

Avaliação pré-clínica do potencial de inibidor do antígeno de membrana prostático específico (PSMA) radiomarcado com lutécio-177 no tratamento do câncer de próstata

Jefferson de Jesus Silva*, Adriana Vidal Fernandes Massicano, Laís Fernanda Alcarde, Raquel Benedetto, Cristian Antonio Wieczorek Villas Boas, Luís Alberto Pereira Dias, Jair Mengatti & Elaine Bortoleti de Araújo

Centro de Radiofarmácia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, Brasil

*Correspondência:

Jefferson de Jesus Silva

Centro de Radiofarmácia, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, SP, Brasil

Av. Lineu Prestes Avenue, 2242, Cidade Universitária / São Paulo – SP – CEP: 05508-000

Telefone: (11) 98146-4989

E-mail: Jefferson.pharmacist@gmail.com

RESUMO

Diversos radiofármacos PSMA-específicos têm sido apresentados como proposta para o diagnóstico do câncer de próstata, bem como para o tratamento de pacientes com câncer metastático resistente à castração e às terapias convencionais. Este trabalho estudou a marcação e estabilidade radioquímica do inibidor do receptor PSMA, Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-DOTA com ^{177}Lu (PSMA-DOTA- ^{177}Lu), e realizou estudos pré-clínicos para avaliar seu potencial para a terapia do câncer de próstata. O radiofármaco foi obtido com pureza radioquímica elevada (PR > 95%) em todas as condições de marcações estudadas e permaneceu estável quando armazenado sob congelamento por até 48 horas, mesmo com atividade específica alta (74 MBq/ μg). O ensaio de ligação específica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu mostrou fração significativa de ligação às células LNCaP de tumor de próstata, exclusivamente à superfície celular. Os parâmetros farmacocinéticos determinados no estudo *in vivo* em camundongos BALB/c são compatíveis com o rápido clareamento sanguíneo e excreção renal. O radiofármaco demonstrou alta estabilidade em soro humano *in vivo* por um período de até 24 horas, que foi confirmada pela baixa captação óssea demonstrada nos estudos *in vivo* de biodistribuição. Os resultados favoráveis deste estudo sugerem a realização de ensaio clínico controlado deste novo radiofármaco para avaliar seu potencial no tratamento do câncer de próstata.

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

ABSTRACT

Several PSMA-targeting radiopharmaceuticals have been developed for the diagnosis of prostate cancer and, for the treatment of patients with metastatic cancer resistant to castration and conventional therapies. This work studied the radiochemical labeling and stability of Glu-NH-CO-NH-Lys (Ahx)-DOTA with ^{177}Lu (PSMA-DOTA- ^{177}Lu), and performed preclinical studies to determine its potential in prostate cancer therapy. The radiopharmaceutical was obtained with high radiochemical purity (PR > 95%) in all studied conditions and remained stable when stored under freezing for up to 48 hours, even at high specific activity (74 MBq / μg). The specific binding assay of PSMA-DOTA- ^{177}Lu revealed a significant fraction of binding to LNCaP cells, exclusively at the cell surface. The pharmacokinetic parameters of *in vivo* studies performed in BALB/c mice resulted in a rapid blood clearance and renal excretion. Stability studies in human serum demonstrated high PSMA-DOTA- ^{177}Lu stability over 24 hours, which is in agreement with the low bone uptake obtained in the *in vivo* biodistribution studies. The favorable results of this study suggest a controlled clinical trial of this new radiopharmaceutical to evaluate its potential to the treatment of prostate cancer.

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

Introdução:

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

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

O antígeno de membrana prostático específico, conhecido internacionalmente pela sigla PSMA (*Prostate Specific Membrane Antigen*), é uma glicoproteína tipo II, transmembrânica, diferentemente do PSA que é uma proteína livre no sangue, de 750 aminoácidos, sendo que grande parte deles representa seu domínio extracelular. O PSMA representa um ótimo alvo para novos métodos de diagnóstico por imagem e terapia antineoplásica em razão de ser superexpresso em praticamente todas as neoplasias da próstata e de seu possível papel na malignidade destas, assim como na angiogênese de tumores sólidos. Além disso, sua expressão em tecidos extra prostáticos é altamente restrita (Hillier et al., 2009; Ghosh & Heston, 2004).

Nos últimos anos, foram desenvolvidos inibidores de PSMA baseados em ureia (IPBU) que são peptídeos de baixo peso molecular, compostos basicamente por dois aminoácidos ligados através de uma ureia (Maresca et al., 2009). Em razão da evolução das técnicas de produção do gálio-68 (^{68}Ga), Banerjee e colaboradores (2010) analisaram o IPBU com a estrutura básica Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx) conjugado com o agente quelante HBED-CC (ácido N,N'-Bis[2-hidroxi-5-carboxietil-benzil]etilenediamine-N,N'-diacético), radiomarcado com ^{68}Ga (PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga), que se mostrou bastante promissor para diagnóstico do câncer de próstata por meio da técnica de tomografia por emissão de pósitrons (PET).

A aplicação clínica do PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga indica seu potencial como um poderoso traçador diagnóstico mostrando melhor eficácia de detecção do que outros marcadores PET, incluindo traçadores como fludesoxiglicose- ^{18}F e colina- $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$. O PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga também pode ser usado para identificar metástases de linfonodos e metástase óssea (Budaus et al., 2016; Hijazi et al., 2015; Demirci, 2014). O traçador de diagnóstico também tem um papel importante

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

Devido aos baixos níveis de expressão de PSMA em tecidos saudáveis, esses agentes também têm o potencial para terapia radionuclídica, com efeitos colaterais mínimos quando marcados com radionuclídeos terapêuticos adequados (Kratochwil et al., 2015).

O peptídeo PSMA-617 contendo o agente quelante DOTA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-tetracético), tornou-se um novo precursor teranóstico (aplicação em diagnóstico e terapia), demonstrando uma elevada afinidade de ligação ao PSMA e excelente contraste em pacientes portadores de câncer de próstata (Benesová et al., 2015; Afshar-Oromieh et al., 2015).

Uma das últimas publicações encontradas na literatura compilou os resultados de diversos estudos clínicos com o PSMA-617-DOTA radiomarcado com ¹⁷⁷Lu, revelando uma resposta terapêutica surpreendentemente satisfatória em pacientes com câncer de próstata metastático resistentes à castração, estimulando a realização de estudos clínicos prospectivos de fase II e III para avaliar a melhora clínica dos pacientes (Rahbar et al., 2017).

A captação deste radiofármaco em órgãos não alvo, como as glândulas salivares e os rins, sugere estudo de novos derivados PSMA-específicos, visando minimizar a captação nestes órgãos e os efeitos adversos relacionados. Neste sentido, este trabalho estudou a marcação e estabilidade radioquímica do antagonista de PSMA Glu-NH-CO-NH-Lys(Ahx)-DOTA com ¹⁷⁷Lu e avaliou seu potencial para a terapia do câncer de próstata por meio de ensaios pré-clínicos *in vitro*, de especificidade do radiofármaco por células de tumor de próstata (LNCaP) e ensaios *in vivo* de farmacocinética e biodistribuição em camundongos.

Metodologia:

Condição de marcação do inibidor de PSMA com ¹⁷⁷Lu

A 10 µg de peptídeo PSMA-DOTA diluído com 200 µL de tampão acetato de sódio (0,4 M pH 4,5), adicionaram-se cerca de 92,5 MBq (2,5 mCi) de ¹⁷⁷LuCl₃ e a reação de marcação se deu a 90 °C por 30 minutos. Para avaliar a influência da atividade específica, realizou-se a marcação com as mesmas condições, porém utilizando-se massas de 20 µg e 5 µg do peptídeo PSMA-DOTA. Além disso, realizou-se estudo de variação de atividade de ¹⁷⁷LuCl₃ (92,5 a 740 MBq) mantendo-se

a massa em 10 µg. A estabilidade do radiofármaco foi avaliada mediante armazenamento à temperatura $\leq -20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 horas e também incubado em soro humano a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por até 24 horas.

Método de controle de pureza radioquímica

Para determinar a pureza radioquímica da radiomarcagem, foram utilizadas a cromatografia em camada delgada de sílica gel (CCD-SG) e contador gama tipo poço (D5002 cobra II – Packard-. Canberra, EUA) em fase móvel de tampão citrato de sódio 0,1 M pH 5,0 e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (sistema Agilent) em fase reversa (C18 Waters, 150 mm x 4,0 mm, 5 µm) equipado com detector UV 190 – 300 nm e detector de radiação gama (Raytest), com gradiente linear com fluxo de 1,0 mL/minuto. A separação cromatográfica foi realizada utilizando as fases móveis A (H_2O) e B (CH_3CN), contendo 0,1 % de TFA (ácido trifluoracético) para prevenir contaminações das fases móveis, usando o seguinte programa de gradiente: 100 % de A entre 0 - 3 minutos, 70 % de A e 30 % de B entre 3 – 20 minutos e para equilibrar a coluna 100 % de A entre 23 - 27 minutos.

Ensaio *in vitro* de ligação específica

O ensaio de ligação específica foi realizado com PSMA-DOTA- ^{177}Lu e células de carcinoma prostático humano androgênio-dependente (LNCaP). O peptídeo não radiomarcado (30,5 nmol) em meio de cultura contendo 10 % de SFB (soro fetal bovino) foi utilizado como competidor. O ensaio foi realizado em tubos cônicos em triplicata por meio da adição de diferentes quantidades de células, 0,15; 0,3; 0,5 e $1,0 \times 10^6$ células em 500 µL de meio de cultura RPMI (Roswell Park Memorial Institute) contendo 10 % de SFB, seguido da adição de 250 µL de meio de cultura (ligação total) ou 250 µL da solução do competidor (ligação não-específica) e 250 µL da solução contendo o radiomarcador molecular PSMA-DOTA- ^{177}Lu (30,5 pmol) em todos os tubos. Os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 1 hora e 30 minutos, centrifugados a 4200 g por 5 minutos, lavados duas vezes com 1 mL de tampão de ensaio (PBS 0,01 M contendo 0,5 % de albumina sérica bovina) e contados em contador gama (D5002 cobra II – Packard-. Canberra, EUA). Para análise da internalização, as células foram lisadas com 1 mL de NaOH 1 M e o conteúdo intracelular foi removido para tubos de contagem, juntamente com mais duas lavagens da mesma solução. Após a contagem dos tubos em contador gama, a porcentagem de internalização específica foi calculada em função do total de radioatividade na célula e do total de radioatividade adicionado.

Estudos farmacocinéticos e de biodistribuição do peptídeo PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em camundongos BALB/c e camundongos SCID (*Severe Combined Immunodeficient*) com tumor

Os estudos de farmacocinética e de biodistribuição do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu em animais BALB/c machos pesando cerca de 23 gramas foram realizados por método invasivo, após os camundongos serem anestesiados com 100 µL a cada 20 gramas de peso corporal de uma solução de ketamina básica (20 mg/mL) e xilazina (4 mg/mL), por via intraperitoneal (n=5). Os parâmetros farmacocinéticos como meia-vida de distribuição ($t_{1/2} \alpha$), meia-vida de eliminação ($t_{1/2} \beta$), constante de distribuição (α) e constante de eliminação (β), bem como a área sob a curva de concentração plasmática versus tempo (AUC), foram calculados utilizando o programa GraphPad Prism 5.00® (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA) para um modelo de distribuição em dois compartimentos, caracterizado por duas exponenciais, uma de decaimento rápido e outra de decaimento lento. Para realizar os estudos de biodistribuição, os principais órgãos como o coração, fígado, baço, pulmões, pâncreas, estômago, rins, intestino delgado e grosso, músculo da pata traseira, fêmur e cérebro, foram retirados após transcorrido o tempo de estudo e foram lavados, pesados, e avaliou-se a radioatividade em cada um deles em contador gama tipo poço. Para o estudo de biodistribuição em camundongos SCID com tumor, foram utilizados animais 30 dias após inoculação de 5×10^6 células LNCaP por via subcutânea no flanco direito, quando os tumores atingiram cerca de 5 mm de diâmetro (n=3). Os resultados dos estudos de biodistribuição foram expressos em % da atividade injetada por grama de tecido (% AI/g). Os estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal/IPEN (protocolo nº115/2015).

Resultados e Discussão:

No estudo para avaliar a influência da atividade específica (MBq/µg na radiomarcagem), a pureza radioquímica foi satisfatória (> 95 %) para as três massas estudadas sendo de $97,57 \pm 0,51$ % para 5µg, $98,77 \pm 0,25$ % para 10 µg e $98,84 \pm 0,25$ % para 20 µg, mostrando que a variação da massa de PSMA-DOTA para a atividade estudada não influenciou significativamente na porcentagem de pureza radioquímica obtida no procedimento de marcação (teste de Bonferroni, $p > 0,05$). Os resultados do estudo de variação de atividade para a massa de 10 µg de PSMA-DOTA são apresentados na Tabela 1 para as diferentes atividades específicas.

Tabela 1 - Análise da influência da atividade específica sobre a pureza radioquímica do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu (CCD-SG) (n=3).

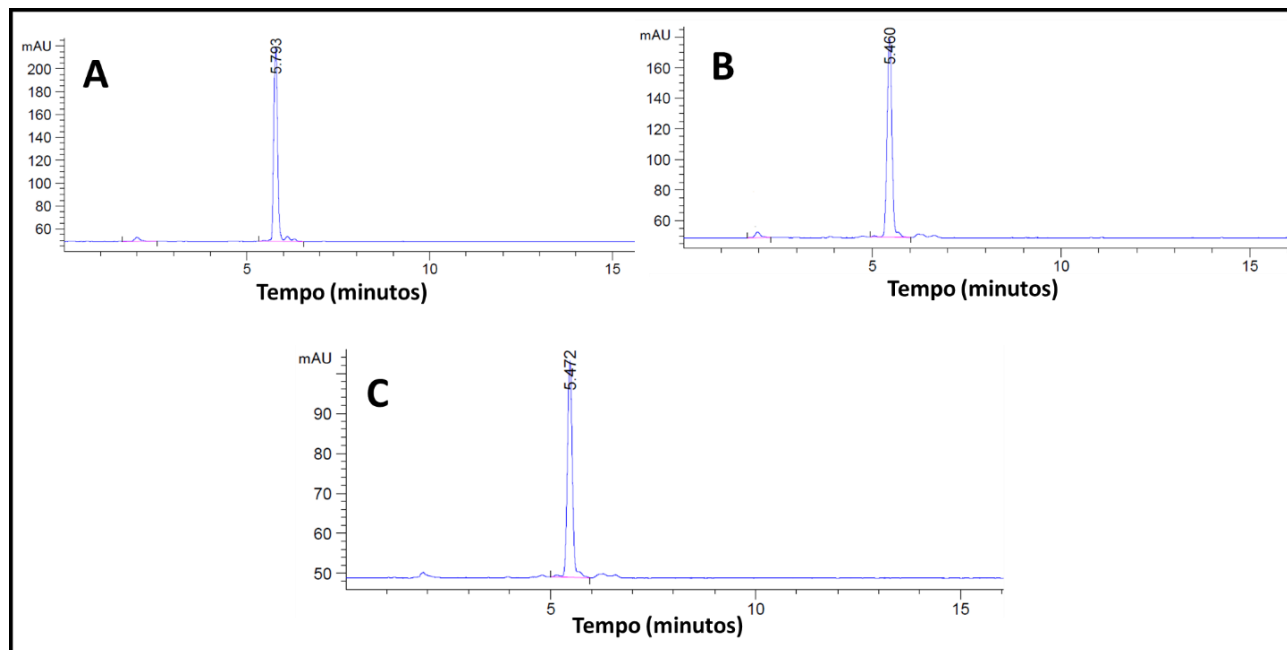
Atividade de ¹⁷⁷ LuCl ₃ (MBq)	Atividade Específica do PSMA-DOTA- ¹⁷⁷ Lu (MBq/μg)	Pureza Radioquímica (%)
92,5	9,25	99,21 ± 0,35
185	18,5	98,29 ± 0,83
370	37,0	98,34 ± 1,17
555	55,5	99,10 ± 0,08
740	74,0	98,36 ± 0,69

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

Pode-se observar que pureza radioquímica satisfatória (> 95 %) foi obtida para todas as atividades específicas avaliadas (Tabela 1) com diferença estatisticamente insignificante entre os grupos (teste de Bonferroni, $p > 0,05$). Entretanto, é importante considerar o efeito da atividade específica sobre a estabilidade do produto radiomarcado.

Desta forma, foram realizados estudos de estabilidade das preparações armazenadas na forma congelada (≤ -20 °C), para avaliar a influência da atividade específica sobre a pureza radioquímica em diferentes tempos. As atividades específicas entre 9,25 MBq/μg e 74 MBq/μg apresentaram alta pureza radioquímica (> 95 %), sem necessidade de purificação e/ou adição de agentes estabilizantes, mantendo-se estáveis mediante armazenamento à temperatura ≤ -20 °C por até 48 horas. O perfil de CLAE de estabilidade do radiofármaco com atividade específica de 74 MBq/μg e armazenado a ≤ -20 °C por até 48 horas estão apresentados na Figura 1, demonstrando que não houve degradação do peptídeo radiomarcado.

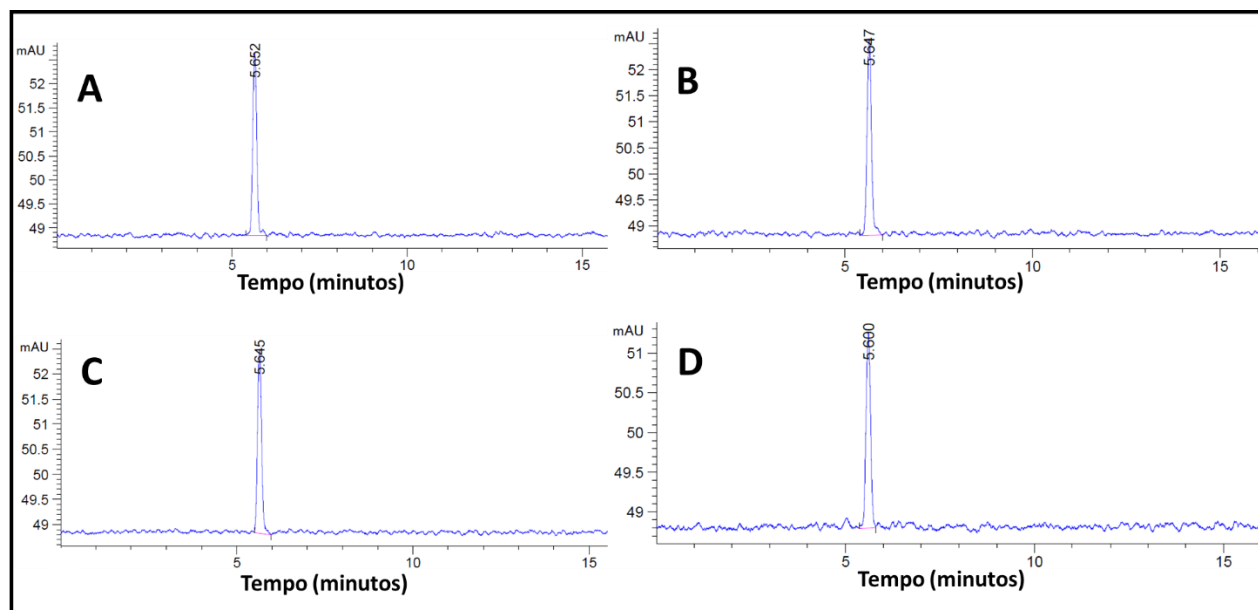
Figura 1 – Perfil de CLAE do estudo da estabilidade do PSMA-DOTA- ^{177}Lu radiomarcado com atividade específica de 74 MBq/ μg e armazenado a $\leq -20^\circ\text{C}$: tempo imediato (A), 24 horas (B) e 48 horas (C).



O peptídeo marcado suportou uma atividade específica compatível com a que está sendo utilizada em ensaios clínicos (74 MBq/ μg) de outros ligantes de PSMA radiomarcados com ^{177}Lu (Das et al., 2016).

O ensaio de estabilidade *in vitro* em soro humano fornece uma estimativa da manutenção da integridade do produto *in vivo*, considerando a possibilidade de metabolização por enzimas presentes no sangue. A maior estabilidade dos radiofármacos no soro plasmático pode refletir uma maior quantidade de radiofármaco intacto presente na área do tumor, aumentando a probabilidade de ligação às células tumorais (Garayoa et al., 2007). Os resultados do estudo de estabilidade do radiofármaco PSMA-DOTA- ^{177}Lu em soro humano *in vitro* analisados por CLAE, estão apresentados na Figura 2.

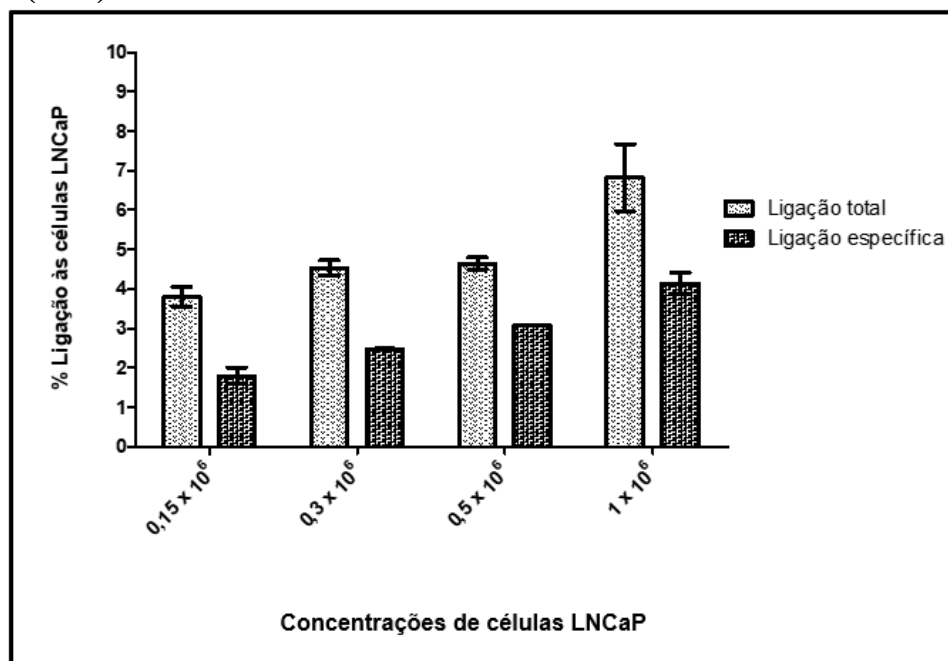
Figura 2 - Estabilidade do PSMA-DOTA- ^{177}Lu incubado em soro humano a 37°C por 15 minutos (A), 1 hora (B), 4 horas (C) e 24 horas (D), analisado por CLAE (n=3).



Os perfis de CLAE apresentaram apenas o pico correspondente ao peptídeo radiomarcado, não tendo sido evidenciada presença de lutécio livre ou outras espécies sugestivas de metabolização ou degradação do composto. Os resultados do estudo de estabilidade em soro humano demonstraram alta estabilidade do radiofármaco e sugerem que o peptídeo PSMA-DOTA- ^{177}Lu provavelmente apresentará estabilidade *in vivo*.

Os estudos de ligação celular são realizados para determinar a capacidade dos marcadores moleculares se ligarem às células tumorais. O percentual de ligação específica obtido para o PSMA-DOTA- ^{177}Lu às células LNCaP (Figura 3) foi discretamente superior aos valores descritos na literatura para o peptídeo PSMA-DOTA- ^{68}Ga (2,5 e 3,0 % utilizando $0,7 \times 10^6$ de células LNCaP), além disso, observa-se uma tendência linear de aumento da % de ligação específica com o aumento da concentração de células (EDER et al., 2012).

Figura 3 – Resultados do ensaio de ligação específica do PSMA-DOTA- ^{177}Lu em diferentes concentrações de células LNCaP (n = 3).



Entretanto, deve-se levar em consideração que as diferenças de origem das células, forma de cultivo, manutenção e número de passagens podem provocar alterações na expressão do receptor por parte das células, influenciando na quantidade de receptores disponíveis na membrana celular. Além disso, o estudo realizado por Eder e colaboradores (2012) não informa a atividade específica do PSMA-DOTA- ^{68}Ga o que também prejudica a comparação dos resultados.

O ensaio de internalização do PSMA-DOTA- ^{177}Lu indica que o maior percentual da ligação específica do radiofármaco às células LNCaP corresponde à fração da ligação de superfície ($99,03 \pm 0,84\%$), com menos de 1 % de internalização. Essa baixa fração de internalização é característica do radiofármaco estudado, provavelmente, devido ao espaçador *Ahx* e ao agente quelante DOTA presentes em sua estrutura molecular (Eder et al., 2012).

Esses resultados estão de acordo com o estudo comparativo de dois agentes quelantes (HBED-CC e DOTA), publicados previamente por Eder e colaboradores (2012), que demonstraram alta fração de internalização do PSMA-HBED-CC- ^{68}Ga e uma fração de internalização extremamente baixa do PSMA-DOTA- ^{68}Ga .

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

Entretanto, peptídeos de baixo peso molecular derivados de bombesina, que possuem pouca internalização promoveram resultados iguais ou até melhores nos estudos pré-clínicos quando

comparados com peptídeos derivados de bombesina que possuem maior internalização (Stangelberger et al., 2005; Cescato et al., 2008).

De fato, não é necessário que o radiofármaco seja internalizado para que o efeito citotóxico sobre as células tumorais aconteça (Pujatti, 2009). Além disso, o PSMA também está presente em baixa expressão em células do epitélio normal da próstata, túbulos renais, mucosa duodenal, glândulas salivares e células neuronais, sendo que radiofármacos com maior internalização pelas células tumorais, também podem ser internalizados pelos tecidos sadios que expressam o receptor de interesse, podendo dificultar sua eliminação e consequentemente aumentando a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos (Kratochwil et al., 2015).

A marcação do PSMA-DOTA com ^{177}Lu aparentemente não prejudicou a capacidade de ligação do peptídeo às células tumorais. Assim, os dados obtidos nos estudos celulares *in vitro* da interação do PSMA-DOTA- ^{177}Lu com o antígeno de membrana prostático específico (PSMA), motivaram a investigar o comportamento *in vivo* do radiofármaco.

O conhecimento prévio da farmacocinética de um novo radiofármaco é importante para avaliar o potencial de aplicação clínica, pois inclui os processos de distribuição, biotransformação e eliminação do radiofármaco (Roberts, Taccone, Lipman, 2015). Os parâmetros farmacocinéticos determinados no estudo *in vivo* foram: $t_{1/2\alpha}$ 2,92 min, $t_{1/2\beta}$ 20,04 min, CL 0,21 mL.min⁻¹ e Vd 1,07 L.Kg⁻¹, compatíveis com o rápido clareamento sanguíneo e excreção renal (n=5).

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

Por meio do ensaio de biodistribuição em camundongos pode-se observar uma captação expressiva nos rins nos primeiros 30 minutos, indicando que o radiofármaco é excretado principalmente por via renal, com redução significativa após 4 horas da administração. Deste modo, os rins provavelmente são os órgãos críticos para a dosimetria. Os demais órgãos avaliados apresentaram baixa captação do radiofármaco, incluindo os ossos, que particularmente demonstra a estabilidade *in vivo* do composto, já que a liberação do lutécio-177 promove acúmulo do radionuclídeo no sistema ósseo (Tabela 2).

Tabela 2 - Biodistribuição do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu com atividade específica de 74MBq/μg em camundongos BALB/c machos. Os resultados estão em porcentagem de atividade administrada por grama de tecido (%Al/g) ou mL de sangue (n=5).

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

Estudos de biodistribuição do PSMA-DOTA-⁶⁸Ga apresentaram resultados semelhantes para o tempo de 60 minutos em camundongos *Nude* com tumor LNCaP. O PSMA-HBED-CC-⁶⁸Ga foi rapidamente eliminado do sangue, porém devido à reabsorção nos túbulos renais atribuído ao agente quelante HBED-CC, apresentou alta captação renal em 60 minutos (139,4 ± 21,4 % Al/g), diferentemente do PSMA-DOTA-⁶⁸Ga que apresentou captação renal mais baixa em 60 minutos (~ 5,0 % Al/g), da mesma forma que o PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu (5,04 ± 1,60 % Al/g) (Eder et al., 2012).

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

O PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu apresentou apreciável captação tumoral (2,76 ± 1,21 % Al/g) após 4 horas da administração endovenosa do radiofármaco, sendo que esse resultado foi semelhante ao PSMA-DOTA-⁶⁸Ga (~ 3,0% Al/g) (Eder et al., 2012). Os resultados dos estudos pré-clínicos realizados neste trabalho com o PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu serão futuramente comparados com estudos pré-clínicos a serem realizados com outros derivados PSMA, para avaliar o potencial do PSMA-DOTA-¹⁷⁷Lu.

Conclusão:

O estudo de variação da atividade possibilitou estabelecer a atividade específica ideal (MBq/ μ g), que será extrapolada para um piloto de produção do radiofármaco. Os resultados obtidos para o PSMA-DOTA- ^{177}Lu , que demonstraram alta estabilidade em soro *in vitro* e clareamento sanguíneo rápido e rápida eliminação renal, sem acúmulo em órgãos não alvos, encorajaram a realização de estudo de biodistribuição em modelo experimental *in vivo* de tumor da próstata para avaliar o seu potencial para aplicação no tratamento do câncer de próstata.

Agradecimentos:

Os autores agradecem à Comissão Nacional de Energia Nuclear e Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- Abd-elgalil WR, Gallazzi F, Garrison JC, Rold TL, Sieckman GL, Figueroa S D, Hoffman TJ, Lever SZ. Design, synthesis, and biological evaluation of an antagonist-bombesin analogue as targeting vector. *Bioconjug. Chem.* 19(10): 2040-2048, 2008.
- Afshar-Oromieh A, Hetzheim H, Kratochwil C, Benesova M, Eder M, Neels OC, Eisenhut M, Ku"bler W, Holland-Letz T, Giesel FL, Mier W, Kopka K, Haberkorn U. The novel theranostic PSMA-ligand PSMA-617 in the diagnosis of prostate cancer by PET/CT: biodistribution in humans, radiation dosimetry and first evaluation of tumor lesions. *J. Nucl. Med.* 56(11): 1697-705, 2015.
- Banerjee SR, Pullambhatla M, Byun Y, Nimmagadda S, Green G, Fox JJ, Horti A, Mease RC, Pomper MG. Gallium-68-labeled inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA) for imaging prostate cancer. *J. Med. Chem.* 53(14): 5333-5341, 2010.
- Benesová M, Schafer M, Bauder-Wust U, Afshar-Oromieh A, Kratochwil C, Mier W, Haberkorn U, Kopka K, Eder M. Preclinical evaluation of a tailor-made dota-conjugated psma inhibitor with optimized linker moiety for imaging and endoradiotherapy of prostate cancer. *J. Nucl. Med.* 56(6): 914-920, 2015.
- Budaus L, Leyh-Bannurah SR, Salomon G, Michl U, Heinzer H, Huland H, Graefen M, Steuber T, Rosenbaum C. Initial experience of Gallium-68-PSMA PET/CT imaging in high-risk prostate cancer patients prior to radical prostatectomy. *Eur. Urol.* 69(3): 393-396, 2016
- 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.* 49(2): 318-326, 2008.

Das T, Guleria M, Parab A, Kale C, Shah H, Sarma HD, Lele VR, Banerjee S. Clinical translation of 177Lu-labeled PSMA-617: initial experience in prostate cancer patients. *Nucl. Med. Biol.* 43(5): 296–302, 2016.

Demirci E, Ocak M, Kabasakal L, Decristoforo C, Talat Z, Halaç M, Bedii K. Gallium-68 PSMA PET/CT imaging of metastatic clear cell renal cell carcinoma. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 41(7): 1461-1462, 2014.

Eder M, Schafer M, Bauder-Wust U, Hull W, Wangler C, Mier W, Haberkorn U, Eisenhut M. 68Ga-complex lipophilicity and the targeting property of a urea-based PSMA inhibitor for PET imaging. *Bioconjug. Chem.* 23(4): 688-697, 2012.

Garayoa EG, Maes CSV, Rüegg D, Blanc A, Bläuenstein P, Tourwé DA, Beck-Sickinger AG, Schubiger PA. New [99mTc] bombesin analogues with improved biodistribution for targeting gastrin releasing-peptide receptor positive tumors. *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 51(1): 42-50, 2007.

Ghosh A & Heston WDW. Tumor target prostate specific membrane antigen (PSMA) and its regulation in prostate cancer. *J. Cel. Biochem.* 91(3):528-539, 2004.

Hijazi S, Meller B, Leitsmann C, Strauss A, Meller J, Ritter CO, Lotz J, Schildhaus HU, Trojan L, Sahlmann CO. Pelvic lymph node dissection for nodal oligometastatic prostate câncer detected by 68Ga-PSMA-positron emission tomography/computerized tomography. *Prostate.* 75(16): 1934-1940, 2015.

Hillier SM, Maresca KP, Femia FJ, Marquis JC, Foss CA, Nguyen N, Zimmerman CN, Barrett JA, Eckleman WC, Pomper MG, Joyal JL, Babich JW. Preclinical evaluation of novel glutamate-urea-lysine analogues that target prostate-specific membrane antigen as molecular imaging pharmaceuticals for prostate cancer. *Cancer Res.* 69(17): 6932-6940, 2009.

Instituto Nacional do Câncer. Incidência de câncer no Brasil – estimativa 2016. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp..> Acesso em: jan. 2017.

Kratochwil C, Giesel FL, Stefanova M, Benešová M, Bronzel M, AfsharOromieh A, Mier W, Eder M, Kopka K, Haberkorn U. 177[Lu]Lutetium-labelled PSMA ligand-induced remission in a patient with metastatic prostate câncer. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 42(6): 987-988, 2015.

Maresca KP, Hillier SM, Femia FJ, Keith D, Barone C, Joyal JL, Zimmerman CN, Kozikowski AP, Barrett JA, Eckelman WC, Babich JW. A series of halogenated heterodimeric inhibitors of prostate-specific membrane antigen (PSMA) as radiolabeled probes for targeting prostate cancer. *J. Med. Chem.* 52(2): 347-357, 2009.

Pujatti PB. Desenvolvimento de derivados da bombesina radiomarcados com Lutécio-177: Relação estrutura e potencial diagnóstico-terapêutico para tumor de próstata. 2009. São Paulo. 136p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares/USP. São Paulo.

Rahbar K, Ahmadzadehfar H, Kratochwil C3, Haberkorn U, Schäfers M, Essler M, Baum RP, Kulkarni HR, Schmidt M, Drzezga A, Bartenstein P, Pfestroff A, Luster M, Lützen U, Marx M, Prasad V, Brenner W, Heinzel A, Mottaghy FM, Ruf J, Meyer PT, Heuschkel M, Eveslage M, Bögemann M, Fendler WP, Krause BJ. German Multicenter Study Investigating 177Lu-PSMA-617 Radioligand Therapy in Advanced Prostate Cancer Patients. *J. Nucl. Med.* 58(1):85-90, 2017.

Roberts JA, Taccone FS, Lipman J. Understanding PK/PD. *Intensive Care Med.* 41(1): 1-4, 2015.

Stangelberger A, Schally AV, Varga JL, Zarandi M, Szepeshazi K, Armatis P, Halmos G. Inhibitory effect of antagonists of bombesin and growth hormone-releasing hormone on orthotopic and intraosseous invasiveness of PC-3 human prostate cancer in Nude mice. *Clin. Cancer. Res.* 11(1): 49-57, 2005.

Sterzing F, Kratochwil C, Fiedler H, Katayama S, Habl G, Kopka K. Gallium-68-PSMA-11 PET/CT: a new technique with high potential for the radiotherapeutic management of prostate cancer patients. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 43(1): 34–41, 2016.