

FERNANDA FERREIRA MENDONÇA

Estudos comparativos in vitro e in vivo de Peptídeos da  
Laminina-111 Radiomarcados com Iodo-131 e Tecnécio-  
99m. Relevância para o Câncer de Mama.

Tese apresentada ao Curso de Pós-  
Graduação da Faculdade de Ciências  
Médicas da Santa Casa de São Paulo para  
obtenção do Título de **Doutor(a)** em  
**Ciências da Saúde.**

SÃO PAULO

2026

FERNANDA FERREIRA MENDONÇA

Estudos comparativos in vitro e in vivo de Peptídeos da  
Laminina-111 Radiomarcados com Iodo-131 e Tecnécio-  
99m. Relevância para o Câncer de Mama.

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo para obtenção do Título de **Doutor(a)** em **Ciências da Saúde**.

Área de Concentração: **Ciências da Saúde**

Orientador: **Profa. Dra. Luciana Malavolta Quaglio**

Coorientador: **Prof. Dr. Leonardo Lima Fuscaldi**

SÃO PAULO

2026

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Mendonça, Fernanda Ferreira

Estudos comparativos in vitro e in vivo de peptídeos da laminina-111 radiomarcados com iodo-131 e tecnécio-99m. Relevância para o câncer de mama./ Fernanda Ferreira Mendonça. São Paulo, 2026.

Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientadora: Luciana Malavolta Quaglio

Coorientador: Leonardo Lima Fuscaldi

1. Neoplasias da mama 2. Peptídeos 3. Compostos  
radiofarmacêuticos 4. Radioisótopos do iodo 5. Tecnécio

BC-FCMSCSP/29-26

## **DEDICATÓRIAS**

Dedico esta obra à minha família, pelo amor, apoio incondicional e incentivo constante ao longo desta jornada, tornando possível a realização deste sonho.

Dedico também à Profa. Dra. Luciana Malavolta Quaglio, ao Prof. Dr. Leonardo Lima Fuscaldi, à Ms. Marycel Figols de Barboza e aos demais membros do grupo da Santa Casa e da Radiofarmácia do Hospital Albert Einstein, pelo apoio, ensinamentos e colaboração fundamentais para a concretização deste trabalho.

À Dra. Maria Emilia Tereria e à Dra. Ana Rey, da Facultad de Química da Universidad de la República – Uruguay, expresso minha profunda gratidão pela parceria, acolhimento e valiosa contribuição científica ao desenvolvimento desta pesquisa.

“Aqueles que passam por nós não vão  
sós, não nos deixam sós. Deixam um  
pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que abriu as portas para que eu conseguisse chegar até aqui. A minha família que me orientou e sempre me apoiou a cada passo dado até este momento.

Agradeço à Profa. Luciana e Prof. Leonardo que me orientaram para concretizar este trabalho, à Dra. Marycel Figols de Barboza que auxiliou com o seu grande conhecimento na área da radiofarmácia e apoio durante as experimentações.

Agradeço à Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP), Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), em especial ao departamento de Biofísica, Facultad de Química da Universidad de la República – Uruguay e ao Hospital Israelita Albert Einstein que me acolheram dando suporte para esta pesquisa.

E, por último agradeço a FAPESP, CAPES e a **FCMSCSP (FAP)** pelo apoio financeiro concedido através das Bolsas de Iniciação Científica (Proc. FAPESP 2018/06823-2) e de Mestrado e Doutorado para a realização deste projeto.

## ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

~ - Aproximadamente

°C – Graus Celsius

$\alpha$  – Alfa

[ $\alpha$ ]- Partícula alfa

$\beta$  – Beta

[ $\beta$ ] – Partícula Beta

$\gamma$  – Gama

[ $\gamma$ ]- Raios gama

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{L}$  – Microlitro

$\mu\text{m}$  – Micrômetro

0,9% NaCl – Cloreto de Sódio

$^{11}\text{C}$  – Carbono-11

$^{18}\text{F}$  – Flúor -18

$^{67}\text{Ga}$  – Gálio-67

$^{99}\text{Mo}$  – Molibdênio-99

$^{99\text{m}}\text{Tc}$  – Tecnécio-99 metaestável

$^{111}\text{In}$  – Índio-111

$^{123/131}\text{I}$  – Iodo-123/131

$^{177}\text{Lu}$  – Lutécio-177

$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  - Tricarbonil

$[\text{}^{123}\text{I}]\text{NaI}$  – Iodeto de Sódio - $^{123}\text{I}$

$[\text{}^{131}\text{I}]\text{NaI}$  – Iodeto de Sódio –  $^{131}\text{I}$

ACN – Acetonitrila

AcOH – Ácido Acético

Ala (A) – Alanina

Arg (R) – Arginina

ATCC – American Type Culture Collection

ANOVA – Analysis of Variance (Análise de Variância)

Boc – terc-butiloxicarbonila

C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>NaK – Tartarado de Sódio e Potássio

C<sub>18</sub> – Carbono 18

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CETEC - Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgias do Hospital Israelita Albert Einstein.

CLAE-FR – Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

cm - centímetro

CO – Monóxido de carbono

CP – Coeficiente de partição

CPM - Contagens por minuto

CSPGs – Proteoglicanos de sulfato de condroitina

CT – Cloramina T

D - Dias

DCM – Diclorometano

DIC – Diisopropilcarbodiimida

DMEM-F12 - Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

DMF - Diimetilformamida

Fmoc – N-9-Fluorenilmetiloxicarboxila IX

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

Gly (G) - Glicina

h - Horas

H<sub>2</sub>O - Água

HCl - Ácido clorídrico

HClO – Ácido Hipocloroso

His (H) - Histidina

HOBt – N-hidroxibenzotriazol

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance

HSPGs – Proteoglicanos de sulfato heparano

IAEA – Agência Internacional de Energia Atômica

IG – Iodo-Gen

Ile (I) - Isoleucina

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IPEN-CNEN/SP - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

KeV – quilo elétron volt

LC/ESI-MS - Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas por ionização electrospray

LPS – Ligação às proteínas séricas

Log P - Logaritmo do coeficiente de partição

Lys (K) – Lisina

M – Molar

mm - milímetro

MBq – mega Becquerel

MCF-7 - Linhagem celular de câncer de mama humano

mCi - Milicurie

MDA-MB-231 - Linhagem celular de câncer de mama triplo-negativo

MeOH – Metanol

min - Minuto

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mmol/g – Milimol por grama

n – tamanho da amostra

NaBH<sub>4</sub> – Borohidreto de Sódio

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de Sódio

Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> –Metabissulfito de Sódio

Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> - Pertecnetado de Sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NaI – Iodeto de Sódio

NaOH –Hidróxido de Sódio

nm – Nanômetro

p - Valor de probabilidade estatística

PBS- Solução Salina Tampão de Fosfato

PET – Tomografia por emissão de pósitron (“Pósitron emission tomography”)

pH - Potencial hidrogeniônico

Pmc- pentamethylcromano-6-sulfonila

PQR –Pureza radioquímica X

R<sub>f</sub> – Fator de retenção

rpm – Rotação por minuto

RPMI-1640 - Roswell Park Memorial Institute Medium -1640

R<sub>t</sub> – Tempo de retenção

s - Segundos

SD – Desvio Padrão

Ser (S) - Serina

SFB – Soro fetal bovino

SPECT – Tomografia computadorizada por emissão de fóton único

SPFS – Síntese de peptídeo em fase sólida

T<sub>1/2</sub> – Tempo de meia-vida

tBu/ tBut - Terc-butil

Tc-99m - Tecnécio 99 metaestável

TFA – Ácido trifluoroacético

TLC/SG – Thin Layer Chromatography/Sílica Gel

Tyr (Y) - Tirosina

UHPLC - Ultra High Performance Liquid Chromatography

UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo

UV-VIS - Ultravioleta-Visível

v/v – volume/volume

Val (V) -valina

## LISTA DE FIGURAS

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |    |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Laminina-111 e seus peptídeos bioativos.....                                                                                                                                                                                                                                                             | 4  |
| <b>Figura 2.</b>  | Fórmula da estrutura do complexo tricarconil.....                                                                                                                                                                                                                                                        | 9  |
| <b>Figura 3.</b>  | Etapas de obtenção de um dipeptídeo em fase sólida pela estratégia Fmoc.....                                                                                                                                                                                                                             | 16 |
| <b>Figura 4.</b>  | Etapas da radiomarcagem dos peptídeos com $[^{131}\text{I}]\text{NaI}$ .....                                                                                                                                                                                                                             | 18 |
| <b>Figura 5.</b>  | Etapas da síntese do $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ e radiomarcagem dos peptídeos com $[^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ .....                                                                                                             | 19 |
| <b>Figura 6.</b>  | Semeadura da amostra na fita TLC/SG de 10 cm para análise cromatográfica.....                                                                                                                                                                                                                            | 20 |
| <b>Figura 7.</b>  | Etapas da avaliação da ligação dos radiopeptídeos às proteínas séricas.....                                                                                                                                                                                                                              | 22 |
| <b>Figura 8.</b>  | Etapas da determinação do coeficiente de partição dos radiopeptídeos.....                                                                                                                                                                                                                                | 23 |
| <b>Figura 9.</b>  | Culturas das linhagens MDA-MB-231 <b>(A)</b> com baixa e alta densidades e MCF-7 <b>(B)</b> com baixa e alta densidades.....                                                                                                                                                                             | 24 |
| <b>Figura 10.</b> | Etapa da avaliação das frações ligada às células tumorais <b>(A)</b> e internalizada às células tumorais <b>(B)</b> .....                                                                                                                                                                                | 24 |
| <b>Figura 11.</b> | Inoculação das células tumorais (MDA-MB-231) em camundonga Balb/c nude fêmeas.....                                                                                                                                                                                                                       | 26 |
| <b>Figura 12.</b> | Injeção do peptídeo radiomarcado, após a tempo determinado realização da biodistribuição em animal controle e o modelo.....                                                                                                                                                                              | 27 |
| <b>Figura 13.</b> | Perfil cromatográfico (A) e a espectro de massas (B) do fragmento HYIGSR.....                                                                                                                                                                                                                            | 43 |
| <b>Figura 14.</b> | Perfil cromatográfico (A) e a espectro de massas (B) do fragmento HYIKVAV.....                                                                                                                                                                                                                           | 44 |
| <b>Figura 15.</b> | Perfis radiocromatográficos do $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -tricarconil <b>(A)</b> , peptídeo $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR <b>(B)</b> , $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_2$ <b>(C)</b> e $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ <b>(D)</b> em Acetonitrila 50%.....      | 46 |
| <b>Figura 16.</b> | Perfis radiocromatográficos do $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -tricarconil <b>(A)</b> , peptídeo $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR <b>(B)</b> , $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_2$ <b>(C)</b> e $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ <b>(D)</b> em Acetonitrila 95%.....      | 47 |
| <b>Figura 17.</b> | Perfis radiocromatográficos do $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -tricarconil <b>(A)</b> , peptídeo $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR <b>(B)</b> , $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_2$ <b>(C)</b> e $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ <b>(D)</b> em Metiletilcetona 100%.....  | 47 |
| <b>Figura 18.</b> | Perfis radiocromatográficos do $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -tricarconil <b>(A)</b> , peptídeo $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR <b>(B)</b> , $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_2$ <b>(C)</b> e $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ <b>(D)</b> em NaCl 0,9%.....             | 48 |
| <b>Figura 19.</b> | Perfis radiocromatográficos do $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -tricarconil <b>(A)</b> , peptídeo $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV <b>(B)</b> , $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_2$ <b>(C)</b> e $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ <b>(D)</b> em Acetonitrila 95%.....     | 49 |
| <b>Figura 20.</b> | Perfis radiocromatográficos do $[^{99\text{m}}\text{Tc}]$ -tricarconil <b>(A)</b> , peptídeo $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV <b>(B)</b> , $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_2$ <b>(C)</b> e $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ <b>(D)</b> em Metiletilcetona 100%..... | 49 |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 21.</b> | Perfis radiocromatográficos do $[^{99m}\text{Tc}]$ -tricarbonil <b>(A)</b> , peptídeo $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV <b>(B)</b> , $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$ <b>(C)</b> e $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$ <b>(D)</b> em NaCl 0,9%.....                                             | 50 |
| <b>Figura 22.</b> | Estabilidade radioquímica dos peptídeos $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR e $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV em salina à temperatura ambiente <b>(A)</b> e em soro à 37°C <b>(B)</b> .....                                                                                  | 51 |
| <b>Figura 23.</b> | Perfis (radio)cromatográficos do peptídeo HYIGSR não radiomarcado <b>(A)</b> , do $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -tricarbonil <b>(B)</b> , do $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR não purificado <b>(C)</b> e do $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR purificado <b>(D)</b> .....    | 52 |
| <b>Figura 24.</b> | Perfis (radio)cromatográficos do peptídeo HYIKVAV não radiomarcado <b>(A)</b> , do $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -tricarbonil <b>(B)</b> , do $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV não purificado <b>(C)</b> e do $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV purificado <b>(D)</b> ..... | 53 |
| <b>Figura 25.</b> | Logaritmo do coeficiente de partição (Log P) dos radiopeptídeos $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR e $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV.....                                                                                                                                   | 54 |
| <b>Figura 26.</b> | Ligação às proteínas séricas (LPS) dos radiopeptídeos $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR e $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV.....                                                                                                                                             | 55 |
| <b>Figura 27.</b> | Porcentagens de ligação <b>(A)</b> e internalização <b>(B)</b> dos radiopeptídeos $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR e $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV na linhagem MCF-7.....                                                                                               | 56 |
| <b>Figura 28.</b> | Porcentagem de (A) ligação e de (B) internalização dos peptídeos $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR e $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV na linhagem MDA-MB-231.....                                                                                                           | 57 |
| <b>Figura 29.</b> | Biodistribuição dos radiopeptídeos $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR e $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV em animais controle (saudáveis) e modelo de câncer de mama (MDA-MB-231) no tempo de 2 horas.....                                                                    | 58 |
| <b>Figura 30.</b> | Comparação entre a detecção dos radiopeptídeos $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR e $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV nos tumores <b>(A)</b> e alvo-não alvo <b>(B)</b> no tempo de 2 horas.....                                                                              | 58 |

## LISTA DE TABELAS

|                  |                                                                                   |    |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> | Características físicas dos radionuclídeos mais utilizados na área clínica.....   | 7  |
| <b>Tabela 2.</b> | Grupos Experimentais para biodistribuição.....                                    | 27 |
| <b>Tabela 3.</b> | Parâmetro utilizados na caracterização dos peptídeos propostos.....               | 43 |
| <b>Tabela 4.</b> | Parâmetros de radiomarcção para os peptídeos <b>HYIGSR</b> e <b>HYIKVAV</b> ..... | 46 |

## SUMÁRIO

|           |                                                                                                            |    |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| I         | INTRODUÇÃO.....                                                                                            | 1  |
| I.1       | Câncer.....                                                                                                | 1  |
| I.1.1.    | <i>Câncer de Mama.....</i>                                                                                 | 1  |
| I.2       | Laminina.....                                                                                              | 3  |
| I.2.1     | <i>Peptídeos Bioativos da Laminina-111.....</i>                                                            | 4  |
| I.3       | Peptídeos Radiomarcados.....                                                                               | 5  |
| I.4       | Radionuclídeos.....                                                                                        | 6  |
| I.4.1     | <i>Iodo Radioativo.....</i>                                                                                | 8  |
| I.4.2     | <i>Tecnécio.....</i>                                                                                       | 8  |
| I.4.2.1   | <i>Tricarbonil [<math>^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3</math>]<math>^{+}</math>.....</i> | 9  |
| I.5       | Conceito de radiofármacos.....                                                                             | 10 |
| I.6       | Justificativa.....                                                                                         | 10 |
| II        | OBJETIVO GERAL.....                                                                                        | 12 |
| II.1      | Objetivos Específicos.....                                                                                 | 12 |
| III       | MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                    | 13 |
| III.1     | Material.....                                                                                              | 13 |
| III.2     | Métodos.....                                                                                               | 15 |
| III.2.1   | <i>Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS).....</i>                                                     | 15 |
| III.2.2   | <i>Purificação e Caracterização de Peptídeos.....</i>                                                      | 16 |
| III.2.2.1 | <i>Purificação dos peptídeos.....</i>                                                                      | 17 |
| III.2.2.2 | <i>Espectrometria de Massas.....</i>                                                                       | 17 |
| III.2.3   | <i>Radiomarcção dos Peptídeos Sintetizados.....</i>                                                        | 18 |
| III.2.3.1 | <i>Purificação do material radiomarcado.....</i>                                                           | 20 |
| III.2.3.2 | <i>Estudos de estabilidade dos peptídeos radiomarcados.....</i>                                            | 20 |
| III.2.3.3 | <i>Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.....</i>                                       | 21 |
| III.2.4   | <i>Determinação do coeficiente de partição (CP) dos peptídeos radiomarcados.....</i>                       | 21 |
| III.2.5   | <i>Interação dos peptídeos radiomarcados às proteínas séricas.....</i>                                     | 22 |

|           |                                                                                                                |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| III.2.6   | <b><i>Avaliação da interação e internalização dos peptídeos radiomarcados às células tumorais.....</i></b>     | 23 |
| III.2.6.1 | <i>Cultura de células de tumor de mama.....</i>                                                                | 23 |
| III.2.6.2 | <b><i>Avaliação da interação e internalização dos peptídeos radiomarcados com as células tumorais.....</i></b> | 24 |
| III.2.7   | <b><i>Modelo Animal.....</i></b>                                                                               | 25 |
| III.2.7.1 | <i>Animais.....</i>                                                                                            | 25 |
| III.2.7.2 | <i>Inoculação das células tumorigênicas MDA-MB-231.....</i>                                                    | 26 |
| III.2.7.3 | <i>Estudos de Biodistribuição.....</i>                                                                         | 26 |
| III.2.8   | <b><i>Análise estatística.....</i></b>                                                                         | 28 |
| IV        | <b>RESULTADOS OBTIDOS.....</b>                                                                                 | 29 |
| IV.1      | <b>Resultados com <sup>131</sup>I.....</b>                                                                     | 29 |
| IV.2      | <b>Resultados com <sup>99m</sup>Tc.....</b>                                                                    | 42 |
| IV.2.1    | <b>Síntese e Caracterização dos Peptídeos.....</b>                                                             | 42 |
| IV.2.2    | <b>Radiomarcagem dos Peptídeos.....</b>                                                                        | 44 |
| IV.2.2.1  | <b><i>Perfis cromatográficos obtidos para o peptídeo <b>HYIGSR</b></i></b>                                     | 46 |
| IV.2.2.2  | <b><i>Perfis cromatográficos obtidos para o peptídeo <b>HYIKVAV</b></i></b>                                    | 48 |
| IV.2.3    | <b>Estudo da estabilidade dos peptídeos radiomarcados.....</b>                                                 | 50 |
| IV.2.3.1  | <b><i>Radiocromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa.....</i></b>                               | 51 |
| IV.2.4    | <b>Determinação do coeficiente de partição (CP) dos peptídeos radiomarcados.....</b>                           | 54 |
| IV.2.5    | <b>Estudo da interação dos peptídeos radiomarcados às proteínas séricas.....</b>                               | 55 |
| IV.2.6    | <b>Avaliação da ligação e internalização dos peptídeos radiomarcados com as células tumorais.....</b>          | 55 |
| IV.2.7    | <b>Estudo de biodistribuição.....</b>                                                                          | 57 |
| V         | <b>DISCUSSÃO.....</b>                                                                                          | 59 |
| V.1       | <b>Definição dos fragmentos peptídicos propostos.....</b>                                                      | 59 |
| V.2       | <b>Utilização dos radionuclídeos <sup>131</sup>I e <sup>99m</sup>Tc.....</b>                                   | 60 |
| V.2.1     | <b><i>Estudo da influência dos solventes na determinação do rendimento radioquímico da marcação.....</i></b>   | 61 |

|      |                                                                                                                 |    |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| V.3  | <b><i>Determinação da estabilidade dos peptídeos radiomarcados.....</i></b>                                     | 62 |
| V.4  | <b><i>Determinação da lipofilicidade e da ligação às proteínas séricas dos peptídeos radiomarcados.....</i></b> | 63 |
| V.5  | <b><i>Avaliação da interação <i>in vitro</i> dos peptídeos radiomarcados com as células tumorais.....</i></b>   | 64 |
| V.6  | <b><i>Estudo de biodistribuição.....</i></b>                                                                    | 65 |
| VI   | <b><i>CONCLUSÕES.....</i></b>                                                                                   | 67 |
| VII  | <b><i>RESUMO.....</i></b>                                                                                       | 68 |
| VIII | <b><i>ABSTRACT.....</i></b>                                                                                     | 70 |
| IX   | <b><i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</i></b>                                                                   | 72 |

## **I. INTRODUÇÃO**

### **I.1. Câncer**

O câncer é um dos principais desafios para a saúde pública, em razão de sua elevada incidência, mortalidade e impacto sobre os sistemas de saúde, estando somente atrás das doenças cardiovasculares. Atualmente, o câncer é responsável por aproximadamente 16,8% dos óbitos (Bray et.al., 2024). Esse crescimento é reflexo do envelhecimento populacional associado a fatores de risco como tabagismo, consumo de álcool e alimentos ultraprocessados, sedentarismo e poluição atmosférica (Chen et.al., 2023).

Trata-se de uma doença caracterizada por alterações genéticas e epigenéticas que conferem às células capacidade de proliferação descontrolada, evasão de mecanismos supressores de crescimento, resistência à morte celular, indução de angiogênese, invasão tecidual e disseminação metastática. Como consequência, o câncer permanece entre as principais causas de morte prematura em todo o mundo (Nascimento & Otoni, 2020).

Neste contexto, o impacto do câncer é extremamente relevante. Estima-se que em 2050 haverá mais de 35 milhões de novos diagnósticos de câncer, um crescente de 77% em comparação aos 20 milhões de casos estimados em 2022 (Bray et.al., 2024). Bray e colaboradores ainda demonstraram que um milhão de crianças perderam suas mães, em 2020, por causa do câncer de mama ou de colo do útero (Bray et.al., 2024).

#### ***I.1.1. Câncer de Mama***

Os tumores de mama são o segundo tipo de câncer mais frequente na população mundial, apresentando alta taxa de mortalidade, sendo que o gênero feminino é o mais acometido por esta neoplasia (INCA., 2024).

De acordo com as estatísticas mundiais do Globocan (estatística de câncer global), somente em 2022, os casos de câncer de mama atingiram 2,2 milhões com 666mil óbitos pela doença (Felay et al., 2022).

Somente no Brasil, para o ano de 2024 foram estimados 73.610 novos casos, o que representa 66,54 casos a cada 100 mil mulheres. De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), houve 18 mil mortes, por causa do câncer de mama, no país (INCA, 2024).

Muitos são os fatores que podem influenciar na ocorrência de tumores de mama, como incidência de radiações nocivas, idade, peso e taxas hormonais (Kashyap et al., 2022). Além disso, um conjunto complexo de alterações moleculares está envolvido no processo do desenvolvimento tumoral (Koya, Ibrahim., 2025).

Embora avanços expressivos tenham sido alcançados nas últimas décadas em prevenção, rastreamento, diagnóstico precoce e tratamento, o câncer de mama ainda responde por elevada mortalidade feminina (WHO, 2022). Isso não decorre apenas da incidência da doença, mas devido à sua natureza heterogênea. Por essa razão, a classificação molecular passou a ser muito importante na compreensão da doença e na definição de estratégias terapêuticas mais precisas (Colavito et al., 2014).

Os principais subtipos moleculares do câncer de mama incluem os tumores Luminal A, Luminal B, HER2-positivo e triplo negativo. Entre eles, os subtipos luminais são os mais frequentes e expressam receptores hormonais (Eroles et al., 2012). O subtipo Luminal A destaca-se por sua alta prevalência e por seu melhor prognóstico quando comparado aos demais subtipos (Nascimento & Otoni, 2020). Ainda assim, esse perfil mais favorável não elimina sua relevância clínica, pois a doença pode apresentar recorrência, progressão e disseminação metastática (Nascimento & Otoni, 2020), justificando a necessidade em desenvolver abordagens terapêuticas direcionadas a esse contexto. Por outro lado, o triplo negativo é o tipo mais agressivo e possui altas taxas de proliferação e metástases com mau prognóstico e ausência de receptores hormonais (Machado Brandão-Costa et al., 2020).

Na presente Tese foram avaliadas duas linhagens celulares de câncer de mama, MDA-MB-231 e MCF-7. Estas linhagens são as mais utilizadas em pesquisas por representarem os tipos de câncer de mama mais presentes na população, com características celulares de invasão e expressão gênicas

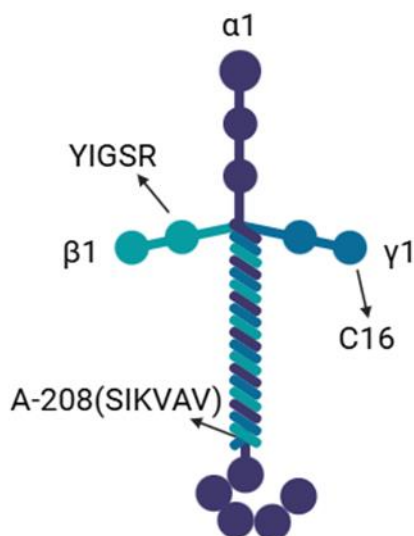
diferentes, sendo as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 as que apresentam um melhor e um pior prognóstico, respectivamente. A MCF-7 possui características de células mamárias anormais, que estão em contato direto com o lúmen dos ductos mamários e é classificada como Luminal A. O subtipo Luminal A expressa receptores de estrogênio e progesterona (Mendonça et al., 2024). A MDA-MB-231 é classificada como Triplo Negativo e apresenta um maior grau de invasão se comparada à MCF-7. Possui pouca expressão de diferenciação luminal e uma alta proliferação. São, normalmente, carcinomas do tipo ductal invasor, com uma alta capacidade de diferenciação metaplásica e medular, relacionados a um pior prognóstico (Machado Brandão-Costa et al., 2020).

Além das alterações adquiridas pelas células tumorais, o microambiente onde elas se encontram também desempenha um importante papel no processo carcinogênico. Dentre os componentes que fazem parte deste microambiente, a matriz extracelular tem uma importância relevante por conter moléculas regulatórias que podem estimular a progressão tumoral (N.Desai et al., 2025). Entre as moléculas que integram a matriz extracelular, podemos citar os colágenos do tipo I, III, IV, V e XI, proteoglicanos de sulfato heparano (HSPGs) e de sulfato de condroitina (CSPGs), e as glicoproteínas, como as lamininas (Brassart-Pasco et al., 2020).

## **I.2. Laminina**

Entre o epitélio e o tecido conjuntivo, a matriz extracelular forma a lâmina basal, estrutura delgada constituída principalmente por moléculas de lamininas (N.Desai et al., 2025). A laminina é composta por três cadeias polipeptídicas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  sendo descritas até o momento 16 isoformas de lamininas. Entre elas a laminina-111, um heterodímero composto pelas cadeias  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  e  $\gamma 1$  (**Figura 1**), que foi associado com adesão celular, secreção de proteases, diferenciação e proliferação celular e metástases em células tumorais (Nonnast et al., 2025). Parte desta regulação se dá através da modulação da expressão gênica, resultado da sinalização celular dependente da interação de proteínas da matriz extracelular com receptores (Mendonça, 2024). Processos como mudanças conformacionais ou clivagem por proteases promovem a liberação de peptídeos

biologicamente ativos (Kikkawa et al., 2013).



**Figura 1.** Laminina-111 e seus peptídeos bioativos.

### ***1.2.1 Peptídeos Bioativos da Laminina-111***

As várias atividades biológicas estimuladas pela laminina-111, tanto em células normais quanto em células neoplásicas, despertaram o interesse em estudar os diferentes sítios ativos da molécula.

Nomizu et al. (1997) realizaram varreduras sistemáticas na molécula de laminina-111 a procura de sequências biologicamente ativas. Ao todo, sintetizaram 560 peptídeos derivados das três cadeias da laminina-111 ( $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  e  $\gamma 1$ ). Depois de sintetizados, os peptídeos foram avaliados em relação à atividade de adesão celular. Dos 560 peptídeos, apenas 51 foram identificados como possíveis sequências biologicamente ativas (Hozumi et al., 2012; Hayashi et al., 2021). Posteriormente, por meio de experimentos adicionais, peptídeos da laminina-111 foram caracterizados como moduladores da progressão de tumores malignos (Hayashi et al., 2021).

Um peptídeo avaliado que apresentou atividade biológica foi o YIGSR localizado na cadeia  $\beta 1$  interna da laminina-111, perto da intersecção cruciforme (Figura 1). A sequência do peptídeo específico do sítio funcional da laminina-111 foi identificada como CDPGYIGSR, entretanto os estudos realizados por

Mokotoff et al. (1997) demonstraram que a atividade do pentapeptídeo YIGSR era equivalente a sequência completa e estava relacionada com a inibição da angiogênese em diversos tipos de tumores (Kikkawa et al., 2013; Jha & Moore., 2024).

Como representante da cadeia  $\alpha 1$  da laminina-111 temos o peptídeo bioativo IKVAV (Figura 1) que se encontra acima do domínio globular (Tashiro et al., 1989). Este fragmento promove adesão e migração celular, tendo um papel importante no crescimento tumoral, metástase, secreção de protease e angiogênese em diversos tipos de tumores (González-Pérez et al., 2022; Jha & Moore., 2024).

Desta forma, para entendermos o papel dessas sequências peptídicas no contexto do câncer de mama, os peptídeos foram radiomarcados.

### **I.3. Peptídeos Radiomarcados**

Peptídeos radiomarcados tornaram-se muito importante na Medicina Nuclear e Oncologia nos últimos anos (Hesham et al., 2021; Malik 2025). Sondas com base em peptídeos radiomarcados representam a base molecular para imagem *in vivo* e terapia com radiofármacos com alta especificidade, devido à alta afinidade dos peptídeos para receptores superexpressos em tumores (Sobral et al., 2020; Fuscaldi et al., 2021).

A atividade anticancerígena de diferentes peptídeos é atribuída a uma variedade de mecanismos que restringem o crescimento de tumores, entre os quais: i) inibição da angiogênese; ii) interações proteína-proteína iii) antagonistas peptídicos que podem preferencialmente se ligar a um receptor específico, etc (Bahar et al., 2025; Wu et al., 2026). Devido a estas características, a utilização direta de peptídeos como agentes para o entendimento e/ou tratamento do câncer vem aumentando consideravelmente nos últimos anos.

Além disso, peptídeos apresentam diversas vantagens em relação às proteínas: tamanho reduzido, facilidade de síntese e modificação, fácil conjugação com radionuclídeos, boa tolerância a condições adversas de marcação, maior afinidade de ligação para receptores tumorais, cinética

favorável (rápida depuração sanguínea de tecidos não alvos e maior fixação no tecido tumoral), capacidade de penetração no tumor e de ser incorporado em vetores e nanopartículas (Sobral et al., 2020).

A escolha do radionuclídeo a ser utilizado depende ainda de suas propriedades físicas e nucleares (meia-vida física, energia característica e tipo de emissão radioativa). As características dos radioisótopos devem ser combinadas às propriedades de biodistribuição e especificidade dos radiofármacos por determinados órgãos e tecidos, de modo a possibilitar a aplicação estrutural, funcional ou até mesmo bioquímica relacionadas à presença de diversas condições patológicas, tais como tumores (Witney & Blower., 2021).

#### **I.4. Radionuclídeos**

Radionuclídeos são isótopos radioativos dos elementos químicos que apresentam núcleo instável devido ao excesso de energia. A liberação deste excesso de energia é chamada de decaimento radioativo ou desintegração radioativa e a radiação (energia) pode ser emitida como uma radiação corpuscular (partícula alfa [ $\alpha$ ]; partícula beta menos [ $\beta^-$ ]; partícula beta mais ou pósitron [ $\beta^+$ ]) ou como uma onda eletromagnética (raios gama [ $\gamma$ ]). Essas emissões ocorrem até que o núcleo do radionuclídeo alcance a estabilidade (Zhang et al., 2025).

Cada radionuclídeo apresenta algumas características físicas próprias. Entre elas: o tempo de meia-vida física ( $T_{1/2}$  física), o qual é definido como o tempo necessário para que a atividade inicial seja reduzida pela metade, e esta propriedade é única para cada radionuclídeo; o tipo de emissão de radiação, que pode ser um ou mais tipos; a energia característica de cada emissão e a intensidade com que se apresenta (Zhang et al., 2025). Em conjunto com essas características está a forma de obtenção dos radionuclídeos, que pode ser através de reatores nucleares, cíclotrons e geradores. Todas essas características definirão a escolha daqueles que melhor atendam aos interesses das áreas clínica e de pesquisa (Abbasi et al., 2019).

Considerando as características físicas e de produção, a tabela abaixo resume os principais radionuclídeos utilizados na área clínica (Tabela 1).

**Tabela 1** - Características físicas dos radionuclídeos mais utilizados na área clínica.

| Radionuclídeo     | T <sub>1/2</sub> física | Tipo de emissão (energia, intensidade)                      | Produção  |
|-------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------|
| <sup>123</sup> I  | 13,2 h                  | γ (159 KeV, 83%)                                            | Cíclotron |
| <sup>131</sup> I  | 8,02 d                  | β <sup>-</sup> (192 KeV, 89%)<br>γ (365 KeV, 81%)           | Reator    |
| <sup>99m</sup> Tc | 6 h                     | γ (140 KeV, 89%)                                            | Gerador   |
| <sup>18</sup> F   | 109,7 min               | β <sup>+</sup> (634 KeV, 97%)                               | Cíclotron |
| <sup>11</sup> C   | 20,3 min                | β <sup>+</sup> (961 KeV, 99,8%)                             | Cíclotron |
| <sup>67</sup> Ga  | 78,3 h                  | γ (93, 185 e 300 KeV, 17-39%)                               | Cíclotron |
| <sup>111</sup> In | 67,3 h                  | γ (171,245 KeV, ~90%)                                       | Cíclotron |
| <sup>177</sup> Lu | 6,65 d                  | β <sup>-</sup> (497 Kev, ~100%)<br>γ (113 e 208 Kev, 6-11%) | Reator    |

<sup>123/131</sup>I (iodo-123/131); <sup>99m</sup>Tc (tecnécio-99 metaestável); <sup>18</sup>F (flúor-18); <sup>11</sup>C (carbono-11) <sup>67</sup>Ga (gálio-67) <sup>111</sup>In (índio-111) <sup>177</sup>Lu (lutécio-177) (Abbasi et al.,2019; Oliveira et al., 2019, Silva et al., 2020)

Dentre os elementos da Tabela 1, ênfase será dada ao iodo (<sup>131</sup>I) e o tecnécio (<sup>99m</sup>Tc), que foram utilizados no presente trabalho.

#### **1.4.1. Iodo radioativo**

O elemento químico iodo apresenta diferentes isótopos radioativos. Os principais são: iodo-123, 124, 125 e 131, apesar de haver outros. Uma importante característica química do iodo é a sua volatilidade, o que pode trazer

problemas relacionados à radioproteção. Porém, o uso de formas não voláteis, como iodeto de sódio (NaI) em pH básico, evita este problema.

O radioisótopo, iodo-131 ( $[^{131}\text{I}]\text{NaI}$ ), apresenta  $T_{1/2}$  de 8,04 dias com decaimento por emissão  $\beta^-$  (192 keV – 89%), seguida por três emissões  $\gamma$  (364 keV – 81%; 637 keV – 7%; 284 keV – 6%). Ele é produzido em reator nuclear por fissão do urânio-235 ( $^{235}\text{U}$ ) e se apresenta na forma de  $[^{131}\text{I}]\text{NaI}$ , uma solução límpida, incolor e com alta pureza radionuclídica (Sobral et al., 2020).

O iodo-131 é o radionuclídeo de maior uso clínico tanto na detecção e tratamento de doenças tireoidianas quanto na radiomarcagem de diversos traçadores com aplicabilidade em diferentes doenças (Durante et al. 2019; Sobral et al., 2020). Sua escolha para o presente estudo foi em razão da disponibilidade e do  $T_{1/2}$  de oito dias, possibilitando que estudos de estabilidade de longo prazo fossem realizados, além do potencial terapêutico. É importante pontuar que a química dos radionuclídeos de iodo é semelhante entre si, permitindo a translação do iodo-131 para o iodo-123, sem que haja comprometimento no processo de radioiodinação para sua utilização em imagens por SPECT.

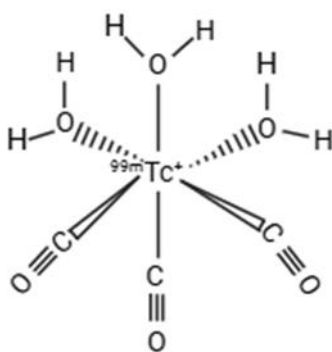
#### ***1.4.2. Tecnécio***

Moléculas marcadas com Tc-99m foram introduzidas em meados da década de 1960 e ainda representam quase 80% de todos os estudos diagnósticos realizados na Medicina Nuclear (IAEA., 2017).

A presença do aminoácido histidina nos peptídeos propostos possibilita a marcação com o radionuclídeo Tc-99m, através da formação do complexo tricarbonil (Waibel et al., 1999, Sobral et al., 2022). O elevado índice de utilização de moléculas radiomarcadas com Tc-99m é resultado das propriedades físicas e químicas ideais deste radionuclídeo, tais como: meia-vida física de 6,01 h, decaimento por emissão de radiação gama pura de baixa energia (140 keV) e praticidade para obtenção do radioisótopo a partir de um sistema gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m ( $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) (Duatti.,2020).

#### ***1.4.2.1. Tricarbonil [ $^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3$ ] $^+$***

Trata de um complexo no qual três posições de coordenação do metal são ocupadas por CO e as demais posições são ocupadas por três moléculas de água (**Figura 2**).



**Figura 2.** Fórmula da estrutura do complexo tricarbonil.

No complexo tricarbonil metálico, as moléculas de água coordenadas ao metal apresentam caráter relativamente lábil, podendo ser substituídas por ligantes com maior capacidade doadora de elétrons. O anel imidazólico da histidina possui átomos de nitrogênio com pares de elétrons livres capazes de atuar como ligantes coordenantes. Assim, ocorre uma reação de substituição de ligantes, na qual as moléculas de água são deslocadas pela coordenação do nitrogênio imidazólico ao centro metálico. Essa substituição é favorecida pela maior estabilidade do complexo metal–histidina em comparação ao complexo hidratado inicial. (Waibel et al., 1999; Sobral et al., 2022).

### **1.5. Conceito de radiofármacos**

Radiofármacos são complexos que possuem em sua constituição dois componentes, sendo um radionuclídeo (elemento radioativo) e outro de interesse biológico (elemento não radioativo) utilizados para o diagnóstico e a terapia de doenças humanas (Schreuder et al., 2019; Zhang et al., 2025). Sua

aplicabilidade na medicina nuclear perfaz aproximadamente 90% para uso diagnóstico e o restante para terapia radionuclídica (Saha, 2010).

Na concepção de um radiofármaco, a molécula é a primeira escolha e se baseia no direcionamento preferencial ou na participação em um processo fisiológico em um dado órgão (Schreuder et al. 2019). Em seguida, escolhe-se o radionuclídeo que apresenta as melhores características para a radiomarkação e cuja emissão de radiação seja detectada por equipamentos de imagem com dose mínima aos pacientes, no caso de uso para o diagnóstico por imagem. Além disso, é essencial que seja seguro, não tóxico e apirogênico na administração em humanos (Saha, 2010).

A presença do aminoácido tirosina nos peptídeos permite a incorporação de iodo por substituição eletrofílica aromática no anel fenólico da tirosina, por meio de métodos diretos e rápidos de marcação. (Sobral et al., 2023). Como mencionado anteriormente, dentre os isótopos radioativos de iodo, o [<sup>131</sup>I]NaI pode ser usado tanto para o diagnóstico quanto para a terapia radionuclídica devido a emissão de raios-γ e de partículas β<sup>-</sup>, respectivamente, além de possuir altas purezas química e radionuclídica, ser de fácil marcação e não gerar impedimentos estéricos na ligação do complexo com o alvo tumoral (Durante et al., 2019).

## **I.6. Justificativa**

O presente trabalho busca avaliar a síntese e a otimização da radiomarkação de peptídeos biologicamente ativos das cadeias α1 (IKVAV) e β1(YIGSR) da laminina-111 com os radioisótopos I-131 e Tc-99m com o intuito de avaliar a interação desses fragmentos radiomarcados com as células tumorais, relacionadas ao câncer de mama (MCF-7) e (MDA-MB 231), o tipo mais prevalente entre as mulheres e com uma das maiores taxas de mortalidade. As implicações dos resultados são amplas. No campo da química e física foram confrontadas as dificuldades da radiomarkação e do direcionamento das cadeias peptídicas no alvo desejado (células tumorais). No campo da medicina, o melhor entendimento da proliferação das células, neste caso, relacionadas ao câncer de mama, poderá trazer avanços para o tratamento desta doença com relevância

clínica que acomete milhões de pessoas no mundo inteiro. Além disso, este estudo favoreceu a integração interdisciplinar e multiprofissional de pesquisadores da área de química, física e oncologia.

## II. OBJETIVO GERAL

Sintetizar e padronizar a radiomarcção de peptídeos da laminina-111 com I-131 e Tc-99m, bem como realizar estudos comparativos *in vitro* e *in vivo* destes radiopeptídeos para potencial aplicação em câncer de mama.

### 1.1. II.1. Objetivos Específicos

- ✓ Sintetizar, purificar e caracterizar os peptídeos propostos derivados da laminina-111;
- ✓ Otimizar protocolos de marcação com os radioisótopos I-131 e Tc-99m para obter maior eficiência de marcação;
- ✓ Otimizar protocolos de purificação dos peptídeos radiomarcados;
- ✓ Determinar o coeficiente de partição dos peptídeos radiomarcados;
- ✓ Determinar a estabilidade dos peptídeos radiomarcados em salina e soro;
- ✓ Quantificar a ligação dos complexos sintetizados às proteínas séricas;
- ✓ Avaliar a afinidade de ligação dos peptídeos radiomarcados às células tumorais relacionadas ao câncer de mama.
- ✓ Avaliar a internalização dos peptídeos radiomarcados nas células tumorais relacionadas ao câncer de mama.
- ✓ Avaliar a biodistribuição dos peptídeos radiomarcados em animais controle e modelo de câncer de mama.

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### III.1 Material

Todos os N-9-fluorenilmetiloxycarbonil (Fmoc)-L aminoácidos foram provenientes da Bachem (Califórnia). Os aminoácidos utilizados nas sínteses peptídicas foram: Fmoc-Tyr (tBu); Fmoc-Ile; Fmoc-Lys (Boc); Fmoc-Val; Fmoc-Ala; Fmoc-Gly; Fmoc-Ser (tBut); Fmoc-Arg (Pmc) e Fmoc-His (1-Trt). As resinas empregadas nas sínteses foram Fmoc-Val-Wang; Fmoc-Arg-Wang com grau de substituição de 0,70 mmol/g para ambas as resinas. Os reagentes e solventes empregados nas sínteses e nos processos de radiomarcção e caracterização dos peptídeos foram todos de grau analítico e de procedência Merck, Aldrich, Baker, Fluka e Pierce. Seguem abaixo, os principais reagentes, solventes, meios de cultura, bem como os equipamentos utilizados em diferentes etapas do desenvolvimento, conforme abaixo:

- 20% 4-metilpiperidina/ 80% dimetilformamida (DMF);
- 60% acetonitrila (ACN) / 40% H<sub>2</sub>O;
- Ácido trifluoroacético (TFA);
- Água destilada;
- Diclorometano (DCM);
- Diisopropilcarbodiimida (DIC);
- Dimetilformamida (DMF);
- Éter gelado;
- Fenol;
- Metanol (MeOH);
- n-hidroxibenzotriazol (HOBt);
- Ninidrina;
- Piridina;
- Solução de iodeto de sódio [<sup>131</sup>I]NaI;
- Cloramina T;
- Metabisulfito de sódio;
- Solução de pertecnetado de sódio Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>;
- Carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)

- Tartarado de sódio e potássio ( $C_4H_4O_6NaK$ )
- Borohidreto de sódio ( $NaBH_4$ )
- Monóxido de carbono (CO)
- 95% acetonitrila (ACN) / 5%  $H_2O$
- 0,9% NaCl (Cloreto de sódio)
- 50% etanol / 50% $H_2O$
- 70% etanol / 30% NaCl
- Ácido clorídrico (HCl) 0,1 M;
- Agitador vórtex Genius 3 (Ika®, EUA);
- Água para injeção
- Banho-Maria
- Balança analítica;
- Calibrador de doses CRC 25W – Capintec;
- Centrífuga Minispin® plus (EppendorfAG, Hamburgo, Alemanha);
- Contador gama automático Wizard'3 2480 (Perkin Elmer);
- Cuba de vidro, pinças, canetas, tesouras, pipetas automáticas;
- Estufa 515 (Fanem);
- Etanol
- Fitas Whatmann 3MM e Fitas TLC/SG de 10 cm;
- Cartucho Sep-Pak C18 Classic (Waters)
- Linhagem celular MDA-MB-231;
- Linhagem celular MCF-7;
- Meio de cultura DMEM - F12;
- Meio de cultura RPMI – 1640;
- N-octanol;
- Radio-TLC imaging scanner AR-2000 (Eckert & Ziegler, Alemanha).
- Soro Fetal Bovino (SFB);
- Tampão PBS;
- Tripsina

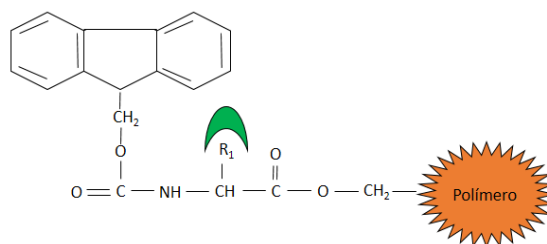
## III.2 Métodos

### III.2.1. Síntese de Peptídeos em Fase Sólida (SPFS)

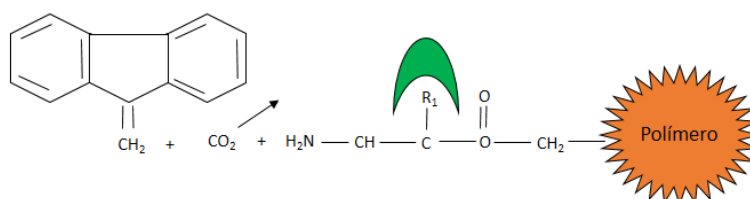
Os peptídeos propostos YIKVAV, YIGSR derivados da laminina-111 e seus análogos HYIKVAV e HYIGSR, respectivamente foram sintetizados pela estratégia Fmoc/tBut (Fields & Noble, 1990). No caso da estratégia Fmoc/tBut, o ciclo sintético se inicia com a remoção do grupo Fmoc em 20% 4-metilpiperidina em DMF (2 e 20 min), o que libera o amino grupo na forma desprotonada para a fase seguinte de acoplamento. A etapa de introdução do aminoácido é usualmente feita com a mistura acilante DIC/HOBt. O excesso molar empregado dos Fmoc-AA e dos agentes acilantes ficou em torno de 2,5 vezes em relação à quantidade de amino grupos na resina. O término da reação de acoplamento é monitorado pelo método qualitativo de ninidrina (Kaiser, et al., 1970) que detecta a presença de amino grupos livres (**Figura 3**). Caso se obtenha um teste positivo (coloração azul ou marrom), repete-se o acoplamento do aminoácido, geralmente nas mesmas condições do acoplamento anterior. Após o encerramento desta etapa, reinicia-se o próximo ciclo até o acoplamento de todos os resíduos de aminoácidos. A síntese dos peptídeos propostos foi feita a partir do aminoácido carboxi-terminal em direção ao o aminoácido N-terminal.

A clivagem final do peptídeo da resina e a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais foram efetuadas em uma única etapa de tratamento em uma mistura contendo TFA:água (95:5%). Após esta clivagem, a resina foi lavada com éter gelado e o peptídeo extraído com solução aquosa de ácido acético (5%, v/v, para os solúveis). Após esta lavagem, o extrato ácido foi liofilizado para se obter, geralmente, um pó amorfo.

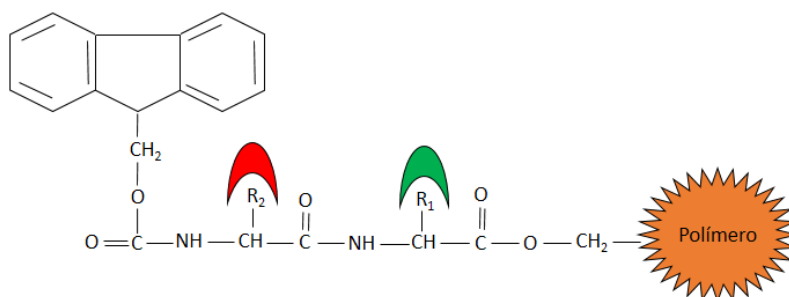
**1ª Etapa: Acoplamento do primeiro aminoácido**



**2ª Etapa: Desproteção do grupo protetor (Fmoc)**

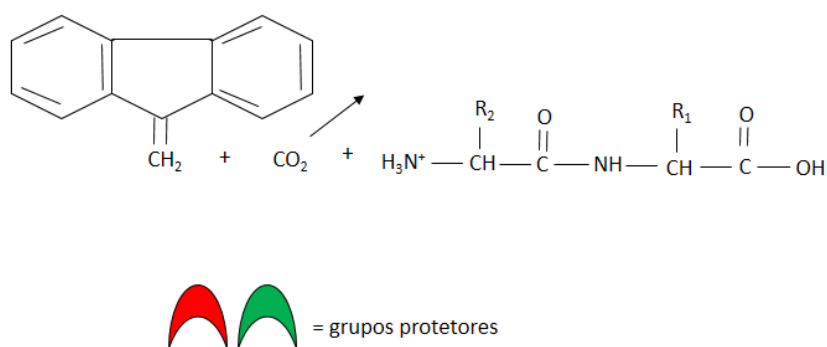


**3ª Etapa: Acoplamento do aminoácido subsequente**



**4ª Etapa: Desproteção do grupo protetor (Fmoc)**

**5ª Etapa: Clivagem do peptídeo da resina [TFA:água (95:5%)]**



**Figura 3.** Etapas de obtenção de um dipeptídeo em fase sólida pela estratégia Fmoc.

### III.2.2. Purificação e caracterização dos peptídeos

A purificação e a caracterização dos peptídeos foram realizadas no departamento de Biofísica da UNIFESP.

### *III.2.2.1. Purificação dos peptídeos*

A etapa de purificação dos peptídeos foi realizada após a liofilização, e envolveu a utilização dos sistemas analítico e preparativo de cromatografia. Todos os peptídeos foram purificados em um sistema de CLAE-FR de Waters, modelo Delta Prep 4000, ao qual é acoplado a um detector UV-VIS (modelo 2487), coletor de frações LKB-Frac-200 da Pharmacia e registrador Servogor 120. De um modo geral foi utilizada uma coluna semi-preparativa e/ou preparativa Vydac C18 (10 x 250 mm ou 25 x 250 mm, respectivamente, diâmetro dos poros de 300 Å).

As condições cromatográficas foram:

Sistema de Solventes: A: 0,1% TFA:H<sub>2</sub>O; B: 0,1% TFA-60% ACN:H<sub>2</sub>O

Gradiente: 0,33% B/min

Fluxo: 10 mL/min

Comprimento de onda: 220 nm.

### *III. 2.2.2. Espectrometria de Massas*

Os peptídeos foram caracterizados por um sistema de LC/ESI-MS constituído por um modelo de separação com um injetor automático com capacidade para 120 amostras Alliance modelo 2695, um detector do tipo UV-Vis modelo 2486, e um detector de massas da Micromass modelo 3100, todos da Waters Associates, Milford, MA, EUA. Os peptídeos foram dissolvidos em 60% ACN:H<sub>2</sub>O (v/v), na concentração de 1 mg/mL.

As condições experimentais foram:

Coluna: Waters Nova-Pak C18 (2,1×150 mm), 60 Å, 3,5 µm

Solventes: A: 0,1% TFA:H<sub>2</sub>O; B: 0,1% TFA - 60%ACN:H<sub>2</sub>O

Gradiente: 0,33% B/min

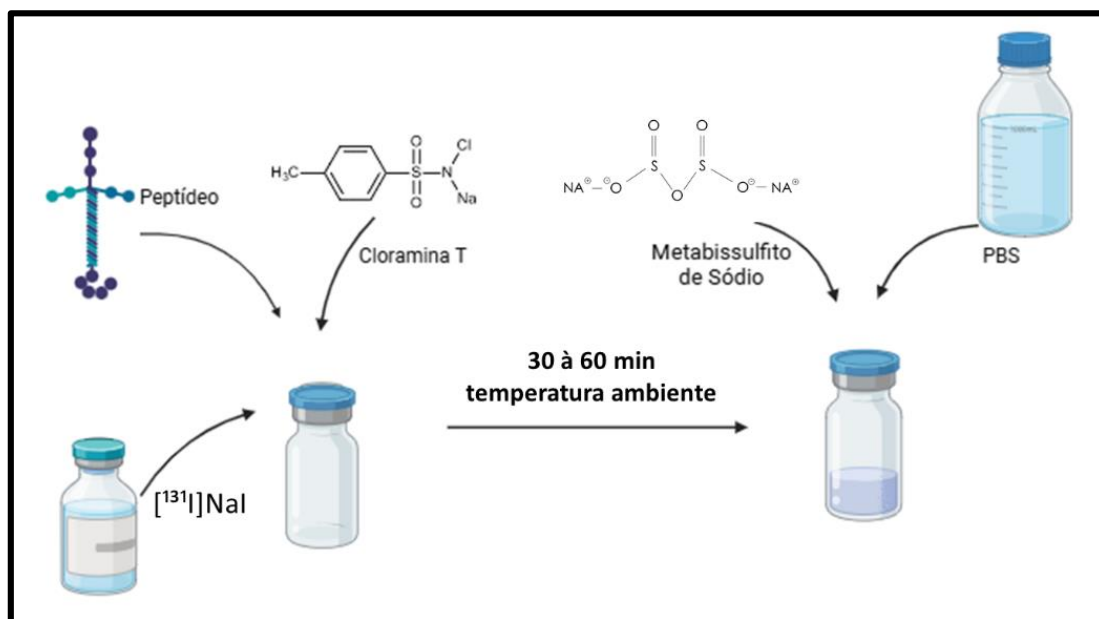
Fluxo: 10 mL/min

Comprimento de onda: 220 nm.

### III.2.3. Radiomarcacão dos Peptídeos Sintetizados

A radiomarcacão dos peptídeos foi feita com os radioisótopos  $^{131}\text{I}$  (YIKVAV e YIGSR) ou  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  (HYIKVAV e HYIGSR).

Experimentalmente, na radiomarcacão com  $^{131}\text{I}$ , o peptídeo (~50  $\mu\text{g}$ ), previamente solubilizado em tampão fosfato 0,2 M (pH = 7,4), foi incubado na presença de aproximadamente 0,5 mCi (18,5 MBq) de  $^{131}\text{I}]\text{NaI}$  e 5  $\mu\text{L}$  de cloramina T (1 mg/mL). Após 30-60 s, foram adicionados 5  $\mu\text{L}$  de metabisulfito de sódio (2 mg/mL) para inativar a cloramina T. Ao meio reacional foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de tampão PBS (pH 7,4), totalizando um volume de aproximadamente 550  $\mu\text{L}$  (Figura 4).



**Figura 4.** Etapas da radiomarcacão dos peptídeos com  $^{131}\text{I}]\text{NaI}$ .

Para a radiomarcacão com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , foi realizado o procedimento descrito por Waibel et al., 1999, que consiste nos seguintes passos:

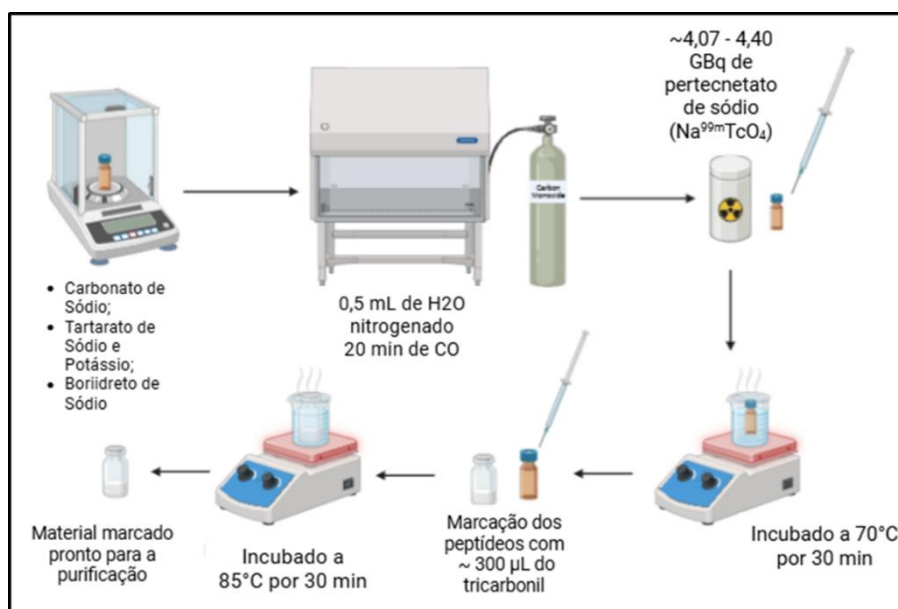
a) Síntese do  $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$

Em um frasco de vidro lacrado contendo inicialmente 4 mg de carbonato de sódio, 20 mg de tartarato de sódio e potássio e 7,0 mg de boriidreto de sódio, diluídos em 0,5 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  nitrogenada, foi adicionado monóxido de carbono

(CO) por 20 min. Em seguida, adicionou-se 1 mL de pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ) com atividade de 110-120 mCi (4,07 – 4,40 GBq) em banho maria a 70°C, durante 30 min. Em seguida, a reação foi resfriada à temperatura ambiente e o pH ajustado para 7,0 com 250 µL de HCl 1 M.

b) Marcação da histidina da sequência peptídica com o  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

A reação da radiomarcagem dos peptídeos foi realizada inicialmente com 0,20-0,60 mg dos peptídeos contendo o aminoácido histidina e aproximadamente 300 µL do  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  previamente preparado. A mistura foi aquecida à 85° C por 30 min (**Figura 5**).



**Figura 5.** Etapas da síntese do  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$  e radiomarcagem dos peptídeos com  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$

Em ambos os processos de radiomarcagem, a avaliação do rendimento radioquímico e da pureza radioquímica foi realizada através de análises cromatográficas, cromatografia em camada delgada (CCD) ascendente e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa.

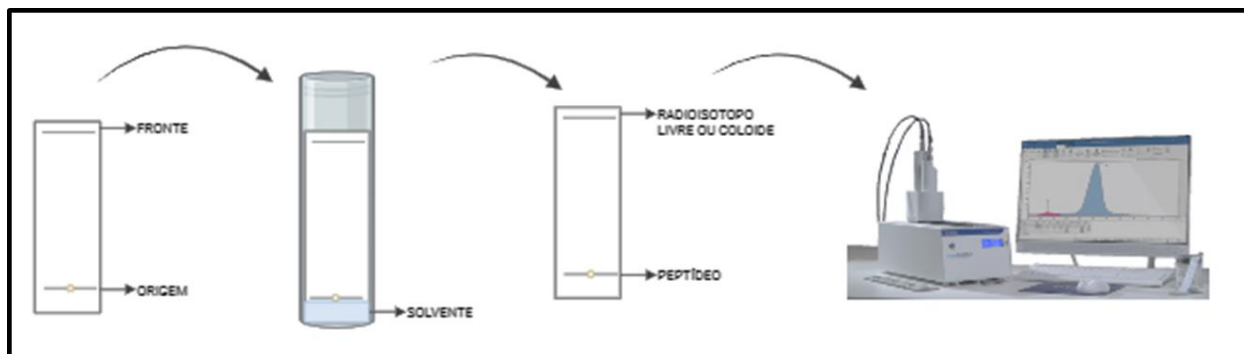
### III.2.3.1. Purificação do material radiomarcado.

A purificação dos peptídeos radiomarcados com  $^{99m}\text{Tc}$  foi realizada por meio de extração em fase sólida, utilizando cartucho Sep-Pak C18 Classic. Previamente à etapa de purificação, o cartucho foi submetido a um processo de pré-condicionamento, que consistiu na passagem sequencial de 5 mL de etanol 50% (v/v) em água, seguida de passagem de ar para remoção do excesso de solvente, e posterior aplicação de 5 mL de água para injeção, finalizando-se novamente com passagem de ar.

Para a purificação, a solução contendo o peptídeo radiomarcado foi aplicada ao cartucho previamente condicionado. Em seguida, realizou-se a lavagem do cartucho com 3 mL de água para injeção, sendo o eluato coletado em frasco de descarte, correspondente à fração contendo  $^{99m}\text{Tc}$  livre. A eluição do peptídeo radiomarcado retido no cartucho foi realizada com 1 mL de solução de etanol 70% (v/v) em solução salina, sendo esta fração coletada como produto purificado. Adicionalmente, a atividade radioativa remanescente no cartucho foi quantificada, sendo atribuída à fração coloidal de  $^{99m}\text{Tc}$ .

### III.2.3.2. Estudos de estabilidade radioquímica dos peptídeos radiomarcados

A estabilidade radioquímica foi avaliada à temperatura ambiente e sob refrigeração até 72 horas após seu preparo para as marcações com  $^{131}\text{I}$  ou à temperatura ambiente até 4 horas para as marcações com  $^{99m}\text{Tc}$ . Para tal finalidade, a pureza radioquímica foi quantificada por CCD (**Figura 6**).



**Figura 6.** Semeadura da amostra na fita TLC/SG de 10 cm para análise cromatográfica.

A estabilidade dos fragmentos radiomarcados também foi avaliada em soro a 37 °C. Experimentalmente, em um eppendorf contendo 475 µL de soro foram adicionados 25 µL (~1.96 MBq) dos peptídeos radiomarcados. As amostras foram incubadas sob leve agitação (500 rpm) por 1, 4 e 24 h para as marcações com <sup>131</sup>I ou 1, 2, 3 e 4 para as marcações <sup>99m</sup>Tc. Em seguida, em uma alíquota de 100 µL da amostra, foram adicionados 200 µL de ACN 100% gelada para a precipitação das proteínas séricas e posterior análises cromatográficas, em triplicada, utilizando a técnica de CCD.

#### *III.2.3.3. Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa*

O controle de qualidade por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) foi realizado para determinar os tempos de retenção (Rt) e a pureza radioquímica (PRQ) dos peptídeos radiomarcados. A CLAE-FR foi realizada no UHPLC Infinity II 1290, equipado com detector UV-visível, injetor automático, forno de coluna e sistema de dados Open Lab ECM acoplado ao detector de radiação. Para as análises foi utilizada a coluna analítica de fase reversa Phenomenex Kinetex® C18 (100 mm x 3 mm; 2,6 µm) mantida a 25 °C.

As condições cromatográficas foram:

Sistema de Solventes: A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O; B: 0,1% TFA/ACN;

Gradiente: 5% B/min;

Fluxo: 1 mL/min;

Comprimento de onda: 220 nm;

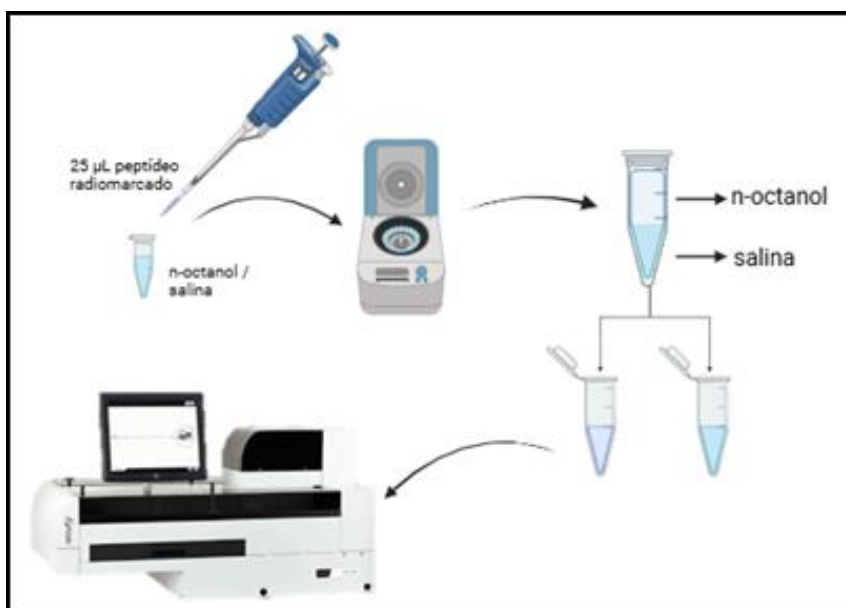
Detector de radiação.

#### **III.2.4. Determinação do coeficiente de partição (CP) dos peptídeos radiomarcados**

O coeficiente de partição (CP) dos peptídeos radiomarcados foi determinado conforme descrito por Sobral et al., (2020). Experimentalmente, adicionou-se 25 µL de cada peptídeo radiomarcado a um tubo contendo 500 µL de n-octanol e 500 µL de solução salina 0,9%. Agitou-se o tubo e, com a finalidade de separar as duas fases (aquosa e oleosa), as amostras foram

centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos. Em seguida, cuidadosamente, foram coletados 100 µL da fase oleosa e da fase aquosa para contagem em contador automático tipo poço (**Figura 8**). O coeficiente de partição foi determinado pela divisão da atividade contida na fase oleosa pela fase aquosa e expresso em Log P:

$$CP = \log \left[ \frac{\text{fase orgânica (cpm)}}{\text{fase aquosa (cpm)}} \right]$$



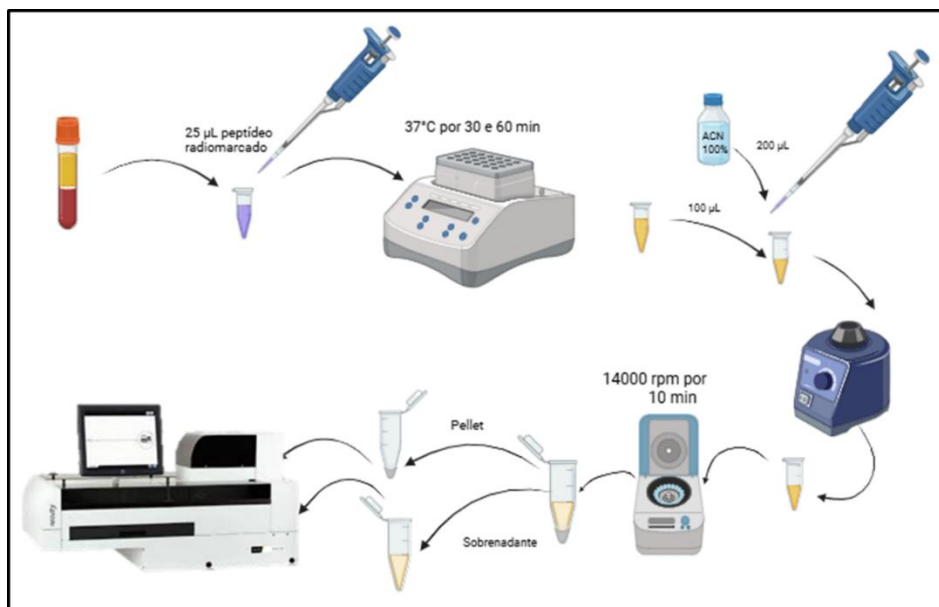
**Figura 8.** Etapas da determinação do coeficiente de partição dos radiopeptídeos.

### ***III.2.5. Interação dos peptídeos radiomarcados às proteínas séricas***

A porcentagem de ligação às proteínas séricas dos peptídeos radiomarcados foi avaliada pelo método de precipitação proteica com ACN 100% gelada. Para este estudo foram adicionados 25 µL dos peptídeos radiomarcados a 175 µL de soro humano e incubados à 37°C por 30 e 60 min. Para a precipitação das proteínas, foram adicionados 200 µL de ACN 100% gelada. Após agitação por um minuto em vórtex, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos, em centrífuga Minispin® plus. Após centrifugação, o sobrenadante foi separado do pellet. Em seguida, as radioatividades do pellet e do sobrenadante foram contadas em contador gama automático (**Figura 7**). A

porcentagem de ligação dos peptídeos radiomarcados às proteínas séricas foi determinada por meio do cálculo:

$$\text{Ligação às proteínas séricas (\%)} = \frac{\text{precipitado (cpm)}}{(\text{precipitado} + \text{sobrenadante})(\text{cpm})} \times 100$$

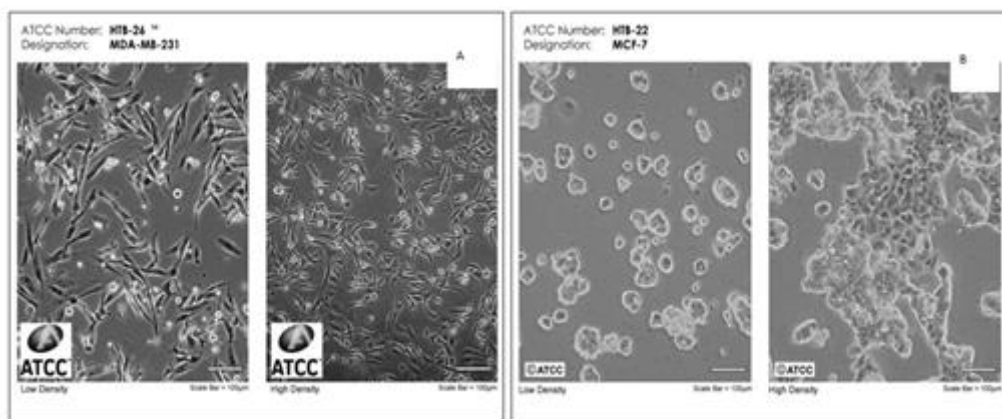


**Figura 7.** Etapas da avaliação da ligação dos radiopeptídeos às proteínas séricas.

### ***III.2.6. Avaliação da interação e internalização dos peptídeos radiomarcados às células tumorais.***

#### ***III.2.6.1. Cultura de células de tumor de mama***

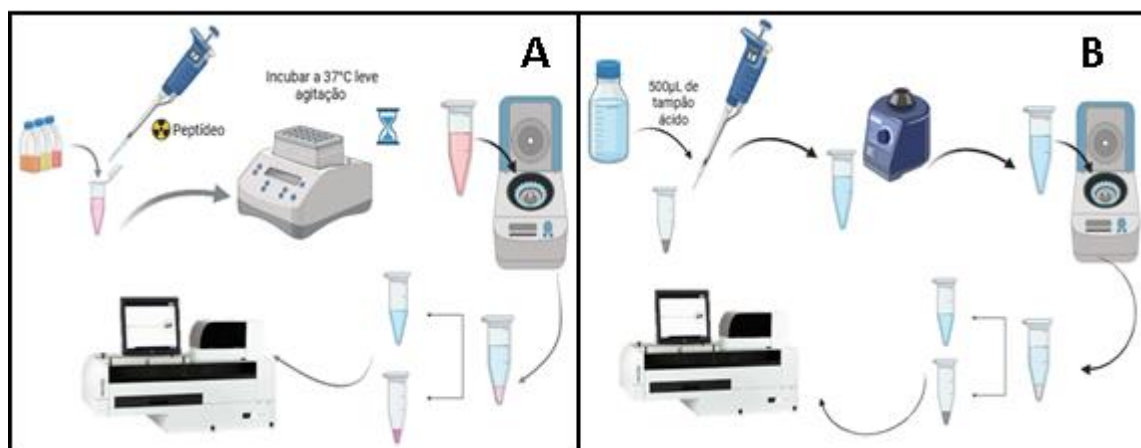
Células (MDA-MB-231 e MCF-7) (**Figura 9**) de tumor de mama foram cultivadas em meio RPMI ou DMEM-F12 (Gibco, Gaithersburg, MD), respectivamente, com 10% de soro bovino fetal (Invitrogen) a 37° C (5% CO<sub>2</sub>), onde alcançaram a confluência de 80%. O meio foi removido e as células incubadas com tripsina (0,04% de tripsina / EDTA). As células foram centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos e ressuspensas em meio Dulbecco's para a realização dos experimentos a seguir.



**Figura 9.** Culturas das linhagens MDA-MB-231 **(A)** com baixa e alta densidades e MCF-7 **(B)** com baixa e alta densidades. (ATCC, 2021)

### *III.2.6.2. Avaliação da ligação e internalização dos peptídeos radiomarcados com as células tumorais.*

Em sextuplicada, foi adicionado  $2 \times 10^6$  células (MDA-MB-231 ou MCF-7) em 450 µL de meio de cultura RPMI ou DMEM-F12 respectivamente e uma alíquota de 25 µL dos radiopeptídeos. A avaliação da ligação e internalização dos peptídeos radiomarcados com as células foi realizada após a incubação a 37°C, com leve agitação (500 rpm), nos tempos de 1, 4 e 24 h para os peptídeos marcados com  $^{131}\text{I}$  ou de 1 e 2 horas para os peptídeos marcados com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Após o término de cada período de incubação, os eppendorfs foram centrifugados a 2000 rpm por 5 min. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados e as atividades dos pellets celulares e dos sobrenadantes foram mensuradas em contador gama automático Wizard2™ 3" 2480 (**Figura 10**).



**Figura 10.** Etapas da avaliação das frações ligada **(A)** e internalizada **(B)** às células tumorais.

A porcentagem da fração ligada às células tumorais foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Fração de ligação} = \frac{\text{atividade do pellet}}{\text{atividade do pellet} + \text{atividade do sobrenadante}} \times 100$$

Após a contagem da atividade, a internalização dos radiopeptídeos às células tumorais foi mensurada através da adição de 500 µL de tampão de lavagem ácida (0,2 M ácido acético em 0,5 M NaCl; pH 2,8) e mantido em temperatura ambiente por 5 min para remover os radiopeptídeos ligados à superfície celular. Os eppendorfs foram centrifugados novamente a 2000 rpm por 5 min e as atividades dos pellets celulares e dos sobrenadantes foram mensuradas em contador gama automático Wizard2™ 3" 2480 (Figura 10). A porcentagem da fração internalizada às células tumorais foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{Fração Internalizada} = \frac{\text{atividade no pellet}}{\text{atividade no pellet} + \text{atividade no sobrenadante}} \times 100$$

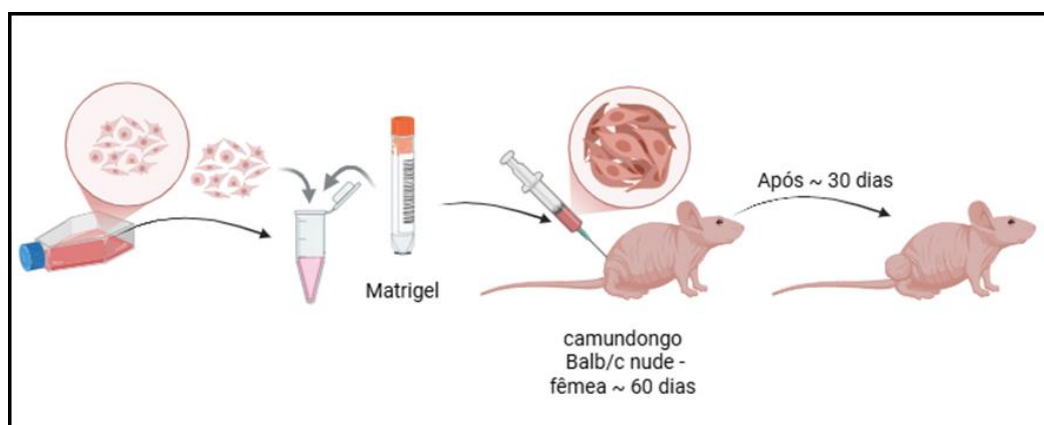
### **III.2.7. Modelo Animal**

#### **III.2.7.1. Animais**

Foram utilizados 27 camundongos fêmeas da linhagem Balb/c nude (~60 dias e ~25 g) provenientes do biotério do Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia do Hospital Israelita Albert Einstein (CEUA 3740-19 e 6015-24), acondicionados em caixas moradia de acrílico (40 x 34 x 17 cm) forrado com maravalha, em número aproximado de 3-5 animais por caixa, em ciclo claro-escuro de 12 h e controle de temperatura (22 ± 1° C). A maravalha foi trocada duas vezes por semana e os animais tiveram livre acesso à água e ração para roedores.

### III.2.7.2. Inoculação das células tumorígenicas MDA-MB-231

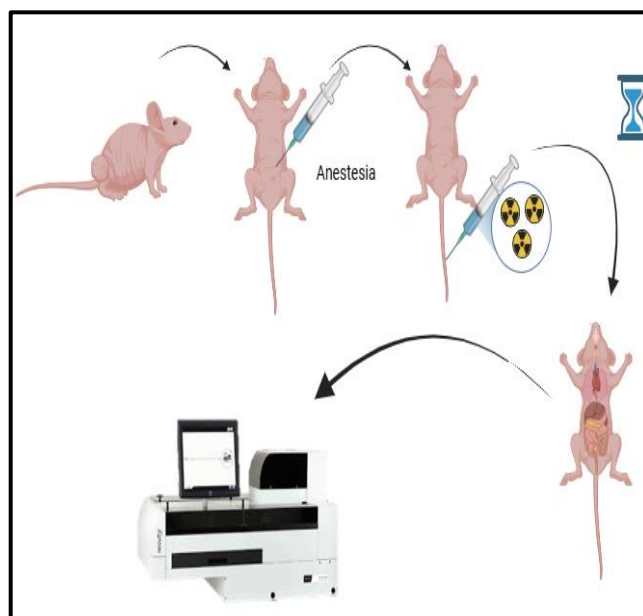
O modelo de câncer de mama foi realizado apenas com as células MDA-MB-231. Alíquotas de aprox. 100-150  $\mu\text{L}$ , contendo  $1 \times 10^7$  células MDA-MB-231 e matrigel, foram inoculadas pela via subcutânea no flanco posterior direito dos camundongos. Após a inoculação das células, esperou-se um crescimento tumoral entre 3-4 semanas (**Figura 11**). Os animais com tumor de mama foram utilizados nos estudos de biodistribuição.



**Figura 11.** Inoculação das células tumorais (MDA-MB-231) em camundongos Balb/c nude fêmeas.

### III.2.7.3. Estudos de Biodistribuição

Os camundongos, com peso entre 25-30g, foram anestesiados via aplicação intraperitoneal de uma injeção combinada de ketamina e xilazina. Em seguida, os peptídeos radiomarcados foram administrados através da veia caudal para posterior estudo de biodistribuição (**Figura 12**). A biodistribuição dos peptídeos radiomarcados em órgãos de interesse foram quantificados em contador gama nos tempos de 15 min e 120 min.



**Figura 12.** Injeção do peptídeo radiomarcado, após a tempo determinado realização da biodistribuição em animal controle e o modelo.

Para melhor esclarecimento e definição do número de animais que foram utilizados no presente projeto, seguem abaixo os grupos experimentais (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Grupos Experimentais para biodistribuição.

| Grupos                                              | Administração<br>(via caudal)             | Biodistribuição (min) |     |
|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------|-----|
|                                                     |                                           | 15                    | 120 |
| Animais normais<br>(controle)                       | Peptídeos radiomarcados<br>com I-131 (2)  | 3                     | 3   |
| Animais normais<br>(controle)                       | Peptídeos radiomarcados<br>com Tc-99m (2) | -                     | 3   |
| Animais induzidos ao<br>modelo de câncer de<br>mama | Peptídeo radiomarcado<br>com I-131 (2)    | 6                     | 6   |
| Animais induzidos ao<br>modelo de câncer de<br>mama | Peptídeo radiomarcado<br>com Tc-99m (2)   | -                     | 6   |

### ***III.2.8. Análise estatística***

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada pelo programa GraphPad Prism (versão 8.0.1). As médias de três ou mais grupos foram comparadas por Análise de Variância (one-way ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os valores de  $p < 0,05$ .

## IV. RESULTADOS OBTIDOS

### IV.1. Resultados com <sup>131</sup>I

Amino Acids (2024) 56:1  
https://doi.org/10.1007/s00726-023-03379-x

#### ORIGINAL ARTICLE



## Assessment of bioactive peptides derived from laminin-111 as prospective breast cancer-targeting agents

Fernanda Ferreira Mendonça<sup>1</sup> · Danielle Vieira Sobral<sup>1</sup> · Ana Claudia Ranucci Durante<sup>1</sup> · Ana Cláudia Camargo Miranda<sup>2</sup> · Jorge Mejia<sup>2</sup> · Daniele de Paula Faria<sup>3</sup> · Fabio Luiz Navarro Marques<sup>3</sup> · Marycel Figols de Barboza<sup>2</sup> · Leonardo Lima Fuscaldi<sup>1</sup> · Luciana Malavolta<sup>1</sup>

Received: 20 October 2023 / Accepted: 24 December 2023 / Published online: 29 January 2024  
© The Author(s) 2024

### Abstract

Breast cancer remains a pressing public health issue primarily affecting women. Recent research has spotlighted bioactive peptides derived from laminin-111, implicated in breast tumor development. Remarkably, the sequences IKVAV, YIGSR, and KAFDITYVRLKF from the  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ , and  $\gamma 1$  chains, respectively, have garnered significant attention. This study aims to assess the potential of these radiolabeled peptides as targeting agents for breast cancer. The three peptides were synthesized using the Fmoc strategy, purified via reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC), and characterized through mass spectrometry. Iodine-131 (<sup>131</sup>I) radiolabeling was performed using the chloramine T method, exhibiting high radiochemical yield and stability for [<sup>131</sup>I]I-IKVAV and [<sup>131</sup>I]I-YIGSR. Conversely, [<sup>131</sup>I]I-KAFDITYVRLKF demonstrated low radiochemical yield and stability and was excluded from the biological studies. The lipophilicity of the compounds ranged from  $-2.12$  to  $-1.10$ . Serum protein binding assay for [<sup>131</sup>I]I-IKVAV and [<sup>131</sup>I]I-YIGSR reached  $\cong 48\%$  and  $\cong 25\%$ , respectively. Affinity for breast cancer cells was evaluated using MDA-MB-231 and MCF-7 tumor cell lines, indicating the affinity of the radiopeptides with these tumor cells. Ex vivo biodistribution profiles of the radiopeptides were assessed in the MDA-MB-231 breast tumor animal model, revealing tumor tissue accumulation, supported by a high tumor-to-contralateral muscle ratio and autoradiography. These results signify the effective penetration of YIKVAV and YIGSR into tumor tissue. Therefore, the synthesized  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  peptide fragments exhibit favorable characteristics as potential breast cancer-targeting agents, promising future exploration as radiopharmaceuticals for breast cancer.

**Keywords** Laminin 111-derived peptides · Targeting molecules · Radiolabeled peptides · Breast cancer

### Introduction

Cancer stands as a significant and urgent global public health concern. In 2020, the Global Cancer Observatory reported a staggering 9.2 million newly diagnosed cancer cases and 4.4 million cancer-related death among females. For women, breast cancer emerges as the predominant malignancy, accounting for around 2.3 million fresh instances (24.5%) and 682 thousand fatalities (15.5%). This prominence of breast cancer underscores a substantial challenge within the public health system, given its high mortality rate (Batiston et al. 2011; Ferlay et al. 2021).

The progression of tumorigenesis and subsequent tumor development involves an intricate interplay of molecular changes (Montor et al. 2018). In the context of breast cancer, uncontrolled cellular growth gives rise to proliferative potential, sustained angiogenesis, and metastatic

Handling editor: F. Albericio.

✉ Luciana Malavolta  
luciana.malavolta@gmail.com

<sup>1</sup> Department of Physiological Sciences, Santa Casa de São Paulo School of Medical Sciences, Rua Dr. Cesáreo Motta Jr. 61, São Paulo CEP 01221-020, Brazil

<sup>2</sup> Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo 05521-200, Brazil

<sup>3</sup> Laboratory of Nuclear Medicine (LIM-43), Department of Radiology and Oncology, Faculdade de Medicina FMUSP, Universidade de São Paulo, São Paulo 01246-903, Brazil

competence (Hanahan and Weinberg 2011). Beyond the inherent modifications in tumor cells, the surrounding microenvironment significantly contributes to the carcinogenic process. A prime example is furnished by the laminin family of glycoproteins, which are a pivotal component of the extracellular matrix. While critical for tissue morphogenesis and homeostasis, laminins influence tumor invasion, angiogenesis, and metastasis (Ponce et al. 2001; Bosman and Stamenkovic 2003; Hamill et al. 2009).

Laminin-111, comprising  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$ , and  $\gamma 1$  chains, is intricately linked to pivotal cellular processes, including adhesion, differentiation, proliferation, protease secretion, and metastasis within tumor cells. Additionally, bioactive peptides derived from laminin-111 have been identified as agents that influence the malignancy of tumors (Kikkawa et al. 2013; Otagiri et al. 2013).

Within the spectrum of biologically active peptides derived from laminin-111, a prominent role is assumed by the IKVAV peptide, sourced from the  $\alpha 1$  chain. This peptide engenders cell adhesion and migration, thereby wielding a pivotal influence on tumor growth, metastasis, protease secretion, and angiogenesis across various tumor types (Sweeney et al. 1991; Bresalier et al. 1995; He et al. 2015). Extracted from the  $\beta 1$  chain, the CDPGYIGSR fragment emerges as a key entity associated with angiogenesis inhibition in diverse tumor contexts. Remarkably, subsequent investigations have illuminated that even the truncated YIGSR sequence retains its biological efficacy (Tashiro et al. 1989; Ponce et al. 2003; De Souza Santos 2011). Finally, the KAFDITYVRLKF sequence, known as the C16 peptide, represents the  $\gamma 1$  chain and is associated with an indelible imprint on gene expression in cells originating from invasive ductal carcinoma of the breast (MDA-MB-231) (Mokotooff et al. 1997; Smuczek et al. 2017).

As outlined in the literature, the laminin-111-derived peptides IKVAV, YIGSR, and KAFDITYVRLKF exhibit specific interactions with cell membrane receptors, namely integrins  $\alpha_3\beta_1$  and  $\alpha_6\beta_1$ , 67 KD protein, and integrins  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_5\beta_1$ , respectively (Kikkawa et al. 2013). Notably, the expression of these receptors is upregulated on the surface of tumor cells compared to their physiological presence on normal cell surfaces (Schottelius and Wester 2009). This divergence in expression levels suggests a potential avenue for employing these receptors as targets and the associated peptides as targeting agents for therapeutic or diagnostic interventions at tumor sites.

In this context, the present study aims at assessing the viability of peptides derived from the  $\alpha 1$  (IKVAV),  $\beta 1$  (YIGSR), and  $\gamma 1$  (KAFDITYVRLKF) chains of laminin-111, radiolabeled with iodine-131 ( $^{131}\text{I}$ ), as prospective targeting agents for breast cancer.

## Materials and methods

### Peptides synthesis

The YIKVAV ( $\alpha 1$  chain), YIGSR ( $\beta 1$  chain), and KAFDITYVRLKF ( $\gamma 1$  chain) peptides were synthesized manually by Solid Phase Peptide Synthesis (SPPS) method, using the Fmoc strategy (Fields and Noble 1990), at 1.0 mmol scale on Wang resin (0.70 mmol/g). The amino acids and Wang resin were purchased from Bachem (Torrance, USA). The  $\alpha$ -amino group deprotection was carried out using a solution containing 2 M 4-methyl-piperidine in dimethylformamide (DMF), with stirring for 20 min, at room temperature. The coupling reaction was carried out using 2.5 excess of Fmoc-amino acid in the presence of 2.5 mM  $\text{N,N}'$ -diisopropylcarbodiimide (DIC)/2.5 mM hydroxybenzotriazole (HOBt) in a 1:1 (v/v) dichloromethane (DCM)/DMF mixture as a solvent system. Each coupling reaction was qualitatively verified using the ninhydrin test (Kaiser et al. 1970) after 2 h. At the end of the synthesis, a cleavage reaction was performed in a highly concentrated trifluoroacetic acid (TFA) solution.

### Peptides characterization

All reagents and solvents meet the American Chemical Society standards or high-performance liquid chromatography (HPLC) grade.

### Analytical and preparative RP-HPLC

The analyses and purification were conducted through RP-HPLC, using a C18 column (4.6  $\times$  150 mm; particle size of 5  $\mu\text{m}$ ; pore size of 300 Å). Mobile phase A consisted of 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , while mobile phase B was 0.1% TFA in 60:40 acetonitrile (ACN)/ $\text{H}_2\text{O}$ . The gradient profile for mobile phase B encompassed 5–95% in 30 min; flow rate of 1.0 mL/min for analytical purposes and 10.0 mL/min for purification purposes, with signal acquisition performed via a UV detector ( $\lambda = 220 \text{ nm}$ ).

### Liquid chromatography mass spectrometry (LC–MS)

A system consisting of a micromass platform LCZ spectrometer, a Waters Alliance HPLC, a Waters 996 Photodiode Array detector and a Compaq workstation was used to characterize the synthesized peptides. A Waters Nova-Pak C18 column (2.1  $\times$  150 mm; particle size of 3.5  $\mu\text{m}$ ; pore size of 60 Å) was employed, using the mobile phase A consisted of 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , while mobile phase B was 0.1% TFA in 60:40 ACN/ $\text{H}_2\text{O}$ . The gradient profile for mobile

phase B encompassed 5–95% in 30 min; flow rate of 0.4 mL/min. The detection was at 220 nm over a mass range of 500–3930 Da.

### Radiolabeling of peptides

The peptides were radiolabeled with  $^{131}\text{I}$  through the utilization of  $^{131}\text{I}$ NaI and the chloramine T technique, as previously described (Durante et al. 2019). The  $^{131}\text{I}$  was obtained as  $^{131}\text{I}$ NaI from Nordion (Ottawa, Canada) and distributed in Brazil by the *Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares* of the *Comissão Nacional de Energia Nuclear—IPEN-CNEN* (Sao Paulo, Brazil). Briefly, the procedure involved introducing aliquots of approximately 11–15 MBq of  $^{131}\text{I}$ NaI, with pH 7 for YIKVAV and 9–10 for YIGSR and KAFDITYVRLKF, and 3–5  $\mu\text{L}$  of 1 mg/mL (4.4 mM) chloramine T solution into a vial containing a 25  $\mu\text{g}$  aliquot (~36 nmol, 42 nmol and 17 nmol, respectively) of each peptide dissolved in a 0.1 M phosphate buffer solution (PBS) at pH 7.4. After 1 to 4 min, at room temperature, 5  $\mu\text{L}$  of a solution containing 2 mg/mL (0.01 M) sodium metabisulfite was added to interrupt the radioiodination reaction. Figure 1 shows the chemical structure of the peptides after the  $^{131}\text{I}$ -labeling process.

The radiolabeling efficiency of the  $^{131}\text{I}$ -peptides was evaluated through an ascending chromatography technique employing silica gel-coated plates on an aluminum base (TLC-SG). Various mobile phases were assessed to determine the peptide radiolabeling yield. Following standardization, the solvent system that yielded superior separation between the  $^{131}\text{I}$ -peptides and  $^{131}\text{I}$ NaI was constituted of 95:5 ACN/ $\text{H}_2\text{O}$  for  $^{131}\text{I}$ -YIKVAV and  $^{131}\text{I}$ -YIGSR, whereas for  $^{131}\text{I}$ -KAFDITYVRLKF the better mobile phase was 0.9% NaCl. After the chromatographic development, the distribution of radioactivity on the strip was determined using a radiation scanner. The retention factors ( $R_f$ ) of  $^{131}\text{I}$ NaI and  $^{131}\text{I}$ -peptides, along with the percentage of activity corresponding to the respective peaks, were ascertained.

The radiochemical yield was also assessed using RP-HPLC analyses. A C18 analytical column (3.0  $\times$  100 mm; 2.6  $\mu\text{m}$ ) maintained at 30  $^\circ\text{C}$  by a column oven was employed. The mobile phase A consisted of 0.1% TFA in  $\text{H}_2\text{O}$ , while mobile phase B comprised 0.1% TFA in ACN. The gradient profile for mobile phase B encompassed the following proportions: 3–10% (0–2 min), 10–30% (2–16 min), and 30–5% (16–22 min); flow rate of 1.0 mL/min, with signal acquisition being performed via both a UV detector ( $\lambda = 220$  nm) and a radioactivity detector. In the chromatographic analysis, the retention times ( $R_t$ ) corresponding to unlabeled peptides,  $^{131}\text{I}$ NaI, and  $^{131}\text{I}$ -peptides were determined.

### Radiochemical stability

The radiochemical stability of the radiopeptides was evaluated in two distinct environments: in saline ( $n = 3$ ), at room temperature and under refrigeration (4–8  $^\circ\text{C}$ ), by a period of 48 h after the radiolabeling, and in serum ( $n = 5$ ), at 37  $^\circ\text{C}$ , for up to 24 h after incubation. At predefined time intervals, aliquots were extracted and subjected to ascending chromatography, as previously detailed.

### Lipophilicity

The lipophilicity was evaluated according to established methods (Durante et al. 2019). Briefly, 25  $\mu\text{L}$  of each radiopeptide (0.6 MBq) were added into a blend of *n*-octanol (500  $\mu\text{L}$ ) and water (475  $\mu\text{L}$ ), and vortexing for 30 s, followed by centrifugation (5000 rpm) for 5 min ( $n = 5$ ). From both phases, 100  $\mu\text{L}$  aliquots were withdrawn and measured employing an automatic gamma counter. The lipophilicity was quantified as Log P value [Eq. (1)]:

$$P = \log \left[ \frac{\text{cpm}(\text{organic phase})}{\text{cpm}(\text{aqueous phase})} \right] \quad (1)$$

### Serum protein binding (SPB)

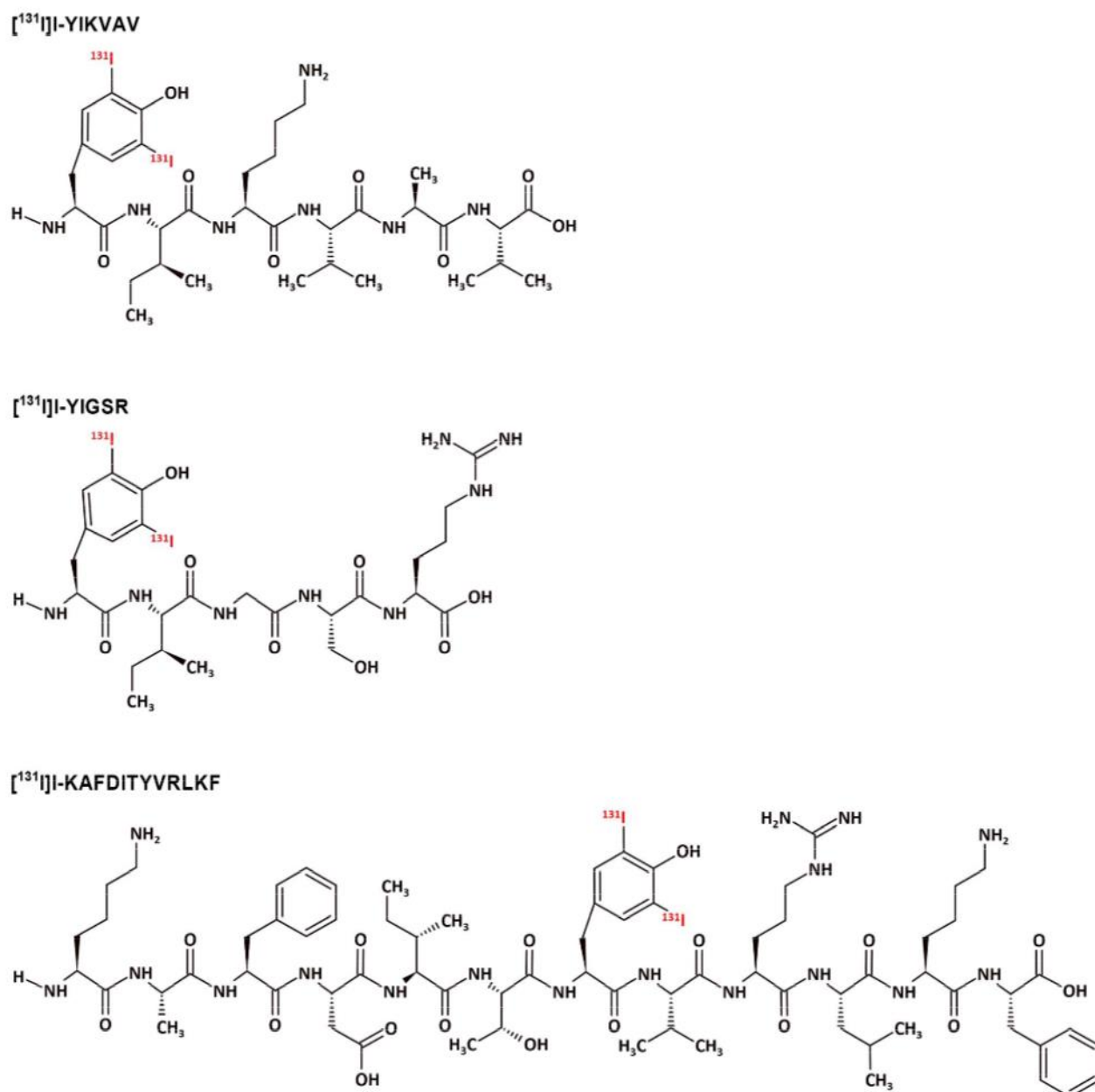
The percentage of radiopeptides bound to serum proteins was quantified according to the literature (Sobral et al. 2020). Briefly, 25  $\mu\text{L}$  of each radiopeptide (0.6 MBq) were added into 475  $\mu\text{L}$  of serum and incubated (37  $^\circ\text{C}$ ) under gentle agitation for 1 h ( $n = 5$ ). Subsequently, 1 mL of 0.6 M trichloroacetic acid (TCA) was added, vortexing for 1 min, and the samples were centrifuged (4000 rpm) for 10 min. The supernatant and the pellet were separated, and the radioactivity in each fraction was measured in an automatic gamma counter. The SPB percentage was calculated as [Eq. (2)]:

$$\text{SPB} [\%] = \frac{\text{cpm}(\text{pellet})}{\text{cpm}(\text{pellet} + \text{supernatant})} \times 100 \quad (2)$$

### Biological evaluation

#### Culture of breast cancer cells (MDA-MB-231 and MCF-7)

The human breast cancer cell lines were purchased from the *Banco de Células do Rio de Janeiro—BCRJ* (Rio de Janeiro, Brazil). The MDA-MB-231 and MCF-7 cells were cultured in RPMI-1640 and DMEM-F12, respectively,



**Fig. 1** <sup>131</sup>I-labeled YIKVAV, YIGSR, and KAFDITYVRLKF peptides

supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and 1% (v/v) antibiotics (penicillin and streptomycin). The cells were incubated in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, at 37 °C, and grown to a 90% confluence. Then, cells were trypsinized, centrifuged (1,500 rpm) for 5 min, and resuspended in their respective supplemented medium for the *in vitro* assays. For the development of the breast cancer animal model, MDA-MB-231 cells were resuspended in 1:1 matrigel:RPMI-1640 mixture.

#### Binding and internalization studies of the radiopeptides to MDA-MB-231 and MCF-7 tumor cells

In vials containing  $2 \times 10^6$  MDA-MB-231 or MCF-7 cells resuspended in supplemented medium (450 µL), 50 µL of the [<sup>131</sup>I]I-peptides (1.2 MBq) were added and incubated at 37 °C under gentle agitation (500 rpm) for 1, 4 and 24 h ( $n=5$  for each time interval). Subsequently, the vials were

centrifuged (5000 rpm) for 5 min and the supernatant was collected. The radioactivity of the cell pellet and supernatant was measured in an automatic gamma counter. The binding percentage was calculated as Eq. (3):

$$\text{Binding [\%]} = \frac{\text{cpm}(\text{pellet})}{\text{cpm}(\text{pellet} + \text{supernatant})} \times 100 \quad (3)$$

After that, the pellets were resuspended in 0.5 mL of acid buffer (0.2 mM acetic acid in 0.5 M NaCl solution; pH 2.8) and kept at room temperature for 5 min to remove radiopeptides bound to the cell membrane surface. Then, the vials were centrifuged (5000 rpm) for 5 min and the supernatant was collected. The radioactivity of the cell pellet and supernatant was measured in an automatic gamma counter. The internalization percentage was calculated as Eq. (4):

$$\text{Internalization [\%]} = \frac{\text{cpm}(\text{pellet})}{\text{cpm}(\text{pellet} + \text{supernatant})} \times 100 \quad (4)$$

### MDA-MB-231 breast tumor animal model

Female Balb/c nude mice ( $\approx 20$  g;  $\approx 8$  w) were supplied and maintained in the vivarium of the *Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia* of the *Hospital Israelita Albert Einstein* (Sao Paulo, Brazil), accredited by the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC) International. All procedures involving mice were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the *Hospital Israelita Albert Einstein* (protocol #3740/19).

Mice were subcutaneously inoculated into the right lower flank with 200  $\mu$ L of a solution containing  $1 \times 10^7$  MDA-MB-231 cells in a 1:1 matrigel:RPMI-1640 medium mixture. Tumors were allowed to grow in vivo for 30 days after inoculation or until reaching a diameter of 10 mm.

### Ex vivo biodistribution profile and autoradiography

The ex vivo biodistribution profiles of [ $^{131}$ I]I-YIKVAV and [ $^{131}$ I]I-YIGSR were determined after intravenous injection into MDA-MB-231 breast tumor-bearing ( $n=4$ ) and naive ( $n=3$ ) female Balb/c nude mice. Animals were anesthetized using ketamine–xylazine combination (100:10 mg/Kg) and euthanized at 15 and 120 min post-injection. Organs and tissues of interest were dissected, dried on filter paper, weighed, and measured using an automatic gamma counter. A standard dose with the same amount of radioactivity as injected into the mice was counted. The results were expressed as the percentage of injected dose per gram of tissue (%ID/g). After samples counting, the tumor and contralateral muscle were used for autoradiography as

previously described (de Paula Faria et al. 2023). Briefly, tissues were frozen and sliced at 30  $\mu$ m in a cryostat, then were exposed to a phosphor-imaging plate (BASMS-2325; Fujifilm, Japan) for 24 h at 21–25 °C. The plate was scanned using a Typhoon FLA 9500 plate reader (GE Healthcare, USA) with a pixel resolution of 100  $\mu$ m for qualitative analysis.

### Statistical analysis

Quantitative data were expressed as either “mean  $\pm$  standard deviation (SD)” (in vitro data) or “mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM)” (in vivo data). Pairs of groups were compared using the Student t-test. The means of three or more groups were compared by one-way Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey’s post hoc test. The statistical significance threshold for mean differences was set at 0.05.

## Results

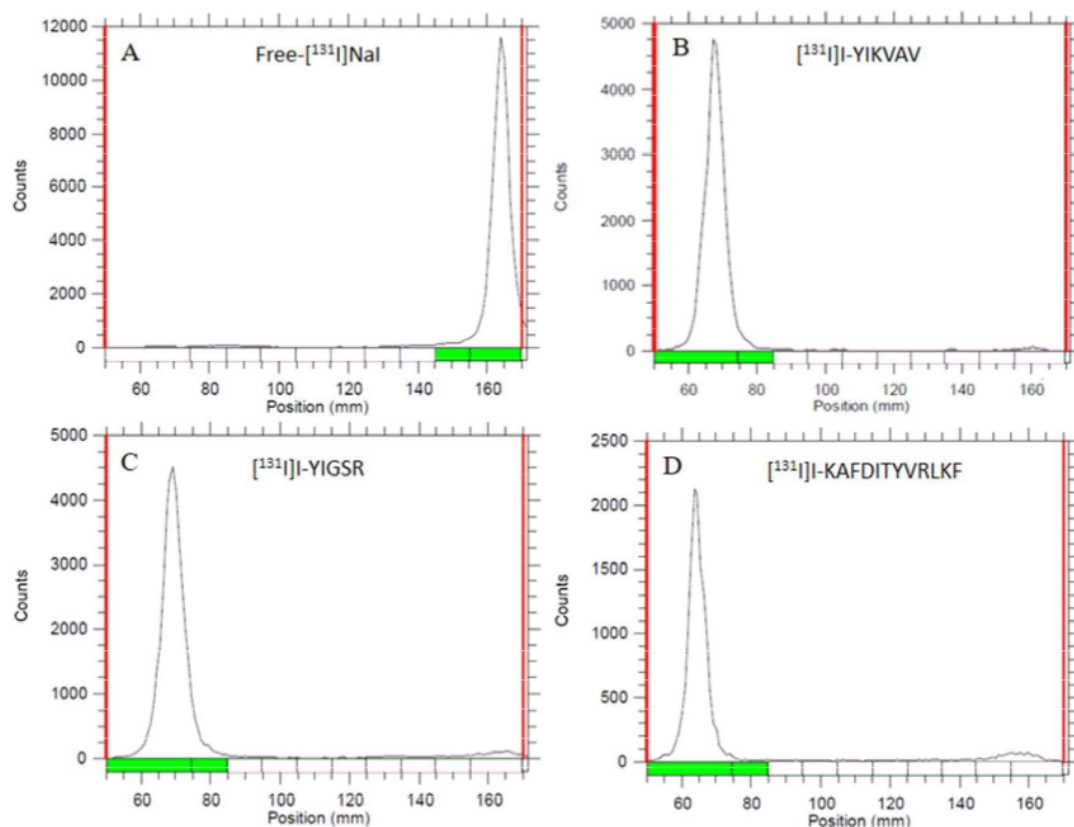
### Peptides synthesis

The synthesized YIKVAV ( $\alpha$ 1 chain), YIGSR ( $\beta$ 1 chain), and KAFDITYVRLKF ( $\gamma$ 1 chain) were obtained in approximately 70% yield. The theoretical molecular weights of 693.0 g/mol (YIKVAV), 596.0 g/mol (YIGSR), and 1501.0 g/mol (KAFDITYVRLKF) were confirmed by mass spectrometry.

### Radiolabeling of peptides and radiochemical stability

The three peptides were  $^{131}$ I-labeled with radiochemical yields of  $98 \pm 4\%$ ,  $93 \pm 6\%$ , and  $80 \pm 7\%$  for [ $^{131}$ I]I-YIKVAV (0.36 MBq/nmol), [ $^{131}$ I]I-YIGSR (0.31 MBq/nmol), and [ $^{131}$ I]I-KAFDITYVRLKF (0.76 MBq/nmol), respectively ( $n=10$ ), determined by TLC-SG chromatography (Fig. 2). In both chromatographic systems employed in this work, free [ $^{131}$ I]NaI migrates with the mobile phase to the top of the strip ( $R_f=0.9$ –1.0) and the radiolabeled peptide fragments remain at the origin of the strip ( $R_f=0.1$ –0.2), allowing an efficient separation between [ $^{131}$ I]I $^-$  and radiolabeled species. The RP-HPLC analysis (Fig. 3A) showed  $R_t$  of 15.60, 7.44, and 12.67 min for unlabeled YIKVAV, YIGSR, and KAFDITYVRLKF, respectively, while the  $R_t$  of the correspondent labeled compounds were 17.94 (Fig. 3B), 8.37 (Fig. 3C), and 15.32 min (Fig. 3D), respectively. Free [ $^{131}$ I] NaI showed  $R_t$  of 2.80 min.

The radiochemical stability of [ $^{131}$ I]I-YIKVAV, [ $^{131}$ I]I-YIGSR, and [ $^{131}$ I]I-KAFDITYVRLKF are summarized in Fig. 4. The [ $^{131}$ I]I-YIKVAV (Fig. 4A) and [ $^{131}$ I]I-YIGSR (Fig. 4B) presented suitable radiochemical stability in saline



**Fig. 2** Ascending radiochromatograms obtained in TLC strips using either 95:5 ACN/H<sub>2</sub>O solution for free [<sup>131</sup>I]NaI, [<sup>131</sup>I]-YIKVAV, and [<sup>131</sup>I]-YIGSR, or 0.9% NaCl solution for [<sup>131</sup>I]-KAFDITYVRLKF as eluents

and, only at 48 h post-radiolabeling, small reductions of  $\cong 10$  and 5%, respectively, were observed in the radiochemical purity. On the other hand, the radiochemical purity of [<sup>131</sup>I]-I-KAFDITYVRLKF (Fig. 4C) decreased by approximately 50% after 24 h, when maintained at room temperature or under refrigeration. The radiochemical stability was also evaluated in serum, and the results were similar to those in saline, i.e., [<sup>131</sup>I]-YIKVAV (Fig. 4A) and [<sup>131</sup>I]-YIGSR (Fig. 4B) were stable within 24 h, but [<sup>131</sup>I]-KAFDITYVRLKF (Fig. 4C) was unstable.

### Lipophilicity and serum protein binding (SPB)

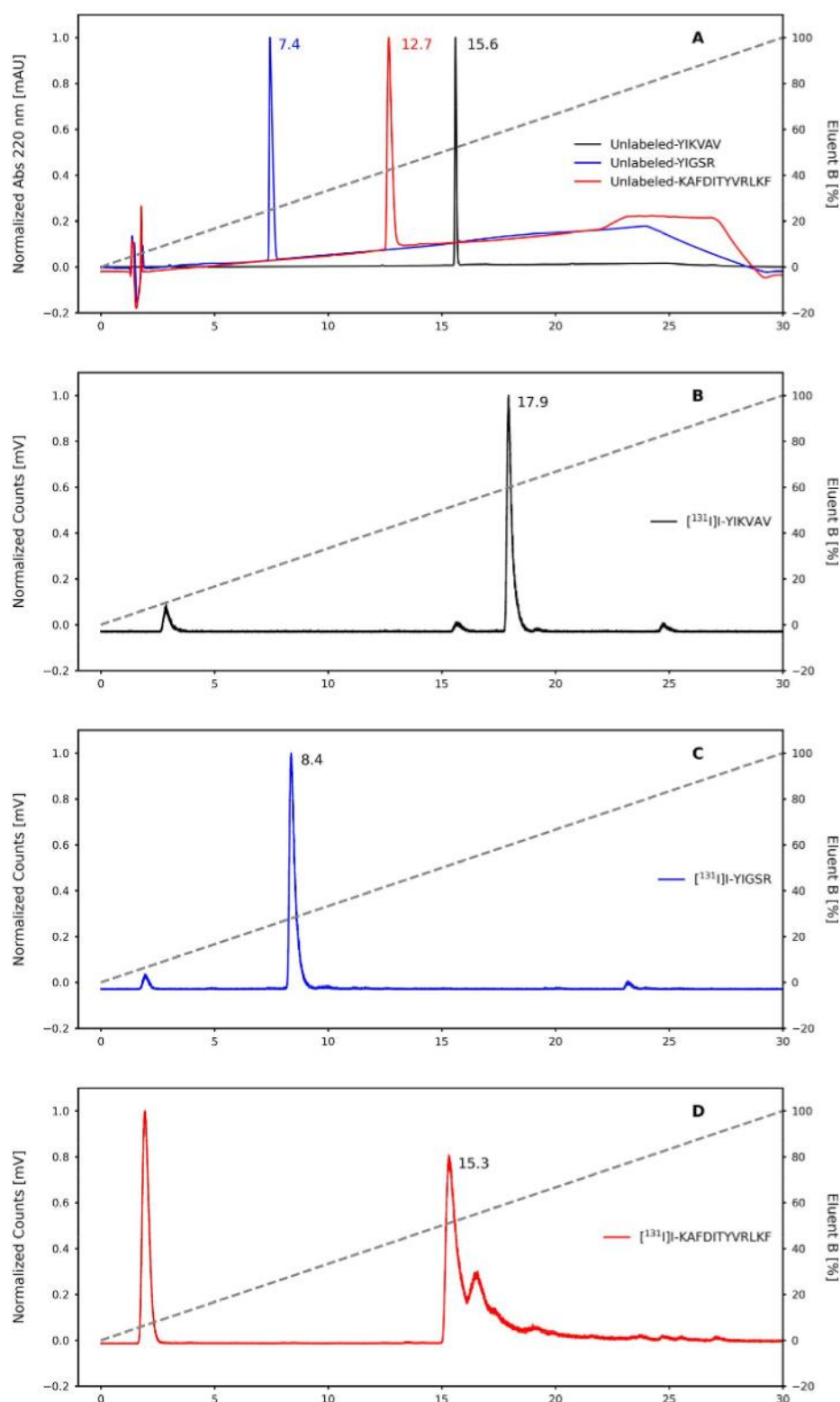
The lipophilicity, expressed as Log P, and the SPB percentage data are summarized in Table 1.

### Biological evaluation

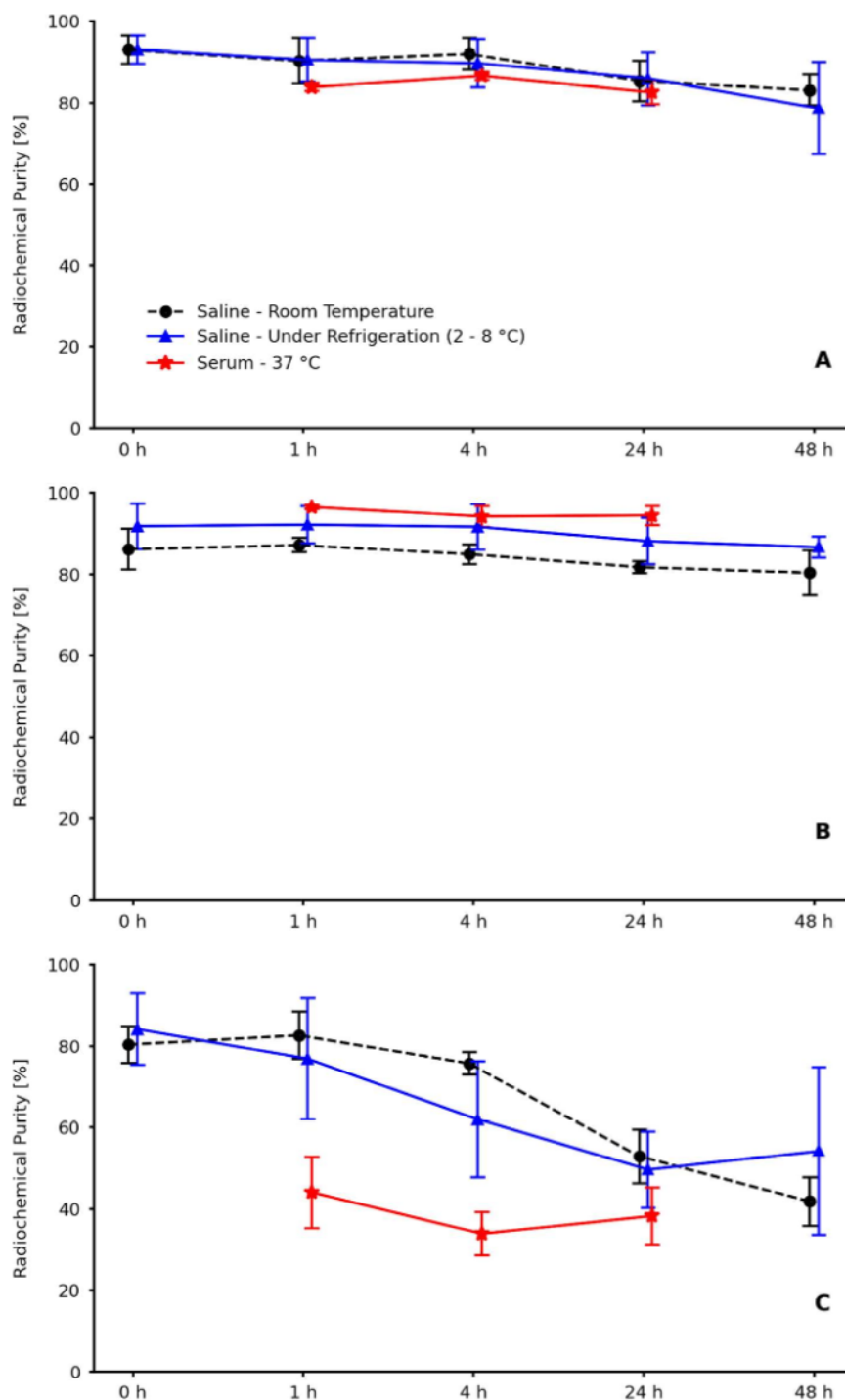
The affinity studies of [<sup>131</sup>I]-YIKVAV and [<sup>131</sup>I]-YIGSR were conducted in MDA-MB-231 and MCF-7 breast tumor cells (Fig. 5). The radiopeptides showed different values for the binding (Fig. 5A) and internalization (Fig. 5B)

percentages to MDA-MB-231 cells. The binding percentages of [<sup>131</sup>I]-YIKVAV were between  $5.67 \pm 0.68$  and  $7.34 \pm 1.17\%$  over the evaluated time interval. The [<sup>131</sup>I]-YIGSR showed a binding percentage of  $8.42 \pm 0.50\%$  at 1 h, which decreased to  $5.72 \pm 0.31\%$  at 24 h. The internalization percentages of [<sup>131</sup>I]-YIKVAV and [<sup>131</sup>I]-YIGSR were  $73.37 \pm 3.73$  and  $49.70 \pm 4.40\%$ , respectively, at 1 h of incubation. Within 24 h, the internalization percentages of both [<sup>131</sup>I]-YIKVAV and [<sup>131</sup>I]-YIGSR were  $\cong 52\%$ . The radiopeptides also showed different results for the binding (Fig. 5C) and internalization (Fig. 5D) percentages to MCF-7 cells. The binding percentages of [<sup>131</sup>I]-YIKVAV to MCF-7 cell line were approximately 15% throughout the incubation period, with a higher binding percentage of  $18.10 \pm 1.63\%$  at 4 h. The [<sup>131</sup>I]-YIGSR showed binding percentages from  $6.67 \pm 0.25\%$  at 1 h to  $10.02 \pm 0.61\%$  at 24 h. The internalization percentages of the [<sup>131</sup>I]-YIKVAV were approximately 80% within the first hours of incubation and decreased to  $59.71 \pm 5.57\%$  at 24 h. However, the [<sup>131</sup>I]-YIGSR presented an internalization of approximately 40% within time.

**Fig. 3** RP-HPLC profiles: **A** unlabeled YIKVAV (black line), YIGSR (blue line), and KAFDITYVRLKF (red line), **B** [ $^{131}$ I]YIKVAV (black line), **C** [ $^{131}$ I]YIGSR (blue line), and **D** [ $^{131}$ I]KAFDITYVRLKF (red line)



**Fig. 4** Radiochemical stability in saline and serum of **A**, **B** [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIKVAV, **C**, **D** [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIGSR, and **E**, **F** [ $^{131}\text{I}$ ]I-KAFDITYVRLKF. Data are expressed as 'mean  $\pm$  SD' ( $n=3$  [saline];  $n=5$  [serum]). Different letters represent statistically significant differences within time ( $p<0.05$ )



The [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIKVAV and [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIGSR ex vivo biodistribution profiles are summarized in Fig. 6. Both peptides exhibited rapid blood clearance and low accumulation in non-target organs. However, there was a notable accumulation of radioactivity in the stomach and thyroid. Data obtained from xenografted mice demonstrated that

[ $^{131}\text{I}$ ]I-YIKVAV and [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIGSR displayed high tumor accumulation. The tumor-to-contralateral muscle ratios (Fig. 6—inserts) were 1.5 at 15 min for both peptides, which increased to 4.6 and 2.8 at 120 min for [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIKVAV and [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIGSR, respectively. These findings were further supported by autoradiography (Fig. 7), where visual analysis of

**Table 1** Lipophilicity (Log P) and serum protein binding (SPB) of the three  $^{131}\text{I}$ -labeled peptide fragments

| Parameters | $^{131}\text{I}$ I-YIKVAV | $^{131}\text{I}$ I-YIGSR | $^{131}\text{I}$ I-KAFDITYVRLKF |
|------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Log P      | $-1.61 \pm 0.07$          | $-2.12 \pm 0.08$         | $-1.10 \pm 0.04$                |
| SPB [%]    | $48.40 \pm 0.78$          | $25.01 \pm 0.70$         | nd                              |

Data are expressed as 'mean  $\pm$  SD' ( $n=5$ )

nd not determined

the images indicates a higher accumulation of radiopeptides in the tumor tissue than the contralateral muscle. Additionally, they were found to penetrate deeply into the tumor tissue.

## Discussion

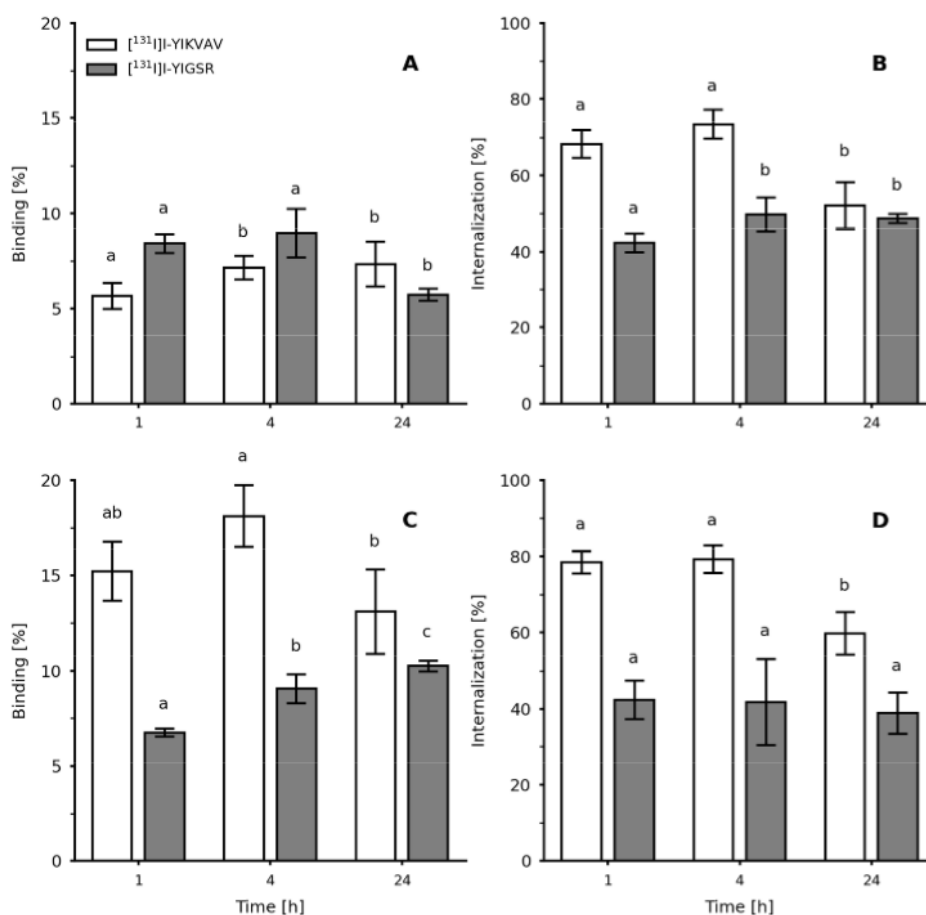
Three laminin-111-derived peptide fragments were synthesized, each representing a different chain. The IKVAV fragment represented the  $\alpha 1$  chain, modified by introducing the non-native amino acid tyrosine (Y) at the N-terminal

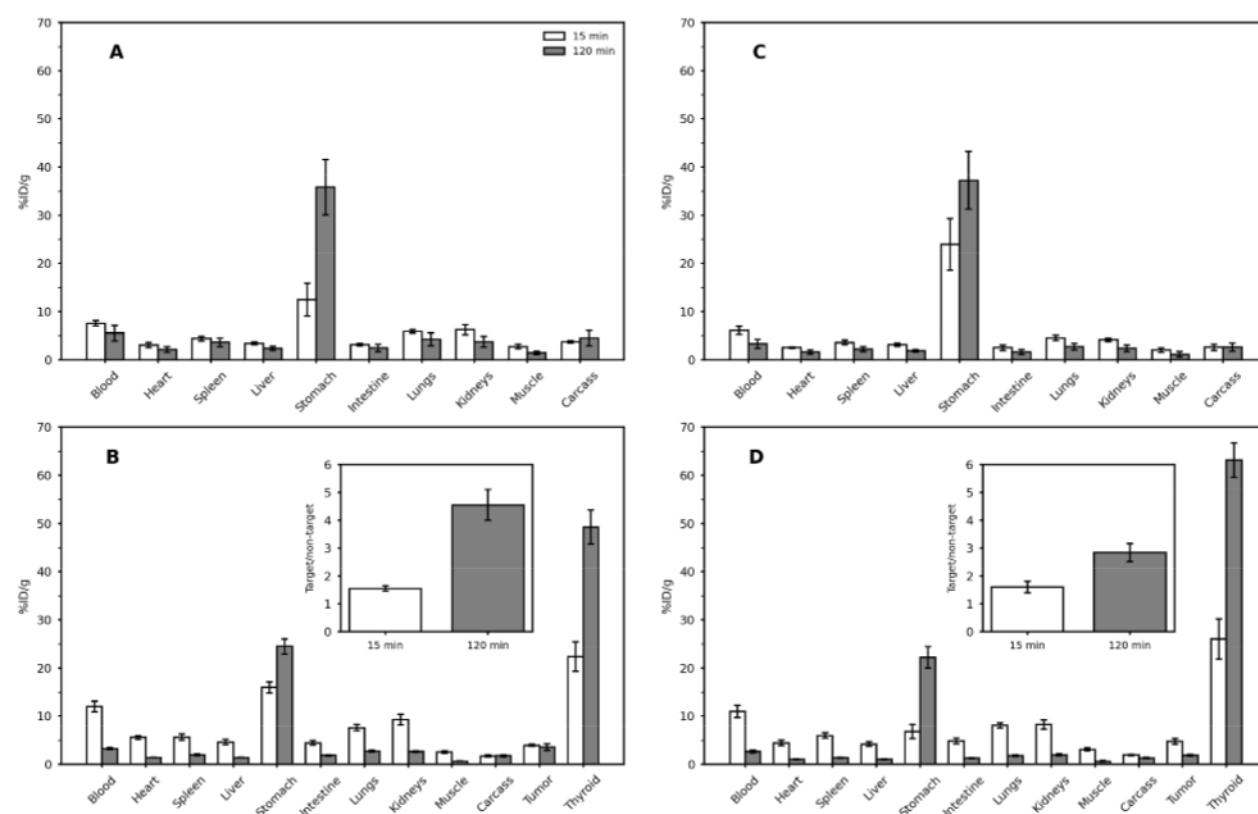
position to allow the radiolabeling with  $^{131}\text{I}$ . Thus, the final structure is YIKVAV. The  $\beta 1$  chain was represented by the YIGSR fragment, a truncated version of the peptide CDP-GYIGSR, which retained its biological activity, and the  $\gamma 1$  chain was represented by the C16 peptide, KAFDITYVRLKF. All fragments were synthesized using the Fmoc strategy and were purified by RP-HPLC, with chemical purity higher than 95%.

Radiolabeling of the peptides with  $^{131}\text{I}$  was accomplished by the chloramine T method (Hunter 1970; Ebenhan et al. 2018), with the radionuclide incorporated at the aromatic ring of the tyrosine amino acid (Fig. 1). The choice of  $^{131}\text{I}$  in this study was influenced by its availability and cost-effectiveness.

In the radiolabeling procedure, the best radiochemical yields were achieved at 1.5, 1, and 4 min for YIKVAV, YIGSR, and KAFDITYVRLKF fragments, respectively. However, the  $\gamma 1$  representative, KAFDITYVRLKF, displayed a longer reaction time, likely due to steric hindrance caused by the central tyrosine residue (Fig. 1). Hu and co-workers have assessed the validity of labeling YIGSR with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  by employing the bifunctional chelator S-Acetyl-NH<sub>3</sub>-MAG3. This study achieved a radiolabeling yield of 62%

**Fig. 5** Binding and internalization percentages of the  $^{131}\text{I}$ I-YIKVAV and  $^{131}\text{I}$ I-YIGSR to **A, B** MDA-MB-231 and **C, D** MCF-7 breast cancer cells. Data are expressed as 'mean  $\pm$  SD' ( $n=5$ ). Different letters represent statistically significant differences within time for the same radiopeptide ( $p < 0.05$ )





**Fig. 6** Ex vivo biodistribution of **A, B** [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIKVAV and **C, D** [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIGSR in naive (control) ( $n=3$ ) and MDA-MB-231 breast tumor-bearing nude female Balb/c mice ( $n=5-7$ ). Inserts: Tumor-to-

contralateral muscle ratios obtained from the ex vivo biodistribution data in MDA-MB-231 breast tumor-bearing nude female Balb/c mice. Data are expressed as 'mean  $\pm$  SEM'

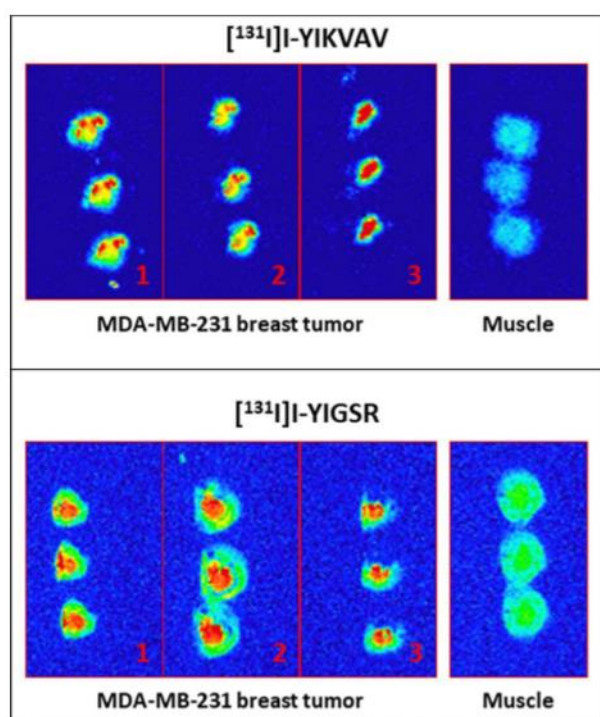
(Hu et al. 2007). Consequently, our findings demonstrated that iodine radiolabeling offers a simpler procedure and higher radiochemical efficiencies.

The use of the ascending chromatography method to evaluate radiochemical yields was motivated by its ease of use, material availability and low cost associated with the procedure, and RP-HPLC analyses validated it. Due to the delay for the samples to go through from the UV detector to the radioactivity detector, the radiopeptides exhibited slightly extended  $R_f$  when compared to the unlabeled peptide fragments. Despite this, the RP-HPLC results align with the ascending chromatographic outcomes, providing further support for the accuracy and consistency of the obtained results.

The radiochemical stability of  $^{131}\text{I}$ -labeled peptides in saline was assessed at room temperature and under refrigeration (4–8 °C). In both conditions, the [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIKVAV and [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIGSR remained stable over time. However, the [ $^{131}\text{I}$ ]I-KAFDITYVRLKF decreased radiochemical purity to around 50%, within the specified time interval, for both storage conditions. The evaluation of radiochemical stability was extended to serum at 37 °C, for 24 h. Throughout

the entire duration, the [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIKVAV and [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIGSR demonstrated consistent radiochemical stability within the serum. Conversely, the [ $^{131}\text{I}$ ]I-KAFDITYVRLKF exhibited radiochemical instability within the first hour of exposure to serum. The radiochemical stability is important when assessing a new peptide-based targeting molecule. Previous studies have illustrated that [ $^{131}\text{I}$ ]I-peptides, across various concentrations, maintained radiochemical stability for up to 24 h following the radiolabeling procedure (Araújo et al. 2009; Brunton et al. 2010).

All the radiopeptides displayed hydrophilic characteristics, supporting preferential renal excretion, which could generate a lower background for an imaging diagnosis radiopharmaceutical. Conversely, lipophilic compounds tend to be reabsorbed and recirculated within the systemic circulation (Jeghers et al. 1990). However, due to the lower radiochemical stability of the [ $^{131}\text{I}$ ]I-KAFDITYVRLKF, further evaluations were limited to the  $^{131}\text{I}$ -labeled YIKVAV and YIGSR. This prudent decision was guided by the necessity for stable radiolabeling, a crucial factor in the evaluation and utility of radiopeptides.



**Fig. 7** Autoradiography of [ $^{131}\text{I}$ ]-YIKVAV and [ $^{131}\text{I}$ ]-YIGSR in MDA-MB-231 breast tumor-bearing mice: (1) tumor center; (2) interior of the tumor between the center and the surface; (3) tumor surface

The findings from the SPB analysis revealed that  $\approx 50\%$  of the [ $^{131}\text{I}$ ]-YIKVAV fragment and  $\approx 75\%$  of the [ $^{131}\text{I}$ ]-YIGSR are available to reach the intended target. This indicates a considerable potential for clinical application, as these fractions signify the proportion of the peptides that could potentially engage in the desired interactions or therapeutic effects (de Barros et al. 2013).

The observed variations in the binding and internalization patterns of the radiopeptides within MDA-MB-231 and MCF-7 tumor cells likely stem from the unique characteristics of each evaluated peptide. The IKVAV peptide, recognized for its role in promoting cell adhesion and migration (Bresalier et al. 1995; He et al. 2015), is likely responsible for its higher binding and internalized fractions. Due to the importance of this fragment, a recent assessment was conducted on a lyophilized matrix composed of hyaluronic acid (HA) and the IKVAV peptide within a 3D in vitro model of breast cancer. The results demonstrated that the HA-IKVAV displayed elevated sensitivity compared to its 2D counterparts, particularly regarding cellular membrane permeabilization and viability, thereby reinforcing the significance of this fragment (Sieni et al. 2020). These attributes align with its tendency to facilitate interactions that promote these cellular behaviors.

On the contrary, the YIGSR peptide is associated with angiogenesis inhibition (Ponce et al. 2003). This aligns with our findings, as this peptide demonstrated the lowest percentage of both bound and subsequently internalized fractions within a 24 h incubation period. The effectiveness of this fragment in inhibiting the growth of melanoma and lung tumor cells has been under evaluation, including metastasis formation. These studies suggested that the YIGSR peptide have a potential to be used as targeting molecule for systemic delivery for the treatment of metastatic cancer (Iwamoto et al. 1988; Sarfati et al. 2011). Moreover, this pentapeptide-rhodamine B derivative (YIGSR-RhB) exhibited high absorption by B16F10 melanoma cells and 4T1 breast cancer cells, resulting in a robust fluorescent signal within these in vitro tumor cells and in vivo mice tumors. As a result, YIGSR-RhB exhibits promising potential as a tumor-targeting probe for fluorescent imaging, displaying the ability to directly adhere to the cell membrane and selectively target tumor cells (Liu et al. 2020). In the context of our results, it is evident that the proposed peptides exhibit favorable interactions in both types of breast cancer cell lines, thereby holding promise as potential breast cancer-targeting agents.

The in vivo assay conducted in naïve and breast tumor-bearing mice demonstrated that both [ $^{131}\text{I}$ ]-YIKVAV and [ $^{131}\text{I}$ ]-YIGSR exhibited rapid blood clearance and displayed low accumulation in various non-target organs. This desirable profile indicates a minimized radioactivity background. Nevertheless, notable radioactivity accumulation was observed in the stomach and thyroid, which can be attributed to the partial in vivo release of  $^{131}\text{I}$  from the peptides, generating free  $^{131}\text{I}$  as a radiochemical impurity that accumulates in those organs (Lisco et al. 2023). Conversely, the peptide fraction that retained radiolabeling exhibited substantial accumulation at the tumor site. This accumulation displayed a high targeted-to-non-targeted ratio that increased from 15 to 120 min, implying a remarkable specificity for tumor tissue. Previous studies reported targeted-to-non-targeted ratios for  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled peptides in the same order of magnitude in a murine MCF-7 breast cancer model, however maximum tumor-to-muscle ratio was seen at 15 min post-injection. (Ahmadpour et al. 2018a, b). This specificity was further supported by autoradiography visual analysis, which illustrated higher peptide accumulation in the tumor tissue compared to the contralateral muscle at 120 min after peptide administration. Moreover, samples were obtained from various levels, ranging from the tumor surface to the center to assess the depth of penetration within the tumor tissue. These findings suggest that both YIKVAV and YIGSR peptides effectively reach and penetrate deep into the tumor tissue.

Given their promising attributes, both [ $^{131}\text{I}$ ]-YIKVAV and [ $^{131}\text{I}$ ]-YIGSR peptides are candidates for radiolabeling

with more appropriate radioisotopes. This step could enhance their performance and facilitate their evaluation as potential radiopharmaceuticals. This avenue of exploration holds significant promise for advancing their clinical utility within the realm of breast cancer imaging diagnostic and treatment, which could be achieved by further chemical modifications to enable radiolabeling with other radionuclides.

## Conclusion

The YIKVAV, YIGSR and KAFDITYVRLKF peptide fragments were synthesized and radiolabeled with  $^{131}\text{I}$ . However, due to its limited radiochemical stability, the [ $^{131}\text{I}$ ]I-KAFDITYVRLKF fragment did not undergo further assessment. Conversely, the [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIKVAV and [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIGSR fragments displayed favorable radiochemical characteristics. The comprehensive in vitro and in vivo data indicated their potential as effective targeting agents for breast cancer.

**Acknowledgements** The authors would like to thank the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* for the fellowship. Authors also thank the *Fundo de Amparo à Pesquisa (FAP)* of Santa Casa de São Paulo School of Medical Sciences and the grant #2021/08717-8, (CancerThera) - São Paulo Research Foundation (FAPESP).

**Author contributions** FFM: conducted all experiments. DVS: handled cell culture and preparation, as well as in vitro assays. ACRD: conducted the radiolabeling assay and quality control, including RP-HPLC analysis. ACCM: carried out the radiolabeling assay and quality control, as well as in vivo experiments. JM: prepared figures and conducted data analysis. DdPF and FLNM: both performed radioautography assays. MFdB: conducted the radiolabeling assay and quality control, and analyzed data. LLF: conducted experiments, data analysis, and provided supervision. LM: developed the project, conducted experiments, performed data analysis, and provided supervision. All authors reviewed and approved the manuscript.

**Data availability** The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article. Raw data that support the findings of this study are available from the corresponding authors, upon reasonable request.

## Declarations

**Conflict of interest** The authors declare no conflict of interest.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

- Ahmadpour S, Noaparast Z, Abedi SM, Hosseinimehr SJ (2018a)  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-(tricine/EDDA)-FROP peptide for MCF-7 breast tumor targeting and imaging. *J Biomed Sci*. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0420-x>
- Ahmadpour S, Noaparast Z, Abedi SM, Hosseinimehr SJ (2018b)  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -(tricine)-HYNIC-Lys-FROP peptide for breast tumor targeting. *Anticancer Agents Med Chem*. <https://doi.org/10.2174/1871520618666180307142027>
- Araújo EB, Caldeira-Filho JS, Nagamati EM, Muramoto E, Colturato MT, Couto RM et al (2009) A comparative study of  $^{131}\text{I}$  and  $^{177}\text{Lu}$  labeled somatostatin analogues for therapy of neuroendocrine tumours. *Appl Radiat Isot*. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2008.09.009>
- Batiston AP, Tamaki EM, de Souza LA, dos Santos MLM (2011) Knowledge of and practices regarding risk factors for breast cancer in women aged between 40 and 69 years. *Rev Bras Saúde Mater Infant*. <https://doi.org/10.1590/S1519-38292011000200007>
- Bosman FT, Stamenkovic I (2003) Functional structure and composition of the extracellular matrix. *J Pathol*. <https://doi.org/10.1002/path.1437>
- Bresalier RS, Schwartz B, Kim YS, Duh QY, Kleinman HK, Sullam PM (1995) The laminin  $\alpha 1$  chain Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV)-containing peptide promotes liver colonization by human colon cancer cells. *Cancer Res* 55:2476–2480
- Brunton LL, Parker KL, Blumenthal DK, Buxton IL (2010) In: *Manual de Farmacologia e Terapêutica de Goodman & Gilman*, 12<sup>a</sup>. Artmed, Rio de Janeiro, pp 04–14
- De Barros ALB, Motta LG, de Aguiar CF et al (2013)  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled bombesin analog for breast cancer identification. *J Radioanal Nucl Chem*. <https://doi.org/10.1007/s10967-012-2331-8>
- Durante AC, Sobral DV, Miranda ACC, de Almeida EV, Fuscaldi LL, de Barboza MF, Malavolta L (2019) Comparative study of two oxidizing agents, chloramine T and Iodo-Gen®, for the radiolabeling of  $\beta$ -CIT with Iodine-131: relevance for Parkinson's disease. *Pharmaceuticals*. <https://doi.org/10.3390/ph12010025>
- Ebenhan T, Satheke MM, Lengana T, Koole M, Gheysens O, Govender T, Zeevaert JR (2018)  $^{68}\text{Ga}$ -NOTA-funcionalizada ubiquitina: citotoxicidade, biodistribuição, dosimetria de radiação e primeira imagem PET/CT humana de infecções. *J Nucl Med* 12:25–29. <https://doi.org/10.2967/jnumed.117.200048>
- Faria DP, Campeiro JD, Junqueira MS, Real CC, Marques FLN, Hayashi MAF, Sapienza MT (2023) [ $^{18}\text{F}$ ]FDG and [ $^{11}\text{C}$ ] PK11195 PET imaging in the evaluation of brown adipose tissue – effects of cold and pharmacological stimuli and their association with crotamine intake in a male mouse model. *Nucl Med Biol*. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2023.108362>
- Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F (2021) Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int J Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.33588>
- Fields GB, Noble RL (1990) Solid-phase peptide-synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-acids. *Int J Pept Prot Res* 35:161–214
- Hamill KJ, Kligys K, Hopkinson SB, Hopkinson SB, Jones JC (2009) Laminin deposition in the extracellular matrix: a complex picture emerges. *J Cell Sci*. <https://doi.org/10.1242/jcs.041095>
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- He X, Hao Y, Long W, Song N, Fan S, Meng A (2015) Exploration of peptide T7 and its derivative as integrin  $\alpha_v\beta_3$ -targeted imaging agents. *Onco Targets Ther*. <https://doi.org/10.2147/OTT.S82095>
- Hu J, Qin G, Zhang Y, An R, Lan X (2007)  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -YIGSR as a receptor tracer in imaging the Ehrlich Ascites tumor-bearing mice

- as compared with  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI. *J Huazhong Univ Sci Technol.* <https://doi.org/10.1007/s11596-007-0432-3>
- Hunter R (1970) Standardization of the chloramine-T method of protein iodination. *Proc Soc Exp Biol Med* 133:989–992
- Iwamoto Y, Robey FA, Graf J, Sasaki M, Kleinman HK, Yamada Y, Martin GR (1988) YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science.* <https://doi.org/10.1126/science.2961059>
- Jeghers O, Piepz A, Ham HR (1990) What does protein binding of radiopharmaceuticals mean exactly? *Eur J Nucl Med* 17:101–102
- Kaiser E, Collescot RI, Bossinge CD, Cook PI (1970) Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. *Anal Biochem* 34:595–598
- Kikkawa Y, Hozumi K, Katagiri F, Nomizu M, Kleinman HK, Koblin-ski JE (2013) Laminin-111-derived peptides and cancer. *Cell Adh Migr.* <https://doi.org/10.4161/cam.22827>
- Lisco G, De Tullio A, Triggiani D, Zupo R, Giagulli VA, De Pergola G, Piazzolla G, Guastamacchia E, Sabbà C, Triggiani V (2023) Iodine Deficiency and iodine prophylaxis: an overview and update. *Nutrients.* <https://doi.org/10.3390/nu15041004>
- Liu F, Yan JR, Chen S, Yan GP, Pan BQ, Zhang Q, Wang YF, Gu YT (2020) Polypeptide-rhodamine B probes containing laminin/fibronectin receptor-targeting sequence (YIGSR/RGD) for fluorescent imaging in cancers. *Talanta.* <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120718>
- Mokotoff M, Swanson DP, Jonnalagadda SS, Epperly MW, Brown ML (1997) Evaluation of laminin peptide fragments labeled with indium-111 for the potential imaging of malignant tumors. *J Pept Res.* <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1997.tb01158.x>
- Montor WR, Salas AROSE, Melo FHM (2018) Receptor tyrosine kinases and downstream pathways as druggable targets for cancer treatment: the current arsenal of inhibitors. *Mol Cancer.* <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0792-2>
- Otagiri D, Yamada Y, Hozumi K, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M (2013) Cell attachment and spreading activity of mixed laminin peptide-chitosan membranes. *Pept Sci.* <https://doi.org/10.1002/bip.22303>
- Ponce ML, Nomizu M, Kleinman HK (2001) An angiogenic laminin site and its antagonist bind through the  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_1$  integrins. *FASEB J.* <https://doi.org/10.1096/fj.00-0736com>
- Ponce ML, Hibino S, Lebiada AM, Mochizuki M, Nomizu M, Kleinman HK (2003) Identification of a potent peptide antagonist to active laminin-1 sequences and angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 63:5060–5064
- Sarfati G, Dvir T, Elkabets M, Apte RN, Cohen S (2011) Targeting of polymeric nanoparticles to lung metastases by surface-attachment of YIGSR peptide from laminin. *Biomaterials.* <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.014>
- Schottelius M, Wester HJ (2009) Molecular imaging targeting peptide receptors. *Methods.* <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2009.03.012>
- Sieni E, Bazzolo B, Pieretti F, Zamuner A, Tasso A, Dettin M, Conconi MT (2020) Breast cancer cells grown on hyaluronic acid-based scaffolds as 3D in vitro model for electroporation. *Bioelectrochem.* <https://doi.org/10.1016/j.bioelectrochem.2020.107626>
- Smuczek B, Santos ES, Siqueira AS, Pinheiro JJV, Freitas VM, Jaeger RG (2017) The laminin-derived peptide C16 regulates GPNMB expression and function in breast cancer. *Exp Cell Res.* <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.07.005>
- Sobral DV, Fuscaldi LL, Durante ACR, Rangel MG, Oliveira LR, Mendonça FF, Miranda ACC, Cabeza JM, Montor WR, Cabral FR, Barboza MFF, Malavolta L (2020) Radiochemical and biological properties of peptides designed to interact with EGF receptor: relevance for glioblastoma. *Nucl Med Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2020.07.001>
- De Souza ES (2011) Microarray analysis of differentially expressed genes in breast cancer cell lines (MDA-MB-231) treated with the bioactive peptide of laminin C16. Dissertation, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo
- Sweeney TM, Kibbey MC, Zain M, Fridman R, Kleinman HK (1991) Basement membrane and the SIKVAV laminin-derived peptide promote tumor growth and metastases. *Cancer Metastasis Rev.* <https://doi.org/10.1007/BF00050795>
- Tashiro K, Sephel GC, Weeks B, Sasaki M, Martin GR, Kleinman HK, Yamada Y (1989) A synthetic peptide containing the IKVAV sequence from the A chain of laminin mediates cell attachment, migration, and neurite outgrowth. *J Biol Chem.* [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)71604-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)71604-9)

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## IV.2. Resultados com $^{99m}\text{Tc}$

### IV.2.1. Síntese e Caracterização dos Peptídeos

Os fragmentos peptídicos derivados da molécula da laminina-111 foram sintetizados com a adição do resíduo de histidina (H): **HYIGSR** e **HYIKVAV**. As sínteses das sequências foram realizadas através da síntese de peptídeos em fase sólida, manualmente, utilizando a estratégia Fmoc/But. A clivagem final do peptídeo da resina e a remoção dos grupos protetores das cadeias laterais foram efetuadas em uma mistura contendo elevado teor de TFA.

i. Primeira sequência: fragmento modificado **HYIGSR** (cadeia  $\beta$ 1 da laminina-111). A síntese foi realizada utilizando a resina Arg-Wang (0,7 mmol/g), na escala de 0,49 mmol/g; peso teórico: 731,81 g; peso obtido: 529,83 g. Vale ressaltar que o aminoácido H foi adicionado no N-terminal para a realização da radiomarcagem com o radionuclídeo  $^{99m}\text{Tc}$ .

ii. Segunda sequência: fragmento modificado **HYIKVAV** (cadeia  $\alpha$ 1 da laminina-111). A síntese foi realizada utilizando a resina Val-Wang (0,5 mmol/g), na escala de 0,35 mmol/g; peso teórico: 829,01 g; peso obtido: 385,45 g. Vale ressaltar que os aminoácidos H e Y foram acrescentados no N-terminal da sequência IKVAV, já descrita (Sweener et al., 1991; Bresalier et al., 1995) para realização da radiomarcagem com o radionuclídeo  $^{99m}\text{Tc}$  e comparação com a sequência utilizada para a marcação com  $^{131}\text{I}$ .

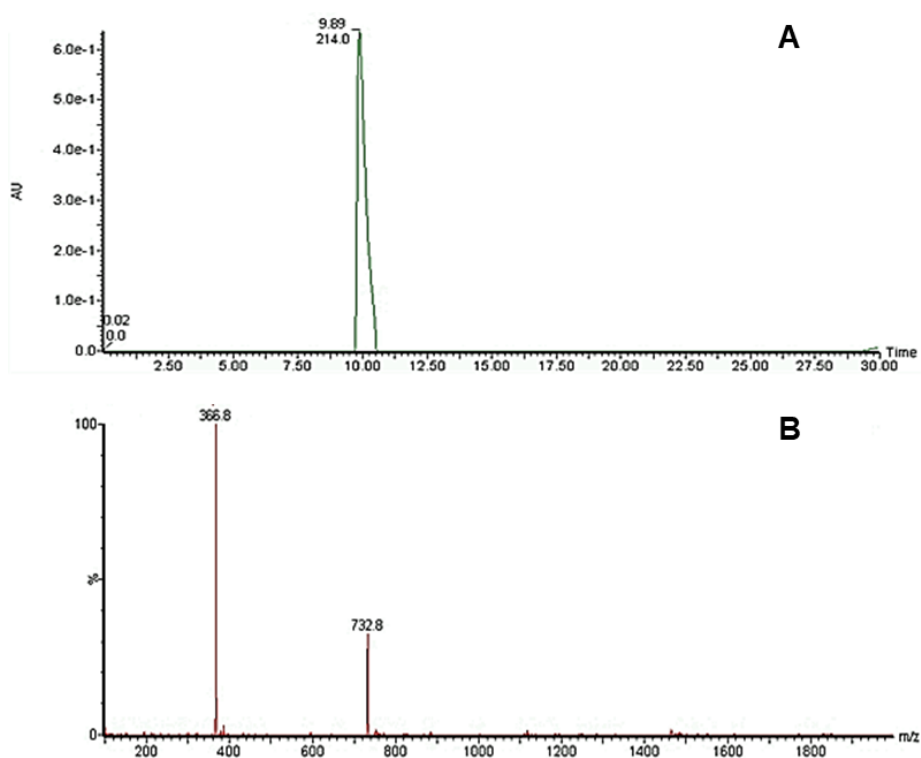
Os rendimentos finais das sínteses foram de aproximadamente 60% para todos os fragmentos e a pureza dos peptídeos foi confirmada por CLAE-FR. Os parâmetros utilizados nas análises cromatográficas estão resumidos na **Tabela 3**.

**Tabela 3.** Parâmetros utilizados na caracterização dos peptídeos propostos

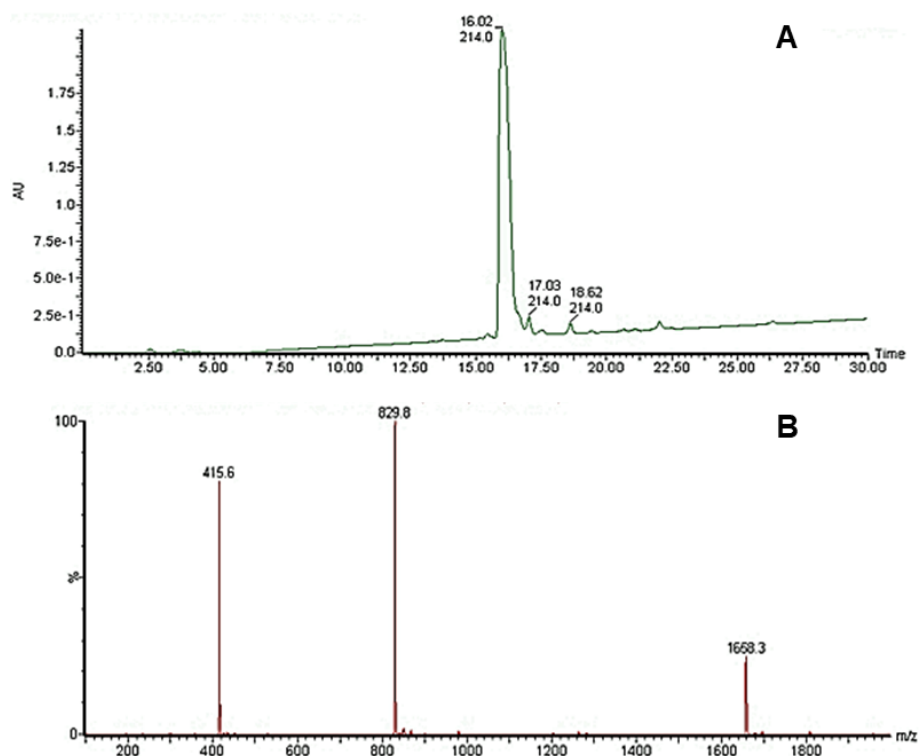
| Peptídeos                              | Massa obtido<br>[mg] | CLAE-FR analítico     |                            |                          |
|----------------------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------------|--------------------------|
|                                        |                      | Gradiente             | Tempo de Retenção<br>[min] | % de Sol. B para eluição |
| <b>HYIGSR</b><br>MM = 731,81<br>g/mol  | 529,83               | 5% - 95% em<br>30 min | 9,89                       | 60%                      |
| <b>HYIKVAV</b><br>MM = 829,01<br>g/mol | 385,48               | 5% -95%<br>em 30 min  | 16,02                      | 60%                      |

Solvente A: 0,1% TFA/H<sub>2</sub>O; Solvente B: 60% ACN/H<sub>2</sub>O

Os perfis cromatográficos, obtidos nas análises por CLAE-FR, e os espectros de massa, obtidos nas análises por espectrometria de massa, dos fragmentos peptídicos sintetizados **HYIGSR** e **HYIKVAV** estão representados nas **figuras 13 e 14**, respectivamente.



**Figura 13.** Perfil cromatográfico **(A)** e espectro de massas **(B)** do fragmento **HYIGSR**.



**Figura 14.** Perfil cromatográfico **(A)** e espectro de massas **(B)** do fragmento **HYIKVAV**.

Para ambos os peptídeos foi obtido um bom perfil cromatográfico. No espectro de massas, a massa obtida foi correspondente a massa molecular teórica de 731,81g/mol mais uma molécula de hidrogênio totalizando 732,8 g/mol para o peptídeo **HYIGSR**. Já para o fragmento **HYIKVAV** sua massa molecular foi de 892,8 g/mol com mais um hidrogênio, quando ionizada obteve uma massa de 415,6 g/mol e no caso do **HYIKVAV** também houve uma dimerização com o valor de 1658,3 g/mol.

As sínteses e caracterizações dos peptídeos foram realizadas com sucesso. Em seguida, os processos de padronização das radiomarcações foram iniciadas.

#### **IV.2.2. Radiomarcação dos Peptídeos**

Para realizar a padronização do radiomarcação e obter alto rendimento radioquímico, foram avaliadas diferentes condições de marcação, além do melhor sistema de solventes para a realização das análises radiocromatográficas. Tendo que levar em conta que o melhor solvente é aquele

que consegue separar o  $^{99m}\text{Tc}$  livre e o  $^{99m}\text{Tc}$ -tricarbonil do peptídeo radiomarcado.

As variações realizadas para a padronização das reações de radiomarcção, assim como os sistemas cromatográficos utilizados para avaliação de cada radiopeptídeo, estão sumarizadas na **Tabela 4**.

**Tabela 4.** Parâmetros de radiomarcção para os peptídeos **HYIGSR** e **HYIKVAV**.

| Parâmetro de radiomarcção                                 | HYIGSR                                                                                       | HYIKVAV                                                      |
|-----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Massa de peptídeo [mg]                                    | 0,04; 0,1; 0,15; 0,2                                                                         | 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0                    |
| Atividade de [ $^{99m}\text{Tc}$ ]Tc-tricarbonil [mCi]    | ~4                                                                                           | ~4                                                           |
| Temperatura de reação [°C]                                | 70; 85                                                                                       | 70; 85                                                       |
| Tempo de reação [min]                                     | 15; 30; 60                                                                                   | 15; 30                                                       |
| Fases móveis para análise do rendimento radioquímico      | ACN:H <sub>2</sub> O (50:50)<br>ACN:H <sub>2</sub> O (95:05)<br>NaCl 0,9%<br>Metiletilcetona | ACN:H <sub>2</sub> O (95:05)<br>NaCl 0,9%<br>Metiletilcetona |
| Fase estacionária para análise do rendimento radioquímico | TLC-SG                                                                                       | TLC-SG                                                       |

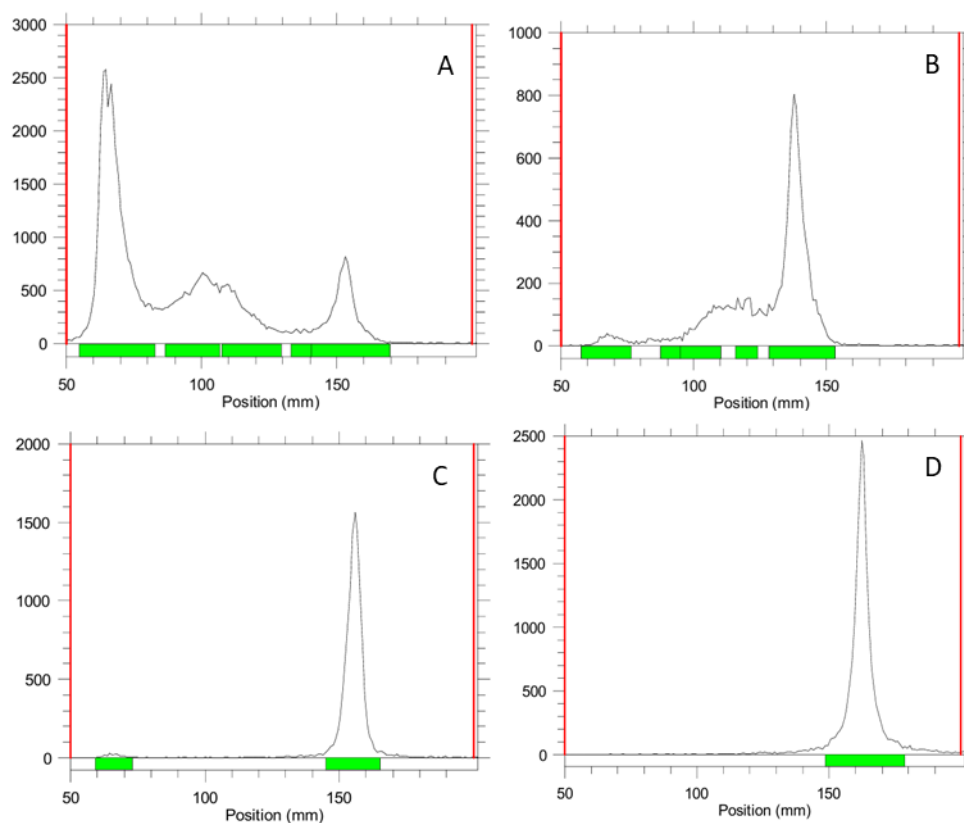
Para a marcação do peptídeo HYIGSR com o tricarbonil foi obtido melhores resultados utilizando 0,2 mg do peptídeo à 85°C por 30 min. O fragmento HYIKVAV teve um melhor rendimento utilizando 0,6 mg do peptídeo à 85°C por 30 min.

A avaliação do rendimento radioquímico foi realizada através da cromatografia em camada delgada ascendente (TLC/SG) utilizando diferentes fases móveis.

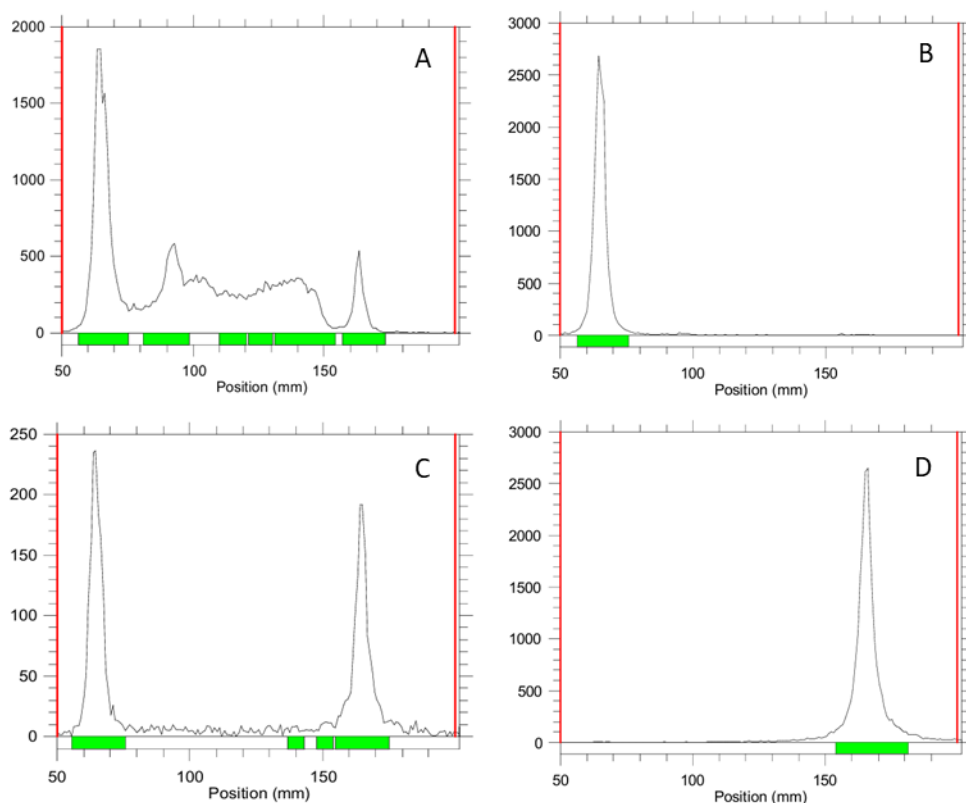
Nos sistemas cromatográficos de salina 0,9% para a análise, o tricarbonil ficou retido no ponto de aplicação, com  $R_f$  de 0.1- 0.2, o peptídeo radiomarcado entre o  $R_f$  0.3 - 0.8, enquanto o  $^{99m}\text{Tc}$  migrou com o eluente com  $R_f$  0.9 - 1.0. As análises foram realizadas em triplicata. O cálculo do rendimento radioquímico foi determinado em porcentagem da atividade de cada espécie radioquímica em relação à atividade total de fita, sempre de acordo com o  $R_f$  correspondente.

#### IV.2.2.1. Perfis cromatográficos obtidos para o peptídeo **HYIGSR**

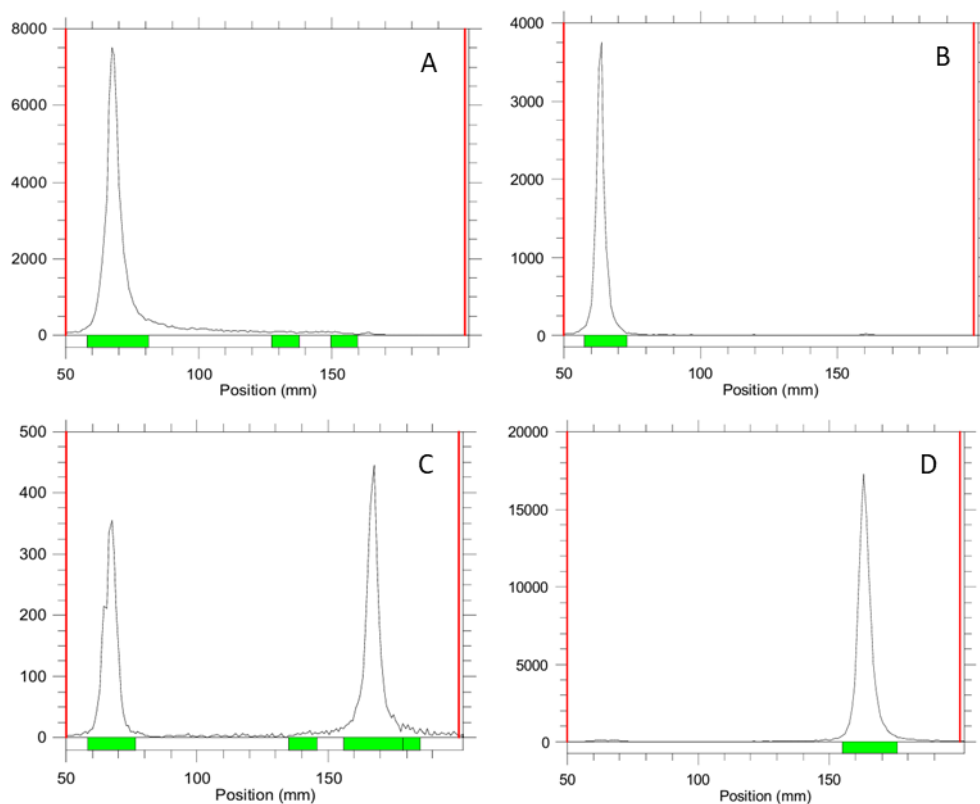
As **figuras 15-18** mostram os perfis cromatográficos obtidos em diferentes condições de radiomarcagem para o peptídeo **HYIGSR**, de acordo como solvente utilizado nas análises cromatográficas.



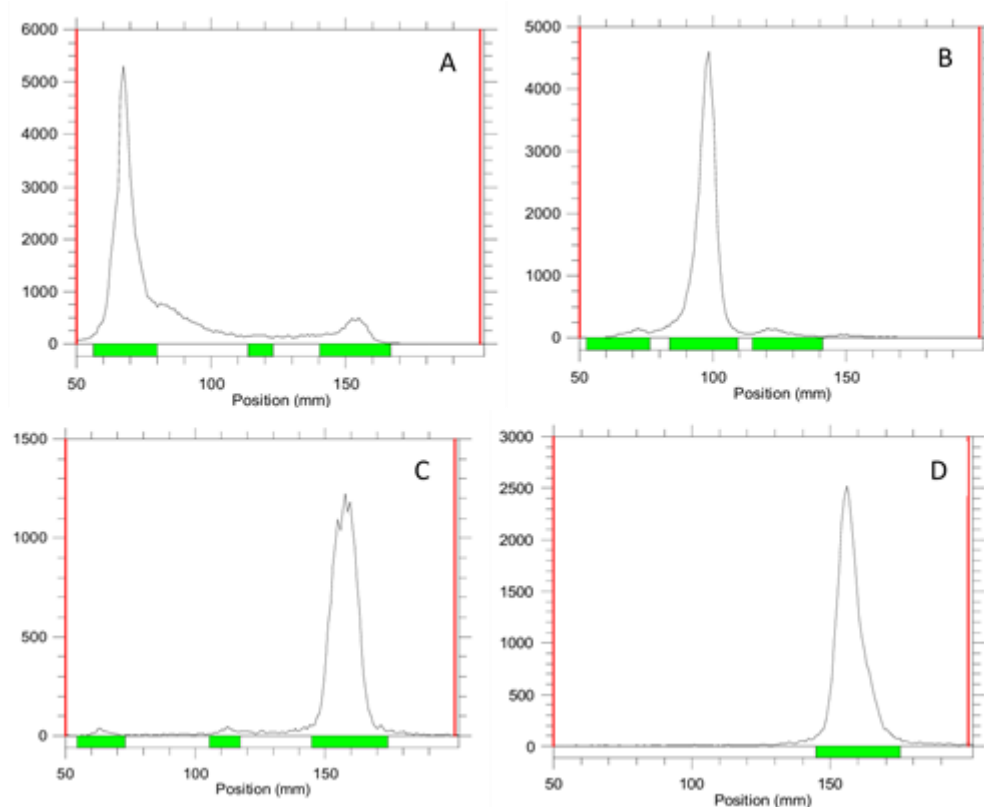
**Figura 15.** Perfis radiocromatográficos do  $[^{99m}\text{Tc}]$ -tricarbonil (**A**), peptídeo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -**HYIGSR** (**B**),  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$  (**C**) e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  (**D**) em Acetonitrila 50%.



**Figura 16.** Perfis radiocromatográficos do  $[^{99m}\text{Tc}]$ -tricarbonil (A), peptídeo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  (B),  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$  (C) e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  (D) em Acetonitrila 95%.



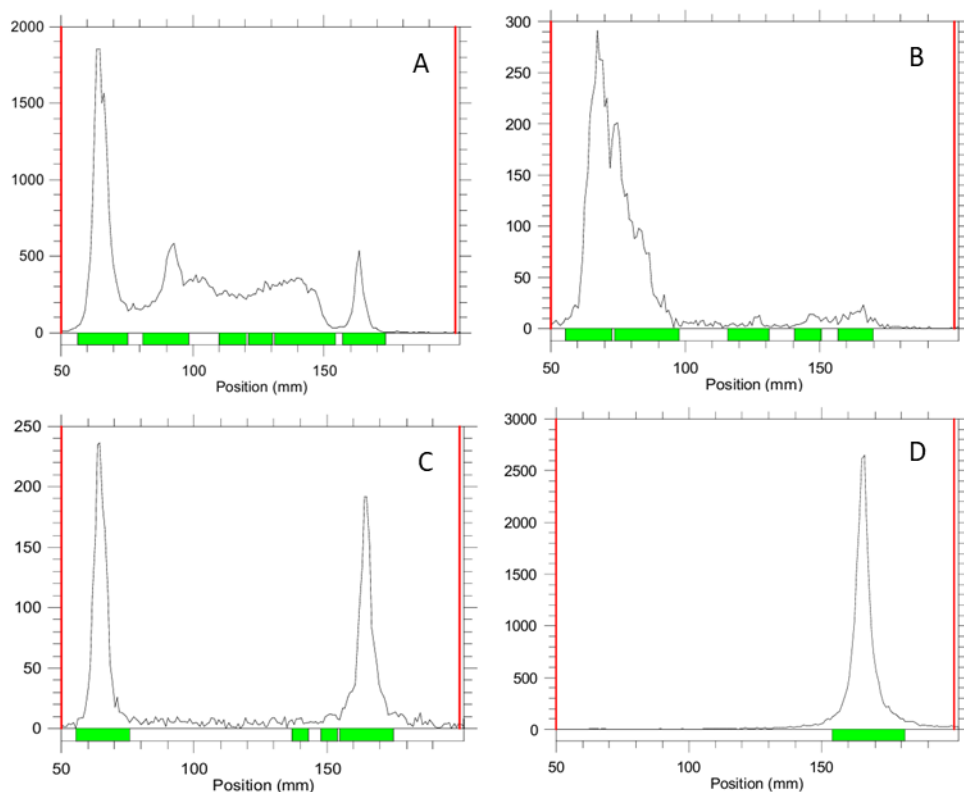
**Figura 17.** Perfis radiocromatográficos do  $[^{99m}\text{Tc}]$ -tricarbonil (A), peptídeo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  (B),  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$  (C) e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  (D) em Metiletilcetona 100%.



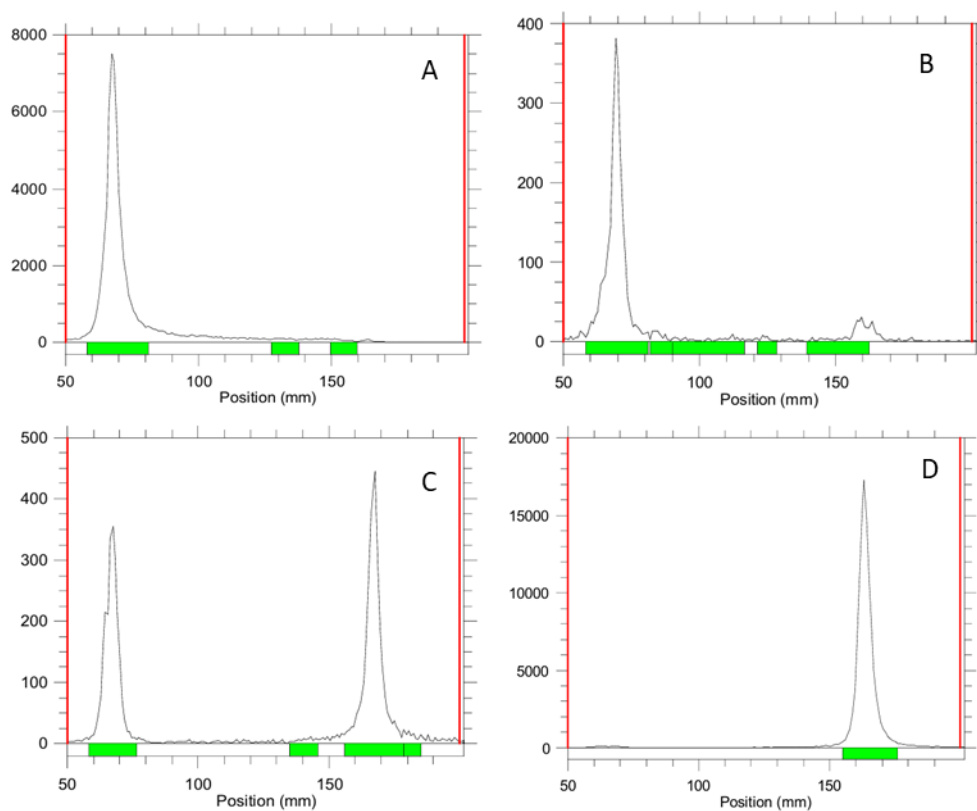
**Figura 18.** Perfis radiocromatográficos do  $[^{99m}\text{Tc}]$ -tricarbonil (**A**), peptídeo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  (**B**),  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$  (**C**) e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  (**D**) em NaCl 0,9%.

#### ***IV.2.2.2. Perfis cromatográficos obtidos para o peptídeo HYIKVAV***

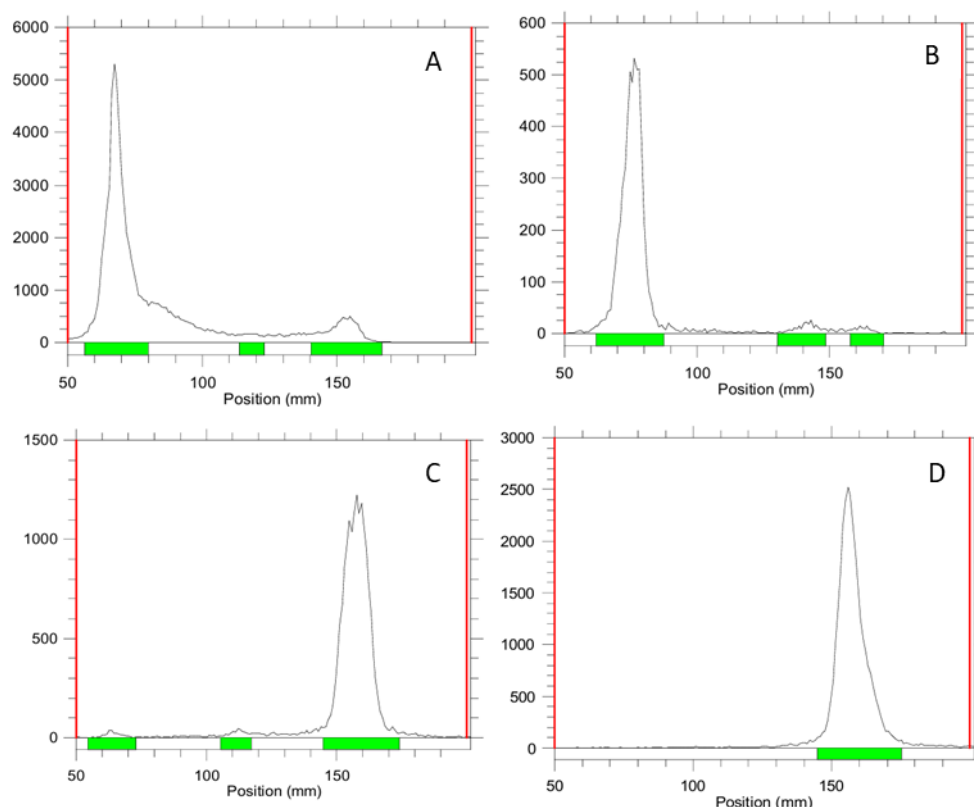
**Figuras 19 - 21** mostram os perfis cromatográficos obtidos em diferentes condições de radiomarcagem para o peptídeo HYIKVAV, de acordo como solvente utilizado nas análises cromatográficas.



**Figura 19.** Perfis radiocromatográficos do  $[^{99m}\text{Tc}]$ -tricarbonil (A), peptídeo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  (B),  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$  (C) e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  (D) em Acetonitrila 95%.



**Figura 20.** Perfis radiocromatográficos do  $[^{99m}\text{Tc}]$ -tricarbonil (A), peptídeo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  (B),  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$  (C) e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  (D) em Metiletilcetona 100%.

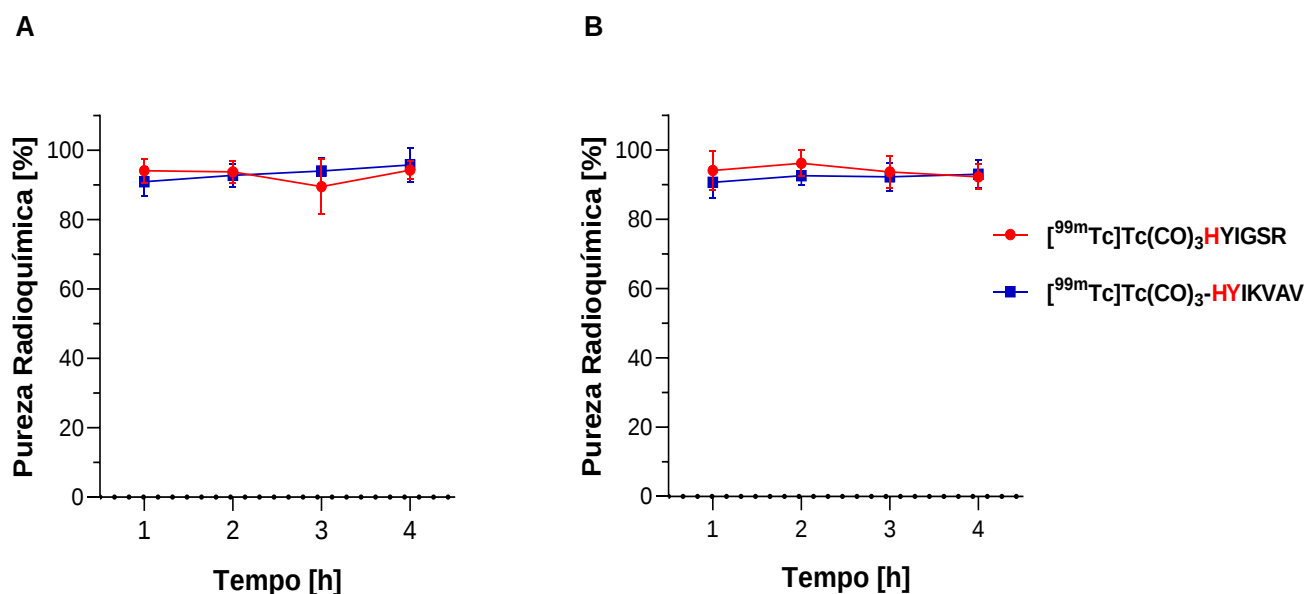


**Figura 21.** Perfis radiocromatográficos do  $[^{99m}\text{Tc}]$ -tricarbonil **(A)**, peptídeo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  **(B)**,  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_2$  **(C)** e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{TcO}_4^-$  **(D)** em NaCl 0,9%.

De acordo com as Figuras (15, 16, 17, 19 e 20) os eluentes 50% ACN / 50% $\text{H}_2\text{O}$ , 95% ACN / 5% $\text{H}_2\text{O}$  e 100% Metiletilacetona não foram adequados para mensurar o rendimento radioquímico, não sendo capazes de separar Ticarbonil,  $\text{TcO}_2$ ,  $\text{TcO}_4^-$  e o peptídeo marcado. Para ambos os peptídeos a NaCl 0,9% apresentou ser o melhor eluente (Figuras 18 e 21).

#### IV.2.3. Estudo de estabilidade radioquímica dos peptídeos radiomarcados

O uso de métodos cromatográficos constitui um dos parâmetros básicos para estimar as estabilidades radioquímicas dos radiofármacos. Além disso, a estabilidade de um radiocomposto influencia diretamente na sua biodistribuição *ex vivo*. Neste estudo, foram avaliadas as estabilidades dos peptídeos radiomarcados em meio reacional, mantidos à temperatura ambiente, e após incubação em soro, à 37°C (**Figura 22**).

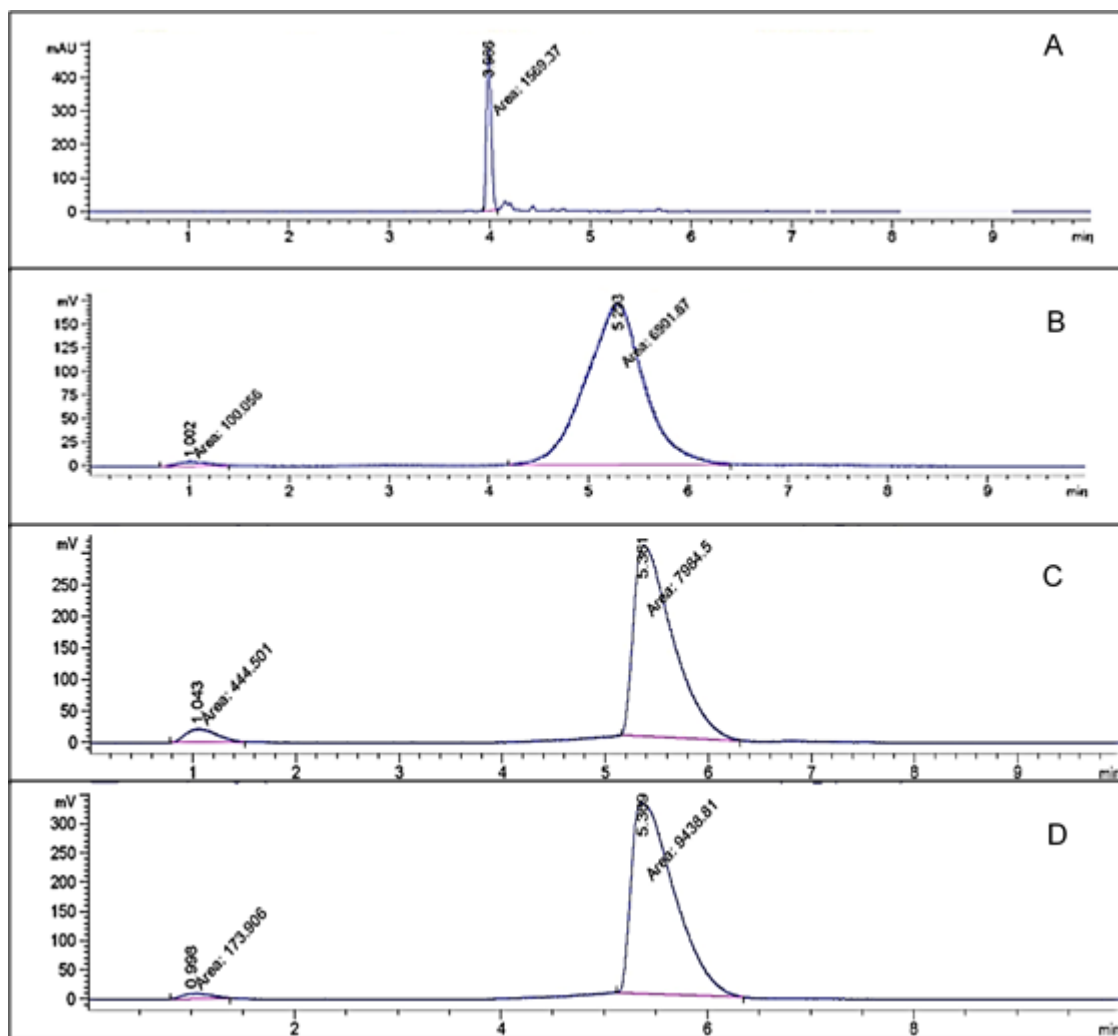


**Figura 22.** Estabilidade radioquímica dos peptídeos  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  em salina à temperatura ambiente (A) e em soro à 37°C (B). Não há diferença estatística entre os tempos avaliados ( $p > 0,05$ ) ( $n = 3-5$ ).

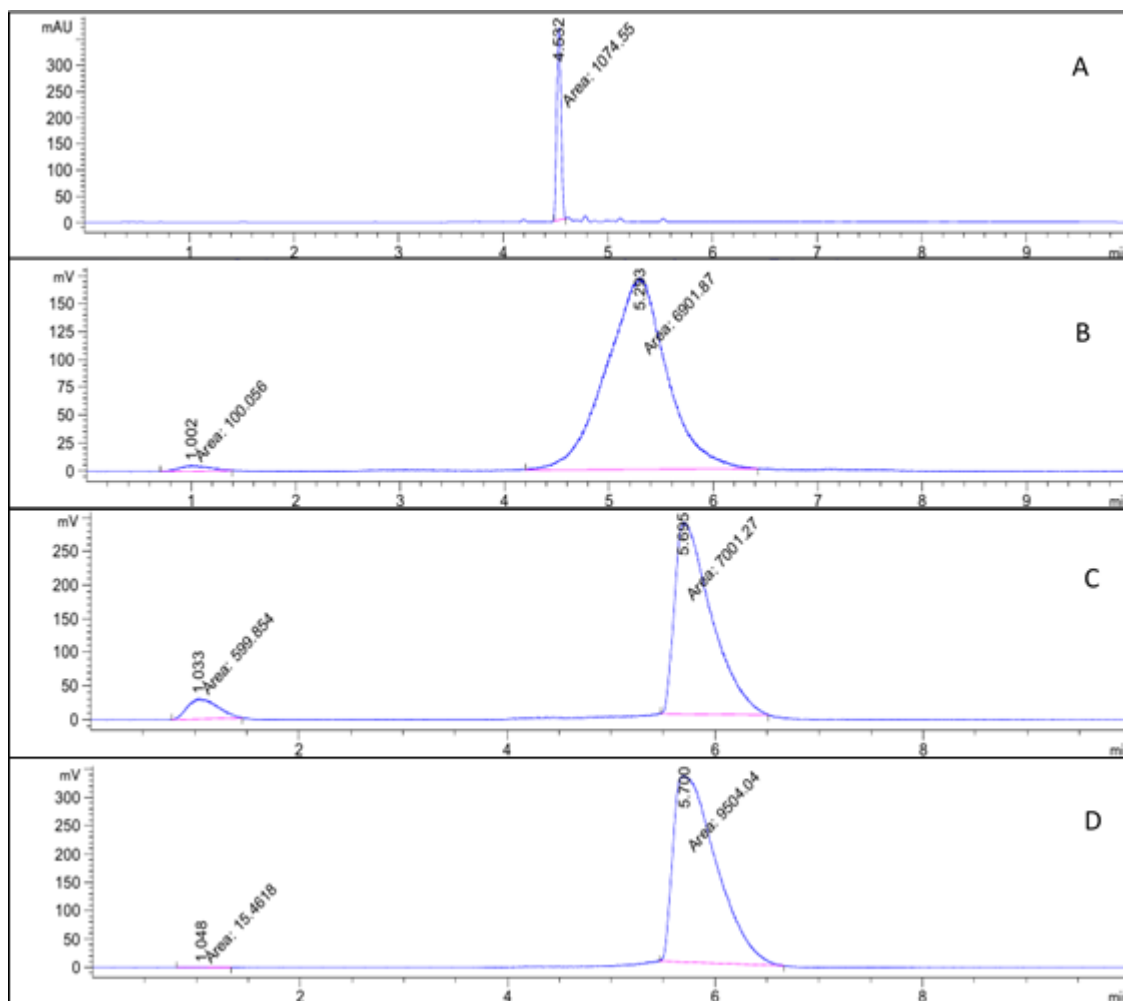
Como pode ser observado nos gráficos da figura 22, ambos radiopeptídeos apresentaram-se estáveis, tanto em temperatura ambiente quanto em soro no decorrer dos tempos investigados, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles. Destaca-se ainda que a pureza radioquímica permaneceu acima de 90%.

#### IV.2.3.1. Radiocromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

O controle de qualidade por radioCLAE-FR foi realizado para avaliar a presença do produto radiomarcado e de eventuais impurezas radioquímicas, além de determinar os respectivos tempos de retenção ( $R_t$ ). Os perfis radiocromatográficos estão representados nas **figuras 23 e 24**.



**Figura 23.** Perfis (radio)cromatográficos do peptídeo **HYIGSR** não radiomarcado **(A)**, do  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -tricarbonil **(B)**, do  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -**HYIGSR** não purificado **(C)** e do  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -**HYIGSR** purificado **(D)**.

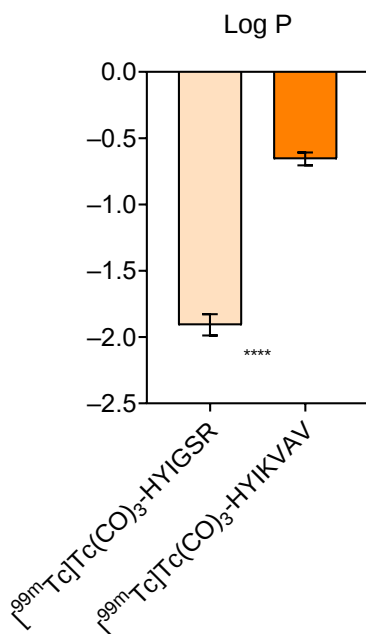


**Figura 24.** Perfis (radio)cromatográficos do peptídeo **HYIKVAV** não radiomarcado (**A**), do  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}$ -tricarbonil (**B**), do  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -**HYIKVAV** não purificado (**C**) e do  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3$ -**HYIKVAV** purificado (**D**).

O tempo de retenção do tricarbonil é de 5.293 min após a marcação de ambos os peptídeos. Os radiopeptídeos tiveram um avanço no tempo de retenção de 5.351 para **HYIGSR** e 5.695 para **HYIKVAV**, em relação aos peptídeos não radiomarcados devido à distância dos detectores. No início do perfil (radio)cromatográfico no tempo de aproximadamente 1 min sai o  $^{99m}\text{Tc}$  livre, após a purificação dos radiopeptídeos as impurezas diminuíram. Os dados obtidos por radioCLAE-FR são condizentes ao CCD.

#### IV.2.4. Determinação do coeficiente de partição (CP) dos peptídeos radiomarcados

A lipofilicidade dos radiopeptídeos foi avaliada por meio da determinação do coeficiente de partição (P) entre *n*-octanol e salina. Os dados foram expressos como logaritmo de P (Log P) e estão representados na **figura 25**.

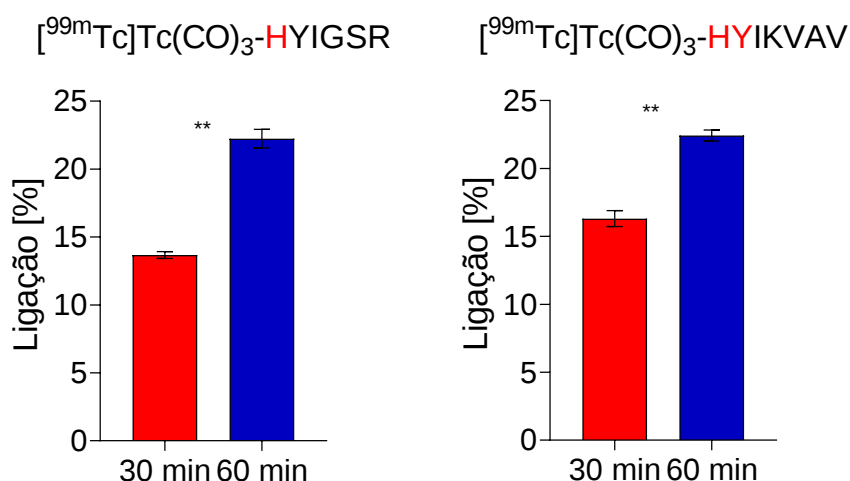


**Figura 25.** Logaritmo do coeficiente de partição (Log P) dos radiopeptídeos  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$ . Os dados estão expressos como “média ± DP” ( $n = 5$ ) e foram analisados pelo teste t de *Student*. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os radiopeptídeos (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Os resultados mostraram que o Log P do  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  foi de  $-1,91 \pm 0,08\%$  e o do  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  de  $-0,65 \pm 0,05\%$ . Logo, o fragmento  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  apresentou características menos hidrofílicas em comparação com  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$ .

#### IV.2.5. Estudo da interação dos peptídeos radiomarcados às proteínas séricas

A porcentagem de LPS foi avaliada pelo método de precipitação proteica com acetonitrila (ACN) 100% gelada nos tempos de 30 e 60 minutos. Os resultados obtidos estão representados nos gráficos da **Figura 26**.

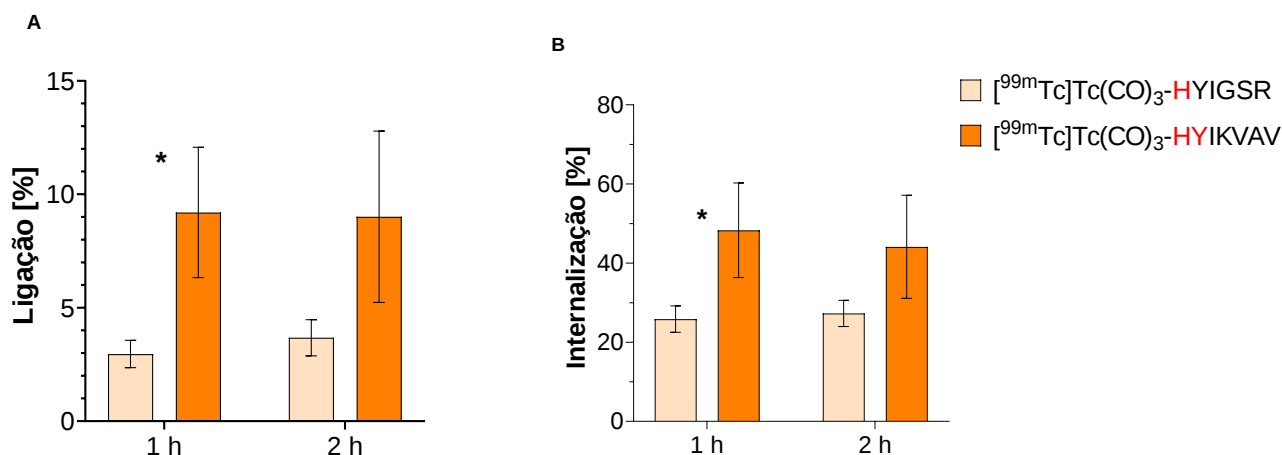


**Figura 26.** Ligação às proteínas séricas (LPS) dos radiopeptídeos  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$ . Os dados estão expressos como “média  $\pm$  DP” ( $n = 3$ ) e foram analisados pelo teste t de *Student*. Asteriscos indicam diferença estatisticamente significativa entre os tempos investigados  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$ :  $**p = 0,0035$ ;  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$ :  $**p = 0,0067$ ).

A porcentagem de LPS para o radiopeptídeo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  no tempo de 30 min foi de  $15,11 \pm 2,48\%$  e subiu para  $21,12 \pm 2,01\%$  em 60 min, para o  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  obteve  $18,08 \pm 3,11\%$  de ligação no tempo de 30 min e em 60 min de  $21,64 \pm 1,39\%$ . Os dados do Log P do coeficiente de partição corroboraram estes resultados.

#### IV.2.6. Avaliação da ligação e internalização dos peptídeos radiomarcados com células tumorais

As porcentagens de ligação e internalização dos complexos  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  às células MCF-7 estão representadas na **Figura 27**.

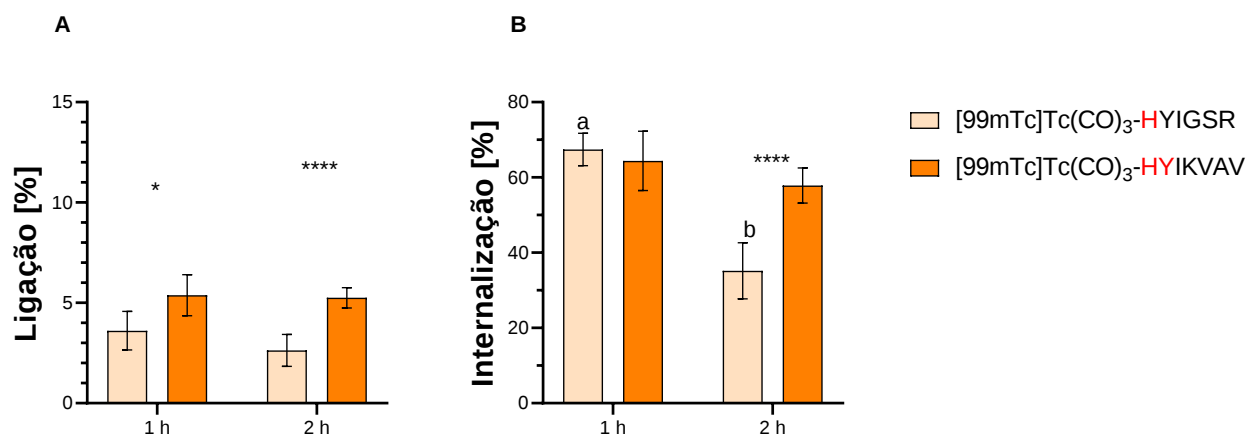


**Figura 27.** Porcentagens de ligação **(A)** e internalização **(B)** dos radiopeptídeos [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIGSR e [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIKVAV na linhagem MCF-7. Os dados estão expressos como “média ± DP” (*n* = 3) e foram analisados pelo teste t de *Student*. Com relação ao tempo de incubação (1h versus 2 h), não há diferença estatística (*p* > 0,05). Com relação aos peptídeos investigados ([<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIGSR versus [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIKVAV), há diferença estatística entre os peptídeos para o tempo de 1 h de incubação, tanto na ligação (\**p* = 0,0211) quanto na internalização (\**p* = 0,0350).

Como pode ser evidenciado pela análise dos gráficos, as porcentagens de ligação do [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIGSR foram de 2,96 ± 0,60% (1 h) a 3,68 ± 0,79 (2 h). Já o [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIKVAV teve uma ligação 9,20 ± 2,87% na primeira hora e 8,01 ± 4,57% no tempo de 2 h.

As porcentagens de internalização do [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIGSR foram de 25,85 ± 3,33% em 1 h e 27,28 ± 3,30% em 2 h. E para o [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIKVAV os dados foram de 51,74 ± 8,00% e 44,11 ± 13,02% nos tempos de 1 e 2 h, respectivamente.

A **figura 28** mostra as porcentagens da fração ligada e internalizada, respectivamente, para os peptídeos [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIGSR e [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIKVAV às células MDA-MB-231.



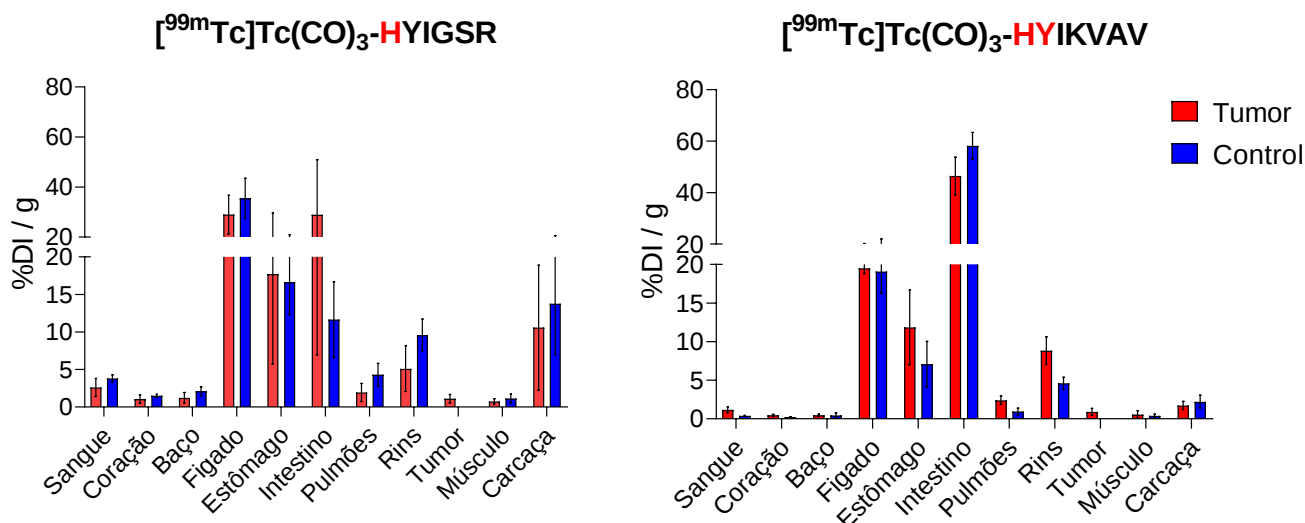
**Figura 28.** Porcentagem de **(A)** ligação e de **(B)** internalização dos peptídeos  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  na linhagem MDA-MB-231. Com relação ao tempo de incubação (1h versus 2 h), há diferença estatística somente para a internalização do peptídeo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  ( $p > 0,0001$ ). Com relação aos peptídeos investigados ( $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  versus  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$ ), há diferença estatística entre os peptídeos para o tempo de 1 h de incubação, tanto na ligação ( $p = 0,0115$ ) quanto na internalização ( $p < 0,0001$ ), e para o tempo de 2 h de incubação na internalização ( $p < 0,0001$ ) ( $n = 6$ )

O peptídeo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  apresentou um porcentagem de  $3,63 \pm 0,96\%$  em 1h e  $2,63 \pm 0,80\%$  no tempo de 2h (Figura 28 A). Já o fragmento  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  na primeira hora obteve  $5,38 \pm 1,02\%$  e  $5,25 \pm 0,50\%$  em duas horas.

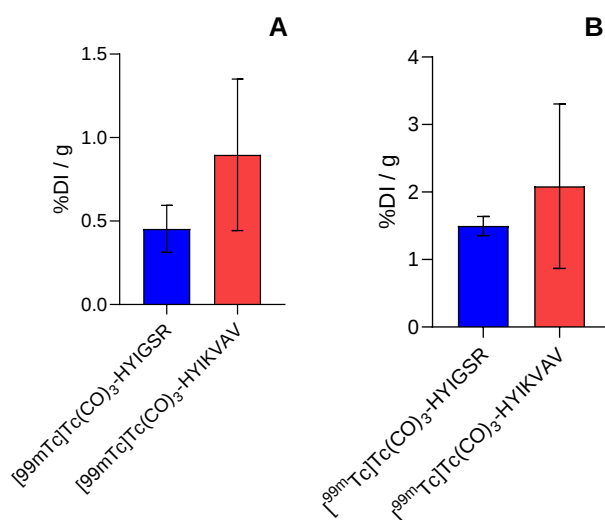
A porcentagem da fração internalizada do peptídeo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$   $67,42 \pm 4,27\%$  em 1 h e para 2 h  $35,18 \pm 7,49\%$ . Já para o  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$   $64,39 \pm 7,90\%$  e  $57,77 \pm 4,44\%$  respectivamente (Figura 28 B).

#### IV.2.7. Estudo de biodistribuição

Dois grupos de animais foram utilizados, sendo um controle (saúdável) e o outro modelo de câncer de mama induzido pela inoculação das células tumorigênicas MDA-MB-231. Após os animais atingirem a idade para a experimento foi injetado o  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  ou  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  por via endovenosa através da veia da cauda. A biodistribuição dos radiopeptídeos foi analisada no tempo de 2 horas (**Figuras 29 e 30**).



**Figura 29.** Biodistribuição dos radiopeptídeos  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  em animais controle (saudáveis) e modelo de câncer de mama (MDA-MB-231) no tempo de 2 horas. Os dados estão expressos como “média  $\pm$  SD” ( $n = 3 - 5$ ).



**Figura 30.** Comparação entre a detecção dos radiopeptídeos  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  e  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  nos tumores (A) e alvo-não alvo (B) no tempo de 2 horas. Os dados estão expressos como “média  $\pm$  SD” ( $n = 3$ ).

Os dados da biodistribuição mostram que ambos os radiopeptídeos tiveram uma rápida depuração sanguínea, houve uma captação no estômago podendo sugerir a presença de  $^{99m}\text{Tc}$  livre e captação no fígado e intestinos sendo uma via de eliminação já que a via renal não foi tão intensa. O radiopeptídeo  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  teve uma maior captação no tumor com uma relação alvo-não alvo de  $1,56 \pm 1,22\%$ .

## V. DISCUSSÃO

### V.1 Definição dos fragmentos peptídicos propostos

A escolha das sequências peptídicas para o desenvolvimento do presente trabalho baseou-se na importância e no envolvimento da molécula laminina-111 em processos de adesão celular, secreção de proteases, diferenciação e proliferação celular, e metástases em células tumorais de diversos tipos de cânceres, incluindo o câncer de mama (Nonnast et al., 2025). Como já relatado, a laminina-111 é um heterodímero composto pelas cadeias  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  e  $\gamma 1$ . Em todas as suas cadeias há a presença de sequências peptídicas biologicamente ativas. (Nirwane et al., 2022)

O peptídeo YIGSR, derivado da cadeia  $\beta 1$ , está relacionado com a inibição da angiogênese de diferentes tipos de tumores (Mokotoff et al. 1997; Jha and Moore., 2024). Como o resíduo de Y já está presente na sequência deste peptídeo, é possível radiomarcá-lo com  $^{131}\text{I}$ . Por outro lado, para a radiomarcagem com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , utilizando a metodologia do tricarbonil, foi necessária a adição do resíduo de H, obtendo-se a sequência **HYIGSR**. (Qiao et al., 2020; Facca et al., 2021)

O outro peptídeo proposto contém a sequência IKVAV derivada da cadeia  $\alpha 1$  da laminina-111. Esta sequência é descrita por promover adesão celular e migração tendo um papel importante no crescimento tumoral, metástase, secreção de proteases e angiogênese em diversos tipos de tumores (González-Pérez et al., 2022; Jha and Moore., 2024). Entretanto, para permitir o processo de radiomarcagem com o  $^{131}\text{I}$  foi incorporado o aminoácido Y e para a radiomarcagem com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , também pelo método do tricarbonil, foi incorporado o aminoácido H, que não estavam na sequência original do peptídeo. Portanto, as sequências dos peptídeos utilizadas em nosso estudo foram **YIKVAV** e **HYIKVAV**.

Assim, a proposição dos estudos de radiomarcagem dos dois peptídeos biologicamente ativos da laminina-111, bem como os estudos de ligação e internalização em células tumorais de mama e a biodistribuição em modelos animais de câncer de mama poderiam trazer importantes elucidações para o

potencial uso desses fragmentos como moléculas direcionadoras para o tecido tumoral.

Resumidamente, os peptídeos foram sintetizados, caracterizados e purificados de maneira bastante satisfatória para iniciar o processo de radiomarcção subsequente.

## **V.2. Utilização dos radionuclídeos $^{131}\text{I}$ e $^{99\text{m}}\text{Tc}$**

Os radioisótopos escolhidos para este estudo foram o  $^{131}\text{I}$  e  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , disponíveis nas formas químicas de iodeto de sódio ( $^{131}\text{I}^-\text{Na}^+$ ) e pertecnetato de sódio ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ), respectivamente. Ambos apresentam características físicas favoráveis para a radiomarcção de moléculas do tipo peptídeos. Além disso, o  $^{131}\text{I}^-\text{Na}^+$  apresenta alto índice de pureza radionuclídica, química de fácil marcação e distribuição estabelecida em todo o Brasil (Durante et al., 2019; Sobral et al., 2020). Já o  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$  representa quase 80-85% de todos os estudos diagnósticos realizados na Medicina Nuclear (Sobral et al., 2022) e é facilmente obtido através de um gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m ( $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ).

O método utilizado para a radiomarcção dos peptídeos com  $^{131}\text{I}$  foi a substituição eletrofílica aromática que, através da utilização de um agente oxidante (cloramina T), provoca a oxidação do iodeto ( $^{131}\text{I}^-$ ) a iodato ( $^{131}\text{I}^+$ ) e sua ligação covalente ao anel aromático da cadeia lateral do resíduo da Y. Trata-se de um método bem descrito na literatura com alto rendimento radioquímico, mas dependente da sequência a ser radiomarcada (Hunter, 1962; Durante et al., 2019; Molavipordanjani et al., 2019). No nosso caso, a escolha do  $^{131}\text{I}$  foi em razão da disponibilidade (fornecimento pelo IPEN-SP) e pelo  $T_{1/2}$  de aproximadamente oito dias, possibilitando que estudos de estabilidade de longo prazo fossem realizados.

A obtenção dos peptídeos radiomarcados com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  foi possível pela presença do aminoácido H nos peptídeos para a formação do complexo tricarbonil (Waibel et al., 1999). O radioisótopo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  possui características físicas para a obtenção de imagens SPECT, como emissão gama de baixa energia (~140 KeV) e  $T_{1/2}$  de aproximadamente 6 horas. Para a radiomarcção dos

peptídeos com  $^{99m}\text{Tc}$  foi utilizado um método bem descrito na literatura, o método do complexo tricarbonil, justificando a adição do aminoácido H na sequência (Tejeria et al., 2017; Sobral et al., 2022).

### ***V.2.1 Estudo da influência dos solventes na avaliação do rendimento radioquímico da marcação***

Para quantificarmos o rendimento radioquímico da reação de marcação dos  $^{131}\text{I}$ -peptídeos e  $^{99m}\text{Tc}$  $\text{Tc}(\text{CO})_3$ -peptídeos, primeiramente foi estabelecido o melhor sistema eluente para ser utilizado nas análises cromatográficas por meio da técnica de CCD ascendente. De acordo com Zimmer e Pavel 1978, é considerado o solvente mais adequado aquele que consegue separar de forma mais eficiente o radioisótopo livre do peptídeo radiomarcado.

Neste estudo, para os peptídeos radiomarcados com  $^{131}\text{I}$ , utilizando o sistema ACN 95% em TLC, foi observado um  $R_f$  de 0,1–0,2 para os peptídeos radiomarcados, enquanto que o radionuclídeo apresentou um  $R_f$  de 0,9-1,0. Já para os peptídeos radiomarcados com  $^{99m}\text{Tc}$ , o sistema foi salina em TLC, obtendo-se um  $R_f$  de 0,1-0,2 para o  $^{99m}\text{Tc}$  $\text{Tc}$ -tricarbonil, de 0,3-0,8 para os radiopeptídeos e de 0,9-1,0 para o  $^{99m}\text{Tc}$  livre (**Figuras 18 a 21**).

Após definido o melhor sistema de análise cromatográfica para cada peptídeo e também as melhores condições de radiomarcção, rendimentos radioquímicos de aproximadamente 93% e 92% foram obtidos para os fragmentos  $^{131}\text{I}$ -YIGSR e  $^{131}\text{I}$ -YIKVAV, respectivamente. E, após purificação dos  $^{99m}\text{Tc}$  $\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIGSR e  $^{99m}\text{Tc}$  $\text{Tc}(\text{CO})_3$ -HYIKVAV foram obtidas purezas superiores a 95% para ambos.

Sobral e colaboradores (2020) marcaram dois peptídeos EEEYFELV e DEDEYFELV que interagem com o receptor EGF utilizando o radioisótopo  $^{131}\text{I}$  e obtiveram rendimentos de  $90,80 \pm 5,90\%$  e  $95,10 \pm 3,39\%$ , respectivamente. Posteriormente os mesmos autores marcaram GRGDHV com  $^{99m}\text{Tc}$ , pelo método do tricarbonil, e obtiveram um rendimento de  $98,30 \pm 0,17\%$  (Sobral et al., 2022).

As análises dos rendimentos e purezas radioquímicas também foram realizadas por CLAE. Através desta técnica foi possível determinar os  $R_t$ 's dos peptídeos radiomarcados e do radionuclídeo livre, além de avaliar a purezas radioquímicas dos complexos radiomarcados. Vale a pena mencionar que os radiopeptídeos apresentaram um  $R_t$  ligeiramente maior quando comparados aos peptídeos não radiomarcados, devido ao tempo necessário para que as amostras percorressem do detector de UV para o detector de radioatividade.

Os resultados das análises da CLAE-FR corroboraram os resultados da CCD e confirmaram o sucesso do processo de radiomarcção com a obtenção de peptídeos radiomarcados com purezas >90%, mostrando a importância das análises da CCD na avaliação do rendimento radioquímico de peptídeos marcados, uma vez que é um método rápido, confiável e de fácil execução (Durante et al., 2019; Fuscaldi et al., 2021).

### **V.3. Determinação da estabilidade dos peptídeos radiomarcados**

O radioisótopo  $^{131}\text{I}$  possui propriedades que permitem sua utilização ao longo de uma semana, pois sua  $T_{1/2}$  é de ~8 dias (Kowalsky et al., 2004). Entretanto, sua atividade vai diminuindo ao longo dos dias e, assim, os estudos de estabilidade foram feitos até 48 horas pós-marcação. Além disso, para a realização de futuros estudos *in vivo* é necessária alta atividade específica. Já o radioisótopo  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  tem uma  $T_{1/2}$  de ~6 (EPA, 2026) e, portanto, os estudos de estabilidade foram feitos somente até 4 horas pós-marcação. Conforme descrito nos resultados, foi avaliada a estabilidade dos peptídeos radiomarcados tanto em meio reacional quanto em soro humano. Vale lembrar que uma alta estabilidade radioquímica dos radiopeptídeos é essencial para uma possível aplicação na área clínica. Estudos realizados por Du e colaboradores (2025) mostraram que  $^{131}\text{I}$ -peptídeos permaneceram estáveis por até 72 h após a marcação.

Os fragmentos  $^{131}\text{I}$ -YIGSR e  $^{131}\text{I}$ -YIKVAV foram bastante estáveis, com uma pequena redução de aproximadamente 5% e 10%, respectivamente, em 48 h pós-marcação. Vale ressaltar que não houve diferenças significativas na pureza radioquímica destes radiopeptídeos quando mantidos em temperatura

ambiente ou refrigerados, além de se manterem estáveis durante todo o período avaliado após incubação em soro. Por esse motivo, ambos os peptídeos seguiram para o estudo com o radioisótopo  $^{99m}\text{Tc}$ , mostrando estabilidade durante o tempo estudado tanto no meio reacional como em soro pós-marcação.

#### **V.4. Determinação da lipofilicidade e da ligação às proteínas séricas dos peptídeos radiomarcados**

A lipofilicidade de uma biomolécula é determinada pela sua estrutura química e pode ser refletida por sua partição entre um solvente orgânico (como o n-octanol) e outro aquoso (como a água ou salina). Os valores são expressos como o logaritmo do coeficiente de partição (Log P). Valores negativos de Log P são característicos de moléculas hidrofílicas, ou seja, quanto mais negativo o Log P, mais hidrofílica é a molécula. Compostos hidrofóbicos possuem Log P superior a 1, pois quanto maior o Log P, maior é a afinidade da substância pela fase orgânica e, portanto, mais hidrofóbico é o composto. Valores próximos a 0 são característicos de moléculas menos hidrofílicas ou anfifílicas (Soares et al., 2022).

De acordo com Kothari e colaboradores (2003), o coeficiente de partição é uma das principais propriedades físico-químicas de um fármaco, pois sua farmacocinética e biodistribuição *in vivo* dependem da sua característica hidrofílica ou hidrofóbica.

Além disso, a interação das moléculas com as proteínas séricas representa um importante fenômeno biológico que irá influenciar a biodistribuição, a taxa de eliminação, como também o acesso ao sítio de ligação e metabolismo do radiocomposto (Sobral et al., 2022; Fuscaldi et al., 2023; Mendonça et al., 2024).

Os resultados obtidos mostraram que todos os radiopeptídeos apresentaram valores negativos de Log P, ou seja, apresentam características hidrofílicas. Sendo o  $[^{131}\text{I}]\text{I-YIGSR}$  e o  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  os mais hidrofílicos em comparação com os outros fragmentos. Como era o esperado, a baixa lipofilicidade de um composto reflete geralmente em uma menor interação do mesmo com as proteínas séricas, em outras palavras, quanto mais negativo o Log P do composto menores valores de porcentagem de ligação às proteínas

séricas são esperados, como também foi observado com os fragmentos [<sup>131</sup>I]-YIGSR e [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIGSR.

Vários estudos com peptídeos contendo o domínio RGD mostraram valores de Log P negativos, independente do radioisótopo utilizado (Sobral et al., 2022). É importante salientar que fármacos mais hidrofílicos são fundamentalmente eliminados do organismo pela via urinária. Por outro lado, fármacos mais hidrofóbicos passam por metabolização, etapa fundamental para a eliminação desses compostos do organismo, ou são eliminados pela via biliar, podendo ser reabsorvidos e voltar para a circulação sistêmica (Brunton et al., 2010; Soares et al 2022).

#### **V.5. Avaliação da interação *in vitro* dos peptídeos radiomarcados com as células tumorais**

Os resultados obtidos nos estudos *in vitro* de ligação e internalização com as células da linhagem MCF-7 para o peptídeo [<sup>131</sup>I]-YIGSR apresentou valores ao redor de 8% e 41%, respectivamente. Por outro lado, para o peptídeo [<sup>131</sup>I]-YIKVAV, as frações ligada e internalizada nesta linhagem foram de aproximadamente 15% e 78%, respectivamente. Já para a linhagem MDA-MB-231, ambos radiopeptídeos apresentaram valores de fração ligada abaixo de 10% e uma porcentagem de fração internalizada entre 43 e 60%.

Os radiopeptídeos [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIGSR e [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-HYIKVAV tiveram uma ligação com a linhagem MCF-7 de aproximadamente 4 e 8% e de internalização 27 e 44% no tempo de 2 h, respectivamente. Para a linhagem MDA-MB-231 ambos os radiopeptídeos tiveram uma ligação no tempo de 2 h de aproximadamente 2 e 5% e uma internalização ao redor de 35 e 57%, respectivamente.

De Barros e colaboradores (2013) utilizaram a linhagem MDA-MB-231 para avaliarem a ligação do peptídeo bombesina marcado com <sup>99m</sup>Tc. Frações ligada e internalizada de aproximadamente 2,5% e 16,8%, respectivamente, foram obtidas nos tempos de 1 h. Já com 4 h de incubação um aumento foi observado tanto para a ligação (9%) quanto para a internalização (20%).

A diferença obtida entre as diferentes linhagens celular para os radiopeptídeos se deve, provavelmente, pela diferença de expressão dos receptores nestas

linhagens. Jha e Moore (2024) demonstraram que o peptídeo YIGSR está relacionado à inibição da angiogênese, o que pode ser corroborado pelos nossos resultados, uma vez que este peptídeo apresentou a menor porcentagem, tanto de fração ligada (~ 6%) quanto internalizada (~ 50%), em 24 h de incubação. O peptídeo IKVAV está associado a promoção de adesão e migração celular (González-Pérez et al., 2022; Jha and Moore., 2024) o que pode ser correlacionado ao alto valor de fração internalizada. Os nossos resultados mostraram uma porcentagem de internalização ao redor de 75% com 1 h de incubação para os fragmentos marcados com  $^{131}\text{I}$  e de entorno de 65% para os fragmentos com  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ .

Desta forma, os nossos resultados mostraram que os peptídeos propostos apresentaram uma boa interação *in vitro* em ambos os tipos de linhagens celulares, relacionadas ao câncer de mama, mesmo sendo linhagens de diferentes subtipos e com características celulares de invasão e expressão gênicas diferentes.

## V.6. Estudo de biodistribuição

Os radiopeptídeos [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIGSR e [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIKVAV mostraram uma rápida depuração sanguínea tanto nos animais controle como nos animais modelo nos tempos de 15 min e 120 min. Para órgão não-alvo a porcentagem foi menor que 5%, o estômago e a tireoide apresentaram uma maior porcentagem de ligação podendo sugerir presença de  $^{131}\text{I}$  livre. Para ambos os radiopeptídeos, a relação alvo-não alvo foi maior no tempo de 120 min, sendo que o [ $^{131}\text{I}$ ]I-YIKVAV apresentou o melhor resultado.

Já para os radiopeptídeos [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc(CO) $_3$ -HYIGSR e [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc(CO) $_3$ -HYIKVAV foi realizado a biodistribuição só no tempo de 120 min. Para ambos os radiopeptídeos a biodistribuição apresentou também uma rápida depuração sanguínea e porcentagem menor que 5% para os órgãos não-alvo. Uma alta porcentagem no estômago indica a presença parcial de  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  livre; já no fígado e intestino, uma parcela de [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]-tricarbonil; enquanto os rins representam a via urinária de eliminação dos radiopeptídeos. Na **figura 30** tanto a comparação

entre os radiopetídeos ligado ao tumor como a porcentagem alvo-não alvo apresenta uma maior porcentagem para o  $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$ .

Em comparação com a sequência YIGSR e o seu derivado HYIGSR ambos tiveram uma biodistribuição muito parecida. O mesmo acontece com as sequências derivadas do fragmento IKVAV, YIKVAV e HYIKVAV.

## VI. CONCLUSÕES

- Os peptídeos YIGSR, **HYIGSR**, **YIKVAV** e **HYIKVAV** foram eficientemente sintetizados, caracterizados e purificados;
- Os estudos radioquímicos demonstraram que as metodologias de radiomarcagem dos peptídeos, utilizando o método da cloramina T ( $^{131}\text{I}$ ) e o método do tricarbonil ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ), se mostraram bastante eficientes com a obtenção dos fragmentos radiomarcados com altos rendimento e pureza radioquímicos (>90%);
- Os estudos de estabilidade mostraram que os radiopeptídeos [ $^{131}\text{I}$ ]-YIGSR, [ $^{131}\text{I}$ ]-**YIKVAV**, [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc(CO)<sub>3</sub>-**HYIGSR** e [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc(CO)<sub>3</sub>-**HYIKVAV** apresentaram boa estabilidade radioquímica, tanto em meio reacional quanto em soro humano.
- O estudo de lipofilicidade mostrou que os fragmentos [ $^{131}\text{I}$ ]-YIGSR e [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc(CO)<sub>3</sub>-**HYIGRS** são mais hidrofílicos do que os fragmentos [ $^{131}\text{I}$ ]-**YIKVAV** e [ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ]Tc(CO)<sub>3</sub>-**HYIKVAV**, o que foi corroborado pela menor porcentagem de LPS dos derivados do YIGSR em relação aos derivados do IKVAV, sugerindo alta compatibilidade para futuras aplicações clínicas.
- Os estudos de interação com as linhagens de câncer de mama mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os peptídeos avaliados. Estes resultados podem estar relacionados aos processos de adesão, migração e angiogênese que estes peptídeos estão associados.
- Estudos de biodistribuição *in vivo* e *ex vivo* foram realizados para melhor compreensão da interação dos fragmentos peptídicos radiomarcados com o tumor de mama, sendo que os fragmentos derivados do peptídeo IKVAV mostraram melhor interação com o tecido tumoral.

## VII. RESUMO

**Introdução:** O câncer de mama vem sendo considerado um importante problema de saúde pública por ser o tumor mais comum entre as mulheres. Diversos estudos demonstram que peptídeos biologicamente ativos derivados da laminina-111 regulam a expressão gênica em células de câncer de mama, entre eles o peptídeo YIGSR, derivado da cadeia  $\beta 1$ , e o peptídeo bioativo IKVAV, representante da cadeia  $\alpha 1$ .

**Objetivo:** Este estudo teve como objetivo principal a síntese e a padronização da radiomarcagem dos peptídeos YIGSR, YIKVAV, HYIGSR e HYIKVAV com  $[^{131}\text{I}]\text{NaI}$  e  $\text{Na}^{99\text{mTc}}\text{O}_4$ , bem como a avaliação da ligação e internalização desses compostos em células tumorais relacionadas ao câncer de mama, além da biodistribuição em animais controle e em modelo experimental de câncer de mama.

**Métodos:** Os peptídeos foram sintetizados pela estratégia Fmoc/tBu. A caracterização e a purificação foram realizadas por CLAE-FR. Os peptídeos YIGSR e YIKVAV foram marcados com o radionuclídeo  $^{131}\text{I}$  pelo método da Cloramina T, enquanto os peptídeos HYIGSR e HYIKVAV foram marcados com o radionuclídeo  $^{99\text{mTc}}$  utilizando o método tricarbonil. O rendimento radioquímico dos peptídeos  $[^{131}\text{I}]\text{-YIGSR}$ ,  $[^{131}\text{I}]\text{-YIKVAV}$ ,  $[^{99\text{mTc}}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  e  $[^{99\text{mTc}}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  foi avaliado por cromatografia ascendente em camada delgada e por CLAE-FR. Estudos de estabilidade foram realizados em temperatura ambiente e sob refrigeração ( $4^\circ\text{C}$ ) por até 48 h, além de estudos em soro humano por até 24 h para os peptídeos radiomarcados com iodo. Para os peptídeos radiomarcados com tecnécio, os estudos de estabilidade foram conduzidos em temperatura ambiente e em soro humano por até 4 h. A ligação às proteínas séricas foi avaliada pelo método de precipitação proteica com acetonitrila 100% gelada, e o coeficiente de partição dos radiopeptídeos foi determinado e expresso em Log P. A avaliação da ligação e internalização dos peptídeos em células tumorais (MDA-MB-231 e MCF-7) foi realizada nos tempos de 1, 4 e 24 h para os peptídeos radiomarcados com iodo, e de 1 e 2 h para os peptídeos radiomarcados com tecnécio. Os estudos de biodistribuição foram realizados em animais controle e em modelo de câncer de mama inoculado com células MDA-MB-231 nos tempos de 15 min e 2 h para os peptídeos  $[^{131}\text{I}]\text{-}$

YIGSR e [131I]I-YIKVAV, e no tempo de 2 h para os peptídeos [99mTc]Tc(CO)3-HYIGSR e [99mTc]Tc(CO)3-HYIKVAV.

**Resultados:** Os peptídeos propostos foram sintetizados, caracterizados, purificados e radiomarcados com eficiência. Após a padronização da radiomarcagem, rendimentos radioquímicos superiores a 90% foram obtidos para todos os fragmentos. Os estudos de estabilidade demonstraram boa estabilidade dos compostos. Os peptídeos apresentaram características hidrofílicas e porcentagem de ligação às proteínas séricas em torno de 20%, compatível com aplicações clínicas. Além disso, os radiopeptídeos demonstraram capacidade de ligação e internalização em células tumorais (MDA-MB-231 e MCF-7), com diferenças estatisticamente significativas entre os compostos avaliados. Nos estudos de biodistribuição, todos os fragmentos apresentaram rápida depuração sanguínea e captação tumoral, destacando-se os derivados [131I]I-YIKVAV e [99mTc]Tc(CO)3-HYIKVAV, que apresentaram os melhores resultados.

**Conclusão:** Os peptídeos foram eficientemente sintetizados e radiomarcados. Os radiopeptídeos apresentaram características promissoras para futuras aplicações clínicas, demonstrando capacidade de ligação e internalização em células tumorais de câncer de mama, além de perfil favorável de biodistribuição.

**Palavras-chave:** Câncer de mama; peptídeos; compostos radiofarmacêuticos; radioisótopos de iodo e tecnécio.

## VII. ABSTRACT

**Introduction:** Breast cancer is considered a major public health issue, as it is the most common malignancy among women worldwide. Several studies have demonstrated that biologically active peptides derived from laminin-111 regulate gene expression in breast cancer cells, including the YIGSR peptide derived from the  $\beta$ 1 chain and the bioactive peptide IKVAV, representative of the  $\alpha$ 1 chain.

**Objective:** The main objective of this study was the synthesis and standardization of the radiolabeling of the peptides YIGSR, YIKVAV, HYIGSR, and HYIKVAV with  $[^{131}\text{I}]\text{NaI}$  and  $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ , as well as the evaluation of their binding and internalization in breast cancer-related tumor cells and their biodistribution in control animals and an experimental breast cancer model.

**Methods:** The peptides were synthesized using the Fmoc/tBu strategy. Characterization and purification were performed by RP-HPLC. The peptides YIGSR and YIKVAV were labeled with the radionuclide  $^{131}\text{I}$  using the Chloramine-T method, whereas HYIGSR and HYIKVAV were labeled with the radionuclide  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  using the tricarbonyl method. The radiochemical yield of the peptides  $[^{131}\text{I}]\text{I}$ -YIGSR,  $[^{131}\text{I}]\text{I}$ -YIKVAV,  $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$ , and  $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  was evaluated by ascending thin-layer chromatography and RP-HPLC. Stability studies were carried out at room temperature and under refrigeration ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) for up to 48 h, as well as in human serum for up to 24 h for the iodine-radiolabeled peptides. For the technetium-radiolabeled peptides, stability studies were conducted at room temperature and in human serum for up to 4 h. Serum protein binding was evaluated using the protein precipitation method with ice-cold 100% acetonitrile, and the partition coefficient of the radiopeptides was determined and expressed as Log P. Binding and internalization assays in tumor cells (MDA-MB-231 and MCF-7) were performed at 1, 4, and 24 h for the iodine-radiolabeled peptides and at 1 and 2 h for the technetium-radiolabeled peptides. Biodistribution studies were carried out in control animals and in a breast cancer model inoculated with MDA-MB-231 cells at 15 min and 2 h for  $[^{131}\text{I}]\text{I}$ -YIGSR and  $[^{131}\text{I}]\text{I}$ -YIKVAV, and at 2 h for  $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIGSR}$  and  $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$ .

**Results:** The proposed peptides were efficiently synthesized, characterized, purified, and radiolabeled. After optimization of the radiolabeling procedures, radiochemical yields greater than 90% were obtained for all fragments. Stability

studies demonstrated good stability of the compounds. The peptides exhibited hydrophilic characteristics and approximately 20% serum protein binding, which is highly compatible with clinical applications. Furthermore, the radiopeptides demonstrated the ability to bind to and internalize into tumor cells (MDA-MB-231 and MCF-7), with statistically significant differences observed among the evaluated compounds. In biodistribution studies, all fragments exhibited rapid blood clearance and tumor uptake, with the derivatives  $[^{131}\text{I}]\text{-YIKVAV}$  and  $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-HYIKVAV}$  showing the most promising results.

**Conclusion:** The peptides were successfully synthesized and radiolabeled. The radiopeptides demonstrated promising characteristics for future clinical applications, including binding and internalization capacity in breast cancer tumor cells, as well as favorable biodistribution profiles.

**Keywords:** Breast cancer; peptides; radiopharmaceutical compounds; iodine and technetium radioisotopes.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi Gharibkandi, Nasrin & Molavipordanjani, Sajjad & Akbari, Jafar & Hosseinimehr, Seyed Jalal. (2019). Pharmacokinetic Evaluation of 99mTc-radiolabeled Solid Lipid Nanoparticles and Chitosan Coated Solid Lipid Nanoparticles. *Current Drug Metabolism*. 20. 10.2174/1389200220666191112145808.
- Bahar A, Porbaran M, Khazaei M, Tahmasebi H. Antimicrobial peptides for anticancer and antiviral therapy: last promising update. *Discov Oncol*. 2025 Oct 29;16(1):1991. doi: 10.1007/s12672-025-03855-8. PMID: 41160325; PMCID: PMC12572512.
- Brassart-Pasco S, Brézillon S, Brassart B, Ramont L, Oudart J-B and Monboisse JC (2020) Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression. *Front. Oncol*. 10:397. doi: 10.3389/fonc.2020.00397
- Bray F , Laversanne M , Sung H , et al. Estatísticas globais de câncer 2022: estimativas GLOBOCAN de incidência e mortalidade em todo o mundo para 36 tipos de câncer em 185 países . *CA Cancer J Clin* . 2024 ; **74** ( 3 ) : 229 - 263 .
- Bresalier, RS; Schwartz, B; Kim, YS; Duh, QY; Kleinman, HK, Sullam, PM. The laminin alpha 1 chain Ile-Lys-Val-Ala-Val (IKVAV)-containing peptide promotes liver colonization by human colon cancer cells. **Cancer Res**. 1995;55:2476-2480.
- Céspedes, GF; Vicente, EF; Cilli, EM; Jubilut, GN; Nakaie, CR; Use of FTIR in the obtention of resins and peptides synthesis in solid phase. **Química Nova**. 2013;34(4):589-594.
- Chen S, Cao Z, Prettnner K, et al. Estimates and Projections of the Global Economic Cost of 29 Cancers in 204 Countries and Territories From 2020 to 2050. *JAMA Oncol*. 2023;9(4):465–472. doi:10.1001/jamaoncol.2022.7826
- Colavito SA, Zou MR, Yan Q, Nguyen DX, Stern DF. Significance of glioma-associated oncogene homolog 1 (GLI1) expression in claudin-low breast cancer and crosstalk with the nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFκB) pathway. *Breast Cancer Res*. 2014 Sep

25;16(5):444. doi: 10.1186/s13058-014-0444-4. PMID: 25252859; PMCID: PMC4303124.

D. Kashyap, D. Pal, R. Sharma et al., "Global Increase in Breast Cancer Incidence: Risk Factors and Preventive Measures," *BioMed Research International*, vol. 2022, Article ID 9605439, 16 pages, 2022.

Danielle V. Sobral, Leonardo L. Fuscaldi, Ana Claudia R. Durante, Mayara G. Rangel, Larissa R. Oliveira, Fernanda F. Mendonça, Ana Cláudia C. Miranda, Jorge M. Cabeza, Wagner R. Montor, Francisco R. Cabral, Marycel F.F. Barboza, Luciana Malavolta, Radiochemical and biological properties of peptides designed to interact with EGF receptor: Relevance for glioblastoma, *Nuclear Medicine and Biology*, Volumes 88–89, 2020, Pages 14-23, ISSN 0969-8051, <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2020.07.001>.

Du, J., Ren, W., Liu, W. et al. Experimental study of iodine-131 labeling of a novel tumor-targeting peptide, TFMP-Y4, in the treatment of hepatocellular carcinoma with internal irradiation. *BMC Cancer* **25**, 245 (2025). <https://doi.org/10.1186/s12885-025-13666-3>

Duatti A. Review on <sup>99m</sup>Tc radiopharmaceuticals with emphasis on new advancements. *Nucl. Med. Biol.* 2020 doi: 10.1016/j.nucmedbio.2020.05.005.

EPA: [https://www.epa.gov/radiation/radionuclide-basics-technetium-99?utm\\_source=chatgpt.com](https://www.epa.gov/radiation/radionuclide-basics-technetium-99?utm_source=chatgpt.com) Acesso em 8 de maio de 2026.

Facca, V.J., Al-saden, N., Ku, A. et al. Imaging of HER2-Positive Tumors in NOD/SCID Mice with Pertuzumab Fab-Hexahistidine Peptide Immunoconjugates Labeled with [<sup>99m</sup>Tc]-(I)-Tricarbonyl Complex. *Mol Imaging Biol* **23**, 495–504 (2021). <https://doi.org/10.1007/s11307-020-01571-z>

EROLE, P.; BOSCH, A.; PÉREZ-FIDALGO, J. A.; LLUCH, A. *Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways*. *Cancer Treatment Reviews*, v. 38, n. 6, p. 698–707, 2012. DOI: 10.1016/j.ctrv.2011.11.005

Fields, GB; Noble, RL. Solid-phase peptide-synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino-acids. *Int. J. Pept. Prot. Res.* 1990;35(3):161-214.

- Fuscaldi, L.L.; Sobral, D.V.; Durante, A.C.R.; Mendonça, F.F.; Miranda, A.C.C.; da Cunha, M.L.; Malavolta, L.; Mejia, J.; de Barboza, M.F. Standardization of the [68Ga]Ga-PSMA-11 Radiolabeling Protocol in an Automatic Synthesis Module: Assessments for PET Imaging of Prostate Cancer. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 385. <https://doi.org/10.3390/ph14050385>
- Fuscaldi LL, Sobral DV, Durante ACR, Mendonça FF, Miranda ACC, Salgueiro C, de Castiglia SG, Yamaga LYI, da Cunha ML, Malavolta L, de Barboza MF and Mejia J (2023) Radiochemical and biological assessments of a PSMA-I&S cold kit for fast and inexpensive 99mTc-labeling for SPECT imaging and radioguided surgery in prostate cancer. *Front. Chem.* 11:1271176. doi: 10.3389/fchem.2023.1271176
- González-Pérez F, Alonso M, González de Torre I, Santos M, Rodríguez-Cabello JC. Protease-Sensitive, VEGF-Mimetic Peptide, and IKVAV Laminin-Derived Peptide Sequences within Elastin-Like Recombinamer Scaffolds Provide Spatiotemporally Synchronized Guidance of Angiogenesis and Neurogenesis. *Adv Healthc Mater.* 2022 Nov;11(22):e2201646. doi: 10.1002/adhm.202201646. Epub 2022 Sep 30. PMID: 36099430; PMCID: PMC11468767.
- Hayashi H, Horinokita I, Yamada Y, Hamada K, Takagi N, Nomizu M. Effects of laminin-111 peptide coatings on rat neural stem/progenitor cell culture. *Exp Cell Res.* 2021 Mar 1;400(1):112440. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112440. Epub 2020 Dec 22. PMID: 33359470.
- Hozumi K, Sasaki A, Yamada Y, Otagiri D, Kobayashi K, Fujimori C, Katagiri F, Kikkawa Y, Nomizu M. Reconstitution of laminin-111 biological activity using multiple peptide coupled to chitosan scaffolds. *Biomaterials.* 2012 Jun;33(17):4241-50. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.02.055. Epub 2012 Mar 20. PMID: 22436803.
- IAEA. International Atomic Energy Agency. Labelling of small biomolecules using novel technetium-99m. Vienna 2007. Acesso em: 20 maio 2026
- INCA – Instituto Nacional de Câncer. *Câncer de mama*. Rio de Janeiro: INCA, 2024. Disponível em: [Instituto Nacional de Câncer \(INCA\)](https://www.inca.org.br/). Acesso em: 21 maio 2026.
- Jha A, Moore E. YIGSR, A Laminin-Derived Peptide, Dictates a Concentration-Dependent Impact on Macrophage Phenotype Response. *Cell Mol Bioeng.*

- 2024 Jul 26;17(5):423-440. doi: 10.1007/s12195-024-00810-5. PMID: 39513005; PMCID: PMC11538123.
- Jha A, Moore E. Laminin-derived peptide, IKVAV, modulates macrophage phenotype through integrin mediation. *Matrix Biol Plus.* 2024 Feb 15;22:100143. doi: 10.1016/j.mbplus.2024.100143. PMID: 38405086; PMCID: PMC10884775.
- Kaiser, E; Colescot, RI; Bossinge, CD; Cook, PI. Color test for detection of free terminal amino groups in solid-phase synthesis of peptides. **Anal. Biochem.** 1970;34(2):595-598.
- Kikkawa Y, Hozumi K, Katagiri F, Nomizu M, Kleinman HK, Koblinksi JE. Laminin-111-derived peptides and cancer. *Cell Adh Migr.* 2013 Jan-Feb;7(1):150-256. doi: 10.4161/cam.22827. Epub 2012 Dec 21. PMID: 23263633; PMCID: PMC3544779.
- Kikkawa, Y; Hozumi, K; Katagiri, F; Nomizu, M; Kleinman,; Koblinksi, JE. Laminin-111-derived peptides and cancer. **Cell Adhesion & Migration** 2013;7:150-159.
- Koya AI, Ibrahim SA. Carcinogenesis. [Updated 2024 Oct 2]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-.
- Kyrönlähti A, Godbole N, Akinrinade O, Soini T, Nyholm I, Andersson N, Hukkinen M, Lohi J, Wilson DB, Pihlajoki M, Pakarinen MP, Heikinheimo M. Evolving Up-regulation of Biliary Fibrosis-Related Extracellular Matrix Molecules After Successful Portoenterostomy. *Hepatol Commun.* 2021 Feb 9;5(6):1036-1050. doi: 10.1002/hep4.1684. PMID: 34141988; PMCID: PMC8183171.
- Machado Brandão-Costa, R.; Helal-Neto, E.; Maia Vieira, A.; Barcellos-de-Souza, P.; Morgado-Diaz, J.; Barja-Fidalgo, C. Extracellular Matrix Derived from High Metastatic Human Breast Cancer Triggers Epithelial-Mesenchymal Transition in Epithelial Breast Cancer Cells through  $\alpha v \beta 3$  Integrin. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 2995. <https://doi.org/10.3390/ijms21082995>
- Malik, N. Editorial: Radiolabeled Peptides in Cancer Imaging and Therapy—Emerging Isotopes. *Pharmaceuticals* **2025**, *18*, 1836. <https://doi.org/10.3390/ph18121836>

- Mendonça FF, Sobral DV, Durante ACR, Miranda ACC, Mejia J, de Paula Faria D, Marques FLN, de Barboza MF, Fuscaldi LL, Malavolta L. Assessment of bioactive peptides derived from laminin-111 as prospective breast cancer-targeting agents. *Amino Acids*. 2024 Jan 29;56(1):1. doi: 10.1007/s00726-023-03379-x. PMID: 38285098; PMCID: PMC10824877.
- Mokotoff, M.; Swanson, D.P.; Jonnalagadda, S.S.; I , Epperly, M.W.; Brown, M.L. Evaluation of laminin peptide fragments labeled with indium-111 for the potential imaging of malignant tumors. **J. Pept. Res.** 1997;49:510-516.
- Nascimento, R. G. do, & Otoni, K. M. (2020). Histological and molecular classification of breast cancer: what do we know?. *Mastology*, 30, 1–8. <https://doi.org/10.29289/25945394202020200024>
- Nirwane A, Yao Y. Cell-specific expression and function of laminin at the neurovascular unit. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2022 Nov;42(11):1979-1999. doi: 10.1177/0271678X221113027. Epub 2022 Jul 7. PMID: 35796497; PMCID: PMC9580165.
- Nomizu, M; Kuratomi, Y; Song, S. Y; Ponce, ML; Hoffman, M.P; Powell, SK; Miyoshil, K.; Otaka, A; Kleinman, HK.; Yamada, Y. Identification of call binding sequences in mouse laminin gamma1 chain by systematic peptide screening. **J. Biol. Chem.** 1997;272: 32198-32205.
- Nonnast E, Mira E, Mañes S. The role of laminins in cancer pathobiology: a comprehensive review. *J Transl Med*. 2025 Jan 17;23(1):83. doi: 10.1186/s12967-025-06079-0. PMID: 39825429; PMCID: PMC11742543.
- N.Desai, D.Sahel, B. Kubal, H.Postwala, Y. Shah, VPChavda, C. Fernandes, DKKhatri, LKVora, Papel da matriz extracelular no câncer: perspectivas sobre a progressão tumoral e a terapia. *Av. Terapia*. 2025, 8, 2400370. <https://doi.org/10.1002/adtp.202400370>
- Oliveira, Antônio Eduardo. Garantia da rastreabilidade das medições de atividade dos radiofármacos no Brasil. Comissão Nacional de Energia Nuclear. Doutorado em Radioproteção e Dosimetria. 2019.
- Qiao Z, Xu J, Gonzalez R, Miao Y. Novel [<sup>99m</sup>Tc]-Tricarbonyl-NOTA-Conjugated Lactam-Cyclized Alpha-MSH Peptide with Enhanced Melanoma Uptake and Reduced Renal Uptake. *Mol Pharm*. 2020 Sep 8;17(9):3581-3588. doi:

10.1021/acs.molpharmaceut.0c00606. Epub 2020 Jul 28. PMID: 32663011; PMCID: PMC7484323.

Rina Wu, Jinyu Zhou, Wang Han, Junrui Wu, Zhishen Mu, AI-Driven Precision Protease Engineering for the Food Industry, Trends in Food Science & Technology, 10.1016/j.tifs.2026.105611, (105611), (2026).

Saha GB. Fundamentals of nuclear pharmacy. 6<sup>a</sup> ed. New York: Springer; 2010. 428p.

Schaberg E, Götz M, Faissner A. The extracellular matrix molecule tenascin-C modulates cell cycle progression and motility of adult neural stem/progenitor cells from the subependymal zone. Cell Mol Life Sci. 2022 Apr 16;79(5):244. doi: 10.1007/s00018-022-04259-5. PMID: 35430697; PMCID: PMC9013340.

Schibli R, Schubiger PA. Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals. **Eur. J. Nucl. Med.** 2002;29:1529–1542.

Schreuder N, Koopman D, Jager PL, Kosterink JGW, van Puijenbroek E. Adverse events of diagnostic radiopharmaceuticals: a systematic review. Semin Nucl Med. 2019; 49: 382– 410.

Silva F, Cabral Campello MP, Paulo A. Radiolabeled Gold Nanoparticles for Imaging and Therapy of Cancer. Materials (Basel). 2020 Dec 22;14(1):4. doi: 10.3390/ma14010004. PMID: 33375074; PMCID: PMC7792784.

Soares, J.X.; Santos, Á.; Fernandes, C.; Pinto, M.M.M. Liquid Chromatography on the Different Methods for the Determination of Lipophilicity: An Essential Analytical Tool in Medicinal Chemistry. *Chemosensors* **2022**, *10*, 340. <https://doi.org/10.3390/chemosensors10080340>

Sobral, D.V.; Fuscaldi, L.L.; Durante, A.C.R.; Mendonça, F.F.; de Oliveira, L.R.; Miranda, A.C.C.; Mejia, J.; Montor, W.R.; de Barboza, M.F.; Malavolta, L. Comparative Evaluation of Radiochemical and Biological Properties of <sup>131</sup>I- and [<sup>99m</sup>Tc]Tc(CO)<sub>3</sub>-Labeled RGD Analogues Planned to Interact with the αvβ3 Integrin Expressed in Glioblastoma. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 116. <https://doi.org/10.3390/ph15020116>

Sweeney, TM; Kibbey, MC; Zain, M; Fridman, R; Kleinman, HK. Basement membrane and the SIKVAV laminin-derived peptide promote tumor growth and metastases. **Cancer Metastasis Rev.** 1991;10:245-254.

- Waibel, R.; Alberto, R.; Willuda, J.; Finnern, R.; Schibli, R.; Stichelberger, A.; Egli A.; Abram, U.; Mach, -P. Pl Ckthun, A.; Schubiger, P.A. (1999). **Nat. Biotechnol.** 17: 897-901.
- WITNEY, T. H.; BLOWER, P. J. *The chemical tool-kit for molecular imaging with radionuclides in the age of targeted and immune therapy*. Cancer Imaging, v. 21, n. 1, 2021. DOI: 10.1186/s40644-021-00385-8.
- Wu Y, Li T, Zhang X, Jing H, Li F, Huo L. Preclinical evaluation of the theranostic potential of 89Zr/177Lu-labeled anti-TROP-2 antibody in triple-negative breast cancer model. *EJNMMI Radiopharm Chem.* 2024 Jan 9;9(1):5. doi: 10.1186/s41181-023-00235-x. PMID: 38194043; PMCID: PMC10776551.
- Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther.* 2021 May;221:107753. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107753. Epub 2020 Nov 28. PMID: 33259885; PMCID: PMC8084948.
- Zhang S, Wang X, Gao X, Chen X, Li L, Li G, Liu C, Miao Y, Wang R, Hu K. Radiopharmaceuticals and their applications in medicine. *Signal Transduct Target Ther.* 2025 Jan 3;10(1):1. doi: 10.1038/s41392-024-02041-6. PMID: 39747850; PMCID: PMC11697352.
- Zhang S, Wang X, Gao X, Chen X, Li L, Li G, Liu C, Miao Y, Wang R, Hu K. Radiopharmaceuticals and their applications in medicine. *Signal Transduct Target Ther.* 2025 Jan 3;10(1):1. doi: 10.1038/s41392-024-02041-6. PMID: 39747850; PMCID: PMC11697352.

## ANEXO

### Anexo 1 CEUA 3740/2019



**ALBERT EINSTEIN**  
INSTITUTO ISRAELITA DE  
ENSINO E PESQUISA

São Paulo, 26 de abril de 2019

A

Marycel Rosa Felisa Figols de Barboza

Certificamos que o projeto intitulado *"Estudos in vitro e in vivo de peptídeos da Laminina-111 radiomarcados com iodo-131. Relevância para o estudo de câncer de mama"*, protocolo CEUA 3740/2019, sob a responsabilidade da pesquisadora *Marycel Rosa Felisa Figols de Barboza* - que envolve a produção, manutenção, e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein (CEUA/Einstein) em reunião realizada em 26/04/2019.

#### **Vigência do Projeto: Abril/2019 a Julho/2021**

| Espécie    | Linhagem    | Sexo  | Idade/Peso    | Total | Fornecedor |
|------------|-------------|-------|---------------|-------|------------|
| Camundongo | Balb/c nude | Fêmea | 8 semanas/25g | 60    | CETEC      |

Aproveitamos a oportunidade para informar que:

- O (treinamento ou projeto) deve ser desenvolvido conforme delineado no processo aprovado.



- Eventuais modificações ou emendas ao processo devem ser apresentadas à CEUA/Einstein de forma clara e sucinta, identificando a parte a ser modificada e suas justificativas;
- O Relatório final deve ser apresentado à CEUA/Einstein após o encerramento das atividades previstas.
- No caso de treinamento, esta aprovação tem validade de 12 meses a partir da data de aprovação pela CEUA/Einstein e, para cada evento realizado nesse período, um relatório específico deverá ser encaminhado.

Atenciosamente,

**Dr. Julio Cesar Martins Monte**  
Coordenador da Comissão de Ética  
no Uso de Animais – CEUA/Einstein



São Paulo, 26 de abril de 2024

À  
Marycel Rosa Felisa Figols de Barboza

Certificamos que a proposta intitulada *“Avaliação in vitro e in vivo de Peptídeos da Laminina-111 Radiomarcados com Tecnécio-99m como potenciais biomarcadores para o Câncer de Mama”*, protocolo CEUA nº 6015/2024, sob a responsabilidade da pesquisadora *Marycel Rosa Felisa Figols de Barboza* - que envolve a produção, manutenção, e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Albert Einstein (CEUA/Einstein) em 26/04/2024.

**Vigência da Autorização: Abril/2024 a Dezembro/2025**

**Tipo e Características do animal a ser utilizado**

| Espécie    | Linhagem    | Sexo  | Idade/Peso            | Total | Procedência |
|------------|-------------|-------|-----------------------|-------|-------------|
| Camundongo | Balb/c nude | Fêmea | 60 dias/<br>25 gramas | 43    | CETEC       |

Aproveitamos a oportunidade para informar que:

- O projeto/treinamento de pesquisa deve ser desenvolvido conforme delineado no processo aprovado;



**ALBERT EINSTEIN**  
INSTITUTO ISRAELITA DE  
ENSINO E PESQUISA

- A CEUA/Einstein deve ser informada de todos os fatos relevantes que alterem o curso normal do projeto/treinamento. É papel do pesquisador responsável assegurar medidas imediatas adequadas frente a eventos não previstos;
- Eventuais modificações ou emendas ao processo devem ser apresentadas à CEUA/Einstein de forma clara e sucinta, identificando a parte a ser modificada e suas justificativas;
- No caso de treinamento, esta aprovação tem validade de 12 meses a partir da data de aprovação pela CEUA/Einstein e para cada evento realizado nesse período, o pesquisador responsável deverá apresentar um relatório das atividades realizadas;
- No caso de projeto de pesquisa, esta aprovação tem validade de acordo com o cronograma proposto no protocolo. Os relatórios deverão ser enviados a cada 6 (seis meses), a partir da data de aprovação da CEUA/Einstein.

Atenciosamente,

---

**Dr. Thiago Pinheiro Arrais Aloia**

Coordenador da Comissão de Ética  
no Uso de Animais – CEUA/Einstein