g. *nude mice* portadores de tumores induzidos). Os resultados

obtidos para a fixação tumoral ajudariam a tirar ilações sobre o eventual comportamento antagonístico e sobre a afinidade do radiopéptido ao receptor.

A escolha de um análogo curto do NPY neste trabalho, relacionou-se sobretudo com o facto de que geralmente a eficiência de marcação é maior para péptidos pequenos e a sua síntese é também menos dispendiosa e mais fácil. No entanto, a truncagem dos péptidos pode ter como consequência uma perda significativa de afinidade para o receptor e conseqüentemente a perda de propriedades fundamentais para imagem molecular tumoral. Por essa razão, foi também considerado o análogo longo [Arg<sup>6</sup>,Pro<sup>34</sup>]pNPY, apesar de não ter sido possível sintetizá-lo com sucesso, marcá-lo com <sup>99m</sup>Tc e efectuar estudos de biodistribuição comparativos com os do análogo curto. Na tabela 4.1 encontram-se valores de afinidade para o receptor Y1 de alguns análogos do NPY.

**Tabela 4.1** – Valores de afinidade para o receptor Y1 de vários análogos do NPY (curtos e longos).

	Péptido	Afinidade para o receptor Y1		Ref.
		K <sub>i</sub> (nM)	IC <sub>50</sub> (nM)	
	pNPY	0,012*	2,0 ± 0,4**	46, 49
<b>Análogos longos</b>	[Arg <sup>6</sup> ,Pro <sup>34</sup> ]pNPY*	0,006	-----	49
	[Phe <sup>7</sup> ,Pro <sup>34</sup> ]pNPY*	0,009	-----	49
	Lys <sup>4</sup> (Re(CO) <sub>3</sub> -(N <sup>α</sup> His-ac))-[Phe <sup>7</sup> , Pro <sup>34</sup> ]NPY**	-----	5,2 ± 1,0	45
<b>Análogos curtos</b>	[Pro <sup>30</sup> , Nle <sup>31</sup> , Bpa <sup>32</sup> , Leu <sup>34</sup> ]NPY(28-36) (NPY1)**	-----	29, 7 ± 6,8	46
	[Pro <sup>30</sup> , Tyr <sup>32</sup> , Leu <sup>34</sup> ]NPY(28-36) (BVD15)**	-----	39 ± 24	47
	[Lys(DOTA) <sup>4</sup> ]-BVD15**	-----	63 ± 25	47
	[Lys(Cu/DOTA) <sup>4</sup> ]-BVD15**	-----	29 ± 15	47

Estudos realizados em células: SK-N-MC (neuroblastoma) (\*); MCF-7 (cancro da mama) (\*\*)

Como se pode verificar, os análogos [Arg<sup>6</sup>,Pro<sup>34</sup>]pNPY e [Phe<sup>7</sup>,Pro<sup>34</sup>]pNPY apresentam uma afinidade superior para o Y1R, em relação ao pNPY, resultado das modificações estruturais efectuadas. Por outro lado, os análogos curtos demonstram invariavelmente uma afinidade mais reduzida (ainda que na ordem dos nanomolar), apesar de terem sido concebidos de forma a manter os aminoácidos mais importantes na ligação ao Y1R.

Actualmente, existe apenas um estudo onde foi avaliado o perfil de biodistribuição de um análogo curto do NPY (BVD15) com uma sequência peptídica semelhante ao

NPY1, marcado com  $^{18}\text{F}$ . Neste estudo, apesar de se ter verificado uma boa afinidade de ligação ao Y1R em células MCF-7 ( $K_i = 31 \pm 18 \text{ nM}$ ), a captação tumoral *in vivo* foi bastante reduzida (valor máximo de  $0,1 \pm 0,04\% \text{ID/g}$ ), bem como a intensidade de captação tumoral em estudos de imagem PET (48). Por outro lado os resultados do primeiro estudo em humanos, com o  $[\text{Phe}^7, \text{Pro}^{34}] \text{pNPY}$  marcado com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , foram bastante mais promissores, demonstrando uma boa fixação tumoral (43).

Caso neste trabalho se tivesse conseguido avançar com a avaliação biológica do análogo longo radiomarcado, faria sentido avaliar a sua aplicação em vários modelos tumorais de cancro da mama (tal como com o análogo curto), pois determinadas variações nas características celulares podem alterar os resultados obtidos. Apesar de na maioria dos estudos publicados, na área dos radiopéptidos análogos do NPY, serem utilizadas as células MCF-7, os resultados da avaliação da expressão do receptor Y1 em várias linhas celulares obtidos neste trabalho, demonstram que as células MDA-MB-231 e MDA-MB-435S poderão constituir ou induzir modelos tumorais mais adequados.

Por vezes, a obtenção de maus resultados na farmacocinética (e.g. elevadas fixações renais) e baixa captação tumoral dos radiopéptidos é atribuída à utilização do DOTA como AQBf (43). Neste caso, como já referido, seria utilizado um derivado tridentado do pirazolo (figura 1.13) que se revela bastante flexível permitindo a exploração de inúmeras variações na sua estrutura original. Assim, tanto no análogo curto como no longo, poderia por exemplo colocar-se um grupo COOH adicional (de carga negativa) na estrutura do pz, o que faria diminuir a carga do péptido, aumentando a sua hidrofília e melhorando consequentemente a farmacocinética (com a diminuição da excreção hepatobiliar e eventualmente da captação renal).

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste trabalho possibilitou a aquisição de novos conhecimentos e competências, ao nível da investigação em Radiofarmácia, nomeadamente a manipulação de técnicas como a síntese de péptidos, HPLC e western blot.

O cancro da mama consiste, hoje em dia, numa das neoplasias mais frequentes entre as mulheres. Apesar da existência de várias modalidades terapêuticas, a sua eficácia permanece limitada e os efeitos secundários podem ser bastante severos. Tendo em conta o forte impacto do cancro da mama na actualidade, torna-se necessário melhorar as técnicas de imagem, de modo a contribuir para uma maior eficácia na detecção desta doença, numa fase cada vez mais precoce da mesma. Particularmente no âmbito da medicina nuclear, os radiofármacos em actual utilização clínica não são considerados radiotraçadores ideais, na medida em que apresentam algumas limitações, designadamente a falta de especificidade. Neste sentido, a investigação em radiofarmácia desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de novas sondas de imagem molecular, de elevada sensibilidade e especificidade na visualização de lesões de cancro da mama, potencialmente úteis no diagnóstico inicial, estadiamento e também no planeamento/ monitorização da terapia.

Infelizmente, não foi possível atingir parte dos objectivos propostos para este trabalho (como a marcação dos dois análogos do NPY e a respectiva avaliação biológica), devido a problemas logísticos imprevistos. Contudo, foi comprovada através de uma análise western blot, a expressão do receptor Y1 em várias linhas celulares tumorais, de onde se destacam as células MDA-MB-231 e MDA-MB-435S de carcinoma da mama. Deste modo, pensa-se que estas células poderão constituir um modelo tumoral *in vitro* e induzir um modelo tumoral *in vivo*, mais apropriado para avaliação da aplicação de radiopéptidos análogos do NPY, para imagem tumoral de cancro da mama, relativamente às células MCF-7 (usualmente mais utilizadas).

Como perspectivas futuras, propõe-se a repetição da síntese do análogo longo do NPY, aproveitando a experiência deste trabalho (bem como a sua conjugação ao AQBFPz e marcação com  $^{99m}\text{Tc}$ , e síntese do complexo análogo de Re), a realização de estudos para investigação sobre as eventuais propriedades antagonistas do radiopéptido curto e a comparação dos dois radiopéptidos (curto e longo), quanto ao perfil de biodistribuição e capacidade de captação tumoral *in vivo*. Tendo em conta os resultados de estudos anteriores, considera-se que os análogos do NPY são bastante promissores para imagem molecular de cancro da mama, e como tal, a sua aplicação deve ser mais explorada.



---

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GLOBOCAN 2008: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2008 [Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2010 June [updated 2012 July; cited 2012 Aug 1]. Available from: <http://globocan.iarc.fr/>.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011 Mar-Apr;61(2):69-90.
3. Bastos J, Barros H, Lunet N. Evolução da mortalidade por Cancro da Mama em Portugal. *Acta Med Port*. 2007; 20: 139-144.
4. Fabbri A, Carcangiu ML, Carbone A. Histological Classification of Breast Cancer. In: Bombardieri E, Bonadonna G, Gianni L, editors. *Breast Cancer Nuclear Medicine in Diagnosis and Therapeutic Options*. Heidelberg: Springer; 2008. p. 3-14.
5. Berg WA, Gutierrez L, NessAiver MS, Carter WB, Bhargavan M, Lewis RS, Ioffe OB. Diagnostic accuracy of mammography, clinical examination, US, and MR imaging in preoperative assessment of breast cancer. *Radiology*. 2004 Dec;233(3):830-49.
6. Oude Munnink TH, Nagengast WB, Brouwers AH, Schröder CP, Hospers GA, Lub-de Hooge MN, et al. Molecular imaging of breast cancer. *Breast*. 2009 Oct;18 Suppl 3:S66-73.
7. Buscombe JR, Holloway B, Roche N, Bombardieri E. Position of nuclear medicine modalities in the diagnostic work-up of breast cancer. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2004 Jun;48(2):109-18.
8. Eckelman WC, Reba RC, Kelloff GJ. Targeted imaging: an important biomarker for understanding disease progression in the era of personalized medicine. *Drug Discov Today*. 2008 Sep;13(17-18):748-59.
9. Lee JH, Rosen EL, Mankoff DA. The role of radiotracer imaging in the diagnosis and management of patients with breast cancer: part 1--overview, detection, and staging. *J Nucl Med*. 2009 Apr;50(4):569-81.
10. Nguyen BD, Roarke MC, Karstaedt PJ, Ingui CJ, Ram PC. Practical applications of nuclear medicine in imaging breast cancer. *Curr Probl Diagn Radiol*. 2009 Mar-Apr;38(2):68-83.
11. Koolen BB, Vogel WV, Vrancken Peeters MJ, Loo CE, Rutgers EJ, Valdés Olmos RA. Molecular Imaging in Breast Cancer: From Whole-Body PET/CT to Dedicated Breast PET. *J Oncol*. 2012;2012:438647.
12. Hodgson NC, Gulenchyn KY. Is there a role for positron emission tomography in breast cancer staging? *J Clin Oncol*. 2008 Feb 10;26(5):712-20.
13. Berg WA, Weinberg IN, Narayanan D, et al. High-resolution fluorodeoxyglucose positron emission tomography with compression ("positron emission mammography") is highly accurate in depicting primary breast cancer. *Breast J*. 2006;12(4):309-323.
14. Schillaci O, Buscombe Jr. Breast Imaging with Scintimammography. In: Bombardieri E, Bonadonna G, Gianni L, editors. *Breast Cancer Nuclear Medicine in Diagnosis and Therapeutic Options*. Heidelberg: Springer; 2008. p. 57-70.

15. Ben-Haim S, Israel O. Breast cancer: role of SPECT and PET in imaging bone metastases. *Semin Nucl Med.* 2009 Nov;39(6):408-15.
16. Peterson LM, Mankoff DA, Lawton T, Yagle K, Schubert EK, Stekhova S, et al. Quantitative imaging of estrogen receptor expression in breast cancer with PET and 18F-fluoroestradiol. *J Nucl Med.* 2008 Mar;49(3):367-74.
17. Perik PJ, Lub-De Hooge MN, Gietema JA, van der Graaf WT, de Korte MA, Jonkman S, Kosterink JG, et al. Indium-111- labeled trastuzumab scintigraphy in patients with epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006 May 20;24(15):2276-82.
18. Dijkers EC, Kosterink JG, Rademaker AP, Perk LR, van Dongen GA, Bart J, de Jong JR, de Vries EG, Lub-de Hooge MN. Development and characterization of clinical-grade <sup>89</sup>Zr-trastuzumab for HER2/neu immunoPET imaging. *J Nucl Med.* 2009 Jun;50(6):974-81.
19. Lee S, Xie J, Chen X. Peptides and peptide hormones for molecular imaging and disease diagnosis. *Chem Rev.* 2010 May 12;110(5):3087-111.
20. Zwanziger D, Beck-Sickinger AG. Radiometal targeted tumor diagnosis and therapy with peptide hormones. *Curr Pharm Des.* 2008;14(24):2385-400.
21. Dijkgraaf I, Boerman OC, Oyen WJ, Corstens FH, Gotthardt M. Development and application of peptide-based radiopharmaceuticals. *Anticancer Agents Med Chem.* 2007 Sep;7(5):543-51.
22. Correia JD, Paulo A, Raposinho PD, Santos I. Radiometallated peptides for molecular imaging and targeted therapy. *Dalton Trans.* 2011 Jun 21;40(23):6144-67.
23. Ambrosini V, Fani M, Fanti S, Forrer F, Maecke HR. Radiopeptide imaging and therapy in Europe. *J Nucl Med.* 2011 Dec;52 Suppl 2:42S-55S.
24. Powsner RA, Powsner ER. *Nuclear Medicine Physics.* 2nd edition. Blackwell Publishing; 2006.
25. Alves S, Paulo A, Correia JD, Gano L, Smith CJ, Hoffman TJ, Santos I. Pyrazolyl derivatives as bifunctional chelators for labeling tumor-seeking peptides with the *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> moiety (M = <sup>99m</sup>Tc, Re): synthesis, characterization, and biological behavior. *Bioconjug Chem.* 2005 Mar-Apr;16(2):438-49.
26. Alves S, Correia JD, Santos I, Veerendra B, Sieckman GL, Hoffman TJ, Rold TL, Figueroa SD, Retzlaff L, McCrate J, Prasanphanich A, Smith CJ. Pyrazolyl conjugates of bombesin: a new tridentate ligand framework for the stabilization of *fac*-[M(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> moiety. *Nucl Med Biol.* 2006 Jul;33(5):625-34.
27. Alves S, Correia JD, Gano L, Rold TL, Prasanphanich A, Haubner R, Rupprich M, Alberto R, Decristoforo C, Santos I, Smith CJ. In vitro and in vivo evaluation of a novel <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>-pyrazolyl conjugate of cyclo-(Arg-Gly-Asp-d-Tyr-Lys). *Bioconjug Chem.* 2007 Mar-Apr;18(2):530-7.
28. Raposinho PD, Xavier C, Correia JD, Falcão S, Gomes P, Santos I. Melanoma targeting with alpha-melanocyte stimulating hormone analogs labeled with *fac*-[<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup>: effect of cyclization on tumor-seeking properties. *J Biol Inorg Chem.* 2008 Mar;13(3):449-59.

29. Raposinho PD, Correia JD, Oliveira MC, Santos I. Melanocortin-1 receptor-targeting with radiolabeled cyclic  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone analogs for melanoma imaging. *Biopolymers*. 2010;94(6):820-9.
30. Merrifield RB. Solid-phase peptide synthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1969;32:221-96.
31. Pedersen SL, Tofteng AP, Malik L, Jensen KJ. Microwave heating in solid-phase peptide synthesis. *Chem Soc Rev*. 2012 Mar 7;41(5):1826-44.
32. Mitchell AR. Studies in solid-phase peptide synthesis: a personal perspective. *Biopolymers*. 2008;90(3):215-33
33. Murray JK, Aral J, Miranda LP. Solid-phase peptide synthesis using microwave irradiation. *Methods Mol Biol*. 2011;716:73-88.
34. Lindner D, Stichel J, Beck-Sickinger AG. Molecular recognition of the NPY hormone family by their receptors. *Nutrition*. 2008 Sep;24(9):907-17.
35. Körner M, Reubi JC. NPY receptors in human cancer: a review of current knowledge. *Peptides*. 2007 Feb;28(2):419-25.
36. Körner M, Waser B, Reubi JC. High expression of neuropeptide Y1 receptors in ewing sarcoma tumors. *Clin Cancer Res*. 2008 Aug 15;14(16):5043-9.
37. Körner M, Reubi JC. Neuropeptide Y receptors in primary human brain tumors: overexpression in high-grade tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008 Aug;67(8):741-9.
38. Körner M, Waser B, Reubi JC. Neuropeptide Y receptor expression in human primary ovarian neoplasms. *Lab Invest*. 2004 Jan;84(1):71-80.
39. Körner M, Waser B, Reubi JC. High expression of neuropeptide Y receptors in tumors of the human adrenal gland and extra-adrenal paraganglia. *Clin Cancer Res*. 2004 Dec 15;10(24):8426-33.
40. Körner M, Waser B, Reubi JC. Neuropeptide Y receptors in renal cell carcinomas and nephroblastomas. *Int J Cancer*. 2005 Jul 10;115(5):734-41.
41. Reubi JC, Gugger M, Waser B, Schaer JC. Y(1)-mediated effect of neuropeptide Y in cancer: breast carcinomas as targets. *Cancer Res*. 2001 Jun 1;61(11):4636-41.
42. Reubi C, Gugger M, Waser B. Co-expressed peptide receptors in breast cancer as a molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2002 Jul;29(7):855-62.
43. Zwanziger D, Khan IU, Neundorf I, Sieger S, Lehmann L, Friebe M, et al. Bioconjug Chem. Novel chemically modified analogues of neuropeptide Y for tumor targeting. 2008 Jul;19(7):1430-8.
44. Gandomkar M, Najafi R, Mazidi M, Goudarzi M, Ebrahimi SES. Synthesis, Labeling and Quality Control of a New Neuropeptide Y Analogue for Diagnosis of Breast Tumors. *Iran J Nucl Med*. 2008 Jul; 16(1): 20-24.

45. Khan IU, Zwanziger D, Böhme I, Javed M, Naseer H, Hyder SW, Beck-Sickinger AG. Breast-cancer diagnosis by neuropeptide Y analogues: from synthesis to clinical application. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2010 Feb 1;49(6):1155-8.
46. Zwanziger D, Böhme I, Lindner D, Beck-Sickinger AG. First selective agonist of the neuropeptide Y1-receptor with reduced size. *J Pept Sci.* 2009 Dec;15(12):856-66.
47. Guérin B, Dumulon-Perreault V, Tremblay MC, Ait-Mohand S, Fournier P, Dubuc C, Authier S, Bénard F. [Lys(DOTA)<sup>4</sup>]BVD15, a novel and potent neuropeptide Y analog designed for Y1 receptor-targeted breast tumor imaging. *Bioorg Med Chem Lett.* 2010 Feb 1;20(3):950-3.
48. Pourghiasian M, Inkster J, Hundal N, Mesak F, Guerin B, Ait-Mohand S, et al. <sup>18</sup>F-BVD-15 for NPY Y1 receptor imaging in breast cancer and neuroblastoma models by PET. *J Nucl Med.* 2011; 52 (Supplement 1):1682
49. Söll RM, Dinger MC, Lundell I, Larhammer D, Beck-Sickinger Ag. Novel analogues of neuropeptide Y with a preference for the Y1-receptor. *Eur J Biochem.* 2001 May;268(10):2828-37.
50. Hoffmann S, Rist B, Videnov G, Jung G, Beck-Sickinger AG. Structure-affinity studies of c-terminally modified analogs of neuropeptide Y led to a novel class of peptidic Y1 receptor antagonist. *Regul Pept.* 1996 Aug 27;65(1):61-70.
51. Pedersen SL, Sørensen KK, Jensen KJ. Semi-automated microwave-assisted SPPS: Optimization of protocols and synthesis of difficult sequences. *Biopolymers.* 2010;94(2):206-12.
52. Bacsá B, Desai B, Dibó G, Kappe CO. Rapid solid-phase peptide synthesis using thermal and controlled microwave irradiation. *J Pept Sci.* 2006 Oct;12(10):633-8.
53. Coin I, Beyermann M, Bienert M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nat Protoc.* 2007;2(12):3247-56
54. Medeiros PJ, Al-Khazraji BK, Novielli NM, Postovit LM, Chambers AF, Jackson DN. Neuropeptide Y stimulates proliferation and migration in the 4T1 breast cancer cell line. *Int J Cancer.* 2012 Jul 15;131(2):276-86.
55. Yang K, Guan H, Arany E, Hill DJ, Cao X. Neuropeptide Y is produced in visceral adipose tissue and promotes proliferation of adipocyte precursor cells via Y1 receptor. *FASEB J.* 2008 Jul;22(7):2452-64.
56. Li AJ, Ritter S. Functional expression of neuropeptide Y receptors in human neuroblastoma cells. *Regul Pept.* 2005 Jul 15;129(1-3):119-24.
57. Ruscica M, Dozio E, Boghossian S, Bovo G, Martos Riaño V, Motta M, Magni P. Activation of the Y1 receptor by neuropeptide Y regulates the growth of prostate cancer cells. *Endocrinology.* 2006 Mar;147(3):1466-73.
58. Gericke MT, Kosacka J, Koch D, Nowicki M, Schröder T, Ricken AM, et al. Receptors for NPY and PACAP differ in expression and activity during adipogenesis in the murine 3T3-L1 fibroblast cell line. *Br J Pharmacol.* 2009 Jun;157(4):620-32.

59. Bigott-Hennkens HM, Dannoos S, Lewis MR, Jurisson SS. In vitro receptor binding assays: general methods and considerations. *Q J Nucl Med Mol Imaging*. 2008 Sep;52(3):245-53. Epub 2008 May 13.
60. Mankoff DA, Link JM, Linden HM, Sundararajan L, Krohn KA. Tumor receptor imaging. *J Nucl Med*. 2008 Jun;49 Suppl 2:149S-63S.
61. Böhme I, Stichel J, Walther C, Mörl K, Beck-Sickinger AG. Agonist induced receptor internalization of neuropeptide Y receptor subtypes depends on third intercellular loop and C-terminus. *Cell Signal*. 2008 Oct;20(10):1740-9.
62. Gjinj M, Zhang H, Waser B, Cescato R, Wild D, Wang X, et al. Radiolabeled somatostatin receptor antagonists are preferable to agonists for in vivo peptide receptor targeting of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Oct 31;103(44):16436-41.
63. Cescato R, Erchevgyi J, Waser B, Piccand V, Maecke HR, Rivier JE, et al. Design and in vitro characterization of highly sst2-selective somatostatin antagonists suitable for radiotargeting. *J Med Chem*. 2008 Jul 10;51(13):4030-7.
64. Wadas TJ, Eiblmaier M, Zheleznyak A, Sherman CD, Ferdani R, Liang K, Achilefu S, Anderson CJ. Preparation and biological evaluation of <sup>64</sup>Cu-CB-TE2A-sst2-ANT, a somatostatin antagonist for PET imaging of somatostatin receptor-positive tumors. *J Nucl Med*. 2008 Nov;49(11):1819-27.
65. Fani M, Del Pozzo L, Abiraj K, Mansi R, Tamma ML, Cescato R, et al. PET of somatostatin receptor-positive tumors using <sup>64</sup>Cu- and <sup>68</sup>Ga-somatostatin antagonists: the chelate makes the difference. *J Nucl Med*. 2011 Jul;52(7):1110-8.
66. Cescato R, Maina T, Nock B, Nikolopoulou A, Charalambidis D, Piccand V, Reubi JC. Bombesin receptor antagonists may be preferable to agonists for tumor targeting. *J Nucl Med*. 2008 Feb;49(2):318-26.
67. Schroeder RP, Müller C, Reneman S, Melis ML, Breeman WA, de Blois E, et al. A standardised study to compare prostate cancer targeting efficacy of five radiolabelled bombesin analogues. *Eur J Nucl Med Mol Imagi*. 2010 Jul;37(7):1386-96.
68. Mansi R, Wang X, Forrer F, Kneifel S, Tamma ML, Waser B, et al. 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. *Clin Cancer Res*. 2009 Aug 15;15(16):5240-9.
69. Mansi R, Wang X, Forrer F, Waser B, Cescato R, Graham K, et al. Development of a potent DOTA-conjugated bombesin antagonist for targeting GRPr-positive tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2011 Jan;38(1):97-107.
70. Wild D, Fani M, Behe M, Brink I, Rivier JE, Reubi JC, et al. First clinical evidence that imaging with somatostatin receptor antagonists is feasible. *J Nucl Med*. 2011 Sep;52(9):1412-7.

## APÊNDICE 1

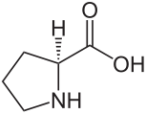
Sistema de estadiamento TNM para o cancro da mama. Adaptado de (4).

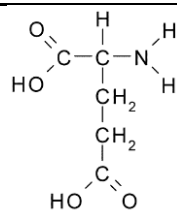
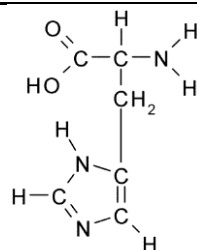
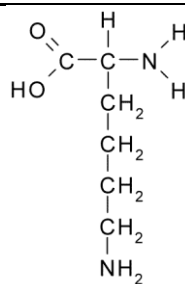
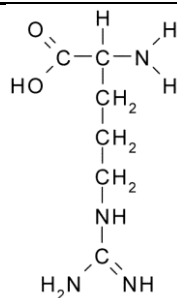
<b>Categoria</b>	<b>Definição</b>
<b>Tumor (T)</b>	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Ausência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
Tis (CDIS)	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
Tis (CLIS)	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Doença de Paget do mamilo sem tumor (Nota: a doença de Paget do mamilo, associada a um tumor, é classificada conforme o tamanho do mesmo)
T1	Carcinoma invasivo ≤ 2 cm, na sua maior dimensão
T1mic	Microinvasão ≤ 0,1 cm, na sua maior dimensão
T1a	Tumor > 0,1 cm mas ≤ 0,5 cm, na sua maior dimensão
T1b	Tumor > 0,5 cm mas ≤ 1 cm, na sua maior dimensão
T1c	Tumor > 1 cm mas ≤ 2 cm, na sua maior dimensão
T2	Tumor > 2 cm mas ≤ 5 cm, na sua maior dimensão
T3	Tumor > 5 cm, na sua maior dimensão
T4	Tumor de qualquer dimensão, com extensão directa à parede torácica ou à pele
<b>Gânglios regionais linfáticos (N)</b>	
NX	Os gânglios linfáticos não podem ser avaliados (e.g. anteriormente removidos)
N0	Ausência de metástases ganglionares linfáticas regionais
N1	Metástase em gânglio (s) axilar ipsilateral móvel
N2	Metástase em gânglio (s) axilar ipsilateral fixo ou aderente (N2a), ou gânglio (s) da mama interna ipsilateral clinicamente evidenciado, na ausência de evidência clínica de metástases ganglionares (N2b)
N3	Metástase em gânglios (s) infraclavicular ipsilateral, com ou sem envolvimento ganglionar axilar (N3a); ou evidência clínica de gânglio (s) da mama interna ipsilateral, na presença de metástases ganglionares axilares ipsilaterais (N3b); ou Metástase em gânglios (s) supraclavicular ipsilateral, com ou sem envolvimento metastático de gânglio axilar ou da mama interna ipsilateral (N3c)
<b>Metástases à distância (M)</b>	
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Existência de metástases à distância

## APÊNDICE 2

Estrutura química dos aminoácidos proteínogénicos.

Aminoácido	Estrutura
Glicina	
Alanina	
Valina	
Leucina	
Isoleucina	
Fenilalanina	
Triptofano	

<b>Metionina</b>	$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{H} \\    \quad   \quad   \\  \text{HO} \quad \text{H} \quad \text{H} \\  \quad \quad   \quad \quad   \\  \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \text{H} \\  \quad \quad   \\  \quad \quad \text{CH}_2 \\  \quad \quad   \\  \quad \quad \text{S} \\  \quad \quad   \\  \quad \quad \text{CH}_3  \end{array}  $
<b>Prolina</b>	
<b>Serina</b>	$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{H} \\    \quad   \quad   \\  \text{HO} \quad \text{H} \quad \text{H} \\  \quad \quad   \quad \quad   \\  \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \text{H} \\  \quad \quad   \\  \quad \quad \text{OH}  \end{array}  $
<b>Treonina</b>	$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{H} \\    \quad   \quad   \\  \text{HO} \quad \text{H} \quad \text{H} \\  \quad \quad   \quad \quad   \\  \quad \quad \text{CH} \quad \quad \text{H} \\  \quad \quad   \quad \quad   \\  \quad \quad \text{HO} \quad \text{CH}_3  \end{array}  $
<b>Tirosina</b>	$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{H} \\    \quad   \quad   \\  \text{HO} \quad \text{H} \quad \text{H} \\  \quad \quad   \quad \quad   \\  \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \text{H} \\  \quad \quad   \\  \quad \quad \text{C}_6\text{H}_4 \\  \quad \quad   \\  \quad \quad \text{OH}  \end{array}  $
<b>Asparagina</b>	$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{H} \\    \quad   \quad   \\  \text{HO} \quad \text{H} \quad \text{H} \\  \quad \quad   \quad \quad   \\  \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \text{H} \\  \quad \quad   \\  \quad \quad \text{C} \\  \quad \quad / \quad \backslash \\  \quad \quad \text{H}_2\text{N} \quad \text{O}  \end{array}  $
<b>Glutamina</b>	$  \begin{array}{c}  \text{O} \quad \quad \text{O} \\     \quad \quad    \\  \text{H}_2\text{N}-\text{C} \quad \text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{C}-\text{OH} \\    \quad \quad   \\  \quad \quad \text{NH}_2  \end{array}  $
<b>Cisteína</b>	$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{H} \\    \quad   \quad   \\  \text{HO} \quad \text{H} \quad \text{H} \\  \quad \quad   \quad \quad   \\  \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \text{H} \\  \quad \quad   \\  \quad \quad \text{SH}  \end{array}  $
<b>Ácido Aspártico</b>	$  \begin{array}{c}  \text{H} \\    \\  \text{O}=\text{C}-\text{C}-\text{N}-\text{H} \\    \quad   \quad   \\  \text{HO} \quad \text{H} \quad \text{H} \\  \quad \quad   \quad \quad   \\  \quad \quad \text{CH}_2 \quad \quad \text{H} \\  \quad \quad   \\  \quad \quad \text{C} \\  \quad \quad / \quad \backslash \\  \quad \quad \text{HO} \quad \text{O}  \end{array}  $

**Glutamato****Histidina****Lisina****Arginina**

## APÊNDICE 3

Péptidos com potencial interesse como sondas de imagem molecular. Adaptado de (20).

<b>Péptido</b>	<b>Aminoácidos</b>	<b>Tumores</b>
<b>Somatostatina</b>	14	Tumores neuroendócrinos, neuroblastoma, carcinoma renal, cancro do pulmão de pequenas células (CPPC), cancro da mama, cancro da próstata, linfoma maligno, tumor cerebral
<b>Bombesina</b>	14	Cancro de próstata, cancro de mama, CPPC, cancro do cólon, glioblastoma, carcinoma gástrico
<b>Péptido libertador de gastrina (GRP)</b>	27	Cancro de próstata, cancro de mama, CPP, melanoma
<b>Péptido intestinal vasoactivo (VIP)</b>	28	Cancro do pulmão, estômago, cólon, recto, mama, próstata, ductos pancreáticos, fígado e bexiga
<b>Neuropéptido Y</b>	36	Neuroblastoma, glioblastoma, cancro da mama, adenocarcinoma do ovário, tumor do estroma gastrointestinal, carcinoma renal, feocromocitoma, paraganglioma,
<b>Neurotensina</b>	13	CPPC, do cólon, da tiróide, da mama, meningiomas, sarcoma de Ewing, astrocitoma, meduloblastoma
<b>α-MSH</b>	13	Melanoma
<b>Substância P</b>	11	Tumores carcinóides, CPPC, tumor cerebral
<b>Colecistoquinina (CCK)</b>	33	Carcinoma colo-rectal, carcinoma pancreático, CPPC, carcinoma medular da tiróide, cancro do ovário, astrocitomas

## APÊNDICE 4

Quantidade de aminoácidos, solventes, resina e reagentes utilizados na síntese do [Arg<sup>6</sup>,Pro<sup>34</sup>]NPY.

	Volume (mL)	Massa (g)
<b>Aminoácidos</b>		
Ala (A)	21	1,31
Arg (R)	27	3,50
Asn (N)	11	1,31
Asp	11	0,91
Glu	11	0,94
Gly	6	0,36
His	6	0,74
Ile	11	0,78
Leu	16	1,13
Lys	6	0,56
Pro	27	1,82
Ser	11	0,84
Thr	6	0,48
Tyr	27	2,48
<b>Solventes</b>		
DCM	83	-----
DMF	8506	-----
<b>Resina</b>		
Rink Amide MBHA	-----	0,30
<b>Reagentes</b>		
	V (mL)	V <sub>total solução</sub> (mL)
Anidrido acético	25	125
DIPEA	17,4	50
HBTU	-----	100
Piperidina	120	600
		18,97
		-----

## APÊNDICE 5

Meio de cultura utilizado em cada linha celular em estudo.

Linha celular	Tipo de cancro (humano)	Meio de cultura
<b>MCF-7</b>	Carcinoma da mama	DMEM
<b>MDA-MB-231</b>	Carcinoma da mama	DMEM
<b>MDA-MB-435S</b>	Carcinoma da mama	RPMI
<b>A2780</b>	Carcinoma do ovário	RPMI
<b>PC-3</b>	Carcinoma da próstata	RPMI
<b>HeLa</b>	Carcinoma cervical	DMEM

## APÊNDICE 6

Condições cromatográficas das análises HPLC efectuadas ao complexo  $^{99m}\text{Tc-pz-Glu-NPY1}$  – controlo analítico e após purificação.

Eluente A – solução aquosa com 0,1% de TFA

Eluente B – acetonitrilo com 0,1% de TFA

Passo	Tempo	Fluxo (mL/min)	A (%)	B (%)
<b>0</b>	5	1	70	30
<b>1</b>	2	1	70	30
<b>2</b>	30	1	50	50
<b>3</b>	0,1	1	0	100
<b>4</b>	10	1	0	100
<b>5</b>	0,1	1	70	30
<b>6</b>	5	1	70	30

**APÊNDICE 7**

Resultados obtidos no estudo de quantificação proteica dos extractos celulares realizados:

Valores de absorvância média (de três replicados) das soluções padrão de BSA com concentrações conhecidas.

[BSA] (mg/mL)	Abs média	DP*
0	0,201	0,010
0,15	0,212	0,004
0,25	0,229	0,013
0,5	0,251	0,009
0,75	0,270	0,009
1,5	0,312	0,003
2,5	0,392	0,010
5	0,558	0,011

\*DP = Desvio padrão

Valores de absorvância dos dois replicados de cada extracto; respectiva concentração total de proteína (dos dois replicados, média e desvio padrão); e volume a retirar de cada extracto de forma a obter 50 µg de proteína (para utilizar no western blot). A concentração de proteína (c) foi calculada pela equação ( $Abs = 0,0705 \times c + 0,2091$ ) da recta de calibração obtida a partir de soluções padrão de BSA com concentrações conhecidas.

Extracto celular	Abs1	Abs2	[proteína]1 (mg/mL)	[proteína]2 (mg/mL)	[proteína] média (mg/mL)	DP*	Volume (µL) (50 µg)
<b>MDA-435S (DMEM)</b>	0,349	0,351	1,98	2,01	2,00	0,02	25,0
<b>MDA-435S (RPMI)</b>	0,344	0,346	1,91	1,94	1,93	0,02	25,9
<b>A2780</b>	0,485	0,59	3,91	5,40	4,66	1,05	10,7
<b>MCF-7</b>	0,486	0,533	3,93	4,59	4,26	0,47	11,7
<b>MCF-7</b>	0,484	0,501	3,90	4,14	4,02	0,17	12,4
<b>MDA-231</b>	0,432	0,497	3,16	4,08	3,62	0,65	13,8
<b>PC3</b>	0,278	0,312	0,98	1,46	1,22	0,34	41,0
<b>A2780</b>	0,602	0,587	5,57	5,36	5,47	0,15	9,1
<b>HeLA</b>	0,542	0,527	4,72	4,51	4,62	0,15	10,8

\*DP = Desvio padrão