



INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
"Autarquia associada à Universidade de São Paulo"

**PREPARO DO REAGENTE LIOFILIZADO HYNIC-[Tyr³]-OCTREOTATO E
ESTUDO DE MARCAÇÃO COM TECNÉCIO-99m**

IVANI BORTOLETI MELO

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

**Orientadora:
Dra. Constanca Pagano Gonçalves da Silva**

**São Paulo
2008**

***A minha mãe,
sempre presente em minha vida
A meu pai,
com muita saudade ...
A minha irmã Elaine,
exemplo de pessoa e profissional
Aos meus filhos Lucas e Daniel***

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus, força superior, que me deu saúde e perseverança em mais essa etapa de minha vida.
- ❖ Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN) na pessoa do Superintendente Dr. Nilson Dias Vieira Junior.
- ❖ A Dra. Constança Pagano Gonçalves da Silva, minha orientadora, pelos ensinamentos, conselhos, apoio e confiança a mim depositada proporcionando um grande crescimento pessoal e profissional.
- ❖ A Dra. Elaine Bortoleti de Araujo, Gerente adjunta para a Garantia da Qualidade do CR e minha irmã, pelos ensinamentos, pela oportunidade de compartilhar conhecimentos, pela força, paciência e carinho que sempre obtive com sua presença.
- ❖ Ao Dr. Carlos Alberto Buchpiguel pela oportunidade e facilidades oferecidas para a realização dessa dissertação.
- ❖ Aos pesquisadores e técnicos do Centro de Radiofarmácia pela oportunidade e facilidades concedidas.
- ❖ À Dra. Emiko Muramoto, pelo apoio e colaboração fornecida na realização da distribuição biológica em modelo animal.
- ❖ A farmacêutica Miriam Roseli Yoshie Okamoto do Centro de Medicina Nuclear (FMUSP) pela colaboração fornecida na realização do reagente liofilizado.
- ❖ A Dra. Sheila Siqueira da Divisão de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo pela realização das lâminas histológicas do tumor.

- ❖ Aos demais pesquisadores, técnicos, bolsistas do IPEN que apoiaram durante a realização deste trabalho.
- ❖ Aos colegas do Centro de Medicina Nuclear que apoiaram neste importante momento profissional, em especial a meus amigos Leandro e Elci pela força.
- ❖ Aos meus pais, pois sem eles em minha vida nada disso seria possível, obrigado!
- ❖ Ao meu marido pela paciência, compreensão, apoio e estímulo, mesmo nos momentos mais atribulados.

“No fim tudo dá certo, se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim.”
Fernando Sabino

PREPARO DO REAGENTE LIOFILIZADO HYNIC-[Tyr³]-OCTREOTATO E ESTUDO DE MARCAÇÃO COM TECNÉCIO-99m

Ivani Bortoleti Melo

RESUMO

O desenvolvimento de moléculas radiomarcadas com alta especificidade para um órgão ou tumor tem contribuído para a obtenção de um diagnóstico de precisão em medicina nuclear. Um caso particular são os peptídeos radiomarcados para a localização de tumores neuroendócrinos como os derivados sintéticos da somatostatina. Atualmente, o DTPA-octreotideo-¹¹¹In é o radiofármaco mais utilizado com o propósito de visualizar tumores que expressem receptores para somatostatina. Contudo, o uso do índio-111 como radionuclídeo oferece limitações em relação a sua disponibilidade (produto de ciclotron), suas características físicas como meia-vida (67 horas) e emissor de fótons de média energia (171 keV e 245 keV) que não favorecem a obtenção de imagens tipo SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography). As propriedades físicas favoráveis do tecnécio-99m (^{99m}Tc) fazem dele o radioisótopo mais adequado para substituir o índio-111 (¹¹¹In) na marcação desses peptídeos. Este trabalho avaliou a preparação e marcação do reagente liofilizado HYNIC-Tyr³-octreotato (HYNIC-octreotato) com ^{99m}Tc, baseado em metodologia descrita na literatura, utilizando tricina e EDDA (ácido etilenodiaminodiacético) como coligantes. Foram estudados os parâmetros de marcação (tempo de incubação, temperatura, volume e atividade do pertecnetato de sódio) e estabilidade do liofilizado. Adicionalmente, estudou-se a influência de pré-congelamento com nitrogênio (N₂) líquido na estabilidade do liofilizado, bem como a influência de manitol na pureza radioquímica e biodistribuição do complexo. Os estudos de estabilidade revelaram que o método de liofilização utilizado, empregando o pré-congelamento com nitrogênio líquido possibilitou a obtenção de um reagente liofilizado com estabilidade de 4 meses quando armazenado sob refrigeração. A estabilidade do reagente liofilizado obtido sem pré-congelamento com nitrogênio líquido foi semelhante à obtida com o pré-congelamento. Os estudos de marcações determinaram as melhores condições de marcação, para as quais se obteve

pureza radioquímica maior que 90%. A presença de manitol na formulação não influenciou na formação do complexo HYNIC-Octreotato-^{99m}Tc, conforme avaliação realizada por CLAE e estudos cintilográficos de distribuição do composto em coelhos. Estudos de biodistribuição invasivos realizados em camundongos *Nude* com tumor (células AR42J de tumor pancreático) e camundongos *Swiss* normais, bem como estudos cintilográficos realizados em coelhos e camundongos *Nude* revelaram cinética de distribuição rápida, acúmulo renal e captação tumoral significativa do peptídeo radiomarcado. Os resultados dos estudos de marcação com ^{99m}Tc, produção de reagente liofilizado e biodistribuição sugerem que o radiofármaco HYNIC-octreotato-^{99m}Tc apresenta potencial para aplicação em diagnóstico de tumores neuroendócrinos em medicina nuclear.

PREPARATION OF LYOPHILIZED KIT OF HYNIC-[Tyr³]-OCTREOTATE AND LABELING STUDIES WITH ^{99m}TECHNETIUM

Ivani Bortoleti Melo

ABSTRACT

The development of radiolabeled molecules with high specificity for an organ or tumor has been contributed to the precise diagnostic in nuclear medicine. Somatostatin labeled derivatives constitutes a particular example of labeled peptide applied in the localization of neuroendocrine tumors. Nowadays, the ¹¹¹In-DTPA-octreotide is the radiopharmaceutical applied in diagnostic procedures for the visualization of tumors with high expression of somatostatin receptors. However, the 111-indium is a radionuclide that presents some limitations related to availability (cyclotron production), half-life (67 hours) and the emission of medium energy photons (171 keV e 245 keV), not favorable to the acquisition of images in SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography). The favorable physical properties of the ^{99m}Tc make this radionuclide the more favorable to substitute the 111-indium on peptide labeling procedures. This work studied the preparation and labeling of a lyophilized kit of HYNIC-Tyr³-octreotate (HYNIC-octreotate) with ^{99m}Tc, base on previously described procedures and using tricine and EDDA (ethylendiaminediacetic acid) as coligands. It was studied the labeling parameters (incubation time, temperature, volume and perthechnetate activity) and the stability of the lyophilized preparation. Additionally, it was studied the influence of the pre-freezing using liquid nitrogen in the stability of the lyophilized preparation, as well as the influence of manitol in the labeling yield and biological distribution of the complex. The stability studies showed that the lyophilization using liquid nitrogen pre-freezing resulted in a lyophilized preparation with stability over 4 month when stored under refrigeration. The stability of the lyophilized preparation obtained without liquid nitrogen pre-freezing was similar. The labeling studies determined the best labeling conditions, resulting in a radiochemical yield superior than 90%. The use of manitol in the formulation did not influence the formation of the complex ^{99m}Tc-HYNIC-Octreotate, as evidenced

in HPLC and in the scintigraphic studies of the complex biodistribution in rabbits. Invasive biodistribution studies using xenografted *Nude* mice (pancreatic tumor cells AR42J) and healthy *Swiss* mice, and scintigraphic studies in rabbits showed the fast kinetic distribution, renal uptake and significant tumoral uptake of the labeled peptide. The results of labeling studies with ^{99m}Tc , the production of the lyophilized kit and the biodistribution studies suggest that the ^{99m}Tc -HYNIC-Octreotate is a potential radiopharmaceutical to be applied in the diagnostic of neuroendocrine tumors in nuclear medicine.

SUMÁRIO

	Página
1 . INTRODUÇÃO.....	21
2 . OBJETIVO.....	25
3 . REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1 Medicina Nuclear e Radiofarmácia	26
3.2 Radiofármacos	26
3.3 O elemento tecnécio-99m	28
3.4 Determinação da pureza radioquímica de radiofármacos	32
3.5 Radiofármacos peptídicos	35
3.6 Marcação de peptídeo com ^{99m} Tc	39
3.7 Radiofármacos baseados em peptídeos análogos da somatostatina	44
3.7.1 Somatostatina endógenas e análogos sintéticos	44
3.7.2 Análogos da somatostatina radiomarcados	46
3.7.3 Receptores para somatostatina	52
3.7.4 Tratamento de tumores neuroendócrinos com análogos da somatostatina radiomarcados	55
4 . MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1 Infra-estrutura e equipamento	56

SUMÁRIO

	Página
4.1.1 Reagentes e Soluções	56
4.1.2 Equipamentos	57
4.1.3 Outros	58
4.1.4 Animais	58
4.2 Preparo de Soluções	58
4.2.1 Tampão fosfato 0,2M pH6,2	58
4.2.2 Tampão citrato 0,1M pH 5,0	59
4.2.3 Solução de NaOH 0,1N	59
4.2.4 Solução de acetato de amônia 0,1N	59
4.2.5 Solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1N	59
4.2.6 Fracionamento do peptídeo HYNIC-Tyr ³ -octreotato (HYNIC- octreotato)	59
4.3 Métodos	60
4.3.1 Marcação do peptídeo HYNIC-octreotato com ^{99m} Tc	60
4.3.2 Determinação da pureza radioquímica	61
4.3.3 Estudo de variação do pH	63
4.3.4 Estudo da influência do manitol na marcação do HYNIC-octreotato com ^{99m} Tc	63

SUMÁRIO

	Página
4.3.5	Elaboração do reagente liofilizado de HYNIC- octreotato 64
4.3.6	Estabilidade do reagente liofilizado HYNIC- octreotato 66
4.3.7	Estudo das variáveis de marcação do reagente liofilizado HYNIC- octreotato 66
4.3.8	Obtenção de modelo tumoral animal 67
4.3.9	Estudo da distribuição biológica do HYNIC- octreotato- ^{99m} Tc em animais de laboratório 67
4.3.10	Estudo cintilográfico do HYNIC-octreotato - ^{99m} Tc 69
5 .	RESULTADOS 70
5.1	Marcação do peptídeo HYNIC-octreotato com ^{99m} Tc - estudo da influência do pH 70
5.2	Marcação do peptídeo HYNIC-Octreotato com ^{99m} Tc – estudo da influência do manitol 71
5.3	Avaliação da estabilidade do reagente liofilizado HYNIC- octreotato 78
5.3.1	Estabilidade do reagente liofilizado HYNIC-octreotato (1º lote) com pré-congelamento em nitrogênio líquido 78
5.3.2	Estabilidade do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato (2º lote) sem pré-congelamento em nitrogênio líquido 80
5.4	Estudo das variáveis de marcação do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato 80

SUMÁRIO

Página

5.4.1	Avaliação da atividade do pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$)	81
5.4.2	Avaliação do volume do pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$)	81
5.4.3	Avaliação do tempo de reação	82
5.5	Modelo tumoral de células AR-42J em camundongos <i>Nude</i>	83
5.6	Estudo da distribuição biológica do HYNIC-octreotato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em animais de laboratório	85
5.7	Cintilografia utilizando o reagente liofilizado de HYNIC-octreotato para pronta marcação com tecnécio-99m em camundongos <i>Nude</i> com tumor de células AR42J (Tumor pancreático de ratos)	89
6.	DISCUSSÃO	91
7.	CONCLUSÃO	97
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE TABELAS

Página

1	Especificações do eluído de gerador de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$	32
2	Características de diferentes radionuclídeos utilizados na marcação de peptídeos em diagnóstico.....	36
3	Sistemas Peptídeos-Receptor específicos	37
4	Acurácia do Octreotídeo-DTPA- ^{111}In em estudo multicêntrico	48
5	Biodistribuição em camundongos <i>Nude</i> do HYNIC-Octreotídeo marcado com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, utilizando diferentes coligantes em comparação com o ^{111}In -Octreotídeo	51
6	Resumo das características de radiofármacos análogos da somatostatina utilizados em terapia	55
7	CCD em ITC-SG: R_f^* das espécies radioquímicas para as diferentes fases móveis utilizadas no controle radioquímico da marcação de HYNIC-octreotato com $^{99\text{m}}\text{Tc}$	62
8	Condições do gradiente empregado na CLAE utilizada na avaliação da pureza radioquímica da marcação de HYNIC-octreotato com $^{99\text{m}}\text{Tc}$	63

LISTA DE TABELAS

Página

9	Pureza radioquímica da marcação do HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc utilizando-se CCD em ITLC-SG: influência do pH	70
10	Determinação das impurezas radioquímicas identificadas na marcação do HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc 1 hora após marcação utilizando CCD em ITLC-SG	70
11	Determinação das impurezas radioquímicas identificadas na marcação do HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc 3 horas após marcação utilizando CCD em ITLC-SG	71
12	Pureza radioquímica da marcação do Octreotato-HYNIC com ^{99m}Tc utilizando-se CCD em ITLC-SG 1 e 3 horas após a marcação: influência do manitol	71
13	Demonstração dos tempos de retenção obtidos no perfil CLAE (Figura 14) para o composto HYNIC-octreotato- ^{99m}Tc sem adição de manitol 1 hora após marcação	72
14	Demonstração dos tempos de retenção obtidos no perfil CLAE (Figura 15) para o composto HYNIC-octreotato- ^{99m}Tc com adição de manitol 1 hora após marcação	73
15	Demonstração dos tempos de retenção obtidos no perfil CLAE (Figura 16) para o composto HYNIC-octreotato- ^{99m}Tc sem adição de manitol 3 horas após marcação	74

LISTA DE TABELAS

Página

16	Demonstração dos tempos de retenção obtidos no perfil CLAE (Figura 17) para o composto HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc com adição de manitol 3 horas após marcação	75
17	Demonstração dos tempos de retenção obtidos no perfil CLAE (Figura 18) para o pertecnetato de sódio.....	76
18	Avaliação da estabilidade do reagente liofilizado HYNIC-octreotato com pré-congelamento em nitrogênio líquido armazenado em temperatura 4/5°C. Avaliação da pureza radioquímica utilizando CCD (ITLC-SG)	78
19	Demonstração dos tempos de retenção obtidos no perfil CLAE (Figura 21) para o composto HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc	79
20	Determinação da estabilidade do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato sem pré-congelamento em nitrogênio líquido armazenado em temperatura 4/5°C. Avaliação da pureza radioquímica utilizando CCD (ITLC-SG)	80
21	Estudo da variação da atividade do Pertecnetato de sódio (Na ^{99m} TcO ₄) na marcação do reagente liofilizado HYNIC-octreotato	81
22	Estudo da variação do volume final do pertecnetato de sódio (Na ^{99m} TcO ₄) na marcação do reagente liofilizado HYNIC-octreotato	82

LISTA DE TABELAS

Página

23	Estudo das condições de reação do reagente liofilizado HYNIC-octreotato	83
24	Porcentagem de distribuição dose/órgão-tecido do peptídeo radiomarcado HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc em camundongos <i>Nude</i> com adenocarcinoma pancreático	86
25	Porcentagem de distribuição dose/grama órgão-tecido do peptídeo radiomarcado HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc em camundongos <i>nude</i> com adenocarcinoma pancreático	87
26	Porcentagem de distribuição dose/órgão ou tecido do peptídeo radiomarcado HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc em camundongos <i>Swiss normais</i>	88
27	Porcentagem de distribuição dose/grama de órgão ou tecido do peptídeo radiomarcado HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc em camundongos <i>Swiss normais</i>	89

LISTA DE FIGURAS		Página
1	(A) Gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (produzido pelo IPEN-CNEN/SP) (B) Esquema simplificado de um gerador molibdênio-99/tecnécio-99m	30
2	Radiomarcção direta do peptídeo com ^{99m}Tc	40
3	Marcação do peptídeo com ^{99m}Tc via quelante pré-marcado.....	41
4	Marcação indireta do peptídeo com ^{99m}Tc via agente quelante bifuncional	41
5	(A) Esquema da estrutura Peptídeo-HYNIC- ^{99m}Tc (B) Esquema estrutura Peptídeo-HYNIC-tricina- ^{99m}Tc ; (C) Esquema Peptídeo-HYNIC-EDDA- ^{99m}Tc	42
6	Três possibilidades de ligação do coligante EDDA ao complexo Peptídeo-HYNIC- ^{99m}Tc	43
7	Imagens cintilográficas em ratos <i>Wistar</i> normais (posição supina), 4 horas após a injeção de RC160- ^{99m}Tc utilizando diferentes tipos de coligantes: EDDA, Et ₂ EDDA*, EDTA, BzEDTA**, tricina, e tricina/NA*** (da direita para esquerda) Diferenças na biodistribuição do complexo radiomarcado.....	44
8	Composição de aminoácidos da Somatostatina-14 e 28	45
9	Composição de aminoácidos do Octreotídeo	45
10	Análogos sintéticos da somatostatina. De cima para baixo: lanreotídeo, RC-160, octreotato-Tyr ³ e depreotide (P829)	46
11	Representação da estrutura do octreotídeo-Tyr ³⁻¹²³ I	47

LISTA DE FIGURAS

Página

12	Representação da estrutura do análogo octreotídeo-DTPA	47
13	Esquema de internalização do sistema receptor-peptídeo radiomarcado (Kaltsas et al.2001)	53
14	Perfil de CLAE para o composto HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc sem adição de manitol 1 hora após marcação	72
15	Perfil de CLAE para o composto HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc com adição de manitol 1 hora após marcação.....	73
16	Perfil de CLAE para o composto HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc sem adição de manitol 3 horas após marcação.....	74
17	Perfil de CLAE para o composto HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc com adição de manitol 3 horas após marcação.....	75
18	Perfil de CLAE para o pertecnetato de sódio	76
19	Imagem cintilográfica de coelhos em posição decúbito ventral 1, 3 e 4 horas pós injeção intra-venosa do HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc com manitol em sua composição final	77
20	Imagem cintilográfica de coelhos em posição decúbito-ventral 30 minutos, 1hora, 3horas e 4 horas pós injeção intra-venosa do HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc sem manitol em sua composição final	77
21	Perfil de CLAE da marcação do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato após período de armazenamento de 5 meses da preparação liofilizada	79

LISTA DE FIGURAS

Página

22	Linhagem utilizada de camundongos <i>Nude</i> mantidos em biotério provido de barreiras isoladoras (controle de contaminação de agentes patógenos e condições adequadas para o desenvolvimento do modelo tumoral); (B) Inoculação de células tumorais AR42J em dorso do camundongo <i>nude</i>	83
23	Camundongo <i>Nude</i> com tumor em região dorsal de aproximadamente 1 centímetro após 20 dias com retirada da massa tumoral para análise histológica	84
24	Neoplasia indiferenciada, com alta celularidade, composta por células epitelióides e fusiformes, sem arranjo característico e com estroma escasso, formando blocos sólidos e ocupando o tecido celular subcutâneo (lâmina 100x)	84
25	Neoplasia indiferenciada composta por células predominantemente epitelióides, coesas, com núcleos grandes, pleomórficos, com nucléolos evidentes e citoplasma amplo, eosinofílico (lâmina 400x)	85
26	Imagens cintilográficas de camundongo <i>Nude</i> com massa tumoral implantada em dorso. Imagens realizadas 3 horas após a injeção do HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc	90

1. INTRODUÇÃO

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

Um caso particular são os peptídeos radiomarcados, utilizados em diversas áreas de interesse, como oncologia, neurologia, cardiologia, na pesquisa de focos de infecção/inflamação e na pesquisa de trombose/aterosclerose. A aplicação em oncologia, para diagnóstico e tratamento de tumores específicos, representa, sem dúvida, a área mais estudada, com maior número de radiofármacos desenvolvidos, alguns dos quais comercialmente disponíveis (Signore et al. 2001).

As células tumorais, apesar de seu aparente metabolismo e crescimento descontrolados, são na verdade moduladas por vários peptídeos endógenos, incluindo inúmeros hormônios e fatores de crescimento que interagem com receptores na superfície do tumor. Entre esses peptídeos estão a somatostatina (SM), peptídeo intestinal vasoativo (VIP), fator de necrose tumoral e fator de angiogênese (Thrall e Ziessman, 2001).

Dentre os peptídeos endógenos investigados a SM é o mais amplamente estudado. A SM é um hormônio peptídico cíclico que consiste de 14 ou 28 aminoácidos e com uma meia-vida plasmática muito curta, aproximadamente 3 minutos. Receptores para SM (sstr) são encontrados em diversos tecidos normais e em tumores neuroendócrinos (NETs), tais como os tumores gastroenteropancreáticos (GEP) e carcinóides. Os tumores neuroendócrinos podem apresentar uma concentração de sstr até 1000 vezes maior do que as células normais (Obenaus et al 1999).

Estudos moleculares revelaram a existência de 5 diferentes subtipos de receptores para SM que estão estruturalmente relacionados à glicoproteínas de

membrana (proteína G). (Gottschalk et al.1996, Breeman et al. 2001, Seregni et al. 1998). Dos cinco subtipos de receptores, o sstr2 e sstr5 são os mais expressos nos NETs, contudo devemos considerar que os receptores variam em diferentes tipos de tumores (Kaltsas e Papadogias et al.2005).

A SM natural tem afinidade por todos os cinco tipos de receptores, porém os análogos artificiais têm mais afinidade por alguns subtipos do que por outros (Decristoforo and Stephen, 1999).

Tumores neuroendócrinos são raros. A incidência estimada é de 1,5 a cada 100.000 habitantes e representam 2% de todos os tumores malignos do sistema gastrointestinal. Geralmente possuem um crescimento lento (Gnanasegaran et al. 2005). O diagnóstico precoce de tais tumores é de extrema importância para condução e sucesso do tratamento.

A utilização da SM marcada em medicina nuclear, com o objetivo de localizar e tratar esses tumores levou à síntese e utilização, a partir dos anos 80, de análogos sintéticos que apresentassem uma meia-vida plasmática maior, superando a degradação enzimática sofrida pela SM natural (Breeman et al. 2001 e Decristoforo et al, (a) 1999).

O primeiro análogo conhecido foi o octreotídeo, que possui 8 aminoácidos e uma meia-vida plasmática de 2 a 3 horas. Outros análogos com meia-vida ainda maior também foram desenvolvidos, como o Tyr³-octreotato, lanreotídeo, Tyr³-octreotídeo e RC160 (Decristoforo et al (a) 1999).

O primeiro estudo clínico utilizando um análogo da SM foi realizado com Tyr³-octreotídeo-¹²³I. Após alguns resultados iniciais, o traçador revelou alguns problemas que influenciaram em sua aplicabilidade na prática clínica. Os maiores obstáculos foram a marcação complicada do radiofármaco, a disponibilidade limitada , o alto custo do radionuclídeo e a atividade intestinal alta do radiotraçador que se deve ao seu clareamento hepato-biliar (Kreening et al.1992).

Conseqüentemente, um novo traçador foi desenvolvido ligando-se o agente quelante bifuncional, ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA), ao octreotídeo, resultando no DTPA-octreotídeo marcado com índio-111 (Octreoscan-¹¹¹In ®) (Seregni et al. 1998). Hoje, a cintilografia com Octreoscan-¹¹¹In é considerada uma poderosa técnica não invasiva na localização e estadiamento dos tumores

neuroendócrinos. Contudo, sua aplicação ampla no diagnóstico oncológico é restrita pelo seu custo alto e disponibilidade limitada. O ^{111}In é produto de ciclotron e esse isótopo apresenta características físicas não favoráveis para a aplicação clínica, ou seja, meia-vida física de 67 horas e emissão de fótons de média energia (171 keV e 247 keV), resultando em imagens com pouca resolução e uma alta dose de radiação ao paciente (Maina et al. 2002).

Por outro lado, estudos recentes mostram que a utilização do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ como radionuclídeo ligado às SM sintéticas promove melhor viabilidade de estudo, uma vez que o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ pode ser obtido diariamente por meio da eluição dos geradores de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$. O radionuclídeo possui meia-vida física relativamente curta (6 horas) e uma emissão gama principal de 140 keV, ideal para reproduzir imagens cintilográficas em Medicina Nuclear (Maina et al. 2002 e Guggenberg et al. 2003).

A alta sensibilidade das SM marcadas com $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em detectar tumores receptor-positivos, combinada com uma radiação de fundo baixa e difusa no trato gastrointestinal e vascular, resulta na obtenção de imagens de melhor qualidade quando comparadas com as imagens que utilizam ^{111}In . Contudo, a alta atividade renal pode impedir que tumores sejam localizados em imagens imediatas dessa área, mas leva-se em consideração que raramente a região renal é sitio de metástases dos tumores avaliados (Gabriel et al. 2003).

Vários análogos sintéticos de SM foram radiomarcados utilizando-se diferentes radionuclídeos e agentes quelantes bifuncionais. A afinidade destes radiofármacos pelos tumores mostraram-se dependente da estrutura do próprio peptídeo, mas também do tipo de agente quelante utilizado e do radionuclídeo empregado (Obenaus et al.1999; Maina et al.2002; Decristoforo et al.2000). Uma evidência recente assinala uma propriedade superior de localização do tumor com o Tyr³-octreotato quando comparado ao Tyr³-octreotídeo, mesmo carregando metais quelantes idênticos (Maina et al. 2002 e Breeman et al. 2001).

Atualmente, somente um análogo sintético da SM conhecido como P829 ou depreotide- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (NeoTec®), tem sido comercializado e introduzido na prática clínica no exterior. Contudo, este composto não tem propriedades de imagens similares ao Octreoscan- ^{111}In , mostrando-se não eficiente no diagnóstico de tumores endócrinos, mas suficiente para o diagnóstico de câncer de pulmão de

pequenas-células (Guggenberg et al. 2004).

A marcação de análogos de SM com tecnécio-99m utilizando-se o agente quelante bifuncional HYNIC (hidrazinonicotinamida) ligado ao peptídeo no N-terminal, já foi amplamente estudada. Tal grupo quelante não preenche todos os sítios de ligação do ^{99m}Tc (ocupa somente dois sítios de coordenação), sendo necessário utilizar coligantes como glucoheptonato, tricina, ácido etilenodiamino diacético (EDDA), sozinhos ou em combinação, tais como, tricina/fosfina ou tricina/EDDA para satisfazer essas ligações (Liu et al., 2002 e Lui et al., 1998). A escolha do coligante é importante, pois influencia na hidrofiliabilidade e estabilidade do complexo (Hubalewska-Dydejczyk et al. 2006).

Dentre os análogos de SM marcados com tecnécio-99m utilizando-se o grupamento quelante HYNIC, encontra-se o HYNIC-Tyr³-octreotato que mostrou propriedades favoráveis para visualização de NETs com vantagens sobre outros análogos, a saber: alta captação tumoral, rápido clareamento sanguíneo e baixa captação residual na região abdominal, o que facilita a visualização dos tumores (Maina et al. 2002; Dydejczyk et al. 2006; Nikolopoulou et al. 2005).

O desenvolvimento de uma formulação liofilizada HYNIC-Tyr³-octreotato, que possibilite a comercialização para pronta marcação com tecnécio-99m no próprio serviço de medicina nuclear, promoveria o desenvolvimento de novos protocolos clínicos para diagnóstico de tumores neuroendócrinos. A aplicação rotineira deste peptídeo radiomarcado representaria a viabilização do diagnóstico de tumores neuroendócrinos em Medicina Nuclear, com custo reduzido e melhor resolução de imagem quando comparado ao radiofármaco atualmente disponível Octreoscan- ^{111}In .

2. OBJETIVO

Desenvolver o reagente liofilizado HYNIC-Tyr³-Octreotato para marcação com tecnécio-99m, com estabilidade e pureza radioquímica para a aplicação clínica rotineira no diagnóstico de tumores neuroendócrinos. Estabelecer as melhores condições para essa marcação e estudar sua biodistribuição em modelo animal.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Medicina Nuclear e a radiofarmácia

A Medicina Nuclear é a especialidade médica que utiliza as propriedades nucleares de compostos radioativos para realizar avaliações diagnósticas e terapêuticas.

O processo de obtenção de imagens ou exames de cintilografia resume-se em administrar ao paciente um radiofármaco específico, que se concentrará em um órgão alvo e emitirá fótons que serão detectados por um equipamento (Gama-câmara), fornecendo informações anatômicas e principalmente funcionais através de imagens estáticas ou tomográficas (SPECT – *Single Photon Emission Computed Tomography* – Tomografia por Emissão de Fóton Único).

3.2 Radiofármacos

Radiofármacos são substâncias que por sua forma farmacêutica, quantidade e qualidade de radiação, podem ser utilizadas no diagnóstico e tratamento de enfermidades dos seres vivos, qualquer que seja a via de administração empregada (Carvalho, 2007).

Os radiofármacos são compostos sem ação farmacológica, que têm na sua composição um radionuclídeo, e são utilizados em Medicina Nuclear para diagnóstico e terapia de várias doenças. As características físico-químicas do radiofármaco determinam a sua farmacocinética, isto é, a sua fixação no órgão alvo, metabolização e eliminação do organismo, enquanto que as características físicas do radionuclídeo determinam a aplicação do composto em diagnóstico ou terapia (Oliveira et al. 2006).

Os radiofármacos utilizados para diagnóstico estão classificados em radiofármacos de perfusão (ou 1ª geração) e radiofármacos específicos (ou 2ª geração). Os radiofármacos de perfusão são transportados no sangue e atingem o órgão alvo na proporção do fluxo sanguíneo. Não têm locais específicos de ligação e pensa-se que são distribuídos de acordo com tamanho e carga do

composto. Os radiofármacos específicos são direcionados por moléculas biologicamente ativas, como, por exemplo, anticorpos e peptídeos, que se ligam a receptores celulares ou são transportados para o interior de determinadas células. A capacidade da biomolécula reconhecer os receptores vai determinar a fixação do radiofármaco no tecido pretendido e não deverá ser alterada com a incorporação do radionuclídeo. Os radiofármacos específicos são classificados de acordo com o receptor ou o alvo específico. Os radiofármacos desenvolvidos para se ligarem a receptores têm como objetivo detectar alterações na concentração dos mesmos em tecidos biológicos, especificamente em tecidos tumorais para os quais a expressão dos receptores se encontra alterada significativamente pela diferenciação celular (Oliveira et al. 2006).

São vários os fatores que influenciam na interação dos radiofármacos com os receptores (Vallabhajosula, 2001):

- Depuração plasmática: os compostos para ligação aos receptores (peptídeos, esteróides, neurotransmissores) são de baixo peso molecular e eliminados rapidamente da corrente sanguínea;
- Atividade específica: é necessária elevada atividade específica (atividade/massa do ligante), uma vez que os receptores apresentam baixa concentração, de modo a evitar a sua saturação com moléculas do ligante não marcadas;
- Afinidade e Especificidade: o radiofármaco deve ter elevada afinidade para determinado receptor e muito pouca afinidade para os restantes. Este fato é muito importante, pois as concentrações de radiofármaco e receptores são baixas, devendo haver ligação suficientemente forte para a realização da aplicação clínica;
- Estabilidade *in vivo* para que o radiofármaco alcance intacto o local alvo;
- Fluxo sanguíneo: a captação do radiofármaco depende do fluxo sanguíneo, perfusão tecidual, permeabilidade capilar e capacidade de difusão.

Dos radiofármacos utilizados para diagnóstico, os que contêm na sua composição ^{99m}Tc representam cerca de 90% da totalidade. Este fato deve-se às características físicas do ^{99m}Tc : meia-vida física de 6,01 horas, emissão gama com energia adequada ao detector (140 keV) e disponível em gerador de baixo

custo. A meia-vida física do ^{99m}Tc é suficientemente longa para a preparação dos radiofármacos, administração e aquisição das imagens e suficientemente curta para minimizar a dose de radiação para o paciente (Oliveira et al. 2006).

Os radiofármacos de tecnécio são preparados pela adição de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) a um reagente liofilizado (*kit*), que contém os componentes necessários para preparar o composto radioativo (Saha 1998):

- Composto químico a ser ligado ao radionuclídeo (responsável pela biodistribuição do radiofármaco após a sua administração);
- Agente redutor para reduzir o pertecnetato (comumente o SnCl_2);
- Aditivos e agentes conservantes (agentes antimicrobianos, antioxidantes, estabilizantes, entre outros).

A mistura dos diferentes componentes é fornecida num recipiente adequado, na forma de liofilizado e em atmosfera de nitrogênio, gás inerte como argônio ou vácuo, para sua correta conservação.

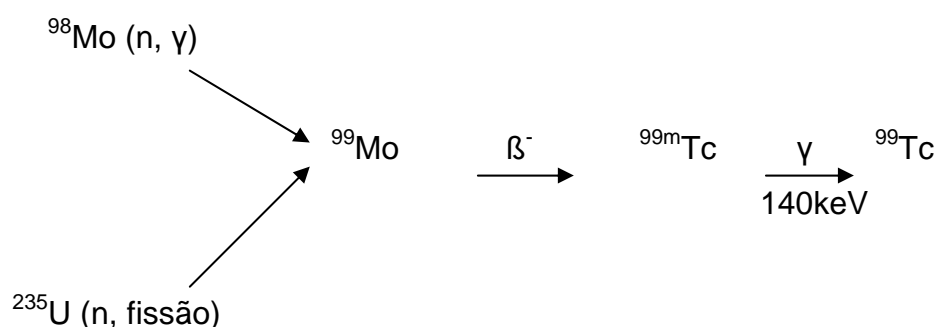
A preparação radiofarmacêutica conservar-se-á, após a marcação nas condições necessárias, segundo cada caso, durante o seu prazo de validade. Este prazo de validade é variável e deve ser determinado experimentalmente, indo desde os 30 minutos até as 6 horas, que normalmente se aceitam para os radiofármacos marcados com ^{99m}Tc . Durante este período podem se retirar doses sucessivas dos frascos, cada uma delas adequada para a administração (Oliveira et al. 2006).

Após a marcação e antes da administração do radiofármaco de tecnécio, é necessário realizar os ensaios adequados de controle de qualidade para comprovar os requisitos de qualidade impostos para sua administração.

3.3 O elemento tecnécio-99m

Dos radioisótopos atualmente disponíveis, o tecnécio-99m tem, sem dúvida, as melhores propriedades nucleares para a detecção em câmara de cintilação. A meia-vida de 6,02 horas e ausência de emissão beta produz uma

baixa dose de radiação ao paciente. A emissão gama de 140 keV tem uma penetração satisfatória nos tecidos (50 % são absorvidos em 4,6 cm de tecido) e, além disso, a energia é suficientemente baixa para permitir uma boa colimação. O molibdênio-99 (^{99}Mo) é produzido indiretamente pela irradiação do molibdênio-98 (^{98}Mo) por nêutrons ou como produto da fissão de ^{235}U (Rocha A.F.G. e Harbert J.C., 1979)



O método de produção do ^{99}Mo por reação (n,γ) resulta em uma baixa atividade específica. Usualmente o ^{99}Mo é produzido pela fissão do ^{235}U (Thrall J.H. e Ziessman H.A., 2001).

Como o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é um radioisótopo produzido a partir do decaimento do elemento ^{99}Mo , diz-se que o radioisótopo “pai” (^{99}Mo) dá origem ao “filho” ($^{99\text{m}}\text{Tc}$).

Uma vez obtido o ^{99}Mo , ele é empregado na preparação de sistemas de geradores. Um sistema de gerador, para ser considerado de grande utilidade, tem que apresentar certas propriedades básicas (Rocha A.F.G. e Harbert J.C., 1979):

- Deve produzir um isótopo “filho” com alta pureza química, radioquímica e radionuclídica.
- Deve ser seguro e simples de manipular.
- Deve ser estéril e livre de pirogênio.
- O produto deve ser adequado para a preparação de radiofármacos.
- Deve ser capaz de fornecer separações múltiplas.

O gerador comercial de molibdênio-99/tecnécio-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$) é um sistema composto por uma coluna cromatográfica de óxido de alumínio (Al_2O_3), onde é depositado o molibdato ($^{99}\text{MoO}_4^{-2}$) que, via decaimento β^- , forma o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Figura 1). Estas duas espécies apresentam diferentes afinidades pelo Al_2O_3 , possibilitando que o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ seja coletado como ânion tetraoxitecnetato hidratado (pertechnetato, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$), por eluição com solução fisiológica estéril, juntamente com seu isômero ou carreador $^{99}\text{TcO}_4^-$ (Banerjee et al. 2001).

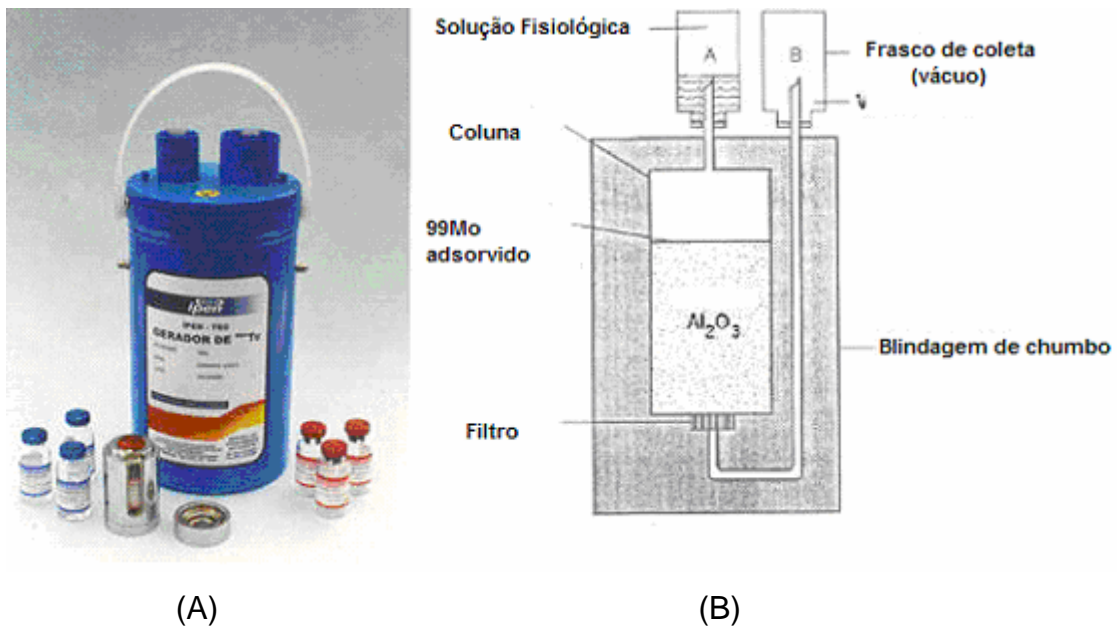


Figura 1. (A) Gerador de molibdênio-99/tecnécio-99m (produzido pelo IPEN-CNEN/SP) (B) Esquema simplificado de um gerador molibdênio-99/tecnécio-99m (Fonte: Adaptado FCF/USP)

O $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é um metal de transição (pertence ao grupo 7 da Tabela Periódica) e pode existir em 9 estados de oxidação (-1 a +7), o que lhe dá a possibilidade de formar complexos de coordenação com numerosos agentes quelantes. A coordenação de agentes quelantes ao $^{99\text{m}}\text{Tc}$ é feita quando o metal se encontra em estados de oxidação inferiores ao +7. A redução do metal, do estado de

oxidação +7 para outros estados de oxidação, é realizada normalmente com cloreto estanoso (Oliveira et al. 2006).

Após a eluição com solução salina (NaCl 0,9%), uma solução de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) é obtida. A USP (United States Pharmacopeia) padroniza que no mínimo 95% do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ presente no eluato seja no estado de oxidação +7 (porcentagem de pureza radioquímica). Apesar de tal solução poder ser utilizada para fins diagnósticos, na maioria das aplicações médicas, contudo, o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (+7) é reduzido a estados de oxidação inferiores de modo a formar um complexo com um ligante específico, cuja biodistribuição é definida por sua própria natureza, constituindo os chamados radiofármacos essenciais (Carvalho, 2007 e Thrall e Ziessman, 2001).

O único radioisótopo desejado no eluato do gerador $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ é o $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Qualquer outro radionuclídeo presente na amostra é considerado como impureza radionuclídica e é indesejável, pois resultará em dose extra de irradiação para o paciente, sem benefício clínico.

O radioisótopo contaminante mais comum é o ^{99}Mo . O ^{99}Tc , radionuclídeo filho proveniente da transição isomérica do $^{99\text{m}}\text{Tc}$, não é considerado como contaminante ou impureza. O ^{99}Tc pode ser um problema do ponto de vista químico nos procedimentos de marcação radioativa, mas não constitui um problema do ponto de vista de irradiação ou de saúde, e não precisa ser analisado como impureza radionuclídica. A meia-vida do ^{99}Tc é de $2,1 \times 10^5$ anos e decai para rutênio-99 (^{99}Ru), que é estável.

Os geradores passam por um controle de qualidade rigoroso antes de serem entregues ao consumidor final, entretanto cada laboratório deve fazer seu controle de qualidade em cada eluição (Thrall e Ziessman, 2001).

Além da pureza radioquímica e da pureza radionuclídica, outros parâmetros devem ser avaliados no eluído de um gerador de $^{99}\text{Mo}-^{99\text{m}}\text{Tc}$ para atestar sua qualidade (Tabela 1) (Marques et al. 2001).

Tabela 1. Especificações do eluído de gerador de ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (Fonte: adaptado de Marques et al.2001)

<i>Parâmetro</i>	<i>USP*</i>	<i>EP**</i>	<i>AIEA***</i>
Eficiência da eluição	$\geq 90 \%$	90-100 %	-
Pureza radionuclídica (^{99}Mo)	$\leq 0,15\mu\text{Ci}/\text{mCi}$	$\leq 1,0 \mu\text{Ci}/\text{mCi}$	-
Pureza radioquímica	$\geq 95 \%$	$\geq 95\%$	$\geq 95\%$
Pureza química (Al^{3+})	$\leq 10 \text{ ppm}$	$\leq 20 \text{ ppm}$	$\leq 10 \text{ ppm}$
pH	4 - 7	4 - 8	4,5 - 7,5

* United States Pharmacopeia – USP 2007

** European Pharmacopeia (Farmacopéia Européia) – 5ª edição

*** Agência Internacional de Energia Atômica

A eficiência da eluição está associada à atividade esperada do radioisótopo em cada eluição, levando-se em conta o decaimento do radioisótopo “pai”. A pureza radionuclídica está associada à quantidade de ^{99}Mo em relação a cada milicurie (mCi) de $^{99\text{m}}\text{Tc}$. O aumento de ^{99}Mo resulta em maior exposição ao paciente em detrimento da qualidade da imagem. A pureza radioquímica avalia a quantidade de tecnécio hidrolisado o que resulta na diminuição da qualidade de imagem e da marcação e aumento da dose de radiação. A pureza química detecta a concentração de Al^{3+} que pode resultar na diminuição da qualidade de imagem devido a problemas na marcação do radiofármaco (Marques et al.2001).

3.4 Determinação da pureza radioquímica de radiofármacos

A ligação do $^{99\text{m}}\text{Tc}$ a diferentes substratos depende de inúmeros fatores, (como a natureza do ligante, o pH do meio de marcação, entre outros) que determinam o estado de oxidação que o elemento radioativo irá apresentar e a estrutura do complexo resultante. Na marcação com $^{99\text{m}}\text{Tc}$, assim como com outros elementos radioativos, é imperativo determinar-se a pureza radioquímica do radiofármaco resultante. Se, por exemplo, 5% da atividade de $^{99\text{m}}\text{Tc}$ permanece livre na forma de pertecnetato de sódio, podemos dizer que a pureza radioquímica é de 95%, assumindo que não há outras impurezas. Cada radiofármaco tem uma pureza radioquímica específica e, segundo os requisitos

da USP ou da FDA (Food and Drug Administration), tipicamente superior ou igual 90% (Thrall e Ziessman, 2001)

As impurezas radioquímicas têm origem na decomposição dos radiofármacos, devido à ação do solvente, temperatura, pH, luz, presença de agentes oxidantes ou redutores, radiólise. No caso dos radiofármacos de ^{99m}Tc , as impurezas mais comuns são $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ou formas hidrolisadas de ^{99m}Tc . Estas impurezas podem aumentar a dose de radiação e interferir nas imagens de diagnóstico (Thrall e Ziessman, 2001).

Alguns sistemas foram desenvolvidos para determinar a pureza radioquímica. Existem várias técnicas cromatográficas que vão da mais simples como a cromatografia em coluna e a cromatografia em camada delgada até as mais sofisticadas e computadorizadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). De modo geral, entre os métodos modernos de análise, as técnicas cromatográficas ocupam um lugar de destaque na química e bioquímica, na pesquisa e na indústria, devido a sua facilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação das espécies químicas presentes em uma amostra, mesmo em misturas muito complexas (Degani et al. 1998).

O ponto comum entre as várias técnicas cromatográficas existentes e que caracteriza o método é o fato de os componentes da mistura ou amostra serem distribuídos entre duas fases. A cromatografia é, portanto, um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes componentes entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. Durante a passagem da fase móvel pela fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (UnB, 2008)

A cromatografia de adsorção baseia-se no grau de partição relativa dos compostos, entre uma dada fase líquida móvel (eluente) e uma determinada fase sólida estacionária, geralmente sílica gel ou alumina (Al_2O_3).

A cromatografia em camada delgada (CCD), um caso particular da cromatografia de adsorção, tem várias aplicações importantes em química orgânica, a saber: estabelecer se dois compostos são idênticos, verificar a pureza de um composto (complexidade e muitas vezes a natureza), determinar o número de componentes em uma mistura, determinar o solvente apropriado para separação em uma coluna cromatográfica, monitorar a separação de uma mistura em uma coluna cromatográfica ou acompanhar o progresso de uma reação. É um método extremamente conveniente, pois é uma técnica rápida, reproduzível e necessita apenas de uma quantidade muito pequena de amostra (1-100 μ g) (UnB, 2008).

O grande avanço na cromatografia em coluna foi o desenvolvimento e a utilização de suportes com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, as quais tornam necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, devido a sua baixa permeabilidade (CLAE).

As fases móveis utilizadas em CLAE devem possuir alto grau de pureza e estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e desgaseificadas antes do uso. A bomba deve proporcionar ao sistema vazão contínua sem pulsos com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado. As colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno de 0,45 cm para separações analíticas e na faixa de 2,2 cm para preparativas. O comprimento é variável, sendo comuns colunas analíticas de 10-25 cm e preparativas em torno de 25-30 cm. Essas colunas são reutilizáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação (Degani, 1998).

A coluna é a parte principal do equipamento. Podemos reconhecê-la como o “rim” do cromatógrafo. À medida que a amostra passa pela coluna, os componentes vão se separando e, quando passam pelo detetor, são identificados na forma de pico em um gráfico.

Na fase reversa, invertemos a polaridade da fase estacionária, ou seja, usamos um material apolar como fase estacionária, como por exemplo as fases Octadecilsilano (C18) e octilsilano (C8).

A composição da fase móvel pode se dar de forma isocrática, a composição do solvente não muda durante a corrida, ou na forma gradiente, onde a composição do solvente varia durante a corrida.

3.5 Radiofármacos peptídicos

Peptídeos são elementos necessários em muitos processos biológicos fundamentais, bem mais do que outras classes de moléculas. Eles estão presentes em controles de funções celulares, comunicação intercelular, resposta imune, entre outras atividades. Por exemplo, peptídeos funcionam como hormônios, neurotransmissores, como fatores de inibição e crescimento celular em tecidos normais e tumorais. Muitos tumores expressam receptores para diferentes peptídeos, freqüentemente em alta densidade (Ginj e Maecke, 2008).

Por esses motivos, pequenos peptídeos sintéticos utilizados na detecção de receptores são os agentes escolhidos para diagnóstico por imagem e radioterapia de determinados cânceres devido sua favorável farmacocinética. Técnicas de modificação molecular permitem a síntese de uma variedade de peptídeos bioativos com grupos quelantes (necessários para ligação ao elemento radioativo), sem o comprometimento das propriedades biológicas. Várias técnicas foram desenvolvidas para efetuar com eficiência a marcação de sítios específicos utilizando radionuclídeos como ^{99m}Tc , ^{123}I , ^{111}In e ^{18}F . Entre os radionuclídeos, o ^{99m}Tc apresenta propriedades físicas que favorecem a aquisição de imagens cintilográficas (Tabela 2) (Okarvi, 2004).

Tabela 2. Características de diferentes radionuclídeos utilizados na marcação de peptídeos em diagnóstico

<i>PROPRIEDADES</i>	<i>LIMITAÇÕES</i>
<p>Tecnécio-99m</p> <ul style="list-style-type: none"> • Fácil disponibilidade e baixo custo • Fácil manuseio • Razoável meia-vida de 6,01 horas • Emissão γ de 140 keV • Excelentes características para imagem • Ausência de radiação α e β • Dosimetria favorável 	<ul style="list-style-type: none"> • Não é apropriado para realização de imagens em estudos tardios
<p>Iodo-123</p> <ul style="list-style-type: none"> • Emissão γ de 159 keV • Meia-vida de 13 horas • Boas características para imagem 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto custo • Disponibilidade limitada • Radionuclídeo produzido em ciclotron
<p>Índio-111</p> <ul style="list-style-type: none"> • Emissão γ de 171 e 245 keV • Meia-vida de 2,8 dias • Utilizado em imagens tardias 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto custo • Disponibilidade limitada • Radionuclídeo produzido em ciclotron • Radiação relativamente alta para o paciente • Características nucleares sub-ótimas
<p>Cobre-64</p> <ul style="list-style-type: none"> • Emissão β^- (573keV) e β^+ (655keV) • Apropriado para imagens e radioterapia • Meia-vida de 12,7 dias • Pode ser obtido por ciclotron 	<ul style="list-style-type: none"> • Disponibilidade limitada • Alto custo na produção e despacho • Características sub-ótimas para imagens PET devido a baixa abundância de β^+ (19%)

<i>PROPRIEDADES</i>	<i>LIMITAÇÕES</i>
<p>Gálio-66-67-68</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adequado para γ cintilografias e imagens PET • Meia-vidas: ^{66}Ga (9,5horas); ^{67}Ga (78,3horas) e ^{68}Ga (68 minutos) • Boas características físicas 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto custo • Disponibilidade limitada • Radionuclídeos produzidos em ciclotron (^{66}Ga e ^{67}Ga)
<p>Fluor-18</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pode ser produzido em grandes quantidades (ex. Ci) • Baixa energia pósitron de 0,635 MeV • Alta sensibilidade e resolução • Baixa dose de radiação ao paciente • Meia-vida de 110 minutos permite a produção do radiofármaco e aquisição de imagens 	<ul style="list-style-type: none"> • Alto custo • Disponibilidade limitada • Radionuclídeo produzido em ciclotron

Vários receptores são super expressos em determinados tipos de tumores e isto têm sido explorados para desenvolvimento de radiofármacos. A marcação de peptídeos receptor-específicos possibilita a visualização dos tumores por meio de cintilografia (Tabela 3) (Reubi et al. 1998 ; Breeman et al. 1996).

Tabela 3. Sistemas Peptídeos-Receptor específicos

<i>RECEPTOR PARA:</i>	<i>TIPOS DE TUMORES</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Somatostatina 	Tumores neuroendócrinos, câncer de pequenas células pulmonar, câncer medular de tireóide, vários tumores do sistema nervoso e linfoma
<ul style="list-style-type: none"> • Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) 	Vários adenocarcinomas (estômago, cólon, pâncreas, pulmão, etc), câncer de pequenas células pulmonares, tumores neuroendócrinos e linfoma

RECEPTOR PARA:**TIPOS DE TUMORES**

- | | |
|--|---|
| • Colecistoquinina-B (CCK-B) | Câncer medular de tireóide, de pequenas células pulmonares, ovariano estromal, astrocitoma (potencialmente adenocarcinoma gastrointestinal e cânceres de estômago, cólon, pâncreas) |
| • Colecistoquinina-A (CCK-A) | Tumores gastroenterohepáticos, meningiomas e neuroblastomas |
| • Substância P | Câncer medular de tireóide, de pequenas células pulmonares, tumores de mama, vasos peri e intra-tumoral |
| • Bombesina | Câncer de pequenas células pulmonares, colônico e glioblastoma |
| • Neurotensina | Câncer pancreático, prostático e de pequenas células pulmonares |
| • Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) | Câncer de mama e próstata |
| • Glucagon-like peptide-1" (Glp-1) | Insulinoma, câncer medular de tireóide |
-

Os peptídeos possuem grandes vantagens sobre as proteínas e anticorpos na utilização como radiofármacos. Essas incluem: peso molecular menor; fácil preparação; fácil marcação; várias técnicas de radiomarcagem; tolerância em misturas e modificações químicas; capacidade de se ligar a agentes quelantes bifuncionais no C ou N-terminal do peptídeo; possibilidade de modificar a taxa e a rota de excreção; rápido clareamento sanguíneo e de tecidos não alvos; elevada razão entre o tumor e o tecido adjacente; alta penetração no tecido tumoral; baixa toxicidade e imunogenicidade; alta afinidade e especificidade por receptores

(Okarvi, 2004). Em contra partida, os anticorpos possuem alto peso molecular, limitada marcação e baixa captação no órgão ou tecido alvo. Apresenta, também, lento clareamento sanguíneo e como resultado, uma modesta razão alvo/tecido adjacente (Ginj e Maecke, 2008).

Uma importante consideração em relação a um radiofármaco peptídico é a sua estabilidade *in vivo*. Isto tem sido mostrado nos análogos da somatostatina. Peptídeos possuem uma meia-vida biológica muito curta. Sofrem rápida degradação no plasma por proteínas endógenas, daí a necessidade desses peptídeos sofrerem alterações moleculares para inibir essa degradação enzimática. Uma das formas é a substituição de bandas de aminoácidos desses peptídeos e a ciclização (Okarvi, 2004).

A solubilidade, estrutura e função dos peptídeos são características da seqüência e composição de seus aminoácidos. A via e a taxa de excreção dos peptídeos podem ser modificadas pela introdução de aminoácidos hidrofílicos ou lipofílicos na cadeia peptídica sem alterar as suas propriedades de ligação aos receptores específicos. Peptídeos lipofílicos são geralmente eliminados do corpo por via hepatobiliar e peptídeos hidrofílicos por via renal. A ciclização dos peptídeos pode ser usada para restringir a mobilidade de conformação e ganhar afinidade por receptores e atividade biológica. Para evitar interferência da radiomarcagem com a região de ligação aos receptores, um espaço funcional pode ser incorporado entre o sítio de ligação e o quelante escolhido (Okarvi, 2004).

3.6 Marcação de peptídeos com ^{99m}Tc

A marcação de peptídeos com ^{99m}Tc pode se realizar de três maneiras: (i) marcação direta, (ii) marcação indireta utilizando quelante bifuncional pré-marcado e (iii) marcação indireta, utilizando quelante bifuncional previamente acoplado ao peptídeo. Esses métodos possuem vantagens e limitações, requerendo uma seleção de acordo com o tipo de peptídeo ou a natureza do complexo- ^{99m}Tc .

A marcação direta envolve a quelação direta do ^{99m}Tc com os grupos-sulfídricos do peptídeo (Figura 2). Durante a marcação direta, o agente redutor converte as pontes dissulfídicas da cisteína em grupos tiol livres para a ligação do ^{99m}Tc . A falta de controle sobre a ligação não específica metal-quelante, além do fato de tal método somente poder ser aplicado a peptídeos que possuam pontes dissulfídicas, limita sua aplicabilidade. Além disto, a marcação direta resulta em peptídeos com baixa estabilidade *in vivo* e essas pontes dissulfídicas da cisteína são essenciais para a manutenção das propriedades biológicas das proteínas. Apesar de tais restrições, o método tem sido aplicado na preparação de muitos radiofármacos baseados em peptídeos (Gandomkar et al. 2003; Okarvi, 2004; Reneen 2000).

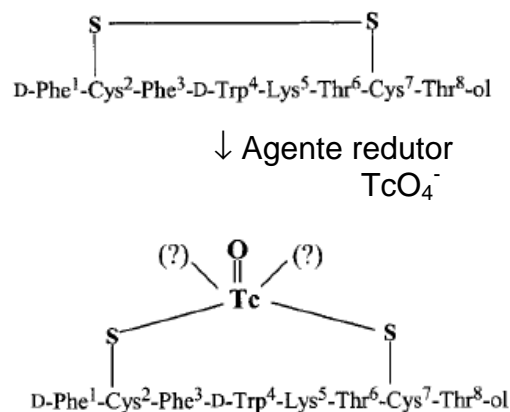


Figura 2. Radiomarcagem direta do peptídeo com ^{99m}Tc (Fonte: Adaptado de Okarvi, 2004)

No método do quelante pré-marcado, a marcação química é bem definida e facilmente controlada. O radionúclideo se liga primeiramente ao quelante e este se liga posteriormente ao peptídeo. As múltiplas fases desta marcação fazem com que esta aplicação seja inviável na rotina clínica (Figura 3) (Okarvi, 2004).

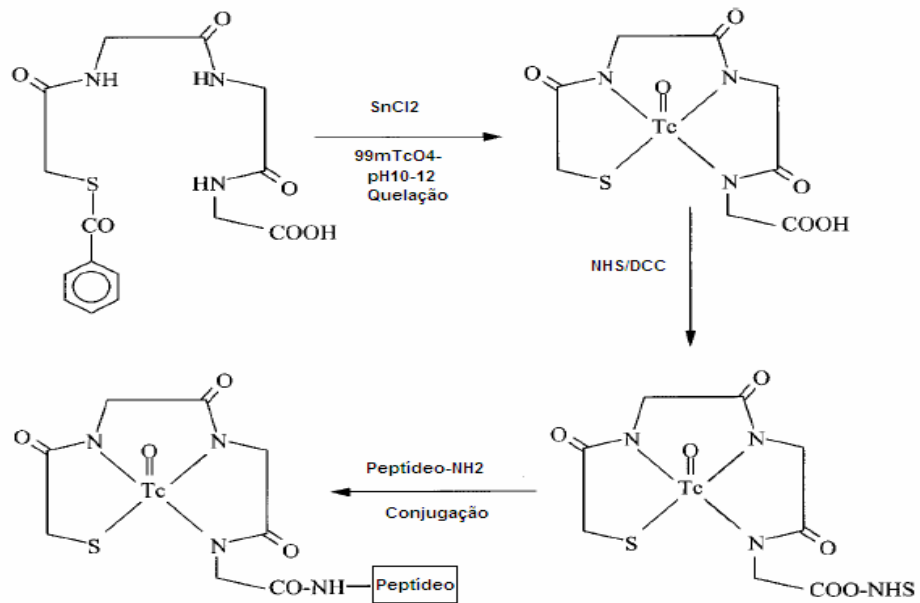


Figura 3. Marcação do peptídeo com ^{99m}Tc via quelante N_2S_2 pré-marcado
(Fonte: Adaptado de Okarvi, 2004)

Na outra variante do método indireto, um agente quelante bifuncional é ligado ao peptídeo durante sua síntese, para posteriormente ser marcado com ^{99m}Tc (Figura 4) (Okarvi, 2004).

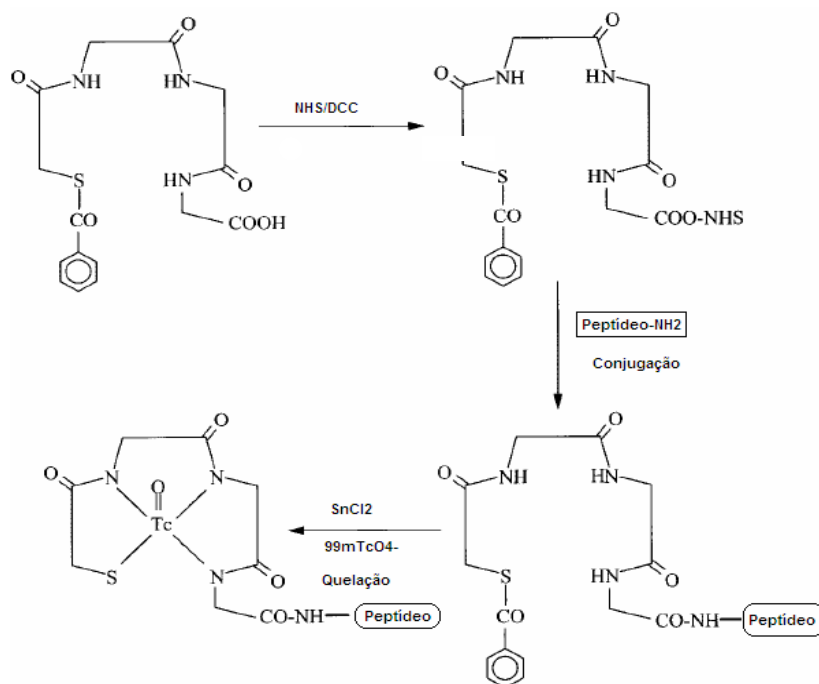


Figura 4. Marcação indireta do peptídeo com ^{99m}Tc via agente quelante N_2S_2 bifuncional
(Fonte: Adaptado de Okarvi, 2004)

Uma variedade de agentes quelantes bifuncionais (AQB) para marcação de proteínas com tecnécio-99m foram desenvolvidos incluindo agentes do tipo aminotiólicos (N_nS_n) ou tetraamínicos (N_4) por exemplo: o mercaptoacetiltriglicina (MAG_3), mercaptoacetildiglicina (MAG_2), diaminoditiol (DADT), etilenodicisteína (EC), N_3S e o grupamento hidrazinonicotinamida (HYNIC) (Okarvi,2004). Desses AQB, o de maior interesse é o HYNIC devido a alta eficiência de marcação a peptídeos e a formação de complexos hidrofílicos (Liu et al. 1998).

Outros AQB são utilizados para marcação de proteínas com radioisótopos do tipo lantanídeos, por exemplo, o itrio-90 (^{90}Y) e lutécio-177 (^{177}Lu), sendo os mais utilizados o anidrido cíclico do ácido etileno diamino pentacético (DTPA) e o ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano- N,N',N'',N''' -tetra acético (DOTA) (Gnanasegaran et al. 2005).

Na marcação dos análogos da SM com ^{99m}Tc os agentes quelantes bifuncionais ligam-se ao peptídeo no N-terminal, servindo de sítio de marcação. Como agente quelante, grupo HYNIC não pode sozinho, satisfazer todos os sítios de ligação do ^{99m}Tc , portanto são utilizados coligantes como glucoheptonato, tricina, ácido etilenodiamino- N,N' -diacético (EDDA), sozinhos ou em combinação, como por exemplo: tricina/fosfina ou tricina/EDDA, ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) para satisfazer essas ligações (Figura 5) (Decristoforo e Mather (b), 1999; Lui et al. 1998; Liu et al. 2002)

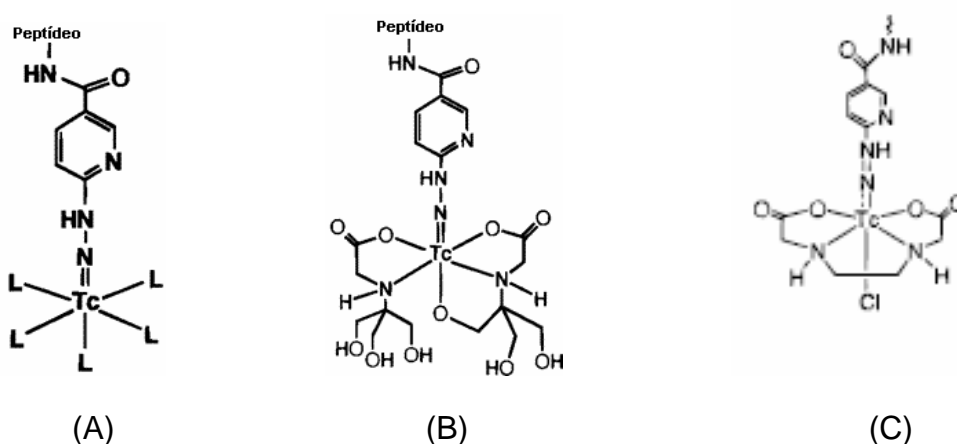


Figura 5. (A) Esquema da estrutura Peptídeo-HYNIC- ^{99m}Tc (B) Esquema estrutura Peptídeo-HYNIC-tricina- ^{99m}Tc ; (C) Esquema Peptídeo-HYNIC-EDDA-

^{99m}Tc (Fonte: adaptado de Liu et al. 1996; Liu et al. 1997)

O HYNIC mostrou-se promissor devido a sua característica monodentada que favorece a utilização de vários coligantes levando a diferentes biodistribuições dos peptídeos análogos (Storch et al. 2005).

A correta natureza da ligação do EDDA ao Peptídeo-HYNIC- ^{99m}Tc não é muito clara. Existem algumas possibilidades descritas (Figura 6) (Liu et al.1997):

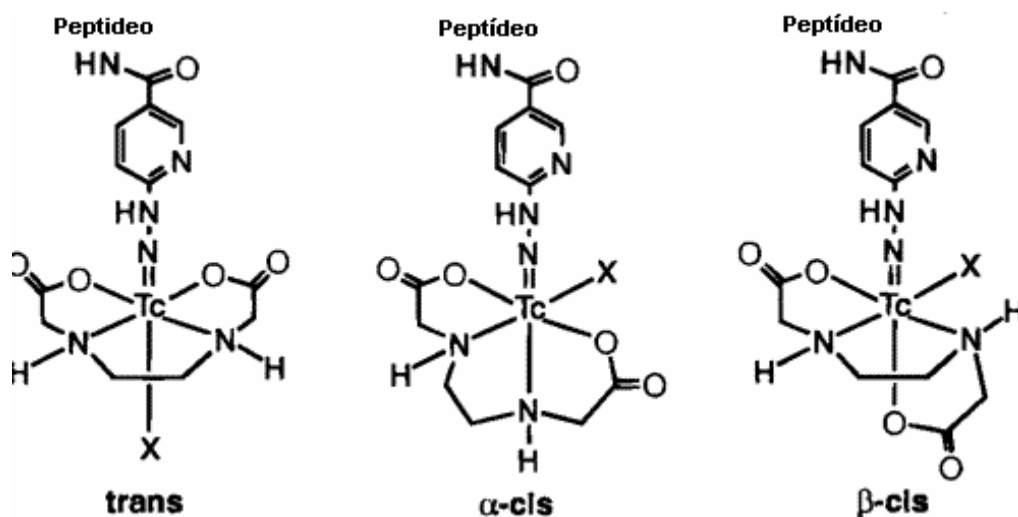


Figura 6. Três possibilidades de ligação do coligante EDDA ao complexo Peptídeo-HYNIC- ^{99m}Tc (Fonte:Liu et al. 1996)

A localização do AQB e os diferentes tipos de coligantes na molécula do peptídeo podem modificar sua farmacocinética (Figura 7). Para preservar a afinidade de ligação do peptídeo, a ligação do AQB deve ser realizada em um sítio distante da região de ligação do peptídeo com o receptor (Decristoforo e Mather (b), 1999)

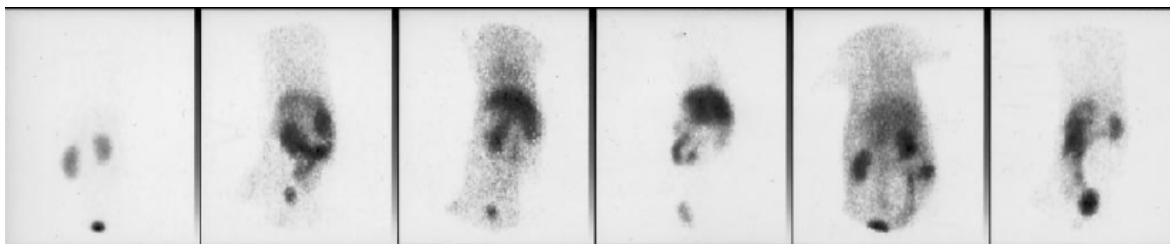


Figura 7. Imagens cintilográficas em ratos *Wistar* normais (posição supina), 4 horas após a injeção de RC160-^{99m}Tc utilizando diferentes tipos de coligantes: EDDA, Et₂EDDA*, EDTA, BzEDTA, tricina, e tricina/NA*** (da direita para esquerda) Diferenças na biodistribuição do complexo radiomarcado. (Fonte: Decristoforo e Mather (b), 1999)**

* ácido N,N'-dietililenodiaminodiacético

** ácido N-benzililenodiaminotriacético,

*** tricina - ácido nicotínico

Para uma imagem com ótima sensibilidade na detecção de tumores receptor-positivos, deve-se combinar uma alta taxa de marcação desse tumor com uma radiação de fundo baixa e para tumores localizados em região da pélvis e abdome, espera-se uma baixa atividade no trato gastrointestinal e vascular (Decristoforo e Mather (b),1999).

3.7 Radiofármacos baseados em peptídeos análogos da somatostatina

3.7.1 Somatostatinas endógenas e análogos sintéticos

A Somatostatina é um neuropeptídeo cíclico de 14 ou 28 aminoácidos (Figura 8) produzido pelo hipotálamo, hipófise, tronco cerebral, trato gastrointestinal e pâncreas. Atua como neurotransmissor que inibe a formação de peptídeos e a secreção de células neuroendócrinas. Fora do sistema nervoso central sua atividade hormonal inclui a inibição da liberação de hormônio de crescimento, insulina, glucagon, gastrina, serotonina e calcitonina. Tem também efeito antiproliferativo em tumores e função moduladora da atividade imunológica (Thrall e Ziessman, 2001).

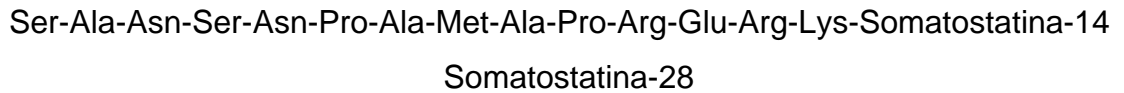
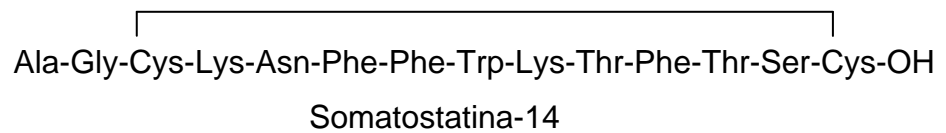


Figura 8. Composição de aminoácidos da Somatostatina-14 e 28

A rápida degradação plasmática das somatostatinas endógenas constituía-se num problema para sua utilização como fármacos. Para contornar este problema, foram sintetizados vários análogos da somatostatina que passaram a ter uma meia-vida plasmática maior. O primeiro análogo e até hoje utilizado foi o octreotídeo, que apresenta uma cadeia com oito amino-ácidos (Figura 9).

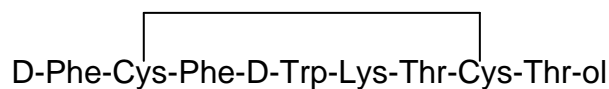


Figura 9. Composição de aminoácidos do Octreotídeo

Na tentativa de desenvolver um análogo da somatostatina ideal, várias modificações na estrutura desses peptídeos foram realizadas, indicando que pequenas modificações na molécula podem acarretar em mudanças significativas em sua biodistribuição (Figura 10) (Okarvi, 2004).

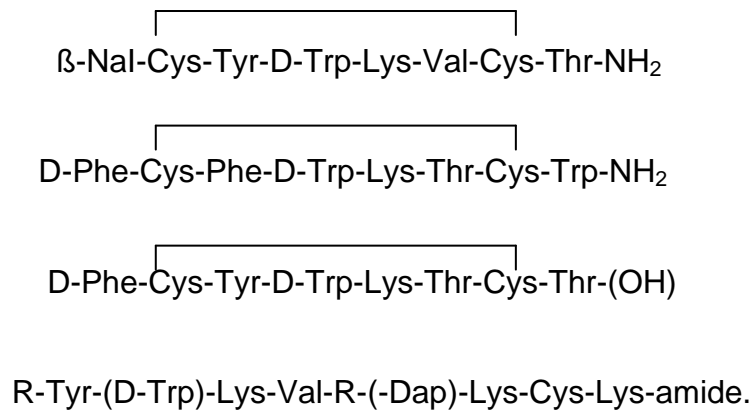


Figura 10. Análogos sintéticos da somatostatina. De cima para baixo: lanreotídeo, RC-160, Tyr³-octreotato e depreotide (P829)

3.7.2 Análogos da somatostatina radiomarcados

Na última década houve um espetacular crescimento no desenvolvimento de pequenos peptídeos radiomarcados para uso em imagens cintilográficas com alta afinidade por tumores receptor-associados. A evidente super-expressão de receptores para somatostatina em tumores e metástases de origem neuroendócrina e a rápida degradação plasmática tem promovido descobertas em relação a esses análogos (Maina et al. 2002).

As imagens cintilográficas com análogos da somatostatina são indicadas na localização de tumores primários e sítios metastáticos (estadiamento), detectar progressão da doença, monitorar o desempenho cirúrgico, radio e químico terapêutico e prever a resposta terapêutica (selecionar pacientes receptor-positivos para terapia com radionuclídeos) (Bombardieri et al. 2003).

O primeiro análogo da somatostatina utilizado na aquisição de imagens cintilográficas foi Tyr³-octreotídeo. Por radiodação, o Phe³ do octreotídeo foi substituído por um resíduo de Tyr. O Tyr³-octreotídeo-¹²³I (Figura 11) revelou ótimas qualidades em imagens em vários tipos de tumores neuroendócrinos.

Contudo sua excreção hepato-biliar e o processo de radioiodação limitaram a sua utilização (Okarvi, 2003).

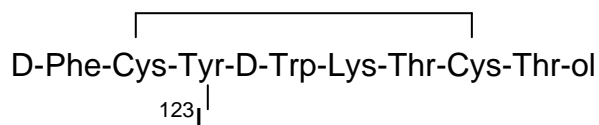


Figura 11 – Representação da estrutura do octreotídeo-Tyr³-¹²³I

Conseqüentemente, um novo radiofármaco foi desenvolvido ligando o DTPA ao octreotídeo, resultando no DTPA-octreotídeo para marcação com ¹¹¹In (comercialmente conhecido como OctreoScan[®]) (Seregni et al. 1998).

Hoje, o uso do DTPA-octreotídeo-¹¹¹In é considerado uma poderosa técnica não invasiva na localização e estadiamento dos tumores neuroendócrinos (Figura 12).

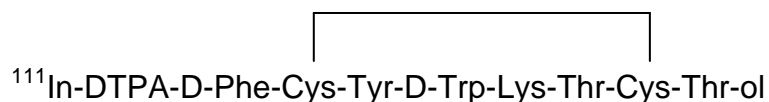


Figura 12 - Representação da estrutura do análogo DTPA- octreotídeo-¹¹¹In

O DTPA-octreotídeo-¹¹¹In é rapidamente clareado pelos rins. Apenas 2% da atividade administrada sofre excreção hepatobiliar e 10% está presente na circulação 4 horas após a administração. Este clareamento rápido aumenta a relação de radioatividade alvo/não alvo. Captação fisiológica ocorre em glândula tireóide, fígado, vesícula biliar, baço, rins e bexiga. Os rins retêm uma porção considerável do composto e aparecem bastantes intensos mesmo em imagens tardias (Thrall e Ziessman, 2001). A maior parte da captação renal se dá pela reabsorção do peptídeo radiomarcado nas células tubulares após filtração glomerular. No entanto, receptores para somatostatina são encontrados em célula renal tubular e *vasa recta* (Kwekkeboom et al. 2000).

A acurácia do DTPA-Octreotídeo-¹¹¹In para diferentes tumores neuroendócrinos pode ser vista na tabela 4 (Thrall e Ziessman, 2001)

Tabela 4. Acurácia do Octreotídeo-DTPA-¹¹¹In em estudo multicêntrico

Tipo de tumor	nº compatíveis de diagnóstico/total de pacientes	Porcentagem (%)
Carcinóide	190/237	80
Insulinoma	8/11	72
Gastrinoma	40/42	95
Glucagonoma	8/11	72
Carcinoma de Pequenas células	2/2	100
Feocromocitomas	9/9	100
Paraganglioma	6/7	86
Carcinoma Medular da Tireóide	12/22	54
Vipoma	6/7	86
Adenoma de Hipófise	24/30	80

A ampla aplicação no diagnóstico oncológico do DTPA-octreotídeo-¹¹¹In é restrita pelo seu alto custo e a limitada produção do ¹¹¹In em ciclotron, lembrando também, das características físicas do ¹¹¹In de ser um emissor de fótons de média energia (171 keV, 247 keV), o que acarreta em imagens com pouca resolução e uma alta dose de radiação ao paciente.

Como conseqüência, estudos recentes mostram que a utilização do ^{99m}Tc como radiotraçador ligado às SM sintéticas promovem melhor viabilidade de estudo, uma vez que o radioisótopo pode ser obtido diariamente por meio da eluição dos geradores de ⁹⁹Mo-^{99m}Tc, além de suas características físicas favoráveis para reproduzir imagens de SPECT (*Single Photon Emission Computer Tomography*) em Medicina Nuclear (Maina et al. 2002; Guggenberg et al.2003).

Como resultado, nos últimos anos, vários análogos da somatostatina surgiram carregando uma variedade de agentes quelantes em suas estruturas para eficiente ligação ao ^{99m}Tc (Maina et al. 2002).

No início da década de 90, Maina e colaboradores (Maina et al. 1994) estudaram um análogo da somatostatina marcado com ^{99m}Tc, o SDZ 219-387.

Este análogo é um derivado do octreotídeo e o sistema quelante bifuncional utilizado foi o PnAO (propileno amina oxima tetradentado) acoplado no primeiro aminoácido do octreotídeo (D-fenilalanina) via ligação tiouréia. Este radiofármaco apresentou rendimentos de marcação superiores a 90% e alta afinidade a receptores de somatostatina, principalmente o sub-tipo 2. Entretanto, sua alta lipofilicidade leva a uma maior porção de metabolização no fígado, o que inviabiliza a análise de tumores e metástases da região abdominal.

Na seqüência, uma variedade de quelantes bifuncionais, já descritos anteriormente, foram acoplados ao N-terminal do octapeptídeo servindo como sítio de ligação ao ^{99m}Tc . A utilização do HYNIC e de quelantes tetramínicos são as mais identificadas em estudos publicados (Maina et al.2002; Gabriel et al.2004; Storch et al.2005; Cwikla et al.2008).

Maina e colaboradores (Maina et al. 2002) avaliaram o N^0_4Tyr^3 – octreotate marcado com ^{99m}Tc (Demotate- ^{99m}Tc), que difere do Tyr^3 -octreotate por carregar no N-terminal uma cadeia tetraamínica aberta que serve como sítio de ligação do ^{99m}Tc . Concluíram que o composto possui várias vantagens combinadas, a saber: alta afinidade pelos tumores e metástases, rápida marcação e clareamento sanguíneo. Possui uma estabilidade pós marcado de 6 horas o que é importante para a aplicabilidade clínica. O fato do Demotate- ^{99m}Tc resistir à degradação enzimática é comprovado com a presença do composto intacto na urina de animais injetados.

Outro estudo (Gabriel et al.2004) realizado em pacientes com tumores e metástases de tumores neuroendócrinos já confirmados compara o Demotate- ^{99m}Tc com o HYNIC-octreotídeo- ^{99m}Tc e identificou biodistribuição similar, com clareamento sanguíneo mais rápido para o primeiro, o que pode inicialmente ser considerada uma vantagem. Entretanto, o mesmo estudo identificou que lesões hepáticas menores apresentaram visualização prejudicada com o Demotate- ^{99m}Tc , em virtude, provavelmente, deste clareamento rápido.

O primeiro peptídeo radiomarcado com tecnécio registrado e comercializado é o depreotideo-^{99m}Tc (P829, NeoSpect®). Ele demonstrou bons resultados na identificação de nódulos solitários em pacientes com câncer de pulmão de pequenas células. Em pacientes com tumores endócrinos, a taxa de detecção foi baixa quando comparada com a utilização do Octreoscan-¹¹¹In (Storch et al. 2005).

Pesquisas estão sendo desenvolvidas sobre a formulação de um reagente liofilizado para pronta marcação com tecnécio-99m utilizando o HYNIC-Tyr³-octreotídeo. Estes estudos apresentam um reagente com grande qualidade e com alta especificidade para identificar tecidos receptor-positivo para somatostatina. Os coligantes escolhidos nestas formulações são o EDDA e a tricina (Guggenberg et al.2004 e Vazquez-González et al.2006).

Estudos avaliaram o diagnóstico de tumores receptor-positivos para somatostatina utilizando o Tyr³-octreotídeo-EDDA-HYNIC-^{99m}Tc (HYNIC-octreotídeo). Mostraram que o composto tem um rápido clareamento sanguíneo e uma baixa captação em tecidos receptor-negativos. Mostraram ainda, que sua excreção é predominantemente renal com pequeno acúmulo em região do trato gastrointestinal (Decristoforo et al.2000; Maina et al.2002).

Estudo em modelo animal revela (Decristoforo et al.2000) que o HYNIC-octreotídeo pode ser marcado com ^{99m}Tc com alta atividade específica e com pureza radioquímica superior a 90%. Apresenta rápido clareamento sanguíneo, baixa captação em tecidos receptor-negativos e insignificante captação em região gastrointestinal. A utilização de diferentes coligantes mostra importantes diferenças em sua biodistribuição (Tabela 5) .

Tabela 5. Biodistribuição em camundongos *Nude* do HYNIC-octreotídeo marcado com ^{99m}Tc , utilizando diferentes coligantes em comparação com o ^{111}In -Octreotídeo. Fonte: (Adaptado de: Decristoforo et al.2000).

Sítio	HYNIC-octreotídeo com EDDA	HYNIC-octreotídeo com tricina	^{111}In -octreotídeo
Rins	4,71 ± 1,38	14,57 ± 3,42	22,12 ± 6,53
Tumor	9,65 ± 2,16	9,58 ± 0,90	4,26 ± 1,00
Razão tumor/rins	2,05	0,66	0,19

Em outro estudo, também com modelo animal, comparou-se a biodistribuição do EDDA-HYNIC-Trp³-octreotato- ^{99m}Tc (HYNIC-octreotato) com o EDDA-HYNIC-octreotídeo- ^{99m}Tc (HYNIC-octreotídeo) (Storch et al. 2005). Os peptídeos marcados apresentaram um rápido clareamento sanguíneo com menos de 0,1% da atividade injetada circulante após 4 horas de injeção em camundongos *Nude*. Mostraram também uma significativa captação em tecidos receptor-positivos (como pâncreas, adrenal e estômago) e excreção predominantemente renal. Para confirmação da marcação em tecido receptor-positivo, ensaios utilizando grandes doses bloqueadoras (Tyr-octreotideo) foram realizados e comprovaram ausência de captação nos tecidos após o bloqueio (Storch et al. 2005).

Realizando uma comparação direta do HYNIC-octreotídeo- ^{99m}Tc com o HYNIC-octreotato- ^{99m}Tc , podemos considerar maior afinidade do HYNIC-octreotídeo- ^{99m}Tc para a marcação do receptor sstr2 quando comparado com HYNIC-octreotato- ^{99m}Tc , mas este último apresenta uma maior taxa de internalização, comprovada em estudos com células AR42J de tumor pancreático de ratos. As imagens com os dois radiopeptídeos apresentam uma razão tumor/tecido não tumoral maior do que a encontrada nos peptídeos marcados com ^{111}In . Estudo revela que ambos os agentes marcado com ^{99m}Tc apresentam concordância em 85% dos sítios tumorais e metastáticos avaliados, com uma vantagem encontrada no HYNIC-octreotato- ^{99m}Tc na análise de linfonodos e

metástases hepáticas (isto devido à menor taxa de captação fisiológica hepática apresentada pelo HYNIC-octreotato-^{99m}Tc) (Cwikla et al. 2008).

A alta sensibilidade para detectar tumores receptor-positivos, combinada com uma baixa e difusa radiação de fundo no trato gastrointestinal e vascular, resulta na obtenção de imagens de melhor qualidade utilizando os derivados de SM marcados com ^{99m}Tc quando comparada com as imagens que utilizam ¹¹¹In. Contudo, a alta atividade renal pode impedir que tumores sejam localizados em imagens imediatas dessa área, mas leva-se em consideração que raramente a região renal é sítio de metástases dos tumores avaliados (Gabriel et al. 2003).

3.7.3 Receptores para somatostatina

Até o presente momento, são conhecidos cinco sub-tipos de receptores para somatostatina (sstr): sstr1, sstr2, sstr3, sstr4 e sstr5. Para o sstr2, existem ainda duas variantes identificadas, sstr2A e o sstr2B. Estudos farmacológicos indicam que as somatostatina-14 e somatostatina-28 se ligam a todos os sub-tipos de receptores com grande afinidade (Breeman et al. 1996).

Receptores para somatostatina são expressos em vários tecidos normais e em maior quantidade em tumores de origem neuroendócrina, como os tumores gastroenteropancreáticos. Quando tecidos normais expressam receptores para somatostatina na superfície de suas células, se por ventura desenvolverem um processo neoplásico, expressarão uma quantidade muito maior desses receptores (Bombardieri et al. 2003).

Os cinco sub-tipos de receptores para somatostatina são expressos em maior quantidade em vários tecidos cancerosos. O sstr mais freqüente nesses tecidos é o sstr2. Contudo, existem exceções, como o adenoma pituitário onde predomina o sstr3, tumores em pulmões expressam uma maior quantidade de sstr5, mas também expressam o sstr2 e sstr3. Os sstr1, 2, 3 e 5 são mais encontrados em tumores gastroenteropancreático, em câncer medular da tireóide e câncer do epitélio ovariano (Gandomkar et al. 2007).

A internalização de análogos da somatostatina radiomarcados em células de NETs é intermediada pela presença dos sstr na membrana plasmática. Após a ligação ao sstr, o complexo peptídeo-receptor é internalizado por endocitose e transportado para várias organelas celulares, por exemplo lisossomos e nucléolos. O complexo peptídeo-receptor pode ser dissociado por acidificação intracelularmente e os receptores podem ser reciclados para a membrana plasmática (Figura 13). Todo esse processo demora aproximadamente 15 minutos (Oddstig et al.2006).

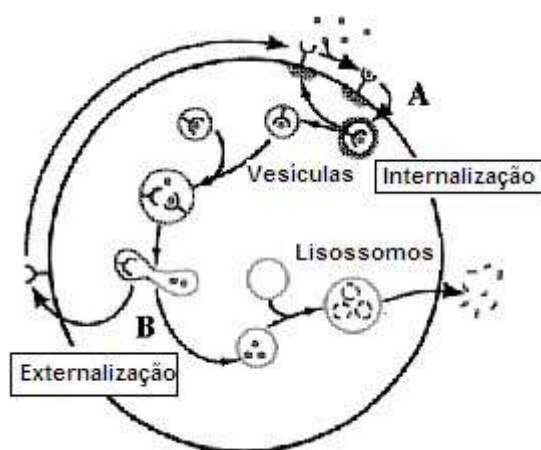


Figura 13 – Esquema de internalização do sistema receptor-peptídeo radiomarcado (Kaltsas et al.2001).

Embora o sstr2 seja considerado o receptor mais importante, não podemos excluir a participação dos sstr3 e sstr5. Estudo *in vitro* demonstrou que esses receptores internalizam a somatostatina radiomarcada com mais eficiência quando comparado ao sstr2 (Hofland et al. 2003).

Reubi e colaboradores (Reubi et al. 1999), estudaram vários análogos sintéticos da somatostatina e avaliaram a possibilidade de se ligarem aos receptores sstr. Identificaram que pequenas diferenças na seqüência de aminoácidos da proteína e o acoplamento de quelantes na estrutura desses análogos alteram a forma de se ligarem aos receptores. Análogos como o octreotídeo, lanreotídeo, vapreotídeo e o Tyr³-octreotídeo possuem uma alta

afinidade pelo receptor sstr2. Observou-se, também, uma maior afinidade do DOTA-octreotídeo pelo sstr3 em relação ao DTPA-Tyr³-octreotídeo, fato atribuído à substituição do Tyr³ pelo Phe e à substituição do quelante DTPA pelo DOTA. O DOTA lanreotídeo mostrou quinze vezes mais afinidade pelo receptor sstr5 do que o análogo comercial DTPA-octreotídeo -¹¹¹In. De modo geral, o octapeptídeo octreotídeo, não apresenta afinidade pelos sstr 1 e 4, uma intermediária afinidade pelo sstr3, e uma moderada afinidade pelo sstr5 (Reubi et al.2000).

Embora o DTPA-octreotídeo-¹¹¹In seja conhecido por se ligar a outros receptores, Virgolini e colaboradores (Virgolini et al. 1998) relatam que o DOTA-lanreotídeo marcado com ⁹⁰Y ou ¹¹¹In pode ser considerado um “marcador universal” para receptores de somatostatina, com alta afinidade pelos receptores sstr2, sstr3, sstr4 e sstr5 e uma moderada afinidade ao sstr1. O DOTA-vapreotídeo (RC-160) marcado com ⁹⁰Y mostra igual afinidade os subtipos 2, 3 e 4.

O depreotídeo-^{99m}Tc, por sua vez, mostrou uma baixa afinidade pelo receptor sstr2 (mais encontrados em tumores neuroendócrinos) e alta afinidade pelo sstr3, resultando em uma pobre qualidade em imagens cintilográficas (Cwikla et al. 2008).

A substituição do treoninol pela treonina no carbono terminal do octreotídeo é a diferença entre esse análogo e o outro análogo octreotato. Estudos revelaram que tal substituição acarreta ao octreotato propriedades superiores de ligação a receptores, com maior afinidade de ligação ao sstr2, com aumento na internalização e rápido clareamento sanguíneo (Nikolopoulou et al. 2005; Maina et al. 2002).

Recentemente, novos análogos da somatostatina com alta afinidade para todos os receptores estão sendo desenvolvidos pela indústria farmacêutica para utilização em tratamentos de tumores endócrinos digestivos. Entre eles o SOM230 e KE108 são os mais promissores. Contudo, testes clínicos devem ser realizados para demonstrar que esses análogos são igualmente seguros e viáveis

comercialmente como os análogos já existentes na rotina clínica (Panzuto et al. 2003).

3.7.4 Tratamento de tumores neuroendócrinos com análogos da Somatostatina radiomarcados

A base da terapia com análogos da somatostatina radiomarcada é a super-expressão de receptores sstrs nas células tumorais. Vários tipos de análogos como o octreotídeo, lanreotídeo e o octreotato são utilizados para este tipo de terapia. O octreotídeo foi o primeiro análogo a ser utilizado marcado com ^{111}In e atualmente também é marcado com ^{90}Y e ^{177}Lu . A recente introdução do quelante DOTA aumentou a estabilidade dos radioconjugados e possibilitou o uso de vários radionuclídeos como o ^{90}Y . A taxa de resposta desse radioisótopo em terapia depende de alguns fatores: tipo de análogo e radionuclídeo, tipo e tamanho do tumor (Tabela 6) (Gnanasegaran et al.2005).

Tabela 6. Resumo das características de radiofármacos análogos da somatostatina utilizados em terapia

Radiofármacos	Octreotídeo-DTPA- ^{111}In	Octreotídeo-DTPA- ^{90}Y	Lanreotideo-DOTA- ^{90}Y	Octreotato-DOTA- ^{177}Lu
Tipo de radiação	Elétrons auger	Alta Energia β^- (>1mm)	Alta Energia β^- (>1mm)	Baixa Energia β^- e γ (<200 μm)
Meia-vida	67 horas	64 horas	64 horas	160,8horas
Quelante	DTPA	DOTA	DOTA	DOTA
Dose	Maior 5GBq/ciclo	1 a 4,4GBq/ciclo	1,2 GBq/ciclo	3,7-7,4GBq/ciclo
Imagens	sim	não	não	sim
Afinidade por receptor	Alta para sstr 2 e 5, moderada para 3 e sem afinidade para sstr 1 e 4	Alta para sstr2 e 5, moderada para 3 e sem afinidade para sstr 1 e 4	Alta para sstr 2,3,4 e 5 e baixa para sstr1	Nove vezes mais afinidade pelo sstr2

4. Materiais e Métodos

4.1 Infra-estrutura e equipamentos

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios do Centro de Radiofarmácia (CR) da Diretoria de Radiofarmácia (DIRF) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) e no Laboratório de Radiofarmácia do Centro de Medicina Nuclear da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) que proporcionaram toda infra-estrutura necessária para manipulação de fontes radioativas não seladas.

Os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos pelo CR. O radioisótopo ^{99m}Tc foi obtido a partir da eluição de geradores molibdênio-tecnécio (^{99}Mo - ^{99m}Tc) produzidos no IPEN.

4.1.1 Reagentes e Soluções

- Acetato de amônia – Merck;
- Acetona, p.a. – Grupo Química;
- Acetonitrila, grau pureza HPLC - Carlo Erba;
- Ácido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) p.a – Merck;
- Ácido Clorídrico, p.a. - Merck;
- Ácido trifluoracético (TFA), grau de pureza p.a.- Merck;
- Água purificada (Purificador Milli-RX 45 – Millipore);
- Citrato de Sódio hidratado – Merck;
- Cloreto de Sódio 0,9% - Farmace;
- Cloreto estanoso dihidratado ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) - Q.M.
- EDDA - ácido etilenodiamino-N,N'-diacético – Sigma Aldrich;
- Etanol, p.a. – Merck;
- Fosfato de sódio dibásico, p.a. - Merck;
- Fosfato de sódio monohidratado, p.a. - Merck ;
- Hidróxido de sódio p.a. - Vetec Química fina;
- Manitol p.a. – Nuclear;
- Metanol p.a. – Merck;
- Metiletilcetona (MEC) – Merck;

- Nitrogênio gasoso - White Martins;
- Nitrogênio líquido - White Martins;
- Peptídeo - HYNIC- Tyr3-Octreotato , AnaSpec INC Custom Peptide Synthesis, EUA;
- Solução de Pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) eluída do gerador ^{99}Mo - $^{99\text{m}}\text{Tc}$ – IPEN-CNEN/SP (IPEN-TEC);
- Tricina 98 % – Sigma Aldrich.

4.1.2 – Equipamentos

- Agitador magnético - Fisaton mod. VB50R, Brasil;
- Balança Analítica, modelo M-220 – Denver Instruments, EUA;
- Calibrador de doses, modelo CRMTM-35R - Capintec, EUA;
- Câmara de cintilação, modelo Nucline TH22 – Mediso (Medical Imaging Systems) EUA;
- Câmara de Cintilação SMV (Sophy Medical Vision), França;
- Contador automático tipo poço, com cristal de NaI(Tl) , Gama Counter Automatic 1480, modelo Wizard 3” – Perkin Elmer, EUA;
- Contador automático tipo poço, com cristal de NaI(Tl), modelo E5002 cobra II – Packard-Camberra, EUA;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência – Shimadzu modelo RF-10AxL com detetor de radiação gama Parkin Elmer RadiometricTM Modelo 600TR, EUA;
- Estufa – Fabbe, Brasil;
- Freezer, modelo Stock F-17; Prosdócimo, Brasil;
- Geladeira - Metalfrio Mod. VB50R, Brasil;
- Liofilizador – Edwards modelo Super Modoly, EUA.
- Manta aquecedora - Quimis Q-310, Brasil;
- Pipetas automáticas 10-100 e 100-1000 – Labmate e HTL;
- PHmetro MicroNal mod. B374, Brasil.

4.1.3 – Outros

- Célula de tumor de pâncreas de ratos (AR42J) – ATCC[®], EUA.
- Coluna para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – C¹⁸, 5 μm , 4.6x250 mm - Waters.

- Frascos penicilina e rolhas de borracha;
- Fitas para cromatografia em camada delgada (ITLC-SG) - 5 cm x 20 cm – Pall Corporation – Life Sciences
- Fitas para determinação do pH - Baker –pHIX ,pH 0 -14 , J.T.Baker.
- Seringas descartáveis de 1 e 3 mL;
- Vidraria e material de laboratório em geral;

4.1.4 – Animais

Foram seguidas as diretrizes, padrões, regulamentos e leis relativas aos cuidados e manutenção dos animais em experimentação, de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

- Camundongo adulto da linhagem *Nude*, Biotério do IPEN/CNEN – SP;
- Camundongo adulto da linhagem *Swiss*, Biotério do IPEN/CNEN – SP;
- Coelho adulto, Biotério do CMN/FMUSP.

4.2 Preparo das soluções

4.2.1 Tampão fosfato 0,2M pH 6,2

Para preparo da solução (A), pesou-se 27,58 g de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e dissolveu-se em 1000 mL de água purificada. Para a solução (B), pesou-se 28,39 g de fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4) e dissolveu-se em 1000 mL de água purificada. Para preparo do tampão pH 6,2, misturou-se cerca de 80 mL de (A) e 18,5 mL de (B) e ajustou-se o pH utilizando-se solução de HCl 0,1N.

4.2.2 Tampão citrato 0,1M pH 5,0

Para preparo da solução (A), pesou-se 37,71 g de citrato de sódio e dissolveu-se em 1000 mL de água purificada. Para a solução (B), pesou-se 21

g de ácido cítrico em 1000 mL de água purificada. Para preparo do tampão pH 5,0, misturou-se cerca de 29,5 mL de (A) e 20,5 mL de (B) e ajustou-se o pH utilizando-se solução de HCl 0,1N ou solução de NaOH 0,1N.

4.2.3 Solução de NaOH 0,1N

Pesou-se 4g de NaOH e dissolveu-se em 1000 mL de água purificada.

4.2.4 Solução de acetato de amônia 0,1N

Pesou-se 7,7 g de acetato de amônia e dissolveu-se em 1000 mL de água purificada.

4.2.5 Solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1N

Pipetou-se 0,85 mL de HCl concentrado e diluiu-se para 100mL com água purificada.

4.2.6 Fracionamento do peptídeo HYNIC-Tyr³-octreotato (HYNIC-octreotato)

A dissolução de 3,5 mg do peptídeo HYNIC-Tyr³-octreotato foi realizada em 3,5 mL de solução etanol 10% e realizado o fracionamento em alíquotas de 20 µL, 40 µL e 200 µL, mantidas sob temperatura inferior a 0°C. As alíquotas foram utilizadas nas marcações iniciais e na elaboração do reagente liofilizado.

4.3 - Métodos

4.3.1 - Marcação do peptídeo HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc

A marcação inicial foi realizada utilizando-se parâmetros já descritos na literatura (Guggenberg et al.2004 e Ciávaro et al, 2005). Como coligantes foram escolhidos o EDDA e a tricina e como agente redutor o SnCl₂.2H₂O. Para realizar

a marcação, inicialmente foram preparadas as soluções dos coligantes e do agente redutor.

- Solução (A) – 30 mg EDDA dissolvidos em 1,5 mL de NaOH 0,1N;
- Solução (B) – 60 mg tricina dissolvidos em 1,5 mL tampão fosfato 0,2N pH 6,2;
- Solução (C) – 1 mL da Solução (A) mais 1 mL da Solução (B);
- Solução $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 10 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 10 mL HCl 0,1N previamente nitrogenado;

A marcação ocorreu em um frasco penicilina branco, onde foi adicionado:

- 1 mL da Solução (C);
- 20 μL do peptídeo HYNIC-octreotato;
- 1110MBq (30 mCi) de pertecnetato de sódio ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) em 1 mL, obtido da eluição do gerador de molibdênio-tecnécio;
- 15 μL da solução de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, imediatamente após o $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$.

O frasco foi fechado com rolha de borracha e utilizado um lacre de alumínio. A reação ocorreu em banho-maria (água em ebulição) por 10 minutos. O frasco foi retirado do banho e aguardou-se 20 minutos para completar a reação e realização do controle de qualidade.

Desta forma, a composição final do frasco antes da marcação com $^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ era de:

- 20 μg do peptídeo HYNIC-octreotato;
- 0,01 g de EDDA;
- 0,02 g de tricina;
- 15 μg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Após o procedimento de marcação com o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ e incubação (banho-maria e T° ambiente, completando 30 minutos), o pH final apresentava-se entre 6,5 e 7,0 (conferido por sistema de fitas indicadora universal de pH).

4.3.2 – Determinação da pureza radioquímica

As impurezas radioquímicas formadas decorrentes do processo de marcação do peptídeo foram determinadas pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com fitas sílica gel (ITLC-SG) usada como suporte em diferentes solventes e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) - coluna de C18 , 5 µm, 4,6 x 250 mm , Waters .

Como impurezas radioquímicas podemos considerar a presença do próprio pertecnetato ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), decorrente da sua não redução, o óxido de tecnécio (TcO_2 , espécie coloidal) e a formação de coligantes com o pertecnetato.

Na Cromatografia em Camada Delgada (CCD), a amostra do produto foi aplicada sobre a fita sílica gel (ITLC-SG) - fase estacionária - e arrastada por um solvente – fase móvel. Como fase móvel foi utilizado (Guggenberg et al.2004):

- Metiletilcetona (MEC) – que apresentou na origem ($R_f=0$) o peptídeo, o coligante e o colóide e no fronte o $^{99m}\text{TcO}_4^-$;
- Tampão citrato de sódio 0,1M pH 5,0 - que apresentou na origem ($R_f=0$) o peptídeo e o colóide e no fronte o coligante marcado e o $^{99m}\text{TcO}_4^-$
- Metanol:acetato de amônia 1:1 – que apresentou na origem ($R_f=0$) o colóide e no fronte o peptídeo, o coligante marcado e o $^{99m}\text{TcO}_4^-$.

Tabela 7. CCD em ITC-SG: R_f^* das espécies radioquímicas para as diferentes fases móveis utilizadas no controle radioquímico da marcação de HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc

Fase móvel	TcO_4^-	TcO_2	Coligante- ^{99m}Tc	Peptídeo- ^{99m}Tc
MEC	$R_f = 1$	$R_f = 0$	$R_f = 0$	$R_f = 0$
Tampão Citrato de Sódio 0,1M pH 5	$R_f = 1$	$R_f = 0$	$R_f = 1$	$R_f = 0$
Metanol:Acetato de amônia (1:1)	$R_f = 1$	$R_f = 0$	$R_f = 1$	$R_f = 1$

* Rf = relação entre a distância de migração da espécie radioquímica e a distância de migração do solvente

Na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) a solução reativa foi analisada em coluna de C18, 5 μ m, 4,6 x 250 mm (Waters), utilizando-se gradiente de mistura de ácido trifluoracético 0,1% e acetonitrila. Amostras de 20 μ L, aproximadamente 0,148 MBq (4 μ Ci) do peptídeo marcado foram analisadas sob um fluxo de 1 mL/ min, tempo de corrida de 20 minutos em mistura da solução A (ácido trifluoracético 0,1%) e solução B (acetonitrila), de acordo com gradiente ilustrado na Tabela 8.

Tabela 8. Condições do gradiente empregado na CLAE utilizada na avaliação da pureza radioquímica da marcação de HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc

Tempo (min)	% Solução A	% Solução B
0-1	100	0
3	100	0
10	34	66
15	34	66
17	0	100
19	100	0

4.3.3 – Estudo de variação do pH

Avaliou-se a pureza radioquímica do composto HYNIC-octreotato- ^{99m}Tc obtido com marcação em pH final de 6,0, 7,0 e 8,0 utilizando-se a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com fitas sílica gel (ITLC-SG). O estudo da variação do pH foi obtido variando-se o pH do tampão fosfato pH 6,2 utilizado na dissolução do coligante tricina.

4.3.4 – Estudo da influência do manitol na marcação do HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc

Avaliou-se, por meio das técnicas de CCD e CLAE, se o manitol a ser utilizado como excipiente na composição do reagente para liofilização poderia influenciar na eficiência de marcação da proteína.

Para tal avaliação, também foi estudada a biodistribuição da proteína marcada em coelhos, utilizando-se a técnica de imagem cintilográfica, 1 e 3 horas após injeção intra-venosa do peptídeo marcado com e sem manitol. As imagens foram adquiridas por 5 minutos em gama câmara (Sophy Medical Vision) utilizando matriz 128x128, pico de 149keV e janela de 15%.

4.3.5 - Elaboração do reagente liofilizado de HYNIC- octreotato

Entre as formulações encontradas na literatura para a realização do reagente liofilizado HYNIC-octreotato , foi escolhido o método de distribuição de todos os componentes da fórmula em um único frasco liofilizado, acompanhando a marcação um frasco com solução tampão fosfato pH 6,2.

Foram preparados reagentes liofilizados de HYNIC-octreotato para marcação com tecnécio-99m, sendo a composição por frasco de:

- 20 µg do peptídeo HYNIC- Try^3 - octreotato;
- 0,01 g de EDDA;
- 0,02 g de tricina;
- 15 µg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 50 mg de manitol

Foram realizados 3 lotes de reagentes liofilizados a fim de acompanhar a estabilidade do reagente e as melhores condições de marcação:

- **1º Lote:** 25 frascos com pré-congelamento em nitrogênio líquido, preparados da seguinte forma:

- Dissolução de 500 µg do peptídeo HYNIC-Try³-octreotato em 0,5 mL de Etanol 10%;
- Dissolução 0,01 g SnCl₂.2H₂O em 10 mL de HCl 0,1N, mantido sob nitrogenação até o momento da utilização;
- Dissolução de 300 mg de EDDA em 10 mL de H₂O purificada, sob aquecimento suave e agitação;
- Dissolução de 600 mg de tricina em 10 mL de H₂O purificada sob agitação;
- Pesagem de 1250 mg de manitol;
- Em um becker, sempre sob agitação magnética e nitrogenação, adicionou-se 8,3 mL da solução de EDDA, 8,3 mL da solução de tricina e os 1250 mg do manitol.
- Adicionou-se 500 µL da solução do peptídeo HYNIC-Try³-octreotato;
- Adicionou-se 375 µL da solução de SnCl₂.2H₂O;
- O pH da mistura foi acertado em 6,5 utilizando-se solução de HCl 0,1N;
- O volume final da preparação foi ajustado para 25 mL utilizando-se água purificada;
- A solução final foi aliqotada em frações de 1 mL em frascos tipo penicilina e imediatamente pré-congelados com nitrogênio líquido;
- Os frascos pré-congelados foram colocados na bandeja do liofilizador, também pré-congelada a -40,5°C e iniciou-se imediatamente o processo de liofilização;
- Ciclo de liofilização: Secagem primária ocorreu por 20 horas, com temperatura da prateleira variando de -40°C a 25°C e pressão aproximada de 8x10⁻² mbar. Na secagem secundária a temperatura de 25°C é mantida por mais 5 horas. No final do ciclo, ainda sob vácuo, os frascos foram fechados com rolhas de borracha e posteriormente lacrados.
- Os frascos foram estocados entre 4° e 5°C

➤ **2º lote:** 25 frascos sem pré-congelamento em nitrogênio líquido

As condições de preparo do reagente liofilizado foram exatamente iguais as do 1º lote. Somente não foi realizado o pré-congelamento com nitrogênio líquido, sendo os frascos colocados, logo após a pipetagem de 1mL, diretamente na

bandeja pré-congelada do liofilizador. Os frascos liofilizados também foram estocados entre 4° e 5°C.

➤ **3º lote:** 100 frascos com pré-congelamento em nitrogênio líquido

As condições de preparo do reagente liofilizado foram iguais as do 1º lote. Este lote foi utilizado para estudo de variação das condições de marcação com ^{99m}Tc .

4.3.6 – Estabilidade do reagente liofilizado HYNIC- octreotato

Acompanhou-se a estabilidade dos reagentes liofilizados do 1º e 2º lote. Foram realizados controle de pureza radioquímica das marcações com frequência imediata, quinzenal, mensal até o período de 5 meses após a produção. A estabilidade foi avaliada através de controles radioquímicos utilizando-se a técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em fita sílica gel (ITLC-SG).

4.3.7 – Estudo das variáveis de marcação do reagente liofilizado HYNIC- octreotato

Foi necessário a realização deste estudo para estabelecer as melhores condições de marcação do reagente HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc

As variáveis estudadas foram:

- Atividade do pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$): 740, 1110, 1480, 1850 e 2220 MBq (20, 30, 40, 50 e 60 mCi, respectivamente). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.
- Volume do pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$): 1 mL, 2 mL, 3 mL e 4 mL. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

- Condição de reação: temperatura ambiente, banho-maria (água fervendo) por 10, 15, 20 e 30 minutos. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

Ao estudar-se uma variável, as demais mantiveram-se fixas, da seguinte forma:

- Atividade do pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) de 1110 MBq (30 mCi)
- Volume do pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) de 1 mL
- Condição de reação - banho-maria por 15 minutos
- Volume do tampão fosfato 0,1M pH 6,2 em 1 mL

4.3.8 – Obtenção de modelo tumoral animal

Células de tumor pancreático de rato (AR42J), cultivadas no Laboratório de Cultura Celular do Centro de Biologia Molecular (CBM) do IPEN/CNEN em meio de cultura F12K (Cultilab), contendo 10 % de soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina, em estufa de CO_2 a 37°C e 5 % de umidade. Para inoculação em camundongos *Nude*, as células foram separadas do meio de cultura e injetadas intradermicamente no dorso do animal na concentração de $5-6 \times 10^5$ células em 100 μL de PBS (tampão fosfato pH 7,5/ NaCl 0,9 %).

Após 10-15 dias os animais apresentaram crescimento de massa supostamente tumoral na região de inoculação de 0,5 a 1,0 cm de diâmetro. Amostras desta massa foram enviadas ao Laboratório de Patologia do HC-FMUSP para análise histológica (cortesia da Dra Sheila Siqueira).

O modelo tumoral escolhido para este trabalho foi obtido de referências da literatura (Guggenberg et al.2004 e Ciávaro et al, 2005).

4.3.9 – Estudo da distribuição biológica do HYNIC-octreotato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ em animais de laboratório

Os camundongos (*Nude* e *Swiss*) utilizados nos estudos de distribuição biológica foram obtidos no Biotério do Centro de Biologia Molecular do IPEN/CNEN. O radiofármaco foi administrado (40 μ Ci/0,2mL) na veia caudal dos animais que foram sacrificados (utilizando-se anestésico volátil - éter) 1,5 e 4 horas após a administração. Os seguintes órgãos foram retirados: tireóide, pulmão, coração, baço, fígado, estômago, rins, intestino delgado, intestino grosso, supra-renais, pâncreas, rabo, fração muscular (amostra da pata traseira) e amostras de 100 μ L de sangue retirados da região orbital. Os órgãos foram lavados, pesados e colocados em tubos apropriados para ser submetido à contagem da radioatividade em contador gama tipo poço (Perkim Elmer). Nos camundongos *Nude* com tumor implantado, a massa tumoral também foi retirada e submetida à contagem.

Um padrão de dose administrada em cada estudo biológico foi preparado a partir da diluição da dose em um balão volumétrico de 10 mL e contagem em contador gama de 3 alíquotas de 1 mL do padrão. Foi utilizado o valor da contagem média obtida, multiplicado por 10 (fator de diluição). A porcentagem de dose presente em cada órgão ou tecido analisado foi calculada a partir de um padrão real. Para determinar esse padrão real foi utilizada a contagem por minuto (cpm) média do padrão de dose administrada subtraída da contagem (cpm) do rabo de cada animal seguindo a equação:

$$\text{Padrão Real} = \text{cpm padrão dose administrada} - \text{cpm do rabo (EQ.1)}$$

Com base no padrão real calculado para cada animal, a porcentagem de dose presente em cada órgão/tecido de interesse foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ dose/órgão} = (\text{cpm órgão} / \text{cpm padrão real}) \times 100 \text{ (EQ.2)}$$

$$\% \text{ dose/grama} = \% \text{ dose/órgão} / \text{massa do órgão ou tecido (EQ.3)}$$

Os cálculos da porcentagem da dose presente no sangue total do animal foram determinados de acordo com as seguintes equações:

% dose sangue/mL = cpm 100 µl de sangue x 10 /cpm padrão real
(EQ.4)

% dose sangue total = % dose sangue/mL x volemia do animal (EQ.5)

volemia = peso animal (g) x 0,07 (mL/g) (EQ.6)

O cálculo da porcentagem da dose administrada no músculo total do animal foi calculado:

% dose músculo/grama = cpm amostra músculo retirada / peso da amostra / cpm do padrão real (EQ. 7)

% dose músculo total = % dose músculo/grama x 40% peso do animal (EQ. 8)

Foi determinada a pureza radioquímica por CCD de todos os radiofármacos utilizados para controle da biodistribuição.

4.3.10 – Estudo cintilográfico do HYNIC-octreotato -^{99m}Tc

Os primeiros estudos cintilográficos foram realizados em 02 coelhos sadios fornecidos pelo Laboratório de Radiofarmácia do Centro de Medicina Nuclear – FMUSP, 20 minutos, 1 hora e 4 horas após administração de 37 MBq (1 mCi)/0,1 mL do radiofármaco em veia auricular. As imagens estáticas foram adquiridas durante 5 minutos com o animal em decúbito ventral utilizando matriz 128X128, energia de 149 keV e janela de 15 %. O colimador utilizado foi o de baixa energia e alta resolução. Os animais permaneceram em privação de movimento através da técnica de imobilização em maca animal apropriada.

Posteriormente foi realizado outro estudo cintilográfico em 02 camundongos *Nude* com tumor pancreático implantado. As imagens foram adquiridas 3 horas

após a injeção de 37 MBq (1mCi) em 0,1 mL do radiofármaco em veia caudal. As imagens foram adquiridas durante 5 minutos com os animais em decúbito dorsal para melhor visualização da região de implante tumoral. Os parâmetros de aquisição utilizados diferem dos acima em relação à matriz empregada (256x256) em virtude do tamanho do modelo animal. Os animais foram contidos sob anestésico volátil (éter). Posteriormente foram sacrificados e coletados seus órgãos e tecidos para controle biológico invasivo.

5 – Resultados

5.1 - Marcação do peptídeo HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc – estudo da influência do pH

As marcações iniciais foram realizadas utilizando-se as condições descritas na literatura (Guggenberg et al. 2004 e Ciávaro et al. 2005), conforme descrito previamente e com pH final de marcação de 6,5-7,0 (Tabela 9). Os resultados dos estudos de variação do pH final da marcação estão descritos na Tabela 9. A eficiência de marcação foi determinada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) em fita sílica gel (ITLC-SG).

Tabela 9. Pureza radioquímica da marcação do Octreotato-HYNIC com ^{99m}Tc utilizando-se CCD em ITLC-SG: influência do pH

pH	% Pureza Radioquímica		
	1 hora após marcação	3 horas após marcação	
6,0 – 6,5	87,5 ± 2,8	83,1 ± 5,5	n=4
6,5 – 7,0	94,9 ± 2,6	90,0 ± 4,5	n=9
7,5 – 8,0	63,5 ± 4,0	56,6 ± 5,4	n=4

As impurezas radioquímicas identificadas nas marcações acima foram o $^{99m}\text{TcO}_4^-$, TcO_2 e coligante marcado com tecnécio-99m nas porcentagens descritas nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Determinação das impurezas radioquímicas identificadas na marcação do HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc 1 hora após marcação utilizando CCD em ITLC-SG

pH	% Impurezas Radioquímicas		
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$^{99m}\text{TcO}_2$	coligante - ^{99m}Tc
6,0 – 6,5	4,4 ± 2,9	1,4 ± 0,8	5,4 ± 1,2
6,5 – 7,0	0,4 ± 0,3	0,5 ± 0,2	3,3 ± 1,3
7,5 – 8,0	25,7 ± 7,7	2,2 ± 1,1	8,6 ± 1,0

Tabela 11. Determinação das impurezas radioquímicas identificadas na marcação do HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc 3 horas após marcação utilizando CCD em ITLC-SG

pH	% Impurezas Radioquímicas		
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	TcO_2	coligante - ^{99m}Tc
6,0 – 6,5	$2,7 \pm 1,2$	$1,8 \pm 0,5$	$3,2 \pm 1,2$
6,5 – 7,0	$1,4 \pm 0,9$	$6,2 \pm 0,8$	$5,8 \pm 1,9$
7,5 – 8,0	$15,4 \pm 5,2$	$7,5 \pm 2,6$	$18,8 \pm 3,0$

5.2 - Marcação do peptídeo HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc – estudo da influência do manitol

Estabelecendo o pH final da reação entre 6,5 e 7,0 foram realizados estudos para verificar se a inclusão do manitol na composição do radiofármaco alteraria os resultados da pureza radioquímica (Tabela 12).

Tabela 12. Pureza radioquímica da marcação do HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc utilizando-se CCD em ITLC-SG 1 e 3 horas após a marcação: influência do manitol

Octreotato- HYNIC- ^{99m}Tc	% Pureza Radioquímica	
	1 hora	3 horas
Sem manitol	$91,34 \pm 3,58$	$89,19 \pm 4,51$
Com	$94,36 \pm 2,83$	$93,27 \pm 4,21$

n=4

A pureza radioquímica dos compostos com ou sem a adição de manitol também foi avaliada por meio da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Figuras 14, 15, 16 e 17 e Tabelas 13, 14, 15 e 16, respectivamente).

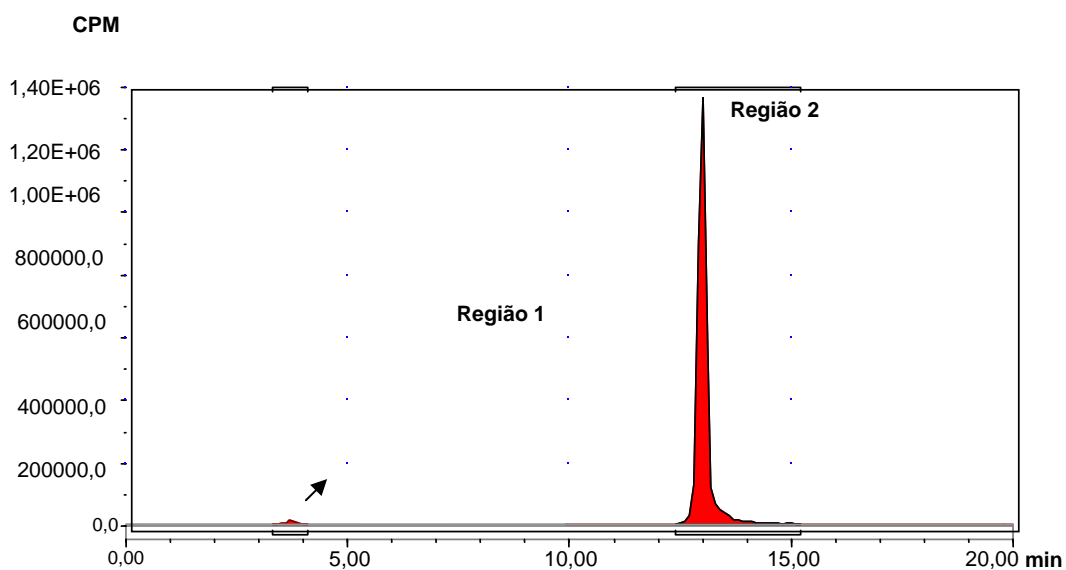


Figura 14. Perfil de CLAE para o composto HYNIC-octreotato-^{99m}Tc sem adição de manitol 1 hora após marcação

Tabela 13. Demonstração dos tempos de retenção obtidos no perfil CLAE (Figura 14) para o composto HYNIC-octreotato-^{99m}Tc sem adição de manitol 1 hora após marcação

	Início (min)	Fim (min)	Retenção (min)	Altura (cpm)	Área (cpm)	%ROI
Região 1	3,30	4,10	3,70	16685,7	41400,0	1,19
Região 2	12,40	15,20	13,00	1367571,4	3424600,0	98,81

Encontramos dois picos de retenção, região 1 (3,70 minutos) e região 2 (13 minutos) (Tabela 13). De acordo com a literatura (Storch et al.2005 e Gandomkar et al.2007) o pico da região 1 corresponde à presença de tecnécio-99m livre ou complexos de coligante marcado com tecnécio-99m. O pico da região 2 corresponde ao peptídeo radiomarcado.

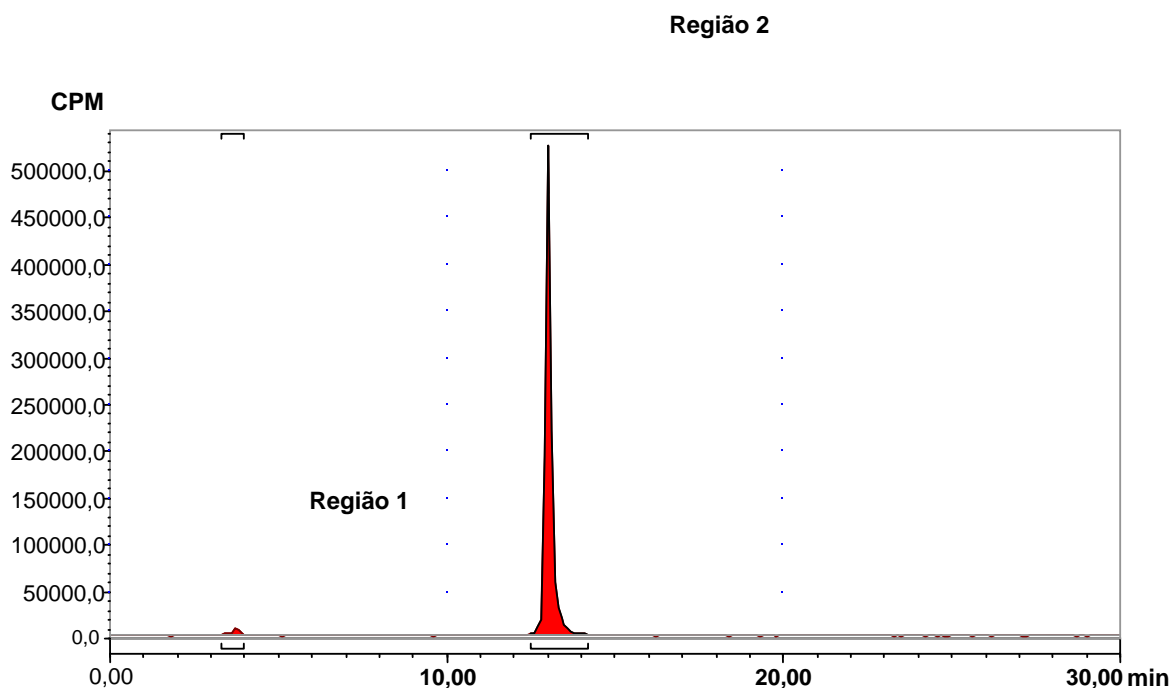


Figura 15. Perfil de CLAE para o composto HYNIC-octreotato-^{99m}Tc com adição de manitol 1 hora após marcação

Tabela 14. Demonstração dos tempos de retenção obtidos no perfil CLAE (Figura 15) para o composto HYNIC-octreotato-^{99m}Tc com adição de manitol 1 hora após marcação

	Início (min)	Fim (min)	Retenção (min)	Altura (cpm)	Área (cpm)	%ROI
Região 1	3,30	4,00	3,70	11057,1	24904,3	2,21
Região 2	12,50	14,20	13,00	527742,9	1099718,6	97,79

A figura 15 mostra o perfil do peptídeo marcado com tecnécio-99m com a presença do manitol em sua formulação, uma hora após a marcação. Observa-se que as regiões 1 e 2 apresentam os mesmos tempos de retenção (Tabela 14) em relação ao composto marcado sem a presença do manitol (Tabela 13).

A figura 16 mostra o perfil do peptídeo marcado com tecnécio-99m sem a presença do manitol em sua formulação, três horas após a marcação. Observa-se uma região inicial com pico de retenção em 2,70 minutos e outro em 12 minutos,

que devem corresponder ao coligante e a proteína marcados, respectivamente (Tabela 15).

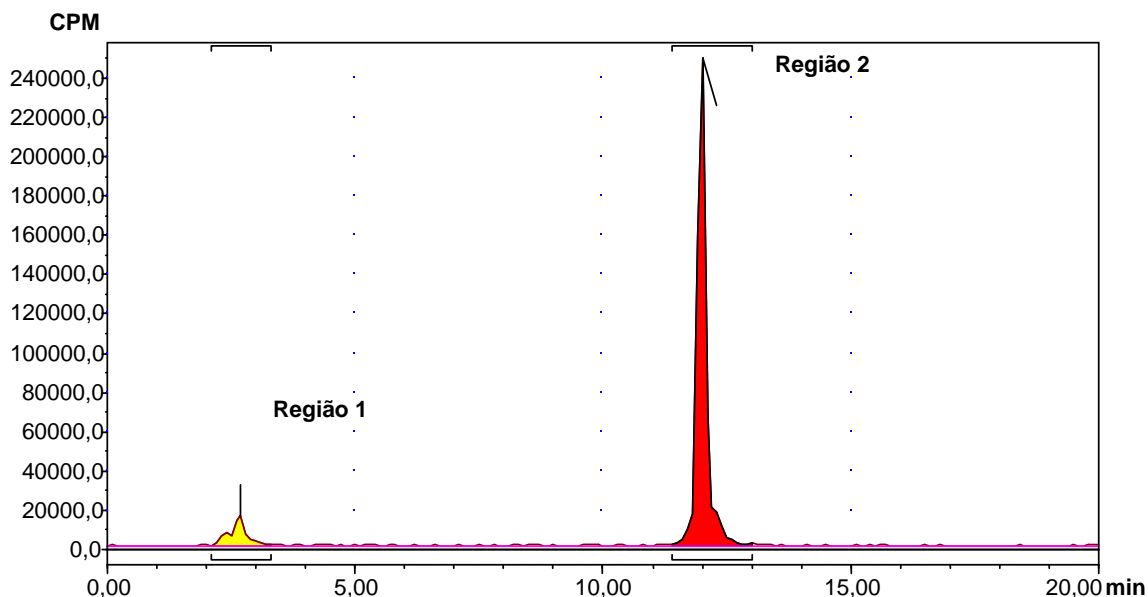


Figura 16. Perfil de CLAE para o composto HYNIC-octreotato-^{99m}Tc sem adição de manitol 3 horas após marcação

Tabela 15. Demonstração dos tempos de retenção obtidos no perfil CLAE (Figura 16) para o composto HYNIC-octreotato-^{99m}Tc sem adição de manitol 3 horas após marcação

	Início (min)	Fim (min)	Retenção (min)	Altura (cpm)	Área (cpm)	%ROI
Região 1	2,10	3,30	2,70	17285,7	60657,1	9,79
Região 2	11,40	13,00	12,00	250657,1	558971,4	90,21

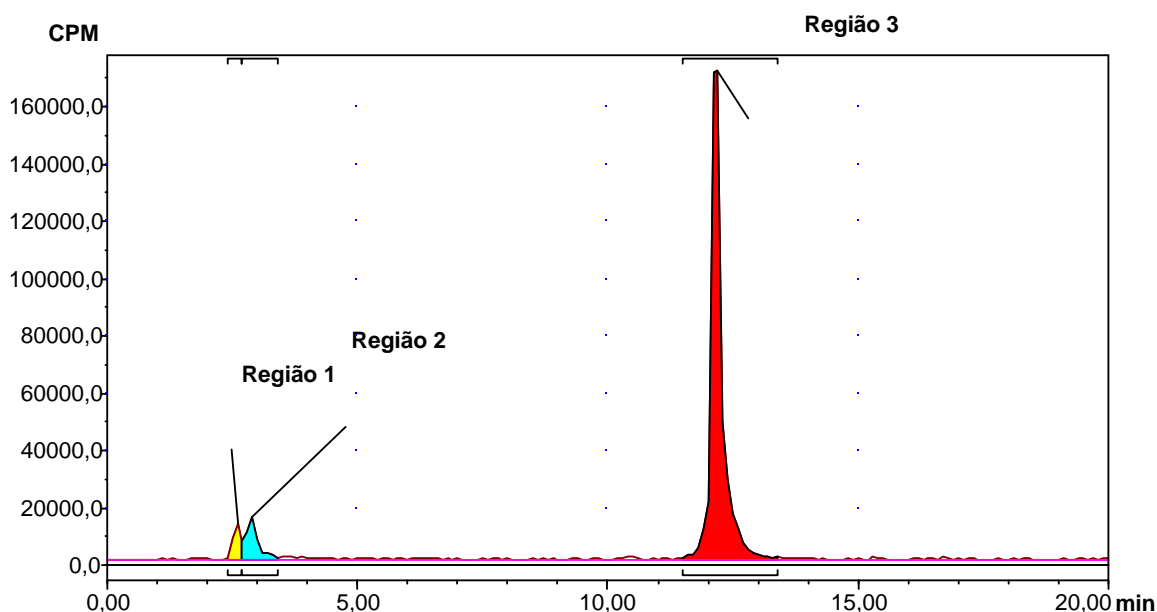


Figura 17. Perfil de CLAE para o composto HYNIC-octreotato-^{99m}Tc com adição de manitol 3 horas após marcação

Tabela 16. Demonstração dos tempos de retenção obtidos no perfil CLAE (Figura 17) para o composto HYNIC-octreotato-^{99m}Tc com adição de manitol 3 horas após marcação

	Início (min)	Fim (min)	Retenção (min)	Altura (cpm)	Área (cpm)	%ROI
Região 1	2,40	2,70	2,60	14085,7	20153,6	3,60
Região 2	2,70	3,40	2,90	16514,3	42939,3	7,67
Região 3	11,50	13,40	12,20	172857,1	496896,4	88,73

A figura 17 mostra o perfil do peptídeo marcado com tecnécio-99m com a presença do manitol em sua formulação, três horas após a marcação. Foram encontrados três picos de retenção, região 1 (2,60 minutos), região 2 (2,90 minutos) e região 3 (12,20 minutos) que devem provavelmente corresponder a coligante marcado, tecnécio livre e proteína marcada, respectivamente.

O tempo de retenção do pertecnetato livre no mesmo sistema CLAE foi determinado, conforme demonstrado na Figura 18, sendo de 3,3 minutos (Tabela 17).

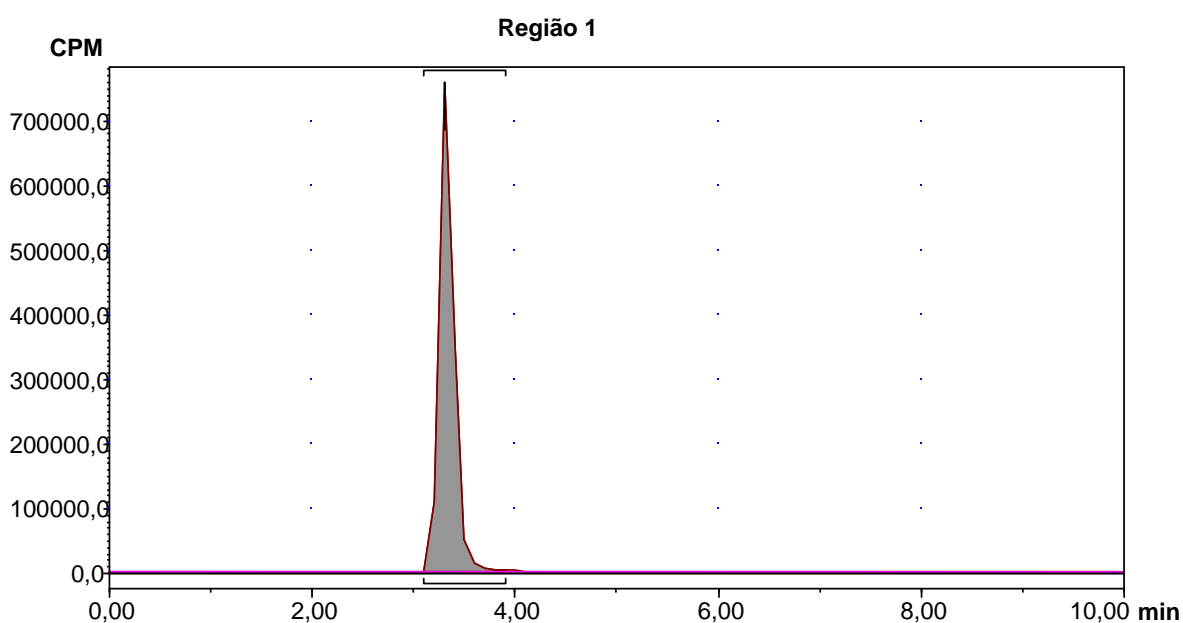


Figura 18. Perfil de CLAE para o pertecnetato de sódio

Tabela 17. Demonstração dos tempos de retenção obtidos no perfil CLAE (Figura 18) para o pertecnetato de sódio

	Início (min)	Fim (min)	Retenção (min)	Altura (cpm)	Área (cpm)	%ROI
Região 1	3,10	3,90	3,30	760914,3	1280228,6	100,00

Como complemento à avaliação da interferência do manitol no composto HYNIC-octreotato para marcação com tecnécio-99m, foram realizadas imagens em coelhos dos complexos obtidos com e sem manitol (Figuras 19 e 20).

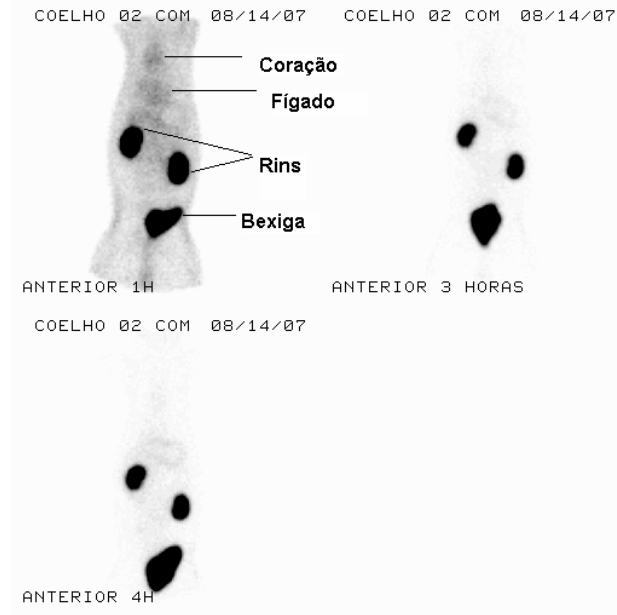


Figura 19. Imagem cintilográfica de coelhos em posição decúbito-ventral 1, 3 e 4 horas após injeção intravenosa do HYNIC-octreotato-^{99m}Tc com manitol em sua composição final.

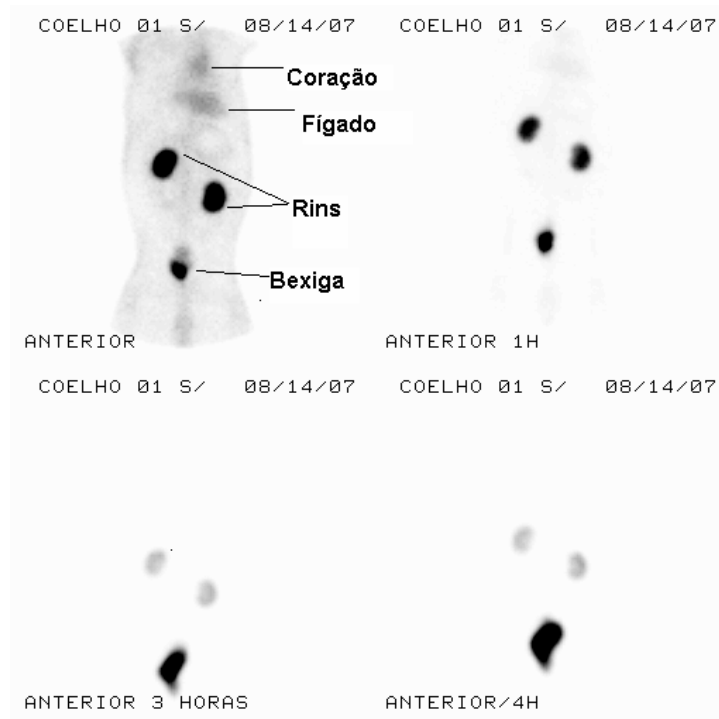


Figura 20. Imagem cintilográfica de coelhos em posição decúbito-ventral 30 minutos, 1 hora, 3 horas e 4 horas após injeção intravenosa do HYNIC-octreotato-^{99m}Tc sem manitol em sua composição final.

5.3 Avaliação da estabilidade do reagente liofilizado HYNIC-octreotato

Após verificar que a presença do excipiente manitol na formulação não alterava o rendimento radioquímico e nem o perfil CLAE, procedeu-se a elaboração do reagente liofilizado HYNIC-octreotato. Foi avaliada a estabilidade dos reagentes com e sem pré-congelamento em nitrogênio líquido.

5.3.1- Estabilidade do reagente liofilizado HYNIC-octreotato (1º lote) com pré-congelamento em nitrogênio líquido

A avaliação da estabilidade do primeiro lote de 25 frascos liofilizados com pré-congelamento em nitrogênio líquido foi realizada durante 6 meses utilizando-se da cromatografia em camada delgada (ITLC-SG) para determinação da pureza radioquímica do peptídeo radiomarcado (Tabela 22).

Tabela 18. Avaliação da estabilidade do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato com pré-congelamento em nitrogênio líquido armazenado em temperatura 4-5°C. Avaliação da pureza radioquímica utilizando CCD (ITLC-SG)

Período avaliado (dias)	% HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc 1 hora após marcação	% HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc 3 horas após marcação
10	91,55 ± 0,77	91,37 ± 0,48
20	94,56 ± 2,35	90,04 ± 0,34
30	90,04 ± 0,34	91,46 ± 2,56
60	91,41 ± 2,14	92,01 ± 1,48
90	90,82 ± 0,76	88,10 ± 2,55
120	90,01 ± 0,13	90,87 ± 0,18
150	86,98 ± 1,79	86,39 ± 1,30

n=3 para cada período avaliado

A estabilidade do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato após 150 dias (5 meses) de sua elaboração também foi avaliada utilizando-se o método de CLAE (Figura 21).

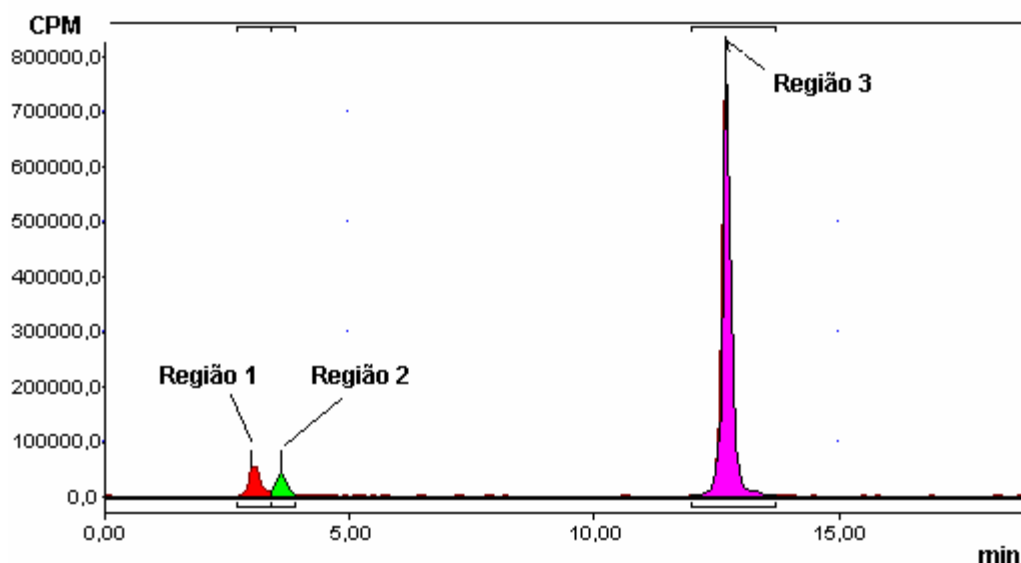


Figura 21. Perfil de CLAE da marcação de reagente liofilizado de HYNIC-octreotato após período de armazenamento de 5 meses da preparação liofilizada

Foram encontrados três picos de retenção, região 1 (3 minutos), região 2 (3,60 minutos) e região 3 (12,70 minutos) que devem corresponder, respectivamente, a coligante marcado, tecnécio livre e proteína marcada (Tabela 19).

Tabela 19 – Demonstração dos tempos de retenção obtidos no perfil de CLAE (Figura 21) para o composto HYNIC-octreotato-^{99m}Tc

	Início	Fim	Retenção	altura	área	%ROI
Região 1	2,70	3,40	3,00	56400,0	155857,1	7,79
Região 2	3,40	3,90	3,60	47085,7	113542,9	5,68
Região 3	12,00	13,70	12,70	838057,1	1731342,9	86,54

5.3.2 Estabilidade do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato (2º lote) sem pré-congelamento em nitrogênio líquido

A avaliação da estabilidade do segundo lote de 25 frascos liofilizados sem pré-congelamento em nitrogênio líquido foi realizada durante 120 dias (4 meses) utilizando-se da cromatografia em camada delgada (ITLC-SG) para determinação da pureza radioquímica do peptídeo radiomarcado (Tabela 20). No entanto, por um problema relacionado ao liofilizador (no momento em que os frascos são lacrados), não foram obtidos um número adequado de frascos do reagente liofilizado que apresentassem condições de vácuo ideal (condição para preservação da massa de estanho). Com isso, o número de ensaios realizados nesta etapa foi prejudicado.

Tabela 20. Determinação da estabilidade do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato sem pré-congelamento em nitrogênio líquido armazenado em temperatura 4-5°C. Avaliação da pureza radioquímica utilizando CCD (ITLC-SG)

Período avaliado	% HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc	
	1 hora	3 horas
5 dias	92,18 ± 0,66 n=3	87,77 ± 3,47 n=3
10 dias	91,88 ± 2,28 n=3	89,98
30 dias	93,53	93,28
60 dias	92,93	92,01
90 dias	89,00	89,21
120 dias	90,62	87,74

5.4 Estudo das variáveis de marcação do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato

As variáveis de marcação do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato com ^{99m}Tc avaliadas foram: atividade do pertecnetato de sódio, volume do pertecnetato

de sódio e condições de reação. No momento em que era realizada a avaliação de um parâmetro, os demais se mantinham fixos:

- Volume do $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ igual a 1 mL
- Atividade do $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ igual a 740MBq (20mCi)
- 1 mL de tampão fosfato pH 6,2
- Reação em banho-maria por 15 minutos (água em ebulição)

5.4.1 Avaliação da atividade do pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$)

A influência da variação da atividade de tecnécio-99m na pureza radioquímica da marcação pode ser observada na Tabela 21.

Tabela 21. Estudo da variação da atividade do pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) na marcação do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato

Atividade do $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$	% HYNIC-octreotato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	% HYNIC-octreotato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$
	1 hora	3 horas
740 MBq (20 mCi)	92,90 ± 0,89	91,43 ± 0,09
1110 MBq (30 mCi)	91,19 ± 1,12	90,07 ± 0,55
1200 MBq (40 mCi)	93,42 ± 0,93	92,37 ± 0,38
1500 MBq (50 mCi)	82,16 ± 9,56	82,76 ± 9,39
1800 MBq (60 mCi)	72,74 ± 8,42	71,59 ± 9,56

n = 4 para cada atividade

5.4.2 – Avaliação do volume do pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$)

A influência da variação do volume da solução de tecnécio-99m na pureza radioquímica da marcação pode ser observada na Tabela 22.

Tabela 22. Estudo da variação do volume do pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) na marcação do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato

Volume do $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$	% HYNIC-octreotato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$	% HYNIC-octreotato- $^{99\text{m}}\text{Tc}$
	1 hora	3 horas
1mL	88,41 ± 4,41	88,44 ± 3,44
2mL	92,25 ± 2,09	90,80 ± 1,18
3mL	85,48 ± 4,37	85,64 ± 4,03
4mL	89,58 ± 0,60	87,86 ± 3,90

n = 4 para cada volume

Os valores encontrados no estudo de variação do volume do pertecnetato (tabela 22), mais especificamente as porcentagens com o volume fixado em 1 mL, diferem do valor encontrado na tabela 21, quando também foi utilizado 1mL de pertecnetato porque os ensaios de variação do volume foram realizados quando o lote de reagente liofilizado já não apresentava rendimento de pureza radioquímica superior a 90%, isto devido a estabilidade do produto já estar comprometida pelo tempo.

5.4.3 – Avaliação do tempo de reação

A influência da variação do tempo e temperatura de incubação (condições de incubação) na pureza radioquímica da marcação pode ser observada na Tabela 23. Foi importante determinar se a reação poderia ocorrer em temperatura ambiente, visto que muitos serviços de medicina nuclear não dispõem de sistemas de aquecimento em banho-maria.

Tabela 23. Estudo da variação das condições de incubação na marcação do reagente liofilizado de HYNIC-octreotato

Condição de incubação	% HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc	% HYNIC-octreotato- ^{99m} Tc
	1 hora	3 horas
Temperatura ambiente	38,76 ± 1,37	48,79 ± 1,6
10 min banho-maria	86,53 ± 2,86	81,65 ± 5,72
15 min banho-maria	93,42 ± 0,93	92,37 ± 0,38
20 min banho-maria	90,86 ± 2,08	85,58 ± 1,82
30 min banho-maria	87,73 ± 2,88	47,24 ± 4,63

n =4 para cada condição

5.5 Modelo tumoral de células AR-42J em camundongos *Nude*

Após intervalo de tempo de 10 a 15 dias da inoculação das células de adenocarcinoma pancreático de ratos (AR42J) na região dorsal dos camundongos *Nude* observou-se crescimento de massa palpável na região de inoculação em 80% dos camundongos inoculados (Figuras 22 e 23).



(A)



(B)

Figura 22. (A) Linhagem utilizada de camundongos *Nude* mantidos em biotério provido de barreiras isoladoras (controle de contaminação de agentes patógenos e condições adequadas para o desenvolvimento do

modelo tumoral); (B) Inoculação de células tumorais AR42J em dorso do camundongo *Nude*.



Figura 23. Camundongo *Nude* com tumor em região dorsal de aproximadamente 1 centímetro após 20 dias com retirada da massa tumoral para análise histológica

A avaliação histológica da massa palpável foi realizada, confirmando a presença de células neoplásicas indiferenciadas, conforme indicado nas Figuras 24 e 25.

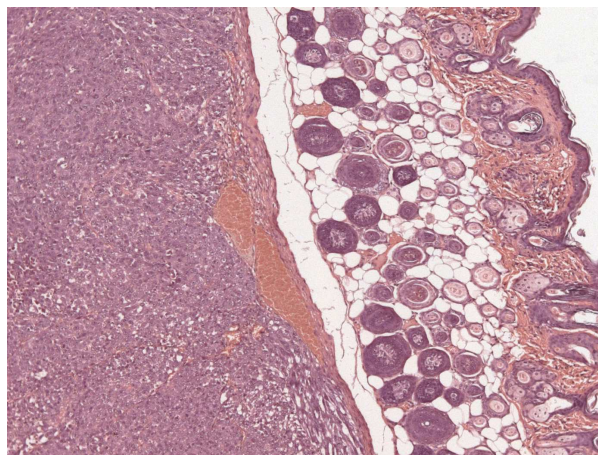


Figura 24. Neoplasia indiferenciada, com alta celularidade, composta por células epitelióides e fusiformes, sem arranjo característico e com estroma escasso, formando blocos sólidos e ocupando o tecido celular subcutâneo (lâmina 100x)

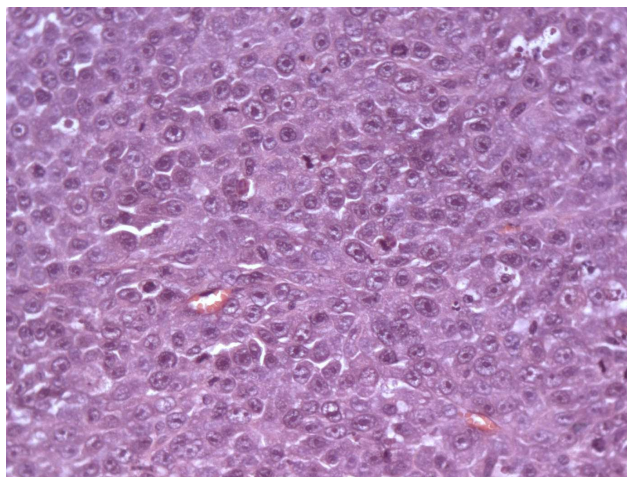


Figura 25. Neoplasia indiferenciada composta por células predominantemente epitelióides, coesas, com núcleos grandes, pleomórficos, com nucléolos evidentes e citoplasma amplo, eosinofílico (lâmina 400x)

5.6 - Estudo da distribuição biológica do HYNIC-octreotato-^{99m}Tc em animais de laboratório

Os resultados dos estudos invasivos de biodistribuição em camundongos *Nude* e *Swiss* estão representados nas Tabelas 24 e 25 e Tabelas 26 e 27, respectivamente. Os valores foram expressos e, porcentagem dose/órgão ou tecido e porcentagem dose/grama do órgão ou tecido, em relação ao tempo de injeção (uma hora e meia e 4 horas após a injeção intravenosa)

Tabela 24. Porcentagem da atividade administrada/órgão-tecido do peptídeo radiomarcado HYNIC-octreotato-^{99m}Tc em camundongos *Nude* com adenocarcinoma pancreático

Órgão/Tecido	% dose/órgão ou tecido	
	1 hora 30 minutos	4 horas
TIREÓIDE	0,14 ± 0,12	0,02 ± 0,02
PULMÃO	0,10 ± 0,06	0,09 ± 0,03
CORAÇÃO	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,001
BAÇO	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01
FÍGADO	0,24 ± 0,03	0,28 ± 0,17
ESTÔMAGO	0,22 ± 0,04	0,15 ± 0,16
VAZIO		
MÚSCULO TOTAL	3,01 ± 0,05	1,91 ± 0,04
RINS	4,79 ± 1,45	1,55 ± 1,20
INTES. DELGADO	1,06 ± 0,16	0,57 ± 0,07
INTES. GROSSO	0,75 ± 0,47	1,08 ± 0,06
PÂNCREAS	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01
SUPRA-RENAIS	0,48 ± 0,21	0,16 ± 0,02
SANGUE TOTAL	0,42 ± 0,05	0,28 ± 0,05
TUMOR	0,24 ± 0,10	0,40 ± 0,05

n=8

Tabela 25. Porcentagem da atividade administrada/grama de órgão-tecido do peptídeo radiomarcado HYNIC-octreotato-^{99m}Tc em camundongos *Nude* com adenocarcinoma pancreático

Órgão/Tecido	% dose/grama de órgão ou tecido	
	1 hora 30 minutos	4 horas
PULMÃO	1,02 ± 0,11	0,67 ± 0,20
CORAÇÃO	0,25 ± 0,07	0,12 ± 0,01
BAÇO	0,50 ± 0,17	0,21 ± 0,18
FÍGADO	0,30 ± 0,05	0,28 ± 0,11
ESTÔMAGO VAZIO	2,21 ± 0,42	1,30 ± 0,23
MÚSCULO	0,18 ± 0,13	0,05 ± 0,03
RINS	21,12 ± 10,43	3,98 ± 0,64
INTES. DELGADO	1,11 ± 0,41	0,59 ± 0,11
INTES. GROSSO	1,90 ± 0,40	2,00 ± 0,28
PÂNCREAS	0,06 ± 0,06	0,02 ± 0,01
SANGUE/mL	0,27 ± 0,06	0,14 ± 0,07
TUMOR	0,35 ± 0,04	0,27 ± 0,06

n=8

A eficiência do ensaio foi assegurada realizando-se o controle radioquímico do HYNIC-octreotato-^{99m}Tc empregado nos estudos biológicos, utilizando-se CCD em ITLC-SG, apresentando pureza radioquímica superiores a 90 %. A impureza radioquímica que se apresentou em maior porcentagem foi o coligante marcado com tecnécio-99m, com média encontrada de 5 %.

Tabela 26. Porcentagem da atividade administrada/órgão ou tecido do peptídeo radiomarcado HYNIC-octreotato-^{99m}Tc em camundongos Swiss normais

Órgão/Tecido	% dose/órgão ou tecido	
	1 hora 30 minutos	4 horas
TIREÓIDE	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,001
PULMÃO	0,75 ± 0,23	0,39 ± 0,22
CORAÇÃO	0,05 ± 0,01	0,01 ± 0,01
BAÇO	0,05 ± 0,02	0,01 ± 0,01
FÍGADO	0,69 ± 0,32	0,27 ± 0,10
ESTÔMAGO	1,60 ± 0,40	0,67 ± 0,26
MÚSCULO TOTAL	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,01
RINS	25,11 ± 5,41	10,64 ± 7,53
INTES. DELGADO	3,08 ± 0,50	1,70 ± 0,52
INTES. GROSSO	0,88 ± 0,12	1,52 ± 0,56
PÂNCREAS	1,13 ± 0,25	0,33 ± 0,17
SUPRA RENAIIS	0,04 ± 0,03	0,01 ± 0,01
SANGUE TOTAL	0,74 ± 0,48	0,24 ± 0,03

n=8

Tabela 27. Porcentagem da atividade administrada/grama de órgão ou tecido do peptídeo radiomarcado HYNIC-octreotato-^{99m}Tc em camundongos *Swiss* normais

Órgão/Tecido	% dose/grama de órgão ou tecido	
	1 hora 30 minutos	4 horas
PULMÃO	2,70 ± 0,62	1,49 ± 0,38
CORAÇÃO	0,37 ± 0,16	0,11 ± 0,07
BAÇO	0,52 ± 0,21	0,15 ± 0,12
FÍGADO	0,44 ± 0,21	0,22 ± 0,13
ESTÔMAGO	5,61 ± 1,67	2,47 ± 1,07
MÚSCULO	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,001
RINS	64,07 ± 20,59	22,93 ± 10,40
INTES. DELGADO	1,82 ± 0,57	1,10 ± 0,34
INTES. GROSSO	0,85 ± 0,18	1,62 ± 0,65
PÂNCREAS	2,58 ± 0,75	0,76 ± 0,28
SANGUE/mL	0,39 ± 0,17	0,08 ± 0,01

n=8

A eficiência do ensaio foi assegurada realizando-se o controle radioquímico do HYNIC-octreotato-^{99m}Tc empregado nos estudos biológicos, utilizando-se CCD em ITLC-SG, apresentando pureza radioquímica superiores a 92 %. Também neste caso, a impureza radioquímica que se apresentou em maior porcentagem foi o coligante marcado com tecnécio-99m, com média encontrada de 5 %.

5.7 – Cintilografia utilizando o reagente liofilizado de HYNIC-octreotato para pronta marcação com tecnécio-99m em camundongos *Nude* com tumor de células AR42J (Tumor pancreático de ratos)

Utilizou-se o reagente liofilizado de HYNIC-octreotato do 3^o lote para a realização das imagens cintilográficas em camundongos *Nude* com tumor

pancreático. A pureza radioquímica da proteína marcada foi de 91,36%, sendo que encontramos a presença de 7,59% de coligante marcado com tecnécio-99m.

As imagens cintilográficas foram realizadas 3 horas após a injeção em veia caudal do camundongo (Figura 26).

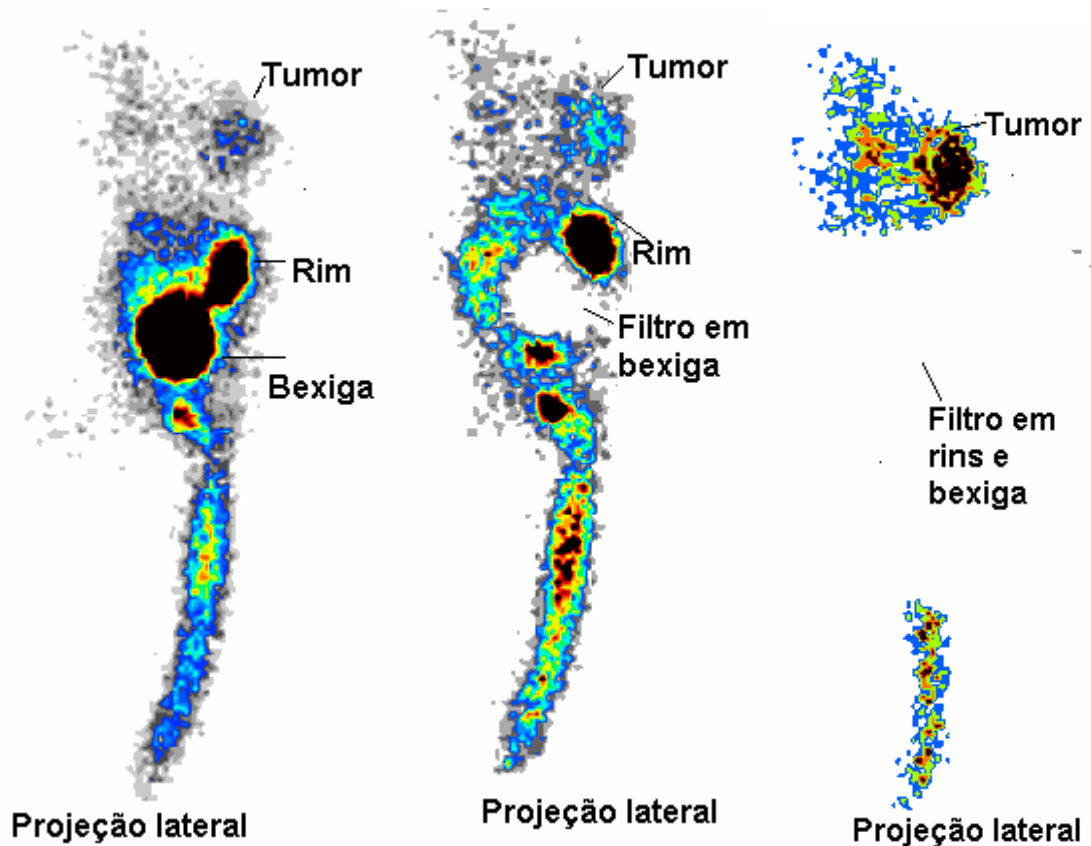


Figura 26 - Imagens cintilográficas de camundongo *Nude* com massa tumoral implantada em dorso. Imagens realizadas 3 horas após a injeção do HYNIC-octreotato-^{99m}Tc

As imagens da Figura 26 mostram uma captação intensa em rins e bexiga e, em grau menor, mais de importância relevante, captação em região da massa tumoral. Foi utilizado o recurso de filtros de chumbo para melhor visualização da captação do radiofármaco em região tumoral.

6- Discussão

As primeiras marcações do HYNIC-Tyr³-octreotato (HYNIC-octreotato) utilizando o EDDA e a tricina como coligantes foram realizadas, de acordo com a formulação indicada em literatura para o HYNIC-Tyr³-octreotideo (Guggenberg et al.2004 e Ciavarró et al.2005;).

Sabendo-se que o pH final influencia diretamente no rendimento radioquímico da marcação, foram analisadas diferentes faixas de pH entre 6 e 8. A variação do pH foi realizada no tampão fosfato 0,2N utilizado na dissolução do coligante tricina. Os melhores resultados foram estabelecidos na faixa de pH entre 6,5 e 7,0. Nesta condição a pureza radioquímica encontrada foi de 91,34 ± 3,58 % do complexo HYNIC-Tyr³-octreotato-^{99m}Tc uma hora após a marcação e 89,19 ± 4,51 % três horas após a marcação. A literatura determina que a pureza radioquímica seja superior a 90 %, de forma a possibilitar uma aplicação clínica do radiofármaco. Desta forma, obteve-se um produto dentro das especificações (Hubalewska-Dydejczyk et al. 2006).

Verificou-se que a adição do manitol (utilizado posteriormente como excipiente da formulação liofilizada) não interferiu no rendimento da marcação. A partir da estrutura química do manitol, com grupamentos hidrofílicos polares, poder-se-ia supor que atuasse como um coligante, em competição com os coligantes introduzidos (EDDA e tricina) na formação do complexo EDDA-tricina-Tyr³-HYNIC-octreotato-^{99m}Tc. A análise de CLAE do complexo formado na presença e ausência de manitol (Figuras 14 e 15, respectivamente) mostram perfis praticamente idênticos, com tempo de retenção do complexo peptídeo radiomarcado de aproximadamente 13 minutos (Tabelas 13 e 14). Se houve participação do manitol na formação do complexo, esta não ficou evidenciada pelo perfil do CLAE. Além disso, o perfil da CLAE também mostra um pico inicial de 3,70 minutos que pode ser atribuído, inicialmente, à presença do coligante marcado ou tecnécio livre.

As duas impurezas radioquímicas, coligante marcado e tecnécio livre, foram identificadas nas análises por cromatografia em camada delgada em ITLC-SG. Neste caso, a porcentagem de coligante marcado sempre foi ligeiramente maior que a porcentagem de tecnécio livre. Ao se analisar os perfis de CLAE das

misturas de marcação com e sem manitol, 3 horas após a marcação, duas espécies radioquímicas foram identificadas, com RT muito próximos e picos parcialmente sobrepostos, representando impurezas radioquímicas das marcações, correspondendo, provavelmente, ao tecnécio livre e coligante marcado.

A literatura também relata duas espécies radioquímicas com tempo de retenção curtos e próximos, utilizando sistemas de CLAE semelhantes ao empregado neste trabalho, qual seja, cromatografia de fase reversa, com coluna do tipo C18 e mistura gradiente utilizando acetonitrila e tampão ou solução aquosa ácida com porcentagem crescente de acetonitrila em função do tempo, embora os análogos da somatostatina marcados com tecnécio sejam diferentes.

Guggenberg e colaboradores (2004) marcaram o análogo HYNIC-Tyr³-octreotídeo com tecnécio-99m, utilizando EDDA e tricina como coligantes, e obtiveram em análise CLAE um pico de retenção aos 10,7 minutos que correspondeu ao peptídeo radiomarcado e outras duas espécies com tempos de retenção de 2,4 e 3,2 minutos, que foram relacionados ao coligante marcado e ao tecnécio livre (^{99m}TcO₄⁻), respectivamente.

Gandomkar e colaboradores (2007) marcaram o análogo HYNIC-Tyr⁸-octreotídeo, também utilizando o EDDA e a tricina como coligantes, e obtiveram duas espécies radioquímicas com tempos de retenção aos 4,43 e 5,90 minutos que atribuíram, respectivamente, ao coligante marcado e tecnécio livre e uma espécie principal com tempo de retenção de 12,86 minutos atribuída ao peptídeo radiomarcado.

No presente estudo, o perfil de CLAE para o pertecnetato de sódio determinou um tempo de retenção em 3,3 minutos (Figura 18 e Tabela 17).

Comparando-se os perfis de CLAE deste estudo obtidos 1 e 3 horas após a marcação, observa-se pequena diferença no RT do pico correspondente ao peptídeo marcado bem como das impurezas. Tal diferença pode ser atribuída ao processo manual de injeção da amostra no equipamento utilizado e não será valorizada nesta discussão. Mais importante, é verificar que após 3 horas de marcação, os picos correspondentes às impurezas (tecnécio livre e coligante marcado) ficam mais evidentes, possibilitando concluir pela presença das duas

espécies.

Desta forma, o perfil CLAE para o composto marcado sem manitol 3 horas após a marcação com ^{99m}Tc (Figura 16 e Tabela 15) identificou uma região com tempo de retenção em 2,7 minutos (porém com um pico alargado sugerindo a presença de duas espécies radioquímicas) e outra correspondente ao peptídeo radiomarcado em 12 minutos.

O perfil CLAE para o composto marcado com adição de manitol apresentou, 3 horas após sua marcação, 2 picos de impureza com tempos de retenção em 2,60 e 2,90 minutos e um com tempo de 12,2 minutos que foi atribuído ao peptídeo radiomarcado (Figura 17 e Tabela 16).

Comparando os tempos de retenção encontrados nos perfis CLAE com a presença de manitol, principalmente no de 3 horas após a marcação, com os dados encontrados na literatura (Guggenberg et al.2004), podemos atribuir os tempos de retenção (RT) de 2,60 minutos e 2,90 minutos ao coligante marcado e tecnécio livre, respectivamente e o pico com tempo de retenção de 12,20 minutos ao peptídeo radiomarcado. As diferenças de RTs podem ser atribuídas ao fato da comparação envolver dois análogos diferentes de somatostatina, embora marcados com os mesmos coligantes, bem como à pequenas diferenças no sistema CLAE utilizados.

Verificamos também, nas imagens cintilográficas em coelhos sadios (Figura 19 e 20), que a presença de manitol no composto aparentemente não altera sua biodistribuição. Ambas as cintilografias revelaram o rápido clareamento sanguíneo do composto, captação renal significativa, acúmulo do composto na bexiga devido à eliminação renal e ausência de captação em demais órgãos da região abdominal.

O modelo tumoral escolhido para este estudo foi o camundongo *Nude* inoculado com células AR42J (célula de tumor pancreático). Observou-se um grande aproveitamento dos camundongos inoculados (80% obtiveram crescimento de massa na região de implantação das células). A análise histológica dessa massa indicou a presença de tecido neoplásico com alta celularidade, o que garantiu a integridade do modelo utilizado nos estudos de biodistribuição.

Nos estudos de biodistribuição em camundongos normais *Swiss*, evidenciou-se uma alta concentração do radiofármaco em rins ($64,07 \pm 20,59$ % e $22,93 \pm 10,40$ % dose/g 1 e 4 horas após injeção, respectivamente), fato explicado pela hidrofiliabilidade do peptídeo marcado. Estudos evidenciam que os rins, principalmente a célula tubular renal e *vasa recta* apresentam alta densidade de receptores para somatostatina, especialmente os tipos *sst2* e *sst5* (Kwekkeboom et al. 2000). Tal fato também deve contribuir para a alta captação renal além da reabsorção do peptídeo radiomarcado nas células tubulares após filtração glomerular.

Comparativamente, a captação renal observada nos camundongos *Nude* ($21,12 \pm 10,43$ % e $3,98 \pm 0,64$ % dose/g 1 e 4 horas após injeção, respectivamente), é menor que a observada nos camundongos *Swiss*, porém ainda expressiva.

Gandomkar e col. (2007) observaram níveis de captação renal do complexo HYNIC-Thr⁸-octreotideo em ratos *Lewis* de $2,95 \pm 0,56$ % e $2,13 \pm 0,20$ % dose/g 1 hora e 4 horas após a administração do radiofármaco. Kopecky e col. (2004), em estudo de biodistribuição do complexo EDDA-HYNIC-octreotídeo-^{99m}Tc em ratos *Wistar* descrevem captação renal de $6,92 \pm 3,11$ % e $4,86 \pm 0,69$ %, 1 e 2 horas após a administração do radiofármaco.

A alta captação renal observada na biodistribuição do HYNIC-octreotato-^{99m}Tc em comparação aos estudos publicados, pode ser atribuída a uma série de fatores, dentre eles, diferenças inter-espécies (considerando-se a possibilidade de haver expressão diferente de receptores para somatostatina no tecido renal, nas diferentes espécies de animais), diferenças no estado de hidratação dos animais, além de serem tratados com derivados diferentes da somatostatina (afinidades distintas pelos diferentes tipos de receptores de somatostatina).

Ainda nos estudos de biodistribuição, em contrapartida, observa-se uma baixa e favorável captação do HYNIC-octreotato-^{99m}Tc em fígado e intestinos delgado e grosso, considerada uma grande qualidade do radiofármaco, uma vez que existe uma alta incidência de tumores e metástases neuroendócrinas na região abdominal e captções nesses órgãos dificultariam uma avaliação.

O composto estudado apresentou um rápido clareamento sanguíneo. Uma

hora após administração observa-se menos de 1 % ($0,42 \pm 0,05$ e $0,74 \pm 0,48$ % dose sangue total em Nudes e Swiss, respectivamente) da dose administrada na corrente sanguínea. Além disso, baixa captação em tireóide e estômago indicam uma alta estabilidade *in vivo*.

A captação tumoral aparentemente baixa, especialmente se comparada com órgãos como os rins, deve ser avaliada em termos das relações tumor: órgãos não alvos. Neste sentido, a razão tumor:músculo para o tempo de uma hora foi de 2,0 e para o tempo de 3 horas de 4,8 (calculadas a partir da % dose/grama). A razão tumor:músculo indica a facilidade com que a massa tumoral poderá ser contrastada do tecido não específico para efeito de aquisição de imagem. Os valores obtidos de razão tumor:músculo são considerados excelentes, principalmente considerando-se o aumento da razão com o tempo, fato que indica a permanência relativa do produto no tumor, provavelmente relacionada à especificidade de ligação aos receptores tumorais e capacidade de internalização do produto.

Outra razão importante de ser observada é a razão tumor:sangue. Também neste caso, a razão aumenta com o tempo, sendo de 1,29 para 1 hora e 1,92 para 4 horas, indicando a especificidade da ligação do composto ao tumor.

Comparando-se o perfil de biodistribuição encontrado neste estudo com os da literatura, observa-se que, embora os valores absolutos sejam diferentes, a biodistribuição é comparável. Tais diferenças devem ser analisadas com critério, tendo em vista o modelo animal e tumoral utilizado.

A literatura descreve diferentes formulações de reagentes liofilizados, como por exemplo, utilizando frascos separados, ou seja, coligantes liofilizados em um frasco e peptídeo e agente redutor em outro (Ciávaro et al, 2005).

Optou-se pela formulação mais prática, tanto para sua produção como para a marcação, disponibilizando-se todos os reagentes liofilizados em um único frasco, acompanhando para a marcação um frasco com tampão fosfato 0,1M pH 6,2.

Avaliando a estabilidade do reagente liofilizado com pré-congelamento em nitrogênio líquido até o 4º mês, não foram evidenciadas diferenças no rendimento radioquímico das marcações dos liofilizados, ficando acima de 90 % da espécie

ativa em ambos os casos. O controle de 6 meses já demonstrou uma queda do rendimento de marcação (88,62% em ITLC e 86,54% em CLAE), indicando que possivelmente o prazo estabelecido para utilização do reagente liofilizado seja de 4 meses (Tabela 18) para as condições de liofilização utilizada.

A análise da formulação realizada sem o pré-congelamento líquido foi prejudicada por problemas identificados no liofilizador (mencionado em resultados). Os rendimentos radioquímicos até o 4^o mês foram superiores a 90%, indicando, talvez, que o pré-congelamento não acrescentaria estabilidade ao reagente liofilizado. No entanto existe a necessidade de comprovação destes resultados, em um estudo envolvendo um número maior de lotes produzidos nas duas condições estudadas.

Entre os estudos dos parâmetros de marcação, evidenciados nas Tabelas 21, 22 e 23, a condição de atividade máxima de 1480 MBq (40mCi) de pertecnetato de sódio em 2 mL e banho-maria a 100°C (água em ebulição) por 15 minutos foi a condição que apresentou melhores resultados no rendimento radioquímico (rendimentos superiores a 92%). Os resultados sugerem que um frasco do reagente liofilizado possibilitaria a marcação e utilização para um paciente adulto, considerando-se uma faixa de atividade a ser administrada em torno de 1110 MBq (30mCi).

7 -Conclusão

Os resultados deste estudo possibilitaram estabelecer a formulação do reagente liofilizado HYNIC-Tyr³-octreotato para pronta marcação com ^{99m}Tc e as melhores condições de marcação.

Os estudos realizados permitem concluir que o regente liofilizado EDDA-tricina-HYNIC-Tyr³-octreotato foi obtido com estabilidade suficiente para comercialização do produto. Os estudos das variáveis de marcação definiram os limites para obtenção de bons resultados de pureza radioquímica e contribuindo para a composição da bula do produto no requisito “Instruções de marcação”.

Os resultados dos estudos de biodistribuição e, particularmente, o rápido clareamento sanguíneo, a captação insignificante na região abdominal e significativa captação tumoral, elegem o composto como candidato potencial para aplicações e ensaios clínicos envolvendo o diagnóstico de tumores neuroendócrinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANERJEE S.; PILLAI M.R.A.; RAMAMOORTHY,N. Evolution of Tc-99m in diagnostic radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine* v. 31 n.4 p.260-270, 2001.

BLOCK,D.; FEITSMA,R.I.J; VERMEIJ,P.; PAUWELS, E.J.K. Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine. *European Journal of Nuclear Medicine* v.26 n.11 p.1511-1519,1999.

BOMBARDIERI,E.; AKTOLUN,C.; BAUM,R.P.; DELALOYE-BISHOF,A.; BUSCOMBE,J.; CHATAL,J.F.; MAFFIOLI,L.; MONCAYO,R.; MORTELMANS,L.; RESKE,S.N. ¹¹¹In-Pentretotide scintigraphy procedure guidelines for tumor imaging.Gidelines of the Oncology Committee of the European Association of Nuclear Medicine; set.2003.

BREEMAN, W.A.P.; VANHAGEM,M.P.; VISSERWISSELAAR,H.A. *In vitro* and *in vivo* studies of substance P receptor expression in rats with the new analog [Indium 111 DTPA Arg(1)] substance P. *Journal Nuclear. Medicine* v.37 p.108-117, 1996.

BREEMAN, W.A.P. ; JONG, M.; KWEKKEBOOM, D.J.; VALKEMA, R.; BAKKER, W.H.; KOOIJ, P.M.; VISSER, T.J.; KRENNING, E.P. Somatostatina receptor-mediated imaging and therapy: basic science, current knowledge, limitations and future perspectives. *European Journal of Nuclear Medicine* v.28 p.1421-1427, 2001.

CARVALHO, G.L.C. Estudo da viabilidade da marcação com tecnécio-99m do anticorpo antimiosina íntegro e seu fragmento: Desenvolvimento de radiofármaco para avaliação cardíaca. Tese (Mestrado) – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2007.

CIÁVARO, M.;OBENAU, E.F G.; CASTIGLA, S.G. HYNIC-TOC labeled with ^{99m}Tc via an instant kit formulation: Preliminary results. Anais do XX Congresso de Alasbimn, Uruguai, 2005.

CWIKLA, J.B., MIKOLAJCZAK, R.; PAWLAK, D.; BUSCOMBE, J.R.; GUTTMEJER-NASIEROWSKA, A.; BATOR, A.; MAECKE, H.R.; WALECKI, J. Initial direct comparison of ^{99m}Tc -TOC and ^{99m}Tc -TATE in identifying sites of disease in patients with proven GEP NETs. *The Journal of Nuclear Medicine* v.49 n.7 p.1060-1065, July 2008.

DASGUPTA, P. Somatostatin analogues: Multiple roles in cellular proliferation, neoplasia, and angiogenesis. *Pharmacology & Therapeutics* v.102 Issue 1, p. 61-85, April 2004.

DECRISTOFORO, C. MATHER, S.J. (b) Technetium-99m somatostatin analogues: effect of labeling methods and peptide sequence. *European Journal of Nuclear Medicine* v.26, p.869-876, 1999.

DECRISTOFORO, C. MATHER, S.J. (a) ^{99m}Tc -Technetium-labelled peptide-HYNIC conjugates: Effects of lipophilicity and Stability on biodistribution. *Nucl Med Biol* v.26 p.389-396, 1999.

DECRISTOFORO, C.; MELENDEZ-ALAFORT, L.; SOSABOWAKI, J.K.; MATHER, S.J. ^{99m}Tc -Hynic-[Tyr³]-Octreotide for imaging Somatostatin-Receptor-Positive Tumors: Preclinical Evaluation and Comparison with ^{111}In -Octreotide. *Journal of Nuclear Medicine* v. 41 p. 1114-1119, 2000.

DEGANI A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA P. C.; Cromatografia – um breve ensaio. *Química Nova na Escola* n. 7, 1998

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP) “Metodologia e Aplicações de radioisótopos” (Disciplina FBA0430). Apresenta figura gerador Molibdênio-99 / tecnécio-99m. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/Ensino/Graduacao/Disciplinas/LinkAula/My-Files/radiofarmacia.htm>> Acesso em 20 jul.2008.

GABRIEL, M.; DECRISTOFORO, C.; DONNEMILLER E.; ULMER, H.; RYCHLINSKI, C.W.; MATHER, S.J.; MONCAYO, R. An Inpatient Comparison of ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC with ^{111}In -DTPA-Octreotide for Diagnosis of Somatostatin Receptor-Expressing Tumors. *The Journal of Nuclear Medicine* v. 44 n. 5 p.708-716, 2003.

GABRIEL, M.; DECRISTOFORO, C.; MAINA, T.; NOCK, B.; GUGGENBERG E.; CORDOPATIS, P.; MONCAYO, R. ^{99m}Tc -N⁴-[Tyr³]Octreotate Versus ^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-[Tyr³]Octreotide: An inpatient comparison of two novel technetium-99m labeled tracers for Somatostatin Receptor Scintigraphy. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* v. 19, n.1 p.73-79, 2004.

GABRIEL, M.; DECRISTOFORO, C.; MAINA, T.; NOCK, B.; GUGGENBERG E.; CORDOPATIS, P.; MONCAYO, R. GANDOMKAR, M.; NAJAFI, R.; SHAFIEI, M.; MAZIDI, M.; EBRAHIMI, S.E.S. Preclinical evaluation of $^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{tricine}/\text{HYNIC}^0, 1\text{-NaI}^3, \text{Thr}^8$ -octreotide as a new analogue in the detection of somatostatin-receptor-positive tumors. *Nuclear Medicine and Biology* v.34 p 651-657, 2007.

GANDOMKAR, M.; NAJAFI, R.; SADAT, S.E.; BABAEI, M.H.; RABBANI, M.; SHABANI, G.A. Direct labelling of octreotide with ^{99m}Tc : effect of different concentration of reducing agents and amount of sodium pertechnetate on radiolabelling efficiency. *Applied Radiation and Isotopes* v. 58, Issue 3, p. 361-364, Marco 2003.

GANDOMKAR, M.; NAJAFI, R.; SHAFIEI, M.; MAZIDI, M.; EBRAHIMI, S.E.S. Preclinical evaluation of [$^{99m}\text{Tc}/\text{EDDA}/\text{tricine}/\text{HYNIC}^0, 1\text{-NaI}^3, \text{Thr}^8$]-octreotide as a new analogue in the detection of somatostatin-receptor-positive tumors. *Nuclear Medicine and Biology* v. 34 p.651-65, 2007.

GINJ, M. e MAECKE, H.R. Radiometallo-labeled Peptides in Tumor Diagnosis and Therapy University. Capítulo 4 p.109 *Metal Ions in Biological Systems* vol. 42 Disponível em: < <http://books.google.com/books> > Acesso em 22 jul. 2008.

GNANASEGARAN, G.; KAPSE, N.; BUSCOMBE, J.R. Recent trends in radionuclide imaging and targetted radionuclide therapy of neuroendocrine tumours. *Indian Journal of Nuclear Medicine* v.20 n.3 p.55-65 setembro 2005.

GOTTSCHALK, A.; SANDLER, M.P.; COLEMAN, R.E.; WALKERS, F.G.T.H.; HOFFER, P.B.; PATTON, J.A. Diagnostic Nuclear Medicine 3^a ed. v.2 1996, Pennsylvania, Williams & Wilkins Cap.55 p.1047-1066.

GUGGENBERG, E.V.; SARG, B.; LINDNER, H.; ALAFORT, L.M.; MATHER, S.J.; MONCAYO, R.; DECRISTOFORO, C. Preparation via coligant exchange and characterization of [^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-D-Phe¹, Tyr³] Octreotide (^{99m}Tc -EDDA/HYNIC-TOC) *J Label Compd Radiopharm* v.46 p.307-318, 2003.

GUGGENBERG, E.V.; MIKOLAJCZAK, R.; JANOTA, B.; RICCABONA, G.; DECRISTOFORO, C. Radiopharmaceutical development of a freeze-dried kit formulation for the preparation of [^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-D-Phe¹, Tyr³]-Octreotide, a Somatostatin analog for tumor diagnosis. *Journal of Pharmaceutical Sciences* v.93 n.10, October 2004.

HOFLAND,L.J.; LAMBERTS,S.W.J.; HAGEN,M.; REUBI,J.C.; SCHAEFFER,J.; WAAIJERS,M.; KOETSVELD,P.M.; SRINIVASAN,A.; KRENNING,E.P.; BREEMAN,W.A.P. Crucial role for somatostatin receptor subtype 2 in determining the uptake of [¹¹¹In-DTPA-D-Phe¹] Octreotide in somatostatin receptor-positive organs. *The Journal of Nuclear Medicine* v.44 n.8 p.1315-1321, 2003.

HUBALEWSKA-DYDEJCZYK,A.; FROSS,K.B.; MIKOLAJCZAK,R.; MAECKE,H.R.; HUSZNO,B.; PACH,D.; STASZCZAK,A.S.; JANOTA,B.; SZYBINSKI,P.; KULIG,J. ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-octreotate scintigraphy, na efficient method for the detection and staging of carcinoid tumors: results of 3 years' experience. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* v.33 n.10, October 2006.

KALTSAS, G.A.; KORBONITS,M.; HEINTZ,E.; MUKHERJEE,J.J.; JENKINS, P.J.; CHEW, S.L.; REZNEK, R.; MONSON, J.P.; BESSER,G.M.; FOLEY,R.; BRITTON,K.E.; GROSSMAN,A.B. Comparison of somatostatin Analog and Meatiodobenzylguanidine Radionuclides in the Diagnosis and Localization of Advanced Neuroendocrine Tumors. *The journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* v.86 n.2 p.895-902, 2001.

KALTSAS,G.A.; PAPADOGIAS,D.; MAKRAS,P.; GROSSMAN,A.B. Treatment of advanced neuroendocrine tumours with radiolabelled somatostatin analogues. *Endocrine-Related Cancer* v.12, p.683-699, 2005.

KOPECKY,M.;SEMECKY,V.;TREJTNAR,F.;LAZNICEK,M.;LAZNICKOVA, A.;NACHTIGAL,P.;DECRISTOFORO,C.;MATHER,S.J.; MÄCKE,H.R. Analysis of accumulation of ^{99m}Tc-octreotide and ^{99m}Tc-EDDA/HYNIC-Tyr³-octreotide in the rat kidneys. *Nuclear Medicine and Biology* v.31 p.231-239, 2004.

KRENNING,E.P.; BAKKER,W.H. Localisation of endocrine-related tumours with radioidinated analogue of somatostatin. *Lancet* v.1 p.242-244,1989

KRENNING,E.P.; BAKKER,W.H.; KOOIJ,W.A.P.; BREEMAN,H.Y.; OEI,M.; de JONG,M.; REUBI,J.C.; VISSER,T.J.; BRUNS,C.; KWEKKEBOOM,A.E.M.; REIJS,P.M.;van HAGEN,P.M.; KOPER,J.W.; LAMBERTS,S.W.J.Somatostatin Receptor Scintigraphy with Indium-111-DTPA-D-Phe-1-Octreotide in Man: Metabolism, Dosimetry and Comparison with Iodine-123-Tyr-3-Octreotide . *The Journal of Nuclear Medicine* v.33 n. 5 p.652-658,1992.

KWEKKEBOOM, D.; KRENNING, E.P. e JONG, M. Peptide Receptor Imaging and Therapy *The Journal of Nuclear Medicine* v.41 n.10 p.1704-1713, 2000.

LIU, G.; WESCOTT, C.; SATO, A.; WANG, Y.; LIU, N.; ZHANG, Y.M.; RUSCKOWSKI, M.; HNATOWICH, D.J. Nitriles form mixed-coligand complexes with ^{99m}Tc -HYNIC-Peptide. *Nuclear Medicine and Biology* v.29 p.107-113, 2002.

LIU, S.; EDWARDS, D.S.; LOOBY, R.J.; HARRIS, A.R.; POIRIER, M.J.; BARRETT, J.A.; HEMINWAY, S.J.; CARROLL, T.R. Labeling a Hydrazino Nicotinamide-Modified Cyclic IIb/IIIa Receptor Antagonist with ^{99m}Tc Using Aminocarboxylates as Coligands *Bioconjugate Chem.* v.7 (1) p.63 -71, 1996.

LIU, S.; EDWARDS D.S.; BARRETT. J.A. ^{99m}Tc Labeling of Highly Potent Small Peptides *Bioconjugate Chem.* v.8 (5), p. 621 -636, 1997.

LUI, S.; EDWARDS D.S.; HARRIS, A.R. A novel ternary ligand system for ^{99m}Tc -labeling of HydrazinoNicotinamide-modified biologically active molecules using Imine-N-containing heterocycles as coligands. *Bioconjugate Chem.* v.9 p.583-595, 1998.

MAINA, T.; STOLZ, B.; ALBERT, R.; BRUNS, C.; KOCH, P.; MACKE, H. Synthesis, radiochemistry and biological evaluation of a new somatostatin analogue (SDZ 219-387) labelled with technetium-99m. *European Journal of Nuclear Medicine* v.21 n.5 p. 437-444 , May 1994.

MAINA, T.; NOCK, B.; NIKOLOPOULOU, A.; SOTIRIOU, P.; LOUDOS G.; MAINTAS, D.; CORDOPATIS, P. ; CHITELLIS, E. [^{99m}Tc] Demotate, a new ^{99m}Tc -based [Tyr^3] octreotate analogue for the detection of somatostatin receptor-positive tumours: synthesis and preclinical results. *European Journal of Nuclear Medicine* v.29 p.742-753, 2002.

MAECKE, H.R.; BEHE, M New octreotide derivatives labeled with technetium-99m. *The Journal of Nuclear Medicine* v.37 (suppl):29P, 1996

MARQUES, F.L; OKAMOTO, M.R.Y; BUCHPIGUEL, C.A. Alguns aspectos sobre geradores e radiofármacos de tecnécio-99m e seus controles de qualidade. *Radiol Bras* v.34 n.4 São Paulo jul./ago. 2001

NIKOLOPOULOU, A.; MAINA,T.; SOTIRIOU,P.; CORDOPATIS,P.; NOCK,B.A. Tetraamine-modified octreotide and octreotate: labeling with ^{99m}Tc and preclinical comparison in AR4-2J cells and AR4-2J tumor-bearing mice. *Journal of Peptide Science* v.12 p.124-131, 2006.

OBENAUS, E.R; EDREIRA, M.M.; CRUDO, J.L. Análogos de Somatostatina marcados com ^{99m}Tc . Comisión Nacional de Energía Atómica. Centro Atómico Ezeiza. Unidad de Actividad Radioquímica, Radiofármacos, 1999.

ODDSTIG,J.; BERNHARDT,P.; NILSSON,O.; AHLMAN,H.; FORSELL-ARONSSON,E. Radiation-induced up-regulation of somatostatin receptor expression in small cell lung cancer in vitro. *Nuclear Medicine and Biology* v.33 p.841-846, 2006.

OKARVI, S.M. Peptide-Based radiopharmaceuticals: Future tools for diagnosis imaging of cancers and other diseases. *Medicinal Research Reviews* v. 24 n.3 p. 357-397, 2004.

OLIVEIRA, R.; SANTOS, D.; FERREIRA,D.; COELHO,P.;VEIGA,F. Preparações radiofarmacêuticas e suas aplicações. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas* v.42 n.2 São Paulo Abril/Junho 2006.

PANZUTO,F.; NASONI S.; BACCINI, F.; CASSETA,S.; CORLETO, V.D.; FAVE, D.G. Unlabelled somatostatin analogues in treatment of digestive endocrine tumours. [*Digestive and Liver Disease* v.36, Suppl 1](#), p S42-S47, 2004.

PERKINS, A.C. In vivo molecular targeted radiotherapy. *Biomed Imaging Interv J* v.1(2):e9, 2005.

QUINTANA, J.C. Terapia de tumores neuroendócrinos com análogos de Somatostatina. I Congresso Chileno de Medicina Nuclear, 2004.

RENNEN,H.J.J.M.; BOERMAN,O.C.; KOENDERS,E.B.; OYEN,W.J.G.; CORSTENS,H.M. Labeling proteins with Tc-99m via Hydrazinonicotinamide (HYNIC): Optimization of the conjugation reaction. *Nuclear Medicine & Biology* v.27 p.599-604, 2000.

REUBI,J.C.; WASER,B.; SCHAER, J.C; Unsulfated DTPA – and DOTA-CCK analogs as specific high-affinity ligands for CCK-B receptor-expressing human and rat tissues in vitro and in vivo. *Eur.J.Nucl.Méd.* v.25 p.481-490,1998.

REUBI, J.C.; SCHAR, J.C.; WASER, B.; HEPPELER, A.; SCHMITT, J.S.; MACKE, H.R. Affinity profiles for human somatostatin receptor subtypes SST1-SST5 of somatostatin radiotracers selected for scintigraphic and radiotherapeutic use. *European Journal of Nuclear Medicine* v.27 p.273-282, 2000.

ROCHA,A.F.G e HARBERT,J.C. Medicina Nuclear Bases. Ed.Guanabara Koogan cap12 p.175-184,1979.

SAHA, G. B. Fundamentals of nuclear pharmacy . 4ª Edição Springer p 34-170,1998.

SEREGNI, E.; CHITI, A.; BOMBARDIERI, E. Radionuclide imaging of neuroendocrine tumours: biological basis and diagnostic results. *European Journal of Nuclear Medicine* v.25 p.639-658, 1998.

SHI,W.; JOHNSTON C.F.; BUCHANAN,K.D.; FERGUSON,W.R.; LAIR,J.D.; CROTHERS,J.G.; McILRATH, E.M. Localization of neuroendocrine tumours with [¹¹¹In]DTPA-octreotidescintigraphy (Octreoscan): a comparative study with CT and MR imaging. *QJ Med : An International Journal of Medicine* v.91 p. 295–301, 1998.

SIGNORE, A.; ANNOVAZZI, A.; CHIANELLI, M.; CORSETTI, F.; WIELE, C.V.; WATHERHOUSE,R.N.; SCOPINARO, F. Peptide radiopharmaceuticals for diagnosis and therapy. *European Journal of Nuclear Medicine* v. 28 p.1555-1565, 2001.

STORCH,D.; BEHE,M.; WALTER, M.A.; CHEN,J.; POWELL,P.; MIKOLAJCZAK,R.; MACKE,H.R. Evaluation of [^{99m}Tc/EDDA/HYNIC⁰]Octreotide Derivatives Compared with [¹¹¹In-DOTA⁰,Tyr³,Thr⁸]Octreotide and [¹¹¹In-DTPA⁰]Octreotide: Does Tumor or Pancreas Uptake Correlate with the Rate of Internalization? *Journal Nuclear Medicine* v.46 p.1561-1569, 2005.

THRALL,J.H. e ZIESSMAN,H.A. *Medicina Nuclear* 2ª edição Guanabara Koogan cap. 4 Radiofarmácia p. 52-58, 2001.

UnB - Universidade de Brasília - Instituto de Química. Disponível em: http://www.unb.br/iq/litmo/disciplinas/tecnica_pesquisa_I/Cromatografia.DOC
Acesso em: 07 de jul.2008.

VALLABHAJOSULA, S. Radiopharmaceuticals in oncology. In: KHALKHALI, I.; MAUBLANT, J.C.;GOLDSMITH, S.J., (Eds.). *Nuclear oncology* diagnosis and therapy. Philadelphia: Lippincott Williams and Williams p. 31-59, 2001.

VAZQUEZ-GONZÁLES,A.; FERRO-FLORES,G.; MURPHY,C.A.; GUTIÉRREZ-GARCÍA,Z. Biokinetics and dosimetry in patients of 99mTc-EDDA/HYNIC-Tyr³-octreotide prepared from lyophilized kits. *Applied Radiation and Isotopes*. Disponível em: <http://www.elsevier.com/locate/apradiso>
Acesso em: 10 de maio 2007.